UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

TEMA DE TESIS

DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FHL-18, UN NUEVO COMPUESTO CISTICIDA

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. Karina Lizbet Mendoza Macedo

TUTORA: Dra. Helgi Jung Cook **2010**

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dra. Luz Elena Vera Ávila
PRIMER VOCAL	Dr. Alberto Rojas Hernández
SEGUNDO VOCAL	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez
TERCER VOCAL	Dr. Francisco Hernández Luís
SECRETARIO	Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero

AGRADECIMIENTOS

- A CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

- Al proyecto PAPIIT IN-211209 por el financiamiento de esta investigación.

- A mi tutora la Dra. Helgi Jung Cook por brindarme todo su apoyo en los momentos más difíciles, guiarme en la realización de esta tesis y por permitirme conocer a la maravillosa persona que es.

- A los miembros de mi jurado por las sugerencias realizadas para el mejoramiento de esta tesis.

- A todas las personas del laboratorio de Neuropsicofarmacología (Francis, Iliana, Sury, Nelly, Susi y Héctor) ya que gracias a sus consejos, apoyo y sugerencias fue posible el desarrollo experimental de este proyecto.

- A mi madre, a mi papá Jesús, a mi hermano y a mi tía por su gran apoyo.

- A la Universidad Nacional Autónoma de México

- A mis queridos amigos del laboratorio 124

- A mis amigos de Farmacocinética

- A todos los amigos que a lo largo de estos años han sido parte importante de mi vida

Este trabajo se llevó acabo en el laboratorio 112 del área de Farmacia
del conjunto E, Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

ÍNDICE GENERAL

Capítulo	***Pág.***
Índice general	I
Índice de tablas	IV
Índice de figuras	V
Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. *Taenia solium*	3
2.1.1. Ciclo biológico	4
2.2. Neurocisticercosis	6
2.2.1. Epidemiología	7
2.2.2. Neurocisticercosis en México	8
2.2.3. Diagnóstico	8
2.2.4. Manifestaciones clínicas	9
2.2.5. Tratamiento	10
2.2.6. Prevención	11
2.3. Albendazol	12
2.3.1. Características	12
2.3.2. Mecanismo de acción	13
2.3.3. Farmacocinética	13
2.3.4. Terapia	15
2.4. Análogos del albendazol	15
2.4.1. Evaluación de análogos del albendazol *in vitro*	15
2.4.2. Evaluación de análogos del albendazol *in vivo*	17
2.4.3. Análisis molecular	18
2.5. Evaluación de nuevas moléculas	19
2.5.1 Determinación de las propiedades fisicoquímica	19
2.5.2. Estudios preclínicos	22
2.5.2.1. Estudios farmacológicos	22
2.5.2.2. Estudios farmacocinéticos	25
2.5.2.3. Toxicidad	27

Capítulo ***Pág.***

2.5.3. Estudios clínicos 28

2.6. Validación de métodos analíticos 31

2.7 Cromatografía de líquidos de alta resolución 34

3. Objetivos 35

3.1. Objetivo general 35

3.2. Objetivos específicos 35

4. Parte experimental 36

4.1. Material, reactivos e instrumentos 36

4.2. Desarrollo y validación del método analítico 37

4.2.1. Estimación del pKa y el coeficiente de partición 37

4.2.2. Preparación de soluciones 37

4.2.3. Preparación de solución estándar, curva de calibración y puntos control 38

4.2.3.1. Solución estándar de FHL-18. Concentración de 50 μg/mL 38

4.2.3.2. Solución estándar de diazepam. Concentración de 1 μg/mL 38

4.2.3.3. Preparación de la curva de calibración de FHL-18 en plasma 38

4.2.3.4. Preparación de los puntos control en plasma y en solución 39

4.2.4. Procedimiento de extracción 41

4.2.5. Condiciones cromatográficas 43

4.2.6. Validación del método analítico para la cuantificación de FHL-18 en plama 43

4.2.6.1. Selectividad 43

4.2.6.2. Linealidad 44

4.2.6.3. Precisión 45

4.2.6.3.1. Repetibilidad 46

4.2.6.3.2. Precisión intermedia 46

4.2.6.4. Exactitud 46

4.2.6.5. Recuperación absoluta 47

Capítulo ***Pág.***

4.2.6.6. Estabilidad 48

4.3. Cinética de degradación de FHL-18 48

4.3.1. Estudio a temperatura ambiente 48

4.3.2. Estudio a temperatura corporal de la rata 50

4.3.3. Estudio de farmacocinética de FHL-18 50

5. Resultados y análisis de resultados 51

5.1. Estimación del pKa y el coeficiente de partición 51

5.2. Desarrollo del método analítico 51

5.2.1. Determinación de la solubilidad 51

5.2.2. Selección de las condiciones cromatográficas 52

5.2.2.1. Determinación de la longitud de onda de máxima absorción 52

5.2.2.2. Elección de la columna y fase móvil 53

5.2.2.3. Velocidad de flujo y tiempo de corrida 55

5.2.2.4. Condiciones cromatográficas finales 56

5.2.3. Elección del estándar interno 57

5.2.4. Desarrollo del método de extracción 59

5.3. Validación del método 60

5.3.1. Selectividad 60

5.3.2. Linealidad del método 62

5.3.3. Precisión del método 66

5.3.3.1. Repetibilidad 66

5.3.3.2. Precisión intermedia 66

5.3.4. Exactitud 67

5.3.5. Recobro absoluto 69

5.3.6. Estabilidad 70

5.4 Cinética de desaparición de FHL-18 70

5.4.1. Cinética a temperatura ambiente 70

5.4.2. Cinética a temperatura corporal de la rata (38° C) 74

5.4.3. Estudio de detección de FHL-18 en ratas administradas 77

6. Conclusiones 80

7. Perspectivas 81

8. Bibliografía 82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla ***Pág.***

Tabla 1. Actividad de los análogos del albendazol contra cisticercos de *Taenia crassiseps* durante 11 días 17

Tabla 2. Comparación entre la Nom 177-SSA-1998 32

Tabla 3. Valores promedio, desviación estándar y % de C.V. de las tres curvas para linealidad 62

Tabla 4. Pendiente, intercepto, ecuación de la recta y coeficiente de correlación para las tres curvas 62

Tabla 5. Análisis de varianza para las diferentes ordenadas y pendientes 64

Tabla 6. Desviación absoluta para los datos de linealidad (tres curvas) 65

Tabla 7. Resultados de la repetibilidad del método 66

Tabla 8. Resultados de la precisión intermedia 67

Tabla 9. Desviación absoluta para los datos de reproducibilidad 68

Tabla 10. Desviación absoluta de los datos de repetibilidad 69

Tabla 11. Resultados del recobro absoluto 70

Tabla 11. Resultados de cada curva para determinar el orden de reacción 71

Tabla 12. Resultados de cada curva para determinar el orden de reacción y parámetros para cada cinética 71

Tabla 13. Análisis de residuales para la cinética de orden cero 72

Tabla 14. Análisis de residuales para la cinética de primer orden 72

Tabla 15. Resultados de la cinética a 38 ºC 75

Tabla 16. Parámetros de la cinética de primer orden 76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		*Pág.*
Figura 1.	*Taenia solium*	3
Figura 2.	Cisticercos de *Taenia solium*	3
Figura 3.	Ciclo de vida de *Taenia Solium*	5
Figura 4.	Localización de cisticercos en el cerebro	6
Figura 5.	Prevalencia de neurocisticercosis en el mundo	7
Figura 6.	Estructura química del Albendazol	12
Figura 7.	Productos del metabolismo del albendazol	14
Figura 8.	Estructuras químicas de los análogos del albendazol evaluados	16
Figura 9.	Eficacia cisticida *in vivo* de albendazol (ALB) y del compuesto FHL18. Las barras representan la eficacia promedio ± DE (n=6)	18
Figura 10.	Numeración del anillo bencimidazólico	19
Figura 11.	Señalización de los pKa de FHL-18	51
Figura 12.	Espectro de absorción de FHL-18 en acetonitrilo de 200 a 400 nm	52
Figura 13.	Cromatograma de FHL-18 (11.365 min.) con una columna Waters Spherisorb ODS (5 μm, 4.6 x 250 mm.)	53
Figura 14.	Cromatograma de FHL-18 (aprox. 6 min.), no se observa debido a la interferencia con el plasma. Fase móvil acetonitrilo:agua:metanol (50:45:5)	54
Figura 15.	Cromatograma de FHL-18 (aprox. 8 min.) debido a la interferencia con el plasma. Fase móvil acetonitrilo:agua:metanol (20:30:50)	55
Figura 16.	Cromatograma de FHL-18 (7.413 min.) y el estándar interno (8.327 min.) no presentan una buena simetría. Fase móvil agua:metanol (60:40)	55

Figura ***Pág.***

Figura 17. Cromatograma de FHL-18 (6.909 min.) que se observa coleado debido a una velocidad de flujo más alta que la adecuada 56

Figura 18. Cromatograma con las condiciones cromatográficas finales 56

Figura 19. Cromatograma de FHL-18 (8.614 min.) y Prazicuantel (9.631 min.) 56

Figura 20. Cromatograma de Mebendazol (4.923 min.) 57

Figura 21. Cromatograma de Acenafteno (5.414 min.) 58

Figura 21. Cromatograma de Alobarbital (4.324 min.) 58

Figura 23. Diazepam 59

Figura 24. Blanco de plasma 61

Figura 25. Blanco de plasma + estándar interno 61

Figura 26. FHL-18 + estándar interno 61

Figura 27. Linealidad del método para FHL-18 en plasma 62

Figura 28. Cinética de orden cero para FHL-18 a 450 ng/mL 73

Figura 29. Cinética de primer orden para FHL-18 a 450 ng/mL 73

Figura 30. Cinética de orden cero para FHL-18 a 900 ng/L 74

Figura 31. Cinética de primer orden para FHL-18 a 900 ng/L 74

Figure 32. Cinética de orden cero para FHL-18 (450 ng/mL) a 38° C 75

Figure 33. Cinética de orden cero para FHL-18 (900 ng/mL) a 38° C 76

Figure 34. Cinética de primer orden para FHL-18 (450 ng/mL) a 38° C 77

Figure 35. Cinética de primer orden para FHL-18 (900 ng/mL) a 38° C 77

Figure 36. Cromatograma de plasma de rata 4 horas después de la administración de FHL-18 78

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias son afecciones infecciosas que atacan a poblaciones enteras y dejan graves secuelas en las personas que las padecen. Pese a esto, la investigación para combatir estos padecimientos no es prioritaria para la industria farmacéutica, ya que se presenta con mayor frecuencia en países en vías de desarrollo.

Existe una serie de derivados bencimidazólicos que han demostrado ser útiles para el tratamiento de enfermedades parasitarias, siendo uno de ellos el albendazol. Este compuesto es el fármaco de elección para el tratamiento de la neurocisticercosis. A pesar de su extenso uso, el fármaco presenta una baja solubilidad en agua, lo cual da lugar a una gran variabilidad interindividual en la absorción y por ende en la respuesta terapéutica. Es por lo anterior, que se ha abierto la búsqueda de nuevas alternativas para combatir la enfermedad.

Recientemente, se sintetizó una serie de 13 derivados análogos del albendazol, los cuales fueron evaluados *in vitro* contra cisticercos de *Taenia crassiceps*. Uno de ellos, denominado FHL-18, presentó eficacia semejante a la del albendazol. Al evaluar su eficacia *in vivo*, en un modelo de cisticercosis murina, se encontró que la molécula también posee una buena potencia cisticida (Palomares-Alonso, 2008).

Estudios estructurales entre el albendazol y FHL-18, demuestran que existen características que comparten ambas moléculas, que son las que les confieren esta actividad cisticida; sin embargo, FHL-18, es una molécula más soluble en agua que el albendazol.

Por los resultados encontrados, se consideró de interés continuar con los estudios biofarmacéuticos del FHL-18. Para ello se requiere contar con un método analítico capaz de cuantificar la molécula en fluidos biológicos de tal manera que los resultados sean confiables y se pueda estimar su comportamiento en modelos animales.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Taenia solium*

La *Taenia solium* en su fase adulta es un gusano plano en forma de cinta, de color blanquecino, que mide entre 2 y 7 metros de largo. Su hospedero definitivo es el hombre. Habita en el intestino delgado de éste, donde vive anclada a la pared mediante un escólex (cabeza) con cuatro ventosas y un rostelo con una doble corona de ganchos. La *Taenia solium* posee una cabeza, la cual se encuentra unida a un cuello a partir del cual se desarrollan los segmentos o proglótidos, cada uno de los cuales es una unidad de reproducción autofecundante e independiente que produce huevos que contienen embriones infestantes; los proglótidos más distales, que son los grávidos, presentan ramas uterinas llenas de aproximadamente 50000 a 60000 huevos y habitualmente se desprenden del estróbilo en cadenas cortas que son eliminadas con las heces (Figura 1). Los huevos son esféricos, miden de 30 a 45 micrómetros y consisten de un embrión hexacanto (con seis ganchos) rodeado de una gruesa envoltura de colágeno que presenta apariencia radiada al microscopio (Meza Antonio, 2002).

El hospedero intermediario de *Taenia solium* es el cerdo, albergando la forma larvaria o cisticercosis. No hay otro hospedero definitivo natural, solamente se han podido cultivar gusanos inmaduros en roedores como hamsters y chinchillas, previa inmunosupresión. Por el contrario, la forma larvaria o cisticercosis puede afectar además del cerdo, al hombre y a otros mamíferos como perros y osos.

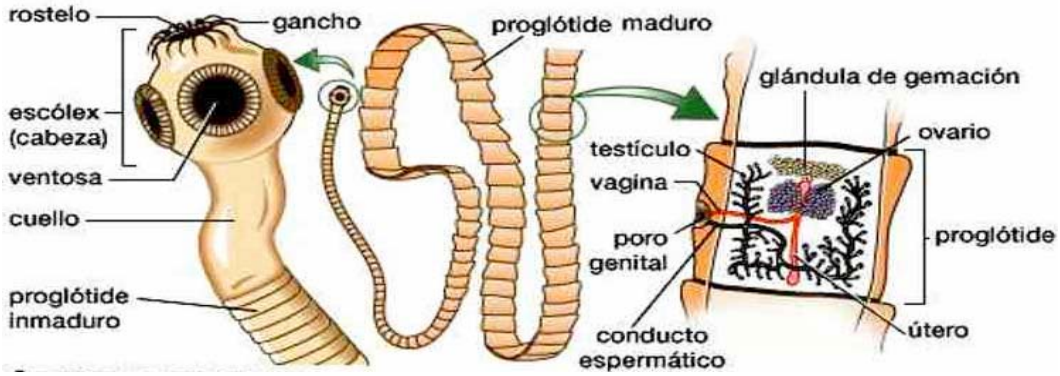


Figura 1. *Taenia solium*

El estadio larval o cisticerco es una vesícula de contenido líquido, en cuya pared interior se encuentra el escólex invaginado (Figura 2). Mide aproximadamente medio centímetro (de 2 a 15 mm), y se distingue en la carne infectada por su color blanquecino (Meza Antonio, 2002).

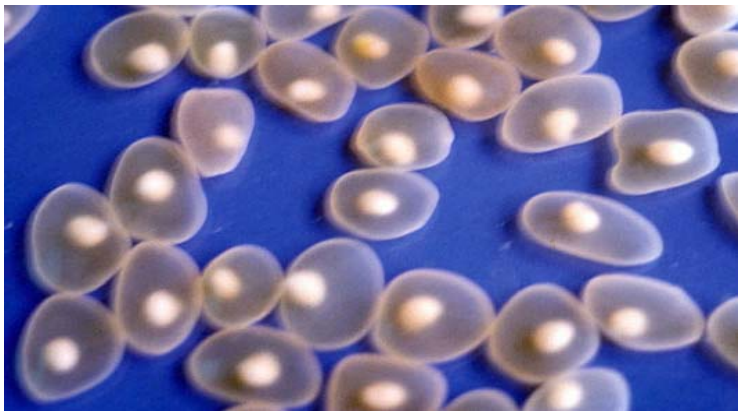


Figura 2. Cisticercos de *Taenia solium*

2.1.1. Ciclo biológico

Los cerdos por sus hábitos coprófagos, es decir que se alimentan de excremento, ingieren proglótidos que contienen decenas de miles de huevos, que por la acción de enzimas y sales biliares del tracto digestivo rompen el

embrióforo y eclosiona la oncósfera. Los embriones activados se fijan momentáneamente a la pared intestinal por medio de sus tres pares de ganchos, liberan enzimas hidrolíticas que destruyen el tejido y atraviesan la barrera intestinal llegando al torrente circulatorio para localizarse sobre todo en el músculo estriado y el cerebro (Imirizaldu L, 2004). Las estructuras microscópicas continúan su desarrollo hasta transformarse en cisticercos en un tiempo promedio de tres a cuatro meses dando como resultado la cisticercosis porcina (García Héctor, 2001). La carne de estos animales infectados contiene quistes larvarios que se desarrollarán en el intestino humano en forma de *Taenia*. Sin embargo, la neurocisticercosis no se produce por consumo de la carne de cerdo infectada por el parásito (Figura 3). Existe evidencia de que la fuente más común de contagio es la vía fecal-oral a través de un portador asintomático de *T. solium*. (Alarcón F, 2006).

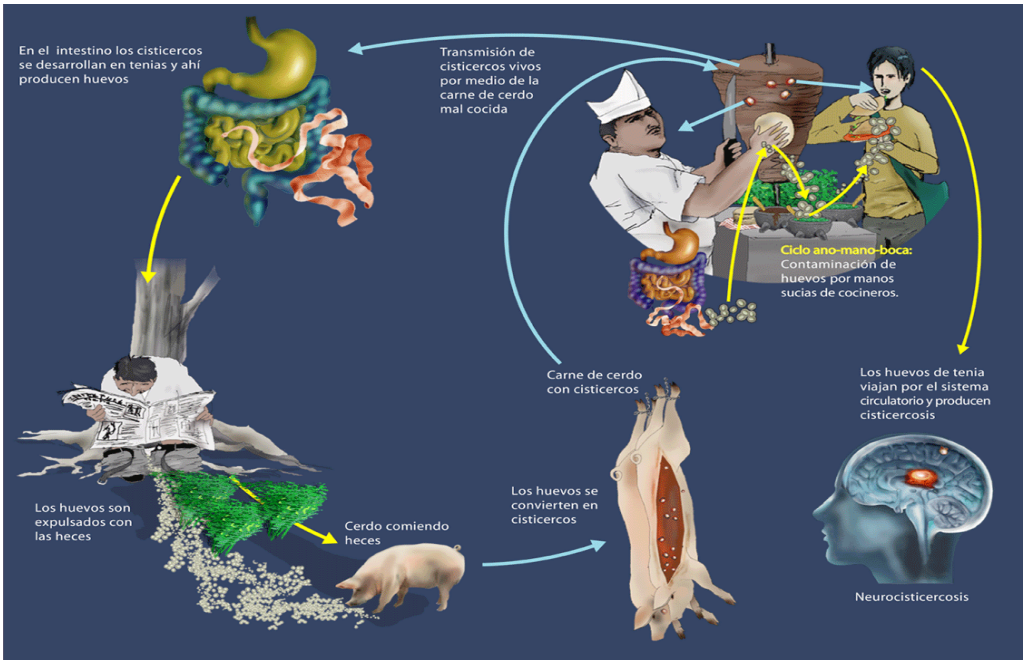


Figura 3. Ciclo de vida de *Taenia solium*

2.2. NEUROCISTICERCOSIS

La neurocisticercosis (NCC) es la enfermedad parasitaria más común del sistema nervioso central y es provocada por las larvas de *T. Solium* (Garg RK, 1997). La cisticercosis humana se presenta cuando los huevos excretados en las heces por un individuo portador de *Taenia solium* son ingeridos por una persona. El contagio indirecto, por medio de la ingesta de vegetales o agua contaminada es menos probable (Alarcón F, 2006)**.** Una vez que los huevecillos han sido ingeridos por el hombre, el mecanismo por el cual entran por el torrente sanguíneo y son distribuidos en los tejidos es similar al descrito para los cerdos.

Cuando los cisticercos entran en el sistema nervioso central pueden alojarse en el espacio subaracnoideo, en el parénquima, en los ventrículos cerebrales y en la médula espinal (Larralde C, 2006)

La forma y dimensión de los cisticercos está determinada por su distribución: los ventriculares y los subaracnoideos tienden a ser más grandes y frecuentemente multiobulados, mientras que los de la forma parenquimatosa por lo general son vesículas únicas, ovoides o esféricas, más o menos homogéneas, de 0.5 a 1 cm de diámetro (Larralde C, 2006)

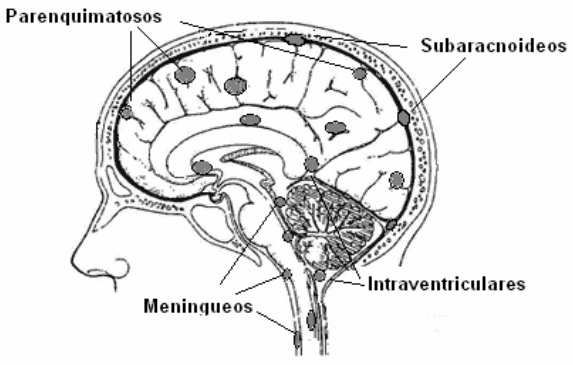


Figura 4. Localización de cisticercos en el cerebro

2.2.1. Epidemiología

La neurocisticercosis en una enfermedad que afecta principalmente a países en vías de desarrollo, tales como los localizados en América Central, América del Sur, África y algunos países de Asia. Sin embargo, la emigración hacia áreas no endémicas ha incrementado la prevalencia en algunos países de Europa y en Estados Unidos (Imirizaldu, 2004) (Figura 5).

En África central, en la India y al sudeste de Asia la neurocisticercosis es una patología endémica, en donde la carne se consume sin control higiénico. Sin embargo, debido a que el Corán prohíbe el consumo de carne de cerdo, esta enfermedad es casi inexistente entre los musulmanes. De igual manera, la cisticercosis es endémica en varios países de América Latina, tales como Brasil, México, Colombia, Perú, Ecuador, Bolivia, Panamá, Honduras, Belice y Guatemala (Del Bruto O, 1999).

Figura 5. Prevalencia de neurocisticercosis en el mundo.

2.2.2. Neurocisticercosis en México

La neurocisticercosis es un problema de salud en México ya que se estima que alrededor de 12% de las intervenciones neuroquirúrgicas son causadas por esta enfermedad (Pérez-López, 2003).

Estudios de autopsia en México revelaron que del 2.8 al 3.6% de los cuerpos presentan estos parásitos en el sistema nervioso central (Carpio Arturo, 2002).

Reportes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía indican que para el 2001, la tasa de morbilidad para cisticercosis por cada 100 habitantes fue de 1.1 para mujeres y 1.8 para hombres (Jiménez M, 2003).

La enfermedad es más prevalente en la zona del Bajío mexicano, donde se tienen grandes ranchos de ganado porcino (Del Bruto O, 1999).

2.2.3. Diagnóstico

Debido a las diferentes partes del cerebro en donde se puede localizar el parásito y a que los signos y síntomas no son específicos, es difícil diagnosticar la presencia de la enfermedad, así que el diagnóstico debe hacerse a través de una valoración conjunta de datos epidemiológicos, clínicos, inmunodiagnósticos y de neuroimagen. Debido a esto, se han propuesto cuatro categorías diagnósticas para la neurocisticercosis:

1. Absoluto: incluye la demostración histológica de cisticercos por biopsia cerebral o medular; lesiones quísticas en donde se pueda observar el escórlex del parásito; visualización de parásitos en el fondo del ojo; y demostración de anticuerpos específicos en el líquido encefalorraquídeo.

2. Mayor: lesiones altamente sugestivas de neurocisticercosis en estudios de neuroimagen.
3. Menor: lesiones compatibles con neurocisticercosis en las pruebas de neuroimagen y manifestaciones clínicas sugestivas.
4. Epidemiológico: Familiares que hayan padecido o que padezcan teniasis; haber residido en países donde la neurocisticercosis es endémica o viajar frecuentemente a dichos países (Pérez-López, 2003).

2.2.4. Manifestaciones Clínicas

Existe una gran variedad de diferencias individuales entre el número y la localización de los parásitos, así como la intensidad de la respuesta inmune por cada individuo, por lo que se considera a la neurocisticercosis como una enfermedad pleomórfica, con manifestaciones clínicas muy variadas. Sin embargo, la epilepsia es una manifestación frecuente, observándose en más del 70 % de los casos. En regiones endémicas, la presencia de epilepsia de inicio tardío es altamente sugestiva de esta enfermedad.

Además de la epilepsia se han podido apreciar una gran variedad de signos focales incluyendo déficit motor, ataxia cerebelosa, disfunción del tronco y movimientos involuntarios anormales (Del Bruto, 2005). Otra manifestación clínica es la hipertensión intracraneal, que puede asociarse a crisis convulsivas o deterioro cognitivo. La hidrocefalia debida a aracnoiditis, ependimitis granular o quistes ventriculares son las causas más comunes de este síndrome. En algunos casos se pueden desarrollar episodios súbitos de pérdida de la conciencia. Puede también ocurrir encefalitis que está relacionada con una

infestación masiva de cisticercos que inducen una respuesta inmune grave en el huésped (Alarcón, 2004).

2.2.5. Tratamiento

Como se mencionó anteriormente, la neurocisticercosis es una enfermedad pleomórfica, por lo que no es posible que sólo un tipo de tratamiento sea aplicado. Es de suma importancia saber la viabilidad y localización de las lesiones ya que a partir de este punto se puede planificar un tratamiento adecuado, el cual puede constar de: fármacos cisticidas, tratamiento sintomático, y/o cirugía (Del Brutto, 1999).

Fármacos cisticidas. Los fármacos de elección para combatir la enfermedad, son el prazicuantel y el albendazol, aunque es clara la superioridad de éste último, ya que el albendazol ha demostrado la destrucción de cisticercos parenquimatosos alrededor de 75-90%, mientras el prazicuantel sólo provoca la desaparición del 60-70% de los cisticercos del mismo tipo.

Un punto importante es que se ha demostrado que el tratamiento con estos fármacos mejora el curso clínico de los enfermos.

Este hecho se demostró en una serie de 203 pacientes con epilepsia debida a la neurocisticercosis, en la que se documentó el control de las crisis convulsivas en un 83% de los enfermos sometidos previamente a tratamiento con albendazol o prazicuantel, a diferencia de aquéllos que no recibieron dicho tratamiento, de los que únicamente un 27% logró un control adecuado de las crisis convulsivas (Pérez-López, 2003).

Tratamiento sintomático. Este tipo de tratamiento consiste en combatir los síntomas provocados por los cisticercos que habitan en el sistema nervioso central. Por ejemplo, en pacientes con epilepsia, la administración de un fármaco antiepiléptico produce un control adecuado de las crisis. El efecto antiinflamatorio de los corticosteroides contrarresta el efecto que provoca la muerte de los parásitos, cuando se administra de manera conjunta con fármacos cisticidas. Los corticosteroides también son de utilidad en casos de vasculitis cisticercosa, pues reducen el riesgo de infartos recurrentes, y disminuyen el riesgo de hidrocefalia o lesiones irreversibles en pacientes con aracnoiditis (Pérez-López, 2003).

Tratamiento quirúrgico. Este tipo de tratamiento es de segunda elección, cuando han fallado los otros tratamientos, o de primera línea, cuando se utiliza para tratar una hidrocefalia; para quitar quistes que obstruyen la circulación del líquido cefalorraquídeo, para extraer quistes de grandes dimensiones, o para disminuir la compresión medular (Pérez-López, 2003)

2.2.6. Prevención

Para el control de la cisticercosis se debe interrumpir la cadena de contagio. Se debe de insistir en las medidas sanitarias (lavado de manos, consumo de agua hervida en áreas endémicas, inspección adecuada de las carnes, etc.). Es imprescindible intentar localizar al paciente teniásico, que generalmente habita con los pacientes con neurocisticercosis, y administrarle el tratamiento de elección (Imirizaldu, 2004).

2.3. ALBENDAZOL

El albendazol es un antihelmíntico de amplio espectro que pertenece a la familia de los bencimidazoles. En 1987 se demostró que este fármaco es efectivo en el tratamiento de la neurocisticercosis (De Silca y col., 1997) y actualmente es el fármaco de elección para el tratamiento de esta enfermedad (Figura 6).

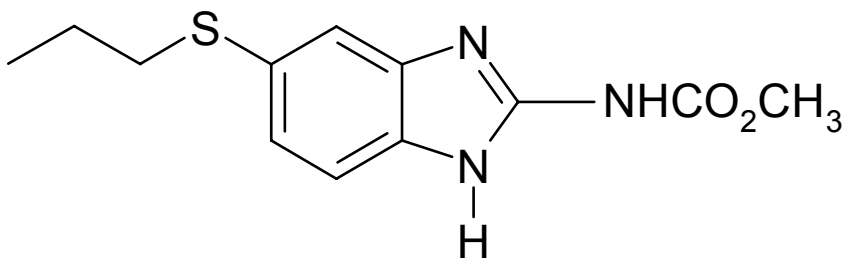


Figura 6. Estructura química del albendazol.

2.3.1. Características

Su nombre químico es: metil-5-(propiltio)-2-bencimidazol-carbamato.

Peso molecular: 265.33

Descripción: Es un polvo blanco, cristalino e inodoro.

Solublilidad: Soluble en dimetilsulfóxido, ácidos fuertes y bases fuertes, ligeramente soluble en metanol, cloroformo, acetato de etilo, y acetonitrilo. Es prácticamente insoluble en agua (Jung H., 2008).

Esta molécula cuenta con dos pKa: 10.47 y 2.90.

2.3.2. Mecanismo de acción

Se han propuesto diferentes mecanismos de acción para los bencimidazoles, uno de los cuales establece que estas moléculas se unen a la β-tubulina y cubren el microtúbulo, inhibiendo así la polimerización de la β-tubulina. Otro estudio sugiere que los bencimidazoles inducen cambios conformacionales en la β-tubulina lo que induce la despolimerización de los microtúbulos, es decir la separación de las proteínas que lo conforman. Ambos mecanismos coinciden en que el parásito, debido al daño que sufre en la función microtubular, no puede captar glucosa y muere (Robinson Mark, 2004).

2.3.3. Farmacocinética

La absorción de albendazol en el tracto gastrointestinal es pobre debido a su baja solubilidad acuosa. Después de su absorción, el fármaco es rápidamente metabolizado por el hígado, mediante el citocromo CYP 3A4 y probablemente también por el intestino a sulfóxido de albendazol, el cual se cree es la principal forma activa del fármaco. Posteriormente, este sulfóxido se metaboliza por medio del mismo citocromo a la sulfona de albendazol, que es un metabolito inactivo (Jung H, 2008) (Figura 7).

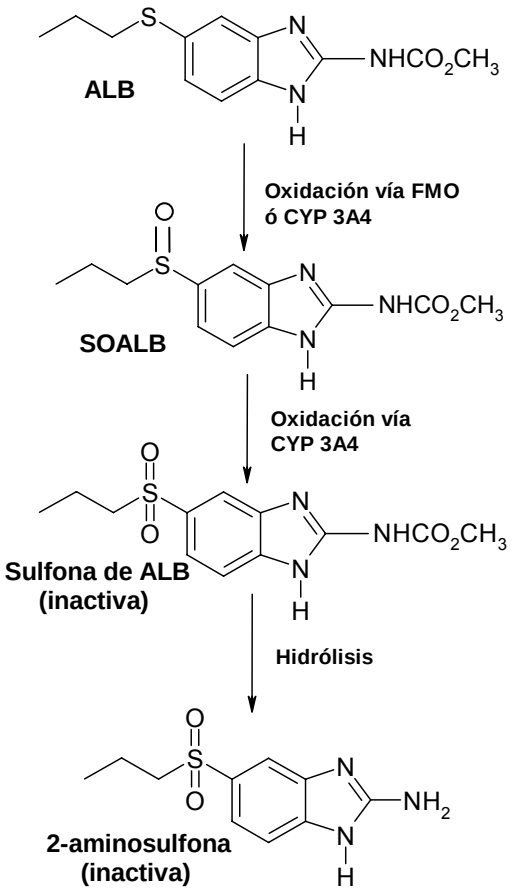


Figura 7. Productos del metabolismo del albendazol

La unión del albendazol a proteínas plasmáticas es alta, alrededor de 89-92%, mientras que el sulfóxido de albendazol se une en menor medida (62-67%).

La concentración plasmática del sulfóxido de albendazol varía ampliamente entre individuos. Este metabolito cruza la barrera hematoencefálica y sus niveles varían entre cada individuo (Massaite Osvaldo, 2004). El tiempo de vida media en humanos oscila entre 8-12 horas (Jung H, 2008).

Los metabolitos de albendazol son eliminados principalmente por excreción renal. Cabe mencionar que una vez que se ha formada la sulfona de albendazol, ésta puede sufrir otras biotransformaciones formando otros metabolitos inactivos (Figura 7).

2.3.4. Terapia

Dado que la neurocisticercosis es una enfermedad que por lo general afecta a personas con bajos recursos económicos, una ventaja del tratamiento con albendazol es su bajo costo, sin embargo, el tratamiento depende de varios factores, entre ellos, el número de cisticercos y su ubicación. Un claro ejemplo de cómo puede variar el tratamiento es el siguiente: el régimen de dosificación para neurocisticercosis parenquimatosa es de 15 mg/kg/día, dividido en dos dosis cada 12 horas por 8 días, sin embrago, para cisticercosis racemosa subaracnoidea la duración del tratamiento es de 1 mes (Massaiti O., 2004).

2.4. ANÁLOGOS DEL ALBENDAZOL

Debido a que el prazicuantel y el albendazol no son 100% efectivos para el tratamiento de la neurocisticercosis es necesario continuar con la búsqueda de nuevas moléculas que disminuyan la variabilidad y sean más efectivas. Por esta razón se sintetizaron una serie de nuevos compuestos bencimidazólicos, algunos de ellos análogos del albendazol, los cuales fueron sometidos a un estudio *in vitro* para evaluar su capacidad cisticida (Palomares F. 2009).

2.4.1. Evaluación de análogos del albendazol *in vitro*

El estudio *in vitro* de los análogos del albendazol (Figura 8) se llevó a cabo empleando cisticercos de *Taenia crassiceps*, que es un modelo validado y estandarizado. En este estudio se probaron dos concentraciones de cada uno de los compuestos, 0.28 y 1.7 μM, las cuales representan la concentración efectiva 50 (CE_{50}) y la concentración efectiva 90 (CE_{90}) del albendazol, en este

modelo. En el estudio se evaluó la mortalidad de los cisticercos en función del tiempo (11 días).

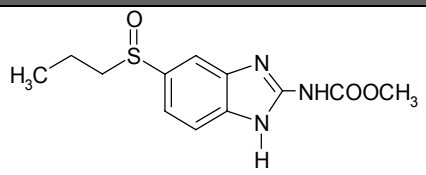
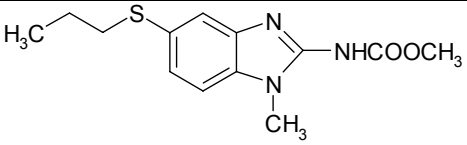
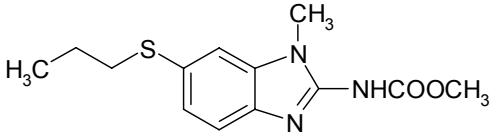
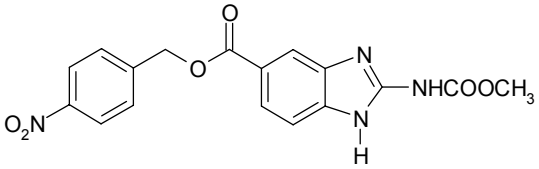
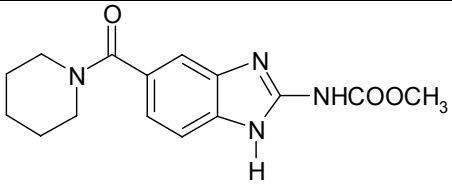
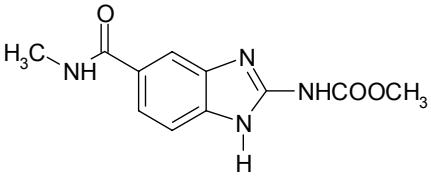
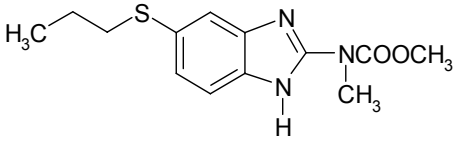
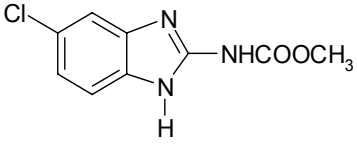
Nombre	Estructura
SOALB	
FHL13	
FHL14	
FHL18	
FHL19	
NLB24	
JPV001	
JVG40	

Figura 8. Estructuras químicas de los análogos del albendazol evaluados

En la Tabla 1 se presentan los resultados de la evaluación de los análogos, comparándolos con el sulfóxido de albendazol (SOALB). Estos resultados evidenciaron que los compuestos que presentaron una eficacia cisticida similar a la del sulfóxido del albendazol fueron FHL-18 y FHL-19, siendo el primero el más eficaz.

Tabla 1. Actividad de los análogos del albendazol contra cisticercos de *Taenia crassiseps* durante 11 días (Palomares F, 2009)

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

2.4.2. Evaluación de análogos del albendazol *in vivo*

Con base en los resultados anteriores, se decidió evaluar la actividad *in vivo* de la molécula con mayor eficacia: FHL-18. El estudio se realizó en un modelo de cisticercosis murina. En la Figura 9 se muestra la eficacia de FHL18, en comparación con el albendazol, después de la administración de una dosis de

216.6 mg/Kg y 150 mg/Kg, respectivamente durante 30 días. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, entre FHL-18 y albendazol. En el estudio, todos los animales sobrevivieron al tratamiento y no mostraron cambios en su alimentación. Al realizar la necropsia, tampoco se encontraron alteraciones evidentes en los órganos internos.

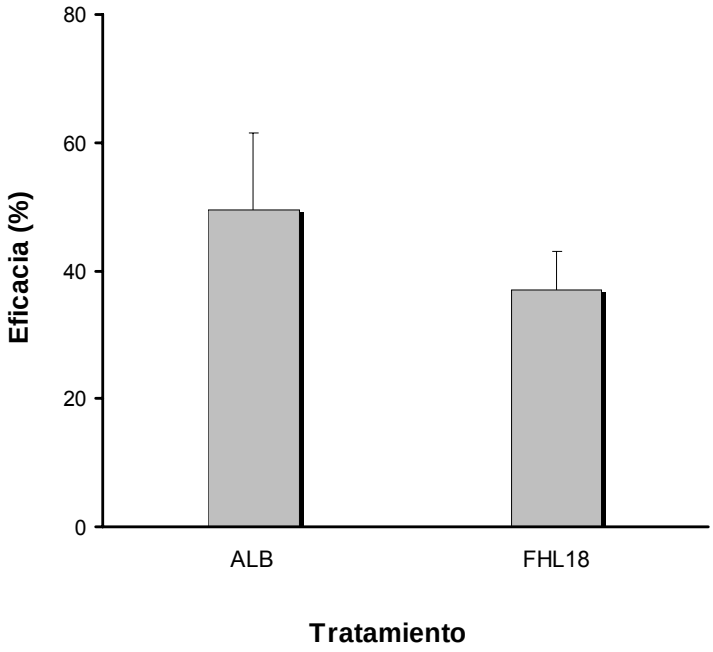


Figura 9. Eficacia cisticida *in vivo* de albendazol (ALB) y del compuesto FHL18 durante 30 días. Las barras representan la eficacia promedio ± DE (n=6) (Palomares F, 2009)

2.4.3. Análisis molecular

Se realizaron los estudios de modelado molecular con el fin de determinar cuales son lo requerimientos estructurales para la actividad cisticida de estas moléculas. Los resultados mostraron que si se introduce un grupo metilo en la posición 1, se anula completamente la actividad, y de igual manera, cuando se sustituye un átomo de hidrógeno en el nitrógeno del carbamato la actividad se

pierde esta actividad (Figura 10). Con estos resultados fue posible concluir que estos dos hidrógenos son indispensables para mantener la actividad cisticida. Por otro lado se observó que cuando se introduce un grupo voluminoso en la posición 5 del anillo y se encuentra ortogonal a éste, como el [(4-nitrobencil) oxi] carbonilo o el piperidin-1-ilcarbonilo (FHL18 y FHL19), la actividad fue muy cercana a la encontrada con el SOALB.

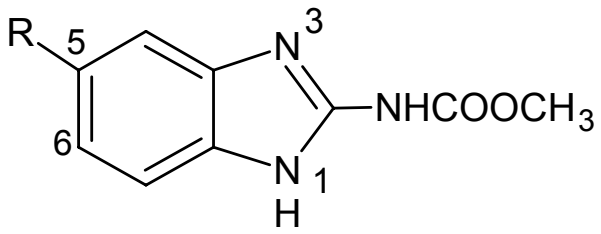


Figura 10. Numeración del anillo bencimidazólico

2.5. EVALUACIÓN DE NUEVAS MOLÉCULAS

Cuando una nueva molécula es sintetizada con fines terapéuticos es necesario saber si cuenta con las características necesarias para ser un fármaco potencial.

2.5.1. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Las primeras pruebas a realizar son la evaluación de sus propiedades fisicoquímicas las cuales incluyen:

a. Solubilidad acuosa. Este es un parámetro determinante en la absorción y por ende, juega un papel importante en la biodisponibilidad. Para que un fármaco pueda ser absorbido debe estar presente en solución

acuosa en el sitio de absorción (Ramesh P. 1999). La solubilidad de un compuesto puede ser determinada por métodos termodinámicos o por métodos turbidimétricos.

b. Permeabilidad: ésta es la habilidad de una molécula de cruzar la membrana biológica. Este parámetro es muy importante en lo que se refiere a absorción y se puede medir mediante las siguientes propiedades:

- Coeficiente de partición (P): este coeficiente describe la liposolubilidad intrínseca de la molécula, en ausencia de equilibrios de disociación, y permite predecir con que facilidad el compuesto atravesará las membranas biológicas.

  Uno de los métodos más empleados para determinar el coeficiente de partición se basa en la distribución en equilibrio de un compuesto entre una fase acuosa y otra lipídica.

- Coeficiente de distribución (D): es la relación de la concentración al equilibrio de un compuesto, en sus especies ionizadas y no ionizadas, entre dos fases inmiscibles. Describe la liposolubilidad efectiva de un compuesto a un valor determinado de pH (Smith D, 2006).

c. pKa: La teoría basada en el pH de partición en la que sólo especies neutras pueden atravesar la membrana ha sido modificado. Un ejemplo es un estudio realizado en células Caco-2, el cual indica que

las especies iónicas pueden contribuir considerablemente al transporte de fármacos. (Smith A, 2006). Sin embargo, sigue siendo de importancia la determinación del pKa, ya que si bien un compuesto en su forma ionizada puede atravesar membranas biológicas, es más sencillo que un fármaco pueda hacerlo en su forma no ionizada. Existen métodos para medir el valor del pKa, por ejemplo: electroforesis, espectroscopía y conductividad (Aulton M, 2004).

d. Tamaño de partícula: el peso molecular puede ser un factor limitante en la absorción oral. La regla de Lipinski establece que el peso molecular aceptable para una buena absorción oral es menor a 500 (Smith A, 2006).

e. Velocidad de disolución: este parámetro está dado por la solubilidad del fármaco a través del tiempo. Cuando se diseña una prueba de disolución es importante reproducir lo mejor posible las condiciones del tracto gastrointestinal ya que el objetivo de esta determinación es encontrar una característica *in vitro* que refleje su comportamiento *in vivo* (Aulton M, 2004).

2.5.2. Estudios preclínicos

Algunos de los estudios preclínicos que solicita la Food and Drug Administration (FDA) para poder registrar un nuevo fármaco son: estudios farmacodinámicos, farmacocinéticos, y toxicológicos.

2.5.2.1. Estudios farmacológicos

El objetivo principal de estos estudios es conocer la interacción del fármaco a nivel molecular, pero es de igual importancia el saber las consecuencias de dicha interacción en el organismo, es decir, estos estudios, de manera general, están encaminados a evaluar la seguridad y eficacia.

La International Conference on Harmonisation (ICH) en su guía S7A indica los requerimientos farmacológicos para determinar que un compuesto es seguro. Estos estudios farmacológicos pueden ser agrupados en 3 áreas:

- Farmacodinamia primaria: estos estudios implican el mecanismo de acción y el efecto que se desea de un compuesto. Para ello, es necesario determinar su selectividad, actividad, potencia y seguridad. Además se deben incluir los siguientes puntos: actividad del principio activo (*in vitro* e *in vivo*), comparación entre especies animales, medida de la actividad del compuesto y estudios previos de la resistencia a la molécula.

- Farmacodinamia secundaria: estos estudios, al igual que en la farmacodinamia primaria, están encaminados a determinar el mecanismo de acción y el efecto que presenta la molécula. Sin embargo, éstos se refieren a algún efecto alterno que pudiera presentar la molécula.

- Seguridad farmacológica: Los estudios de seguridad farmacológica se definen como aquéllos que investigan los efectos farmacodinámicos no deseados de una sustancia en las funciones fisiológicas relacionándolos con el intervalo terapéutico. En algunos casos los estudios farmacodinámicos secundarios contribuyen en la evaluación de seguridad cuando predicen o valoran efectos adversos en humanos.

En general los estudios farmacológicos deben realizarse de la siguiente manera:

Modelo de estudio. Este modelo evidentemente debe representar la enfermedad para la cual la molécula ha sido diseñada y debe estar previamente validado (FDA).

Estudios *in vivo* e *in vitro.* Las nuevas moléculas pueden ser evaluadas *in vitro*, empleando órganos, tejidos aislados, cultivos celulares, fragmentos celulares, organelos celulares, receptores, canales iónicos, transportadores, enzimas, o si están destinadas a combatir alguna enfermedad de origen parasitario, viral o bacteriano, empleando estos microorganismos. Sin embargo, no siempre es posible evaluar la actividad *in vitro*, así que también se pueden aplicar modelos animales, es decir *in vivo*, para observar si las moléculas sintetizadas presentan o no actividad (FDA).

Un punto importante que debe ser considerado es la potencia que presenta la molécula, es decir la cantidad de compuesto que se requiere para producir el efecto farmacológico deseado. Se estima que una molécula presenta una excelente potencia cuando exhibe su efecto a concentraciones menores o iguales a 1nM.

Diseño experimental. Tamaño de la muestra: el número de animales o de preparaciones asignados a la prueba permitirá demostrar adecuadamente el efecto biológico deseado. Ruta de administración: dentro de lo posible, esta ruta debe ser la que se espera utilizar en los estudios clínicos (FDA).

Concentraciones o dosis durante el estudio.

In vivo: Los estudios farmacológicos de seguridad deben estar diseñados para definir la relación entre la dosis-respuesta de un efecto adverso observado. Generalmente, la dosis elegida debe incluir y exceder el rango terapéutico definido para el compuesto. Es necesario hacer mención de que existe diferente sensibilidad entre algunas especies animales (FDA).

In vitro: Estos estudios deben estar diseñados para establecer la relación concentración-respuesta. El intervalo de concentraciones usado debe ser seleccionado aumentando la probabilidad de detectar la actividad deseada.

Duración de los estudios. La duración del estudio debe estar basada en la duración que se espera del tratamiento (FDA).

Estudios de metabolitos y isómeros. Cuando se sabe que un compuesto presentará algún metabolito, éste debe ser evaluado en estudios farmacológicos de seguridad.

Cuando el compuesto presenta una mezcla racémica, es necesario realizar los estudios *in vivo* e *in vitro* pertinentes, para determinar la seguridad y eficacia de los compuestos (FDA).

2.5.2.2. Estudios farmacocinéticos

Muchas de las moléculas que son candidatas a ser fármacos poseen propiedades farmacocinéticas no deseadas, como una vida media muy larga o corta, una pobre absorción y un extenso metabolismo de primer paso, es decir, que se metaboliza en una gran proporción cuando pasa por el hígado. En 1988 se reportó que de 198 nuevos candidatos para ser investigados en humanos, 77 (40%) presentó serios problemas de farmacocinética (Jiunn H. Lin, 1997).

Existen algunos parámetros farmacocinéticos que son críticos en el desarrollo de nuevos fármacos como son:

Absorción: La absorción de un fármaco se ve influenciada por factores fisicoquímicos como la solubilidad y la liposolubilidad. Este es un proceso determinante para obtener una buena biodisponibilidad del fármaco que está directamente relacionada con el efecto terapéutico de éste. De acuerdo a la regla de Lipinsky (Wu Chi, 2005) las características necesarias para que un compuesto pueda ser absorbido adecuadamente son:

- Peso molecular menor a 500 g/mol
- Grupos donadores de puentes de hidrógeno menor a 5

- Grupos aceptores de puentes de hidrógeno menor a 10
- Coeficiente de partición (log P) menor a 5
- Solubilidad acuosa mayor a 100 mg/mL

En esta parte la FDA requiere de que se precise: el sitio de absorción, diferencias en la absorción entre sexos y comparación entre diferentes especies.

Distribución: la lipofilia no sólo afecta la absorción de un fármaco, también está relacionada con la distribución. Generalmente, un fármaco altamente lipofílico se une altamente a proteínas y aumenta su grado de distribución. Sin embargo, el cerebro es diferente a los demás órganos; un fármaco que presenta alta lipofilia puede atravesar pobremente la barrera hematoencefálica, se estima que el rango óptimo de lipofilia que debe tener un compuesto para llegar al sistema nervioso central se encuentra entre log P = 1 y 2 (Jiunn H. Lin, 1997).

En este punto, la FDA indica que se deben considerar estudios de distribución en los tejidos, unión a proteínas y estudios de transferencia placentaria.

Tiempo de vida media: generalmente la duración del efecto terapéutico está directamente relacionada con el tiempo de vida media, es por ello que el tiempo de vida media es uno de los factores más importantes para el diseño del régimen de dosificación de un fármaco. Es preferible seleccionar un candidato que tenga una vida media larga, ya que la dosificación será menos frecuente (Smith D.A., 2006). Es relevante mencionar que este parámetro está en función de la distribución del fármaco en plasma y en los tejidos, así como

de la depuración. Si uno de estos procesos se ve afectado, el tiempo de vida media también lo hará (Chaturvedi P, 2001).

Metabolismo: Un compuesto puede ser excretado del organismo como tal (inalterado), o como una molécula biotransformada. El órgano principal para la biotransformación es el hígado. Aún cuando este proceso tiene como principal objetivo aumentar la polaridad de la molécula de modo que pueda ser fácilmente excretada, los metabolitos no siempre son inactivos; algunas veces estas moléculas pueden ejercer efectos terapéuticos o tóxicos en el organismo. Debido a lo anterior es necesario realizar una serie de pruebas para la identificación y evaluación de los metabolitos originados (Jiunn H, 1997).
Por lo anterior la FDA requiere que se documenten las estructuras químicas y proporción de los metabolitos formados, posibles vías metabólicas, metabolismo presistémico (en el tracto gastrointestinal), así como la inducción o inhibición enzimática que pudiera ejercer la nueva molécula.

Excreción: La FDA indica que deben documentarse las vías por las cuales el nuevo compuesto es excretado.

2.5.2.3. Toxicidad

Una parte muy importante en el desarrollo de nuevos fármacos es su seguridad. Los objetivos básicos de los estudios incluyen:

a. La definición de una dosis y esquema de seguridad para iniciar estudios clínicos de fase I.

b. La predicción del perfil de toxicidad en seres humanos y su reversibilidad.

c. Evitar la exposición de pacientes a compuestos con toxicidad excesiva o impredecible (García Conde, 2003).

La FDA requiere de dos tipos de estudios en animales, el primero se realiza habitualmente en roedores, y se debe identificar la dosis que produce toxicidad grave utilizando la vía y esquema de administración clínicamente relevante. En este punto es importante determinar la DL_{10} (dosis que induce la muerte al 10% de los animales). El segundo estudio determina la tolerancia en otro animal con una dosis de 1/10 de la DL_{10}, en caso de no observarse toxicidad, esta será la dosis para el inicio de ensayos en humanos. En caso contrario, se prolonga el estudio hasta definir la dosis máxima no tóxica en no roedores, un tercio de la cual será aplicada a los estudios en seres humanos. Cuando los fármacos están destinados a utilizarse en tratamientos de larga duración se realizan estudios de hasta 6 meses en roedores y 12 meses en no roedores para evaluar la seguridad (García-Conde, 2003).

2.5.3. Estudios clínicos

Los ensayos clínicos están destinados a evaluar la eficacia y la seguridad de la nueva molécula en seres humanos. Por cuestiones éticas y de recursos económicos, los ensayos clínicos se llevan acabo por etapas:

- Fase I. En esta fase se realiza la investigación del fármaco evaluando su comportamiento en un estudio con voluntarios sanos seleccionados, usualmente de 20 a 100 individuos. Se busca establecer el perfil de

toxicidad del fármaco, tanto cualitativa (órgano blanco), como cuantitativamente (gravedad, duración, reversibilidad), así como la descripción de sus características farmacocinéticas. El diseño de estos estudios es abierto, por lo general simple o doble ciego con una duración promedio de nueve a 18 meses. Se hace una excepción en medicamentos que se encuentren en investigación para el tratamiento del cáncer y el SIDA con el fin de acelerar su desarrollo, ya que son patologías consideradas prioritarias que requieren nuevos y mejores tratamientos (García-Conde, 2003).

- Fase II: Si la comprobación preliminar de seguridad en la fase I ha sido satisfactoria, se pasa a esta fase, la cual involucra la administración del fármaco a individuos que presentan la enfermedad para la que se ha concebido su empleo. No se suelen incluir más de 100 a 200 individuos (a veces, esta fase se subdivide en dos: IIa y IIb, según el número de pacientes). En esta fase, el fármaco debe compararse con los mejores fármacos disponibles para el tratamiento de la enfermedad y si tales fármacos no existen, la comparación sería con placebo. La finalidad de la fase II es la de establecer mediciones preliminares de la relación eficacia terapéutica/toxicidad, así como establecer la dosis óptima.

- Fase III: establece eficacia, indicaciones, dosis, mecanismo de acción, seguridad y farmacocinética en dosis múltiples; los estudios son aleatorios, doble ciego, controlados con placebo o fármacos de referencia (innovadores). Se incluyen de 1000 a 3000 pacientes, los

criterios de inclusión y exclusión son menos estrictos y su duración es de uno a cuatro años.

Completando todas las fases con resultados satisfactorios se solicita la aprobación para el nuevo medicamento a las autoridades reguladoras, proceso que dura en trámite entre 12 y 24 meses.

- Una vez que el medicamento ha sido aprobado para su comercialización se continúa con la investigación clínica en fase IV, de uso terapéutico o de postcomercialización, con una muestra de más de 5000 pacientes. En esta fase se realizan estudios de farmacovigilancia, haciendo el seguimiento mediante el reporte espontáneo de los potenciales eventos adversos que se puedan presentar en condiciones habituales de la práctica clínica. Esta herramienta permite evaluar la eficacia y seguridad de la molécula en la situación real de uso y con un mayor número de pacientes expuestos (García Conde, 2003).

Es por lo anterior que anualmente la industria farmacéutica invierte entre 800 y 1200 millones de dólares y entre 10 a 15 años para poder colocar un nuevo medicamento en el mercado (Jiunn H, 1997).

Es importante mencionar que de 30000 nuevas moléculas sintetizadas sólo 2000 (6.7%) pasan a la etapa de desarrollo preclínico, 200 (0.67%) pasan a la fase clínica I, 40 (0.13 %) pasan a la fase clínica II, 12 (0.04%) pasan a la fase clínica III, 8 (0.027%) son aprobadas por la FDA y sólo 1 logra tener éxito

comercial; esto quiere decir: sólo el 0.003% llega a ser una molécula exitosa (Shilling, C.A.).

El promedio anual de nuevos fármacos lanzados al mercado es de 26 (FDA).

2.6. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Se entiende por validación a la confirmación que se da por la recopilación y análisis de la evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico propuesto.

La validación de métodos bioanalíticos es crucial para cuantificar a los fármacos y/o sus metabolitos durante los estudios preclínicos y/o biofarmacéuticos así como en los estudios clínicos. Estos métodos deben demostrar que se puede detectar y/o cuantificar la molécula, en la matriz biológica de interés (FDA). Para ello, se deben de cumplir con al menos los siguientes parámetros: exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad, precisión intermedia y estabilidad.

Actualmente la NOM-177 1998 es la norma que precisa los requerimientos para validar un método bioanalítico en México. Sin embargo, existen otras opciones que pueden contribuir a la validación, como lo es la guía de la FDA para validación de métodos bioanalíticos.

En el siguiente Tabla se realiza una comparación entre los requerimientos de la NOM-177 1998 y la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA:

Tabla 2. Comparación entre la Nom 177 y la guía de la FDA

PARÁMETRO	NOM-177, 1998	FDA, GUÍA 2001
SELECTIVIDAD	No deben presentarse interferencias. Matriz biológica de al menos 6 fuentes.	No deben presentarse interferencias. Matriz biológica de al menos 6 fuentes.
LÍMITE DE DETECCIÓN	Se debe de distinguir del nivel de ruido.	No indicado.
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	Por quintuplicado, la concentración más baja del intervalo de trabajo. Valor promedio, entre ± 20% del valor nominal y un C. V. ≤ 20%	La respuesta debe ser al menos cinco veces la respuesta del blanco. Por quintuplicado. Valor promedio entre ± 20% del valor nominal y un C. V. ≤ 20%.
LINEALIDAD	Mínimo 5 puntos. Se debe de definir un modelo continuo y reproducible, con una $r^2 \geq 0.99$.	Debe consistir en al menos 6 a 8 puntos. Debe incluir el límite de cuantificación.
PRECISIÓN	Repetibilidad. En un mismo día por quintuplicado 3 niveles de concentración diferentes a la curva de calibración, pero dentrodel rango. El C.V. debe ser ≤ 15 %. Reproducibilidad intralaboratorio. Por duplicado durante 3 días 3 niveles de concentración diferentes a la curva de calibración, pero dentro del rango. El C.V. debe ser ≤ 15 %.	Por quintuplicado al menos 3 niveles de concentración. El C.V. debe ser ≤ 15 %, excepto en el Límite Inferior de Cuantificación que es ≤ 20 %. La precisión se subdivide para considerar la precisión en el mismo día y bajo las mismas condiciones; y por otra parte en diferentes días y condiciones diferentes, como analistas, laboratorios, equipos y reactivos.

Tabla 2. Comparación entre la Nom 177 y la guía de la FDA (Cont.)

PARÁMETRO	NOM-177, 1998	FDA, GUÍA 2001
EXACTITUD	El valor promedio de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro de ± 15 % del valor nominal.	Cinco determinaciones, en mínimo 3 niveles de concentración El valor promedio de los datos de ± 15 % del valor nominal, excepto en el Límite Inferior de Cuantificación que es ± 20 % del valor nominal.
RECUPERACIÓN ABSOLUTA	Por triplicado un mínimo de 3 niveles de concentración dentro del rango y comparar con soluciones de los mismos niveles de concentración. El porcentaje de la relación de respuestas debe ser reproducible y no necesariamente del 100%.	Comparación de los resultados de la extracción a tres niveles de concentración, con soluciones representando el 100 % recuperado. Debe ser consistente, preciso y reproducible.
ESTABILIDAD	- Bajo las condiciones de almacenamiento hasta el análisis. - Dos ciclos de congelación-descongelación. Los valores obtenidos deber ser precisos y exactos. Evaluar otros factores a los cuales se mantendrán las muestras.	Tres alícuotas (para tres análisis) a dos niveles de concentración (alto y bajo) - Bajo las condiciones de almacenamiento hasta el análisis. - Tres ciclos de congelación-descongelación. - A corto plazo, de 4 a 24 horas a T=ambiente. - A largo plazo, el tiempo que se tendrá almacenada la muestra. - Muestras procesadas - Estabilidad de la solución Stock.

2.7 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

Los métodos cromatográficos son comúnmente usados para el análisis cuantitativo y cualitativo de materia prima, fármacos y metabolitos en fluidos biológicos.

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una de las técnicas analíticas más ampliamente utilizada, tanto en la industria como en diferentes campos de la ciencia para la validación de métodos. Esta técnica permite separar físicamente los distintos componentes de una mezcla por una mayor afinidad de uno de los compuestos hacia una de las fases. En toda cromatografía existe un contacto entre dos fases, una fija que suele llamarse fase estacionaria, y una móvil (fase móvil) que fluye permanente durante el análisis, y que en este caso es un líquido o mezcla de varios líquidos. La fase estacionaria por su parte puede ser alúmina, sílice o resinas de intercambio iónico. Existen varios tipos de detectores que se pueden acoplar a la cromatografía líquida. El detector más ampliamente utilizado es el detector de absorbancia ultravioleta-visible (UV), el cual consiste en un espectrofotómetro de barrido que abarca la radiación UV y visible, lo que permite registrar el cromatograma a varias longitudes de onda simultáneamente, la única característica que debe presentar la molécula es pares de dobles ligaduras conjugadas para poder absorber en el UV.

3. .OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Desarrollar y validar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para la detección y cuantificación de FHL-18 en plasma de rata.

3.2. Objetivos específicos

- Seleccionar las condiciones adecuadas para separar e identificar a FHL-18 por cromatografía de líquidos de alta resolución.
- Desarrollar un método que permita la extracción del FHL-18 del plasma.
- Validar el método analítico tomando como guía algunos de los parámetros señalados por la NOM 177-SSA1 (1998).
- Evaluar la estabilidad de FHL-18, tanto a temperatura ambiente como a la temperatura corporal de la rata (38° C).

4. PARTE EXPERIMENTAL

El estudio se dividió en dos partes:

1. Desarrollo y validación del método analítico
2. Cinética de degradación de FHL-18 en plasma.

4.1. Material, reactivos e instrumentos.

- FHL-18 (fue gentilmente donado por el Dr. Francisco Hernández Luis, de la Facultad de Química de la UNAM).
- Diazepam (Sigma-Aldrich, USA)
- 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 TechologiesInc, CA, USA)
- Dimetilsulfóxido RA (Sigma-Aldrich, USA)
- Metanol grado HPLC (Mallinckrodt Baker, México)
- Agua grado HPLC
- Diclorometano, GR (Mallinckodt Baker, México)
- Hexano, RA (Merck)
- Isopropanol,grado HPLC (Mallinckrodt Baker, México)
- Fosfato monobásico de potasio, GR (J.T. Baker, USA)
- Microviales de 200 μL (Agilent Tecnologies, USA)
- Centrífuga Beckman TJ-6 (Beckman, USA)
- Vórtex vertical multi-pulso (Glas-Col, USA)

- Ultracongelador REVCO a -70°C ± 3° C (Kendro Laboratory Products, USA)
- Baño de agua Yamato BT-25.
- Ratas Wistar macho (280-320 g)

4.2. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

4.2.1. Estimación del pKa y el coeficiente de partición

Para poder desarrollar un método analítico es de vital importancia conocer las propiedades fisicoquímicas del compuesto en estudio, es por ello que mediante el software ACDlabs v9 (ACD Inc, Canada), se calculó el pKa y el coeficiente de partición (log P) de FHL-18.

4.2.2. Preparación de soluciones

Solución amortiguadora de fosfatos 25 mM, pH 4.0.

Se pesaron 3.4 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), se disolvió con aproximadamente 500 mL de agua destilada y se llevó al aforo en un matraz volumétrico de 1L. El pH se ajustó a 4.0 con una solución de HCl 1 N.

Plasma de rata

El plasma que se utilizó para la preparación de las curvas patrón y los puntos control fue obtenido de ratas Wistar sanas y sin tratamiento previo.

4.2.3. Preparación de las soluciones estándar, curva de calibración y puntos control para FHL-18.

4.2.3.1. Solución estándar de FHL-18. Concentración de 50 μg/mL

Se pesaron con exactitud 5 mg de FHL-18 que se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 5 mL, se disolvió con aproximadamente 4 mL de dimetil sulfóxido y se llevó al aforo con el mismo disolvente para obtener una concentración de 1 mg/mL de FHL-18. De esta solución se tomó una alícuota de 50 μL, se transfirió a un matraz volumétrico de 1 mL y se llevó al aforo con acetonitrilo.

4.2.3.2. Solución patrón de diazepam (estándar interno). Concentración 1 μg/mL

Se pesó con exactitud 1 mg de diazepam, se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvió con 5 mL de acetonitrilo y se llevó al aforo con el mismo disolvente para obtener un concentración de 100 μg/mL; de esta solución se tomó una alícuota de 100 μL y se transvasó a una matraz de 10 mL, finalmente se llevó al aforo con acetonitrilo.

4.2.3.3. Preparación de la curva de calibración de FHL-18 en plasma.

Esta curva se preparó a partir de la solución estándar de 50 μg/mL de FHL-18. El procedimiento mediante el cual se preparó se describe en el diagrama 1.

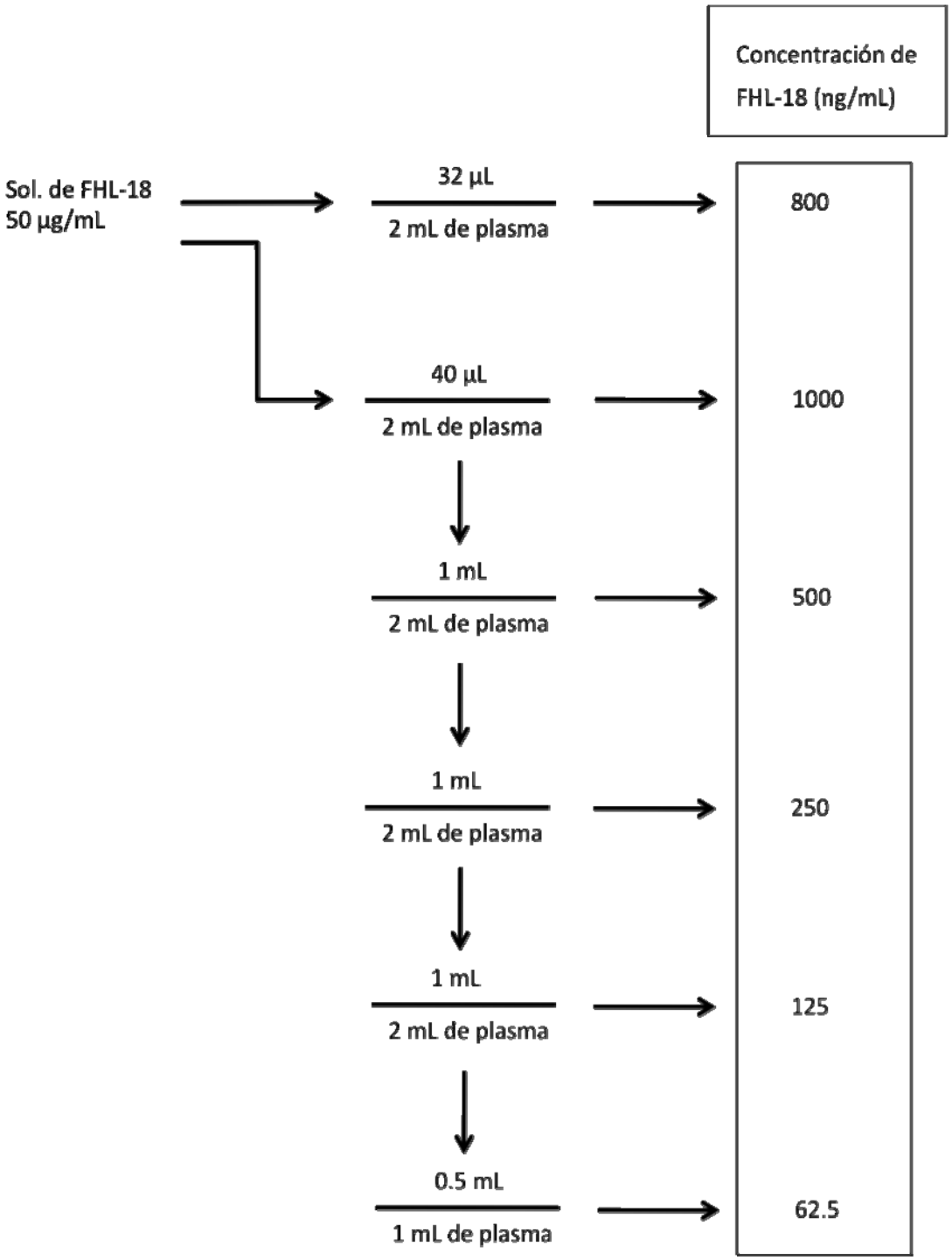


Diagrama 1. Preparación de soluciones para la curva patrón en plasma

4.2.3.4. Preparación de los puntos control en plasma y en solución

Estos puntos se prepararon a partir de la solución estándar de FHL-18 de 50 µg/mL. El procedimiento a seguir se describe en el diagrama 2.

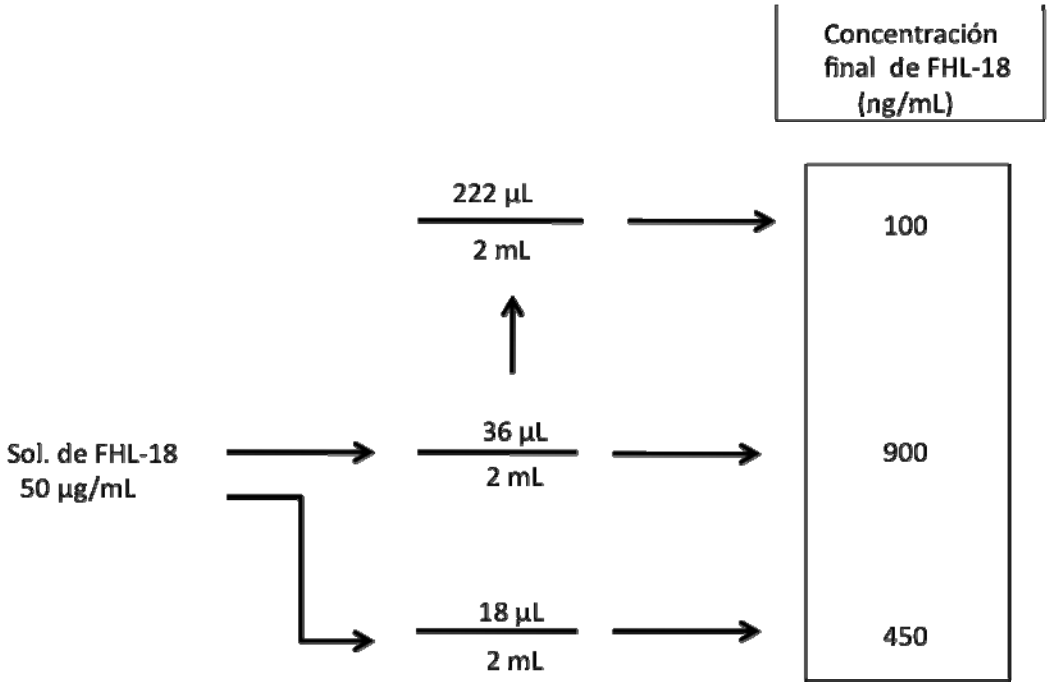


Diagrama 2. Preparación de los puntos control de FHL-18 en plasma

Desarrollo del método analítico

Considerando que no existe información relacionada a esta molécula fue necesario desarrollar primeramente un método analítico para su cuantificación en plasma.

Para ello se llevaron a cabo las siguientes determinaciones:

a) Pruebas de solubilidad en diferentes disolventes.

b) Selección de la longitud de onda de máxima absorción

c) Elección de la columna cromatográfica

d) Selección de la fase móvil

e) Elección del estándar interno

g) Método de extracción

Las condiciones finales fueron las siguientes:

4.2.4. Procedimiento de extracción

A 800 μL de plasma:

- Se le agregaron 150 μL del estándar interno, a una concentración de 1 μg/mL
- Se adicionaron 7 mL de la mezcla de extracción, hexano:diclorometano:isopropanol (100:50:5)
- Se agitaron las muestras en el vortex a 95 rpm por 10 minutos
- Se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos
- Las muestras se congelaron a -70° C por 30 minutos
- Se decantó la fase orgánica y se transvasó a un tubo limpio
- Se evaporó la fase orgánica a sequedad a 40° C y bajo una corriente de N_2
- El residuo se reconstituyó con 50 μL de acetonitrilo

En el diagrama 3 se muestra el proceso de extracción para FHL-18 en plasma.

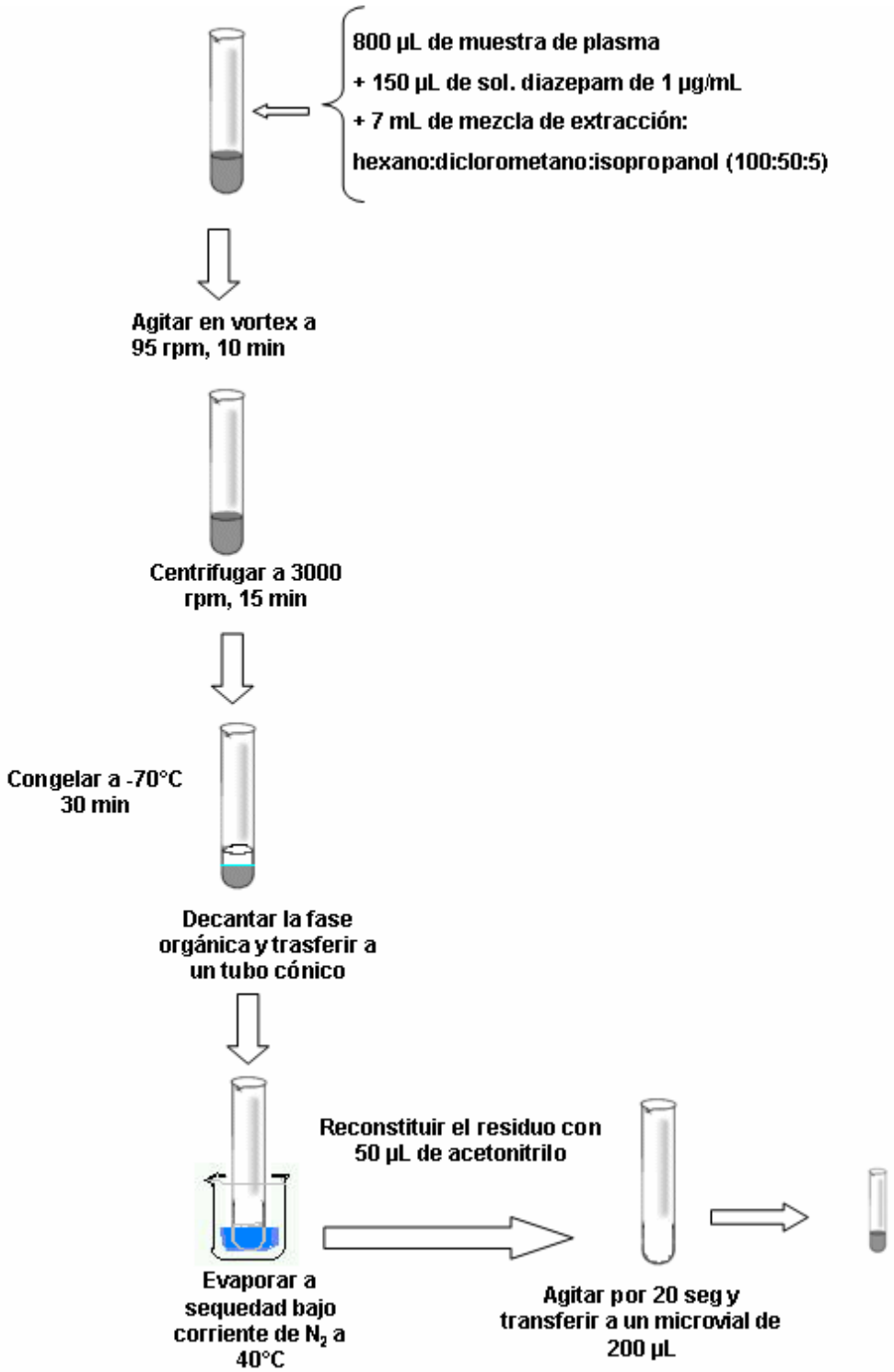


Diagrama 3. Proceso de extracción de FHL-18 del plasma

4.2.5. Condiciones cromatográficas

Columna: X-Terra RP-18, 5 µ, 250 x 4.6 mm (Waters).

Fase móvil: Metanol:Buffer de KH_2PO_4 25 mM, pH = 4.0 (60:40).

Velocidad de flujo: 0.9 mL/min.

Longitud de onda: 226 nm.

Volumen de inyección: 10 µL.

Tiempo de corrida: 16 minutos.

4.2.6. Validación del método analítico para la cuantificación de FHL-18 en plasma

Los parámetros considerados para la validación fueron los siguientes: selectividad, linealidad, precisión, repetibilidad, precisión intermedia, exactitud, recobro absoluto y estabilidad.

Para cada una de las corridas analíticas, se preparó una curva de calibración en plasma de acuerdo con lo descrito anteriormente, a la cual se le calculó la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r).

Es importante mencionar que para la validación del método se utilizó un estándar de FHL-18 estandarizado por métodos absolutos.

4.2.6.1. SELECTIVIDAD

La selectividad del método se determinó analizando diferentes muestras, las cuales fueron:

- Muestras blanco de plasma de 6 ratas diferentes

- Muestra blanco de plasma obtenida de la mezcla de los plasmas de las 6 ratas sin adición del fármaco, ni estándar interno (E.I.).
- Muestra blanco de un plasma hemolizado (sin adición del fármaco, ni estándar interno).
- Muestra de la mezcla de la matriz biológica, adicionada con 150 µL estándar interno (diazepam con una concentración de 1 µg/mL).

Criterio de aceptación: El método es selectivo si no se observa ningún pico de componentes endógenos del plasma, que pudieran interferir en la detección del analito o del estándar interno.

4.2.6.2. Linealidad

Para determinar la linealidad del método se preparó por triplicado la curva de calibración de FHL-18 en el rango de concentración de 62.5 a 1000 ng/mL. Las muestras se procesaron de acuerdo a lo descrito en el diagrama 3. Para cada una de las curvas se graficó la relación de alturas contra la concentración, y por un ajuste de mínimos cuadrados se determinó la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r).

Para cada uno de los puntos se calculó la concentración predicha, la cual es la concentración obtenida después de la extracción del analito del plasma y calculada extrapolando los datos de la relación de alturas (FHL-18/E.I.) dentro de la ecuación de la recta obtenida, a partir de estos resultados se calculó el % de desviación absoluta. Con la concentración predicha obtenida para cada punto de la curva, se calculó el promedio, la desviación estándar y el % de coeficiente de variación de las tres curvas. Adicionalmente se realizó un

ensayo de Levene para verificar la homocedasticidad de las varianzas. También se realizó un análisis de varianza para determinar si existían diferencias significativas entre las pendientes y las ordenas de las tres curvas. Ambos análisis se determinaron con un nivel de confianza del 95 %.

Criterio de aceptación: el % de desviación absoluta para cada uno de los datos debe ser menor o igual al 15 %, con excepción del punto más bajo de la curva, el cual debe de tener una desviación absoluta no mayor al 20%.

El coeficiente de correlación para cada curva debe ser mayor o igual a 0.99.

4.2.6.3. PRECISIÓN

Este punto se divide en dos partes, repetibilidad y precisión intermedia.

4.2.6.3.1. Repetibilidad

Este parámetro se evaluó mediante el análisis de los puntos control a tres niveles de concentración (alta, media y baja) que se encuentran dentro del intervalo establecido. Las concentraciones evaluadas fueron de 100, 450 y 900 ng/mL y fueron preparadas como se describe en el punto 4.2.2.4. Los puntos control se prepararon por quintuplicado y se analizaron en un mismo día.

De cada una de las determinaciones se calculó la relación de alturas (FHL-18/E.I.), posteriormente se calculó la concentración predicha interpolando los datos en la curva de calibración correspondiente. Se determinó el promedio, la desviación estándar y el % del coeficiente de variación para cada nivel de concentración.

Criterio de aceptación: el método es repetible si el % del coeficiente de variación no es mayor al 15%.

4.2.6.3.2. Precisión intermedia

Se analizaron por triplicado durante tres días, los puntos control a tres niveles de concentración (alta, media y baja) dentro del intervalo establecido. Las concentraciones evaluadas fueron de 100, 450 y 900 ng/mL en plasma. De cada una de las determinaciones se calculó la relación de alturas (FHL-18/E.I.), posteriormente se calculó la concentración predicha interpolando los datos en la curva de calibración correspondiente. Finalmente se calculó la concentración predicha promedio, la desviación estándar y el % del coeficiente de variación para cada nivel de concentración utilizando los datos de los tres días de análisis.

Criterio de aceptación: El método presenta precisión intermedia si el % de coeficiente de variación no es mayor al 15%.

4.2.6.4. Exactitud

Para determinar la exactitud se utilizaron los datos de la precisión del método (repetibilidad y precisión intermedia). De cada una de las concentraciones predichas se calculó el % de desviación absoluta mediante la siguiente fórmula:

$$\%\ \text{Desviación absoluta} = \left(\frac{\text{Concentración nominal} - \text{concentración predicha}}{\text{Concentración nominal}} \right) \text{X } 100$$

Donde:

Concentración nominal = concentración teórica.

Concentración predicha = concentración promedio obtenida de la interpolación de la relación de alturas (FHL-18/E.I.) en la curva de calibración preparada en el mismo día.

Criterio de aceptación: El método es exacto si el valor promedio de desviación absoluta en cada nivel de concentración es menor o igual al 15 %

4.2.6.5. Recuperación absoluta

El recobro de las muestras plasmáticas se evaluó procesando por quintuplicado los tres puntos control bajo, medio y alto (100, 450 y 900 ng/mL) en plasma, y comparándolos con muestras en acetonitrilo preparadas por triplicado, que contienen al analito y al estándar interno en la misma concentración que las esperadas en las muestras de plasma procesadas al final de la extracción.

Para cada una de las muestras, tanto las de plasma como las de solución, se calculó la relación de alturas (FHL-18/E.I.), posteriormente se calculó el porcentaje de recobro de cada nivel de concentración, comparando el promedio de la respuesta obtenida para la muestra en plasma con la respuesta obtenida para la muestra en acetonitrilo.

El % de recobro se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recobro} = \left(\frac{\text{Promedio relación de alturas en plasma (FHL-18/E.I.)}}{\text{Promedio relación de alturas en acetonitrilo (FHL-18/E.I.)}} \right) \text{X } 100$$

Adicionalmente se calculó el intervalo de confianza para cada nivel de concentración.

Criterio de aceptación: El porcentaje de recobro no necesariamente debe ser del 100 %, pero deberá ser reproducible para cada nivel de concentración.

4.2.6.6. Estabilidad

Para documentar la estabilidad se llevaron a cabo las siguientes pruebas:

Estabilidad a corto plazo (temperatura ambiente)

Se prepararon por triplicado dos series de los puntos control alto y bajo (900 y 100 ng/mL). Una de las series fue procesada inmediatamente y fue considerada como las 0 horas. La otra serie se mantuvo sobre la mesa de trabajo, a temperatura ambiente, durante 4 horas. Transcurrido este tiempo se procesó de igual manera que la serie anterior. Se determinó la concentración predicha interpolando la relación de alturas (FHL-18/E.I.) de cada punto control en la curva de calibración procesada ese día.

Para cada concentración se determinó el % de desviación absoluta utilizando como referencia el valor promedio de las concentraciones predichas a las 0 horas.

Criterio de aceptación: El % de desviación absoluta, no debe de exceder el 15 % para cada punto control.

4.3. Cinética de degradación de FHL-18

Debido a que la molécula no fue estable a temperatura ambiente, se realizó un estudio de cinética de degradación, empleando para ello las siguientes condiciones:

4.3.1. Estudio a temperatura ambiente

Se prepararon por triplicado el punto control alto y medio (900 y 450 ng/mL). Estas muestras permanecieron a temperatura ambiente durante 0, 1, 2, 3, 4 y 5 horas y posteriormente fueron procesadas. La concentración predicha se determinó interpolando la relación de alturas (FHL-18/E.I.) en la curva de calibración procesada el mismo día del estudio, se calculó el promedio, la desviación estándar y el % del coeficiente de variación para cada concentración. Se graficó la concentración predicha de FHL-18 contra el tiempo y se determinó el orden de la cinética mediante el coeficiente de correlación. Adicionalmente a esta determinación se realizó un análisis de residuales entre la concentración predicha (obtenida mediante la ecuación de la recta) y la concentración nominal:

Orden	Ecuación
0	$C = C_0 + kt$
1	$C = C_0 e^{-kt}$

Donde:

C = Concentración nominal

C_0 = Concentración inicial

k = constante

t = tiempo

El orden de reacción es aquel en donde la suma del análisis de residuales se acerca más a cero.

4.3.2. Estudio a temperatura corporal de la rata

Se prepararon por triplicado dos concentraciones de FHL-18 el punto control alto y medio (900 y 450 ng/mL). Estas muestras permanecieron a 38° C durante 0, 1, 2, 3, 4 y 5 horas y posteriormente fueron procesadas. La concentración predicha se determinó interpolando la relación de alturas (FHL-18/E.I.) en la curva de calibración procesada el mismo día del estudio, se calculó el promedio, la desviación estándar y el % del coeficiente de variación para cada concentración. Se graficó la concentración predicha de FHL-18 contra el tiempo y se determinó el orden de la cinética mediante el coeficiente de correlación.

4.3.3. Estudio de farmacocinética de FHL-18

Para el estudio se preparó una dispersión sólida de FHL-18 en cremofor al 2% y se administró una dosis de 15 mg/kg por vía oral a ratas Wistar. Se tomaron muestras sanguíneas a las 1, 2, 3 y 6 horas, las cuales se analizaron inmediatamente empleando el método desarrollado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Estimación del pKa y el coeficiente de partición

Al utilizar el progrma ACDlabs v9 se encontró que:

Los valores de pKa del FHL-18 son: pKa_1 =10.42 y pKa_2 4.84.

El coeficiente de partición (log P) es de 3.0

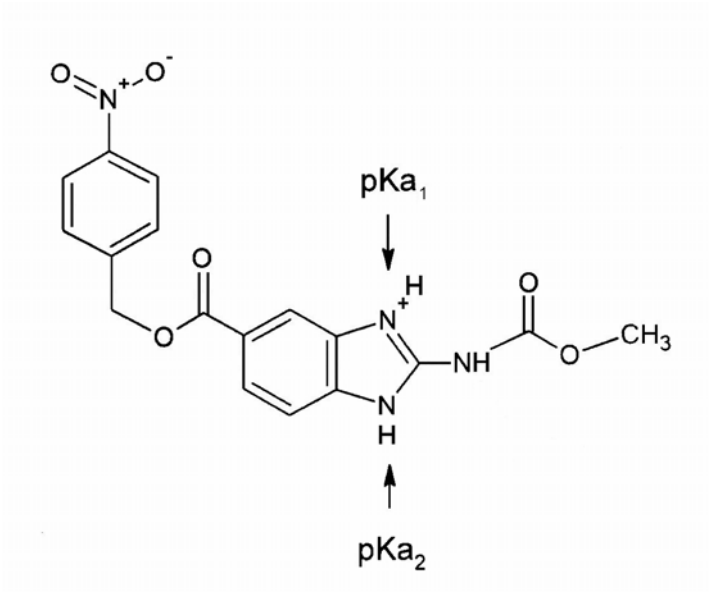


Figura 11. Señalización de los pKa de FHL-18

5.2. Desarrollo del método analítico

5.2.1. Determinación de la solubilidad

Para desarrollar el método analítico, se determinó primeramente la solubilidad de FHL-18, en diferentes disolventes. Se encontró que el compuesto es muy soluble en dimetilsulfóxido, soluble en acetonitrilo y metanol, y prácticamente insoluble en agua.

5.2.2. Selección de las condiciones cromatográficas

5.2.2.1. Determinación de la longitud de onda de máxima absorción

Para determinar la longitud de onda se tomó en cuenta la propiedad fisicoquímica de FHL-18 de absorber en la región UV ya que es una molécula que cuenta con dobles ligaduras conjugadas. Considerando lo anterior se trazó el espectro de absorción de FHL-18 en acetonitrilo, realizando un barrido de longitudes de onda de 200 a 400 nm. La longitud de máxima absorción fue 226 nm.

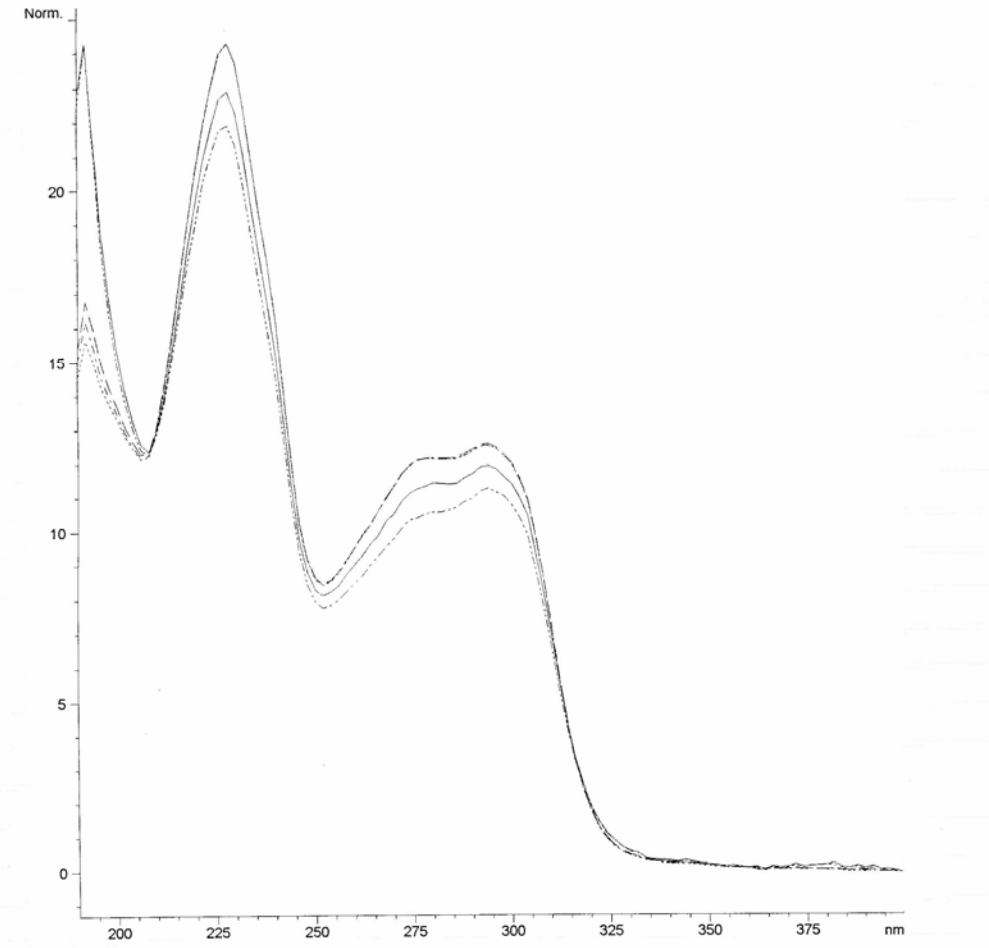


Figura 12. Espectro de absorción de FHL-18 en acetonitrilo de 200 a 400 nm

5.2.2.2. Elección de la columna y fase móvil

Considerando que la molécula es poco polar, se seleccionaron columnas de fase reversa. Las columnas utilizadas fueron las siguientes:

- Symmetry Shield RP C_{18} (5 μm, 4.6 x 250 mm), Waters.
- X TERRA RP18 (5 μm, 4.6 x 250 mm), Waters.
- Waters Spherisorb ODS (5 μm, 4.6 x 250 mm), Waters.

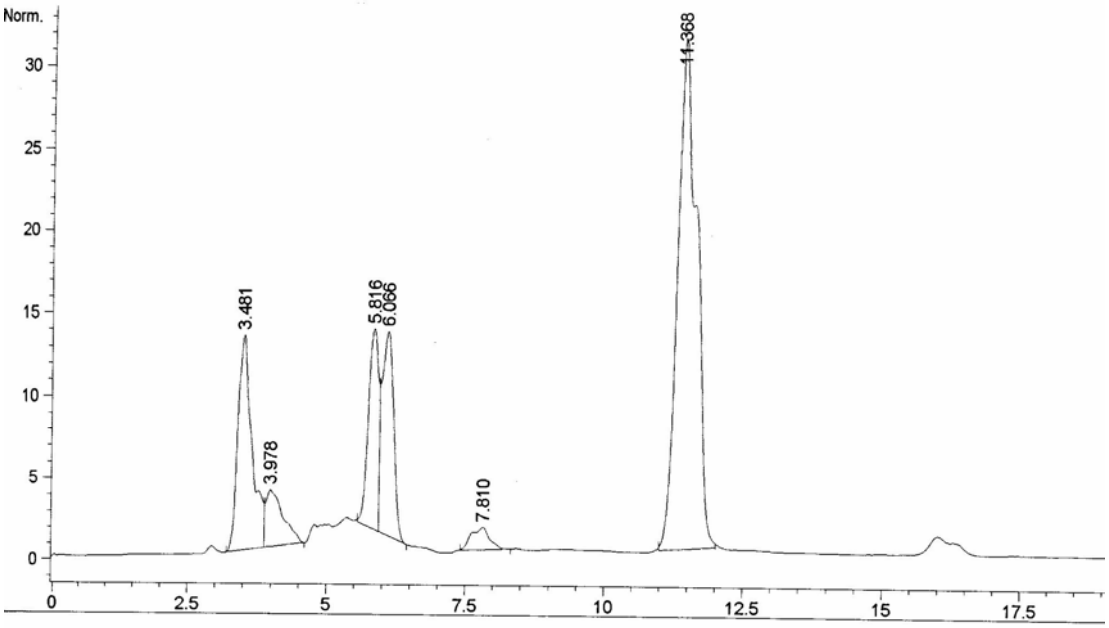


Figura 13. Cromatograma de FHL-18 (11.365 min), con una columna Waters Spherisorb ODS (5 μm, 4.6 x 250 mm)

Para cada una de las columnas se encontró las mejores condiciones cromatográficas para detectar adecuadamente a la molécula. La columna que dio mejores resultados fue la X TERRA, ya que con esta columna se obtuvieron picos bien definidos y con un tiempo de retención adecuado para que no se observaran interferencias con los compuestos endógenos del plasma.

Para la elección de la fase móvil se probaron varias mezclas, entre ellas:

- Acetonitrilo:agua:metanol (50:45:5)
- Acetonitrilo:agua:metanol (30:55:15)
- Acetonitrilo:agua:metanol (60:35:5)
- Acetonitrilo:agua:metanol (45:45:10)
- Acetonitrilo:agua:metanol (40:40:20)
- Acetonitrilo:agua:metanol (20:30:50)
- Agua:metanol (60:40)
- Buffer KH_2PO_4 25mM pH=4:Metanol (40:60)

En la última mezcla no se observó interferencia de los componentes endógenos del plasma con el analito, además de presentar una óptima separación entre FHL-18 y el estándar interno, por lo tanto, Metanol:Buffer KH_2PO_4 25mM pH=4 (60:40), fue la fase móvil de elección.

Con las otras fases móviles sí se presentaron interferencias o el estándar interno que se había elegido, tenía un tiempo de retención similar al analito de interés.

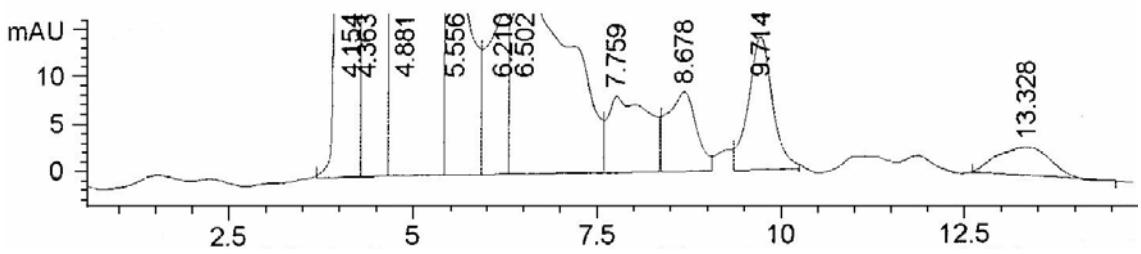


Figura 14. Cromatograma de FHL-18 (aprox. 6 min.) no se observa debido a la interferencia con el plasma. Fase móvil acetonitrilo:agua:metanol (50:45:5).

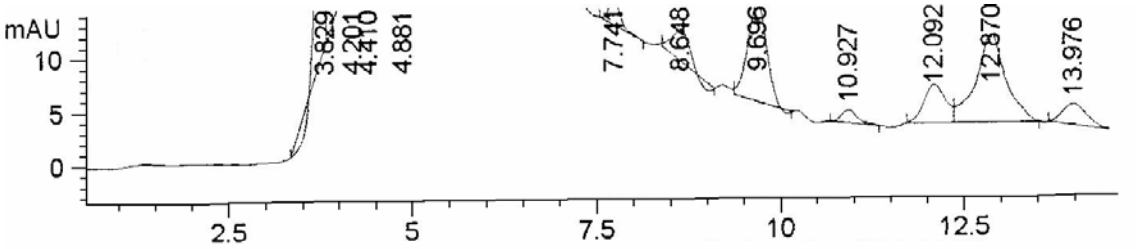


Figura 15. Cromatograma de FHL-18 (aprox. 8 min.) debido a la interferencia con el plasma. Fase móvil acetonitrilo:agua:metanol (20:30:50)

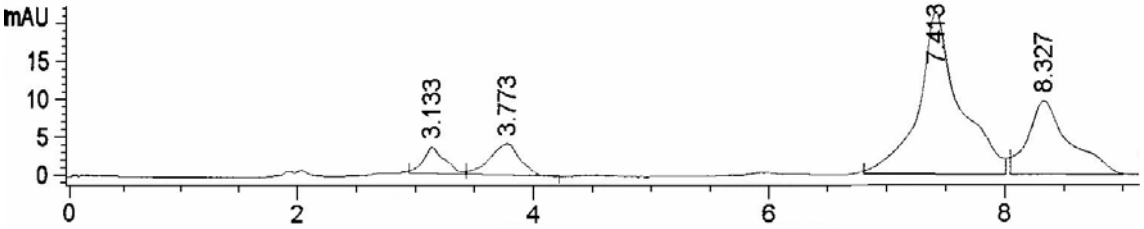


Figura 16. Cromatograma de FHL-18 (7.413 min.) y el estándar interno (8.327 min.) no presentan una buena simetría. Fase móvil agua:metanol (60:40).

5.2.2.3. Velocidad de flujo y tiempo de corrida

La velocidad de flujo se seleccionó de acuerdo a la simetría del pico obtenida (si la velocidad es muy alta o muy baja el pico puede observase coleado). De esta manera se determinó que la velocidad de flujo adecuada era de 0.9 mL/min.

El tiempo de corrida es aquél en el cual los analitos de interés han eluido totalmente, en este tiempo también deben ser eluidos los compuestos endógenos del plasma para que no interfieran en corridas subsecuentes. El tiempo fue de 16 minutos.

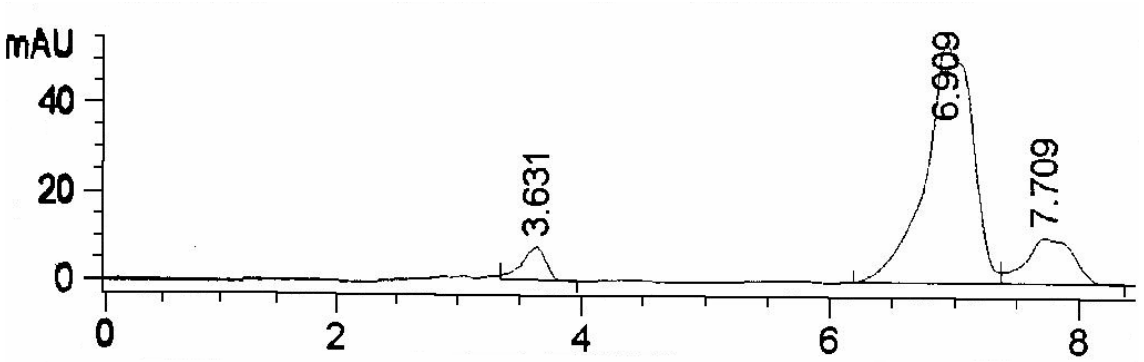


Figura 17. Cromatograma de FHL-18 (6.909 min.) que se observa coleado debido a una velocidad de flujo más alta que la adecuada

5.2.2.4. Condiciones cromatográficas óptimas

- Columna: X-Terra RP-18, 5 µm, 250 x 4.6 mm (Waters).
- Fase móvil: Metanol:Buffer de KH_2PO_4 25 mM, pH = 4.0 (60:40).
- Velocidad de flujo: 0.9 mL/min.
- Tiempo de corrida: 16 minutos.

Las condiciones anteriores permitieron que los picos pertenecientes a los analitos interés presentaran una buena separación, con una resolución de 1.68, una adecuada forma de los picos y sin interferencia de los compuesto endógenos del plasma.

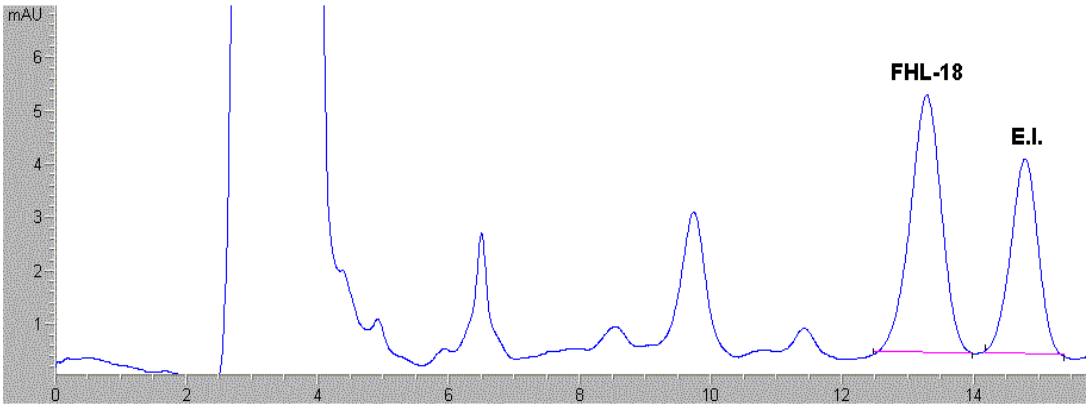


Figura 18. Cromatograma con las condiciones cromatográficas finales

5.2.3. Elección del estándar interno

La elección del estándar interno se llevó a cabo buscando una molécula que presentara un comportamiento fisicoquímico similar al de FHL-18. De esta manera se probaron varios estándares, entre ellos:

Prazicuantel, el cual interfería con el pico de FHL-18.

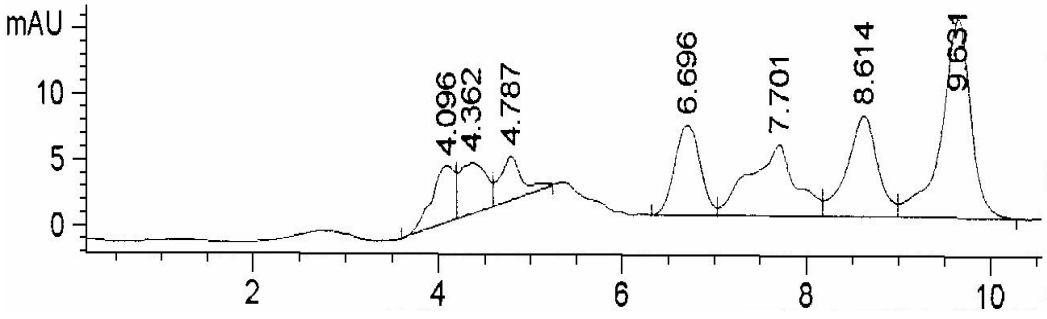


Figura 19. Cromatograma de FHL-18 (8.614 min.) y Prazicuantel (9.631 min.)

Albendazol, en este caso los compuestos endógenos del plasma interferían con la detección de este compuesto.

Mebendazol, este compuesto presentó un tiempo de retención corto, así que los compuestos endógenos del plasma interfirieron con su detección.

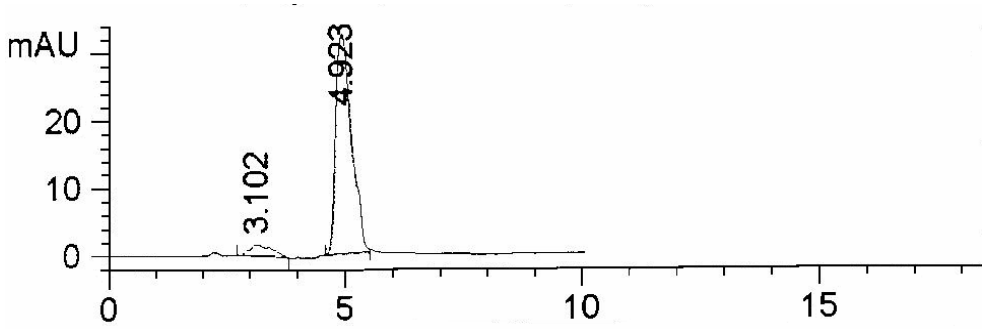


Figura 20. Cromatograma de Mebendazol (4.923 min.)

Acenafteno, el plasma interfirió con la detección de este compuesto.

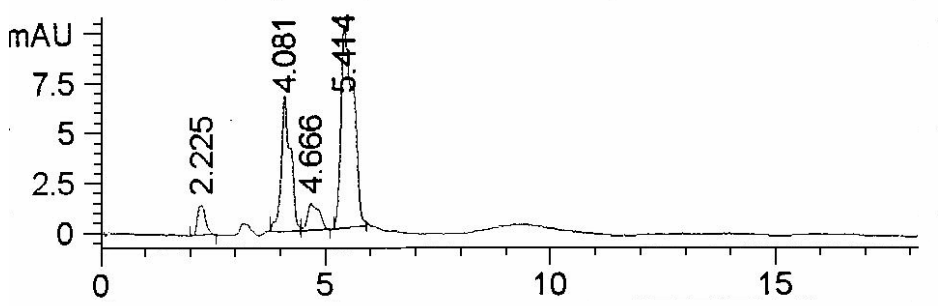


Figura 21. Cromatograma de Acenafteno (5.414 min.)

Alobarbital, su tiempo de retención fue muy corto, por lo que el plasma interfirió con su detección.

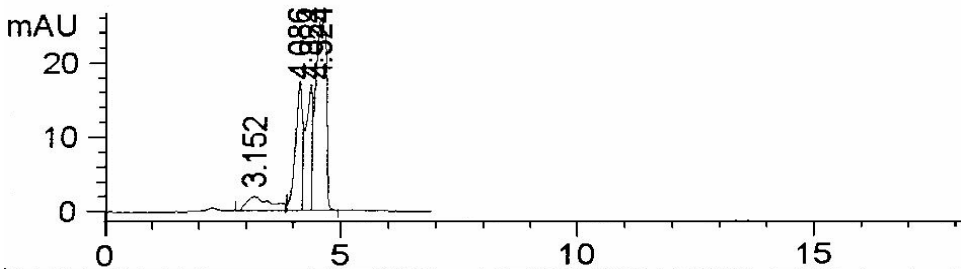


Figura 22. Cromatograma de Alobarbital (4.324 min)

Carbamazepina, el pico correspondiente a este compuesto se presentó sin simetría.

Amitriptilina, su tiempo de retención fue muy largo, de alrededor de 60 minutos.

Diazepam, éste fue el estándar elegido, ya que demostró tener un tiempo de retención en el cual este compuesto no interfería con el analito de interés, fue soluble en la mezcla de extracción y adicionalmente no se observaron interferencias de compuestos endógenos del plasma con el diazepam (Figura 23).

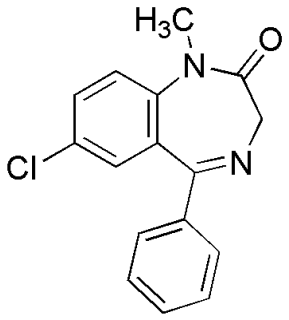


Figura 23. Diazepam

5.2.4. Desarrollo del método de extracción

- Mezcla de extracción: esta mezcla se eligió de acuerdo a la polaridad de la molécula y teniendo como objetivo el obtener un porcentaje de recuperación que fuera constante para todos los niveles de concentración dentro del rango. La mezcla de extracción seleccionada fue hexano:diclorometano:isopropanol (100:50:5), y el volumen utilizado fue de 7 mL.
- Tiempo de agitación: se evaluaron diferentes tiempos de agitación seleccionándose aquél con el que se logró la máxima extracción, el cual resultó ser de 10 minutos.
- Centrifugación: se determinó el tiempo y la velocidad de centrifugación con los que se lograra la separación del plasma y la fase orgánica, el resultado fue de 3000 rpm durante 15 min.
- Congelación: este paso es necesario para poder decantar la fase orgánica, sin correr el riesgo de que alguna fracción del plasma pudiera decantarse también. El tiempo de congelación de las muestras fue de 30 minutos a -70°C.

- Evaporación: posteriormente se transvasó la fase orgánica a un tubo limpio y se evaporó a sequedad con una corriente de N_2, durante 20 minutos, éste fue el tiempo necesario para que se evaporara todo el disolvente.
- Reconstitución del residuo: para poder inyectar la molécula en el HPLC, era necesario reconstituirla en un disolvente donde fuera soluble, en este caso se eligió acetonitrilo y el volumen de reconstitución fue de 50 μL.

5.3. Validación del método

5.3.1. Selectividad

Para determinar la selectividad se analizaron diferentes muestras de plasma para comprobar que sus compuestos endógenos no interfirieran con la señal de los analitos de interés. En la Figura 24 y 25 se presentan los cromatogramas correspondientes al blanco de plasma, obtenido de muestras de 6 diferentes ratas, y blanco de plasma adicionado con estándar interno, respectivamente.

No se observaron interferencias significativas de compuestos endógenos del plasma en la región cromatográfica del FHL-18 y del estándar interno (diazepam).

También fue analizada una muestra de blanco de plasma hemolizado y otras seis muestras de blanco de plasma provenientes de diferentes ratas.

Estas muestras no mostraron interferencia alguna con las señales de FHL-18 y diazepam.

En la Figura 26, se muestra el cromatograma obtenido de la muestra de plasma, adicionada con FHL-18 y E.I.

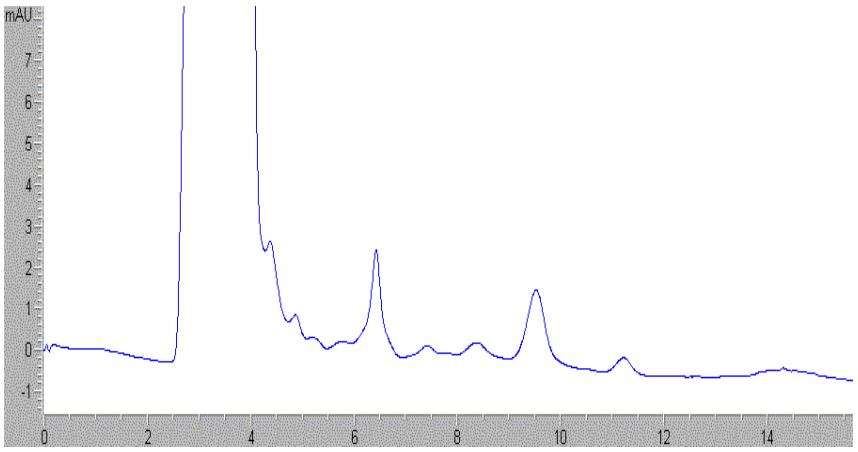


Figura 24. Blanco de plasma

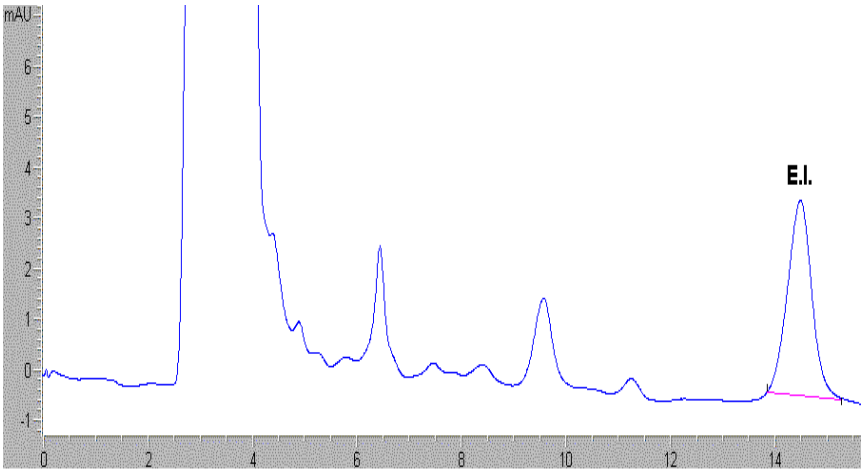


Figura 25. Blanco de plasma + estándar interno (1µg/mL)

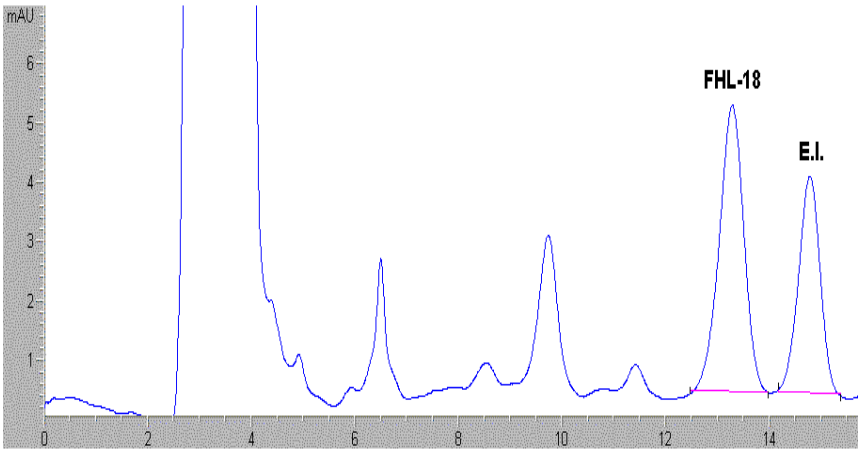


Figura 26. Plasma + FHL-18 (800 ng/mL) + estándar interno (1µg/mL)

5.3.2. Linealidad del método

La Figura 27 muestra el promedio de la relación de alturas (FHL-18/E.I.) de las tres curvas contra la concentración.

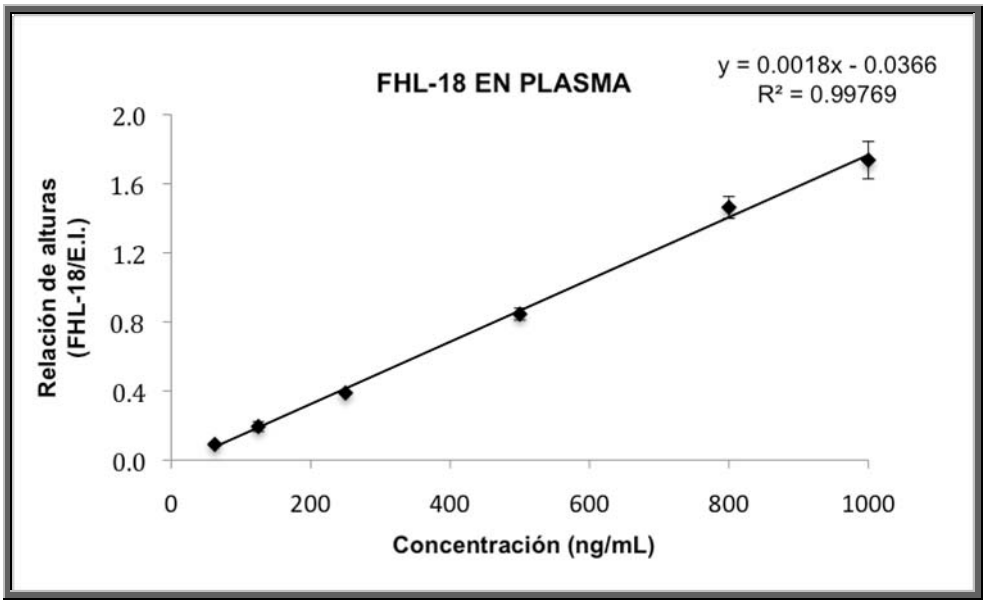


Figura 27. Linaelidad del método para FHL-18 en plasma

Con los resultados obtenidos de las tres curvas, se calculó la relación de alturas promedio, la desviación estándar y el % del coeficiente de variación promedio. Los resultados de estas determinaciones se muestran en la Tabla 3.

Para cada curva se determinó la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r), cuyos resultados, se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3. Valores promedio, desviación estándar y % de C.V. de las tres curvas para linealidad.

Concentración (ng/mL)	Relación de alturas promedio (FHL18/E.I.)	Desviación estándar	% C.V.
62.5	0.0903	0.0102	11.26
125	0.1942	0.0287	14.79
250	0.3884	0.0079	2.03
500	0.8351	0.0343	4.06
800	1.4629	0.0635	4.34
1000	1.7364	0.1086	6.25

El ensayo de Levene para verificación de la homocedasticidad de las varianzas no denotó diferencias significativas al 95% de confianza (valor-P: 0.2534)

Tabla 4. Pendiente, intercepto, ecuación de la recta y coeficiente de correlación para las tres curvas.

Parámetro	Curva A	Curva B	Curva C
Pendiente	0.001723	0.001807	0.001900
Intercepto	-0.03376	-0.03823	-0.04015
Ecuación de la recta	y = 0.0017x – 0.0338	y = 0.0018x – 0.0382	y = 0.0019x – 0.0402
Coeficiente de correlación	0.99315	0.99818	0.99714

Para corroborar que los valores de ordenadas y pendientes no presentan diferencias significativas se realizó un análisis de varianza sobre ellas. En la siguiente Tabla se indican los resultados obtenidos:

Tabla 5. Análisis de varianza para las diferentes ordenadas y pendientes

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	Valor-P
Relación de áreas (Y)	7.10985	1	7.10985	3202.27	0.0000
Ordenadas	0.0165411	2	0.00827053	3.73	0.0552
Pendientes	0.0112751	2	0.00563757	2.54	0.1203
Modelo	7.13766	5			
Residual	0.026643	12	0.00222025		

De ella se observa que al 95% de confianza las distintas ordenadas y las distintas pendientes no son diferentes entre sí.

Los datos obtenidos de la regresión lineal se utilizaron para obtener la concentración predicha y el % de desviación absoluta de cada una de las determinaciones. En la Tabla 6 se muestran los resultados de esta desviación.

Tabla 6. Desviación absoluta para los datos de linealidad (tres curvas).

Concentración teórica (ng/mL)	Concentración predicha (ng/mL)	Desviación absoluta (%)
62.5	73.43	17.49
62.5	73.20	17.13
62.5	64.94	3.90
125	114.66	8.27
125	130.46	4.37
125	137.45	9.96
250	242.07	3.17
250	233.76	6.50
250	230.30	7.88
500	486.80	2.64
500	499.62	0.076
500	476.40	4.72
800	856.72	7.09
800	819.86	2.48
800	828.21	3.53
1000	963.81	3.62
1000	982.18	1.78
1000	991.93	0.807

El método es lineal debido a que el coeficiente de correlación para cada una de las rectas es mayor al 0.99, el % del coeficiente de variación y la desviación absoluta no superan el 20% para el punto más pequeño de la curva y no superan el 15% para los demás puntos.

5.3.3. Precisión del método

5.3.3.1. Repetibilidad

De los datos que se presentan en la Tabla 7 se observa que el método analítico es repetible ya que el coeficiente de variación en cada punto control, es menor al 15%.

Tabla 7. Resultados de la repetibilidad del método

Concentración teórica (ng/mL)	Concentración predicha (ng/mL)	Promedio (ng/mL)	Desviación estándar	% C.V.
100	102.53	101. 62	1.55	1.52
	101.87			
	103.59			
	100.18			
	99.96			
450	489.08	479.20	9.67	2.02
	468.24			
	471.20			
	478.68			
	488.80			
900	791.31	782.03	10.24	1.31
	794.25			
	770.45			
	777.70			
	776.43			

5.3.3.2. Precisión intermedia

En la Tabla 8 se reportan los resultados de la precisión intermedia del método analítico para cuantificar FHL-18 en plasma. En ella se puede observar que el método es reproducible ya que el coeficiente de variación obtenido de las concentraciones predichas de las muestras, para los tres días de análisis, fue menor al 15%.

Tabla 8. Resultados de la precisión intermedia del método

Concentración teórica (ng/mL)	Concentración experimental promedio de los tres días (ng/mL)	Desviación estándar	% C.V.
100	103.26	7.29	7.06
450	471.76	18.56	3.93
900	863.30	82.39	9.54

5.3.4. Exactitud

En las Tablas 9 y 10 se muestran los resultados de cada nivel de concentración obtenidos de los datos de precisión intermedia y repetibilidad. El método es exacto ya que en ninguna de las concentraciones la desviación absoluta supera el 15 %

Tabla 9. Desviación absoluta para los datos de precisión intermedia.

Concentración teórica (ng/mL)	Concentración experimental (ng/mL)	Desviación absoluta (%)
100	93.18	6.82
	94.01	5.99
	103.83	3.83
	114.22	14.22
	110.51	10.51
	110.84	10.84
	100.18	0.180
	99.96	0.035
	101.87	1.87
450	449.37	0.140
	453.62	0.804
	449.71	0.064
	480.57	6.79
	498.76	10.83
	495.69	10.15
	468.24	4.05
	471.20	4.71
	478.68	6.37
900	826.28	8.19
	842.75	6.36
	828.66	7.93
	974.90	8.32
	974.05	8.23
	959.84	6.65
	791.31	12.08
	794.25	11.75
	777.70	13.59

Tabla 10. Desviación absoluta de los datos de repetibilidad.

Concentración teórica (ng/mL)	Concentración predicha (ng/mL)	Desviación absoluta (%)
100	102.53	2.53
	101.87	1.87
	103.59	3.59
	100.18	0.180
	99.96	0.035
450	489.08	8.68
	468.24	4.05
	471.20	4.71
	478.68	6.37
	488.80	8.62
900	791.31	12.08
	794.25	11.75
	770.45	14.39
	777.70	13.59
	776.43	13.73

5.3.5. Recobro absoluto

La Tabla 11 muestra la relación de alturas promedio para los tres niveles de concentración. A partir de estas relaciones, se calculó el recobro absoluto mediante la comparación de los puntos control en plasma con los puntos control en solución y se determinaron sus respectivos intervalos de confianza.

Como se puede observar, el recobro no fue muy alto, pero fue reproducible y estadísticamente igual para el nivel de concentración bajo y medio.

Tabla 11. Resultados del recobro absoluto.

Concentración (ng/mL)	Promedio de la relación de alturas en plasma (FHL-18/E.I.)	Promedio de la relación de alturas en solución (FHL-18/E.I.)	% de recobro
100	0.1754	0.2970	59.032 ± 8.81
450	0.8692	1.5384	56.498 ± 1.18
900	1.4257	3.0542	46.680 ± 0.63
PROMEDIO			**54.21**
DESVIACIÓN ESTÁNDAR			**6.61**
% C.V.			**12.19**

5.3.6. Estabilidad

Al evaluar la estabilidad se encontró que al dejar las muestras en la mesa de trabajo durante 4 horas la molécula no fue estable en plasma. Después de este tiempo el % de recobro en relación con la concentración nominal fue del 30%.

Con el fin de conocer mejor la estabilidad del FHL-18 a temperatura ambiente, se realizaron pruebas de la cinética de desaparición de esta molécula en plasma.

5.4. Cinética de desaparición de FHL-18

5.4.1. Cinética a temperatura ambiente

Esta prueba se realizó para tener una idea del tiempo en el cual es confiable procesar las muestras. En la Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos, para esta determinación. En ella se puede observar que la molécula se degrada rápidamente en plasma. Así a las 5 horas el porcentaje remanente sólo era del 33%.

En esta misma Tabla, se presentan los resultados del ajuste de los datos a una cinética de orden cero y de primer orden. De acuerdo a los resultados obtenidos se podría decir que el orden de la cinética que mejor se ajusta a los datos es el de primer orden, ya que el promedio del coeficiente de correlación para las curvas de las dos concentraciones estudiadas es de 0.9972, y para el orden cero, el coeficiente de correlación 0.9935, sin embargo, estos dos coeficientes son muy similares es por ello que adicionalmente se realizó un análisis de residuales en donde se determinó que el orden de la cinética para la transformación de FHL-18 es cero, los resultados de esta determinación se presenta en las Tablas 13 y 14.

Tabla 12. Resultados promedio de las tres curvas para las dos concentraciones de FHL-18 para determinar el orden de reacción y parámetros para cada cinética

Tiempo (horas)		Concentración (450 ng/mL)	Concentración (900 ng/mL)
0		490.75	895.14
1		402.39	765.88
2		341.37	679.70
3		274.89	537.81
4		233.23	445.33
5		193.40	355.58
Pendiente (m)	Orden cero	-58.88	-108.61
	Primer orden	-0.186	-0.1851
Ordenada (b)	Orden cero	469.87	884.77
	Primer orden	6.1915	6.8326
Coeficiente de correlación (r)	Orden cero	0.9896	0.9975
	Primer orden	0.9995	0.9950
Constante (k)	Orden cero	58.88	108.61
	Primer orden	0.186	0.185

Tabla 13. Análisis de residuales para la cinética de orden cero

Concentración predicha (μg/mL)	Concentración nominal (μg/mL)	$(C_{nominal}-C_{calculada})^2$
0.900	0.895	0.00002
0.791	0.766	0.00065
0.683	0.680	0.00001
0.574	0.538	0.00132
0.466	0.445	0.00041
0.357	0.356	0.00000
0.450	0.491	0.00166
0.391	0.402	0.00013
0.332	0.341	0.00008
0.273	0.275	0.00000
0.214	0.233	0.00035
0.156	0.193	0.00143
Σ		0.00607

Tabla 14. Análisis de residuales para la cinética de primer orden

Concentración predicha (μg/mL)	Concentración nominal (μg/mL)	$(C_{nominal}-C_{calculada})^2$
0.900	0.895	0.00002
0.740	0.766	0.00067
0.608	0.680	0.00508
0.500	0.538	0.00141
0.411	0.445	0.00115
0.338	0.356	0.00030
0.450	0.491	0.00166
0.374	0.402	0.00080
0.311	0.341	0.00092
0.259	0.275	0.00026
0.215	0.233	0.00033
0.179	0.193	0.00021
Σ		0.012822

En las Figuras 28, 29, 30 y 31 se muestran las curvas de orden cero y de primer orden para 900 y 450 ng/mL.

Una vez obtenida la cinética de degradación, se determinó el tiempo de vida media mediante la siguiente fórmula:

$$t_{1/2} = C_0/2k$$

en donde

$t_{1/2}$ = tiempo de vida media

k = valor absoluto de la pendiente de la recta.

C_0 = concentración inicial

Por lo tanto el tiempo de vida medía para FHL-18 a temperatura ambiente en plasma es de aproximadamente 4.1 horas.

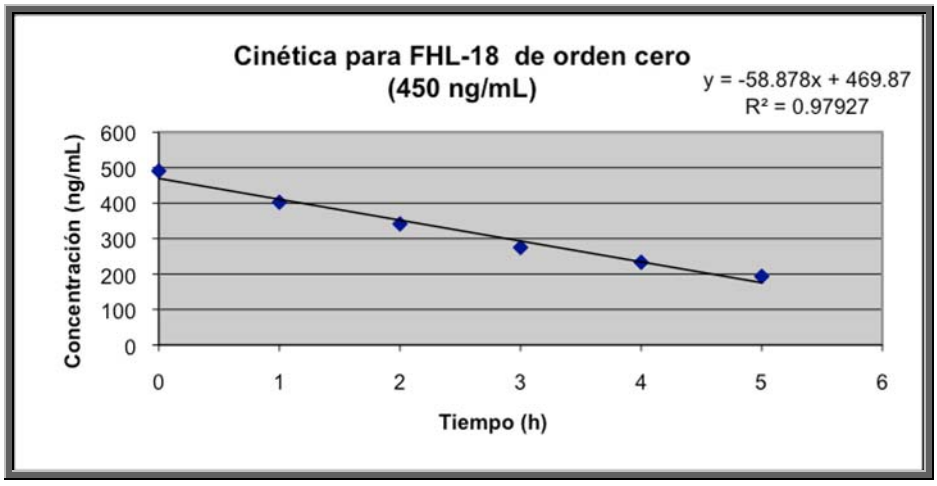


Figura 28. Cinética de orden cero para FHL-18 a 450 ng/mL

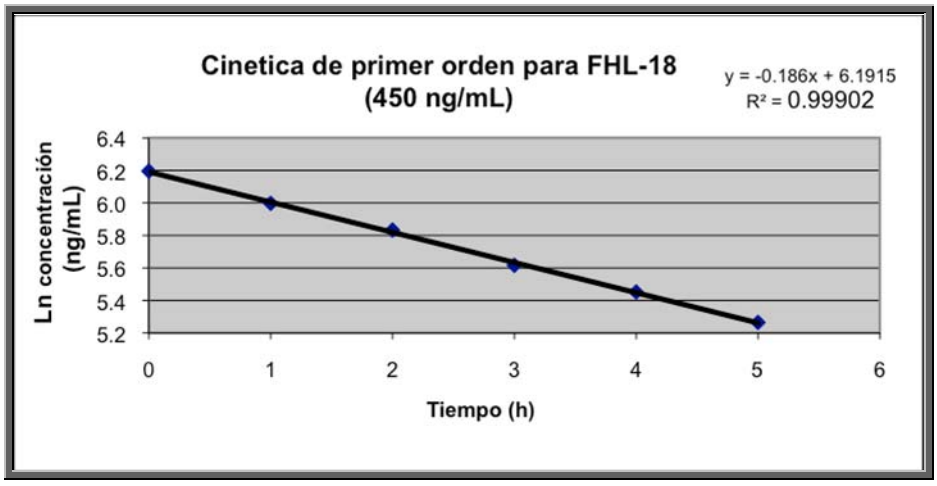


Figura 29. Cinética de primer orden para FHL-18 a 450 ng/mL

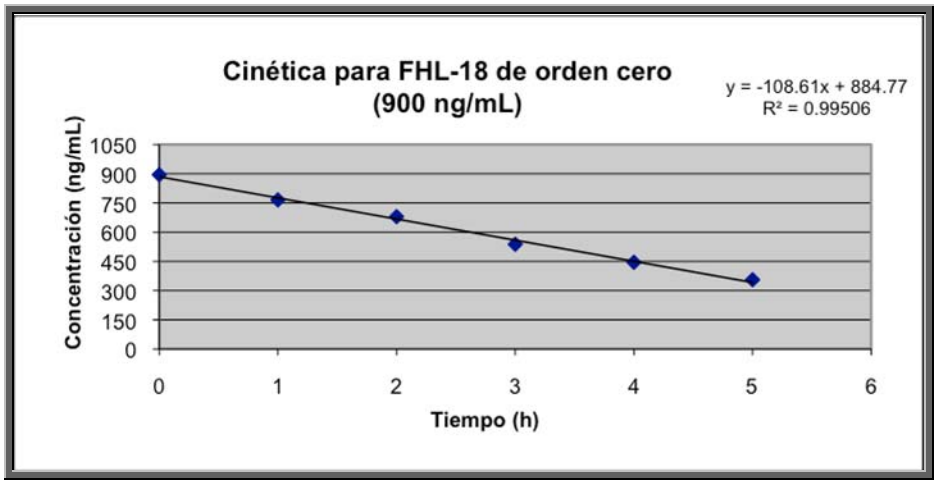


Figura 30. Cinética de orden cero para FHL-18 a 900 ng/mL

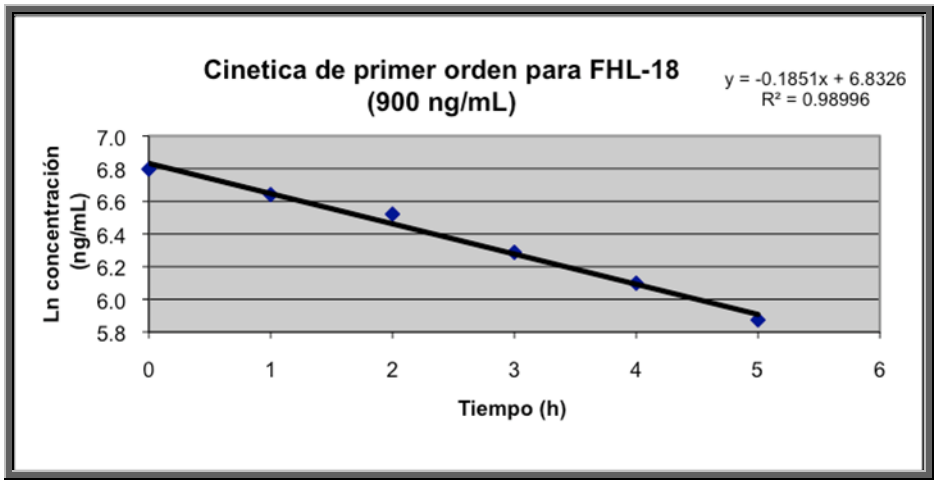


Figura 31. Cinética de primer orden para FHL-18 a 900 ng/mL

5.4.2. Cinética a temperatura corporal de la rata (38° C)

Se realizó este estudio para conocer la velocidad a la cual FHL-18 se degrada (o se hidroliza) en el plasma a la temperatura corporal de la rata (38° C). En la Tabla 15 se muestran las concentraciones obtenidas al interpolar la relación de alturas de las muestras procesadas a diferentes tiempos en la curva de calibración.

Tabla 15. Resultados de la cinética a 38 ºC

Tiempo (minutos)	Concentración (450 ng/mL)	Concentración (900 ng/mL)
0	480.94	966.68
15	334.83	641.34
30	212.71	459.98
45	160.30	311.10
60	118.26	222.41
90	65.70	129.87
120	-	86.64

El procedimiento para determinar el orden de reacción fue el mismo que el utilizado para determinar el orden a temperatura ambiente. Sin embargo, desde que se graficaron los resultados (Figuras 32 y 33) era evidente que la curva obtenida no se ajustaba a una cinética de orden cero. Por ello, sólo se calcularon los parámetros para la cinética de primer orden. Estos resultados se observan en la Tabla 16.

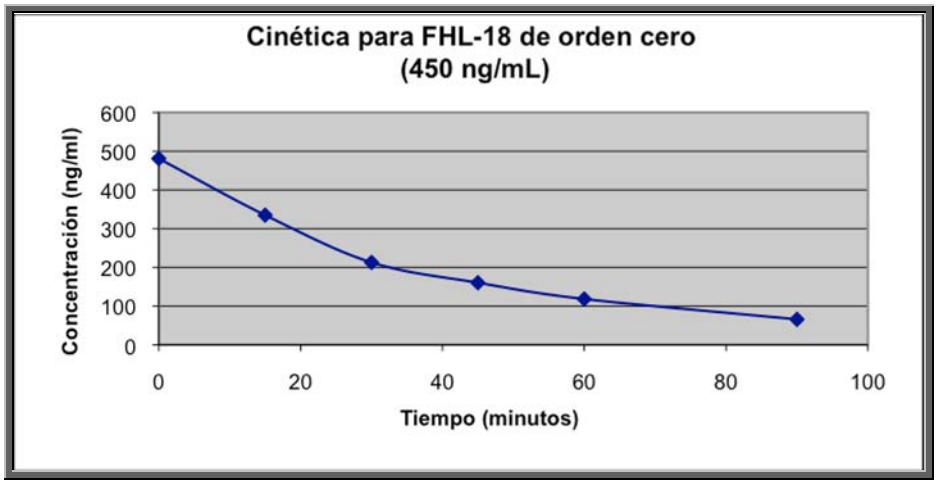


Figura 32. Cinética de orden cero para FHL-18 (450 ng/mL) a 38 ºC

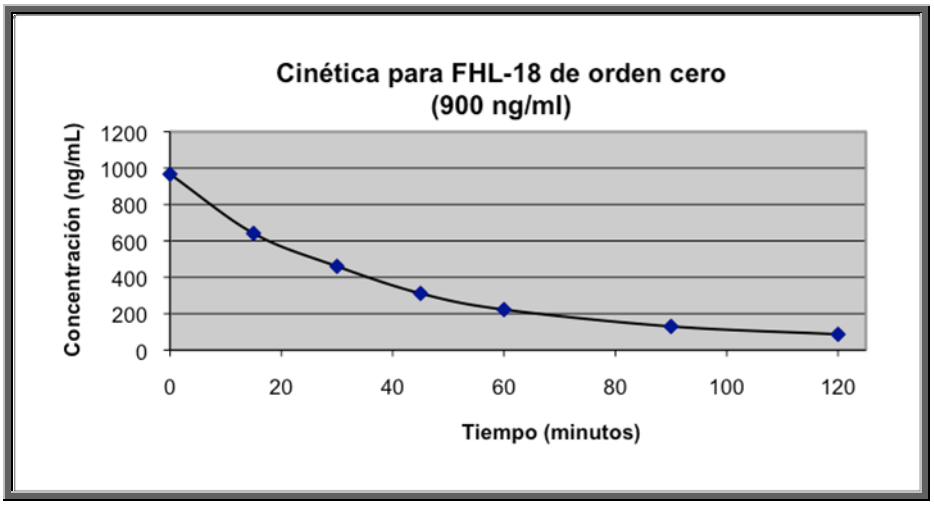


Figura 33. Cinética de orden cero para FHL-18 (900 ng/mL)

El tiempo de vida media se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$t_{1/2} = \text{Ln } 2/ k$$

en donde

$t_{1/2}$ = tiempo de vida media

k = valor absoluto de la pendiente de la recta

Tabla 16. Parámetros de la cinética de primer orden.

Parámetro	Concentración (450 ng/ml)	Concentración (900 ng/ml)
m	-0.020	-0.020
b	6.1136	6.7468
r	0.9964	0.9925
$t_{1/2}$ (min)	31.5	34.6
k (min^{-1})	0.022	0.020

Las Figuras 34 y 35 muestran las curvas de FHL-18 a 450 y 900 ng/mL ajustadas a una cinética de primer orden.

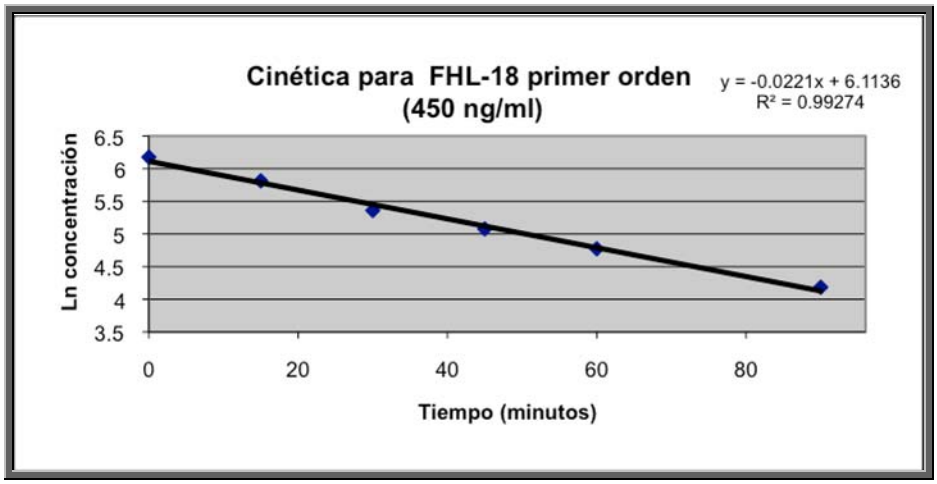


Figura 34. Cinética de primer orden para FHL-18 (450 ng/mL) a T = 38° C

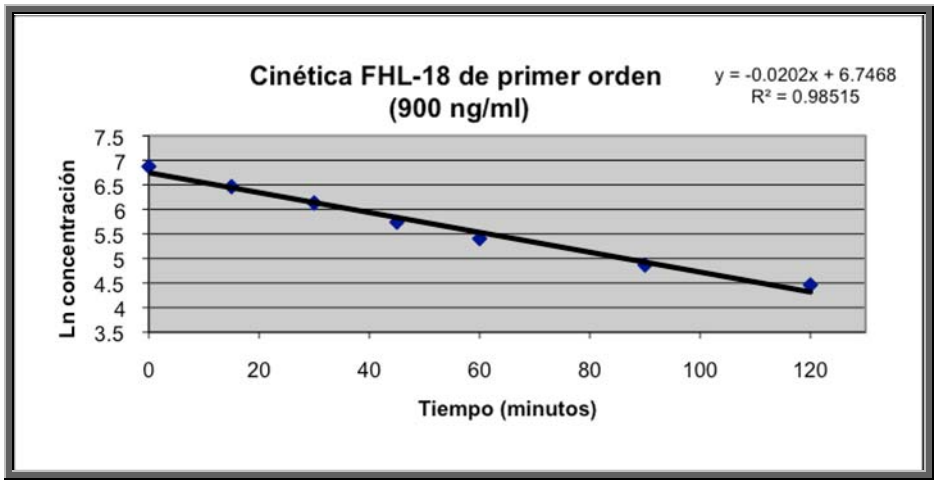


Figura 35. Cinética de primer orden para FHL-18 (900 ng/mL) a T = 38° C

5.4.3. Estudio de detección de FHL-18 en ratas administradas

Tomando en consideración la baja estabilidad de la molécula se realizó un estudio farmacocinético en ratas, a las cuales se les administró una dosis de 15 mg/kg de FHL-18 por vía oral, encontrándose que a ningún tiempo de muestreo fue posible detectar la molécula.

Con estos resultados se puede decir que es probable que la molécula se éste transformando en el plasma y no se puede descartar que también sufra efecto

de primer paso en el hígado, ya que es en este órgano en donde se llevan a cabo las principales reacciones de metabolización que incluyen oxidación, reducción y conjugación. Para determinar el mecanismo mediante el cual la molécula se biotransforma se requieren de otros estudios, los cuales se pueden llevar acabo con enzimas y encontrar al metabolito que se está formando.

La elucidación del metabolito formado es importante, ya que a partir de éste se pueden realizar estudios que nos permita saber si presenta la actividad deseada y de esta manera continuar con los estudios clínicos de esta molécula.

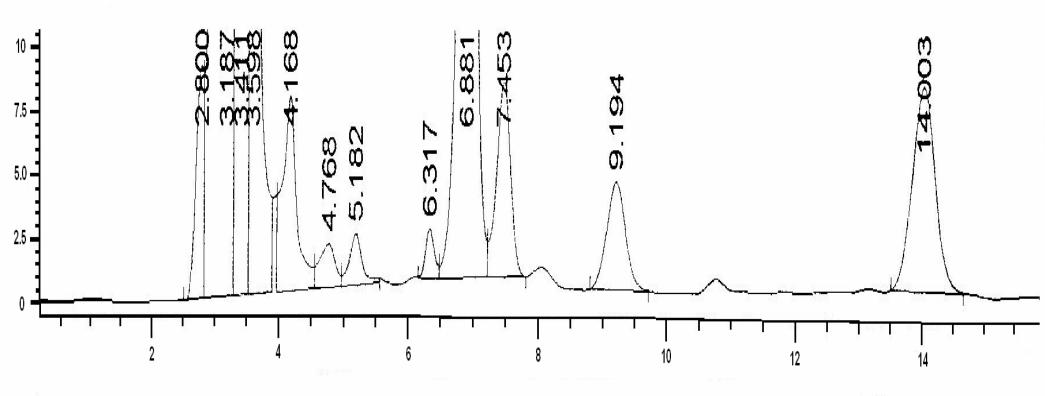


Figura 36. Cromatograma de plasma de rata 4 horas después de la administración de FHL-18

Haciendo una recopilación de los resultados obtenidos y observando la estructura molecular de FHL-18 se puede inferir que este compuesto es hidrolizado por las enzimas presentes en el plasma, llamadas esterasas, las cuales tienen la capacidad de hidrolizar grupos éster y amida, entre otros. Sin embargo, estas enzimas no sólo están presentes en el plasma, también se pueden encontrar en intestino e hígado, lo que también pudo haber causado

que no se detectara FHL-18 en el estudio realizado con las ratas. Es importante puntualizar que la cantidad de enzimas puede diferir entre especies. Un ejemplo de ello es que la enzima llamada carboxilesterasa se encuentra en mayor cantidad en ratones que en ratas, sin embargo, esta enzima no exhibe actividad en plasma humano (Koitka M, 2008), es por ello que se deben continuar con otros estudios para determinar si FHL-18 es estable en plasma humano.

6. CONCLUSIONES

A) El método analítico desarrollado y validado, resultó ser:

- Selectivo, ya que no se presentaron interferencias de los compuestos endógenos del plasma.
- Lineal en el intervalo de concentraciones entre 62.5 y 1000 ng/ml.
- Preciso, tanto para muestras procesadas en el mismo día, como para muestras procesadas en diferentes días, cuando se realiza el análisis en el mismo laboratorio, con el mismo equipo y bajo las mismas condiciones de trabajo.
- Exacto, ya que la desviación con respecto a las concentraciones nominales fue menor al 15%.

B) El FHL-18

- No es estable a temperatura ambiente.
- A temperatura ambiente la cinética de hidrólisis de FHL-18 en plasma es de primer orden con una vida media de 4.1 horas.
- A 38° C la cinética de hidrólisis de FHL-18 en plasma es de primer orden con una vida media de 33.5 minutos.

7. PERSPECTIVAS

- Realizar estudios para determinar cual es el metabolito del FHL-18 que presenta el efecto terapéutico
- Evaluar la actividad cisticida *in vitro* del metabolito formado.
- Determinar la actividad de FHL-18 en otras especies animales.

8. BIBLIOGRAFÍA

Alarcón F. (2006).Neurocisticercosis: etiopatogenia, manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento. Revista Neurología, 43 (Supl 1): S93-S100.

Allen Crow, Abdolsamad Borazjani, Philip M. Potter, Mathew K. Ross. (2007). Hydrolysis of pyrethroids in human and rat tissue: Examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. Toxicology and Applied Pharmacology, 221: 1-12.

Aulton Michael. (2004). Farmacia: ciencia y diseño de formas farmacéuticas. Madrid, España.

Brutto del O.H. (1999). Neurocysticercosis. Revista de Neurología, 29 (5): 456-466.

Bucceri María Verónica. (2005). Documentación preclínica exigida por autoridades regulatorias de países de alta vigilancia sanitaria. Comparación entre FDA y EMEA. Tesina Universidad de Belgrano. No 157.

Carpio Arturo. (2002). Neurocysticercosis: an update. The Lancet Infectious Diseases, 2: 751-762.

Center for Drug Evaluation and Research, Center for Drugs and Biologics, Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. (1987). Guideness for Industry.Guideline for the Format and Content of the Nonclinical Pharmacology/Toxicology Section of an Application.

Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research. (1995). Guidance for Industry. Content and Format of Investigational New Drug Applications (INDs) for Phase 1 Studies of Drugs, Including Well-Characterized, Therapeutic, Biotechnology- derived Products.

Chaturvedi Pravin, Decker Caroline, Odinecs Aleksandrs (2001) Prediction of pharmacokinetic properties using experimental approches during early drug discovery. Current opinion in Chemical Biology. 5: 452-463.

De Silva, N., Guyatt, H., Bundy, D. (1997). Anthelmintics. A comparative review of their clinical pharmacology. Drugs, 53, 769-788.

Ericssson H., Tholander B., Regardh C.G.. (1998). In vitro hydrolysis rate and protein binding of clevidipine, a new ultrashort-acting calcium antagonist metabolized by esterases, in different animal species and man. European Journal of Pharmaceutical Science, 8: 29-37.

European Medicines Agency. (2009). Note for Guidance on Non-Clinical Safety Estudies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals (CPMP/ICH/286/95).

García Héctor; González Armando, Teniasis por Taenia solium. Recuperado el 6 de septiembre del 2009 de:
http://www.fihu-diagnostico.org.pe/revista/numeros/2000/julago00/176-178.html

García-Conde Javier, (2003). Metodología de la investigación clínica. Medicina STM editores. Bacelona, España.

Garg RK. (1997). Drug Treatment of neurocysticercosis. National Medical Journal of India, 10 (4): 173-7.

Gresner Peter, Dolník Martin, Waczulíkova Iveta, Bryszewska María, Siurova Libusa, Watala Cesary. (2006). Increased blood plasma hydrolysis of acetylsalicylic acid in type 2 diabetic patients: A role of plasma esterases. Biochímica et Biophysica Acta, 1760: 207-215.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2000). Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals S7A. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use.

Hooper G.H.S.. (1976). Esterase mediated hydrolysis of naphthyl esters, malathion, methoprene, and cecropia juvenile hormone in Culex pipiens pipiens. Insect Biochemistry.,6: 255-266.

Imirizaldu L., Miranda L , Garcia-Gurtubay I., Gastón I. , Urriza J. , Quesada P. -(2004)-Neurocisticercosis. Una Enfermedad Emergente.-Anales del sistema sanitario de Navarra.

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.

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

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.

Larralde Carlos, S. De Aluja Aline (coords) (2006). Cisticercosis, Guía para profesionales de la salud. Fondo de cultura económica.

M Christopher, De Giorgio, M.D., Marco T. Medina, M.D., Reyna Durón, M.D., Chi Zee, M.D., and Susan Pietsch Escueta, M.P.H. (2004). Neurocysticercosis, Current Review. Epilepsy Currents, 4 (3): 107-111.

Matthias Koitka, Joachim Höchel, Detlev Obst, Antje Rottmann, Hille Gieschen, Hans- Hubert Borchert. (2008). Determination of rat serum esterase, activities by an HPLC method using S-acetylthiocholine iodide and p-nitrophenyl acetate. Analytical Biochemistry, 381: 113-122.

Massaiti Takayanagui Osvaldo. (2004). Therapy for neurocysticercosis. Expert Review Neurotherapeutics, 4(1): 129-139.

Meza-Lucas Antonio, Aguilar Rebolledo Francisco. (2002) Teniasis humana por Taenia Solium. Revista Mexicana de Patología Clínica; 49(2): 92-9.

Miranda Miranda Estefan, Liébano Hernández Enrique, López Arellano María Eugenia, Mendoza de Gives Pedro, Cossio Bayúgar Raquel. (2006). Marcadores enzimáticos como indicadores de resistencia a los antihelmínticos en el nemátodo parásito gastroentérico de rumiantes haemonchus contortus. Bioquimia, 31 (1): 6-12.

Morales Julio, Martínez José Juan z, Rosetti Marco, Fleury Agnes, Maza Victor, Hernandez Marisela, Villalobos Nelly, Fragoso Gladis, de Aluja Aline S., Carlos Larralde, Edda Sdutto. (2008). Spatial Distribution of Taenia soliun Porcine Cysticercosis within a Rural Area of Mexico. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2(9): e284.

Mutch Elaine, Nave Ruediger, McCracken Nigel, Zech Karl, Williams Faith M. (2007). The role of esterases in the metabolism of ciclesonide to desisobutyryl-ciclesonide in human tissue. Biochemical Pharmacology, 73: 1657-1664.

Norma Oficial Mexicana 177, NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Recuperado el día 01-Sep-2009: http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/177ssa18.html.

Pharmacelsus. (2004). Preclinical Drug Development. A Guidance Prepared by Pharmacelsus Contract Research Organisation.

Nath Prasad Kashi, Prasad Amit, Verma Avantika and Kumar Singh Aloukick. (2008). Human cysticercosis and Indian scenario: a review. Journal Bioscience. 33: 571-582.

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. Synthesis and in vitro cysticidal activity of new benzimidazole derivatives. European Journal of Medicinal Chemistry, 2009, 44: 1794-800.

Palomares-Alonso Francisca. (2009). Evaluación farmacodinámica y farmacocinética de nuevas formulaciones y análogos de albendazol con posible actividad cisticida. Tesis de doctorado UNAM.

Panchagnula Ramesh, Thomas Narisetty Sunil. (2000). Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. International Journal of Pharmaceutics, 201: 131-150.

Perez-Lopez C., Isla-Guerrero A., Álvarez F., Budke M., J.C. Fernández-Miranda, J.F. Paz, M. Pérez- Álvarez. (2003). Revista de Neurología, 36 (9): 805-811.

Robinson, M.W., McFerran, N., Trudgett, A., Hoey, L., Fairweather, I. (2004). A possible model of benzimdazole binding to β-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 23: 275-284.

Smith D.A. Waterbeemd Han van, Walker Don. (2006). Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design. Weinheim, Germany. Segunda edición, Wiley-VCH.

Satoh Tetsuo. (2005). Toxicological implications of esterases-From molecular structures to functions, Review. Toxicology and Applied Pharmacology, 207: S11-S18.

Steinmetz Karen L and Edward G Spack. (2009). The basics of preclinical drug development for neurodegenerative disease indications. BMC Neurology., 9 (Suppl 1): S2.

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center of Drug Evaluation and Research. (2009). Guidance for Indutry, Animal Models-Essential Elements to Address Efficacy Under the Animal Rule.

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center of Drug Evaluation and Research. (2001). Guidance for Indutry, Bioanalytical Method Validation.

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center of Drug Evaluation and Research. (2006). Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers. Exploratory IND Studies.

Yang Feng, Chuanbing Bian, Lili Zhu, Gengxiang Zhao Zixiang Huang, Mingdong Huang. (2007). Effect of human serum albumin on drug metabolism: Structural evidence of esterase activity of human serum albumin. Journal of Structural Biology, 157: 348-355.

Wu Hi-Yuan, Benet Leslie (2005) Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. 2 (1): 11-23.