



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

TEMA DE TESIS

**“ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE UNA
FORMULACIÓN TERNARIA CONTENIENDO EL
COMPUESTO (5-CLORO-2-METILTIO-6-(1-
NAFTILOXI)-1H-BENCIMIDAZOL)-
βCICLODEXTRINA Y PVP”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. JESSICA HERNÁNDEZ PINEDA



TUTORA: DRA. HELGI HELEN JUNG COOK

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado:

Presidente: M en C. Juan Manuel Rodríguez	Facultad de Química, UNAM
Vocal: Dra. Martha Patricia García Camacho	Facultad de Química, UNAM
Vocal: Dra. Flora Adriana Ganem Rondero	FES-Cuautitlán, UNAM
Vocal: Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano	FES-Cuautitlán, UNAM
Secretario: Dra. Adriana Miriam Domínguez Ramírez	UAM-Xochimilco

Sitio donde se desarrolló el tema

Departamento de Farmacia, Laboratorio 112-113, División de Estudios de Posgrado, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

En su fase de campo (muestreo): Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEIPSA) de la Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Tutora:

Dra. Helgi Helen Jung Cook

Sustentante:

Q. Jessica Hernández Pineda

AGRADECIMIENTOS

A *Dios*. Sé que sin *Él*, nada es posible...

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Facultad de Química, mi hermosa casa de estudios es un gran honor y una responsabilidad muy grande la que tengo contigo, gracias por permitirme formar parte de tu historia y prepararme profesionalmente con un alto nivel académico.

Al Posgrado en Ciencias Químicas de la UNAM que me respaldará siempre en mi vida profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de los estudios de posgrado (Maestría) durante el periodo de Febrero de 2009-Enero 2011, No. de Becario 227100.

Al Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia por las facilidades otorgadas durante la fase del estudio *in vivo*.

A la Dra. Helgi Helen Jung Cook, gracias por darme la oportunidad de adentrarme en un mundo nuevo para mí, por la paciencia, los conocimientos transmitidos y el apoyo académico, es un gran ejemplo a seguir.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra y la M. en C. Alicia Hernández Campos, por apoyarme durante la síntesis del fármaco α BIOF10, gracias porque durante el tiempo que forme parte de su grupo de trabajo me sentí en casa, agradezco el apoyo que en todo momento recibí de su parte y porque no me resta más que decir que son de los mejores investigadores que he tenido el placer de conocer.

Al veterinario Dr. Froylán Ibarra Velarde, por su apoyo, amabilidad, disposición y colaboración durante la fase de muestreo del presente trabajo.

Al Q.F.B Pedro Josué Trejo Soto por el apoyo y supervisión durante la síntesis del fármaco y a la M. en C. María de Lourdes Mayet Cruz por facilitarme los medios para llevar a cabo el proyecto.

A los miembros del jurado, los Dres. Enrique Ramón Ángeles Anguiano, Adriana Miriam Domínguez Ramírez, Flora Adriana Ganem Rondero y Martha Patricia García Camacho y al M. en C. Juan Manuel Rodríguez, por sus valiosas, acertadas y siempre constructivas opiniones y sugerencias para perfeccionar el presente trabajo a través de su experiencia.

A la Dra. Inés Fuentes Noriega y a la M. en C. Kenneth Rubio Carrasco, por todo el apoyo, por los conocimientos transmitidos, asesorías, opiniones y sugerencias que me fueron formados en el área de la Biofarmacia, además de la cordialidad, paciencia y sensibilidad para conmigo, gracias de corazón.

A mi *hermosa familia*, sólo hay y siempre habrá palabras de amor y agradecimiento hacia ustedes, gracias por formarme y hacerme la persona que soy, por enseñarme que el trabajo, la perseverancia y la humildad son tan importantes en la vida, gracias por su ejemplo de lucha constante. Por supuesto, este triunfo también es *suyo*...

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biofarmacia que me dieron la oportunidad de integrarme en un nuevo espacio, eso fue muy importante para mí y les agradezco con todo mi cariño, gracias por el apoyo y la motivación constante, me siento muy feliz de formar parte de BH112-13.

A todos mis amigos que han estado, están y seguirán estando en mi corazón. Cada uno sabe quién es y cuán importante es para mí pues forman parte de mi vida y agradezco siempre el que me permitan ser parte de la suya.

A Dios

A mis padres, Blanca Rosa y Romualdo

A mis hermanos, Saúl, Omar y Erica

Este trabajo fue presentado en la actividad académica *QuimiUNAM* 2010 celebrado en la Universidad Nacional Autónoma de México, noviembre 2010 y en el Primer Congreso de Alumnos de Posgrado de la UNAM, Mayo 2011.

Índice General

<i>Capítulo</i>	<i>Página</i>
Índice general	i
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	iv
Índice de diagramas	v
Abreviaturas y símbolos	vi
Resumen	vii
Introducción	1
Capítulo 1 Generalidades	3
1.1 <i>Fasciola hepática</i>	3
1.1.1 Morfología	4
1.1.2 Ciclo biológico y mecanismo de transmisión	5
1.1.3 Epidemiología	6
1.1.4 Diagnóstico	7
1.1.5 Tratamiento	8
1.2 El derivado bencimidazólico α BIOF10	9
1.2.1 Estudios previos de farmacocinética del compuesto α BIOF10	10
1.3 Solubilidad y biodisponibilidad	12
1.3.1 Ciclodextrinas	14
1.3.2 Técnicas de preparación de complejos de inclusión	16
Capítulo 2 Justificación	17
Capítulo 3 Hipótesis	18
Capítulo 4 Objetivo General	19
Capítulo 5 Desarrollo Experimental	20
5.1 Síntesis del compuesto α BIOF10	20
5.2 Optimización y validación del método analítico para la cuantificación del compuesto α BIOF10 y sus metabolitos (α -SO y α -SO ₂) en plasma	21
5.2.1 Reactivos	21
5.2.2 Equipos	22
5.2.3 Preparación de disoluciones	22
5.2.4 Curva de calibración	23
5.2.5 Preparación de las concentraciones de los puntos control del compuesto α BIOF10 y sus metabolitos, α -SO y α -SO ₂	23
5.2.6 Procedimiento de extracción	25
5.2.7 Condiciones cromatográficas	27
5.2.8 Validación del método analítico	27

5.3 Estudio farmacocinético en ovinos	31
5.3.1 Material	31
5.3.2 Formulación administrada	31
5.3.3 Diseño experimental	32
Capítulo 6 Resultados y Discusión	35
6.1 Síntesis del compuesto α BIOF10	35
6.2 Optimización y validación del método analítico para la cuantificación del compuesto α BIOF10 y sus metabolitos (α -SO y α -SO ₂) en plasma	36
6.3 Estudio farmacocinético en ovinos	49
6.3.1 Análisis farmacocinético del sulfóxido de alfa, α -SO	49
6.3.2 Análisis farmacocinético de la sulfona de alfa, α -SO ₂	52
6.3.3 Análisis de la biodisponibilidad de las dos formulaciones α BIOF10- β CD-PVP	55
Capítulo 7 Conclusiones	59
Capítulo 8 Referencias	60
Apéndices	64
A. Formulación de la suspensión del complejo α BIOF10- β CD-PVP	64
B. Caracterización del compuesto α BIOF10	65
C. Datos individuales de los Cp vs tiempo en ovinos	66
D. Perfiles de concentración plasmática-tiempo de α -SO y α -SO ₂ .	68

Índice de figuras

Figura no.	Nombre	Página
Figura 1.	<i>Fasciola hepática</i> adulta.	4
Figura 2.	Ciclo biológico de la <i>Fasciola hepática</i> .	6
Figura 3.	Estructura del compuesto 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol, denominado α BIOF10.	10
Figura 4.	Sistema de Clasificación Biofarmaceutica con base en la solubilidad y permeabilidad de los fármacos.	12
Figura 5.	Estructura de la β -ciclodextrina (β CD), con siete unidades de D-glucosa.	14
Figura 6.	Diseño cruzado para la evaluación farmacocinética del compuesto α BIOF10 y sus metabolitos.	33
Figura 7.	Figura 7. Cromatogramas del compuesto α BIOF y sus metabolitos. a) blanco de plasma, b) SI, ABZ-SO en plasma de ovino, c) α BIOF10, α -SO, α -SO ₂ y ABZ-SO en plasma de ovino (20 μ L, 3.2 μ g/mL). Columna analítica (Spherisorb, Waters). Detección UV, 304 nm. Fase móvil MeOH:ACN:Buffer de acetatos (10 mM, pH 5), 40:35:25 (v/v).	37
Figura 8.	Linealidad del método analítico (0.2 – 12.8 μ g/mL)	39
Figura 9.	Gráfico de % recobro absoluto para el compuesto α BIOF10 y sus metabolitos α -SO y α -SO ₂ , n=3.	46
Figura 10.	Perfiles de concentración plasmática promedio \pm error estándar ($C_p \pm ES$) para el metabolito α -SO obtenidos después de la administración de dos diferentes formulaciones, Formulación Vía MW y Convencional.	51
Figura 11.	Perfiles de concentración plasmática promedio \pm error estándar ($C_p \pm ES$) para el metabolito α -SO ₂ obtenidos después de la administración de dos diferentes formulaciones, Formulación Vía MW y Convencional.	54

Índice de tablas

Tabla no.	Nombre	Página
Tabla 1.	Parámetros farmacocinéticos de los metabolitos α -SO y α -SO ₂ del compuesto α BIOF10 obtenidos en estudios previos.	11
Tabla 2.	Parámetros de la regresión lineal de las curvas de calibración para el compuesto α BIOF10 y sus metabolitos.	40
Tabla 3.	Exactitud del método analítico para las curvas de calibración de α BIOF10 y sus metabolitos.	41
Tabla 4.	Exactitud del método analítico para los puntos control de α BIOF10 y sus metabolitos.	42
Tabla 5.	Precisión intra-día del método analítico para la cuantificación del compuesto α BIOF10 y sus metabolitos.	43
Tabla 6.	Precisión inter-día del método analítico para la cuantificación del compuesto α BIOF10 y sus metabolitos.	44
Tabla 7.	Valores promedio de los Recobros Absolutos a cada nivel de concentración de la curva n=3, para α BIOF10 y sus metabolitos.	45
Tabla 8.	Valores promedio de los Recobros Absolutos de los puntos control n=5, para α BIOF10 y sus metabolitos.	47
Tabla 9.	Relación Señal Ruido S/N para el compuesto α BIOF10 y sus metabolitos.	48
Tabla 10.	Valores de concentración recuperada en el límite inferior de la curva de calibración del compuesto α BIOF10 y sus metabolitos.	48

Tabla 11.	Concentraciones plasmáticas promedio de α -SO Cp, para ambas formulaciones después de la administración de una dosis única de 12 mg/kg vía oral.	50
Tabla 12.	Parámetros farmacocinéticos del metabolito α -SO.	52
Tabla 13.	Concentraciones plasmáticas promedio de α -SO ₂ Cp, para ambas formulaciones después de la administración de una dosis única de 12 mg/kg vía oral.	53
Tabla 14.	Parámetros farmacocinéticos del metabolito α -SO.	54
Tabla 15.	Intervalos de confianza de los parámetros farmacocinéticos de los metabolitos α -SO y α -SO ₂ .	56
Tabla 16	Comparación de los parámetros farmacocinéticos del sulfóxido de alfa, α -SO, obtenidos al administrar las tres diferentes formulaciones A: α BIOF10- β CD-PVP vía MW, B: α BIOF10- β CD-PVP vía secado convencional y C: α BIOF10 en suspensión.	57

Índice de Diagramas

Diagrama no.	Nombre	página
Diagrama 1.	Preparación de la curva de calibración de α BIOF10 y sus metabolitos α -SO y α -SO ₂ en plasma mediante diluciones sucesivas	24
Diagrama 2.	Procedimiento de extracción del compuesto α BIOF10 y sus metabolitos α -SO y α -SO ₂ en plasma.	26

Abreviaturas y símbolos

abreviatura	Significado
αBIOF10	5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol
α-SO	Sulfóxido del 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol
α-SO₂	Sulfona del 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol
ABZ	Albendazol
ABZ-SO	Sulfóxido del albendazol
CD	Ciclodextrina
βCD	Beta-ciclodextrina
PVP	Polivinilpirrolidona
VA	Vinil acetato
MeOH	Metanol
ACN	Acetonitrilo
CLAR-UV	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectroscopia Ultra Violeta
RMN-1H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
EM	Espectrometría de Masas
%CV	Coefficiente de variación
DE	Desviación estándar
%DEA	Desviación estándar absoluta
ES	Error estándar
C_{max}	Concentración plasmática máxima
T_{max}	Tiempo en el cual se alcanza la concentración máxima
AUC	Área bajo la curva
μg	Microgramos
mL	Mililitros
S/N	Señal ruido
Cp	Concentración plasmática
T	Tiempo
min	Minutos
μL	Microlitros
NOM	Norma Oficial Mexicana
rpm	Revoluciones por minuto
r²	Coefficiente de determinación
b	Ordenada al origen
r	Coefficiente de correlación
m	Pendiente de la recta
MO	Irradiación por microondas
SC	Secado convencional

RESUMEN

En el presente trabajo, se evaluó la biodisponibilidad del complejo de inclusión conteniendo el agente fasciolicida 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol combinado con β ciclodextrina y polivinilpirrolidona denominado α BIOF10- β CD-PVP. El complejo fue preparado por la técnica de amasado, empleando dos diferentes técnicas de secado, irradiación de microondas (MO) y secado convencional (SC).

vii

El estudio se llevó a cabo en 6 ovinos cruce *East Friesian* con *Pelybuey* a los cuales se les administraron ambos complejos por vía oral en dos periodos diferentes, empleando una dosis de 12mg/kg de α BIOF10 (suspensión, 2% de α BIOF10), de acuerdo a un diseño cruzado. Se tomaron muestras sanguíneas por venopunción yugular a los siguientes tiempos de muestreo: 0 (blanco), 1.5, 3, 4.5, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 36, 48, 72, 96 horas. Las concentraciones plasmáticas del compuesto α BIOF10 y sus metabolitos el sulfóxido y la sulfona, (α -SO y α -SO₂) se determinaron empleando un método analítico por CLAR-UV previamente validado.

Los resultados mostraron que el compuesto α BIOF10 no pudo ser detectado en plasma lo que indica que presenta un extenso efecto de primer paso, ya que solo pudieron cuantificarse los metabolitos, α -SO y α -SO₂. Ello concuerda con estudios previos en los cuales se evaluó el compuesto α BIOF10.

Los valores de concentración plasmática máxima C_{max} para el α -SO fueron 9.79 ± 3.76 y 9.14 ± 4.19 μ g/mL para las formulaciones MO y SC respectivamente. En el caso del metabolito α -SO₂ los valores obtenidos fueron 2.31 ± 0.81 y 1.92 ± 0.804 μ g/mL.

Con respecto a el área bajo la curva $ABC^{0-\infty}$ del α -SO los valores obtenidos al administrar las formulaciones MO y SC fueron 258.73 ± 66.14 y 217.62 ± 78.8 μ g*h/mL y para α -SO₂ 29.49 ± 14.79 y 24.23 ± 7.65 μ g*h/mL. Al realizar el análisis estadístico se encontró que no existen diferencias significativas en C_{max} y $ABC^{0-\infty}$, lo cual sugiere que la irradiación con MO no mejora la biodisponibilidad de este complejo. Al comparar los resultados con los obtenidos en un estudio previo realizado por Ramírez, N y col (2008) se observó que la C_{max} obtenida al administrar los complejos de inclusión aumenta considerablemente comparado con la administración del compuesto α BIOF10 solo en suspensión, lo que indica que los complejos de inclusión mejoran la velocidad de absorción de esta molécula.

INTRODUCCIÓN

La importancia de las infecciones parasitarias transmitidas por trematodos y la necesidad de implementar medidas de control para las mismas, han sido resaltadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). A su vez, los trematodos transmitidos por vegetales han sido incluidos recientemente en la lista de interés del Instituto de Tecnología Alimentaria, (Expert Panel on Food Safety and Nutrition). La fasciolosis, enfermedad ocasionada por la *Fasciola hepática*, también fue agregada a la lista de helmintiasis de gran impacto sobre el hombre en la Tercera Reunión Global de los Socios para el Control de Parásitos (PPC) realizada en la OMS, en Geneva, noviembre del 2004^{1,2}.

En el caso específico de la fasciolosis, la terapia tanto en humanos como en el sector ganadero, se ha basado en cinco grupos de fasciolicidas: salicilanilinas, fenoles halogenados, sulfonamidas, fenoxialcanos y benzimidazoles, sin embargo, aun cuando presentan alta efectividad contra fasciolas adultas no son activos contra las fasciolas jóvenes. Durante las últimas décadas, los benzimidazoles (BMZ), han sido de gran relevancia, ya que presentan un amplio espectro de actividad contra nematodos, trematodos y cestodos del parásito. Dentro de estos el albendazol es el fármaco recomendado sin embargo la actividad se limita también a fasciolas adultas. En la actualidad el fármaco más utilizado es el triclabendazol, no obstante, se ha reportado la aparición de cepas resistentes a este.

La necesidad de sintetizar nuevos compuestos que resulten prometedores para el tratamiento de esta enfermedad, llevaron al descubrimiento del compuesto α BIOF10, el cual ha demostrado alta eficacia *in vitro* e *in vivo*, no obstante, su baja solubilidad en medios acuosos limita su biodisponibilidad.

Por tal motivo se decidió preparar un complejo de inclusión con β ciclodextina, PVP y el compuesto α BIOF10 para con ello incrementar la solubilidad del fármaco.

Se ha reportado que la preparación de los complejos fármaco-ciclodextrinas por irradiación con microondas (MO), confiere mayor capacidad de inclusión, además de disminuir el tiempo de reacción y aumentar el rendimientos^{3,4}.

Por lo anterior, se llevó a cabo el presente estudio, con el fin de determinar si el uso de microondas mejora la biodisponibilidad del complejo de inclusión α BIOF10- β CD-PVP, en relación al preparado por el método tradicional de secado.

Capítulo 1

Generalidades

1.1 *Fasciola hepática*^{1,2,5,6}

La *fasciolosis* es una enfermedad parasitaria producida por trematodos del género *Fasciola*. La especie más común es la *Fasciola hepática* (*Trematoda Digenea*), la cual se localiza en los conductos biliares principalmente de mamíferos, herbívoros, y también del hombre. La distribución de esta especie es cosmopolita y ha sido reportada en todos los continentes. Los principales hábitats de este parásito son las regiones en las cuales se cría ganado ovino y bovino, y donde además existen las especies de moluscos dulceacuícolas que funcionan como sus hospederos intermediarios. La importancia de este parásito radica en el efecto que tiene sobre varias especies animales a los cuales infecta con relativa frecuencia, en particular sobre los rumiantes (bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, etc.), en los que ocasiona cuantiosas pérdidas económicas en forma directa produciendo enfermedad o muerte e indirectas ocasionando baja de producción, disminución del crecimiento, baja fertilidad, entre otros.

Al hombre lo infecta de manera ocasional, produciendo daño principalmente al hígado y vías biliares, lo que se traduce en enfermedad que va desde leve hasta la muerte; esto último depende del número de parásitos que infectan a un individuo.

1.1.1 Morfología

La *fasciola* adulta **Figura 1**, es un gusano plano, sin segmentos ni cavidad celómica, carnoso, que mide de 2 a 3.5 cm de longitud por 1 a 1.5 cm de ancho su cuerpo está cubierto de espinas y tiene apariencia de hoja. Presenta una porción anterior cefálica, en la que se encuentra una ventosa oral, la cual se comunica con el esófago muscular, parte anterior de los ciegos intestinales que tiene en su tubo digestivo. Después de la porción cefálica, el parásito se ensancha como si tuviera hombros y más o menos a ese nivel, en la parte media, se encuentra la ventosa ventral, que le sirve para fijarse a las paredes de los conductos biliares. Este parásito es hermafrodita.

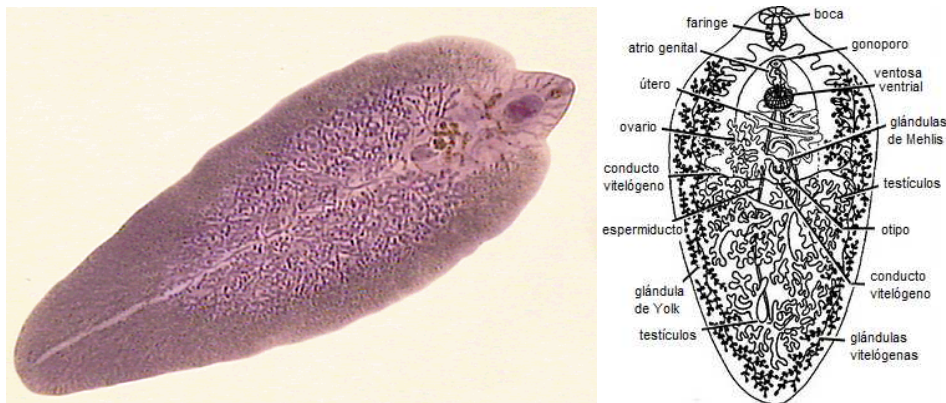


Figura 1. *Fasciola hepática* adulta.

1.1.2 Ciclo biológico y mecanismos de transmisión

El mecanismo de transmisión fundamental por medio del cual el hospedero adquiere la infección por *F. hepática*, **Figura 2**, es mediante la ingestión de plantas acuáticas que crecen semisumergidas y que contienen metacercarias del parásito.

Al llegar al intestino delgado éstas hacen eclosión y dejan en libertad al parásito juvenil, el cual atraviesa la pared intestinal y se dirige al hígado, atraviesa la cápsula de Glisson, penetra en el parénquima hepático hasta llegar a los conductos biliares y en la luz de éstos se establecen para desarrollarse hasta adultos. Cuando maduran sexualmente, empiezan a poner huevos, los cuales salen con la bilis y se mezclan con las materias fecales para ser expulsados al exterior. Si caen en el agua dulce de corriente lenta, en unos 15 días se desarrolla el miracidio que sale libre, infecta caracoles pulmonados y se transforma consecutivamente en esporoquiste, redia madre, redia hija y cercarias (unas 600 por cada miracidio que penetra al caracol), las cuales abandonan el caracol y se enquistan formando las metacercarias sobre plantas acuáticas o en el fondo del agua. Al ser ingeridas las metacercarias por el ganado vacuno, ovino, porcino o incluso por el hombre, se completa el ciclo biológico.

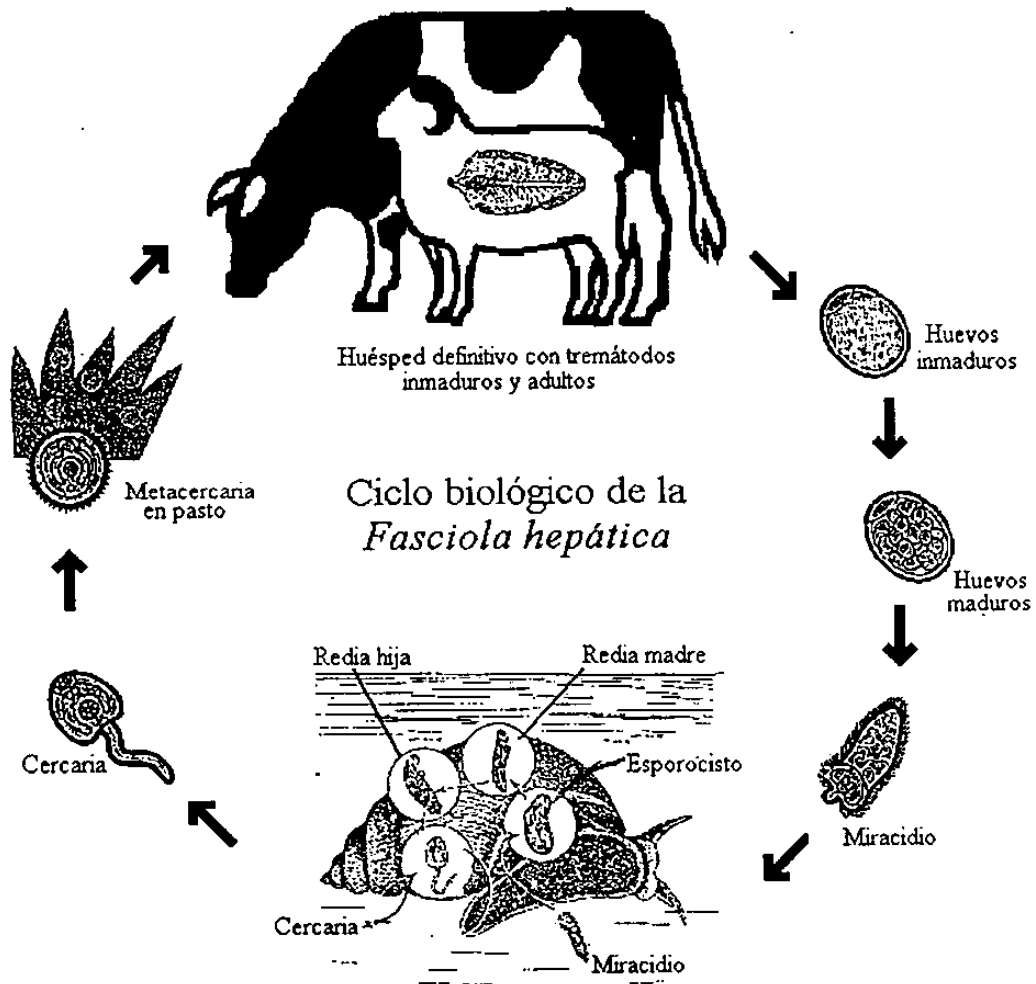


Figura 2. Ciclo biológico de la *Fasciola hepática*.

1.1.3 Epidemiología

Los factores que intervienen para que se presente esta enfermedad se dividen en: biológicos, topográficos, climáticos y humanos (manejo).

Dentro de los biológicos (favorecen la enfermedad), se encuentran: la alta postura de huevos, la resistencia de las metacercarias en el ambiente, la permanencia muy larga en el huésped, el alto poder reproductivo de los caracoles y, la dispersión activa y pasiva de los mismos.

Los factores climáticos que favorecen la presencia de fasciolosis son: temperaturas mayores a 10°C y estaciones húmedas. Los desfavorables son: temperaturas por debajo de 10°C ya que no evoluciona el caracol y estaciones secas. Por lo tanto en invierno se disminuye la contaminación de los pastos.

Los factores topográficos: áreas húmedas permanentes con fuentes de agua renovables mientras que las desfavorables son: las áreas secas, aguas rápidas y aguas estancadas, períodos secos prolongados.

Dentro de los factores humanos que la favorecen se encuentran: la alta carga de animales susceptibles sobre áreas contaminadas, la falta de drenajes, la falta de alambrados, el mal uso de productos fasciolicidas.

1.1.4 Diagnóstico

El diagnóstico clínico es difícil ya que comparte signos con otras enfermedades como las parasitosis gastrointestinales, tuberculosis, salmonelosis inicial y otras. En general los síntomas aparecen en los casos crónicos. Estos son: falta de peso, debilidad general, edema submandibular y palidez de mucosas. En casos de muerte las lesiones y las fasciolas son muy evidentes y si mueren por hemoglobinuria es a veces difícil encontrar la fasciolas muy jóvenes. La información epidemiológica y el conocimiento de la existencia del caracol acercan más rápido al diagnóstico.

El diagnóstico de laboratorio más usado es la detección de huevos en materia fecal. Tanto la flotación, sedimentación o el de filtrado busca concentrar los huevos para poder visualizarlos.

La técnica de sedimentación es sencilla y aprovecha el alto peso específico del huevo que sedimenta rápido.

En el método de flotación usa soluciones de alta densidad como el sulfato de zinc o de magnesio pero requiere lectura rápida porque los huevos se afectan con facilidad.

El filtrado es con el uso de distintos filtros para aclarar la muestra y el último filtro es para retener los huevos con mallas de apertura menor a 50 micras. Las pruebas inmunológicas se usan en humanos y en trabajos experimentales y son entre otras la fijación de complemento y ahora el ELISA. En sangre pueden buscarse las enzimas liberadas por el daño de los hepatocitos, la glutamato-oxalacetato amino-transferasa (GOT). Más tarde aparece la gama-glutamyl transferasa (GGT), por los daños de los conductos, que luego si no hay nuevas infecciones pueden bajar las dos, pero no a niveles normales, sobre todo la GGT.

La eosinofilia elevada es un dato muy importante que debe considerarse en el diagnóstico de la fasciolosis. A veces, se pueden ver los parásitos adultos en cortes histológicos.

1.1.5 Tratamiento^{7,8,9}

Para el tratamiento de la fasciolosis se han utilizado una serie de fármacos que difieren en la eficacia, mecanismo de acción y viabilidad. Los fasciolicidas se clasifican en 5 grupos: salicilamidas, fenoles halogenados, sulfonamidas, fenoxialcanos y los benzimidazoles

Entre las salicilamidas y fenoles halogenados se encuentran la clioxanida, oxiclosanida, niclosamida, rafoxanida, closantel, hexaclorofeno y niclofolan. A excepción de la niclosamida, los demás fármacos solamente son activos contra fasciolas adultas, mientras que para el tratamiento de fasciolas inmaduras son menos activas. El Clorsulon, un fármaco que pertenece al grupo de las sulfonamidas también se utiliza para el control de fasciolas adultas.

Estos fármacos que no controlan los estadios inmaduros de modo suficiente ofrecen una protección más corta, no interrumpen el daño causado por la migración de las larvas inmaduras, y deben usarse más frecuentemente.

El triclabendazol, un derivado de benzimidazol, es el fasciolicida más eficaz contra los estadios inmaduros. Se sabe que su actividad antiparasitaria se debe al grupo metiltilio y al anillo cloro-bencénico en su estructura, por lo que los sustituyentes en las posiciones 5 y 6 pudiesen ser sustituidos por grupos funcionales que presenten un comportamiento electrónico similar.

A la fecha, existen reportados numerosos casos de resistencia de la *F. hepática* a varios fasciolicidas en humanos, particularmente al triclabendazol. El primer caso de resistencia fue reportado en Australia. Desde entonces, también se han reportado casos en Europa y América^{10,11,12}.

1.2 El derivado bencimidazólico α BIOF10^{13,14,15}

Considerando que recientemente no se han desarrollado nuevos fármacos para el tratamiento de la fasciolosis, el grupo de investigación del Dr. Rafael Castillo de la Facultad de Química de la UNAM sintetizó el compuesto denominado α BIOF10 un análogo del triclabendazol **Figura 3** el cual ha presentado un excelente potencial antiparasitario contra la *Fasciola hepática*.

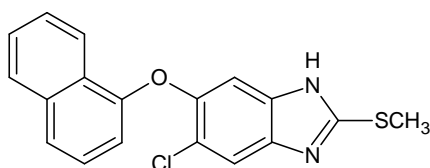


Figura 3. Estructura del compuesto 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol, (α BIOF10)

Se han realizado diferentes estudios para lograr la caracterización completa de las propiedades físicas y químicas del compuesto α BIOF10, las cuales se resumen a continuación:

- ✓ polvo blanco cristalino con ligero olor característico.
- ✓ Fórmula condensada: $C_{18}H_{13}ClN_2OS$
- ✓ Masa Molecular: 340.86 g/mol
- ✓ Punto de fusión pf: 171-179 °C
- ✓ pKa: 2.87, compuesto con características de ácido débil.
- ✓ Coeficiente de partición aparente octanol/agua: 27.63 (log P=1.44)

1.2.1 Estudios previos de farmacocinética del compuesto α BIOF10^{16,17,18,19}

Se han llevado a cabo diferentes estudios de farmacocinética del compuesto α BIOF10. En ellos se ha reportado que el α BIOF10 sufre un extenso metabolismo de primer paso obteniendo dos metabolitos el sulfóxido de alfa (α -SO) y la sulfona (α -SO₂). En la **Tabla 1** se presentan los resultados de los parámetros farmacocinéticos obtenidos para ambos metabolitos. En ella se pueden observar las diferencias entre especies. Así la vida media y el tiempo medio de residencia es más largo en bovinos que en ovinos. De igual forma la concentración plasmática máxima es mayor en bovinos.

Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos de los metabolitos α -SO y α -SO₂ del compuesto α BIOF10 obtenidos en estudios previos.

	Del Rivero, et. al.		Vertiz, et. al.		Ramírez, et, al.	
Modelo Animal, n	ovino, n= 7		Bovino, n=7		ovino, n=8	
Modelo de Ajuste	Abierto de dos Compartimentos		Abierto de un Compartimento		No Compartimental	
Analito	α -SO	α -SO ₂	α -SO	α -SO ₂	α -SO	α -SO ₂
K_e (h⁻¹)	0.0381	-	0.03	0.02	0.035	0.037
t_{1/2} (h)	18.95	-	25.82	34.79	20	19
t_{max} (h)	11.4	-	33.43	63.43	14	23
C_{max} (µg/mL)	8	-	5.1	10.19	5.6	2.3
ABC^{0-t} (µgh/mL)	234.95	-	238.63	735.44	228	96
ABC^{0-∞} (µgh/mL)	238.39	-	249.13	855.89	233	101
ABC% Extrap(%)	-	-	-	-	1.9	5
V/F (L/kg)	1.74	-	-	-	1.5	3.7
Cl/F (mL/h)	2325.6	-	-	-	2979	4
ABMC^{0-t} (h²µg/mL)	-	-	12184.94	55726.54	7637	3339
ABMC^{0-∞} (h²µg/mL)	-	-	14013.69	79950.31	8292	4074
MRT^{0-t} (h)	-	-	51.18	74.87	34	35
MRT^{0-∞} (h)	46.25	-	56.45	91.54	36	39

K _e	Constante de eliminación
t _{1/2}	Tiempo de Vida media del compuesto
t _{retardo}	Tiempo de retardo
t _{max}	Tiempo en el que se alcanza la máxima concentración de compuesto
C _{max}	Concentración plasmática máxima del compuesto
ABC ^{0-t}	Área bajo la Curva de 0 a t
ABC ^{0-∞}	Área bajo la Curva de 0 a infinito
ABC%	Diferencia porcentual entre ABC ^{0-t} y ABC ^{0-∞}
V/F	Volumen de distribución por kilogramo
Cl/F	Aclaramiento total
ABMC ^{0-t}	Área bajo la Curva al primer momento de 0 a t
ABMC ^{0-∞}	Área bajo la Curva al primer momento de 0 a infinito
MRT ^{0-t}	Tiempo medio de residencia de 0 a t
MRT ^{0-∞}	Tiempo medio de residencia de 0 a t

1.3 Solubilidad y Biodisponibilidad²⁰⁻²⁷

La mayoría de los compuestos farmacéuticos activos presentan baja solubilidad en agua. Se estima que el 40% o más -identificados a través de un programa de proyección combinatorio- presentan esta propiedad. La biodisponibilidad de los fármacos depende en gran medida de su solubilidad, pues el paso determinante en la velocidad de absorción es su disolución además de la permeabilidad.

12

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutico, divide los fármacos en 4 clases dependiendo de sus características de solubilidad y permeabilidad, **Figura 3** Los fármacos pertenecientes a la Clase II son aquellos que presentan alta permeabilidad en la membrana pero baja solubilidad en agua, por lo que el paso limitante de la absorción es entonces su solubilidad.

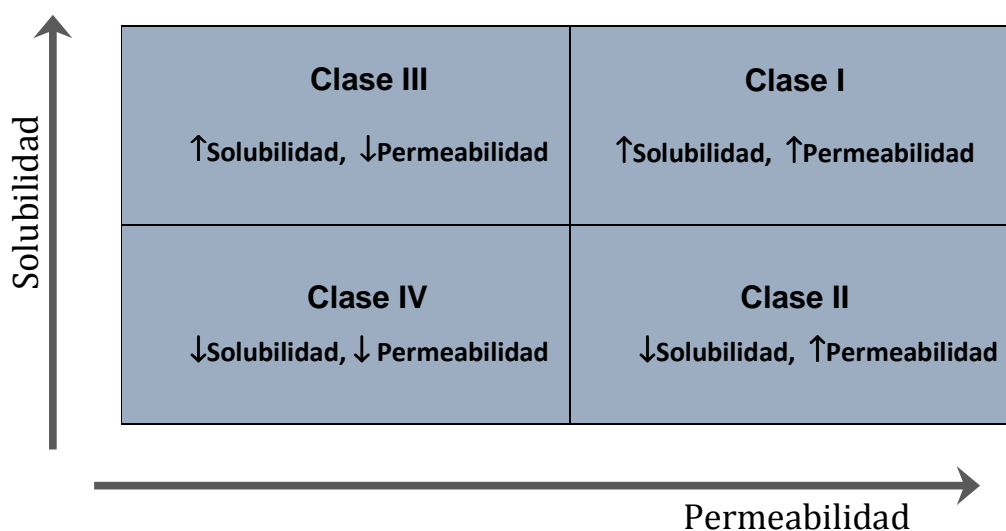


Figura 4. Sistema de Clasificación Biofarmacéutico con base en la solubilidad y permeabilidad de los fármacos.

El compuesto α BIOF10 se encuentra dentro de esta clase, pues presenta alta permeabilidad que le confiere la capacidad de atravesar membranas biológicas, sin embargo, su solubilidad en medio acuoso es baja.

Dado que este compuesto ha resultado ser un fármaco prometedor para el tratamiento de la fasciolosis, surge el interés de buscar estrategias que sean capaces de modificar su solubilidad acuosa.

En general, existen varias técnicas para modificar la solubilidad acuosa de un compuesto, entre ellas la formación de sales, el uso de co-solventes o tensoactivos, la preparación de profármacos y la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas (CD).

Un complejo de inclusión puede definirse como la asociación de un compuesto (ligando o sustrato) con una molécula de ciclodextrina. Los complejos de inclusión con derivados de ciclodextrina permiten mejorar la solubilidad y como consecuencia la biodisponibilidad debido a la formación de co-cristales a través de los puentes de hidrógeno entre los componentes. La nueva especie formada presenta una estequiometría definida, misma que depende de la capacidad de la CD para albergar a un cierto número de moléculas del ligando.

La formación del complejo depende de la compatibilidad del tamaño del ligando con relación a la cavidad de la CD. La estabilidad del complejo está dada por el carácter hidrofóbico de los sustituyentes del ligando; un grupo metilo o etilo incrementa su estabilidad y un grupo hidroxilo la disminuye. En algunos casos las CD no forman complejos de inclusión, sino agregados que también incrementan la solubilidad del compuesto al adsorberlos en la parte externa de su molécula.

1.3.1 Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos que contienen varias unidades de D-(+)-glucosa unidas por medio de enlaces glucosídicos α -(1-4). Entre las ciclodextrinas más comunes se encuentran la α -ciclodextrina (α -CD), β -ciclodextrina (β -CD), **Figura 4** y γ -ciclodextrina (γ -CD) formadas por seis, siete y ocho unidades de D-glucosa respectivamente; en el presente trabajo de tesis se hará uso específicamente de una formulación con β -CD.

14

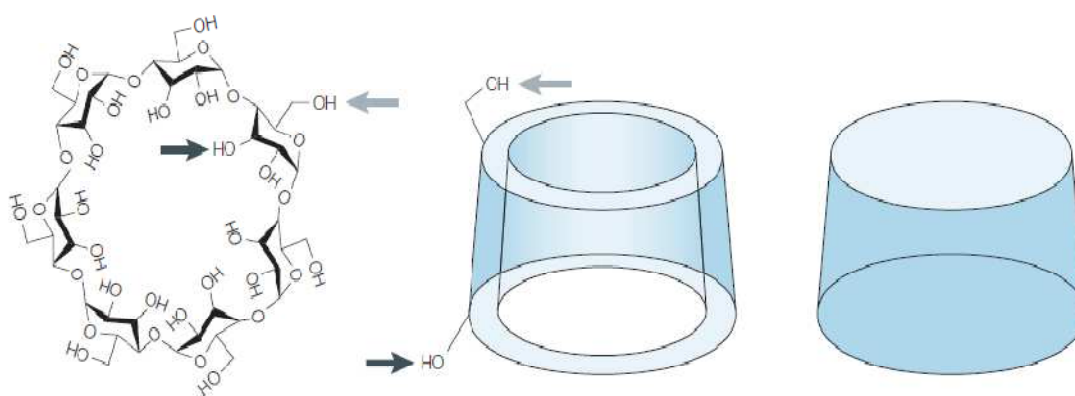


Figura 5. Estructura de la β -ciclodextrina (β -CD), con siete unidades de D-glucosa.

Debido a la falta de rotación de los enlaces glucosídicos que unen a las unidades de glucopiranosas, estos compuestos no presentan una forma cilíndrica perfecta sino una estructura de cono truncado con la superficie hidrofílica externa y una cavidad hidrofóbica interna, adecuada para albergar una molécula poco polar. El tamaño de las CD resulta muy importante ya que si ésta es muy pequeña, como la α -CD, algunas moléculas no podrían ser incluidas. El caso contrario es que al ser muy grande la cavidad, podría albergar a más de una molécula, haciendo difícil la estabilidad del complejo.

La solubilidad de las ciclodextrinas se debe a la presencia de grupos OH en los carbonos C2, C3 y C6 de las unidades de glucopiranosas que forman las CD; estos grupos OH forman enlaces de hidrógeno con el agua. Sin embargo, estos mismos grupos presentes en C2 son propensos a enlazarse con los grupos OH en C3 de la unidad de glucopiranosas adyacente, formando un cinturón de enlaces de hidrógeno intermolecular. Debido a que la β -CD está formada de siete unidades de glucopiranosas, es menos simétrica que la α -CD y la γ -CD por lo que la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares dan lugar a una estructura compacta y rígida que no presentan una buena interacción con los puentes de hidrógeno del agua, lo cual la hace menos soluble que las otras CDs. Para resolver este inconveniente y dado que por su costo esta última resulta mucho más económica, se han desarrollado derivados de este compuesto o bien se han implementado estrategias para el uso de la misma.

Adicionalmente se ha reportado que la formación de complejos de inclusión entre ciclodextrinas y moléculas de interés se ve mejorada cuando se hace uso de polímeros hidrosolubles como son la hidroxipropilmetilcelulosa, la polivinil pirrolidona (PVP), y el polietilenglicol (PEG), los cuales incrementan la solubilidad acuosa del complejo fármaco- β ciclodextrina así como la capacidad de formar el complejo, lo cual puede resultar una técnica útil para disminuir la cantidad de ciclodextrina en formas farmacéuticas sólidas.

Por ejemplo la aplicación de polietilenglicol (PEG-400) y β ciclodextrina mejora la solubilidad de la progesterona, lo mismo ocurre al utilizar conjuntamente la etil celulosa y la hidroxipropil- β ciclodextrina (HP- β CD) lo cual da lugar a un incremento en la solubilidad y velocidad de disolución de nifedipina y carbamazepina. El aumento en la solubilidad de fármacos hidrófobos se debe al efecto aditivo de la ciclodextrina y del polímero hidrosoluble, ya que ambos tienen la capacidad de promover la solubilidad de moléculas hidrófobas, además que los polímeros promueven que una mayor cantidad de fármaco sea incluida dentro de las ciclodextrinas, haciendo que una mayor cantidad sea disuelta

1.3.2 Técnicas de preparación de complejos de inclusión.

Entre los métodos ampliamente utilizados para preparar complejos de inclusión se encuentran la coprecipitación, amasado (kneading), liofilización (freeze-drying), co-trituración (co-grinding) y mezclado de polvos (MPs). Estos métodos frecuentemente involucran procesos que consumen tiempo y generalmente requieren grandes cantidades de disolventes, con lo cual surge una necesidad por optimizar estos procesos de preparación para que sean eficientes.

La irradiación por microondas (MO) es un método recientemente utilizado para preparar complejos de inclusión con CDs presentando ventajas como tiempos de reacción cortos y altos rendimientos en la obtención del producto de reacción. En la tecnología farmacéutica, la MO ha sido empleada por su efecto térmico en el proceso de secado.

Para la preparación de dispersiones sólidas libres de disolventes (DS), ésta técnica resulta novedosa y atractiva. En particular, esta tecnología ha sido utilizada para preparar complejos de inclusión de fármacos de baja solubilidad, empleando PVP/VA 60/40 (PVP/VA 64) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β CD) como acarreador hidrofóbico.

Capítulo 2

Justificación

En México la fasciolosis hepática es la parasitosis más común de la vía biliar. La infestación masiva es común en el ganado vacuno o bovino y en el hombre se presenta rara vez, sin embargo ya se tienen registros de varios casos. Existen al menos cincuenta casos en humanos de fasciolosis en México desde 1935.

Para el tratamiento de esta enfermedad, los bencimidazoles son el grupo terapéutico de gran relevancia, sin embargo se han encontrado limitaciones debidas a su baja solubilidad en agua lo que impacta en su absorción dando lugar a gran variabilidad terapéutica.

Por lo anterior, es de suma importancia el proponer nuevas estrategias que permitan resolver los problemas o inconvenientes hasta ahora descritos tanto para las moléculas ya probadas, como para las que se encuentran en fase de estudio.

En el presente trabajo de tesis se consideró importante evaluar la biodisponibilidad de dos formulaciones conteniendo el compuesto α BIOF10 en forma de complejo α BIOF10- β CD-PVP las cuales fueron preparadas por la técnica de secado por irradiación de MO y secado convencional).

Capítulo 3

Hipótesis

Ho. La aplicación de la técnica de microondas (MO) optimizará la formación del complejo de inclusión entre α BIOF10, β ciclodextrina y PVP, favoreciendo su disolución acuosa y como consecuencia la biodisponibilidad.

Ha. La aplicación de la técnica de microondas no optimizará la formación del complejo de inclusión entre α BIOF10, β ciclodextrina y PVP, y su biodisponibilidad no se verá favorecida.

Capítulo 4

Objetivo General

19

Comparar la biodisponibilidad de dos formulaciones de α BIOF10- β ciclodextrina-PVP, preparadas por dos diferentes técnicas de secado (MO y Convencional).

Objetivos específicos

- a) Sintetizar el fármaco α BIOF10 para su formulación y administración.
- b) Optimizar y validar el método analítico reportado en la literatura para la cuantificación en plasma del compuesto α BIOF10 y sus metabolitos.
- c) Realizar el estudio farmacocinético de ambas formulaciones empleando el borrego como modelo animal.
- d) Comparar los resultados con los obtenidos en estudios previos en los que se administró una suspensión del compuesto α BIOF10 solo.

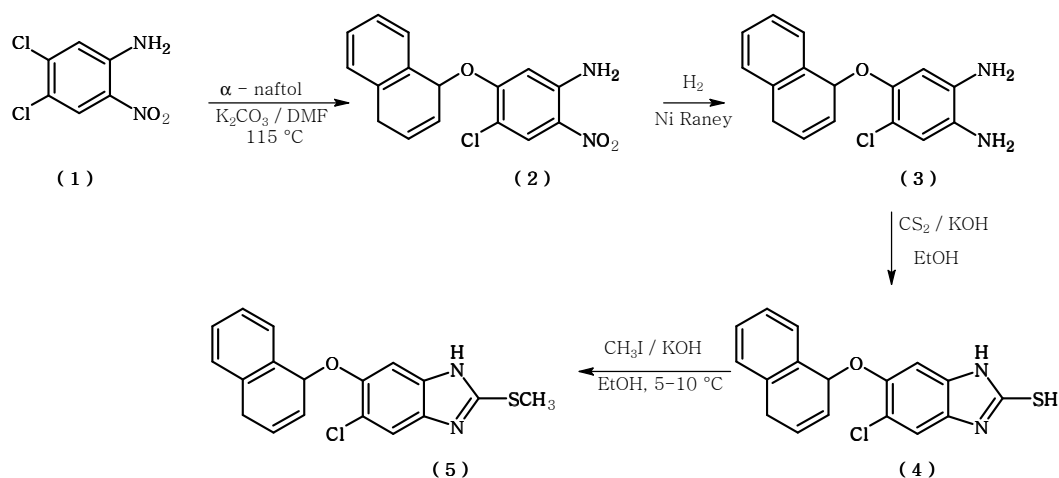
Capítulo 5

Desarrollo Experimental

La parte experimental del proyecto se divide en tres apartados: En el primero se describe la síntesis del compuesto α BIOF10 y la estrategia para escalarlo y obtener la cantidad deseada, el segundo apartado se refiere a la optimización y validación del método analítico para la cuantificación de éste y sus metabolitos en plasma. Finalmente el tercer apartado detalla el estudio farmacocinético para la evaluación de las formulaciones α BIOF10- β ciclodextrina-PVP en ovinos.

5.1 Síntesis del compuesto α BIOF10

Con el fin de contar con la cantidad suficiente del fármaco para desarrollar las nuevas formulaciones, se llevó a cabo la síntesis del compuesto α BIOF10 de acuerdo a lo descrito por Hernández-Campos y *col*¹³ de acuerdo a con la siguiente ruta de síntesis.



La reducción del grupo $-\text{NO}_2$ del compuesto 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (2) se llevó a cabo mediante hidrogenación catalítica con Ni_{Raney} con la finalidad de excluir posibles impurezas procedentes de la reducción con Sn en la ruta de síntesis original. El compuesto αBIOF10 se caracterizó mediante RMN-1H y Espectrometría de Masas.

5.2 Optimización y validación del método analítico para la cuantificación del compuesto αBIOF10 y sus metabolitos ($\alpha\text{-SO}$ y $\alpha\text{-SO}_2$) en plasma

5.2.1 Reactivos

- Compuesto αBIOF10 , sulfóxido de αBIOF10 ($\alpha\text{-SO}$), sulfona de αBIOF10 ($\alpha\text{-SO}_2$) y sulfóxido de albendazol (ABZ-SO) 100 % de pureza, sintetizados en el laboratorio 122 del Departamento de Bioquímica y Farmacia del Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.
- Metanol (MeOH) grado cromatográfico, J.T. Baker®
- Acetonitrilo (ACN) grado cromatográfico, J.T. Baker®
- Agua desionizada y destilada (H_2O).

5.2.2 Equipos

- *Equipo:* Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) SHIMADZU, equipado con las siguientes unidades.

Bomba LC-10AD VP

Automuestrador SIL-10 A

Detector SPD-10A VP (UV-VIS)

Controlador maestro del sistema SCL-10A VP

- Baño de ultrasonido modelo Fisher Scientific
- Baño de agua Lab-Line modelo Imperial IV, AQUABATH™
- Balanza analítica, Sartorius analytic, 0.1 mg
- Cartuchos de extracción en fase sólida, Sep Pak® Vac 3cc C₁₈ Waters
- Manifold para extracción en fase sólida.

5.2.3 Preparación de Disoluciones

5.2.3.1 Disolución patrón de los estándares de referencia de α BIOF10 y sus metabolitos α -SO y α -SO₂ (stock)

Se pesaron con exactitud 8 mg de cada uno de los estándares de referencia (α BIOF10, α -SO y α -SO₂) y se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL, se disolvieron con 15 mL de MeOH y se sometió a un baño de ultrasonido durante 10 min. Terminado este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente y se llevó al aforo con el mismo disolvente. La concentración final obtenida para cada uno de los estándares fue 320 μ g/mL.

5.2.3.2 Disolución patrón del Estándar Interno, ABZ-SO.

Se pesaron con exactitud 7.5 mg de sulfóxido de albendazol (ABZ-SO) y se trasvasaron cuantitativamente en un matraz volumétrico de 50 mL, se disolvieron con 30 mL de MeOH, posteriormente se sometió a un baño de ultrasonido durante 10 min. Terminado este tiempo se dejó enfriar y se llevó a la marca de aforo con el mismo disolvente. La concentración final obtenida para el ABZ-SO fue 150 µg/mL.

5.2.4 Curva de Calibración

A partir de la disolución estándar (320 µg/mL de α BIOF10 y sus metabolitos), se tomó una alícuota de 0.4 mL y se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL. Se llevó a volumen con plasma y se agitó mecánicamente en vortex hasta homogenizar. La concentración obtenida fue de 12.8 µg/mL para cada analito.

Las concentraciones utilizadas para preparar la curva de calibración fueron las siguientes: 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 y 12.8 µg/mL. Las cuales fueron preparadas mediante diluciones sucesivas, como se muestra en el Diagrama 1.

5.2.5 Preparación de las concentraciones empleadas como puntos control del compuesto α BIOF10 y sus metabolitos, α -SO y α -SO₂

Se tomó una alícuota de 300 mL de la disolución estándar (α BIOF10, α -SO y α -SO₂, 320 µg/mL) y se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL llevando a volumen con plasma. La concentración obtenida fue de 9.6 µg/mL (punto control alto). De esta última se tomaron 2.5 y 0.625 mL y se colocaron en sendos matraces volumétricos de 10 mL posteriormente se llevaron a la marca de aforo con plasma para obtener concentraciones de 2.4 µg/mL (punto control medio) y 0.6 µg/mL (punto control bajo) respectivamente.

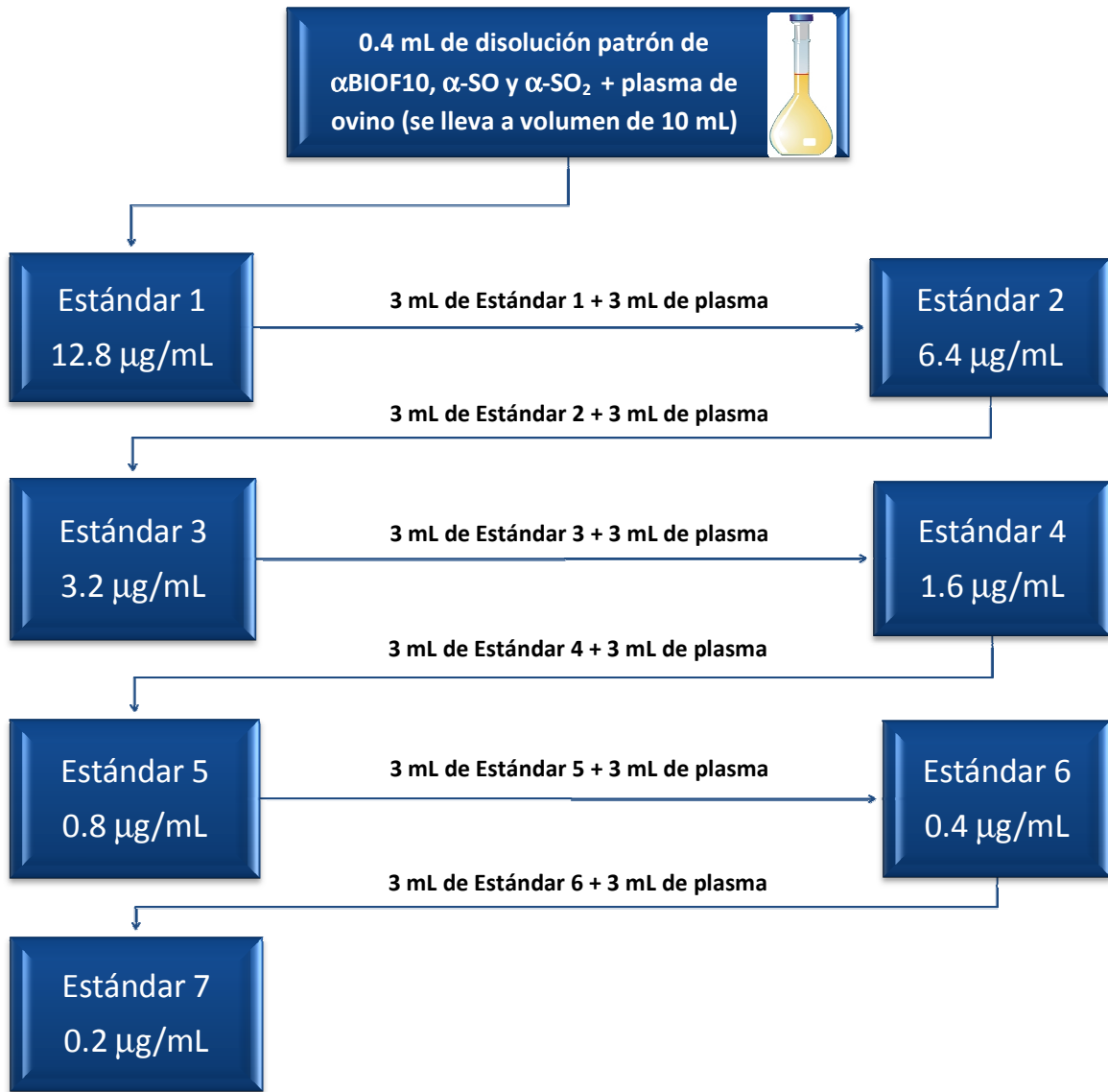


Diagrama 1. Preparación de la curva de calibración de α BIOF10 y sus metabolitos α -SO y α -SO₂ en plasma mediante diluciones sucesivas

5.2.6 Procedimiento de Extracción

El procedimiento de extracción fue mediante una extracción sólido-líquido como se describe a continuación:

En un tubo ependorf[®] se colocó 1 mL de la matriz biológica (plasma de ovino) y se adicionaron 100 μ L de la disolución patrón del estándar interno (ABZ-SO, 150 μ g/mL). Se agitó mecánicamente en un agitador tipo vortex durante 15 segundos, terminado este tiempo, se adicionaron 150 μ L de ACN para lograr la precipitación de proteínas agitando nuevamente durante 15 segundos más. Se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 min. Posteriormente se transfirió el contenido y se hizo pasar a través del cartucho de extracción Sep-Pak[®] C₁₈ previamente activado*, el cual después fue lavado con 10 mL de H₂O.

El compuesto α BIOF10 y sus metabolitos junto con el ABZ-SO se eluyeron del cartucho con 3 mL de MeOH, y posteriormente se llevaron a sequedad en un baño de agua a 40°C bajo una corriente de nitrógeno.

El residuo obtenido se reconstituyó en 250 μ L de MeOH, se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 min y se inyectaron 20 μ L al cromatógrafo de líquidos bajo las condiciones descritas en la sección 5.2.7.

En el **Diagrama 2** se muestra el procedimiento de extracción descrito anteriormente.

* La activación del cartucho se realizó adicionando 5 mL de MeOH y 4 mL de H₂O.

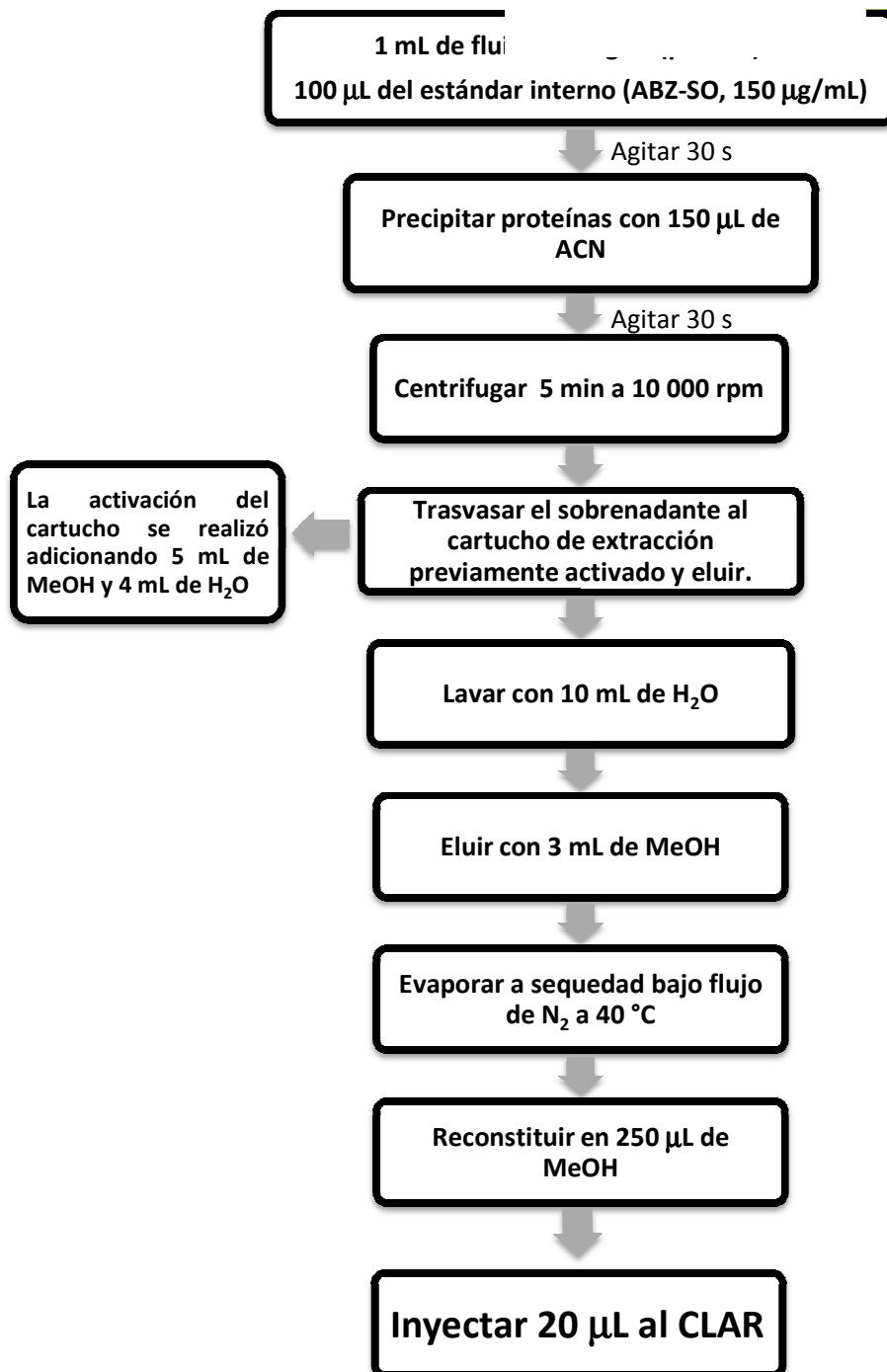


Diagrama 2. Procedimiento de extracción del compuesto α BIOF10 y sus metabolitos (α -SO y α -SO₂) en plasma.

5.2.7 Condiciones Cromatográficas

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

Fase Móvil: MeOH:ACN:Buffer de acetatos (10 mM, pH 5) proporción 40:35:25 (v/v)

Velocidad de Flujo: 1.0 mL/min

Longitud de onda: 304 nm

Tiempo de corrida: 10 min

Volumen de inyección: 20 μ L

Columna Spherisorb, 5 micras, 300 x 3.9 mm, Waters

Temperatura: ambiente

5.2.8 Validación del Método Analítico

Dado que el método analítico a seguir para la cuantificación del compuesto α BIOF10 y sus metabolitos fue una modificación al método reportado por Ramírez, N. *et al*¹⁶, el cual fue previamente validado, los parámetros de validación evaluados para garantizar la confiabilidad del método fueron los siguientes:

- ♣ Selectividad
- ♣ Linealidad
- ♣ Precisión
- ♣ Exactitud
- ♣ Límite de cuantificación

5.2.8.1 Selectividad

Se prepararon e inyectaron al sistema cromatográfico muestras con las siguientes características.

- a) Muestra blanco de *pool* de plasma (mezcla de plasma de 6 individuos) procesada de acuerdo al método.
- b) Muestra procesada con el estándar interno, ABZ-SO, (3.2 µg/mL).
- c) Muestra procesada con el estándar interno ABZ-SO y los tres analitos αBIOF10, α-SO y α-SO₂, (3.2 µg/mL).

Criterio de aceptación: Que no exista interferencia entre las señales del plasma y los analitos²⁸.

5.2.8.2 Linealidad del Método

Se prepararon el mismo día por separado, tres curvas de calibración del compuesto αBIOF10 y sus metabolitos (α-SO y α-SO₂) en el rango de concentraciones establecido, en la sección 5.2.3. A partir de los valores de respuesta (áreas) vs concentración se calculó el coeficiente de determinación (r^2), la pendiente (m), el intercepto (b) y el error relativo debido a la regresión (EER).

Criterio de aceptación: El modelo elegido es aquel cuya suma de cuadrados residuales sea el más pequeño con respecto a los otros modelos aplicados y que su coeficiente de determinación sea mayor o igual a 0.98. El porcentaje de diferencia con respecto al valor nominal no debe ser mayor al 15% en el rango de concentraciones evaluadas, a excepción de la concentración más baja donde puede ser de 20%²⁸.

5.2.8.3 Precisión del Método

La precisión intra-laboratorio (precisión intermedia) se evaluó en dos etapas: precisión intra-día (repetibilidad) y precisión inter-día (reproducibilidad).

5.2.8.3.1 Precisión intra-día (repetibilidad)

29

Se preparó y evaluó el mismo día por quintuplicado cada uno de los puntos control (bajo, medio y alto) conteniendo los diferentes analitos. La respuesta se extrapoló en una curva de calibración preparada el mismo día.

Se calculó la media (\bar{x}), la desviación estándar (σ) y el coeficiente de variación (%CV) para cada una de las concentraciones; así mismo se evaluaron estos parámetros para cada una de las concentraciones de las curvas de calibración, sección 5.2.7.1.

5.2.8.3.2 Precisión inter-día (reproducibilidad)

Se prepararon y analizaron por triplicado durante tres días consecutivos los puntos control (bajo, medio y alto). Para calcular el valor de concentración se analizó una curva de calibración cada día. Se calculó la media (\bar{x}), la desviación estándar (σ) y el coeficiente de variación (%CV) para cada una de las concentraciones en el periodo de validación.

Criterio de aceptación: Para ambos casos, el coeficiente de variación (%CV) no debe ser mayor al 15%²⁸.

5.2.8.4 Exactitud del Método

Para evaluar la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor nominal se calculó el porcentaje de diferencia con respecto al valor nominal (%DEA) utilizando los datos de repetibilidad y reproducibilidad. La fórmula a utilizar fue la siguiente:

$$\% \text{ Diferencia} = \frac{\text{Valor experimental} - \text{Valor nominal} * 100}{\text{Valor Nominal}}$$

Criterio de aceptación: El valor de la diferencia no debe ser mayor al 15%²⁸.

5.2.8.4.1 Recobro

Este parámetro se evaluó como la prueba de eficiencia de extracción, la cual se obtuvo calculando la relación existente entre la respuesta de los analitos en el extracto procedente del plasma frente a la respuesta de los mismos en MeOH. Estos valores se estimaron tanto para las curvas de calibración como para los puntos control, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Respuesta de la muestra procesada proveniente del plasma}}{\text{Respuesta en solución}} \times 100$$

Criterio de Aceptación: El % de recobro deber ser cercano al 100%, sin embargo son aceptables recobros de 50-60% siempre y cuando estos sean reproducibles en los diferentes niveles de concentración analizados²⁸.

5.2.8.5 Límite Inferior de la Curva de Calibración.

Se preparó y analizó por quintuplicado la concentración más baja de la curva de calibración (0.2 µg/mL de αBIOF10 y sus metabolitos) y se extrapola la respuesta en una curva de calibración preparada el mismo día.

Criterio de aceptación: La respuesta del analito debe ser por lo menos cinco veces mayor que la respuesta del blanco y debe cumplir con los criterios de precisión y exactitud, es decir, el coeficiente de variación (%CV) y el % de la diferencia (%DEA) no debe ser mayor al 20%²⁸.

5.3 Estudio Farmacocinético en ovinos

5.3.1 Material

- Tubos heparinizados de 6 mL, sistema Vacutainer
- Agujas estériles Vacutainer (21G)
- Centrifuga
- Congelador a -20°C
- Guantes
- Tubos de Vidrio de 10 mL

5.3.2 Formulación Administrada

Los complejos de inclusión αBIOF10-βCD-PVP fueron preparados y caracterizados por el M. en C. César Rivas en el Laboratorio de Biofarmacia (112 y 113) del Edificio de Bioquímica y Farmacia, del Conjunto E y en la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM, respectivamente.

Las dos suspensiones bajo estudio contenían 22% del complejo α BIOF10- β CD-PVP preparado por el método de secado convencional o α BIOF10- β CD-PVP preparado empleando irradiación por microondas (Apéndice A).

5.3.3 Diseño Experimental

El estudio *in vivo*, se realizó en el Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia, UNAM, ubicado en San Miguel Topilejo, km 28.5 carretera federal México-Cuernavaca. El centro facilitó el personal técnico, las instalaciones y el mantenimiento de 6 ovinos para el estudio con previa aprobación del protocolo de investigación.

Se seleccionaron 6 ovinos todas hembras cruce *East Friesian* con *Pelybuey* de entre 23.5 y 39 kg de peso y edades entre 9 y 13 meses, las cuales permanecieron en ayuno durante 17 horas previas al estudio. El estudio se llevó a cabo empleando un diseño cruzado en dos periodos, dos secuencias dos tratamientos. La dosis a administrar fue de 12 mg/kg en suspensión por vía oral. En el primer periodo se les administró la formulación α BIOF10- β CD-PVP preparada por el método convencional a la mitad de los ovinos (3 borregos) y a la otra mitad se le administró la formulación α BIOF10- β CD-PVP preparada por irradiación con microondas (MO). El periodo de lavado entre las dos etapas del estudio fue de 2 semanas. En la **Figura 6** se observan los periodos del diseño cruzado.

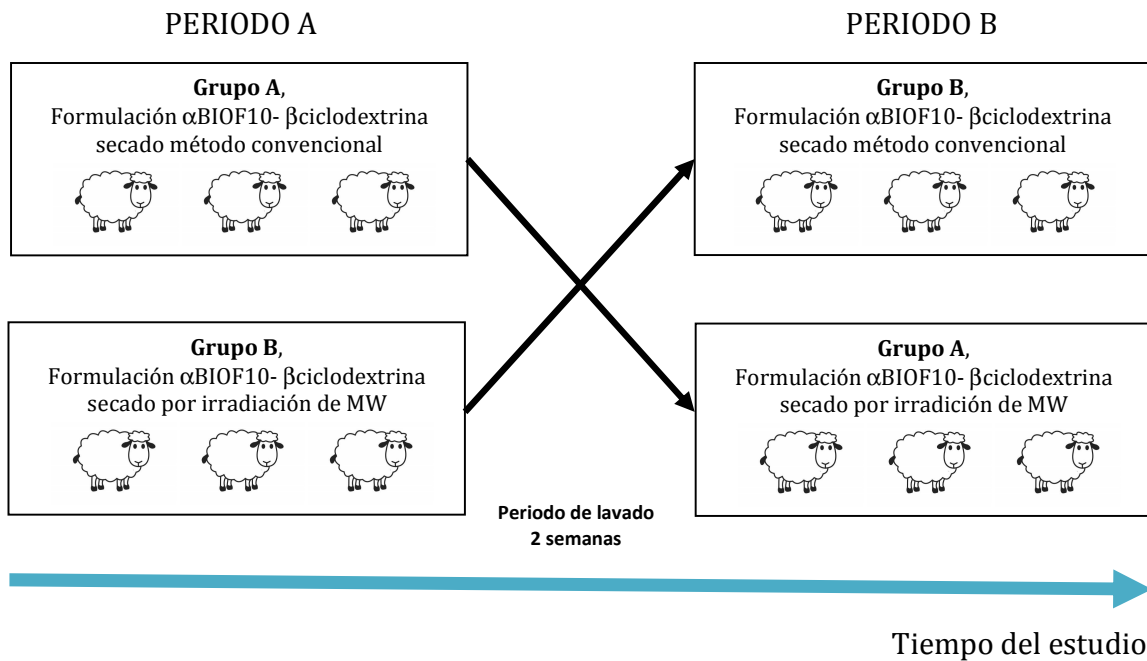


Figura 6. Diseño cruzado para la evaluación farmacocinética del compuesto αBIOF10 y sus metabolitos.

Se tomaron muestras sanguíneas a los siguientes tiempos: 0 (blanco), 1.5, 3, 4.5, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 36, 48, 72, 96 horas. Las muestras se tomaron por venupunción yugular utilizando agujas (21G) y tubos vacutainer heparinizados (6 mL). Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min, se separó el plasma y se almacenó en tubos de vidrio de 10 mL a -20°C sin conservadores hasta el momento de su análisis mediante el método analítico previamente validado, Sección 5.2.

5.3.3.1 Análisis farmacocinético

En el análisis farmacocinético se evaluaron los siguientes parámetros $ABC^{0-t,0-\infty}$, $t_{m\acute{a}x}$, $C_{m\acute{a}x}$, $t_{1/2}$, Vd , Cl , $MRT^{0-t,0-\infty}$, mediante el programa computacional Win Non Lin 4.0.1, aplicando un modelo no compartimental (MNC).

5.3.3.2 Análisis estadístico

Para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre ambas formulaciones se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y el cálculo de intervalo de confianza empleando para ello el paquete computacional Win Non Lin.

Capítulo 6

Resultados y Discusión

En el siguiente apartado se describen detalladamente los resultados experimentales de las tres etapas que constituyeron el proyecto.

6.1 Síntesis del compuesto α BIOF10

Con el fin de contar con la cantidad suficiente del fármaco para el estudio, se sintetizaron y caracterizaron **10 g** del compuesto α BIOF10 obteniendo un **sólido blanco** con un punto de fusión **P.F. 183-184 °C**, los resultados de RMN-1H y EM se presentan en (Apéndice B). El compuesto obtenido corresponde tanto en las espectroscopias como en sus propiedades fisicoquímicas con el reportado previamente por Hernández-Campos *y col* (2002)¹³.

6.2 Optimización y validación del método analítico para la cuantificación del compuesto α BIOF10 y sus metabolitos, el α -SO y la α -SO₂.

Dado que el compuesto α BIOF10 se metaboliza extensamente en el organismo formando dos metabolitos el α -SO y el α -SO₂, para cuantificarlos se empleó el método analítico reportado por Ramírez y col.¹⁶, con algunas modificaciones, las cuales se describen a continuación. Se utilizó una columna *Spherisorb*, 5 micras, 300 x 3.9 mm y se modificaron las proporciones de la fase móvil MeOH:ACN:Buffer acetatos (10 mM, pH 5) en proporción 40:35:25; con ello se logró disminuir el tiempo de corrida a 10 min sin perder resolución en las señales cromatográficas como se observa en la **Figura 7**. Aunado a lo anterior, se optimizó el método de extracción previa precipitación de proteínas lo cual permitió aumentar el recobro de un 50% a un 90%. Ello dio lugar a que el volumen de muestra plasmática a procesar fuera de la mitad que la utilizada por Ramírez, y colaboradores¹⁶.

Bajo estas condiciones, los tiempos de retención para cada especie fueron:

Sulfóxido de albendazol ABZ-SO: 2.73 min

Sulfona de alfa, α -SO₂: 5.33 min

Sulfóxido de alfa, α -SO: 6.44 min

Alfa, α BIOF10: 8.43 min

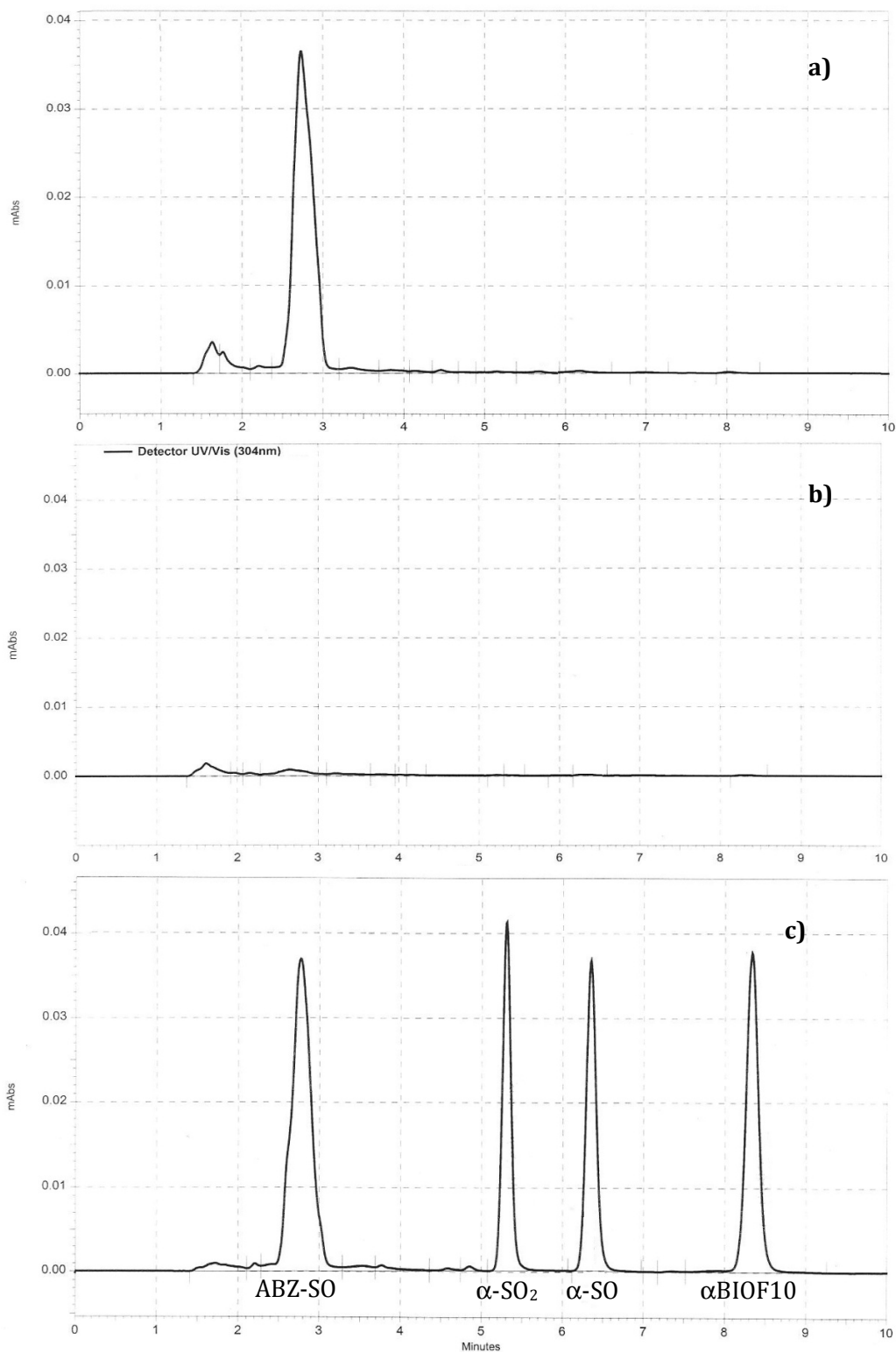


Figura 7. Cromatogramas del compuesto α BIOF y sus metabolitos. a) blanco de plasma, b) SI, ABZ-SO en plasma de ovino, c) α BIOF10, α -SO, α -SO₂ y ABZ-SO en plasma de ovino (20 μ L, 3.2 μ g/mL). Columna analítica (Spherisorb, Waters). Detección UV, 304 nm. Fase móvil MeOH:ACN:Buffer de acetatos (10 mM, pH 5), 40:35:25 (v/v).

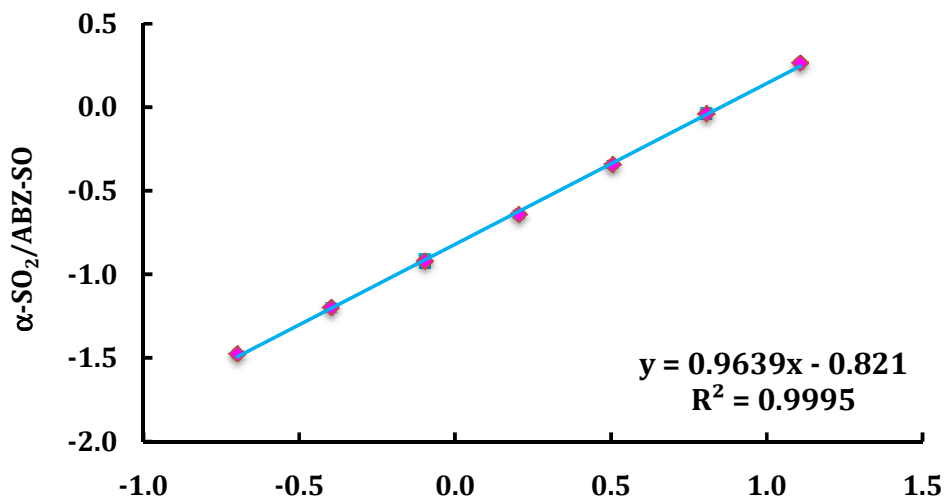
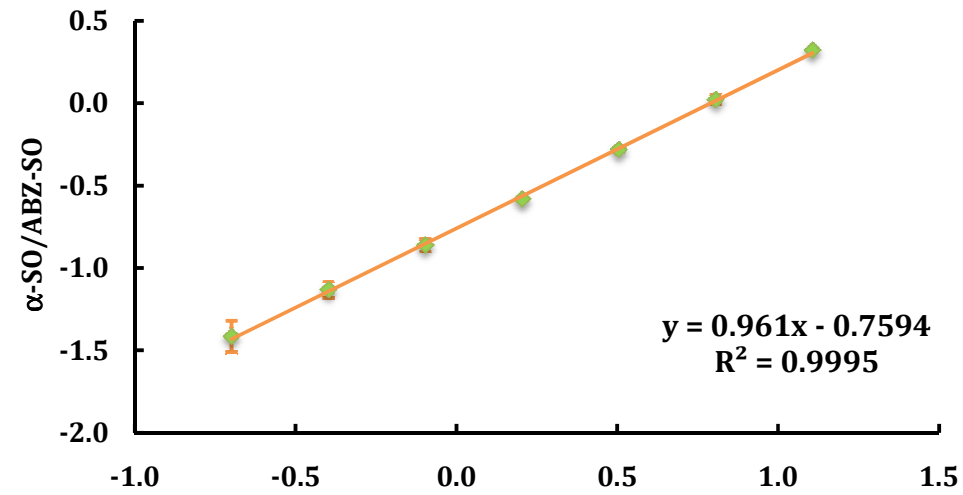
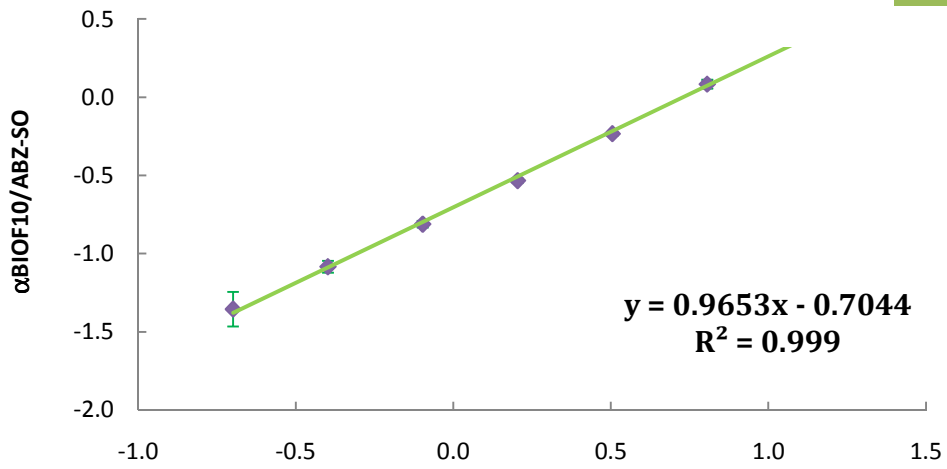
6.2.1 Selectividad

De acuerdo con la **Figura 7**, no se encontraron interferencias de los componentes del plasma en la región cromatográfica correspondiente al fármaco y sus metabolitos.

6.2.2 Linealidad del Método

De acuerdo con el principio de Parsimonia, para establecer la linealidad del método analítico se eligió aquel modelo que mejor ajuste y que sea el más sencillo, en el cual se obtenga la menor suma de cuadrados residuales. En el presente estudio, el mejor modelo de ajuste se encontró al relacionar el logaritmo de la relación de áreas ((α BIOF10, α -SO, α -SO₂)/ABZ-SO) versus el logaritmo de la concentración. La **Figura 8**, muestra los gráficos promedio de las tres curvas evaluadas para cada analito con sus respectivas barras de error a cada nivel de concentración y en la **Tabla 2** se presentan de manera detallada los valores de la pendiente (m), ordenada al origen (b), el coeficiente de correlación (r) y determinación (r²) así como el porcentaje de error relativo debido a la regresión lineal (%EER).

Log. Relación de Áreas



Log. Concentración

Figura 8. Linealidad del método analítico (0.2 – 12.8 $\mu\text{g/mL}$)

Tabla 2. Parámetros de la regresión lineal de las curvas de calibración para el compuesto α BIOF10 y sus metabolitos.

Analito	Replica	Pendiente m	Ordenada	Coefficiente de	Coefficiente de	% EER
			al origen b	correlación r	determinación r ²	
α BIOF10	1	0.9668	-0.7077	0.9998	0.9996	2.6574
	2	1.0078	-0.7426	0.9997	0.9994	3.2989
	3	0.9214	-0.6628	0.9972	0.9943	10.4434
	promedio	0.9653	-0.7044	0.9989	0.9978	
	DE	0.0432	0.0400	0.0015	0.0030	
	%CV	4.4803	5.6734	0.1499	0.2997	
α -SO	1	0.9589	-0.7592	0.9998	0.9996	2.3582
	2	1.0031	-0.8014	0.9998	0.9995	2.5701
	3	0.9211	-0.7176	0.9986	0.9973	6.5050
	promedio	0.9610	-0.7594	0.9994	0.9988	
	DE	0.0410	0.0419	0.0007	0.0013	
	%CV	4.2706	5.5193	0.0674	0.1347	
α -SO ₂	1	0.9601	-0.8177	0.9998	0.9996	2.1529
	2	0.9686	-0.8407	0.9994	0.9988	3.7760
	3	0.9630	-0.8047	0.9997	0.9994	2.8547
	promedio	0.9639	-0.8210	0.9996	0.9992	
	DE	0.0043	0.0182	0.0002	0.0004	
	%CV	0.4497	2.2188	0.0219	0.0438	

% EER. Error Relativo debido a la Regresión Lineal

Dado que los coeficientes de correlación obtenidos fueron mayores a 0.99 en cada una de las curvas y el coeficiente de variación del intercepto y la pendiente fueron menores al 10%, el método se consideró lineal en el intervalo de concentraciones entre 0.2 y 12.8 $\mu\text{g/mL}$.

6.2.3 Exactitud

La exactitud del método se demuestra en la **Tabla 3 y 4**, donde se presenta la diferencia obtenida a cada nivel de concentración de las curvas de calibración de cada especie y las obtenidas estableciendo puntos control (bajo 0.6 µg/mL, medio 2.4 µg/mL y alto 9.6 µg/mL) respectivamente. En ella se puede observar que los valores de Desviación Estándar Absoluta son menores al 15 %. Lo que demuestra la exactitud del método analítico para la cuantificación del compuesto α BIOF10 y sus metabolitos en el intervalo de concentraciones establecido.

Tabla 3. Exactitud del método analítico para las curvas de calibración de α BIOF10 y sus metabolitos.

Concentración Nominal (µg/mL)	α BIOF10		α -SO		α -SO ₂	
	Concentración Experimental n = 3, (µg/mL)	% DEA	Concentración Experimental n = 3, (µg/mL)	% DEA	Concentración Experimental n = 3, (µg/mL)	% DEA
0.2	0.2130	6.5101	0.2075	3.7395	0.2079	3.9621
0.4	0.4034	0.8466	0.4078	1.9529	0.4035	0.8838
0.8	0.7734	3.3287	0.7781	2.7402	0.7837	2.0424
1.6	1.5008	6.2000	1.5211	4.9310	1.5254	4.6639
3.2	3.0684	4.1132	3.1205	2.4841	3.1158	2.6302
6.4	6.5573	2.4580	6.4840	1.3124	6.4523	0.8174
12.8	13.4834	5.3394	13.3025	3.9257	13.3358	4.1857

% DEA. Desviación Estándar Absoluta

Tabla 4. Exactitud del método analítico para los puntos control de α BIOF10 y sus metabolitos.

Analito	Replica	Punto Bajo		Punto Medio		Punto Alto	
		0.6 ($\mu\text{g/mL}$)		2.4 ($\mu\text{g/mL}$)		9.6 ($\mu\text{g/mL}$)	
		Concentración Recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	%DEA	Concentración Recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	%DEA	Concentración Recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	%DEA
α BIOF10	1	0.6338	5.6291	2.5401	5.8368	10.0383	4.5653
	2	0.6347	5.7804	2.2935	4.4395	9.2940	3.1877
	3	0.6333	5.5581	2.3537	1.9272	9.3797	2.2953
	4	0.5343	10.9544	2.3859	0.5870	9.4065	2.0159
	5	0.5570	7.1632	2.4620	2.5850	9.5516	0.5039
	Promedio	0.5986	0.2300	2.4070	0.2936	9.5340	0.6875
α -SO	1	0.6324	5.3962	2.4753	3.1396	10.2668	6.9460
	2	0.6012	0.1953	2.2238	7.3432	9.4399	1.6677
	3	0.6194	3.2251	2.3332	2.7826	9.4981	1.0613
	4	0.5412	9.8060	2.3437	2.3447	9.6662	0.6900
	5	0.5687	5.2197	2.3700	1.2493	9.7296	1.3503
	Promedio	0.5925	1.2418	2.3492	2.1160	9.7201	1.2515
α -SO ₂	1	0.6318	5.2925	2.4448	1.8662	10.5222	9.6062
	2	0.6001	0.0237	2.1973	8.4454	9.6532	0.5537
	3	0.6186	3.0947	2.3125	3.6439	9.7168	1.2172
	4	0.5532	7.7955	2.3225	3.2276	9.8971	3.0948
	5	0.5824	2.9293	2.3772	0.9502	9.9265	3.4014
	Promedio	0.5972	0.4628	2.3309	2.8802	9.9432	3.5746

6.2.4 Precisión del método

Este parámetro determina el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el método fue aplicado repetidamente.

43

6.2.4.1 Precisión inter-día

La **Tabla 5** muestra los valores de concentración recuperada de los puntos control para cada uno de los analitos. Dado que el coeficiente de variación obtenido en todos los casos fue menor al 15% el método se consideró repetible.

Tabla 5. Precisión intra-día del método analítico para la cuantificación del compuesto α BIOF10 y sus metabolitos.

Replica	α BIOF10			α -SO			α -SO ₂		
	Punto bajo	Punto medio	Punto alto	Punto bajo	Punto medio	Punto alto	Punto bajo	Punto medio	Punto alto
	0.6 μ g/mL	2.4 μ g/mL	9.6 μ g/mL	0.6 μ g/mL	2.4 μ g/mL	9.6 μ g/mL	0.6 μ g/mL	2.4 μ g/mL	9.6 μ g/mL
1	0.6338	2.5401	10.0383	0.6324	2.4753	10.2668	0.6318	2.4448	10.5222
2	0.6347	2.2935	9.2940	0.6012	2.2238	9.4399	0.6001	2.1973	9.6532
3	0.6333	2.3537	9.3797	0.6194	2.3332	9.4981	0.6186	2.3125	9.7168
4	0.5343	2.3859	9.4065	0.5412	2.3437	9.6662	0.5532	2.3225	9.8971
5	0.5570	2.4620	9.5516	0.5687	2.3700	9.7296	0.5824	2.3772	9.9265
Promedio	0.5986	2.4070	9.5340	0.5925	2.3492	9.7201	0.5972	2.3309	9.9432
DE	0.0490	0.0961	0.2968	0.0374	0.0900	0.3277	0.0309	0.0913	0.3439
%CV	8.1895	3.9910	3.1128	6.3083	3.8291	3.3718	5.1685	3.9184	3.4584

6.2.4.2 Precisión inter-día

La **Tabla 6** muestra la precisión inter-día evaluada durante tres días consecutivos, donde se muestran los promedios de las determinaciones para cada día. Se puede observar que para todos los casos se cumple con el criterio de aceptación ya que el coeficiente de variación obtenido fue menor al 15% por lo que se confirma la reproducibilidad del método analítico para la cuantificación del compuesto α BIOF10 y sus metabolitos.

Tabla 6. Precisión inter-día del método analítico para la cuantificación del compuesto α BIOF10 y sus metabolitos.

Día	α BIOF10			α -SO			α -SO ₂		
	Punto bajo	Punto medio	Punto alto	Punto bajo	Punto medio	Punto alto	Punto bajo	Punto medio	Punto alto
	0.6 μ g/mL	2.4 μ g/mL	9.6 μ g/mL	0.6 μ g/mL	2.4 μ g/mL	9.6 μ g/mL	0.6 μ g/mL	2.4 μ g/mL	9.6 μ g/mL
1									
n=5	0.5986	2.4070	9.5340	0.5925	2.3492	9.7201	0.5972	2.3309	9.9432
2									
n=3	0.5863	2.4445	10.2204	0.5932	2.4253	9.8843	0.5731	2.4365	9.8319
3									
n=3	0.6432	2.3813	9.8880	0.6791	2.3381	9.1530	0.5843	2.4135	9.4832
Promedio	0.6094	2.4109	9.8808	0.6216	2.3709	9.5858	0.5849	2.3936	9.7528
DE	0.0299	0.0318	0.3432	0.0498	0.0474	0.3837	0.0121	0.0556	0.2400
%CV	4.9117	1.3191	3.4737	8.0059	2.0011	4.0029	2.0612	2.3213	2.4606

6.2.5 Recobro

En lo que se refiere a la cantidad recuperada se presenta en la **tabla 7 y 8**, el valor promedio del recobro absoluto a cada nivel de concentración de la curva así como el promedio de los recobros para los tres puntos control. Como se puede observar, los recobros para las tres especies oscilan entre el 90 y 98 %, lo cual sugiere que la técnica de extracción es adecuada para el tratamiento de la muestra.

Tabla 7. Valores promedio de los Recobros Absolutos a cada nivel de concentración de la curva n=3, para α BIOF10 y sus metabolitos.

Concentración nominal $\mu\text{g/mL}$	% Recobro Absoluto Promedio, n=3		
	α BIOF10	α -SO	α -SO ₂
0.2	88.8	95.0	91.5
0.4	88.9	98.0	94.6
0.8	84.9	92.4	91.0
1.6	95.7	104.3	102.9
3.2	92.0	100.2	98.8
6.4	92.2	97.3	96.1
12.8	92.4	97.4	96.9
PROMEDIO	90.7	97.8	96.0
DE	3.481	3.802	4.159
%CV	0.038	0.039	0.043

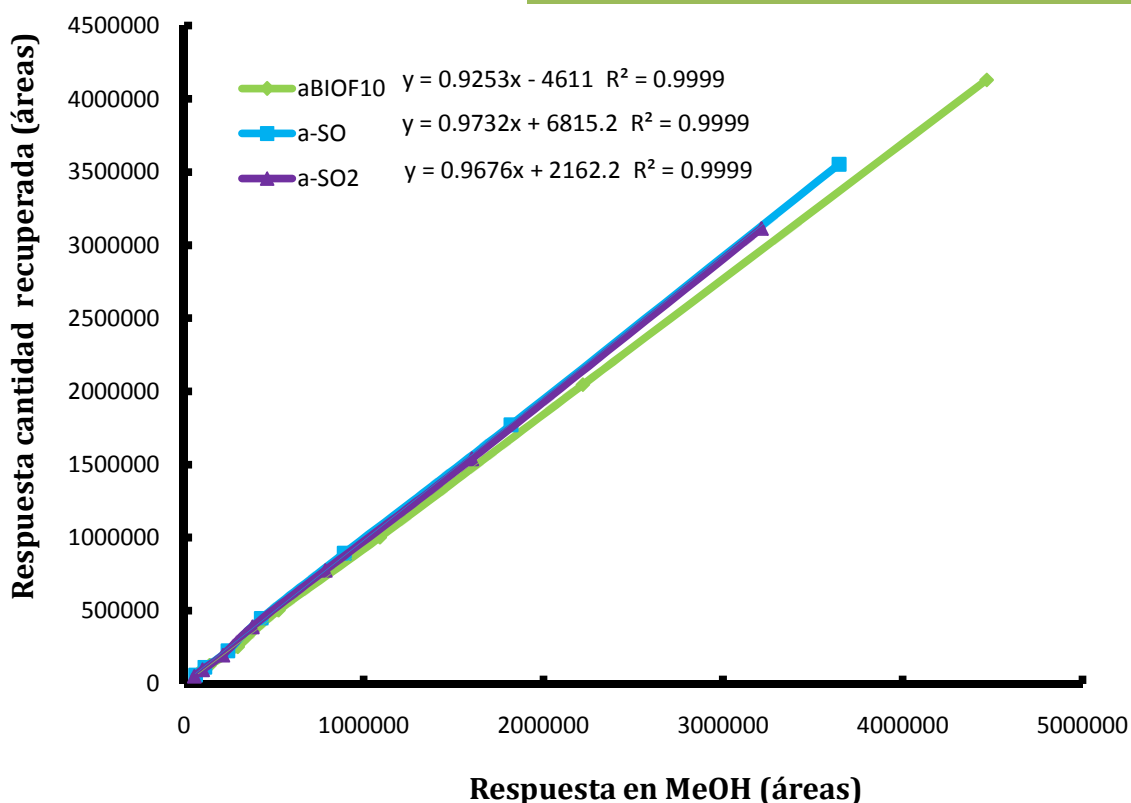


Figura 9. Gráfico de % recobro absoluto para el compuesto α BIOF10 y sus metabolitos α -SO y α -SO₂, n=3.

Si se grafica la cantidad adicionada (respuesta en MeOH) versus la cantidad recuperada y se obtiene una pendiente $m=1$ y un coeficiente de determinación $r^2=1$, se puede asegurar un 100% de recobro. Como se puede observar en la **Figura 9**, tanto las pendientes para cada analitos como los coeficientes de determinación obtenidos son cercanas a 1, es decir se obtuvieron recobros entre un 90 y un 100% para estas especies, esto coincide con los valores obtenidos en la **Tabla 7**, donde se obtuvieron recobros en este intervalo.

Tabla 8. Valores promedio de los recobros absolutos de los puntos control n=5, para α BIOF10 y sus metabolitos.

concentración nominal $\mu\text{g/mL}$	%Recobro Absoluto Promedio, n=5		
	α BIOF10	α -SO	α -SO ₂
0.6	86.0	87.7	86.6
2.4	89.1	90.8	90.4
9.6	100.9	106.8	101.5
PROMEDIO	92.0	95.1	92.8
DE	7.840	10.263	7.769
%CV	8.521	10.788	8.369

6.2.6 Límite Inferior de la Curva de Calibración

Una de las técnicas más utilizadas para determinar el límite de cuantificación es la que se basa en la señal ruido. Esta se aplica para los métodos que utilizan instrumentos de medición en los cuales se presenta una señal ruido basal. Para ello se determina el nivel mínimo de respuesta del analito que pueda cuantificarse confiablemente con base en la señal ruido.

En la **Tabla 9**, se muestra la relación de señal ruido (S/N), encontrada para cada uno de los analitos a la concentración de 0.2 $\mu\text{g/mL}$ (punto más bajo de la curva). En ella se puede observar que para las tres especies se cumple el criterio de aceptación $S/N \geq 5$.

Tabla 9. Relación Señal Ruido S/N para el compuesto α BIOF10 y sus metabolitos.

Replica	α BIOF10		α -SO		a-SO ₂	
	RESPUESTA ÁREA	RELACIÓN S/N	RESPUESTA ÁREA	RELACIÓN S/N	RESPUESTA ÁREA	RELACIÓN S/N
1	33031	7.0897	22434	7.5459	19551	12.9477
2	31401	6.7399	23037	7.7487	19009	12.5887
3	32506	6.9770	22291	7.4978	19027	12.6007
4	29955	6.4295	21346	7.1800	19227	12.7331
5	27526	5.9081	20863	7.0175	18773	12.4325
PROMEDIO	30883.80	6.63	21994.20	7.40	19117.40	12.66
DESV EST	2216.25	0.48	875.89	0.29	290.93	0.19
% CV	7.1761	7.1761	3.9824	3.9824	1.5218	1.5218

Así mismo, se evaluó el %CV y el %DEA **Tabla 10**, para esta concentración demostrando su precisión y exactitud, tomando en cuenta que para ambos casos el valor límite establecido es del 20%.

Tabla 10. Valores de concentración recuperada en el límite inferior de la curva de calibración del compuesto α BIOF10 y sus metabolitos.

Replica	α BIOF10		α -SO		α -SO ₂	
	Concentración Recuperada	%DEA	Concentración Recuperada	%DEA	Concentración Recuperada	%DEA
1	0.1790	10.4969	0.1693	15.3558	0.1902	4.8840
2	0.1760	12.0115	0.1800	9.9942	0.1914	4.2997
3	0.1911	4.4329	0.1821	8.9704	0.2001	0.0338
4	0.1812	9.4097	0.1798	10.1150	0.2083	4.1696
5	0.1729	13.5325	0.1829	8.5320	0.2117	5.8507
PROMEDIO	0.1800		0.1788		0.2003	
DESV EST	0.0069		0.0055		0.0097	
% CV	3.8524		3.0708		4.8343	

Con base en los resultados obtenidos y los parámetros evaluados se confirma que el método analítico para la cuantificación del compuesto α BIOF10 y sus dos metabolitos el α -SO y la α -SO₂ es confiable, preciso y exacto en el intervalo de concentraciones establecidas.

6.3 Estudio farmacocinético en ovinos y biodisponibilidad de dos formulaciones de α BIOF10- β ciclodextrina-PVP

6.3.1 Análisis farmacocinético del sulfóxido de alfa, α -SO

Como se ha reportado en estudios previos, el compuesto α BIOF10 no pudo ser detectado en plasma, lo cual sugiere que presenta un extenso metabolismo de primer paso.

En la **tabla 11** se presentan los valores de concentración plasmáticos promedio de α -SO obtenidos para ambas formulaciones después de la administración de una dosis única de 12 mg/kg de α BIOF10 vía oral. Cabe mencionar, que para fines prácticos de aquí en lo que sigue nos referiremos a la formulación del complejo de inclusión α BIOF10- β CD-PVP formulado por irradiación con MW como -Formulación Vía MO- y la formulación del complejo α BIOF10- β CD-PVP formulada convencionalmente como -Formulación Convencional-.

Tabla 11. Concentraciones plasmáticas promedio de α -SO Cp, para ambas formulaciones después de la administración de una dosis única de 12 mg/kg vía oral.

Concentración Plasmática promedio de α -SO ($\mu\text{g/mL}$), n=6						
Tiempo (h)	Formulación Vía MW			Formulación Convencional		
	Cp	DE	%CV	Cp	DE	%CV
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1.5	4.658	4.954	106.357	4.358	3.637	83.457
3	6.465	5.772	89.279	6.742	4.927	73.088
4.5	6.924	4.941	71.364	7.318	4.353	59.488
6	7.911	3.312	41.870	7.846	3.863	49.236
8	7.315	1.780	24.339	7.770	3.347	43.075
10	6.562	0.934	14.236	7.347	3.384	46.061
12	5.400	0.373	6.899	6.109	2.413	39.507
24	4.331	1.794	41.422	3.309	1.232	37.215
30	3.663	1.776	48.491	2.918	1.476	50.573
36	2.710	1.431	52.806	2.068	1.084	52.386
48	1.634	0.982	60.082	1.127	0.637	56.508
72	0.865	0.824	95.205	0.395	0.217	54.887
96	0.369	0.362	98.001	0.193	0.135	69.558

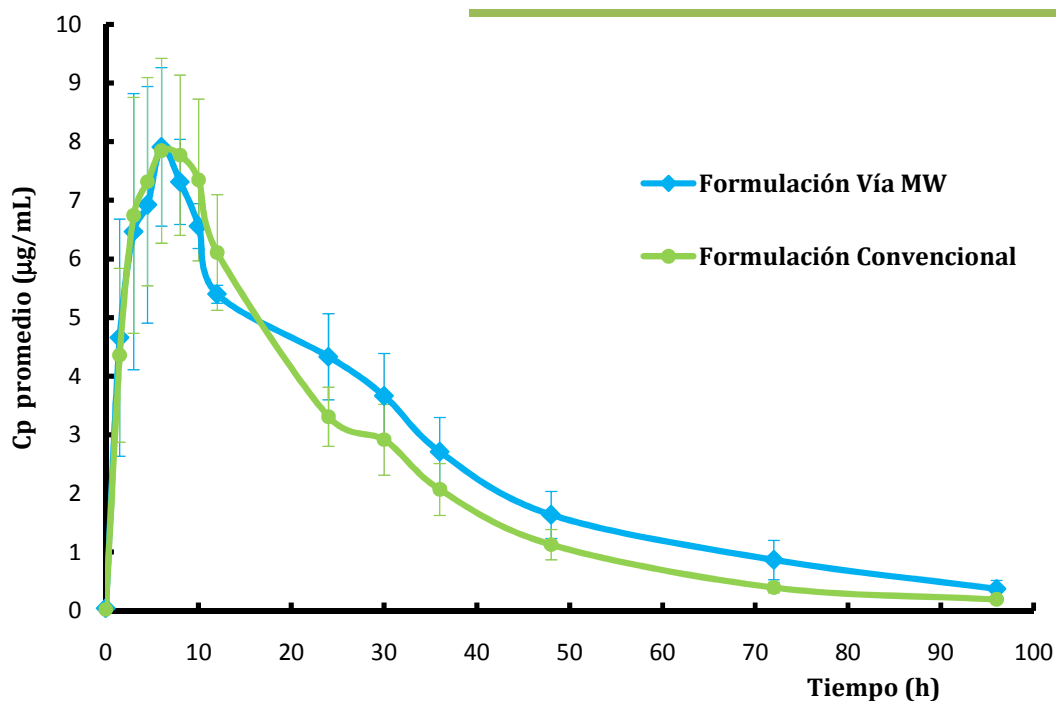


Figura 10. Perfiles de concentración plasmática promedio \pm error estándar ($C_p \pm ES$) para el metabolito α -SO obtenidos después de la administración de dos diferentes formulaciones, Formulación Vía MW y Convencional.

Como se puede observar en la **Tabla 11**, las concentraciones plasmáticas promedio junto con sus valores de error estándar (ES) indican que existe una gran variabilidad interindividual (entre individuos) en todos los tiempos de muestreo para ambas formulaciones.

Con base en los perfiles de concentración plasmática obtenidos se determinaron los parámetros farmacocinéticos del metabolito α -SO, para ambas formulaciones. Los valores obtenidos se encuentran en la **Tabla 12**, como se puede observar, aparentemente la C_{max} para los borregos 4, 5 y 6 es mayor cuando se administró la formulación vía MO, en dos de los casos para el borrego 1 y 3 la C_{max} es semejante y solo en un caso el Borrego 2 resulta ser mayor cuando se administró la formulación convencional.

Lo referente al valor del tiempo en el cual se alcanza la concentración plasmática máxima de α -SO, T_{max} , los valores promedio fueron de 8.9 horas para la formulación de microondas mientras que para la formulación convencional fue de 7 horas, sin embargo como se verá más adelante no hay diferencia significativa en este parámetro sugiriendo que el tiempo en el cual llega a la C_{max} no difiere en ambas formulaciones.

Tabla 12. Parámetros farmacocinéticos del metabolito α -SO.

borrego	C_{max}		T_{max}		$ABC^{0-\infty}$		$MRT^{0-\infty}$		$T_{1/2}$	
	formulación		formulación		formulación		formulación		Formulación	
	Vía MO	SC	Vía MO	SC	Vía MO	SC	Vía MO	SC	Vía MO	SC
1	13.07	13.19	4.50	3.00	0.64	0.60	15.90	13.24	15.53	13.49
2	6.73	9.04	8.00	10.00	0.53	0.62	30.09	31.40	16.70	18.69
3	15.62	15.14	3.00	6.00	0.59	0.89	14.16	21.00	18.16	23.27
4	8.73	7.23	8.00	4.50	0.77	0.40	26.51	18.71	15.39	13.63
5	6.03	5.05	24.00	12.00	0.88	0.48	54.43	30.98	32.05	17.02
6	8.57	5.23	6.00	6.00	0.86	0.54	35.87	30.05	20.39	17.78
X	9.792	9.149	8.917	6.917	0.710	0.588	29.493	24.229	19.703	17.312
DE	3.763	4.198	7.645	3.412	0.146	0.168	14.778	7.648	6.330	3.628
%CV	38.4	45.9	85.7	49.3	20.6	28.5	50.1	31.6	32.1	21.0

6.3.2 Análisis farmacocinético de la sulfona de alfa, α -SO₂

En la **tabla 13** se encuentran los valores promedio de las concentraciones plasmáticas de α -SO₂ después de la administración de las formulaciones bajo estudio. Como se puede observar también existe una gran variabilidad interindividual. Con respecto a sus parámetros farmacocinéticos, de la misma forma que para el α -SO, aparentemente no se observan diferencias.

Tabla 13. Concentraciones plasmáticas promedio de α -SO₂, para ambas formulaciones después de la administración de una dosis única de 12 mg/kg vía oral.

Concentración Plasmática promedio de α -SO ₂ (μ g/mL), n=6						
Tiempo (h)	Formulación Vía MW			Formulación Convencional		
	Cp	DE	%CV	Cp	DE	%CV
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1.5	0.363	0.381	104.917	0.370	0.201	54.266
3	0.911	0.884	97.045	0.859	0.696	80.981
4.5	1.280	1.095	85.540	1.312	0.915	69.738
6	1.549	1.135	73.287	1.417	0.701	49.455
8	1.653	1.047	63.339	1.525	0.702	46.061
10	1.649	0.723	43.810	1.715	0.771	44.942
12	1.575	0.560	35.554	1.774	0.817	46.040
24	1.403	0.525	37.459	1.254	0.452	36.086
30	1.236	0.710	57.421	0.995	0.488	49.022
36	1.016	0.672	66.178	0.793	0.447	56.340
48	0.602	0.380	63.185	0.359	0.195	54.221
72	0.470	0.391	83.204	0.129	0.071	54.999
96	0.145	0.138	94.617	0.065	0.044	67.248

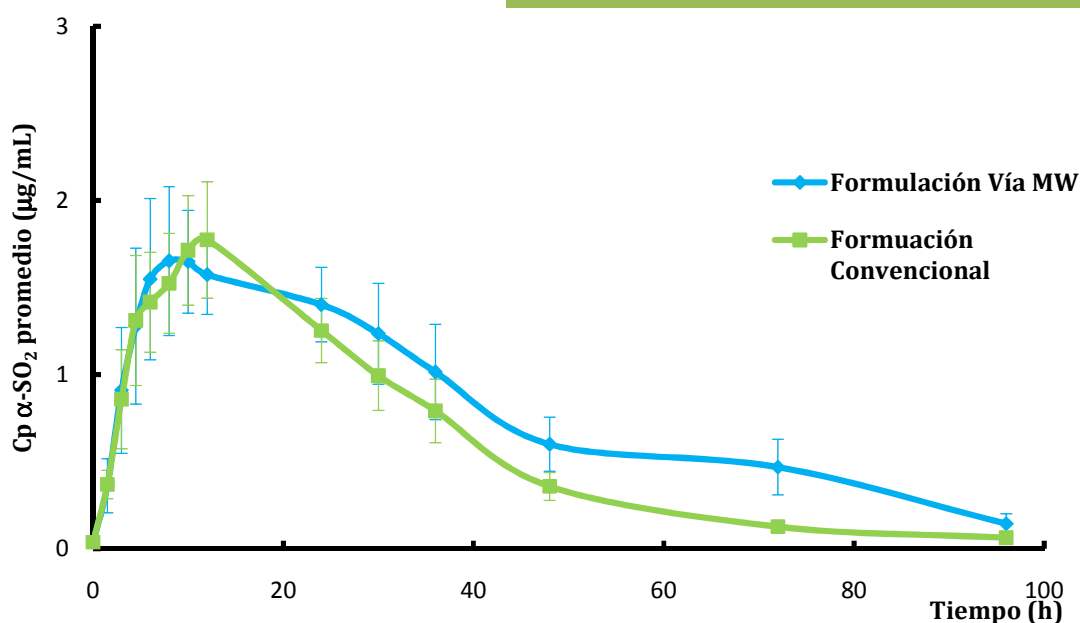


Figura 11. Perfiles de concentración plasmática promedio \pm error estándar ($C_p \pm ES$) para el metabolito α -SO₂ obtenidos después de la administración de dos diferentes formulaciones, Formulación Vía MW y Convencional.

Tabla 14. Parámetros farmacocinéticos del metabolito α -SO₂.

borrego	C _{max}		T _{max}		ABC ^{0-∞}		MRT ^{0-∞}		T _{1/2}	
	formulación		formulación		formulación		formulación		formulación	
	Vía MO	SC	Vía MO	SC	Vía MO	SC	Vía MO	SC	Vía MO	SC
1	3.43	3.23	6.00	12.00	0.21	0.24	16.84	17.76	14.61	10.83
2	1.67	1.89	12.00	24.00	0.15	0.17	33.21	34.88	12.54	17.25
3	3.09	2.20	8.00	10.00	0.27	0.19	40.03	26.50	24.61	16.97
4	1.35	1.08	24.00	6.00	0.15	0.08	31.18	22.89	15.49	18.61
5	1.92	1.07	30.00	24.00	0.28	0.11	59.97	36.31	31.43	24.65
6	2.39	2.04	30.00	12.00	0.30	0.22	39.18	29.86	17.57	15.15
X	2.310	1.920	18.333	14.667	0.227	0.170	36.735	28.036	19.374	17.245
DE	0.818	0.804	10.985	7.554	0.066	0.064	14.112	7.114	7.217	4.522
CV%	35.4	41.9	59.9	51.5	28.9	37.8	38.4	25.4	37.3	26.2

6.3.3 Análisis de la biodisponibilidad de las dos formulaciones α BIOF10- β ciclodextrina-PVP

Con la finalidad de comparar la biodisponibilidad de ambas formulaciones se llevó a cabo el análisis estadístico a un nivel de significancia del 90% evaluando los parámetros farmacocinéticos que se muestran en la **Tabla 14**. Basados en la NOM 177 y la FDA (US Food and Drug Administration), los intervalos de confianza deben estar dentro del intervalo de 80%-125% para los parámetros farmacocinéticos área bajo la curva AUC_{0-t} y concentración plasmática máxima, C_{max} .

Como se puede observar en la **Tabla 14**, para el metabolito α -SO, el intervalo de confianza del C_{max} entra en el límite inferior, sin embargo, el límite superior esta ligeramente por arriba de lo aceptado, con una potencia de 0.80, lo cual nos sugiere una diferencia significativa en este parámetro farmacocinético. Cuando la C_{max} se corrige con respecto a la dosis administrada C_{max}/D se observa que se amplía el intervalo sin embargo obtiene el mismo comportamiento que para la C_{max} y la potencia disminuye a 0.78. Con respecto al área bajo la curva $ABC^{0-\infty}$, el límite superior del intervalo no entra, lo cual sugiere que si existe diferencia significativa entre las formulaciones, sin embargo dado que el valor de la potencia es bajo es necesario aumentar el tamaño de muestra para poder obtener una conclusión válida. En el caso de la sulfona α -SO₂ se obtuvieron resultados semejantes.

Tabla 15. Intervalos de confianza de los parámetros farmacocinéticos de los metabolitos α -SO y α -SO₂.

α -SO			
parámetro	IC 90 %	Potencia 1- β	p-value
C_{max}	(94.40 - 128.77)	0.80	0.074
C_{max}/D	(93.91 - 129.29)	0.78	0.077
ABC^{0-∞}	(104.22 - 143.85)	0.77	0.396
T_{max}	(75.38 - 170.78)	0.21	0.249
T_{1/2}	(90.09-138.87)	0.53	0.152
MRT^{0-∞}	(92.71-142.49)	0.54	0.214
α -SO ₂			
parámetro	IC 90 %	Potencia	p-value
C_{max}	(100.63 - 150.32)	0.59	0.431
ABC^{0-∞}	(106.92 - 179.57)	0.39	0.772
T_{max}	(78.33-173.24)	0.22	0.305
T_{1/2}	(83.69 - 143.96)	0.37	0.148
MRT^{0-∞}	(105.50 - 148.45)	0.73	0.503

En la **Tabla 15** se muestran los valores promedio obtenidos en el presente trabajo así como los valores previamente reportados al administrar el compuesto alfa en suspensión. En ella se puede observar que la C_{max} aumentó al administrar los complejos de inclusión sin embargo ABC^{0-∞} y la T_{max} no se vio modificada al igual que el tiempo medio de residencia.

Tabla 16. Comparación de los parámetros farmacocinéticos del sulfóxido de alfa, obtenidos al administrar las formulaciones **A:** α BIOF10- β CD vía MW, **B:** α BIOF10- β CD vía secado convencional y **C:** α BIOF10 en suspensión.

Parámetros	Formulación	Formulación	Suspensión
	A	B	C
C_{max} (µg/mL)	9.79 (3.76)	9.14 (4.19)	5.64 (1.33)
C_{max}/D (µg/mL*g)	0.028 (0.013)	0.025(0.012)	0.0084 (0.001)
AUC (µg h/mL)	258.73 (66.14)	217.62 (78.8)	232.83 (50.9)
AUC/D (µg h/mL g)	0.71 (0.14)	0.588 (0.168)	0.352 (0.08)
t_{1/2} (h)	19.79 (6.33)	17.31 (3.62)	20 (1)
MRT (h)	29.49 (14.7)	24.229 (7.64)	34 (2)

Palomares y *col*³¹ realizaron un estudio evaluando un complejo de inclusión con albendazol, ABZ- β CD-PVP encontrando un incremento en su C_{max}, además de que el ABC para este complejo se vio incrementada al doble. En el presente trabajo solo se vio incrementada la C_{max} no así el ABC, lo cual indica que solamente se incrementó la velocidad de absorción del fármaco.

Los resultados obtenidos a la fecha no son contundentes, lo cual podría deberse a:

- 1) El tamaño de muestra no es suficiente para llegar a una conclusión definitiva.
- 2) Aun cuando el secado mediante MO mejora la disolución (Apéndice A) esto no impacta en la biodisponibilidad.

Se sugiere proseguir con el estudio de estas formulaciones, empleando un tamaño de muestra mayor que permita definir con certeza los parámetros farmacocinéticos y detallar si existe diferencia entre éstas formulaciones.

Este es el primer estudio en el que se evalúa la biodisponibilidad de una formulación preparada vía MO.

Capítulo 7

Conclusiones

59

- Se optimizó y validó el método analítico para la cuantificación del compuesto α BIOF10 y sus metabolitos sulfóxido y sulfona en plasma de ovino, α -SO y α -SO₂, demostrando ser lineal, específico, preciso y exacto en el intervalo de concentraciones de 0.2 a 12.8 μ g/mL.
- El uso de la irradiación por microondas MO, no mejoró significativamente la biodisponibilidad del complejo α BIOF10- β CD-PVP.
- Al comparar los resultados obtenidos con los reportados al administrar el compuesto α BIOF10 solo, se encontró que la biodisponibilidad incrementó significativamente, por lo que puede ser una alternativa para ser utilizado a futuro en el área veterinaria.

Capítulo 8

Referencias

1. Mas-Coma, S.; Bargues, M.D.; Valero, M.A. Fascioliasis and Other Plant-Borne Trematode Zoonoses. *International Journal of Parasitology* (2005), 35, 1255-1278.
2. http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/WHO_CD_S_NTD_PCT_2007.1.pdf
3. Nacsa, A.; Ambrus, R.; Berkesi, O.; Zsabó-Révész, P. and Aigner, Z. Water-soluble loratadine inclusion complex: Analytical control of the preparation by microwave irradiation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2008) 48, 1020-1023.
4. Moneghini, M.; Bellich, B.; Baxa, P.; Princivalle, F. Microwave generated solid dispersions containing Ibuprofen. *International Journal of Pharmaceutics*. (2008), 361, 125-130.
5. Pijoan, P.; Tortora, J. Principales Enfermedades de los Ovinos y Caprinos. (1986). Pijoan & Tortora. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
6. Tay Zavala Jorge, Lara Aguilera Ramón, Velasco Castejón Oscar, Gutiérrez Quiroz Manuel. *Medica Parasitología*. 6ta. edición, Méndez Editores S.A. de C.V. 1996, México.
7. Fairweather, I., & Boray, J.C. Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. *The Veterinary Journal*, (1999) 158, 81-112.

8. Sargison N.D, Scott P.R. Diagnosis and economic consequences of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica* in a sheep flock in south-east Scotland. *Veterinary Record* (2011), 168,159 – 165.
9. Mottier, L.; Alvarez, L.; Fairweather, I.; Lanusse, C. Resistance-induced changes in triclabendazole transport in *Fasciola hepatica*: ivermectin reversal effect. *Journal of Parasitology*. (2006), 92(6), 1355-1360.
10. Brennan, G.P.; Fairweather, I.; Trudgett, A.; Hoey, E.; McCoy; McConville, M.; Meaney, M.; Robinson, M.; McFerran, N.; Ryan, L.; Lanusse, C.; Mottier, L.; Alvarez, L.; Solana, H.; Virkel, G.; Brophy, P.M. Understanding triclabendazole resistance. *Experimental and Molecular Pathology*. (2007), 82, 104-109.
11. James, C.E.; Hundson, A.L.; Davey, M.W. Drug resistance mechanisms in helminthes: is it survival of the fittest? *Trends in Parasitology*. (2009) , 25, 7, 328-335.
12. Sangster, N.C. Anthelmintic resistance: past, present and future. *International Journal for Parasitology*. (1999), 29, 1, 115-124.
13. Hernández-Campos, A.; Ibarra-Velarde, F.; Vera-Montenegro, Y.; Rivera_Fernández, N.; Castillo, R. Synthesis and Fasciolicidal Activity of 5-chloro-2-(methylthio)-6-(1-naphthyloxy)-1H-benzimidazole. *Chemica & Pharmaceutical Bulletin* (2002), 50(5) 649-652.
14. Ibarra, V. F.; Vera, My.; Hernández, Ca.; Castillo, Br. Eficacia de un compuesto experimental contra *Fasciola hepática* juvenil y adulta en ganado ovino. *Veterinaria México* (1996), 27, 119-122.
15. Ibarra, F.; Montenegro N.; Flores, J.; Hernández, A.; Castillo, R. Evaluación de cuatro vehículos para formular un fasciolicida experimental. *Veterinaria México*, 31,1-7.
16. Ramírez, N.; Mayet, L.; Del Rivero, L.; Ibarra-Velarde, F.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Jung-Cook, H. Pharmacokinetic behavior in sheep and cattle of 5-chloro-2-(methylthio)-6-(1-naphthyloxy)-1H-benzimidazole, a new fasciolicide agent. *Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (2008) 32, 154–159.

17. Del Rivero, L.M.; Jung-Cook, H.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A. High-Performance Liquid Chromatographic Assay for a New Fasciolicide Agent, α BIOF10, in Biological Fluids. *Journal of Chromatography B* (1998), 712, 237-241.
18. Del Rivero, Lauro Misael, Farmacocinética del [alfa]BIOF10 en borregos. Tesis de Maestría (1998), UNAM.
19. Vértiz Serrano Guadalupe, Evaluación farmacocinética de [alfa]-BIOF10 en ganado vacuno, Tesis de Maestría (2000), UNAM.
20. Davis, M. E. and Brewster, M. E. Cyclodextrin-based Pharmaceuticals: Past, Present and Future. *Nature Reviews*. (2004) 3, 1023-1035.
21. Pandey, S.; Kumar, B.; Swamy, V.S.M.; Gupta, A. A Review on Pharmaceutical Application of Cyclodextrins. *International Journal Of Pharmacy & Technology* (2010), 2, 281-310.
22. Ioftsson, T.; Frioriksdottir, H. The effect of water soluble polymers on the aqueous solubility and complexing abilities of β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics* (1998), 163, 115-121.
23. Palomares Alonso Francisca, Evaluación farmacodinámica y farmacocinética de nuevas formulaciones y análogos de Albendazol con posible actividad cisticida, Tesis de Doctorado (2009), UNAM.
24. Castillo Montiel María Dolores, Estudio in vitro de formulaciones conteniendo albendazol - β - ciclodextrinas y promotores de la absorción, Tesis de Maestría (2009), UNAM.
25. Ammar HO, Salama HA, Ghorab M, Mahmoud AA.. Formulation and biological evaluation of glimepiride-cyclodextrin-polymer systems. *International Journal of Pharmaceutics* (2006) 309 (1-2):129-38.
26. Savolainen J., Jarvinen K., Taipale H., Jarho P., Loftsson T., Jarvinen T. Co-administration of a water-soluble polymer increases the usefulness of cyclodextrins in solid oral dosage forms. *Pharmaceutical Research* (1998) 15(11): 1696-1701.

27. Wen, X.; Tan, F.; Jing, Z.; Liu, Z. Preparation and Study the 1:2 Inclusion Complex of Carvedilol with β -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2004), 34, 517–523.
28. Secretaria de Salud Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
29. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. (2001).
30. Shargel, L.; Wu-Pong, S.; Yu A. 2005 Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, 5ta ed. McGrawHill, USA.
31. Palomares-Alonso, F.; Rivas-González, C., Bernad-Bernad, M.J.; Castillo Montiel, M.D.; Palencia-Hernández, G.; González-Hernández, I, Castro-Torres, N, Pinzón-Estrada, E.; Jung-Cook, H. Two novel ternary albendazole–cyclodextrin–polymer systems: Dissolution, bioavailability and efficacy against *Taenia crassiceps* cysts. *Acta Tropica* (2010), 113, 56–60.

Apéndices

Apéndice A. Formulación de la suspensión del complejo α BIOF10- β CD-PVP.

64

	Formulación Vía MO	Formulación SC
α BIOF10	1.65 g	1.65 g
β ciclodextrina	5.85 g	5.85 g
PVP	0.075 g	0.075 g
Excipiente c.b.p.	75 mL	75 mL

Las formulaciones tienen una concentración final del 22 % (m/v) del complejo α BIOF10- β CD-PVP y de un 2 % (m/v) del compuesto α BIOF10.

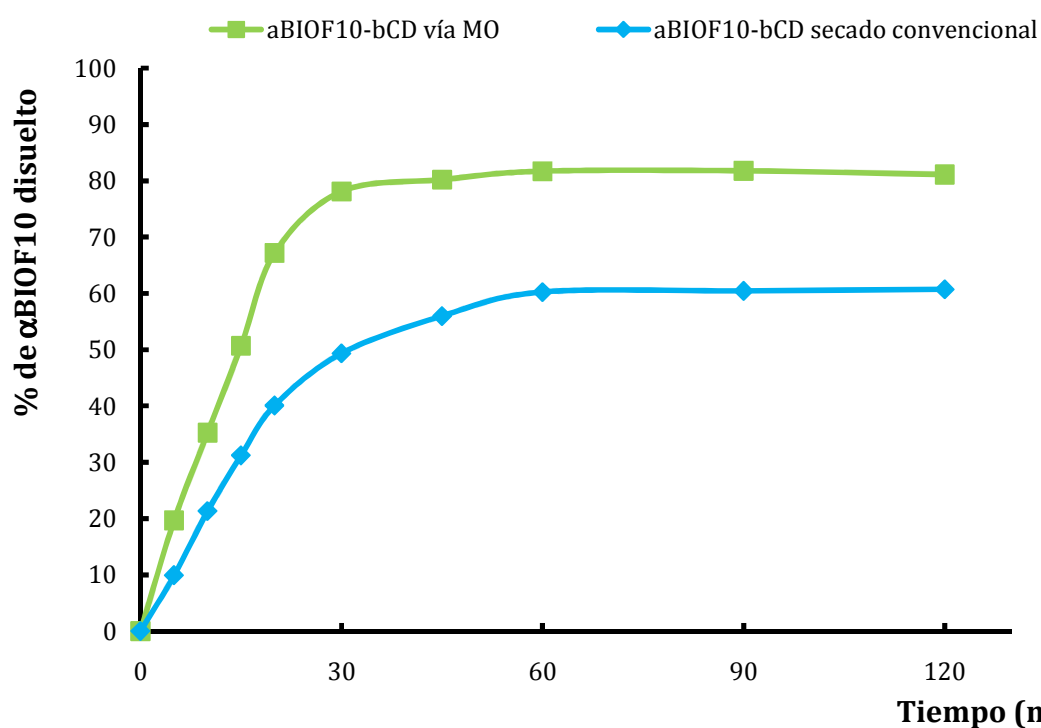
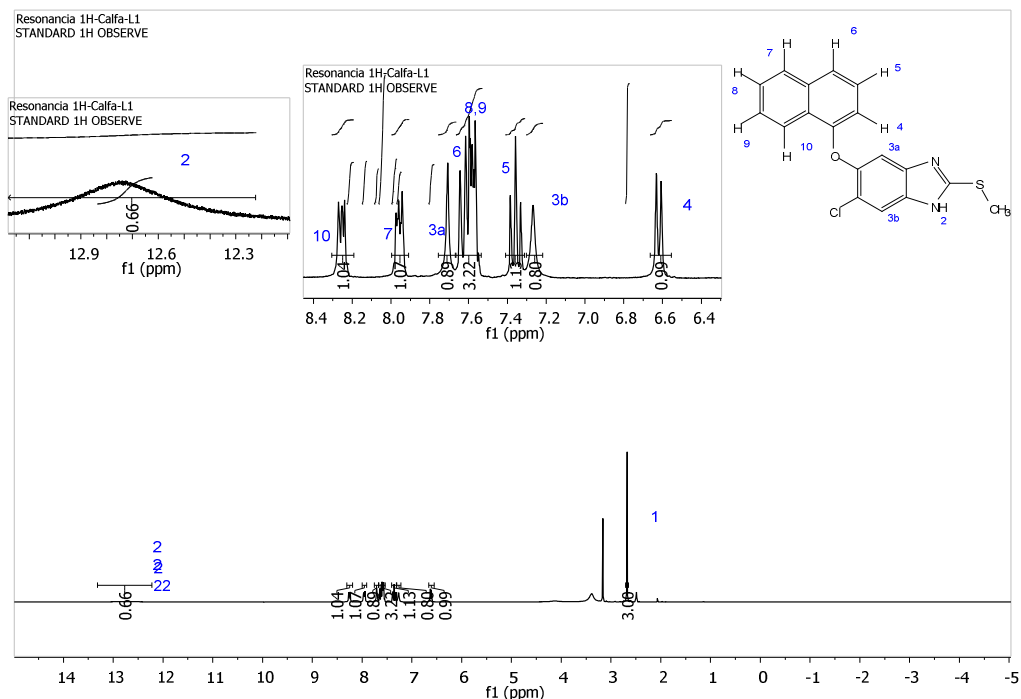


Figura A1. Perfiles de disolución del complejo de inclusión en HCl 0.1 N. Trabajo de tesis de doctorado del M. en C. Cesar Rivas, datos no publicados.

Apéndice B. Caracterización del compuesto α BIOF10.

65

Figura B1. Espectro de RMN- ^1H (DMSO- d_6). δ 3.00 (3H, s, S-CH $_3$), 7.28 (1H, s, 3a) y 7.72 (1H, s, 3b), 12.75 (1H, br, N-H), 6.62 (1H, d, H-4), 7.3-7.4 (1H, t, H-5), 7.62 (1H, d, H-6), 7.9-8.0 (1H, m, H-7), 7.53-7.62 (2H, m, H-8,H-9), 8.21-8.30 (1H, m, H-10).

D:\Xcalibur\data\USAND\OT5044_1

11/18/2010 6:07:49 PM

CALFA-L1

szComment

OT5044_1 #12-13 RT: 2.26-2.46 AV: 2 NL: 2.76E7

T: + c EI Full ms [49.50-800.50]

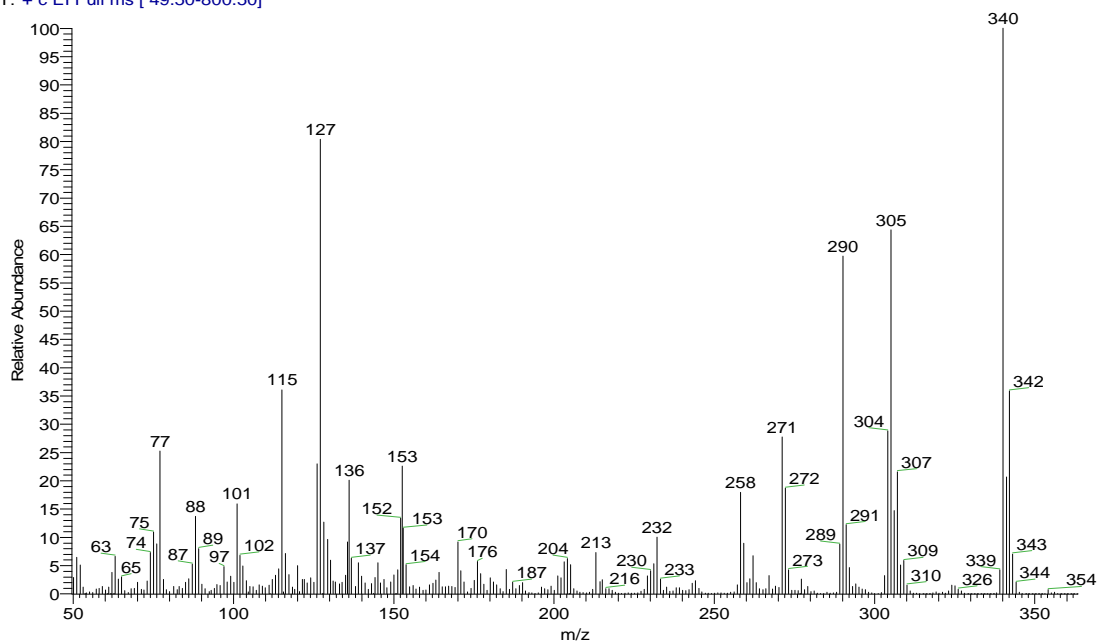


Figura B2. Espectro de Masas (IE) m/z 340 (M^+), 305, 290, isotopía de cloro en 342 m/z .

Apéndice C. Concentraciones plasmáticas individuales de α -SO después de la administración de 12 mg/kg de α BIOF10 vía oral (n=6).

Concentración Plasmática de α -SO ($\mu\text{g/mL}$), formulación vía MO									
Tiempo (h)	Ovino						media	DE	%CV
	1	2	3	4	5	6			
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1.5	8.974	1.009	13.418	3.959	0.249	0.340	4.658	4.954	106.357
3	12.938	2.963	15.620	5.337	0.664	1.269	6.465	5.772	89.279
4.5	13.065	5.328	13.930	5.849	0.939	2.433	6.924	4.941	71.364
6	10.924	6.127	11.856	8.197	1.789	8.574	7.911	3.312	41.870
8	7.826	6.732	9.404	8.727	3.843	7.358	7.315	1.780	24.339
10	5.952	6.519	7.140	8.260	5.346	6.156	6.562	0.934	14.236
12	4.715	5.657	5.708	5.789	5.180	5.348	5.400	0.373	6.899
24	1.930	4.943	1.757	5.431	6.033	5.892	4.331	1.794	41.422
30	1.403	4.066	1.185	4.401	4.955	5.965	3.663	1.776	48.491
36	0.922	3.262	0.716	2.904	4.518	3.935	2.710	1.431	52.806
48	0.485	1.795	0.417	1.638	3.251	2.218	1.634	0.982	60.082
72	0.144	0.602	0.168	0.548	2.533	1.196	0.865	0.824	95.205
96	0.086	0.276	0.067	0.194	1.119	0.471	0.369	0.362	98.001

Concentración Plasmática de α -SO ($\mu\text{g/mL}$), formulación SC									
Tiempo (h)	Ovino						media	DE	%CV
	1	2	3	4	5	6			
0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1.5	8.649	1.750	9.329	5.254	0.342	0.823	4.358	3.637	83.457
3	13.194	3.170	13.386	6.788	1.141	2.771	6.742	4.927	73.088
4.5	11.508	4.043	14.484	7.233	2.299	4.340	7.318	4.353	59.488
6	10.389	6.775	15.145	5.960	3.572	5.234	7.846	3.863	49.236
8	8.930	8.765	14.127	5.222	4.468	5.111	7.770	3.347	43.075
10	7.647	9.036	13.779	3.840	4.913	4.863	7.347	3.384	46.061
12	6.469	7.739	10.268	2.941	5.051	4.184	6.109	2.413	39.507
24	1.690	5.325	3.962	1.982	3.757	3.141	3.309	1.232	37.215
30	1.008	5.531	3.356	1.467	3.425	2.720	2.918	1.476	50.573
36	0.671	3.849	2.125	0.956	2.880	1.930	2.068	1.084	52.386
48	0.331	2.234	1.017	0.457	1.411	1.311	1.127	0.637	56.508
72	0.089	0.688	0.434	0.128	0.499	0.532	0.395	0.217	54.887
96	0.035	0.441	0.243	0.053	0.200	0.189	0.193	0.135	69.558

Apéndice C. Concentraciones plasmáticas individuales de α -SO₂ después de la administración de 12 mg/kg de α BIOF10 vía oral (n=6).

Concentración plasmática de α -SO ₂ (μ g/mL), formulación vía MO									
Tiempo (h)	Ovino						media	DE	%CV
	1	2	3	4	5	6			
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1.5	0.830	0.081	0.945	0.267	0.025	0.031	0.363	0.381	104.917
3	2.211	0.295	2.050	0.677	0.081	0.151	0.911	0.884	97.045
4.5	3.068	0.727	2.477	0.881	0.151	0.373	1.280	1.095	85.540
6	3.429	0.925	2.738	0.950	0.218	1.033	1.549	1.135	73.287
8	3.106	1.252	3.094	1.025	0.500	0.942	1.653	1.047	63.339
10	2.722	1.455	2.532	0.988	0.852	1.348	1.649	0.723	43.810
12	2.337	1.673	2.212	0.831	1.043	1.354	1.575	0.560	35.554
24	0.740	1.255	0.996	1.351	1.705	2.370	1.403	0.525	37.459
30	0.485	1.086	0.460	1.072	1.925	2.390	1.236	0.710	57.421
36	0.326	0.825	0.286	0.840	1.769	2.050	1.016	0.672	66.178
48	0.155	0.948	0.161	0.385	1.078	0.883	0.602	0.380	63.185
72	0.048	0.197	1.134	0.140	0.812	0.493	0.470	0.391	83.204
96	0.025	0.067	0.135	0.045	0.432	0.168	0.145	0.138	94.617

Concentración plasmática de α -SO ₂ (μ g/mL), formulación SC									
Tiempo (h)	Ovino						media	DE	%CV
	1	2	3	4	5	6			
0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1.5	0.745	0.134	0.495	0.345	0.260	0.240	0.370	0.201	54.266
3	2.228	0.417	1.205	0.726	0.132	0.447	0.859	0.696	80.981
4.5	3.014	0.701	1.963	1.025	0.281	0.886	1.312	0.915	69.738
6	2.628	0.894	2.006	1.082	0.557	1.333	1.417	0.701	49.455
8	2.808	1.049	1.926	1.045	0.696	1.623	1.525	0.702	46.061
10	3.054	1.429	2.204	0.878	0.863	1.859	1.715	0.771	44.942
12	3.231	1.636	2.027	0.706	1.008	2.037	1.774	0.817	46.040
24	1.284	1.889	1.362	0.408	1.074	1.506	1.254	0.452	36.086
30	0.737	1.842	1.092	0.300	0.725	1.273	0.995	0.488	49.022
36	0.525	1.651	0.809	0.228	0.586	0.957	0.793	0.447	56.340
48	0.221	0.681	0.322	0.102	0.289	0.541	0.359	0.195	54.221
72	0.042	0.228	0.130	0.042	0.129	0.201	0.129	0.071	54.999
96	0.012	0.141	0.086	0.017	0.075	0.060	0.065	0.044	67.248

Apéndice D. Perfiles de concentración plasmática-tiempo (Cp vs t) de α -SO y α -SO₂.

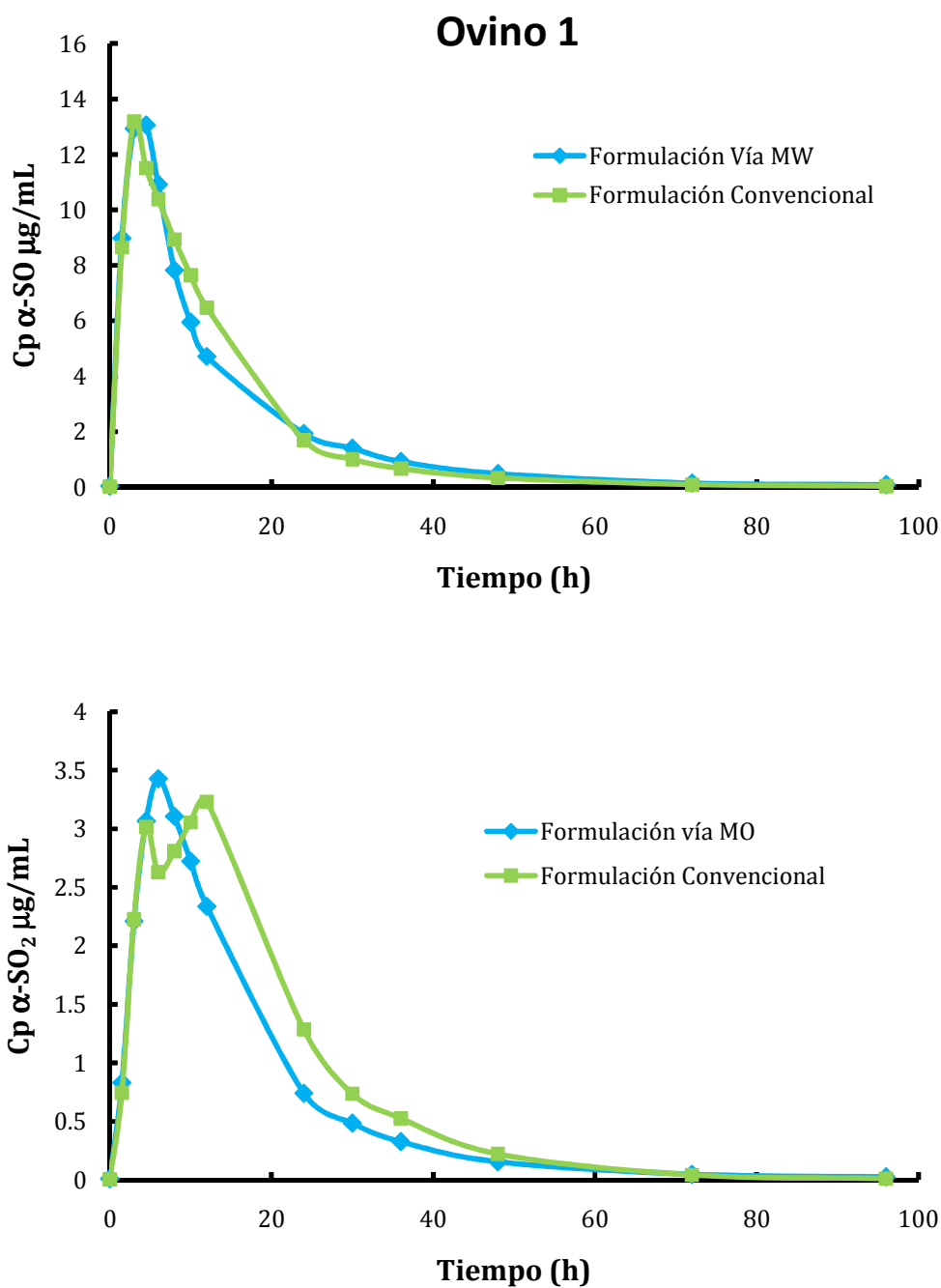


Figura D1. Perfiles de concentración plasmática-tiempo: arriba α -SO, abajo α -SO₂, después de la administración de una dosis de 12 mg/kg de α BIOF10 para el ovino 1.

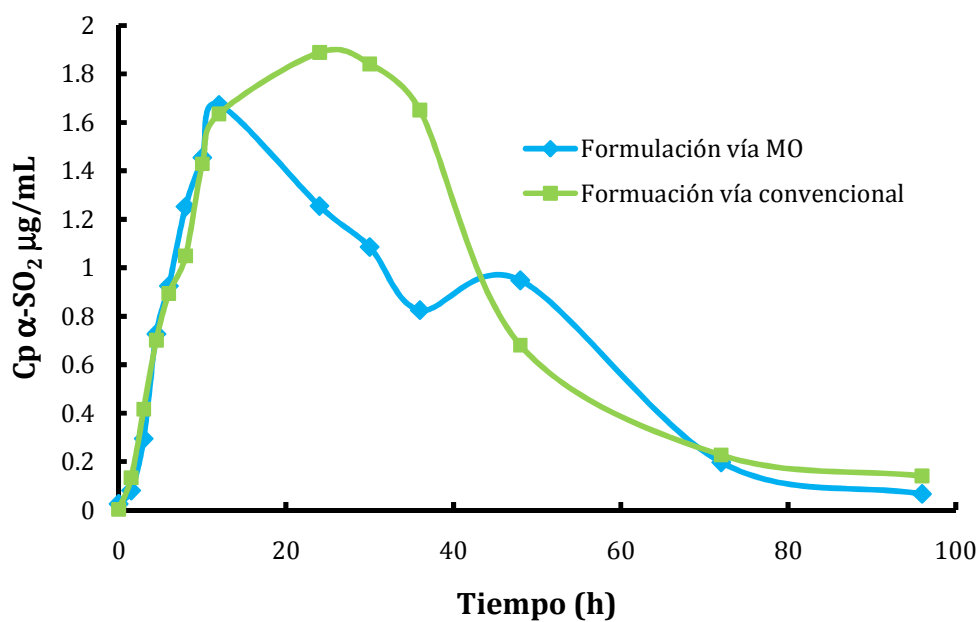
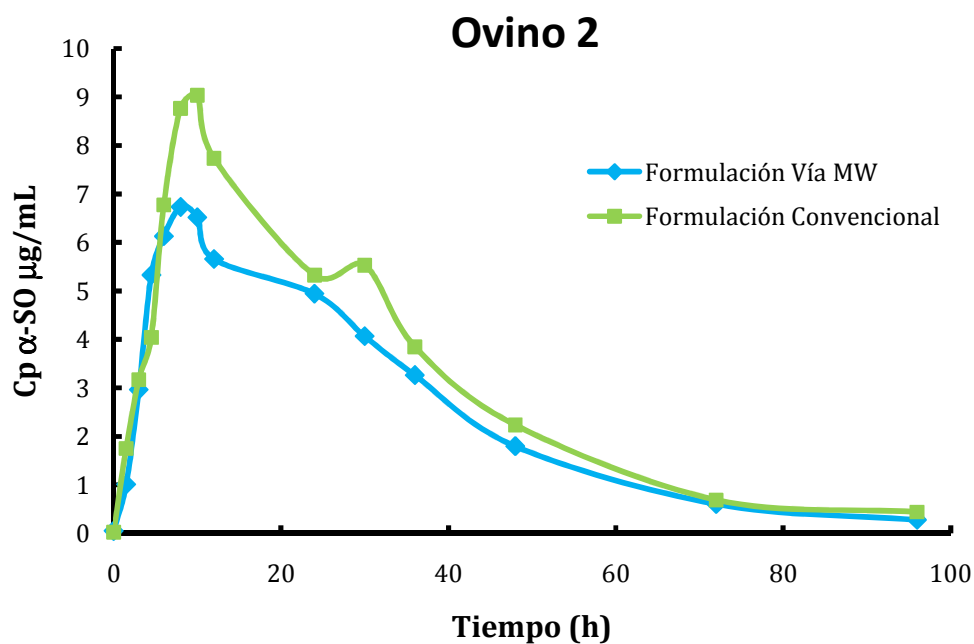


Figura D2. Perfiles de concentración plasmática-tiempo: arriba α -SO, abajo α -SO₂, después de la administración de una dosis de 12 mg/kg de α BIOF10 para el ovino 2.

Ovino 3

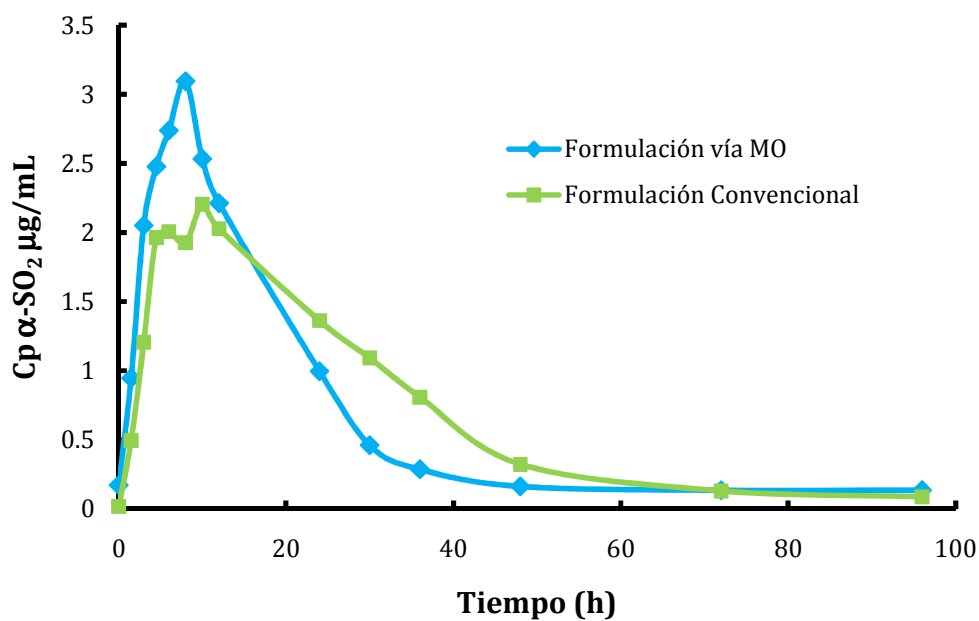
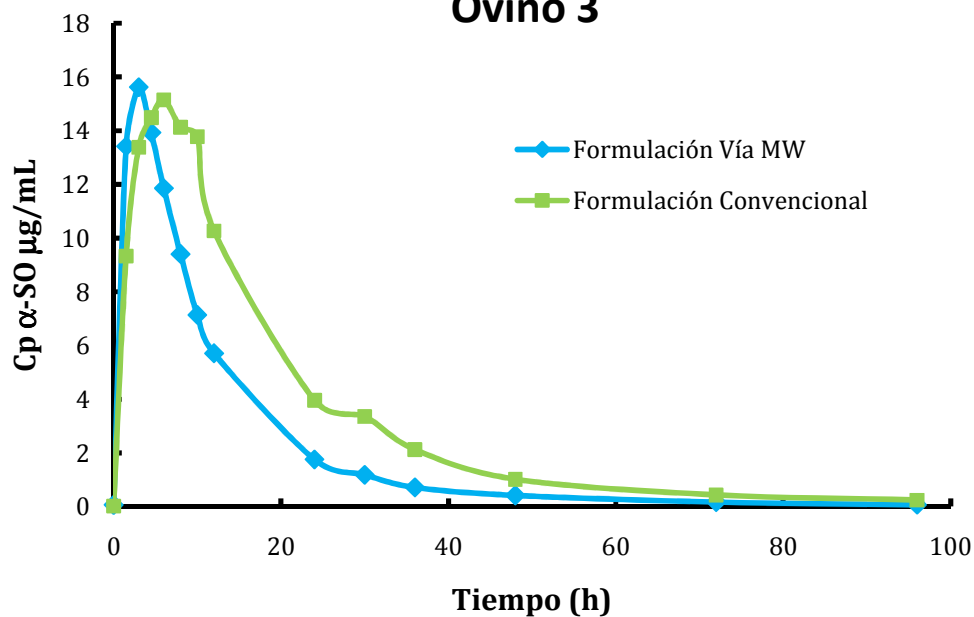


Figura D3. Perfiles de concentración plasmática-tiempo: arriba α -SO, abajo α -SO₂, después de la administración de una dosis de 12 mg/kg de α BIOF10 para el ovino 3.

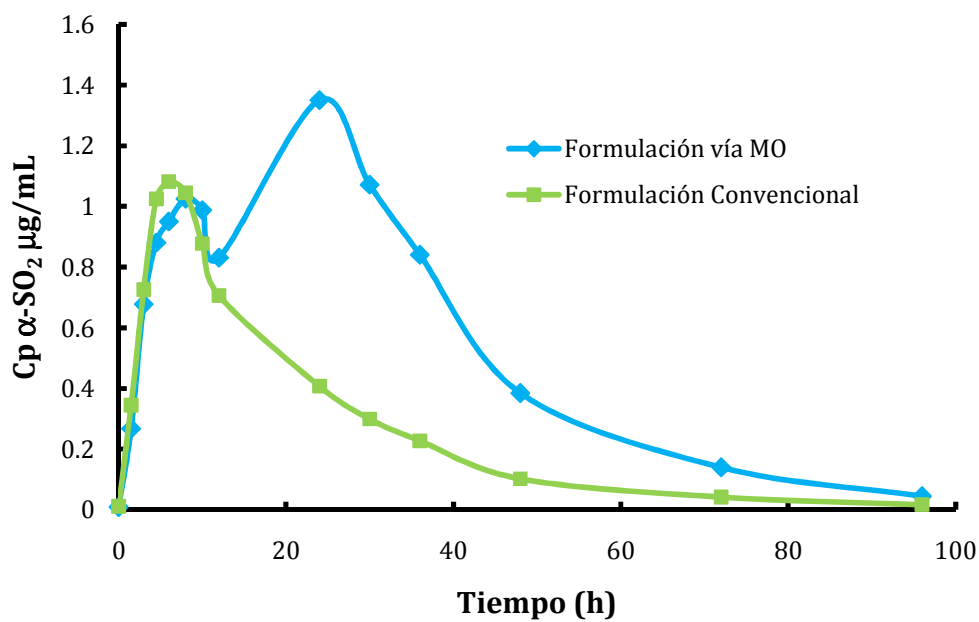
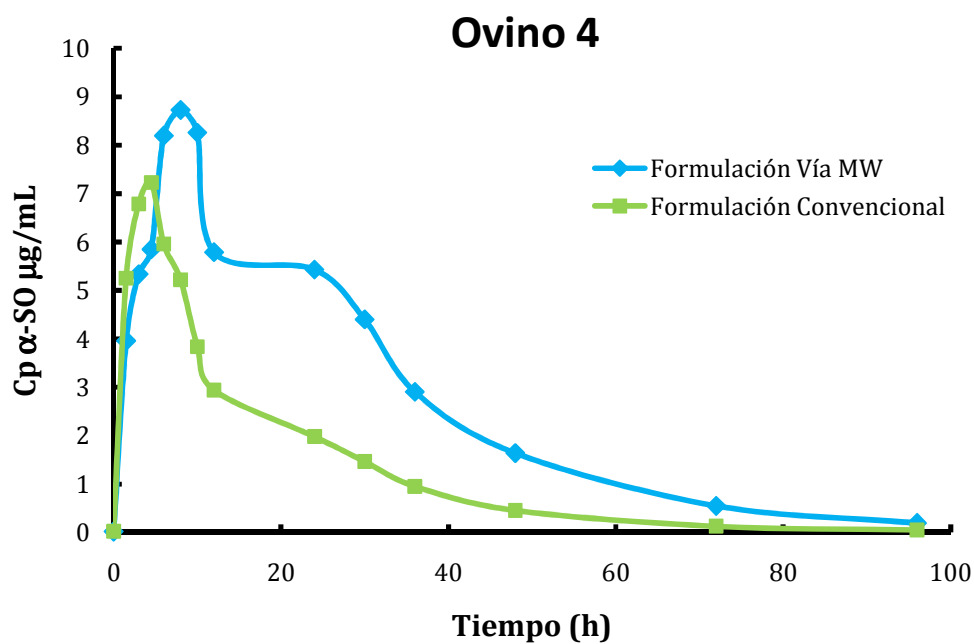


Figura D4. Perfiles de concentración plasmática-tiempo: arriba α -SO, abajo α -SO₂, después de la administración de una dosis de 12 mg/kg de α BIOF10 para el ovino 4.

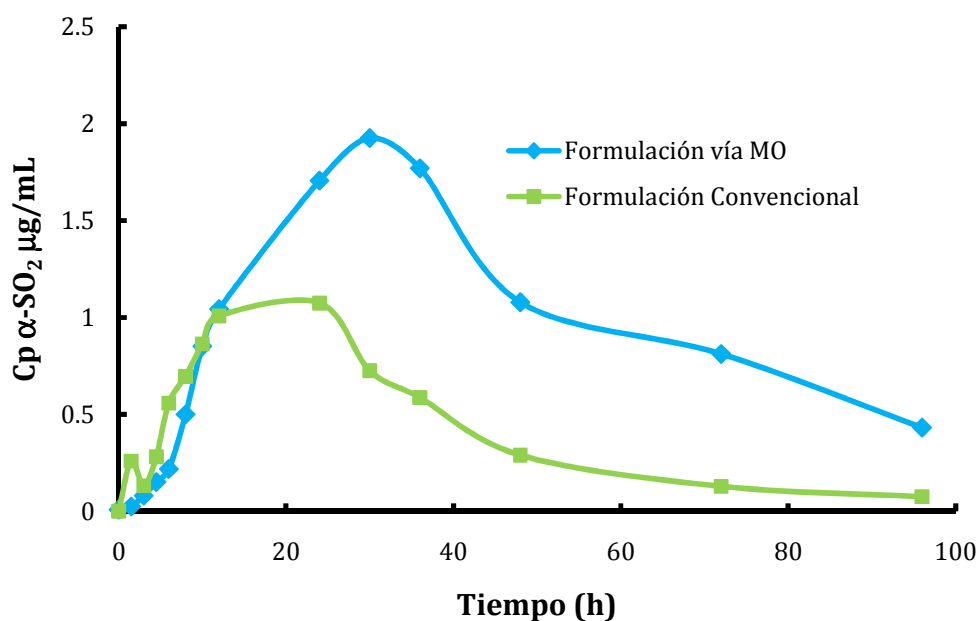
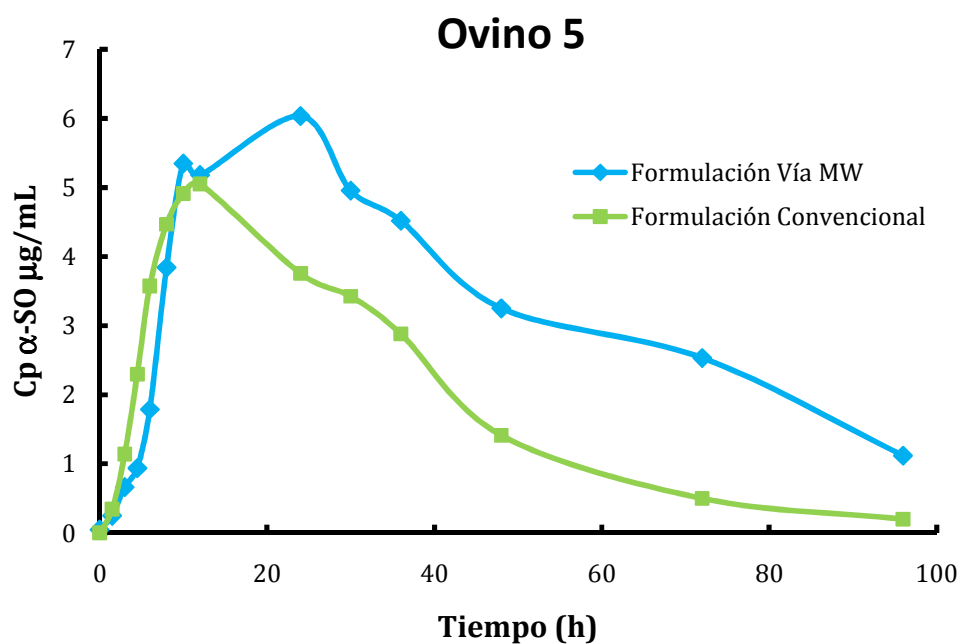


Figura D5. Perfiles de concentración plasmática-tiempo: arriba α -SO, abajo α -SO₂, después de la administración de una dosis de 12 mg/kg de α BIOF10 para el ovino 5.

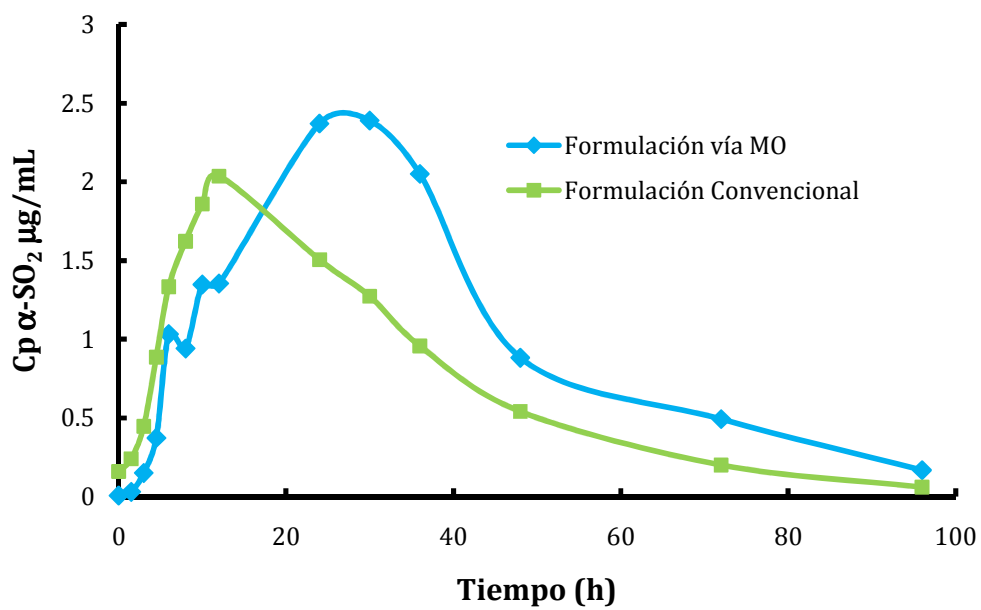
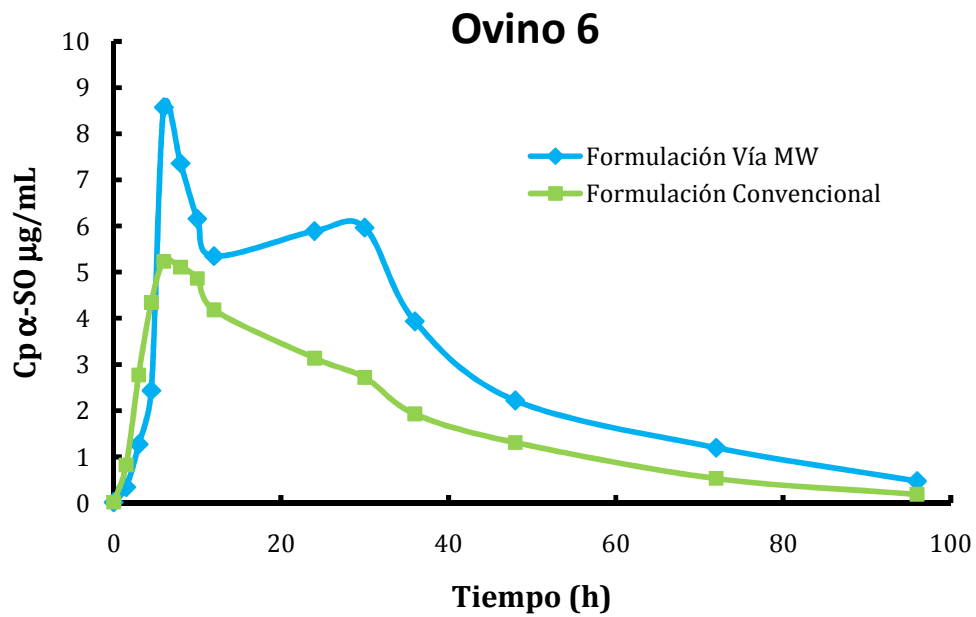


Figura D6. Perfiles de concentración plasmática-tiempo: arriba α -SO, abajo α -SO₂, después de la administración de una dosis de 12 mg/kg de α BIOF10 para el ovino 6.