



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**FARMACOCINÉTICA EN RATAS DE FHL-18, UN NUEVO  
COMPUESTO CON ACTIVIDAD CISTICIDA**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**JUAN CARLOS SOTO SOSA**



**MÉXICO, D.F.**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dra. Helgi Jung Cook

**VOCAL:** M. en F. Liz Jannet Medina Reyes

**SECRETARIO:** M. en C. Maria de Lourdes Beatriz Mayet Cruz

**1er. SUPLENTE:** M. en F. Luis Jesús García Aguirre

**2° SUPLENTE:** M. en C. Kenneth Rubio Carrasco

**ASESOR DEL TEMA**

---

**Dra. Helgi Jung Cook**

**SUPERVISOR TÉCNICO**

---

**Dra. Francisca Palomares Alonso**

**SUSTENTANTE**

---

**Juan Carlos Soto Sosa**



**Este trabajo se desarrolló en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"**

**Edificio de Investigaciones Cerebrales, laboratorio de Neuropsicofarmacología. México D.F.**

*Para la mujer que con su esfuerzo y trabajo diario me ha permitido alcanzar mis objetivos.*

*Con todo mi cariño y admiración...*

**GRACIAS MAMÁ**

*Gracias mamá (Juanita), hermanas (Maguí, Anita y Sandy) y hermano (Aldo) por su incondicional apoyo en todo momento.*

*Gracias Kari por tu enorme paciencia, apoyo y sobretodo por llenar mi vida con tu amor.*

*Dra. Helgi gracias por permitirme trabajar con usted, por las enseñanzas profesionales y personales, por todas las oportunidades, apoyo y ayuda que siempre me brindo.*

*Le agradezco Dra. Fancis toda su paciencia, apoyo y por su invaluable contribución a mi formación profesional con sus enseñanzas.*

*Dr. Robert Johnson Bundy gracias por creer en mí, por la confianza que me tuvo, por su apoyo siempre que acudí a usted y por brindarme siempre una alternativa.*

*Gracias Dr. Francisco Hernández Luis y QFB Sílvia Melchor por la síntesis y gentil donación de FHL-18.*

*Dra. Nelly le agradezco su apoyo durante mi estancia en el laboratorio, por su ayuda a resolver mis problemas en HPLC y por su enorme donación para la continuación de este proyecto.*

*Gracias tía Luisa por cuidarnos tanto, tu apoyo siempre a sido indispensable para mi familia.*

*Gracias amigos por su apoyo y por seguir a mi lado: Geros, Neto, Kari, Casper, Cadillac, Apolonio, Javi, Santamaria y Mari.*

*Les agradezco por hacer mi estancia en el laboratorio de Neuropsicofarmacología tan placentera: Dra. Susana, Dra. Ileana, Héctor, Victorino, Cristi, Maythe, Mara y Benjamín.*

*Al proyecto PAPIIT IN-227911 por el financiamiento para la investigación de FHL-18.*

*Gracias a Clíanthia Research México por su apoyo, la confianza y la oportunidad que me han brindado.*



## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. GENERALIDADES.....	3
2.1 <i>Taenia solium</i> .....	3
2.2 Neurocisticercosis.....	4
2.2.1 Epidemiología.....	6
2.2.2 Manifestaciones clínicas.....	7
2.2.3 Diagnóstico.....	7
2.2.4 Tratamiento.....	7
2.3 Albendazol.....	8
2.3.1 Mecanismo de acción.....	9
2.3.2 Farmacocinética.....	9
2.4 Estudios de Farmacocinética.....	11
2.4.1 Estabilidad.....	13
2.5 FHL-18.....	13
2.5.1 Propiedades fisicoquímicas. ....	15
2.5.2 Método analítico para cuantificar FHL-18 en plasma.....	15
2.6 Validación de métodos bioanalíticos.....	16
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo general.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4. METODOLOGIA.....	23
4.1 Material.....	23
4.2 Reactivos.....	23
4.3 Equipos.....	24
4.4 Material Biológico.....	24
4.5 Preparación de soluciones estándar .....	25
4.5.1 Solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 6. 0.....	25



Contenido	Pág.
4.5.2 Solución estándar de FHL-18 (50 µg/mL).....	25
4.5.3 Solución estándar de diazepam (estándar interno, 3 µg/mL).....	25
4.6 Modificaciones al método analítico.....	25
4.7 Preparación de la curva de calibración de FHL-18 en metanol para la validación del sistema.....	26
4.7.1 Preparación de los puntos control en metanol para evaluar el porcentaje de recobro de FHL18.....	27
4.8 Preparación de la curva de calibración de FHL-18 en plasma.....	27
4.8.1 Preparación de los puntos control en plasma.....	28
4.9 Proceso de extracción.....	29
4.10 Condiciones cromatográficas.....	29
4.11 Validación del sistema.....	29
4.11.1 Linealidad del sistema.....	30
4.11.2 Precisión del sistema.....	30
4.12 Adecuabilidad del sistema.....	31
4.13 Validación del método analítico a 4°C para la cuantificación de FHL-18 en plasma .....	31
4.13.2 Selectividad.....	31
4.13.3 Linealidad.....	32
4.13.4 Límite de cuantificación.....	33
4.13.5 Límite de detección.....	33
4.13.6 Recobro Absoluto.....	33
4.13.7 Precisión.....	34
4.13.7.1 Repetibilidad.....	34
4.13.7.2 Reproducibilidad.....	35
4.13.8 Exactitud.....	35
4.13.9 Estudios de estabilidad.....	35
4.13.9.1 Estabilidad en el inyector.....	35
4.13.9.2 Estabilidad de las muestras procesadas sin reconstituir en refrigeración.....	36



Contenido	Pág.
4.13.9.3 Ciclos congelación–descongelación.....	37
4.13.9.4 Estabilidad a largo plazo.....	38
4.14 Pruebas de solubilidad de FHL-18 en diferentes vehículos para administración de fármacos.....	38
4.15 Estudios de farmacocinética de FHL-18.....	39
4.15.1 Estudio 1. Administración por vía oral.....	39
4.15.2 Estudio 2. Administración por vía oral.....	39
4.15.3 Administración de FHL–18 por vía intravenosa.....	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1 Método analítico para cuantificar FHL 18 en plasma.....	41
5.2 Mezcla de extracción.....	42
5.3 Condiciones cromatográficas.....	42
5.4 Validación del sistema.....	42
5.4.1 Linealidad del sistema.....	43
5.4.2 Precisión del sistema.....	45
5.5 Validación del método analítico.....	46
5.5.1 Selectividad.....	46
5.5.2 Linealidad del método.....	48
5.5.3 Límite de cuantificación.....	50
5.5.4 Límite de detección.....	51
5.5.5 Recobro Absoluto.....	51
5.5.6 Precisión.....	52
5.5.6.1 Repetibilidad.....	52
5.5.6.2 Reproducibilidad.....	52
5.5.7 Exactitud.....	52
5.5.8 Estudios de estabilidad.....	56
5.6 Estudio de Farmacocinética.....	56
6. CONCLUSIONES.....	61
7. BIBLIOGRAFÍA.....	62



## ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Pág.
Tabla 1. Actividad cisticida <i>in vitro</i> de SOALB y FHL-18.....	14
Tabla 2. Parámetros y definiciones establecidos por la NOM-177-SSA1-1998 para la validación de métodos bioanalíticos.....	18
Tabla 3. Comparación de parámetros para la validación de métodos bioanalíticos.....	19
Tabla 4. Condiciones cromatográficas para la separación de FHL-18 y el E.I. de los componentes endógenos del plasma.....	41
Tabla 5. Linealidad del sistema.....	43
Tabla 6. % Error relativo debido a la regresión para el sistema (donde N= 12, N-2= 10).....	44
Tabla 7. Precisión del sistema obtenida a partir de los datos de linealidad.....	45
Tabla 8. Linealidad del método analítico.....	48
Tabla 9. %Des. Abs. de los datos de linealidad.....	50
Tabla 10. Límite de cuantificación del método analítico.....	51
Tabla 11. Cálculo del límite de detección por fórmula.....	51
Tabla 12. Por ciento del recobro del método analítico.....	52
Tabla 13. Repetibilidad del método analítico.....	53
Tabla 14. Reproducibilidad del método analítico.....	53
Tabla 15. Exactitud del método analítico de los datos de repetibilidad.....	54
Tabla 16. Exactitud del método analítico de los datos de reproducibilidad.....	55
Tabla 17. Estudios de estabilidad de FHL18 en plasma de rata.....	57
Tabla 18 Concentraciones plasmáticas de FLH-18 en rata después de la administración de una dosis de 200 µg/Kg por via intravenosa.....	60



## ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Pág.
Figura 1. A) Morfología del escólex de <i>T. solium</i> . B) <i>T. solium</i> fase adulta.....	3
Figura 2. A) Huevo de <i>T. solium</i> con embrión. B) Cisticerco de <i>T. Solium</i> .....	4
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i> .....	5
Figura 4. Distribución geográfica de cisticercosis.....	6
Figura 5. Estructura química del albendazol.....	8
Figura 6. Metabolismo de albendazol.....	10
Figura 7. Estructura química de FHL-18 (con numeración del anillo benzimidazólico).....	14
Figura 8. Eficacia <i>in vivo</i> de ALB y FHL-18.....	14
Figura 9. Conformación ortogonal al núcleo del benzimidazol en 1) albendazol y 2) FHL-18.....	15
Figura 10. Preparación de la curva patrón de FHL-18 en metanol.....	26
Figura 11. Preparación de los puntos control de FHL-18 en metanol.....	27
Figura 12. Preparación de la curva patrón de FHL-18 en plasma.....	28
Figura 13. Preparación de los puntos control de FHL-18 en plasma.....	28
Figura 14. Proceso de extracción de FHL-18 del plasma.....	29
Figura 15. Linealidad del sistema para FHL-18 en metanol.....	44
Figura 16. Solución de adecuabilidad en metanol de FHL-18 (450 ng/mL) y el E.I. (3 µg/mL).....	46
Figura 17. Cromatograma del blanco de pool de plasma de rata.....	47
Figura 18. Cromatograma del blanco de plasma de rata hemolizado.....	47
Figura 19. Cromatograma del E.I. en plasma de rata (3 µg/mL).....	47
Figura 20. Cromatograma de FHL-18 (125 ng/mL) y el E.I. (3 µg/mL) en plasma de rata.....	48
Figura 21. Linealidad del mtodo analítico para cuabtificar FHL-18 en plasma.....	49
Figura 22. Cromatograma de plasma de rata 30 min después de la administración oral de FLH-18 en cremofor al 2 %.....	56



---

Contenido	Pág.
Figura 23. Cromatograma de plasma de rata 30 min después de la administración oral de FLH-18 en 40% propilenglicol, 10% etanol.....	58
Figura 24. Posible metabolismo de FLH-18.....	59
Figura 25. Cromatograma de FLH-18 después de 30 min de la administración por vía intravenosa de una dosis de 200 µg/Kg .....	60



La neurocisticercosis es la infección parasitaria más común del Sistema Nervioso Central (SNC) causada por la presencia de la forma larvaria del céstodo *Taenia solium* en el cerebro. La neurocisticercosis es considerada por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad endémica en la mayor parte de América Latina, África, Europa del Este, y amplias zonas de Asia, es casi inexistente en los Estados Unidos y la mayor parte de Europa. En México un estudio reciente realizado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), uno de los principales centros que atiende pacientes con este padecimiento, mostró que la frecuencia de esta enfermedad no ha disminuido, mostrando una prevalencia del 2.5 % en un periodo de 1994 al 2004.<sup>10</sup>

Actualmente existen solo dos fármacos cisticidas usados para el tratamiento de la neurocisticercosis, praziquantel (PZQ) y albendazol (ALB), siendo este último el de primera elección por su mayor eficacia (ALB del 80-90% y PZQ 60-70%).<sup>6</sup> Sin embargo, el ALB presenta una baja solubilidad en agua, esto limita su absorción ocasionando una gran variabilidad interindividual en los niveles plasmáticos y por lo tanto en la respuesta terapéutica. En la búsqueda de nuevas moléculas cisticidas con mejores propiedades biofarmacéuticas, recientemente se sintetizó una serie de 13 análogos del albendazol, los cuales fueron evaluados contra cisticercos de *Taenia crassiceps*. Entre estos nuevos análogos, el denominado FHL-18 fue el que presentó una potencia *in vitro* similar a la del sulfóxido de albendazol (principal metabolito del ALB), mientras que *in vivo*, éste nuevo análogo mostró una eficacia semejante a la obtenida con ALB.<sup>25</sup> Por lo anterior se consideró de interés realizar estudios biofarmacéuticos de FHL-18, para lo cual se validó un método analítico para cuantificar FHL-18 en plasma de rata por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).<sup>26</sup>

En diversos fármacos se ha demostrado su inestabilidad en el plasma, entre las razones de la inestabilidad se encuentran la termosensibilidad y/o la degradación por las enzimas plasmáticas. Un claro ejemplo de este caso es el antibiótico cefepime, cuando las muestras plasmáticas son procesadas a cuatro grados Celsius las muestras se mantienen estables por un mayor periodo de tiempo comparadas con las muestras procesadas a 22 °C.<sup>23</sup> Esta situación es similar con FHL-18, en un estudio previo se demostró que esta molécula es inestable a temperatura ambiente en plasma.<sup>26</sup>



## 1. INTRODUCCIÓN

---

Sin embargo, debido a la potencia y eficacia de FHL-18 se decidió continuar con los estudios de esta molécula bajo condiciones de baja temperatura durante el procesamiento de la muestra. Si FHL-18 es inestable a la temperatura y/o es degradado en el plasma, al procesar las muestras a una temperatura menor que la del plasma, a 4 °C, entonces se disminuirá la degradación de FHL-18 y así obtener el perfil farmacocinético de esta nueva molécula cisticida. Por lo que el objetivo del presente trabajo es evaluar la farmacocinética de FHL-18, empleando un método analítico validado a 4 °C, en un modelo animal de rata.



### 2.1 *Taenia solium*

*T. solium* pertenece a la clase de los Cestodos que son gusanos planos, invertebrados, macroscópicos, en forma de listón de diferentes tamaños. Los cestodos presentan un cuerpo alargado, adaptado a la forma tubular del intestino, dividido en tres regiones:<sup>1</sup>

1. Escólex: de forma cuboide, con cuatro ventosas, un rostelo con una doble corona de ganchos (de 25-30), con los cuales se adhiere al intestino delgado del hospedero. Figura 1A.
2. Cuello: región de tejido indiferenciado que da origen a la cadena de proglótidos y mide de 5 a 10 mm.
3. Estróbilo: Es el conjunto de proglótidos (cada uno con 10 000 - 50 000 huevos), cada uno de estos cuenta con uno o más juegos de órganos de reproducción. En el extremo más próximo al cuello se encuentran los proglótidos inmaduros, seguidos por los segmentos sexualmente maduros, y por los proglótidos grávidos, llenos de huevos, en el extremo posterior. Figura 1B

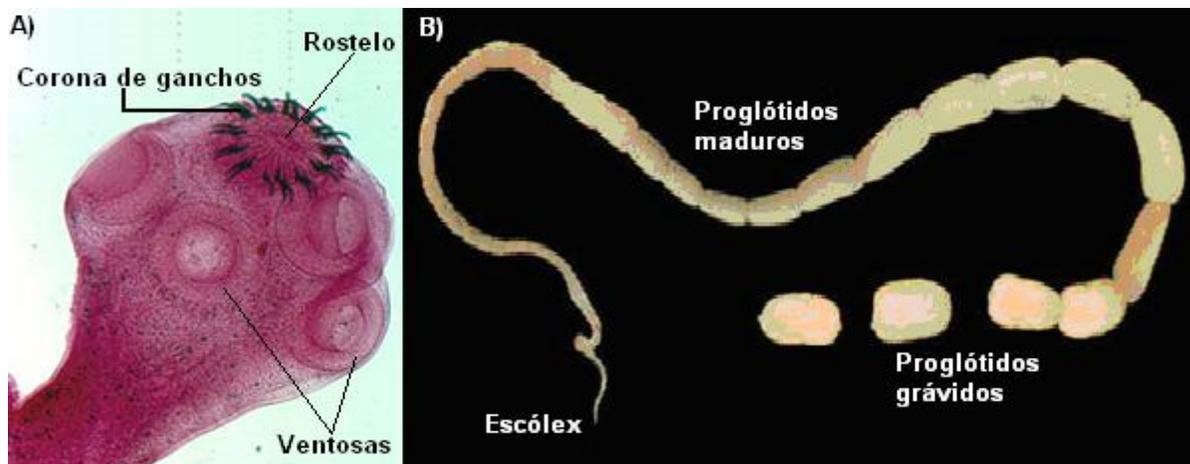


Figura1. A) Morfología del escólex de *T. solium*. B) *T. solium* fase adulta.

Los huevos de *Taenia solium*, figura 1B, miden unos 30  $\mu\text{m}$ , contienen un embrión (tienen 6 ganchos) rodeado por una oncosfera y a partir de este se desarrolla el metacestodo o forma larvaria (cisticerco). Los cisticercos miden de 0.5 a 1 cm de diámetro, figura 2B, son vesículas llenas de líquido transparente con una esfera blanquecina, y que se consideran de importancia médica debido a que pueden alojarse



en diferentes tejidos y causar enfermedades graves como: teniasis, cisticercosis y neurocisticercosis.<sup>1,2</sup>

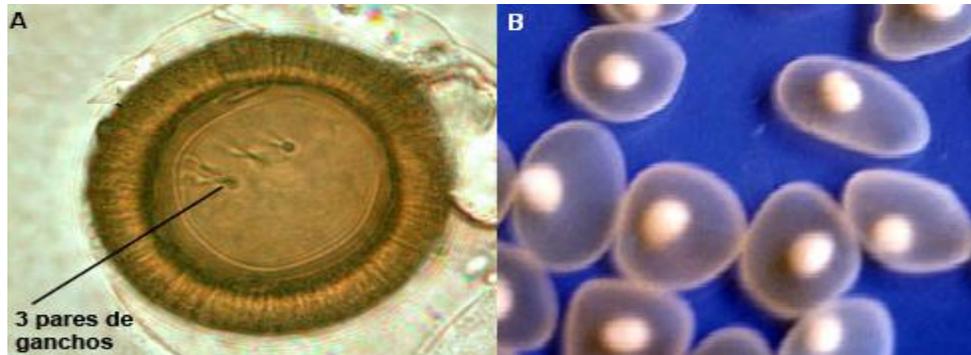


Figura 2. A) Huevo de *T. solium* con embrión. B) Cisticerco de *T. solium*

La teniasis (enfermedad intestinal provocada por la forma adulta de *T. solium*) se produce en el humano que es el hospedero definitivo y es adquirida cuando ingiere alimentos contaminados con cisticercos. Estos se adhieren a la mucosa intestinal por medio del escólex y maduran en tenias adultas que pueden llegar a medir de 2-7 m de longitud y residir en intestino durante años. Meses después de la infección los proglótidos grávidos y huevos de *T. solium* comienzan a ser excretados en las heces del individuo.<sup>3,4</sup>

La cisticercosis es causada por el alojamiento de la forma larvaria de *T. solium* en diferentes tejidos, con mayor frecuencia al tejido subcutáneo, músculo esquelético y ocular.<sup>4</sup>

### 2.2 Neurocisticercosis

La neurocisticercosis (NCC) ocurre cuando la larva de *T. solium* migra al cerebro. Es la enfermedad parasitaria más común del Sistema Nervioso Central (SNC)<sup>5</sup>, y la principal causa de epilepsia adquirida en el mundo.<sup>6</sup> La NCC no es adquirida por comer carne de cerdo contaminada con cisticercos, la ingesta de esta carne solo produce teniasis debido a que los cisticercos son las larvas que se desarrollan en el gusano adulto y no contienen los huevos que causan la cisticercosis.<sup>3</sup>

Los huevos del parásito pueden ser ingeridos en alimentos preparados por una persona con teniasis y con malos hábitos higiénicos, vía fecal-oral, y de igual manera por



## 2. GENERALIDADES

autoinfección. También se pueden ingerir en frutas y verduras regadas con agua residual contaminada con los huevos del parásito.<sup>7</sup> Después de ingerir los huevos del parásito, se rompen y liberan los embriones en oncosferas al intestino, las cuales cruzan la barrera intestinal, entran al torrente sanguíneo y son transportados a diferentes tejidos del hospedero donde se desarrollan en cisticercos y producen cisticercosis humana.<sup>5</sup> En la mayoría de las circunstancias los cisticercos son destruidos por el sistema inmune del hospedero a excepción de los ubicados en sitios inmunológicamente privilegiados como los ojos y el sistema nervioso.<sup>3</sup>

El ciclo de vida del parásito es completado cuando los cerdos (hospedero intermediario) ingieren los huevos del parásito contenidos en las heces humanas o por pastoreo en tierras contaminadas. Los huevos son liberados en el intestino, atraviesan la mucosa intestinal para invadir diversos tejidos donde maduran hasta convertirse en cisticercos,<sup>5</sup> lo cual se muestra en la figura 3.

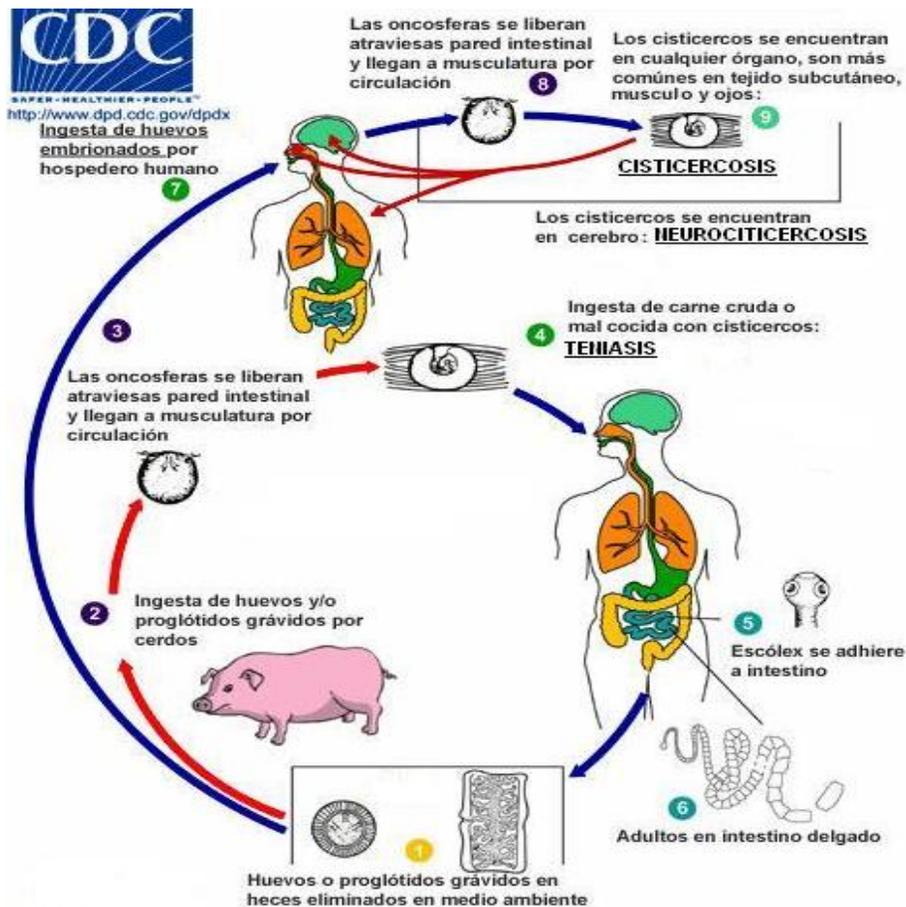


Figura 3. Ciclo de vida de *Taenia solium*.



Una vez en el cerebro el parásito puede alojarse a nivel de parénquima (70-90% de los casos), meninges, intraventricular y subaracnoides (se observa del 15% a 54% de los pacientes) y en la médula espinal (1.6-13% de los pacientes). Además el cisticerco sufre cambios estructurales a través de cuatro etapas; vesicular: forma viable, tiene un pequeño escólex y la vesícula esta llena de un líquido claro, coloidal: el líquido de la vesícula es viscoso y turbio, granular nodular: el escólex es transformado en gruesos gránulos mineralizados y finalmente, la forma calcificada que es la forma no viable del cisticerco.<sup>5,6</sup>

### 2.2.1 Epidemiología

Aún cuando no hay datos disponibles de la prevalencia de esta enfermedad a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado más de 50 000 muertes por año debido a la NCC.<sup>5</sup> La OMS considera que la cisticercosis es endémica en América Latina, sureste de Asia, África, Europa oriental y muchos otros países en vías de desarrollo,<sup>5,8</sup> (figura 4). La enfermedad es casi inexistente en los Estados Unidos y la mayoría de Europa, sin embargo, los casos de NCC en estos países están asociados a los fenómenos de migración de personas de las zonas endémicas.<sup>8</sup>

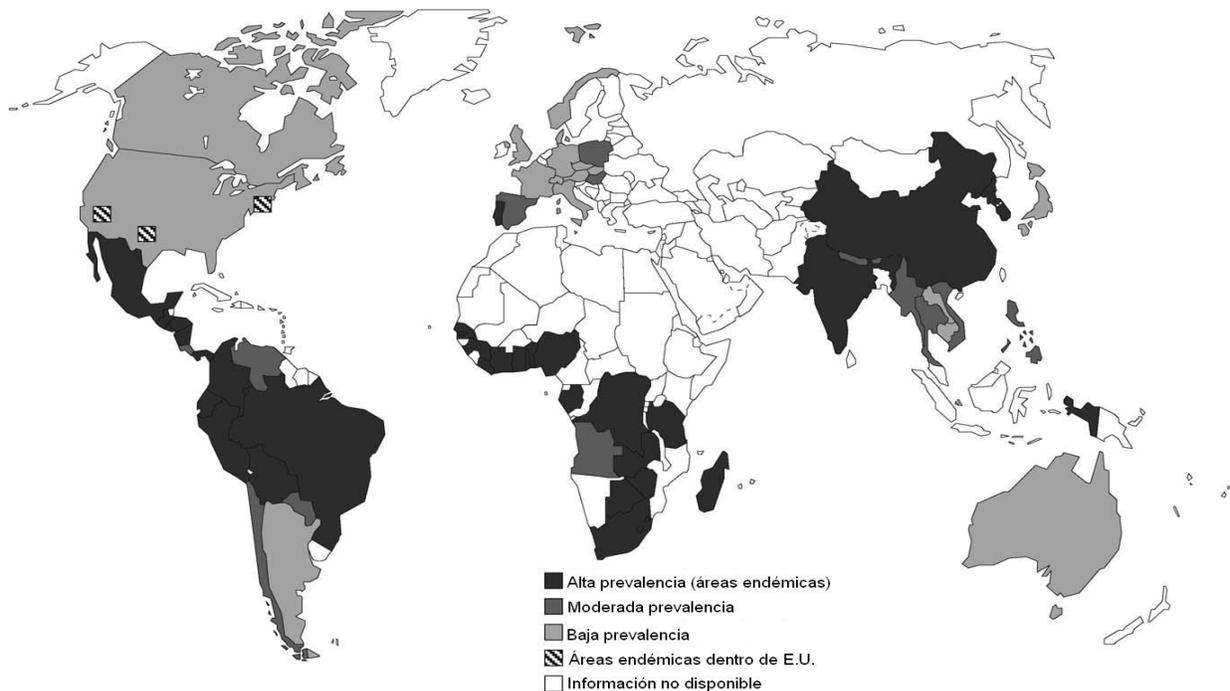


Figura 4. Distribución geográfica de cisticercosis



En México los casos de cisticercosis y teniasis han disminuido, de 1 608 en 1995 a 231 casos en 2009 y de 14 013 en 1990 a 290 en 2009, respectivamente.<sup>9</sup> Sin embargo, un estudio realizado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), uno de los principales centros que atiende pacientes con NCC en el país, mostró que la frecuencia de esta enfermedad se ha mantenido con una prevalencia del 2.5 % en un periodo de 1994 al 2004, por lo que la NCC aun no ha sido controlada en nuestro país.<sup>10</sup>

### 2.2.2 Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas en la NCC son variables y van desde casos asintomáticos hasta casos con serios problemas neurológicos. Están determinadas por la ubicación, número y la viabilidad de los parásitos y de la respuesta inmune del hospedero.<sup>5</sup> En la forma parenquimatosa los pacientes suelen presentarse con dolores de cabeza siendo la epilepsia la manifestación clínica más común (por encima del 70% de los pacientes)<sup>6</sup>. En el caso de la NCC extraparenquimatosa se presenta hipertensión intracraneal.<sup>8</sup>

### 2.2.3 Diagnóstico

La base del diagnóstico es la neuroimagen ya sea por tomografía axial computarizada (sensibilidad y especificidad de más del 95%) ó por resonancia magnética, siendo la segunda más sensible para la detección de la etapa evolutiva del parásito y en el diagnóstico de la NCC extraparenquimatosa.<sup>5, 6</sup> Existen otros métodos basados en la detección de proteínas y anticuerpos específicos de *T. solium*, como son: Western blot (sensibilidad 94-98%, especificidad 100%) y ELISA (sensibilidad 86%, especificidad 96%), sin embargo, la principal limitante de su uso son los frecuentes resultados falsos negativos debido a que su sensibilidad disminuye drásticamente por la presencia de un solo cisticercos en el cerebro o por cisticercos calcificados.<sup>11</sup>

### 2.2.4 Tratamiento

Existen tres tipos de tratamiento para los pacientes: sintomático, uso de fármacos cisticidas y quirúrgico. El tratamiento cisticida se emplea para destruir las larvas siendo los fármacos empleados el albendazol (15 mg/Kg/día durante 8 días) y el praziquantel



(50 mg/Kg/día durante 15 días). La cirugía se emplea, en algunos casos, para extirpar los quistes muy grandes o que no respondieron al tratamiento cisticida.<sup>5, 6, 8</sup>

En relación al tratamiento cisticida aproximadamente del 60% al 70% de los pacientes están libres de parásitos viables después de la terapia cisticida.<sup>8</sup> Entre el segundo y quinto día del tratamiento con los fármacos cisticidas puede haber un incremento en la reacción de inflamación causada por la muerte de los cisticercos, para lo cual se administran junto con los fármacos cisticidas corticosteroides (prednisona y dexametasona)<sup>6, 11</sup>

El fármaco de primera elección es albendazol (ALB), por tener una mayor eficacia comparado con praziquantel (PZQ). El ALB destruye del 80-90% y PZQ del 60-70% de los cisticercos en la cisticercosis parénquimal.<sup>6</sup> Además de lo anterior, el PZQ se metaboliza rápidamente por el hígado en metabolitos inactivos que son excretados en la orina y en la bilis, y tiene una vida media de 1 a 3 h.<sup>5, 12</sup>

### 2.3 Albendazol

El albendazol (figura 5) pertenece al grupo de los benzimidazoles. Es un antiparasitario de amplio espectro y fue en 1987 cuando se mostró su efectividad en el tratamiento contra la neurocisticercosis.<sup>12</sup>

Su nombre químico es metil-5-(propiltio)-2-bencimidazol-carbamato, su fórmula molecular es  $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ , tiene un peso molecular de 265.33 g/mol y es de color ligeramente blanco.<sup>14</sup>

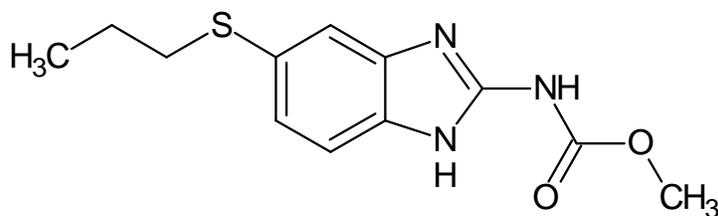


Figura 5. Estructura química del albendazol

El compuesto es soluble en dimetilsulfóxido, ácidos y bases fuertes, es ligeramente soluble en cloroformo, metanol y acetonitrilo, y es prácticamente insoluble en agua. El



ALB es un anfolito, es decir tiene propiedades tanto de ácido como de base, sus valores de pKa son 2.80 y 10.26.<sup>14</sup>

Este fármaco está catalogado como clase II (baja solubilidad, alta permeabilidad) en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica.<sup>15</sup>

### 2.3.1 Mecanismo de acción

El ALB se une a la betatubulina del parásito inhibiendo su polimerización para la formación de los microtúbulos.

Los microtúbulos están asociados con diversas funciones celulares, tales como: formación del huso mitótico en la división celular, transporte intracelular, mantenimiento de la forma celular, secreción y absorción de nutrientes.

La pérdida de los microtúbulos afecta la capacidad de captar la glucosa en la forma larvaria o etapas adultas del parásito, por lo que agota sus reservas de glucógeno y por lo tanto hay una disminución en la producción de adenosín trifosfato (ATP); debido a esta disminución en la producción de energía, el parásito se inmoviliza y eventualmente muere.<sup>16, 17</sup>

### 2.3.2 Farmacocinética

La absorción de ALB en el tracto gastrointestinal es baja, la mayor absorción del fármaco ocurre en el estómago lo cual se atribuye a su mayor solubilidad en un medio ácido. Dado que el proceso de absorción es por difusión pasiva, el paso limitante de su absorción es su baja solubilidad acuosa.<sup>14, 15</sup>

Después de la absorción, el fármaco se metaboliza rápida y extensamente en el hígado en sulfóxido de albendazol (SOALB), que es el metabolito activo. Los otros metabolitos son la sulfona de albendazol y la 2-aminosulfona, los cuales son metabolitos inactivos.<sup>18</sup>

El metabolismo se lleva a cabo por las flavin monooxigenasas (FMO) y el sistema del citocromo P450 (CYP). La primera oxidación del átomo de azufre se lleva a cabo por el CYP 3A4 o las FMO y la segunda oxidación se lleva a cabo por el CYP 2C,<sup>15</sup> figura 6.

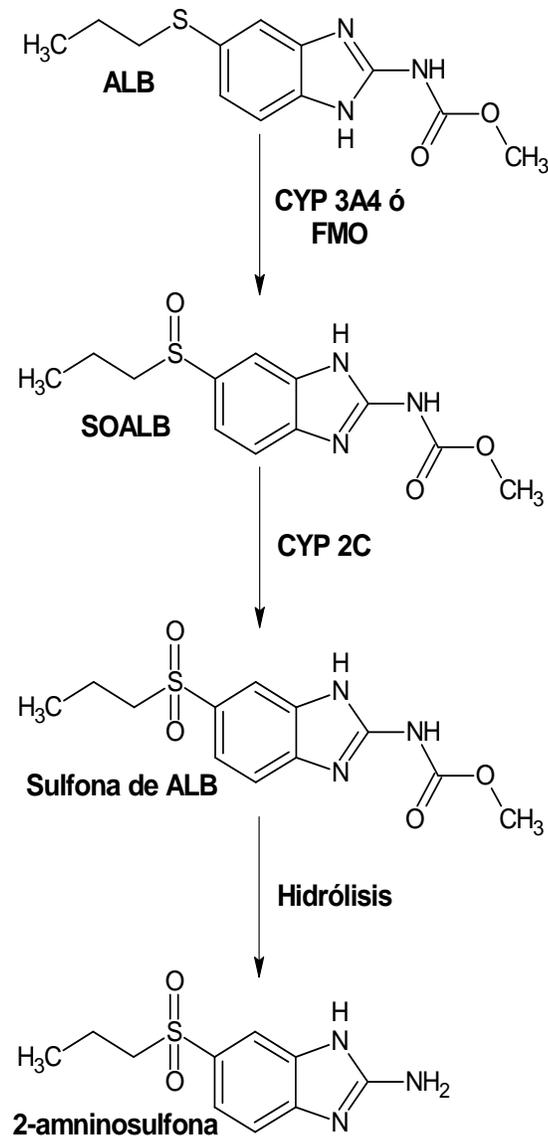


Figura 6. Metabolismo de albendazol

El ALB se une a proteínas plasmáticas del 89-92%, mientras que el porcentaje de unión del sulfóxido de albendazol es del 62-67%.<sup>14</sup> El ALB y el SOALB se distribuyen en todo el cuerpo, el SOALB puede cruzar la barrera hematoencefálica por lo que su concentración en el líquido cefalorraquídeo es del 43% de la encontrada en plasma.<sup>16</sup> La concentración máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) de SOALB después de la administración oral de ALB (15 mg/Kg) está en un rango de 0.45-2.9 mg/mL y es altamente variable entre individuos, lo cual es relacionado con la baja solubilidad del fármaco.<sup>12</sup> El tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) de SOALB en el humano es de 8-12 h y se excreta principalmente en forma



de metabolitos en la orina.<sup>16</sup> En pacientes con neurocisticercosis el  $t_{1/2}$  es aproximadamente de 11h.<sup>12</sup>

La biodisponibilidad del ALB está limitada por la baja absorción en el tracto gastrointestinal, consecuencia de su baja solubilidad, por lo cual se han evaluado diferentes estrategias para incrementar su biodisponibilidad. Por ejemplo, el administrar el fármaco con una dieta rica en grasas, ocasiona que la  $C_{m\acute{a}x}$  del SOALB se aumente de 4.5 a 9 veces en comparación con la administración de ALB con agua, y si se administra junto con dexametasona los niveles plasmáticos de SOALB se incrementan significativamente. La coadministración de ALB con PZQ incrementa el área bajo la curva desde tiempo cero a infinito ( $ABC_{0-\infty}$ ) 4.5 veces. Sin embargo, la administración del ALB junto con cimetidina ó fármacos antiepilépticos (fenitoína, carbamazepina y fenobarbital) reduce significativamente las concentraciones plasmáticas del SOALB.<sup>16</sup>

### 2.4 Estudios de Farmacocinética

Los estudios de farmacocinética son un importante componente tanto de la investigación como en el descubrimiento de moléculas que pueden ser candidatos a nuevos fármacos, ya que la potencia *in vitro* no es el único factor que requiere un buen fármaco debido a que muchos compuestos que son potentes *in vitro* se inactivan *in vivo*. Otros factores como biodisponibilidad y el tiempo de duración del efecto son propiedades de vital importancia para la elección de una molécula candidato a fármaco, al igual que su eficacia.<sup>19</sup> Muchas de las moléculas con actividad biológica no son buenos candidatos a fármaco por sus malas propiedades farmacocinéticas tales como; pobre absorción, tiempo de vida media muy largo o corto, y un extenso metabolismo.<sup>20</sup>

La farmacocinética describe cómo la concentración de un fármaco en el plasma cambia en función del tiempo después de administrar una dosis por una vía específica, e incluye los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación.<sup>19</sup>

Absorción: La absorción se ve influenciada por factores biológicos y fisicoquímicos. Los dos factores fisicoquímicos más importantes que afectan la velocidad de absorción son la lipoficidad y la solubilidad en medio acuoso del fármaco. En general una alta lipoficidad del fármaco le permite una gran permeabilidad a través de las células, aunque también un gran metabolismo por efecto del primer paso. La influencia de la



lipoficidad en el metabolismo se atribuye principalmente al incremento de afinidad del fármaco por la enzimas.<sup>20</sup>

Distribución: es el proceso que describe cómo el fármaco se distribuye en el cuerpo.<sup>19</sup>

La lipoficidad no solo afecta la absorción y el metabolismo sino también la unión a proteínas y distribución del fármaco. Generalmente una alta lipoficidad ocasiona que su unión a proteínas sea más fuerte y también una mayor distribución. Los fármacos también pueden llegar al cerebro, sin embargo este es un órgano diferente a los otros órganos en varios aspectos, por ejemplo esta rodeado por la barrera hematoencefálica donde los capilares endoteliales no tienen poros como los capilares que rodean a otros órganos que si los tienen para permitir el paso de pequeñas moléculas.

Metabolismo: es un proceso en el cual mediante reacciones enzimáticas un xenobiótico es transformado a metabolitos con el objetivo de eliminarlo del cuerpo haciéndolo más soluble en agua. Además es un factor importante para la biodisponibilidad de fármacos después de la administración oral. En general el metabolismo de fármacos se divide en reacciones de fase I y fase II. Las reacciones de fase I involucran oxidación, reducción e hidrólisis de los grupos funcionales del compuesto y son catalizadas por las enzimas de la familia del citocromo P450, las flavín monooxigenasas y las esterasas. La reacciones de fase II son de conjugación donde se introducen nuevos grupos funcionales al compuesto, por ejemplo la glucoronidación, acetilación y metilación.<sup>21</sup> Los metabolitos formados pueden diferir en la distribución y excreción del fármaco original, pueden actuar por mecanismos similares o diferentes por lo que el conocimiento de la formación de los metabolitos activos o inactivos es importante no sólo para predecir el resultado terapéutico, sino también para explicar la toxicidad de los fármacos.<sup>20</sup>

Eliminación: es la pérdida irreversible del fármaco por el organismo. Existen principalmente dos vías de eliminación de fármacos: hepática y renal. En la primer vía el flujo sanguíneo hepático es el único factor que limita la depuración, sin embargo, en la segunda vía aunque también está relacionada con el flujo de sanguíneo también se ve afectada por la velocidad de filtración glomerular, la secreción tubular activa y la reabsorción. La depuración contribuye a establecer la dosis necesaria para mantener una determinada concentración plasmática del fármaco.<sup>19</sup>



### 2.4.1 Estabilidad

La estabilidad es una propiedad esencial para aquellas moléculas que son candidatos a fármacos, ésta información sirve de apoyo para la toma de decisiones en todas las etapas del desarrollo y descubrimiento de nuevas moléculas. Los compuestos inestables en el plasma pueden conducir a una alta depuración, una vida media corta y a perfiles farmacocinéticos indeseables. Los compuestos que se degradan en el tracto gastrointestinal tienden a tener una baja biodisponibilidad oral debido a la eliminación pre-sistémica. La inestabilidad de los compuestos en la matriz biológica o en solución puede deberse a diversas razones: inestabilidad por el pH, reaccionar con los componentes de la solución amortiguadora, fotosensibilidad o termosensibilidad, ó por reaccionar con las proteínas.<sup>22</sup>

Un ejemplo de la importancia de la estabilidad en fármacos es el estudio realizado por H. Elkhaïti et al.<sup>23</sup> con cefepime, cefalosporina de cuarta generación de amplio espectro. Para el estudio de farmacocinética en humanos, los autores evaluaron la estabilidad de la solución de trabajo y de las muestras plasmáticas a temperatura ambiente y a 4 °C. Los resultados mostraron que la solución de trabajo fue estable durante al menos 24 horas cuando se almacenaba tanto a temperatura ambiente como a 4 °C. Sin embargo, las muestras plasmáticas fueron inestables a temperatura ambiente, pero a temperatura de 4 °C se mantuvieron estables al menos por seis horas, y una importante degradación se presentó después de este tiempo. El estudio muestra la influencia de la temperatura en la estabilidad de fármacos y su influencia en la cuantificación.

### 2.5 FHL-18

En la búsqueda de nuevas moléculas cisticidas con mejores propiedades biofarmacéuticas, Palomares y col.<sup>24</sup> evaluaron una serie de 13 análogos del albendazol, contra cisticercos de *Taenia crassiceps*. Entre estos nuevos análogos, el denominado FHL-18 (figura 7) fue el que presentó una potencia *in vitro* similar a la del SOALB (tabla 1), mientras que *in vivo*, éste nuevo análogo mostró una eficacia semejante a la obtenida con ALB, figura 8.

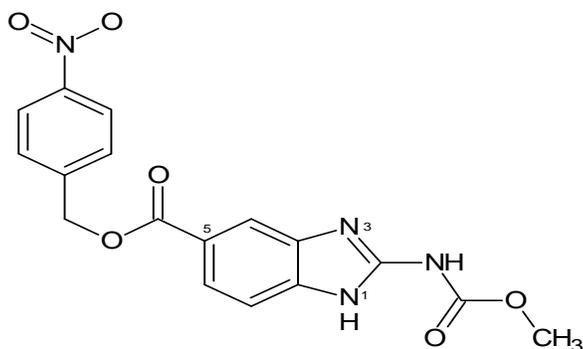


Figura 7. Estructura química de FHL-18 (con numeración del anillo benzimidazólico)

Tabla 1. Actividad cisticida *in vitro* de SOALB y FHL-18<sup>25</sup>

	% Mortalidad	
	0.28 $\mu$ M	1.7 $\mu$ M
SOALB	46 $\pm$ 5	88 $\pm$ 7
FHL-18	41 $\pm$ 1.6	68 $\pm$ 7

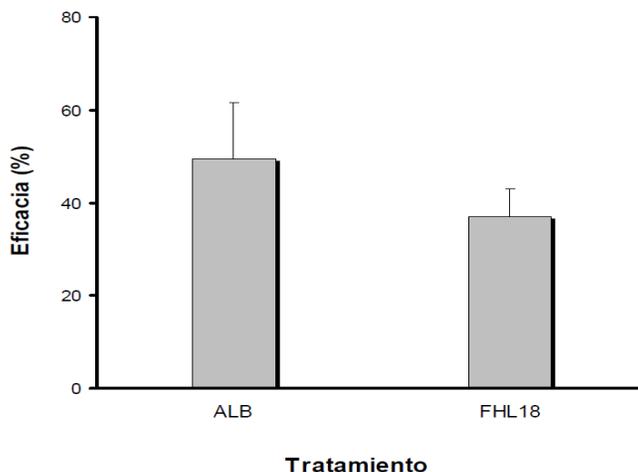


Figura 8. Eficacia *in vivo* de ALB y FHL-18

El estudio estructura-actividad mostró que la actividad cisticida del análogo de albendazol se debe a la presencia del átomo de hidrogeno en la posición 1, el grupo carbamato en la posición 2 y un sustituyente voluminoso en la posición 5 ([4-nitrobenzil]oxil] carbonilo) y que esté ortogonal al núcleo del benzimidazol, (figura 9).

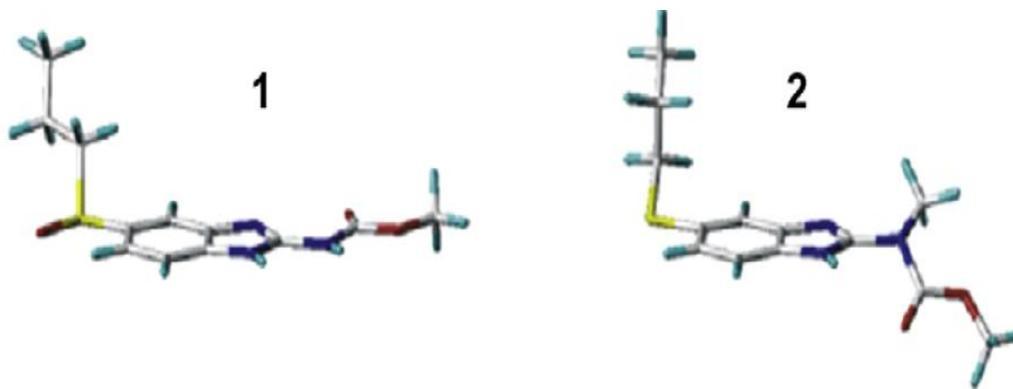


Figura 9. Conformación ortogonal al núcleo del benzimidazol en 1) albendazol y 2) FHL-18<sup>33</sup>

### 2.5.1 Propiedades fisicoquímicas.

Su nombre químico es 2-([metoxicarbonil]amino)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de 4-nitrobenílico, su fórmula molecular es  $C_{17}H_{14}N_4O_6$ , tiene un peso molecular de 370.32 g/mol. El compuesto es soluble en dimetilsulfóxido, es ligeramente soluble en metanol y acetonitrilo, y es prácticamente insoluble en agua. El FHL1-18 tiene dos valores de  $pK_a$ :\* 4.48 y 10.42, su coeficiente de partición\* es de 3.0. Su longitud de onda de máxima absorción es de 226 nm.<sup>26</sup>

### 2.5.2 Método analítico para cuantificar FHL-18 en plasma

Por los resultados obtenidos en la actividad cisticida de FHL-18 en 2010 se desarrolló y validó un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para cuantificarlo en plasma de rata.<sup>26</sup> En el método desarrollado se obtuvo un recobro del  $54\% \pm 12\%$  usando como mezcla de extracción hexano: diclorometano: isopropanol en una proporción 100:50:5 v/v/v. El proceso de extracción desarrollado se realizó a temperatura ambiente.

Las condiciones cromatográficas para el método fueron las siguientes; fase móvil metanol: solución amortiguadora de fosfatos pH 4.0 (25mM), 60:40 v/v, con una velocidad de flujo de 0.9 mL/min y la detección a una longitud de onda de 226 nm. Se empleó la columna X-Terra RP-18, 250x 4.6 mm, 5 $\mu$  (Waters). Con estas condiciones el

\* Propiedades que se calcularon utilizando el programa ACDlabs v9



tiempo de retención del FHL18 es de 13 min, del estándar interno (diazepam) es de 14.5 min, teniendo una resolución de 1.68.

### 2.6 Validación de métodos bioanalíticos

Para la evaluación cuantitativa de fármacos y/o sus metabolitos en estudios preclínicos y/o biofarmacéuticos, se requiere contar con métodos analíticos sensibles y selectivos. La validación incluye todos los procedimientos que demuestren que un método particular, usado para la cuantificación de analitos en una matriz biológica, tales como sangre, plasma, suero, u orina, es confiable y reproducible para su aplicación.<sup>27</sup>

Para la cuantificación de analitos, los métodos cromatográficos como: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) o Cromatografía de Gases, han sido ampliamente utilizados.<sup>28</sup> La validación es un proceso que demuestra que el método cumple con el propósito para el que fue diseñado con éxito y cumplirá o excederá los criterios mínimos (linealidad, precisión, selectividad, sensibilidad, estabilidad, etc.) recomendados por la normativa vigente.<sup>28, 29</sup>

En México la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998<sup>29</sup> es la norma que establece los parámetros y criterios de aceptación para la validación de métodos bioanalíticos, también pueden consultarse guías internacionales tales como la Guía para la industria en validación de métodos bioanalíticos de la Food and Drug Administration (FDA, por sus siglas en inglés). En la tabla 2 se muestran los parámetros y definiciones que establece la NOM-177 para la validación de métodos bioanalíticos mientras que la tabla 3 muestra la comparación de los criterios establecidos por la NOM-177 y la FDA.

Cuando se hacen modificaciones a métodos bioanalíticos previamente validados, se debe realizar una validación parcial que puede abarcar desde una determinación de precisión y exactitud hasta una validación casi total. Los cambios de métodos bioanalíticos que entran en esta categoría, pero que no están limitados, son por ejemplo:<sup>27</sup>

- Transferencia de métodos bioanalíticos entre laboratorios o analistas.
- Cambios en la metodología analítica (ej. cambio en el sistema de detección).



## **2. GENERALIDADES**

---

- Cambio de la matriz dentro de la misma especie (ej. cambio de plasma humano a orina humana).
- Cambios en los procedimientos para procesar las muestras
- Cambio de especie para la misma matriz (ej. cambio de plasma de rata a plasma de ratón).
- Cambio relevante del rango de concentración.



## 2. GENERALIDADES

Tabla 2. Parámetros y definiciones establecidos por la NOM-177-SSA1-1998 para la validación de métodos bioanalíticos.

<b>Parámetro</b>	<b>Definición</b>
<b>Rango</b>	Al intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.
<b>Recuperación absoluta</b>	A la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.
<b>Linealidad</b>	A la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra.
<b>Precisión</b>	Al grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como: <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Repetibilidad: a la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones</li><li>▪ Reproducibilidad intralaboratorio, a la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas</li></ul>
<b>Exactitud</b>	A la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia
<b>Estabilidad</b>	A la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis
<b>Límite de cuantificación</b>	A la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método
<b>Límite de detección</b>	A la mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas
<b>Selectividad</b>	A la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra



## 2. GENERALIDADES

Tabla 3. Comparación de parámetros para la validación de métodos bioanalíticos.

Parámetro	NOM-177	GUÍA FDA 2001
<b>Rango</b>	Se establecer el intervalo en función de las concentraciones esperadas del compuesto por analizar.	Las concentraciones deben ser elegidas en base al rango de concentraciones esperadas en el estudio en particular.
<b>Recuperación absoluta</b>	Analizar al menos por triplicado un mínimo de tres concentraciones (baja, media y alta) dentro del rango. Comparar estos resultados con las respuestas de soluciones del mismo compuesto en las mismas concentraciones. El por ciento de recobro no es necesariamente del 100%, pero debe de ser reproducible en cada nivel de concentración.	Compara muestras extraídas tres concentraciones (baja, media y alta) dentro del rango con muestras sin extraer que representan el 100% de recuperación. La recuperación del analito no es necesario que sea del 100%, pero debe de ser consistente, exacta reproducible.
<b>Linealidad</b>	Mínimo cinco puntos, excepto el cero. Se debe de definir un modelo continuo reproducible, con un coeficiente de correlación $\geq 0.99$ .	Debe de consistir de 6-8 concentraciones que cubran el rango esperado, incluyendo el límite de cuantificación
<b>Exactitud</b>	El valor promedio de los datos de repetibilidad y reproducibilidad en cada nivel de concentración debe de estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal.	Mínimo 3 concentraciones dentro del rango, 5 determinaciones por concentración. El valor de la media en cada nivel de concentración debe de estar dentro del 15% del valor nominal, excepto para el límite de cuantificación que no debe de desviarse por más del 20%.



Tabla 3. Continuación

Parámetro	NOM-177	GUÍA FDA 2001
<b>Límite de cuantificación</b>	<p>Analizar por quintuplicado la concentración más baja del rango.</p> <p>Valor promedio cae dentro del <math>\pm 20\%</math> del valor nominal.</p> <p>El %C.V. <math>\leq 20\%</math>.</p>	<p>La respuesta del analito debe de ser al menos 5 veces la respuesta comparada con la respuesta del blanco.</p> <p>La respuesta del analito debe de ser reproducible con una precisión del 20% y una exactitud del 80-120%.</p>
<b>Precisión</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Repetibilidad: En un mismo día por quintuplicado, analizar un mínimo de tres concentraciones, diferentes a las de la curva de calibración, pero dentro del rango.</li></ul> <p>El por ciento coeficiente de variación (%C.V.) no debe ser mayor al 15%.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Reproducibilidad intralaboratorio: Analizar por duplicado durante tres días, un mínimo de tres concentraciones diferentes a las de la curva de calibración, pero dentro del rango.</li></ul> <p>El %C.V. <math>\leq 15\%</math></p>	<p>Mínimo 3 concentraciones dentro del rango, 5 determinaciones por concentración.</p> <p>En cada nivel de concentración el %C.V. <math>\leq 15\%</math> de desviación, excepto para el límite de cuantificación que no debe de exceder el 20% del %C.V.</p>
<b>Selectividad</b>	<p>Analizar muestras blanco de la matriz biológica proveniente de por lo menos seis voluntarios.</p> <p>No deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar.</p>	<p>Analizar muestras blanco de la matriz biológica proveniente de por lo menos seis voluntarios, debe de ser asegurada en el límite de cuantificación.</p> <p>No deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar.</p>



Tabla 3. Continuación

Parámetro	NOM-177	GUÍA FDA 2001
<b>Estabilidad</b>	<p>En muestras por duplicado, tres niveles de concentración dentro del rango.</p> <p>Para que los compuestos se consideren estables deben de cumplir con los criterios de exactitud y repetibilidad</p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Condiciones de almacenamiento: por un periodo por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis.</li><li>▪ Ciclos de congelación-descongelación: Se deben evaluar al menos dos ciclos de congelación-descongelación antes de analizar las muestras.</li><li>▪ Otros</li></ul>	<p>En muestras por triplicado, dos niveles de concentración (alta y baja) dentro del rango.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Corto plazo: Descongelar las muestras a temperatura ambiente, mantenerlas así de 4 a 24 h y analizarlas.</li><li>▪ Condiciones de almacenamiento a largo plazo: debe de exceder el tiempo entre la obtención de la primer muestra y el análisis de la última muestra.</li><li>▪ Ciclos de congelación-descongelación: Se deben evaluar al menos tres ciclos.</li><li>▪ Muestras procesadas.</li><li>▪ De la solución stock: evaluar la estabilidad al menos por 6 h, si es congelada o almacenada por un periodo importante.</li><li>▪ Otros</li></ul>
<b>Límite de detección</b>	<p>Determinar la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica puede distinguirse de los niveles de ruido.</p>	<p>No requerido</p>



### 3.1 Objetivo general:

- Evaluar la farmacocinética de FHL-18 utilizando un modelo animal de rata.

### 3.2 Objetivos específicos:

- Validar el método analítico para cuantificar FHL-18 en plasma de rata a 4 °C de acuerdo con los criterios que establece la NOM 177-SSA-1998.



### 4.1 Material

Columna Eclipse XDB C18, 250mm x4.6 mm, 5  $\mu$ m (Agilent, USA)

Microviales de 200  $\mu$ L (Agilent Technologies, USA)

Septas de microviales (Agilent Technologies, USA)

Matraces volumétricos de 1, 2, 5, 10 y 1000 mL

Nave de pesado

Espátula

Pipetas automáticas Eppendorf

Sistemas de filtración Millipore

Membranas de filtración Nylon 0.45 $\mu$  tipo HVLP

Tubos de ensaye 10 ml

Vasos de precipitados 50, 100, 1000 mL

Jeringas estériles de 1, 5, y 10 mL (Becton-Dikinson, México)

Sonda esofágica para rata, curva, de punta bola, calibre 16 de acero inoxidable

Catéter i.v., 0.9x25 mm, calibre 22G (B. Braun Melsungen, Alemania)

### 4.2 Reactivos

FHL-18 (sintetizado por la Q.F.B. Silvia P. Melchor Doncel de la Torre y gentilmente donado por el Dr. Francisco Hernández Luis)

Diazepam (Sigma-Aldrich, USA)

Fosfato monobásico de potasio, Grado Reactivo. GR (J.T. Baker, USA)

Dimetil sulfóxido, GR (Sigma-Aldrich, USA)

Metanol grado HPLC (J.T. Baker, USA)

Agua desionizada

Cloruro de metileno, GR (Fermont, México)

Hexano, GR (Tecsiquim, México)

Alcohol isopropílico, GR (Malinckrodt)

Cloruro de Benzalconio, GR (JT Baker, USA)

Etanol, GR (JT Baker, USA)

Twenn 80 (Hycel, México)



Solución salina al 0.9 % estéril (Pisa, México)  
Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (Sigma Aldrich, USA)  
 $\beta$ -ciclodextrina (Sigma Aldrich, USA)  
Propilenglicol (Sigma Aldrich, USA)  
Cremofor EL (Fluka, Alemania)  
Nitrógeno comprimido (Praxair, México)  
Heparina, solución inyectable de 5000 UI/mL (Rimbipar, México)  
Ketamina, solución inyectable de 100 mg/mL (Pisa, México)  
Xilacina, solución inyectable de 20 mg/mL (Pisa, México)  
Pentobarbital sódico, solución inyectable de 65 mg/mL (Holland, México)

### 4.3 Equipos

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent Modelo 1100 con detector de longitud de onda variable UV-Vis, con microcelda de 5  $\mu$ L, 6 mm, 120 bar (Agilent Technologies Inc, CA, USA)  
Balanza analítica Santorius i-1800  
Balanza granataria Ohaus Galaxy 4000D  
Equipo de Ultrasonido Branson PC-620R-1  
Potenciómetro Beckman  $\Phi$ 41 pH meter  
Centrífuga Beckman refrigerada TJ-6 (Beckman, USA)  
Vórtex Thermolyne tipo 37600 Mixer  
Vortex vertical multi-pulso (Glas Col, USA)  
Ultracongelador REVCO a  $-70^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  (Kendro Laboratory Products, USA)

### 4.4 Material Biológico

Plasma de rata, utilizado para la validación del método y que fue obtenido de ratas Wistar sanas sin tratamiento previo.  
Ratas Wistar de  $300 \pm 20$  g



### 4.5 Preparación de soluciones estándar

#### 4.5.1 Solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 6. 0

Se pesaron 2.74 g de fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), se disolvió con aproximadamente 500 mL de agua desionizada y se llevó al aforo en un matraz volumétrico de 1 L. El pH se ajustó con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1 M.

#### 4.5.2 Solución estándar de FHL-18 (50 $\mu\text{g/mL}$ )

Se pesaron con exactitud 5 mg de FHL-18 que se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 5 mL, se disolvió aproximadamente con 4 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) y se llevó al aforo con el mismo disolvente, esta solución tienen una concentración de 1 mg/mL. De la solución anterior se tomó una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  que se transfirió a un matraz volumétrico de 1 mL y se llevó al aforo con metanol, esta solución tienen una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4.5.3 Solución estándar de diazepam (estándar interno, 3 $\mu\text{g/mL}$ )

Se pesó con exactitud 1 mg de diazepam (DZM) y se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvió aproximadamente con 5 mL de acetonitrilo y se llevo al aforo con el mismo disolvente, esta solución tienen una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$ . De la solución anterior se tomó una alícuota de 60  $\mu\text{L}$  que se transfirió a un matraz volumétrico de 2 mL y se llevó al aforo con metanol, esta solución tienen una concentración de 3  $\mu\text{g/mL}$ .

### 4.6 Modificaciones al método analítico

El método analítico reportado para la cuantificación de FHL-18 utilizaba una columna XTerra MS C18, pero debido a su deterioro se cambió por la columna Eclipse XDB C18, y como parte de la optimización del método se modificaron los siguientes parámetros:

- Proporción de fase móvil.
- Proporción de la mezcla de extracción hexano, diclorometano e isopropanol.
- Disolvente para reconstituir las muestras plasmáticas.



### 4.7 Preparación de la curva de calibración de FHL-18 en metanol para la validación del sistema

La curva fue preparada a partir de la solución estándar de 50  $\mu\text{g/mL}$  de FHL-18. El procedimiento mediante el cual se preparó se describe en la figura 10. Antes de aforar a cada solución se adicionaron 60  $\mu\text{L}$  de la solución de diazepam de concentración 100  $\mu\text{g/mL}$  y se aforó con metanol, la concentración final del estándar interno es de 3  $\mu\text{g/mL}$ .

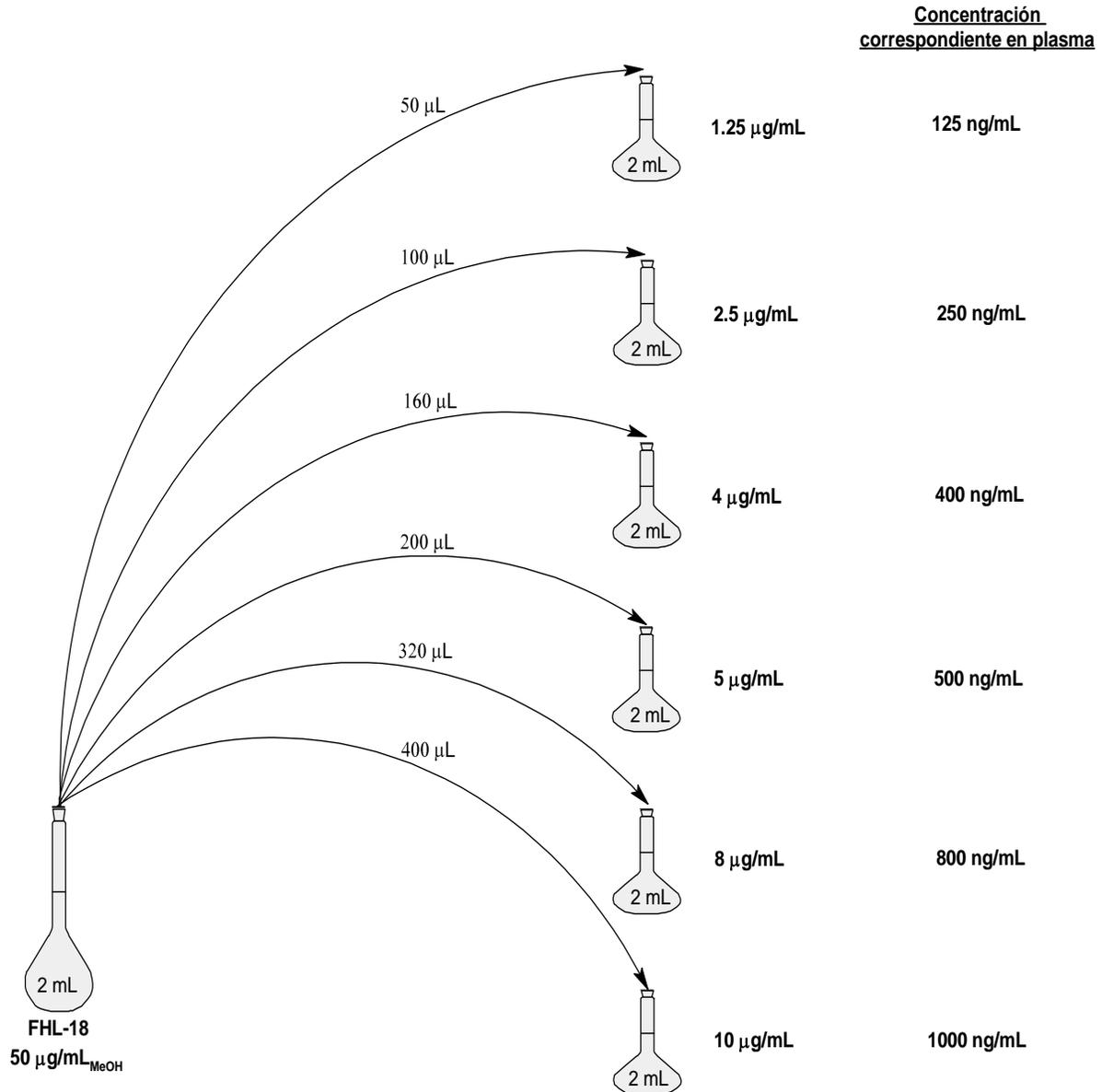


Figura 10. Preparación de la curva patrón de FHL-18 en metanol.



### 4.7.1 Preparación de los puntos control en metanol para evaluar el porcentaje de recobro de FHL18

Los puntos control fueron preparados a partir de la solución estándar de 50  $\mu\text{g/mL}$  de FHL-18. El procedimiento mediante el cual se prepararon se describe en la figura 11. Antes de aforar a cada solución se le adicionaron 60  $\mu\text{L}$  de la solución de diazepam de concentración 100  $\mu\text{g/mL}$  y se aforó con metanol, la concentración final del estándar interno es de 3  $\mu\text{g/mL}$ .

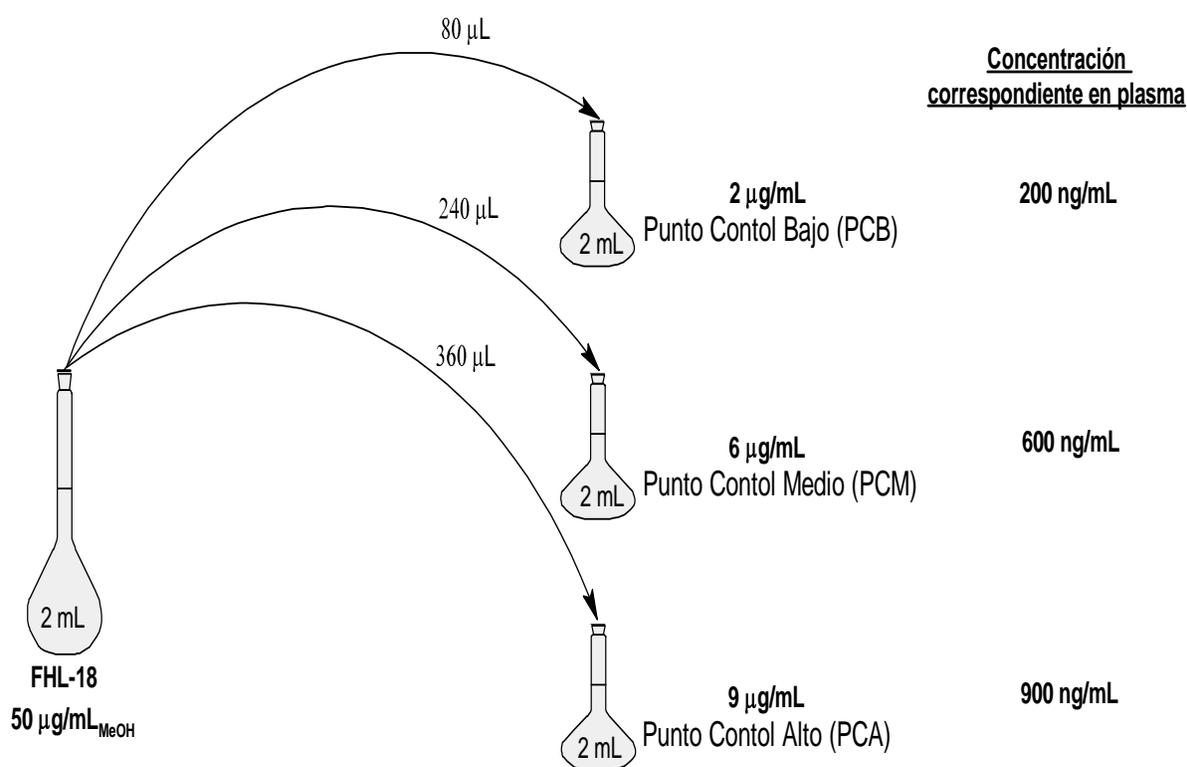


Figura 11. Preparación de los puntos control de FHL-18 en metanol.

### 4.8 Preparación de la curva de calibración de FHL-18 en plasma

La curva fue preparada a partir de la solución estándar de 50  $\mu\text{g/mL}$  de FHL-18. El procedimiento mediante el cual se muestra en el figura 12.

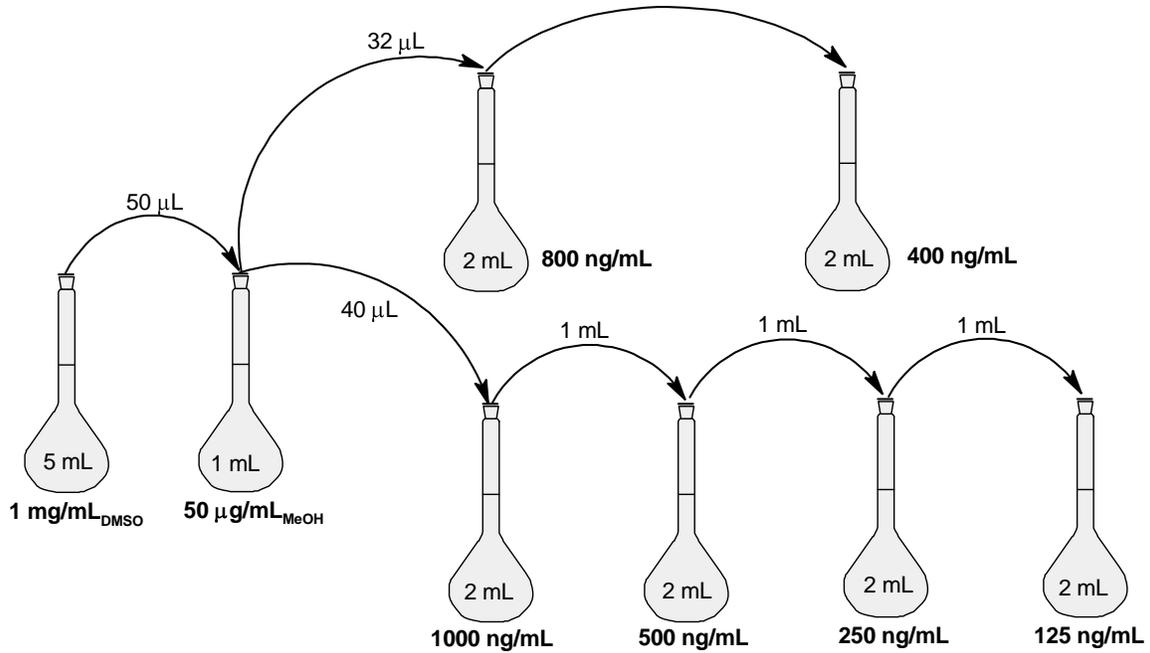


Figura 12. Preparación de la curva patrón de FHL-18 en plasma.

#### 4.8.1 Preparación de los puntos control en plasma

Los puntos control fueron preparados a partir de la solución estándar de 50 µg/mL de FHL-18. El procedimiento mediante el cual se prepararon se muestra en la siguiente figura.

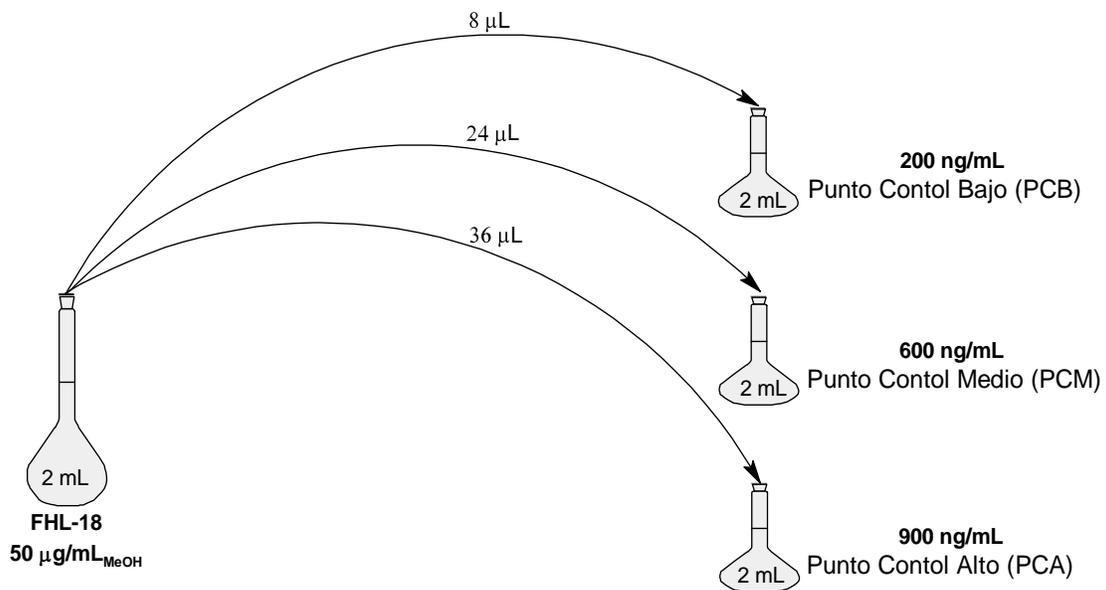


Figura 13. Preparación de los puntos control de FHL-18 en plasma.



### 4.9 Proceso de extracción.

En la siguiente figura se muestra el proceso de extracción de FHL-18 en plasma.

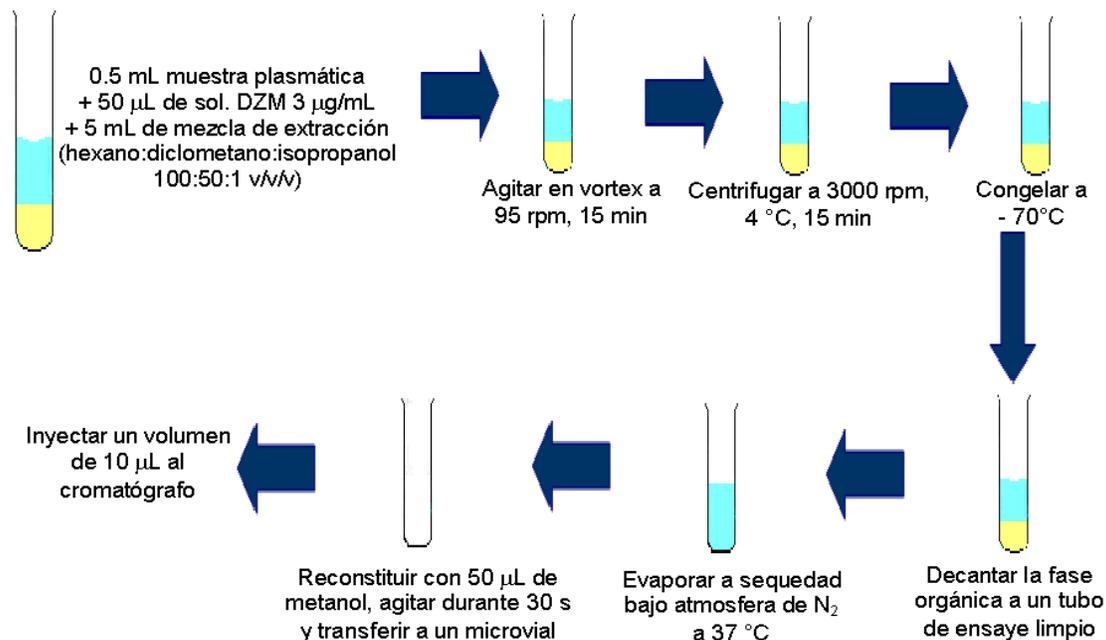


Figura 14. Proceso de extracción de FHL-18 del plasma.

NOTA: El proceso de extracción se realizó a una temperatura de 4 °C, lo cual se logra manteniendo las muestras sumergidas en hielo.

### 4.10 Condiciones cromatográficas

Columna: Eclipse XDB C18, 250 mm x4.6 mm, 5 µm.

Fase móvil: metanol: solución amortiguadora de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, pH 6. 0 (70:30 v/v)

Velocidad de flujo: 0.5 mL/min

Longitud de onda: 226 nm

Volumen de inyección: 10 µL

Tiempo de corrida: 20 min.

### 4.11 Validación del sistema

Los parámetros considerados para la validación del sistema fueron los siguientes: linealidad y precisión.



**4.11.1 Linealidad del sistema**

Se preparó por duplicado la curva de calibración de FHL-18 en metanol a las concentraciones correspondientes al rango de trabajo (125-1000 ng/mL), con la adición del estándar interno. Para cada una de las curvas se graficó la relación de alturas (altura FHL-18/altura E.I.) en función de la concentración y por ajuste de mínimos cuadrados se determinó la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r).

Se calculó el por ciento del error relativo debido a la regresión (%ERDR) empleando la siguiente fórmula:

$$\% ERDR = \left( \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \right) * 100 \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

Donde:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - (\text{pendiente} * \sum xy) - (\text{ordenada} * \sum y)}{N - 2}} \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

S<sub>y/x</sub>= desviación estándar de la regresión

$\bar{y}$  = promedio de la respuesta (relación de alturas)

x = concentración

y= respuesta

N-2= grados de libertad

*Criterios de aceptación:*

1. El sistema es lineal si el coeficiente de correlación (r) de cada una de las curvas es igual o mayor que el 0.99 para la relación de alturas en función de la concentración.
2. Se consideró lineal el sistema si el error relativo debido a la regresión no es mayor que el 2%.

**4.11.2 Precisión del sistema**

Se tomaron los datos obtenidos en linealidad y se calculó para cada nivel de concentración el factor de respuesta (relación de alturas/ concentración). Finalmente del factor de respuesta se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación en por ciento (% C.V.).



*Criterios de aceptación:* el % C.V. del factor de respuesta no debe ser mayor al 2%.

### 4.12 Adecuabilidad del sistema

Se evaluó la adecuabilidad del sistema cromatográfico y se llevó el monitoreo del equipo previo a cada corrida analítica realizando seis inyecciones consecutivas de una solución en metanol de FHL-18 (450 ng/mL) y E.I (3 µg/mL).

*Criterio de aceptación:* el sistema se consideró adecuado si el % C.V. de la repetibilidad de la relación de alturas (altura de FHL-18/ altura del E.I.) y el tiempo de retención no es mayor al 2%.

### 4.13 Validación del método analítico a 4°C para la cuantificación de FHL-18 en plasma

Los parámetros considerados para la validación fueron los siguientes: adecuabilidad del sistema, selectividad, linealidad, límite de cuantificación, límite de detección, precisión, exactitud, recuperación absoluta, estabilidad en hielo, estabilidad en el inyector, estabilidad en ciclos congelación – descongelación, estabilidad a largo plazo.

Para cada una de las corridas analíticas se evaluó la adecuabilidad del sistema y se preparó una curva de calibración en plasma de la cual se calculó su pendiente (m), su ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r).

#### 4.13.2 Selectividad

Se demostró la selectividad del método analizando diferentes muestras, las cuales fueron:

- Muestras en solución con FHL-18 y el E.I. para conocer sus tiempos de retención.
- Muestra blanco de plasma obtenida de la mezcla de al menos seis ratas sin adición de fármaco ni del estándar interno.
- Muestra blanco de plasma hemolizado sin adición de fármaco ni del estándar interno.
- Muestra de pool de plasma adicionada con el estándar interno.
- Muestra de pool de plasma adicionada con FHL-18 (125 ng/mL, concentración más baja de la curva) y el estándar interno (3 µg/mL).



*Criterio de aceptación:* No deben presentarse interferencias en el tiempo de retención del analito de interés, ni en el del estándar interno. En caso de que se presente alguna señal ésta debe ser menor que el 20% de la respuesta de la concentración más baja de la curva de calibración.

### 4.13.3 Linealidad

Se prepararon por triplicado curvas de calibración de FHL-18 en el rango de concentraciones de 125 a 1000 ng/mL, a las muestras se les aplicó el proceso de extracción que se muestra en la figura 14. Para cada una de las tres curvas y de los datos globales se graficó la relación de alturas en función de la concentración de FHL-18, y por ajuste de mínimos cuadrados se determinó la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r) de cada una de las curvas. Calcular el intervalo de confianza para la pendiente y la ordenada al origen, y el por ciento de desviación para cada concentración.

Para cada nivel de concentración se calculó la concentración recuperada, considerando la respuesta obtenida (relación de alturas) como dato desconocido e introduciéndolo en la ecuación derivada del análisis de regresión, a partir de estos resultados se calculó el por ciento de desviación absoluta para cada nivel de concentración.

*Criterios de aceptación:*

1. El método es lineal si el coeficiente de correlación (r) de cada una de las curvas y de todos los datos (global) es igual o mayor que el 0.99 para la relación respuesta en función de la concentración.
2. Para los datos de concentración adicionada contra recuperada, el experimento se considera válido si los valores de por ciento de desviación absoluta obtenidos en cada nivel de concentración son menores o iguales al 15%, excepto para el nivel de concentración más bajo, ya que el valor para este punto puede ser menor o igual al 20%.



### 4.13.4 Límite de cuantificación

Para evaluar este parámetro se prepararon por quintuplicado las muestras en plasma de la concentración más baja del rango de trabajo, 125 ng/mL, las muestras se procesaron e inyectaron al cromatógrafo.

Se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de la relación de alturas de las cinco determinaciones. Finalmente se determinó la concentración recuperada, interpolando en la curva patrón preparada y procesada el mismo día, y el promedio del por ciento de desviación absoluta de las cinco muestras.

*Criterio de aceptación:* se considera que el punto tiene validez como límite de cuantificación, si el coeficiente de variación de las 5 determinaciones no debe ser mayor al 20% y el por ciento de la desviación absoluta del promedio de las 5 determinaciones no debe ser mayor al 20%.

### 4.13.5 Límite de detección

Este parámetro se calculó utilizando los datos obtenidos de las tres curvas de linealidad, pendiente y ordenada al origen, mediante la siguiente ecuación 3:

$$\text{Límite de detección: } \frac{3.3 \times \text{desviación estándar de la ordenada al origen}}{\text{Promedio de la pendiente de la curva de calibración}} \dots\dots\dots \text{Ecuación 3}$$

### 4.13.6 Recobro Absoluto

El recobro de las muestras plasmáticas con FHL-18 y el E.I. se determinó procesando por triplicado cada uno de los puntos control en plasma (figura 13), y comparándolos con las soluciones en metanol inyectadas y preparadas por triplicado (figura 11). Las soluciones contienen a nuestro analito y al E.I. en las concentraciones esperadas después de aplicar a las muestras plasmáticas el proceso de extracción.

Para cada una de las muestras, las plasmáticas y las de soluciones, se calculó la relación de alturas, posteriormente para cada nivel de concentración se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de la respuesta. Finalmente se determinó el por ciento de recobro de cada nivel de concentración,



comparando el promedio de la respuesta obtenida para las muestras en plasma con la respuesta obtenida para la muestras en metanol.

El por ciento de recobro se calculo empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{Recobro absoluto} : \left( \frac{\text{Valor promedio de respuesta a cada concentración en plasma}}{\text{Valor promedio de respuesta a cada concentración en solución}} \right) * 100 \dots\dots\dots \text{Ecuación 4}$$

*Criterio de aceptación:*

1. El porcentaje de recobro absoluto no necesariamente será del 100%, pero el recobro debe ser reproducible en cada nivel de concentración
2. El %C.V. en el recobro entre los tres niveles de concentración no debe ser mayor al 15 %.

### 4.13.7 Precisión.

Este parámetro se divide en repetibilidad y reproducibilidad.

#### 4.13.7.1 Repetibilidad

Se evaluó mediante el análisis de los puntos control por quintuplicado, preparados en un mismo día como se describe en el figura 13. Las concentraciones fueron 200 (concentración baja), 600 (concentración media) y 900 ng/mL (concentración alta).

De cada una de las determinaciones se calculó la relación de alturas, posteriormente se calculó la concentración recuperada interpolando los datos en la curva patrón correspondiente. Se determinó el promedio, la desviación estándar y %C.V. para cada nivel de concentración.

*Criterio de aceptación:* el método es repetible si el coeficiente de variación para cada uno de los niveles de concentraciones no es mayor que el 15%.



### 4.13.7.2 Reproducibilidad

Se analizaron por triplicado durante tres días los puntos control (200, 600 y 900 ng/mL). De cada una de las determinaciones se calculó la relación de alturas, posteriormente se calculó la concentración recuperada interpolando los datos en la curva patrón correspondiente. Finalmente se calculó la concentración recuperada promedio, la desviación estándar y %C.V. para cada nivel de concentración utilizando los datos de los tres días de análisis.

*Criterio de aceptación:* el método es reproducible si el coeficiente de variación para cada uno de los niveles de concentraciones no es mayor que el 15%.

### 4.13.8 Exactitud

Para determinar la exactitud se utilizaron los datos de la precisión del método (repetibilidad y reproducibilidad), de cada una de las concentraciones se calculó la concentración recuperada y finalmente el por ciento de desviación absoluta (%Des. Abs.) mediante la siguiente fórmula (ecuación 5):

$$\% \text{Desviación absoluta} : \left( \frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración nominal}} \right) * 100$$

Dónde:

Concentración nominal= concentración teórica

Concentración recuperada= concentración obtenida de la interpolación de la relación de alturas en la curva de calibración preparada en el mismo día.

*Criterio de aceptación:* el método es exacto si el por ciento de desviación absoluta para cada uno de los niveles de concentraciones es menor o igual al 15%.

### 4.13.9 Estudios de estabilidad

#### 4.13.9.1 Estabilidad en el inyector

Se procesaron por duplicado dos series de puntos control (bajo, medio y alto) junto con una curva de calibración, y se inyectaron. Estas muestras se consideraron como tiempo cero ( $t_0$ ). Los puntos control y la curva de calibración se mantuvieron en el



automuestreador durante un periodo de 8 h ( $t_{8h}$ ), transcurrido el tiempo se inyectó nuevamente cada una de las muestras.

Se compararon los promedios de las concentraciones recuperadas de las muestras procesadas y analizadas al inicio con las muestras mantenidas en el automuestreador y se calculó la desviación absoluta.

*Criterio de aceptación:*

1. Los resultados obtenidos para los puntos control deben cumplir con el criterio de precisión (el %C.V. no es mayor que el 15% para cada nivel de concentración).
2. El %Des. Abs. entre las muestras procesadas e inyectadas al inicio y las mantenidas en el muestreador no es mayor al 15%. El cálculo se realizó empleando la siguiente ecuación:

$$\%Des. Abs. : \left( \frac{Concentración_{Día} - Concentración_{Almacenada}}{Concentración_{Día}} \right) * 100\% \dots \dots \dots \text{Ecuación 6}$$

Donde:

- $Concentración_{Día}$  = corresponde a la concentración de cada punto control preparado el día del análisis o tiempo cero, según corresponda.
- $Concentración_{Almacenada}$  = corresponde a la concentración de cada punto control bajo las condiciones de almacenamiento (en el inyector durante 8h, muestras procesadas sin reconstituir en refrigeración, ciclos de congelación-descongelación, congeladas por 1 mes a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente).

### **4.13.9.2 Estabilidad de las muestras procesadas sin reconstituir en refrigeración**

Se prepararon por triplicado los puntos control y se procesaron hasta su evaporación, se almacenaron en refrigeración por 24 h. El día del análisis se preparó una curva de calibración y por duplicado otra serie de puntos control y se les aplicó el proceso de extracción, se descongelaron las muestras procesadas y se reconstituyeron. Finalmente se inyectaron al equipo de cromatografía todas las muestras.



Se compararon los valores promedio de la concentración recuperada de los puntos control (preparados el día del análisis), con los valores promedio de concentración de los puntos control procesados y refrigeradas

*Criterio de aceptación:*

1. Los resultados obtenidos para los puntos control deben cumplir con el criterio de precisión (el %C.V. no es mayor que el 15% para cada nivel de concentración).
2. El %Des. Abs. entre las muestras preparadas y procesadas el día del análisis y las muestras procesadas y refrigeradas no es mayor al 15%. El cálculo se realizó empleando la ecuación 6.

### 4.13.9.3 Ciclos congelación–descongelación

Se prepararon por triplicado muestras de los puntos control, se congelaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, transcurrido el tiempo, se descongelaron y se mantuvieron en hielo. Una vez descongeladas se re congelaron durante 24 horas bajo las mismas condiciones. El ciclo se repitió 2 veces más y se analizó el tercer ciclo junto con una curva de calibración y puntos control preparados el día del análisis.

Se calculó la concentración recuperada, interpolando los valores en la curva de calibración, y se compararon los valores promedio de cada nivel de la concentración recuperada de los puntos control del ciclo congelación-descongelación, con los valores promedio de concentración recuperada de los puntos control preparados el día del análisis, para calcular el %Des. Abs. a cada nivel de concentración.

*Criterio de aceptación:*

1. Los resultados obtenidos para los puntos control deben cumplir con el criterio de precisión (el %C.V. no es mayor que el 15% para cada nivel de concentración).
2. El %Des. Abs. entre las muestras preparadas el día del análisis y las del ciclo congelación-descongelación no es mayor al 15%. El cálculo se realizó empleando la ecuación 6.



### 4.13.9.4 Estabilidad a largo plazo

Se prepararon por triplicado cada uno de los puntos control y se congelaron. Al término de un mes, se analizaron por triplicado los puntos control congelados, puntos control y una curva de calibración preparados el día del análisis.

Se obtuvo la concentración recuperada, interpolando los valores en la curva de calibración, y se compararon los valores promedio de cada nivel de la concentración recuperada de los puntos control almacenados en congelación, con los valores promedio de concentración recuperada de los puntos control preparados ese día. Finalmente se calculó el por ciento de desviación absoluta.

*Criterio de aceptación:*

3. Los resultados obtenidos para los puntos control deben cumplir con el criterio de precisión (el %C.V. no es mayor que el 15% para cada nivel de concentración).
4. El %Des. Abs. entre las muestras preparadas el día del análisis y las almacenadas en congelación no es mayor al 15%. El cálculo se realizó empleando la ecuación 6.

### 4.14 Pruebas de solubilidad de FHL-18 en diferentes vehículos para administración de fármacos

Se prepararon soluciones de FHL-18 en los siguientes vehículos, se dejaron reposar por al menos 12 h y se seleccionaron los que presentaron menor cantidad precipitada de FHL-18.

- Etanol: Twenn 80: solución salina (5: 5: 90 v/v/v)
- Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina: propilenglicol: solución salina (40: 2.5: 57.5 v/v/v)
- Propilenglicol: etanol: solución salina (30: 20: 50 v/v/v)
- Dimetilsulfóxido al 2.5 % en solución salina
- Propilenglicol: etanol: agua desionizada (40: 10: 50 v/v/v)
- Cremofor al 10 % en solución salina
- $\beta$ -ciclodextrina al 30 % en agua desionizada
- Dimetilsulfóxido: etanol (1: 1 v/v)



### 4.15 Estudios de farmacocinética de FHL-18

Para los estudios de farmacocinética se evaluaron las siguientes las formulaciones:

1. FHL-18/ cremofor al 2%. Concentración de FHL-18: 25 mg/mL
2. FHL-18/ etanol: propilenglicol: agua desionizada (10:40:50 v/v/v)  
Concentración de FHL-18: 4 mg/mL
3. FHL-18/ 5% etanol, 5% Tween 80 y 90% solución salina estéril.  
Concentración de FHL-18: 126 µg/mL

Todos los estudios fueron realizados en ratas Wistar macho de  $300 \pm 20$  g de peso con al menos 12 h de ayuno y de cada rata se tomaron dos muestras a diferentes tiempos. Los tiempos de muestreo fueron establecidos en base al estudio de cinética en plasma de rata a 38 °C que determino que el tiempo de ida media es de 33.5 min.<sup>26</sup>

Todas las muestras fueron colectadas en tubos heparinizados eppendorf de 1 mL y se centrifugaron a 10000 rpm por 4 min a 4° C, se separó el plasma y se almacenó a -70 °C hasta su análisis.

El día del análisis se preparó la curva patrón junto con puntos control y a las muestras obtenidas del estudio, a todas las muestras se les adicionó el estándar interno, y se procesaron usando el método analítico validado a 4 °C para la cuantificación de FHL-18.

#### 4.15.1 Estudio 1. Administración por vía oral

Para el estudio se preparó la dispersión sólida de FHL-18 en cremofor al 2% que fue homogenizada y administrada en una dosis de 40.3 mg/Kg por vía oral a las ratas Wistar usando una sonda esofágica. Después de la administración las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de los anestésicos xilacina (dosis: 10 mg/Kg) y ketamina (dosis: 50 mg/Kg) para la tomaron de las muestras sanguíneas por punción cardiaca. Las muestras sanguíneas fueron recolectadas durante una hora y media en los siguientes tiempos de muestreo: 15, 30, 45, 60 y 90 min.

#### 4.15.2 Estudio 2. Administración por vía oral

Se preparó la solución de FHL-18 en el vehículo que contienen etanol: propilenglicol: agua desionizada (10:40:50 v/v/v) y se administró en una dosis de 12 mg/Kg por vía



oral a las ratas Wistar. Previo a la administración las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de los anestésicos xilacina (dosis: 10 mg/Kg) y ketamina (dosis: 50 mg/Kg), una vez anestesiadas y por medio de una sonda que se colocó directamente al estómago se realizó la administración.

Después de la administración a las ratas se colocó una cánula en la vena lateral de la cola de donde se recolectaron las muestras sanguíneas en los siguientes tiempos de muestreo: 15, 30, 45, 60 y 90 min.

### **4.15.3 Administración de FHL-18 por vía intravenosa**

Se pesó y disolvió FHL-18 en el siguiente vehículo: 5% etanol, 5% Tween 80 y 90% solución salina estéril. Se administró a todas las ratas en la vena lateral una dosis de 200  $\mu$ g/Kg. Una vez administradas las ratas fueron anestesiadas con la mezcla de anestésicos (xilacina/ketamina) y se tomaron muestras sanguíneas por punción cardíaca, de cada rata se tomaron dos muestras sanguíneas a diferentes tiempos. Los tiempos de muestreo fueron los siguientes: 5, 10, 15, 30 y 45 min.



### 5.1 Método analítico para cuantificar FHL 18 en plasma

El método analítico reportado para la cuantificación de FHL-18 utilizaba una columna XTerra MS C18, pero debido a su deterioro, se cambió por la columna Eclipse XDB C18, por lo que fue necesario modificar las condiciones cromatográficas, ya que existen diferencias en polaridad. Mientras que la XTerra es de baja polaridad, la Eclipse es de polaridad moderada.<sup>30</sup> Por lo anterior, se probaron diferentes proporciones de fase móvil (metanol: solución amortiguadora de fosfatos, 10 mM, pH= 6) y velocidades de flujo. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4. En ella se puede observar que en las dos primeras condiciones cromatográficas no se logró separar el FHL-18 de los compuestos endógenos del plasma. Al utilizar una velocidad de flujo de 0.5 mL/min y con la proporción de fase móvil 70:30 v/v se lograron separar los analitos de los componentes del plasma. Además de que se obtuvieron picos bien definidos, con una simetría mayor a 0.9 y una buena resolución (mayor a 1.6), por lo tanto, se eligieron estas condiciones cromatográficas para implementar el método analítico.

Tabla 4. Condiciones cromatográficas para la separación de FHL-18 y el E.I. de los componentes endógenos del plasma

Velocidad de flujo [mL/min]	Proporción de fase móvil	Tiempo de retención [min]		Observación
		FHL-18	E.I.	
0.7	75: 25 v/v	6.5	12.6	FHL-18 y el E.I. no se separan de los componentes endógenos del plasma.
0.5	75: 25 v/v	9.3	10.9	FHL-18 no se separan de los componentes endógenos del plasma.
0.5	70: 30 v/v	12.5	14.4	FHL-18 y el E.I. se separan de los componentes endógenos del plasma. La resolución entre los analitos es mayor a 1.6.



### 5.2 Mezcla de extracción

Una vez que se establecieron las condiciones cromatográficas, se detectaron interferencias en los tiempos de retención del FHL-18 y del estándar interno. Esta interferencia representa el 25 % de la altura correspondiente a la concentración más baja de la curva de calibración (125 ng/mL). En relación a las interferencias en el tiempo de retención del diazepam, estas ocasionaban que el pico saliera coaleado.

Para eliminar los compuestos de similar polaridad al FHL-18 de las muestras plasmáticas, se procesaron las muestras evaluando las siguientes mezclas de extracción:

- Hexano: diclorometano: isopropanol (100:50:1 v/v/v)
- Hexano: diclorometano (2:1 v/v)

Los resultados mostraron que al emplear la mezcla de extracción hexano: diclorometano (2:1 v/v) había interferencias en los tiempos de retención de FHL-18 y E.I.

Con la mezcla de extracción hexano: diclorometano: isopropanol (100:50:1 v/v/v) no se observaron interferencias de los componentes endógenos del plasma, por lo que se eligió esta mezcla como disolvente de extracción.

### 5.3 Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas finales fueron las siguientes:

- Columna: Eclipse XDB C18, 250mmx4.6mm, 5  $\mu$ m.
- Fase móvil: metanol: solución amortiguadora de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM, pH 6.0 (70:30 v/v)
- Velocidad de flujo: 0.5 mL/min
- Longitud de onda: 226 nm
- Volumen de inyección: 10  $\mu$ L
- Tiempo de corrida: 20 min.

### 5.4 Validación del sistema

Las muestras plasmáticas fueron reconstituidas con metanol después del proceso de extracción debido a que es el disolvente de mayor proporción en la fase móvil



(metanol: solución amortiguadora de fosfatos, 70: 30 v/v) por lo cual se decidió evaluar si la respuesta era directamente proporcional usando el metanol como disolvente para reconstituir las muestras.

### 5.4.1 Linealidad del sistema

Los resultados de relación de alturas (altura FHL-18/altura E.I.) de las dos curvas para evaluar la linealidad del sistema se muestran en la tabla 5. Para cada curva de calibración se calculó su pendiente, ordenada al origen y su coeficiente de correlación.

Tabla 5. Linealidad del sistema

Concentración [ng/mL]	Relación de alturas (Altura FHL-18/Altura E.I.)			Desviación estándar
	Curva 1	Curva 2	Promedio (global)	
125	0.30	0.29	0.2974	0.0022
250	0.60	0.60	0.6000	0.0029
400	0.97	0.96	0.9640	0.0068
500	1.19	1.18	1.1888	0.0072
800	1.88	1.90	1.8942	0.0142
1000	2.43	2.39	2.4098	0.0287
Pendiente (m)	0.0024	0.0024	0.0024	
Ordenada al origen (b)	-0.0050	0.0001	-0.0025	
Coeficiente de correlación (r)	0.9996	0.9999	0.9999	

En la figura 18 se muestra el promedio de la relación de alturas (R.H.) de las dos curvas de calibración (datos global) en función de la concentración con su respectiva desviación estándar en cada nivel de concentración (n=2).

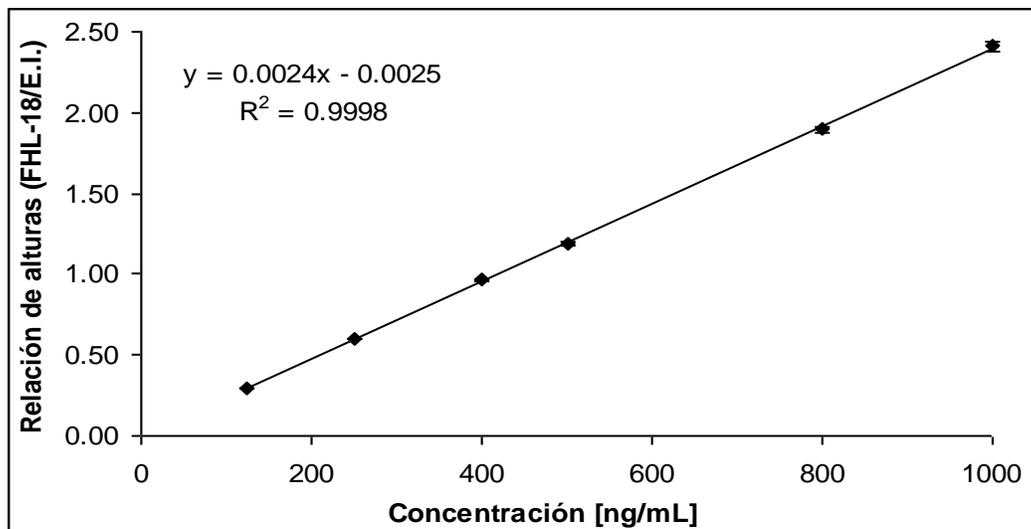


Figura 15. Linealidad del sistema para FHL-18 en metanol

A partir de estos datos se calculó el por ciento del error relativo debido a la regresión (%ERDR) : Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. % Error relativo debido a la regresión para el sistema (donde N= 12, N-2= 10)

Concentración [ng/mL] (x)	R.H. (y)	$y^2$	x·y
125	0.30	0.09	36.99
125	0.30	0.09	37.37
250	0.60	0.36	150.51
250	0.60	0.36	149.48
400	0.97	0.94	387.50
400	0.96	0.92	383.67
500	1.19	1.43	596.94
500	1.18	1.40	591.84
800	1.88	3.55	1507.37
800	1.90	3.63	1523.40
1000	2.43	5.91	2430.11
1000	2.39	5.71	2389.47
Suma ( $\Sigma$ )	14.71	24.37	10184.66
Promedio de la respuesta ( $\bar{y}$ )	1.23		



El cálculo de la desviación estándar de la regresión ( $S_{y/x}$ ) se llevó a cabo empleando la ecuación 2, como se muestra a continuación:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{24.37 - (0.0024 * 10184.66) - (0.0025 * 14.71)}{10}} = 0.016486$$

Finalmente con este dato y usando la ecuación 1 se calculó %ERDR:

$$\% \text{ ERDR} = \left( \frac{0.016486}{1.23} \right) * 100 = 1.345012$$

Los resultados muestran que el sistema es lineal ya que las curvas tienen un coeficiente de correlación mayor a 0.99 y el %ERDR del sistema es menor al 2%.

### 5.4.2 Precisión del sistema.

Con los datos de linealidad se evaluó también la precisión del sistema. Los resultados que se muestran en la tabla 7, indican que el sistema es preciso debido a que el coeficiente de variación en porcentaje (%C.V.) del factor de respuesta es menor a 2%.

Tabla 7. Precisión del sistema obtenida a partir de los datos de linealidad

Concentración [ng/mL]	Relación de alturas (R.H.)	Factor de respuesta
125	0.2959	0.00237
125	0.299	0.00239
250	0.602	0.00241
250	0.5979	0.00239
400	0.9688	0.00242
400	0.9592	0.00240
500	1.1939	0.00239
500	1.1837	0.00237
800	1.8842	0.00236
800	1.9043	0.00238
1000	2.4301	0.00243
1000	2.3895	0.00239
Promedio		0.00239
Desviación estándar (D.E.)		0.00002
%C.V.		0.92



## 5.5 Validación del método analítico

### 5.5.1 Selectividad

Previo a la determinación de la selectividad del método analítico se determinaron los tiempos de retención de FHL-18 y el diazepam en una solución en metanol bajo las nuevas condiciones cromatográficas. El  $t_r$  de FHL-18 fue de 12.5 min y para el E.I. de 14.4 min. La resolución entre ambos compuestos fue mayor de 1.6 y la simetría para ambos picos fue mayor a 0.9 (figura 16).

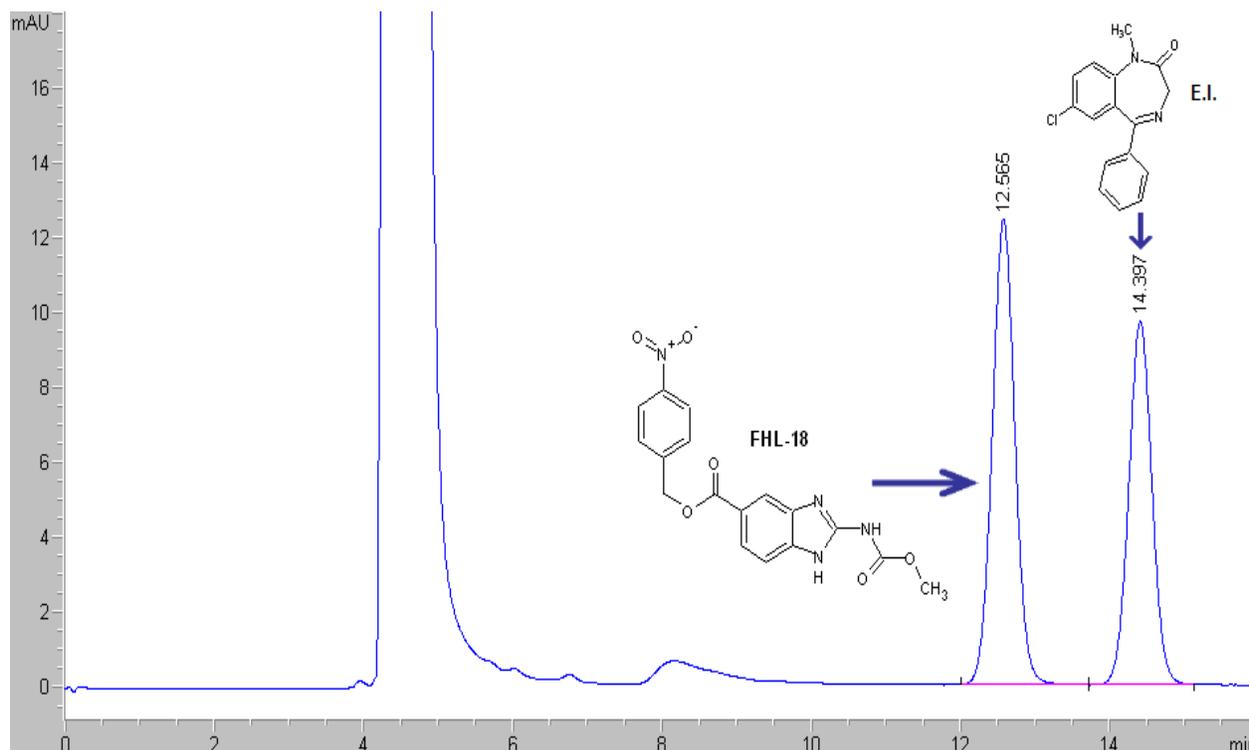


Figura 16. Solución de adecuabilidad en metanol de FHL-18 (450 ng/mL) y el E.I. (3  $\mu$ g/mL).

Una vez definidos los tiempos de retención de los analitos se evaluó la selectividad del método, empleando un pool de plasma de 6 ratas y plasma hemolizado (figura 17 y figura 18 respectivamente). En este caso la técnica se llevó a cabo a 4 °C. Los resultados muestran que el método es selectivo ya que no hay interferencia en los tiempos de retención de FHL-18 y el E.I. con los compuestos endógenos del plasma (figura 19 y figura 20, respectivamente).



## 5. RESULTADOS

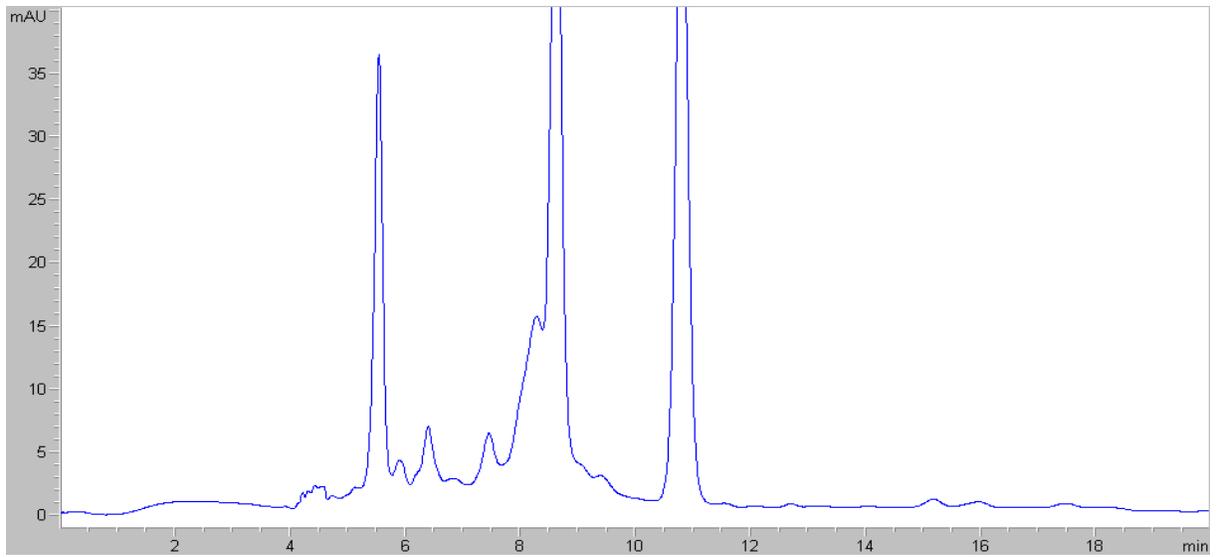


Figura 17. Cromatograma del blanco de pool de plasma de rata

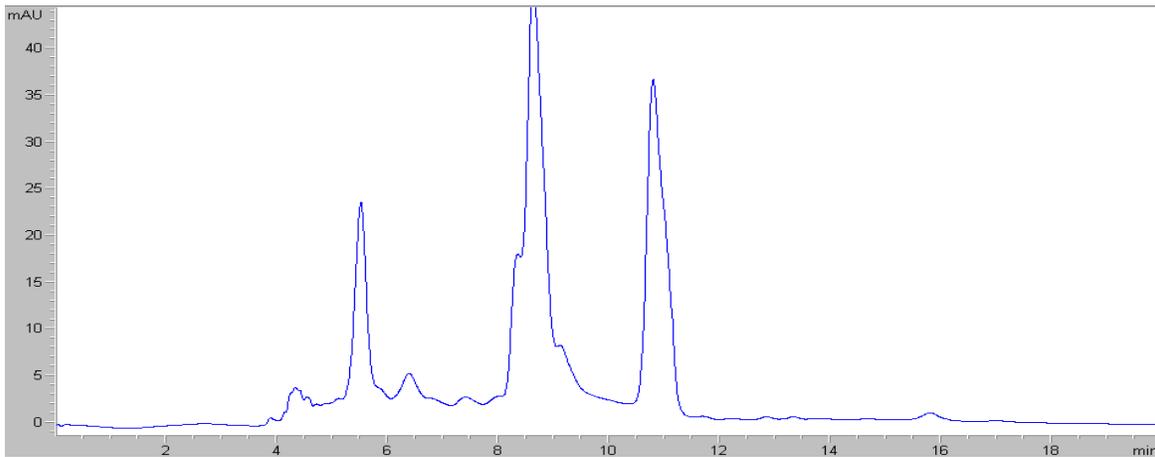


Figura 18. Cromatograma del blanco de plasma de rata hemolizado

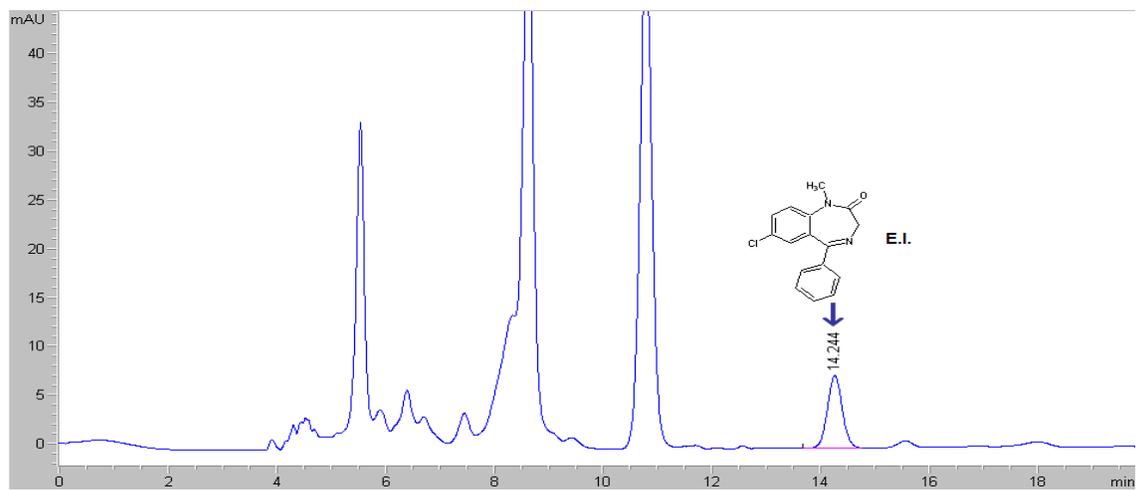


Figura 19. Cromatograma del E.I. en plasma de rata (3 µg/mL)

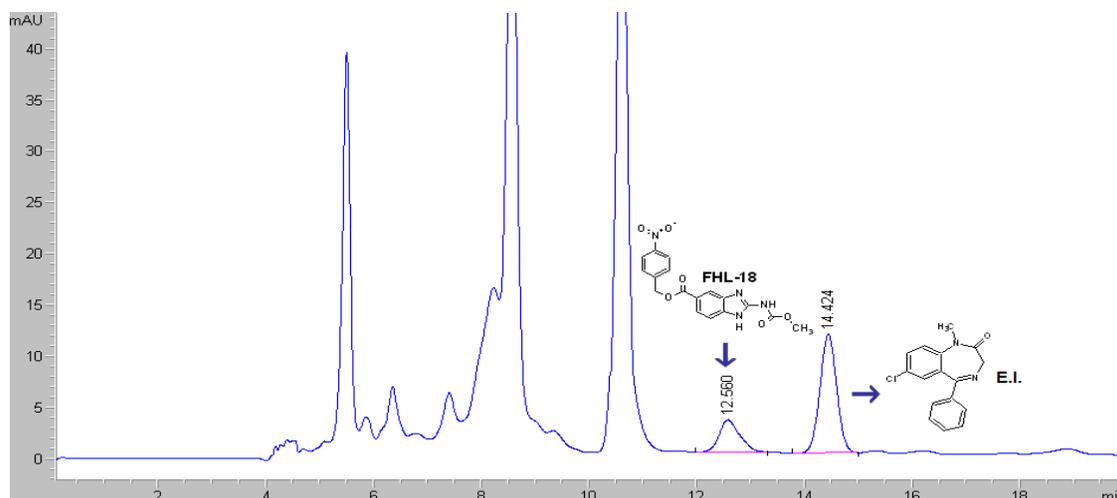


Figura 20. Cromatograma de FHL-18 (125 ng/mL) y el E.I. (3  $\mu$ g/mL) en plasma de rata

### 5.5.2 Linealidad del método

En la tabla 8, se presentan los resultados de relación de alturas (altura FHL-18/altura E.I.) vs concentración de las tres curvas preparadas para evaluar la linealidad del método analítico. Para determinar la exactitud de la curva, a cada nivel de concentración se calculó la concentración recuperada y el %Des. Abs.

En la figura 24 se muestra el promedio de la relación de alturas de las tres curvas de calibración en función de la concentración con su respectiva desviación estándar (n=3).

Tabla 8. Linealidad del método analítico

Concentración [ng/mL]	Relación de alturas (R.H.)			
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio (global)
125	0.25	0.25	0.27	0.2565
250	0.50	0.58	0.56	0.5494
400	0.85	0.82	0.87	0.8460
500	1.07	1.01	1.13	1.0716
800	1.76	1.75	1.77	1.7604
1000	2.31	2.22	2.27	2.2664
Pendiente (m)	0.0023	0.0022	0.0023	0.0023
Ordenada al origen (b)	-0.0770	-0.0359	-0.0169	-0.0433
Coefficiente de correlación (r)	0.9991	0.9981	0.9996	0.9994

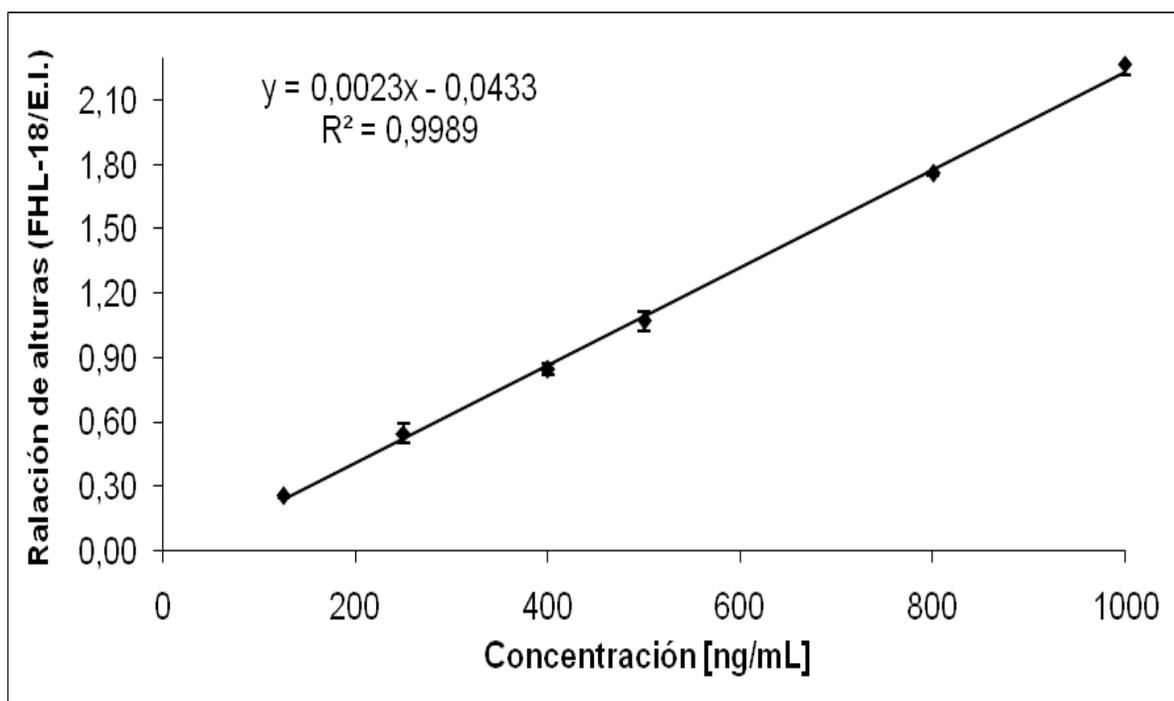


Figura 21. Linealidad del método analítico para cuantificar FHL-18 en plasma.

Los datos obtenidos de la regresión lineal se utilizaron para obtener la concentración recuperada y %Des. Abs. para cada nivel de concentración y el cálculo de los intervalos de confianza (IC), los datos obtenidos se muestran en la tabla 9. En ambos casos los valores de la pendiente y la ordenada cumplen con su respectivo intervalo de confianza, por lo que los valores son aceptados.

Con base en lo anteriormente descrito, se puede observar que, el método analítico desarrollado, en el cual se mantienen las muestras a 4 °C, fue lineal en el rango de concentraciones de 125-1000 ng/mL ya que el coeficiente de correlación de las tres curvas y el global fue mayor a 0.99, el %Des. Abs. para el nivel más bajo del rango de concentraciones fue menor a 20% y para los demás niveles de concentración el valor fue menor al 15%.



Tabla 9. %Des. Abs. de los datos de linealidad

Concentración [ng/mL]	Concentración recuperada [ng/mL]	%Des. Abs.
125	129.48	-3.59
125	128.65	-2.92
125	136.42	-9.13
250	238.31	4.67
250	275.43	-10.17
250	266.16	-6.47
400	392.53	1.87
400	376.66	5.83
400	401.04	-0.26
500	489.23	2.15
500	464.19	7.16
500	513.79	-2.76
800	790.18	1.23
800	788.33	1.46
800	795.08	0.62
1000	1032.94	-3.29
1000	991.52	0.85
1000	1015.04	-1.50
IC (95%)	-0.082951921<b<-0.003586261	
	0.002213018<m<0.002346281	

### 5.5.3 Límite de cuantificación

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos de las cinco replicas de las muestras plásmaticas a una concentración de 125 ng/mL. En ella se observa que el %C.V. y el promedio del %Des. Abs. de las determinaciones es menor al 20%, por lo que esta concentración fue tomada como límite de cuantificación ya que se puede cuantificar con precisión y exactitud.



Tabla 10. Límite de cuantificación del método analítico

Replica de la concentración de 125 ng/mL	Concentración recuperada [ng/mL]	%Des. Abs.
1	146.57	-17.25
2	142.94	-14.35
3	140.60	-12.48
4	140.63	-12.50
5	135.62	-8.50
Promedio	141.27	-13.02
D.E.	3.99	
%C.V.	2.82	

#### 5.5.4 Límite de detección

En la tabla 11 se muestran los datos empleados para el cálculo de la concentración más baja de FHL-18 empleando la ecuación 3. Los valores de desviación estándar de la ordenada al origen y promedio de la pendiente, se obtuvieron a partir de los datos de linealidad (tabla 8)

Tabla 11. Cálculo del límite de detección por fórmula

Desviación estándar de la ordenada al origen	0.0307
Promedio de la pendiente	0.0023
Límite de cuantificación	44.05 ng/mL

Con base en esta información, el límite de detección para FHL-18 fue de 44.05 ng/mL.

#### 5.5.5 Recobro absoluto

En la tabla 12 se muestra el promedio de la relación de alturas de las muestras en plasma y en solución de los puntos control para determinar el recobro absoluto del método analítico. El recobro absoluto del método analítico para cuantificar FHL-18 en plasma de rata fue del 73 %  $\pm$  6 %, con un %C.V. menor al 15 %.



Tabla 12. Por ciento del recobro del método analítico

<b>Concentración [ng/mL]</b>	<b>Promedio de la relación de alturas en plasma</b>	<b>Promedio de la relación de alturas en solución</b>	<b>% Recobro</b>
200	0.3074	0.4498	68.35
600	0.9664	1.3667	70.71
900	1.5646	1.9550	80.03
Promedio			73.03
Desviación estándar			6.18
%C.V.			8.46

El recobro absoluto obtenido fue mayor que el reportado en 2010, que fue del 54%  $\pm$  12%, a temperatura ambiente,<sup>26</sup> por lo que mantener las muestras en hielo durante el proceso de extracción reduce la degradación de FHL-18 en plasma.

### **5.5.6 Precisión**

#### **5.5.6.1 Repetibilidad**

En la tabla 13 se muestran los datos obtenidos al evaluar la repetibilidad del método, en los cuales se observa que el por ciento del coeficiente de variación de cada nivel de concentración es menor al 15%, por lo que el método analítico es repetible.

#### **5.5.6.2 Reproducibilidad**

De los datos que se presentan en la tabla 14 se observa que el método analítico para cuantificar FHL-18 en plasma es reproducible ya que el %C.V. obtenido en cada nivel de concentración recuperada, durante tres días de análisis, fue menor al 15%.

### **5.5.7 Exactitud**

Para evaluar la exactitud del método analítico se calculó el %Des. Abs. para cada nivel de concentración empleando para ello, los datos de repetibilidad y reproducibilidad: Los resultados que se muestran en las tablas 15 y 16 indican que el método es exacto ya que en todos los niveles de concentración, el %desviación fue menor al 15%.



Tabla 13. Repetibilidad del método analítico

Concentración teórica [ng/mL]	Concentración recuperada [ng/mL]	Promedio [ng/mL]	Desviación estándar	% C.V.
200	218.47	221.02	2.78	1.26
	219.04			
	224.04			
	224.04			
	219.50			
600	612.78	624.46	8.82	1.41
	636.92			
	627.55			
	621.53			
	623.53			
900	896.71	898.00	11.36	1.27
	911.53			
	889.09			
	907.45			
	885.24			

Tabla 14. Reproducibilidad del método analítico

Concentración teórica [ng/mL]	Concentración recuperada promedio de los tres días [ng/mL]	Desviación estándar	% C.V.
200	216.92	6.98	3.22
600	626.19	13.81	2.21
900	884.90	36.82	4.16



## 5. RESULTADOS

Tabla 15. Exactitud del método analítico de los datos de repetibilidad

Concentración teórica [ng/mL]	Concentración recuperada [ng/mL]	%Des. Abs.
200	218.47	-9.24
	219.04	-9.52
	224.04	-12.02
	224.04	-12.02
	219.50	-9.75
600	612.78	-2.13
	636.92	-6.15
	627.55	-4.59
	621.53	-3.59
	623.53	-3.92
900	896.71	0.37
	911.53	-1.28
	889.09	1.21
	907.45	-0.83
	885.24	1.64



## 5. RESULTADOS

Tabla 16. Exactitud del método analítico para la cuantificación de FHL en plasma

Concentración teórica [ng/mL]	Concentración recuperada [ng/mL]	%Des. Abs.
200	213.06	-6.53
	207.12	-3.56
	207.89	-3.95
	213.90	-6.95
	218.50	-9.25
	220.72	-10.36
	222.71	-11.36
	215.79	-7.89
	202.22	-1.11
600	621.23	-3.54
	631.20	-5.20
	629.00	-4.83
	608.29	-1.38
	629.00	-4.83
	595.29	0.79
	643.69	-7.28
	639.26	-6.54
	624.50	-4.08
900	891.84	0.91
	923.09	-2.57
	919.73	-2.19
	895.31	0.52
	918.32	-2.03
	900.44	-0.05
	859.81	4.47
	840.09	6.66
	891.84	0.91



### 5.5.8 Estudios de estabilidad

En la tabla 17 se presentan los resultados condensados de estabilidad del FHL18 bajo las condiciones de estudio. En ella se puede observar, que las muestras pueden mantenerse en el inyector, pueden tolerar 3 ciclos de congelación- descongelación y se mantienen estables durante 1 mes a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ya que se cumplen con los criterios establecidos (el %C.V. no es mayor que el 15% para cada nivel de concentración y %Des. Abs. no es mayor al 15%), sin embargo, al procesar las muestras y mantenerlas sin reconstituir en refrigeración, las muestras se degradan, por lo que se debe evitar el mantenerlas bajo estas condiciones.

### 5.6 Estudio de Farmacocinética

Una vez validado el método analítico a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  se llevó a cabo el análisis de las muestras del estudio farmacocinético en ratas, a las cuales se les administró una dispersión sólida de FHL-18 en cremofor al 2%. La dosis administrada fue de  $40.3\text{ mg/Kg}$  por vía oral (equivalente a 2.5 veces la dosis equimolar de albendazol que es de  $15\text{ mg/Kg}$ ).

La dosis se eligió para descartar el supuesto de que en el estudio previo, la cantidad administrada hubiera sido muy pequeña y por ello no se hubiera detectado la molécula.<sup>26, 26</sup> A pesar de lo anterior, no fue posible detectar el FHL-18 en ninguno de los tiempos de muestreo. En la figura 22 se presenta el cromatograma obtenido de una muestra de plasma a los 30 min después de la administración oral de FHL-18.

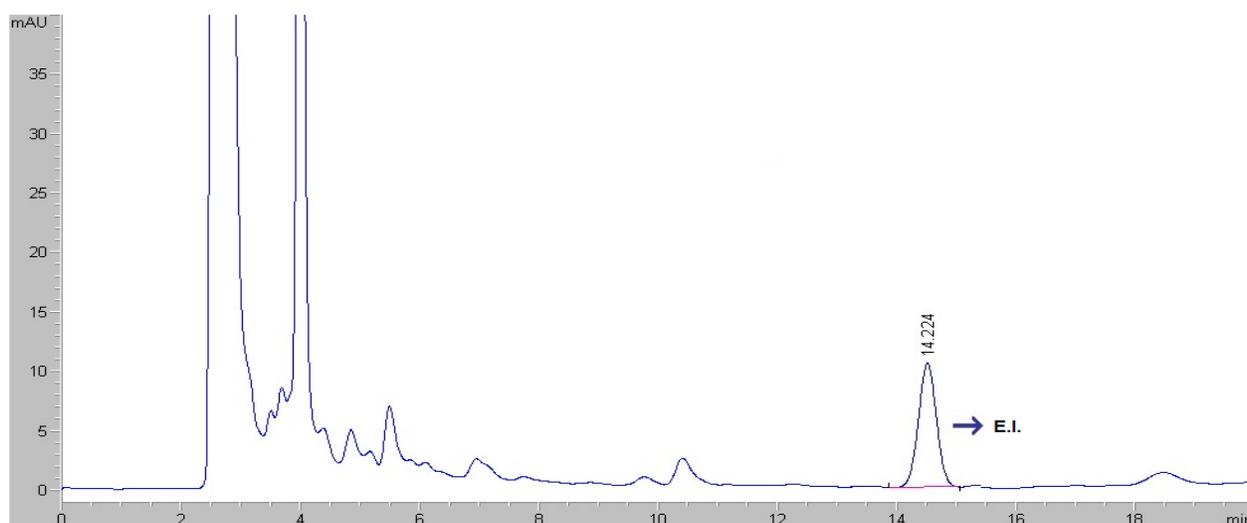


Figura 22. Cromatograma de plasma de rata 30 min después de la administración oral de FLH-18 en cremofor al 2 %.



Tabla 17. Estudios de estabilidad de FHL18 en plasma de rata

Estudio de estabilidad	Concentración nominal [ng/mL]	%C.V. promedio de concentración recuperada [ng/mL]		Promedio de concentración recuperada [ng/mL]		% Des. Abs.
		Muestra del día	Muestra almacenada	Muestra del día	Muestras almacenada	
En el inyector	200	3.73	2.40	211.46	227.36	-7.52
	600	1.94	1.12	593.15	608.65	-2.61
	900	1.27	0.95	918.25	954.76	-3.98
Muestras procesadas sin reconstituir en refrigeración	200	2.66	3.19	218.73	215.69	1.39
	600	6.90	14.81	603.11	472.95	21.58
	900	1.53	7.75	903.32	500.51	44.59
Ciclos de congelación-descongelación	200	2.07	4.18	205.66	204.08	0.77
	600	9.64	1.05	602.92	652.07	-8.15
	900	5.31	1.04	898.94	831.35	7.52
A largo plazo (congeladas por 1mes a -70 °C)	200	2.17	4.60	227.96	217.72	4.49
	600	7.29	3.84	629.00	620.14	1.41
	900	1.12	5.31	896.94	898.94	-0.22



Para descartar que el FLH-18 no se hubiera absorbido por problemas de solubilidad, se evaluaron diferentes metodologías para solubilizarlo, como son el empleo de cosolventes, tensoactivos y la complejación con ciclodextrinas. Se encontró que la mezcla conteniendo 40% propilenglicol y 10% etanol (reportada en la literatura para solubilizar el diazepam<sup>31</sup> fue adecuada lo cual podría estar relacionada con la similitud que tienen las moléculas en el log P, cuyos valores son 2.82 para el FHL-18 y 3 para diazepam. En este estudio se aseguró también que el FLH-18 fuera depositado directamente en el estómago mediante el uso de una sonda. Al igual que en el estudio anterior, no se detectó el FHL18 a ninguno de los tiempos de muestreo seleccionados. En la figura 23 se observa el cromatograma de una muestra plasmática después de la administración oral de FLH-18.

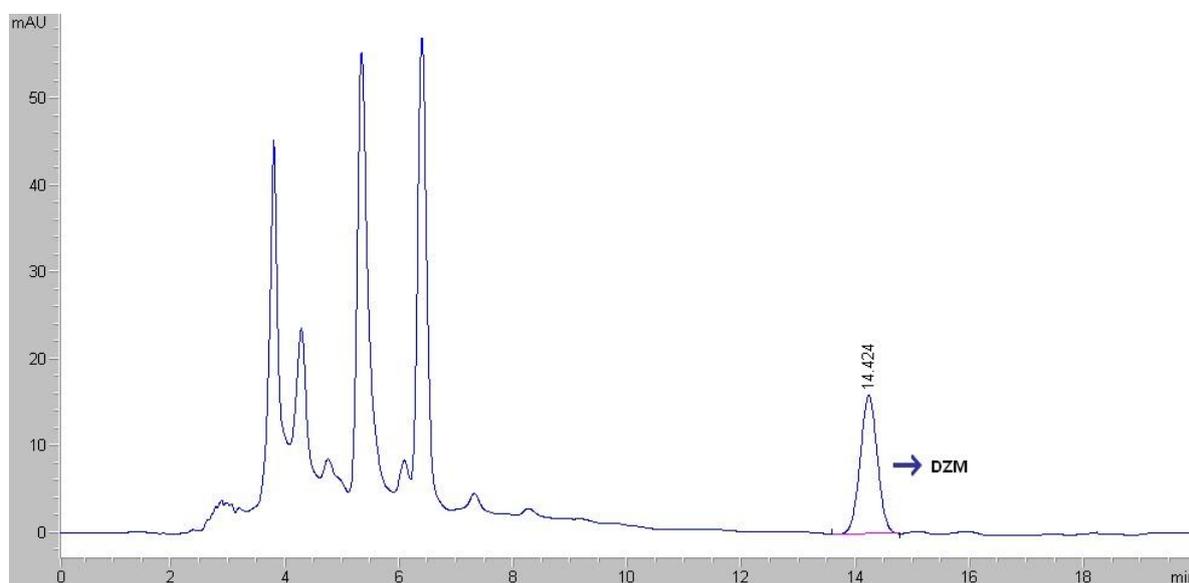


Figura 23. Cromatograma de plasma de rata 30 min después de la administración oral de FLH-18 en 40% propilenglicol, 10% etanol.

La nula absorción de FLH-18 podría estar relacionado con:

- La baja solubilidad del compuesto en medio acuoso, lo cual puede dar lugar a una baja absorción en el tracto gastrointestinal
- Al efecto de primer paso. Basado en la estructura química, este efecto podría llevarse a cabo vía las enzimas carboxilesterasas, las cuales participan en el proceso de fase I del metabolismo de fármacos y catalizan la hidrólisis de un amplio grupo de compuestos que contienen ésteres y aminas, por ejemplo: antiplaquetarios (aspirina, clopidogrel), anticancerígenos



## 5. RESULTADOS

(irinotecan), narcóticos (cocaína, heroína ) y antivirales (oseltamivir). Se encuentran ampliamente distribuidas en tejidos (hígado, intestino) y en especies de mamíferos (ratón, rata, gato, conejo y humano). Se sabe que existen diferencias entre especies, por ejemplo el plasma de rata contiene un nivel mayor de estas enzimas.<sup>33</sup> En la figura 24 se muestran los posibles metabolitos del análogo de albendazol, los cuales no se detectaron en este sistema cromatográfico debido a que el método analítico está diseñado para la cuantificación de FLH-18.

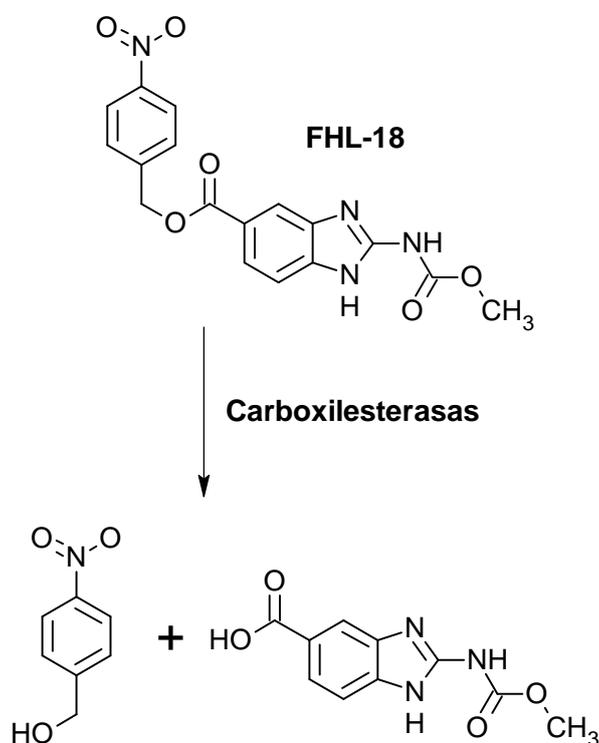


Figura 24. Posible metabolismo de FLH-18

Para la administración por vía intravenosa, se empleó como vehículo la siguiente mezcla de disolventes: 5% etanol, 5% Tween 80 y 90% solución salina estéril.<sup>33</sup> El volumen administrado fue de 0.5 mL (el cual es el recomendado para ratas por esta vía.<sup>35</sup> En la figura 25 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos y en la tabla 18 las concentraciones encontradas a los diferentes tiempos de muestreo.

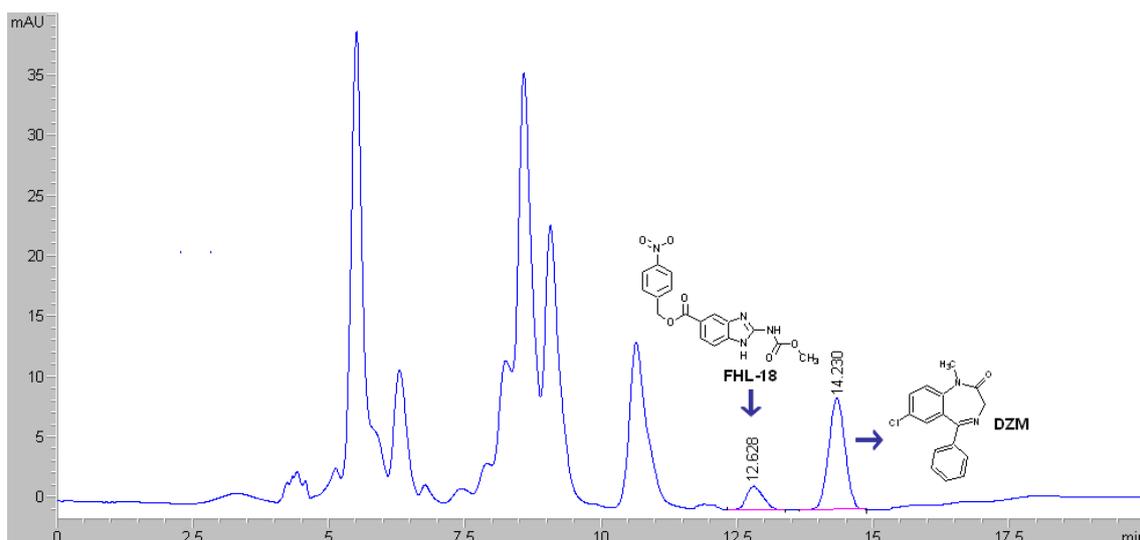


Figura 25. Cromatograma de FLH-18 después de 30 min de la administración por vía intravenosa de una dosis de 200  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ .

Tabla 18. Concentraciones plasmáticas de FLH-18 en rata después de la administración de una dosis de 200  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  por vía intravenosa.

Rata	Tiempo [min]	Concentración de FLH-18 [ng/mL]
1	30	80.70
2	45	76.03
3	30	63.24

Los resultados mostraron que todas las concentraciones se encuentran por debajo del límite de cuantificación. De ello se pueden inferir dos posibles situaciones a) el FLH-18 tiene un gran volumen de distribución; b) los elevados niveles de carboxilesterasas contenidos en el plasma de rata<sup>36</sup> pudieran haber degradado a FLH-18.

De los resultados anteriores se puede establecer que, aún cuando el FLH-18 tiene una buena actividad cisticida, sus propiedades fisicoquímicas no permitieron determinar su perfil farmacocinético, por lo que esta molécula no es un buen candidato para continuar con la investigación.



De los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que:

- El método analítico para cuantificar FHL 18 en plasma cumple con los criterios establecidos por la NOM 177 si se mantienen las muestras a 4 °C.
- El FHL-18 es estable durante los ciclos de congelación-descongelación, durante un mes a -70 °C y en el inyector al menos por 8 h.
- El FHL-18 presenta problemas de solubilidad similares a los de albendazol.
- El FHL-18 no se absorbe y/o sufre un extenso metabolismo, por lo que no es un buen candidato para continuar con su investigación preclínica.



1. Uribarren Berrueta Teresa. Generalidades de Cestodos. Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología y Parasitología, UNAM. Disponible en:<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/cestodos.html>
2. Romero Cabello Romero. Microbiología y parasitología. Médica Panamericana, 2007. p 1479.
3. H. Garcia Hector, H. Del Brutto Oscar. Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. *Lancet Neurol* 2005; 4: 653–61.
4. H García Héctor, E Gonzalez Armando, W Evans Carlton A, H Gilman Robert. Taenia solium cysticercosis. *Lancet* 2003; 362: 547–56.
5. Pratibha Singhi. Neurocysticercosis. *Ther Adv Neurol Disord* 2011, 4(2): 67-81.
6. Sumit Sinha, B.S. Sharma. Neurocysticercosis: A review of current status and management. *Journal of Clinical Neuroscience* 2009, 16: 867–876
7. Robert Kraft. Cysticercosis: An Emerging Parasitic Disease. *American Family Physician* 2007, 76 (1): 91-96.
8. Mahanty Siddhartha, H. Garcia Hector. Cysticercosis and neurocysticercosis as pathogens affecting the nervous system. *Progress in Neurobiology* 2010, 91: 172–184.
9. Flisser Ana, Correa Dolores. Neurocysticercosis May No Longer Be a Public Health Problem in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* 2010, 4(12): e831. doi:10.1371/journal.pntd.0000831
10. Fleury Agnés, Moreno García Jael, Valdez Aguerrebere Paulina, Sayve Durán María de, Becerril Rodríguez Paola, Larralde2 Carlos, Sciutto Edda. Neurocysticercosis, a Persisting Health Problem in México. *PLoS Negl Trop Dis* 2010, 4(8): e805. doi:10.1371/journal.pntd.0000805
11. M. Coyle Christina, B. Tanowitz1 Herbert. Diagnosis and Treatment of Neurocysticercosis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2009, doi:10.1155/2009/180742
12. Sotelo Julio, Jung Helgi. Pharmacokinetic Optimisation of the Treatment of Neurocysticercosis. *Clin Pharmacokinet* 1998, 34 (6): 503-515.



13. Albenza
14. Jung H., Medina L., García L., Fuentes I, Moreno Esparza R. Absorption Studies of Albendazole and Some Physicochemical Properties of the Drug and Its Metabolite Albendazole Sulphoxide. *J. Pharm. Pharmacol* 1998, 50: 4348.
15. Lindenberg Marc, Kopp Sabine, B. Dressman Jennifer. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004, 58: 265–278.
16. Jung Helgi, Cárdenas Graciela, Sciutto Edda, Fleury Agnes. Medical Treatment for Neurocysticercosis: Drugs, Indications and Perspectives. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2008, 8: 424-433.
17. Danaher Martin, Hendrik De Ruyck, R.H. Crooks Steven, Dowling Geraldine, O’Keeffe Michael. Review of methodology for the determination of benzimidazoles residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B* 2007, 845: 1–37.
18. A.D. Dayan. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica* 2003, 86: 141-159.
19. Schwartz Sheila, Pateman Tony. Pre-clinical pharmacokinetics. Chapter 7: A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism. 2004.
20. Lin Jiunn H., LU Anthony Y. H. Role of Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Discovery and Development. *Pharmacological Reviews*, 1997. 49 (4): 403-449.
21. Hsieh Yunsheng, Cheng K. C., Yuguang Wang, Samuel Chackalamannil, Yan Xia, Walter A. Korfmacher, Ronald E. White. The Role of Exploratory Drug Metabolism and Pharmacokinetics in New Drug Research: Case Study- Selection of a Thrombin Receptor Antagonist for Development. *Current Pharmaceutical Design*, 2009. 15 (19): 2262-2269.
22. Di Li, Kerns Edward H. Solution Stability - Plasma, Gastrointestinal, Bioassay. *Current Drug Metabolism*, 2008. 9 (9): 860-868.



23. H. Elkhai'li, L. Linger, H. Monteil, F. Jehl. High-performance liquid chromatographic assay for cefepime in serum. *Journal of Chromatography B*, 1997, 690: 181-188.
24. Palomares Alonso Francisca, Jung Cook Helgi, Pérez Villanueva Jaime, Piliado Juan Carlos, Rodríguez Morales Sergio, Palencia Hernández Guadalupe, López Balbiaux Nayeli, Hernández Campos Alicia, Castillo Rafael, Hernández Luis Francisco. Synthesis and in vitro cysticidal activity of new enzimidazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009, 44:1794-1800.
25. Palomares Alonso Francisca. Evaluación farmacodinámica y farmacocinética de nuevas formulaciones y análogos de albendazol con posible actividad cisticida. Tesis de doctorado. UNAM. 2009.
26. Mendoza Macedo Karina Lizbet. Desarrollo de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la cuantificación de FHL-18, un nuevo compuesto cisticida. Tesis de maestría. UNAM. 2010.
27. FDA. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. May 2001
28. Bansal Surendra, DeStefano Anthony. Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Small Molecules. *The AAPS Journal* 2007; 9 (1) Article 11
29. NOM-177-SSA1-1998, 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.
30. Mac-Mod Analytical. Comparison Guide to C18 Reversed Phase HPLC Columns. Fourth Edition 2008
31. Kipp E. James. Solubilizing Systems for Parenteral Formulation Development—Small Molecules. *Chapter 10: Solubilizing Systems for Parenteral Formulation Development*. 309-339.
32. David Spalding. The importance of the physicochemical properties of drugs to drug metabolism. Chapter 2: A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism. 2004.



33. Jeff L. Staudinger, Chenshu Xu, Yue J. Cui, Curtis D. Klaassen. Nuclear Receptor-Mediated Regulation of Carboxylesterase Expression and Activity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011. 1-15.
34. Helton David, Osborne David w., Pierson Sharon K., Buonarati Michael H., Bethem Robert A. Pharmacokinetic profiles in rats after intravenous, oral, or dermal administration of dapsone. *Drug metabolism and disposition* 2000. 28(8): 925-929.
35. Terrance Hawk C., L. Leary Steven, H. Morris Timothy. Formulary for laboratory animal. Third edition. Blackwell Publishing. 2005. USA.
36. J. Allen Crow, Abdolsamad Borazjani, Philip M. Potter, Matthew K. Ross. Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: Examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007. 221: 1–12.
37. ICH Q2 (R1). Validation of Analytical Procedures: Definitions And Methodology. Jun 1995