

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Parasitología**



**ESTUDIO BIOFARMACÉUTICO Y PARASITOLÓGICO  
DE UNA FORMULACIÓN DE ALBENDAZOL EN  
HIDROXIPROPIL - $\beta$ - CICLODEXTRINA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Juan José García Rodríguez**

Bajo la dirección del doctor  
Francisco Bolás Fernández

**Madrid, 2008**

- **ISBN: 978-84-692-2413-7**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**



**ESTUDIO BIOFARMACEUTICO Y PARASITOLOGICO DE UNA  
FORMULACION DE ALBENDAZOL EN HIDROXIPROPIL- $\beta$ -  
CICLODEXTRINA.**

**Juan José García Rodríguez  
Enero de 2008**

D. FRANCISCO BOLÁS FERNÁNDEZ, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, CERTIFICA QUE:

El trabajo “ **Estudio biofarmacéutico y parasitológico de una formulación de albendazol en hidroxipropil  $\beta$  ciclodextrina**” ha sido realizado por JUAN JOSE GARCIA RODRIGUEZ bajo mi dirección, en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, para optar al grado de Doctor en Farmacia.

Fdo. Francisco Bolás Fernández

Madrid, enero de 2008

## **AGRADECIMIENTOS:**

Hace ya muchos años que pisé por primera vez el hall de la Facultad de Farmacia, y quién me iba a decir entonces que con el tiempo iba a intentar doctorarme en esta disciplina que me cautivó desde el primer momento. Ahora cuando escribo esto, al final de todo el trabajo realizado, me gustaría poder acordarme de todas y cada una de las personas, que de una forma u otra han participado, bien técnica, profesional o personalmente en la consecución de éste, mi pequeño sueño.

Quiero dar las gracias de una forma muy especial al Dr. D. Francisco Bolás Fernández, "mi jefe", que tan constante ha sido para que al final consiguiéramos el objetivo marcado, hace ya unos cuantos años. En todo este tiempo hemos charlado largo y tendido de lo humano y lo divino y desde luego te considero, no sólo mi maestro, sino también mi amigo. Gracias por haberme dejado formar parte de tu equipo y haber confiado en mí a pesar de que en ciertas épocas he llegado a conseguir que eso fuese realmente difícil.

Quiero dar las gracias al Dr. José Antonio Escario, Director del Departamento por haberme permitido colaborar en él.

No me gustaría olvidar a nadie en estos agradecimientos porque a todos los siento parte de esa familia que durante muchos años hemos sido capaces de mantener. Gracias de todo corazón a las Dras. Alicia Gómez, Carmen Cuesta, Carmen Cuellar, (lo de la ovejita hay que repetirlo), a la Dra. Mercedes Martínez (tus consejos son siempre una joya) y a las Dras. Catina Castaño y M<sup>a</sup> Auxiliadora Dea (gracias por revisar deprisa y corriendo el trabajo, hay cosas que yo a estas alturas ni veo). A los Dres. Angel Sánchez Covisa, José Luís Guillén, Luís Zapatero, Francisco Ponce y Juan José Nogal, sé que siempre he podido contar con todos vosotros.

Quiero dar las gracias también de forma especial al Dr. D. Antonio R. Martínez, gracias por confiar en mí tanto personal como profesionalmente.

Gracias Judith, prometo no quitarte más veces el ordenador. Y muchas gracias también a Piedad e Inés, que tanto han luchado conmigo con el tema de los animales de laboratorio.

Muchas gracias Javier por las comidas que hemos compartido y lo mucho que hemos charlado, reconozco que cuando no como en Estomatología, hay un "no se qué" que echo de menos.

Y por supuesto merecen también mención aquellas personas que en estos años han compartido conmigo algún tiempo en el departamento, Rory, Alfredo, Marta, Sara, Chus, Patricia, Raúl, Flery, Paloma. Muchas gracias a todos.

Por supuesto muchas gracias a Emma, mi compañera inseparable en este complicado camino de la vida, gracias por todo, por ser como eres, por confiar en mí y en mis locuras, por apoyarme incondicionalmente y ayudarme a no rendirme jamás, gracias por encargarte de todo cuando en este sprint final no he tenido tiempo casi de nada, gracias por iluminar mi camino, tú que eres la luz de mi vida.

Muchas gracias hijos míos por haberme dado tiempo para poder trabajar en esta tesis, por no haber siquiera preguntado cuando me veáis hablando solo con el ordenador, por haber sobrevalorado el trabajo que estaba haciendo, no sabéis cuan importante es para mí saber que sigo siendo vuestro pequeño héroe. Gracias Alejandro por haber revisado la introducción, sabes que esa coma que no había puesto era muy importante, y ahora al leerlo me suena mucho mejor. Gracias Javier por quedarte junto a mí en el estudio, jugando a los pies de la mesa, sin apenas hacer ruido, tenerte ahí cada día cuando empezaba a trabajar en esto ha sido algo maravilloso.

Gracias mamá, se que no vas a leer esto, porque aunque tus nietos quieren enseñarte te resistes a aquello que en su día por circunstancias no pudiste hacer. Gracias por haberme educado como lo hiciste y por haberme inculcado valores que ahora yo intento enseñar a mis hijos.

Gracias papá, estés donde estés, sé que me sigues cuidando.

Gracias hermana, los años pasan pero nosotros seguiremos siempre siendo niños.

Quiero también agradecer todo el apoyo y ayuda que me han prestado a José, Pili y Susana, mi back up permanente con mis pitufos.

De todo corazón muchas gracias.

*"Cumplir su Leyenda Personal es la única obligación de los hombres. Todo es una sola cosa. Y cuando quieres algo, todo el universo conspira para que realices tu deseo."*

*Paulo Coelho.*

**A Emma.  
A Alejandro y Javier.**

# **INDICE**

---

INDICE

1.	INTRODUCCION .....	10
2.	OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO .....	14
3.	<i>TRICHINELLA</i> COMO MODELO EXPERIMENTAL EN QUIMIOTERAPIA ANTIHELMINTICA 18	18
3.1.	DESCRIPCION TAXONOMICA.....	18
3.2.	MARCO HISTORICO.....	18
3.3.	CICLO BIOLOGICO DE <i>Trichinella</i> spp. ....	20
3.3.1	Fase intestinal. ....	21
3.3.2	Fase migratoria. ....	22
3.3.3	Fase muscular. ....	23
4.	BENCIMIDAZOLES EN LA QUIMIOTERAPIA ANTIHELMINTICA. ....	23
4.1.	CRONOLOGIA.....	23
4.2.	SINTESIS DE BENCIMIDAZOLES.....	26
4.2.1.	Síntesis del albendazol. ....	27
4.3.	MECANISMO DE ACCION DE BENCIMIDAZOLES. ....	28
4.3.1.	Lugares específicos de unión. ....	33
4.4.	FARMACOCINETICA DE BENCIMIDAZOLES.....	35
4.4.1.	Administración, absorción y distribución. ....	35
4.4.2.	Metabolismo y excreción. ....	38
4.4.3.	Quiralidad molecular del albendazol sulfóxido. ....	43
5.	UTILIDAD DE LAS CICLODEXTRINAS EN LA SOLUBILIZACION DEL ALBENDAZOL. ....	45
5.1.	PROPIEDADES Y CARACTERISTICAS DE LAS $\beta$ -CICLODEXTRINAS. ....	46
5.2.	FORMACION DE COMPLEJOS DE INCLUSION CON CICLODEXTRINAS. ....	49
5.3.	VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA COMPLEJACION. ....	51
5.4.	APLICACIONES DE LAS CICLODEXTRINAS. ....	52
6.	MATERIALES.....	55
6.1.	ANIMALES DE EXPERIMENTACION.....	55
6.2.	PARASITO.....	55
6.3.	FARMACOS.....	55
6.4.	REACTIVOS.....	55
6.5.	EQUIPOS Y APARATOS. ....	56
7.	METODOS.....	57
7.1.	METODOS PARASITOLOGICOS.....	57
7.1.1.	Dosis infectante y dosis terapéuticas administradas. ....	57
7.1.2.	Infección con larvas obtenidas previa digestión de la canal. ....	59
7.1.3.	Aplicación de los fármacos. ....	60
7.1.4.	Digestión de la canal y recuento de larvas.....	61
7.1.5.	Recuperación de adultos y recuento. ....	61
7.1.6.	Preparación del intestino para su estudio histopatológico. ....	62
7.1.7.	Preparación del medio HBSS. ....	62
7.2.	METODOS FARMACEUTICOS.....	62
7.2.1.	Preparación de la suspensión de albendazol en carboximetil celulosa sódica.....	62
7.2.2.	Preparación de la solución anestésica. ....	63
7.2.3.	Preparación de la solución de albendazol en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. ....	63
7.2.4.	Obtención de los enantiómeros puros. ....	63
7.3.	METODO DE ESTUDIO BIOFARMACEUTICO Y FARMACOCINETICO.....	64
7.3.1.	Animales de experimentación.....	64
7.3.2.	Formulaciones y dosis utilizadas.....	65
7.3.3.	Obtención de muestras sanguíneas.....	66
7.3.4.	Obtención de muestras en el parásito.....	66
7.3.5.	Determinación de la concentración de albendazol y sus metabolitos mediante HPLC. ....	67

7.3.6.	Determinación de enantiómeros.....	69
7.3.7.	Análisis estadístico.....	69
8.	RESULTADOS.....	72
8.1.	MEJORA DE LA BIODISPONIBILIDAD Y ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA DEL ALBENDAZOL MEDIANTE LA FORMULACION EN COMPLEJOS DE INCLUSION.....	72
8.1.1.	Actividad antiparasitaria.....	72
8.1.1.1.	Fase intestinal.....	72
8.1.1.2.	Fase migratoria.....	77
8.1.1.3.	Fase muscular.....	84
8.1.2.	Estudio de los parámetros farmacocinéticos y biofarmacéuticos.....	91
8.1.2.1.	Farmacocinética comparada del albendazol a la dosis de 50 mg/kg de peso....	93
8.1.2.2.	Farmacocinética comparada del albendazol a la dosis de 100 mg/kg de peso..	97
8.2.	MODIFICACION DE LA PAUTA POSOLOGICA DEL TRATAMIENTO FRENTE A LA FASE MIGRATORIA DE <i>TRICHINELLA SPIRALIS</i> .....	101
8.3.	MODIFICACION EN LA ABSORCION DE ALBENDAZOL COMO CONSECUENCIA DE UNA INFECCION INTESTINAL POR <i>T. SPIRALIS</i> .....	109
8.3.1.	Datos parasitológicos.....	109
8.3.2.	Datos farmacocinéticos.....	113
8.3.3.	Datos histopatológicos.....	115
8.4.	MODELO DE ESTUDIO FARMACOCINETICO DEL ALBENDAZOL SULFOXIDO EN LARVAS MUSCULARES DE <i>TRICHINELLA SPIRALIS</i> .....	120
8.4.1.	Ensayos <i>ex vivo</i> .....	120
8.4.2.	Ensayos <i>in vitro</i> .....	123
9.	DISCUSION.....	128
10.	CONCLUSIONES.....	142
11.	BIBLIOGRAFIA.....	145

# **INTRODUCCION**

---

## **1. INTRODUCCION**

El problema de las parasitosis, en general, y de las helmintosis en particular, es muy amplio y de gran importancia tanto en la práctica médica como en la veterinaria.

En general las helmintosis afectan de tal manera tanto a los humanos como al ganado que representan, por sí mismas, uno de los más importantes grupos de infecciones del planeta.

La repercusión económica que las infecciones por helmintos producen, ha sido valorada y reconocida desde hace tiempo en el ámbito ganadero, y es por ello que los más importantes avances en quimioterapia antihelmíntica procedan del entorno de la salud animal. El tratamiento de los piensos ha resultado ser una mejora muy importante en el control de las infecciones helmínticas, básicamente por establecer una pauta regular y continuada en el tiempo.

Por otro lado, la estimación global de parasitismo realizada por Stoll en la década de los 40 (Stoll, 1947) ha variado poco en los años sucesivos, simplemente viéndose modificada por el crecimiento global de la población.

Los estudios de Stephenson (Stephenson, 1989) y Latham (Latham, 1983) en África demostraron que las medidas profilácticas frente a helmintos producían mayor crecimiento y adaptación física en los niños, asimismo aumentaba la productividad laboral en los adultos. Estudios más recientes realizados en Uganda (Kabartereine y col, 2007), concluyen que los tratamientos promovidos en los programas de control nacional frente a helmintos pueden disminuir los rangos de infección y la patogenia en niños en edad escolar y en aquellos casos de infecciones producidas por uncinarias mejorar la concentración de hemoglobina en sangre.

El descubrimiento del tiabendazol en 1961 abrió las puertas del desarrollo e investigación de todo un grupo químico y terapéutico: los bencimidazoles. En la práctica clínica solamente tres antihelmínticos del grupo de los bencimidazoles se han utilizado de una forma habitual: albendazol, flubendazol y mebendazol. El albendazol ha demostrado no sólo ser altamente efectivo y seguro (presenta pocos efectos secundarios) para el tratamiento de las infecciones por helmintos, sino que también actúa eficazmente en el tratamiento de otras infecciones parasitarias ocasionadas por protozoos. Además, es cada vez más frecuentemente utilizado en infecciones oportunistas por microsporidios en enfermos de SIDA (Haque, 1993), (Dieterich, 1994), (Weber, 1993), (Curry, 1993), (Derouin, 2007). Por su mecanismo de acción a nivel

microtubular también ha sido utilizado en estudios tanto *in vivo* como *in vitro* en los que se ha observado que esta molécula es un potente inhibidor de la proliferación de células hepáticas cancerígenas (Pourgholami y col., 2000); inhibe el crecimiento de células cancerígenas en cáncer colorectal y carcinoma hepatocelular (Morris y col., 2001) y suprime la angiogénesis del tumor y la formación de cistitis inhibiendo el factor de crecimiento endotelial vascular en carcinomatosis peritoneal (Pourgholami y col., 2006).

El problema que los bencimidazoles en general, y el albendazol en particular presentan, es su baja solubilidad y por lo tanto una absorción limitada, lo que unido a su rápido metabolismo hace que se utilicen frecuentemente frente a parásitos intestinales, y que sólo en dosis altas y prolongadas sean efectivos en el tratamiento de infecciones sistémicas. En el caso del albendazol se ha demostrado efectividad sistémica en infecciones como la hidatidosis (Yasawi, 1993), (Kumar, 1993), (Bondiau, 1993) y la neurocisticercosis (Sánchez, 1993), (Suri, 1994) y (Bauer, 1994).

El hecho de que el mayor problema que presenta el albendazol sea su baja solubilidad, hace de este fármaco de amplio espectro, un candidato idóneo para el desarrollo de nuevas formulaciones de solubilidad exaltada tanto en velocidad como en magnitud.

Dentro de los recursos tecnológicos disponibles para la mejora de la solubilidad de moléculas insolubles, la formación de complejos despierta gran interés tanto en investigación como en su aplicación en terapéutica.

De las distintas sustancias que se pueden emplear para la formación de complejos, probablemente las ciclodextrinas son las más utilizadas en terapéutica, encontrándose disponibles en distintos tipos, en grandes cantidades y a precios razonables. Son sustancias que prácticamente carecen de toxicidad (son hidratos de carbono) y fácilmente biodegradables.

El desarrollo, por tanto, de nuevas formulaciones de antiparasitarios, para su uso en medicina humana y veterinaria, requiere un enfoque multidisciplinar. Recurriendo a la tecnología farmacéutica se producen o mejoran sustancias dotadas de una posible actividad farmacológica, hecho que se comprueba haciendo uso de modelos experimentales para el cribado farmacológico tanto *in vivo* como *in vitro*.

Estos modelos experimentales deben responder a un planteamiento simple, es decir, deben permitir obtener los máximos rendimientos, utilizando los mínimos medios posibles.

Por todo ello, y partiendo de una molécula de conocida actividad antihelmíntica, como es el albendazol, procedemos a la realización de un estudio cuya finalidad es la obtención de formulaciones con mayor solubilidad que potencien la actividad de este fármaco a diferentes niveles de infección, usando como modelo experimental el nematodo *Trichinella spiralis* (Owen. 1835; Railliet. 1895), en ratón, por dos motivos fundamentales: por un lado, por su fácil mantenimiento en estos animales de laboratorio, y por otro, por el corto período de tiempo necesario para reproducir su ciclo biológico completo, a diferentes niveles (intestinal, sanguíneo y tisular), lo que nos permite ensayar las diferentes formulaciones de una manera extrapolable a un gran número de situaciones clínicas reales. Por otro lado, realizamos un estudio del comportamiento de los dos enantiómeros, que la molécula de albendazol produce en su metabolismo, a nivel del hospedador y del parásito, intentando descifrar cual de los dos tiene mayor actividad farmacológica. Por último, estudiamos el efecto que una infección intestinal por *Trichinella spiralis* tiene en la biodisponibilidad del fármaco.

# **OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO**

---

## **2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO**

⇒ La estructura molecular de los bencimidazoles hace que estos sean difícilmente solubilizables en agua, lo que repercute directamente en su absorción y consecuentemente en su biodisponibilidad.

Este hecho ha obligado a que estos fármacos se hayan destinado fundamentalmente al tratamiento de helmintiasis intestinales, donde han sido muy efectivos. No obstante, el mecanismo de acción y la eficacia de estas sustancias han hecho de ellas candidatas idóneas para el estudio de formulaciones que permitan extrapolar el efecto logrado a nivel intestinal a nivel sistémico.

Experimentalmente la administración oral de albendazol se ha realizado suspendiendo el mismo en carboximetil celulosa sódica. Este vehículo utilizado conlleva dos problemas fundamentales:

- Dosis no uniformes.
- Baja solubilidad.

Por ello, se planteó realizar un trabajo conjunto con el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, para obtener formulaciones líquidas, que teóricamente consiguieran aumentar el perfil farmacocinético de los bencimidazoles, y por lo tanto su actividad a diferentes niveles en el organismo. El objetivo final marcado, era conseguir una buena correlación entre:

FORMULACIÓN→BIODISPONIBILIDAD→EFECTO ANTIPARASITARIO

Y que además, este efecto antiparasitario se diera en las diferentes fases (enteral y parenteral) del ciclo biológico del nematodo utilizado en nuestro modelo experimental, *Trichinella spiralis*.

Por esta razón, hemos considerado muy interesante realizar complejos de inclusión de albendazol en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, con el fin de aumentar la característica de solubilidad de este antihelmíntico, facilitando así la elaboración de formulaciones líquidas para su posterior administración en animales de experimentación.

Aumentando la solubilidad de los bencimidazoles, generalmente se mejora su biodisponibilidad, como ya se ha demostrado en trabajos anteriores (López García y col, 1997).

⇒ La fase migratoria del ciclo biológico de *Trichinella spiralis* se caracteriza, desde el punto de vista farmacológico, por ser la más resistente al tratamiento experimental. Utilizando la nueva formulación generada desarrollamos un modelo de estudio de modificación de la pauta posológica, intentando observar las posibles variaciones que en la reducción en el número de embriones se producen como consecuencia de estos cambios.

⇒ Las formas farmacéuticas de administración oral son las más utilizadas por varias causas: ser la vía natural de entrada, no presentar ninguna dificultad su administración, y seguridad en casos de sobredosificación al poderse recurrir al lavado gástrico o inducción al vómito.

La mayoría de los fármacos administrados vía oral buscan una acción sistémica tras un proceso de absorción.

El inicio de la acción de un fármaco administrado por vía oral tiene lugar en función de la rapidez con la que el medicamento, una vez liberado, sea absorbido. El punto inicial de absorción de fármacos, aunque muy reducido, es la mucosa bucal; la capacidad de absorción se ve incrementada para algunos fármacos en el estómago, pero, sin lugar a dudas, es la mucosa intestinal la gran protagonista en la absorción de medicamentos.

Los factores que influyen en la absorción oral de fármacos son difíciles de predecir, ya que, además de los factores fisiológicos como el pH, cantidad y tipo de alimentos, existen oscilaciones individuales, así como procesos patológicos.

La alteración, por tanto, del epitelio intestinal, como consecuencia del proceso infeccioso de *Trichinella spiralis*, ofrece un marco inigualable de estudio para valorar la modificación que, teóricamente, se debe producir en la absorción del fármaco albendazol. Los diferentes estados por los que este epitelio pasa a lo largo de la fase intestinal del ciclo de este nematodo, nos puede dar una visión de cómo esta alteración puede condicionar la absorción de fármacos y por tanto su biodisponibilidad.

⇒ El estudio del comportamiento de la molécula de albendazol en el hospedador ha sido reiteradamente analizado, tanto desde el punto de vista metabólico como del papel que los dos enantiómeros del metabolito activo tienen en la eficacia del fármaco. Nosotros en este proyecto hemos querido comprender que es lo que ocurre cuando el fármaco alcanza su objetivo. Para

ello hemos desarrollado un modelo *in vitro* que nos ha permitido analizar el metabolismo que la molécula sufre en el parásito.

Los objetivos finales de esta tesis son:

- Comparar la biodisponibilidad y efecto antihelmíntico de una disolución de albendazol en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina frente a una formulación de referencia (suspensión de albendazol en carboximetil celulosa) a diferentes dosis.
- Comparar la correlación existente entre las diferentes dosis desde un punto de vista biofarmacéutico.
- Estudiar los perfiles enantioméricos en el hospedador.
- Analizar la modificación en la reducción de carga parasitaria en la fase migratoria como consecuencia de la modificación de la pauta posológica.
- Comparar los perfiles farmacocinéticos del albendazol producidos durante las diferentes etapas de una infección intestinal por *Trichinella spiralis*, considerando la carga parasitaria y el deterioro del epitelio intestinal.
- Analizar en un modelo *in vitro* el metabolismo del albendazol en el parásito.

# **REVISION BIBLIOGRAFICA**

---

### 3. TRICHINELLA COMO MODELO EXPERIMENTAL EN QUIMIOTERAPIA ANTIHELMINTICA

#### 3.1. DESCRIPCION TAXONOMICA.

REINO ANIMALIA

SUBREINO ECDYSOZOA (Aguinaldo, 1997)

PHYLUM NEMATODA

CLASE ADENOPHOREA (APHASMIDIA)

ORDEN TRICHURIDEA

SUPERFAMILIA TRICHUROIDEA

FAMILIA TRICHINELLIDAE

SUBFAMILIA TRICHINELLINAE

GENERO TRICHINELLA

ESPECIES	<i>Trichinella spiralis</i>
	<i>Trichinella nativa</i>
	<i>Trichinella britovi</i>
	<i>Trichinella nelsoni</i>
	<i>Trichinella pseudospiralis</i>
	<i>Trichinella murrelli</i>
	<i>Trichinella papuae</i>
	<i>Trichinella zimbawensis</i>

#### 3.2. MARCO HISTORICO.

La trichinellosis es un proceso posiblemente anterior a la aparición del hombre actual sobre la tierra. Sin embargo, el género *Trichinella* y la enfermedad que produce se conocen desde hace relativamente poco tiempo. A pesar de haber sido una de las parasitosis más estudiadas y combatida por las autoridades sanitarias de numerosos países, su conocimiento presenta aún en la actualidad numerosas lagunas.

El primer caso conocido de trichinellosis humana se da en un joven egipcio en el 1200 a.C., que se diagnosticó unos 3200 años después en sus momificados músculos intercostales.

Hay indicios suficientes para pensar que varias epidemias históricas se debieron a una trichinellosis. Este es el caso de la ocurrida en el 27 a.C., en los cartaginenses que ocuparon Sicilia, o en la que en 1827 afecta en Santo Tomás (Antillas) a unas 12000 personas. Experiencias tan dolorosas como éstas bien pudieron ser la causa de que fenicios, cretenses, etíopes, egipcios y árabes prohibieran el consumo de carne de cerdo, incluso por imperativos religiosos (Ley de Moisés, Corán, etc.).

Fue James Paget, un estudiante de medicina de primer año en el Hospital de San Bartolomé, en 1835, quien queda intrigado cuando en la sala de disección observa unas partículas en forma de arenilla que restan afilado a su bisturí, tras la búsqueda insistente de un microscopio, consigue examinar su muestra en el departamento de Botánica del Museo Británico.

Aunque Paget comunica su hallazgo en la Albernetian Society (un club de estudiantes), fue Richard Owen, un profesor suyo, quien días después denuncia el hallazgo ante la Sociedad Zoológica de Londres y describe al parásito; lo identifica como un nematodo y lo denomina *Trichina spiralis*. Owen reconoció a Paget como el descubridor, y éste permitió a Owen que la denominara, quizás a cambio del prestigio y peso profesional que aportaba. En 1895 Railliet propone el cambio de nombre de esta especie por el de *Trichinella spiralis*, ya que *Trichina* había sido aplicado a un género de mosca en 1830 (Gould, 1945).

Entre 1840 y 1862 numerosos investigadores como Dujardin, Von Siebold, Leidy, Herbst, Kuchenmeister, Virchow, Zenker y Friedreich, esclarecen el ciclo biológico y la patogenicidad de la enfermedad.

La enfermedad es reconocida en los años siguientes en varios países, y sus sucesivos brotes, a veces con altos índices de mortalidad, alarman y conciencian rápidamente a la opinión pública.

La inspección triquinoscópica se fue implantando y a finales del siglo XIX era una práctica común en Europa.

Hace más de siglo y medio del descubrimiento de *Trichinella spiralis* y desde entonces hasta nuestros días el interés suscitado por este nematodo ha sido enorme, tanto desde el punto de vista sanitario por la zoonosis que produce como por su idoneidad como modelo de laboratorio para el estudio de otras helmintiasis y de su biología celular.

### 3.3. CICLO BIOLÓGICO DE *Trichinella* spp.

El ciclo biológico de *Trichinella* spp. se caracteriza porque el mismo hospedador actúa como hospedador definitivo, en una de las fases del ciclo que tiene lugar a nivel intestinal, con el paso de las formas larvarias hasta adultos y la reproducción sexual de éstos, y como hospedador intermediario en una segunda fase, de ubicación muscular, con el asentamiento de estas formas larvarias y su posterior evolución hasta el estadio infestante para un nuevo hospedador. Este tipo de ciclo recibe el nombre de "autoheteroxeno".

Tanto en la fase enteral como en la parenteral, el parásito induce cambios estructurales y químicos significativos. La larva infestante (L<sub>1</sub>) ubicada en el tejido muscular estriado, en unas estructuras altamente organizadas, produce una gran modificación en las células musculares (Purkenson y Despommier, 1974). La vida de esta L<sub>1</sub> en estado "de espera" puede ser tan larga como la vida del hospedador.

En contraste, los gusanos adultos se sitúan en las células del epitelio columnar o epitelio simple cilíndrico de la mucosa intestinal, tanto en células caliciformes como enterocitos o células absortivas, sobre todo en la base de las vellosidades, encontrándose directamente en el citoplasma, no apareciendo rodeadas de membrana del hospedador (Gardner, 1976; Wright, 1979).

Esta fase intestinal es transitoria, permaneciendo de varias semanas a meses, dependiendo de la capacidad de la respuesta inmunitaria a cada cepa de las distintas especies de hospedadores (Wakelin y Denham, 1983; Bell, 1985). Así, cuando *T. spiralis* parasita a ratones desnudos (Ruitenberg, 1977) las formas adultas permanecen en el intestino durante toda la vida del hospedador.

Los nuevos embriones constituyen la fase no intracelular y existen principalmente como formas libres, dentro del lumen de vasos sanguíneos y linfáticos. Sin embargo, estos embriones en su comportamiento, tienden a infectar células del músculo esquelético y a menudo penetran en células en las cuales no llegan a formar quistes como cerebro, corazón, riñón, entre otros.



**Fig. 1.** Hembra adulta de *Trichinella spiralis* Se pueden observar numerosos embriones en su útero (flechas). Su tamaño es de 3 mm de largo y 0,36 µm de diámetro.

### 3.3.1 Fase intestinal.

La transmisión del parásito de un individuo a otro se realiza casi exclusivamente por la ingestión del tejido muscular infectado con larvas ( $L_1$ ) enquistadas. Aunque se han descrito otras vías de infección, éstas son excepcionales.



**Fig. 2.** Macho adulto de *Trichinella spiralis*. Su tamaño aproximado son 1,5 mm de largo y 0,36  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Normalmente cuando un hospedador susceptible (Despommier, 1983) ingiere tejido muscular infectado por *Trichinella*, se produce un proceso de digestión por acción de la pepsina y del ácido clorhídrico del estómago, proceso que dura unos minutos, durante el cual la larva no sufre ningún desarrollo.

Una vez liberada, la  $L_1$  rápidamente penetra en la mucosa intestinal, produciéndose una modificación en estas células para constituir el alojamiento de las larvas, en lo que se denomina "nicho intramulticelular" (Despommier, 1983; Capo y col., 1984).

El nicho intracelular realmente consiste en una fila de células del epitelio columnar dentro de las cuales la larva se introduce. Ya que la larva  $L_1$  mide aproximadamente 1 mm de longitud por 35-38  $\mu\text{m}$  de diámetro, y cada célula columnar mide aproximadamente 32  $\mu\text{m}$  por 8,5  $\mu\text{m}$ , cada gusano ocupa aproximadamente 117 células columnares durante la fase intestinal (Campbell, 1983).

Aunque se han citado varias localizaciones que pueden servir como nicho intramulticelular, es generalmente el duodeno donde se localiza el mayor número de larvas.



**Fig. 3.** Microfotografía de hembra gravida, en la que los embriones salen del útero (flecha)

Una vez en su nicho intramulticelular, las  $L_1$  sufren cuatro mudas, que se completan en un espacio de 30 horas, alcanzando el estado juvenil. Una vez llegados a la madurez sexual se

produce rápidamente el apareamiento, presumiblemente dentro de la mucosa intestinal (Despommier, 1983).

Parece ser que los machos son los primeros en ser expulsados, así, la autocuración y sus comienzos pueden comprobarse por la permanencia de la meseta intestinal de adultos y análisis de la relación sexual, si bien existen estudios que demuestran la permanencia de machos una vez que las hembras han sido totalmente eliminadas (SanMartín Durán y col., 1980).

Una vez fecundadas las hembras, en el interior de los huevos, se desarrollan las L<sub>1</sub>, eclosionan en el interior del útero y posteriormente son eliminados por la vulva. Esta larviposición se realiza en el epitelio, desde donde las larvas migran a vénulas y vasos linfáticos.

### 3.3.2 Fase migratoria.

El comienzo de la fase migratoria depende de la especie hospedadora. Una vez que las L<sub>1</sub> abandonan el útero de las hembras, son transportadas rápida y pasivamente a los músculos, las larvas atraviesan la lámina propia del intestino, alcanzan los vasos linfáticos, vía vena cava superior llegan al corazón y por la aorta se incorporan a la sangre arterial para ser distribuidas por todo el organismo. El pico de aparición de L<sub>1</sub> en sangre oscila entre el día 9<sup>o</sup> post-infección (Harley y Gallichico, 1971) y el día 12<sup>o</sup> (Yang y col., 1984).

La fase de emigración es el único período, junto con el breve tiempo en el cual las L<sub>1</sub> permanecen en el estómago tras la infección, en el que *Trichinella* se comporta como un parásito extracelular.

A pesar de que se han descrito infecciones transitorias en células de diversos órganos, únicamente las células del tejido muscular estriado constituyen el nicho intracelular adecuado para que continúe el desarrollo de la larva, a partir de este momento *Trichinella* se convierte de nuevo en un parásito intracelular.

Existen numerosos trabajos sobre los músculos más frecuentemente infectados, de los cuales se concluye que los músculos que tienen mayor actividad son los más altamente parasitados (diafragma, maseteros, intercostales, bíceps, tríceps, flexores y extensores de carpo y tarso, linguales, faríngeos, etc.).

### 3.3.3 Fase muscular.

Durante esta fase intracelular, las larvas aparecen asociadas al citoplasma de la célula hospedadora (Despommier, 1975). Durante la pausa que se produce en su ciclo de desarrollo (días 3º y 4º post-penetración), el nicho intracelular muestra una nueva disposición, produciéndose cambios estructurales de forma que la célula hospedadora pierde las características de fibra muscular y adquiere las características de una nueva entidad, la "célula nodriza" (Backwinkle y Themann, 1972; Despommier, 1975).



**Fig. 4.** Complejo parásito-célula nodriza. La estructura mide 200µm. (Grave, E.)



**Fig. 5.** Diferenciación de la célula nodriza (Despommier)

El crecimiento de la larva dentro de su nicho, es sobre todo debido al crecimiento de su esticosoma (Despommier, 1973; Bruce, 1974). El gusano enrollado en el interior de su célula nodriza, alcanza así la situación "de espera" antes de reiniciar una nueva fase entérica en otro hospedador.

El tiempo necesario para la calcificación de los quistes varía considerablemente en función de la especie hospedadora; en general se admite que las larvas permanecen viables durante largos períodos de tiempo en el interior de los quistes calcificados.

## 4. BENCIMIDAZOLES EN LA QUIMIOTERAPIA ANTIHELMINTICA.

### 4.1. CRONOLOGIA.

La base que despertó el interés sobre los sistemas de anillos bencimidazólicos, como núcleo para el desarrollo potencial de agentes quimioterápicos, se estableció en la década de los cincuenta cuando se descubrió que el 5,6-dimetil-1-(D-ribofuranosil)-bencimidazol era parte integrante de la molécula de vitamina B<sub>12</sub>. Como resultado del intenso estudio de este elemento resultó beneficiada un área de salud, la encargada del tratamiento de enfermedades parasitarias.

Dado el gran índice de infecciones provocadas por parásitos tisulares, y su difícil quimioterapia, se han realizado numerosos estudios utilizando modelos experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro*, encaminados al descubrimiento de nuevos fármacos y mejora de las moléculas ya existentes, intentando en lo posible reducir costes.

Se han realizado numerosos ensayos para conocer la relación estructura actividad del núcleo bencimidazólico sobre la fase muscular de *T. spiralis*. De uno de estos estudios entre varios bencimidazol carbamatos sustituidos en posición 2 y 5, Ozeretskovskaja y col., 1.971; Kolosova y col., 1.976; Bekisk y col., 1.979, concluyeron que la mayor actividad la tenían los 2-aril o 2-alquil carbamatos, y entre los primeros, los orto-sustituidos; siendo el sustituyente en orto un halógeno o un heteroátomo en el anillo. Entre los alquil-bencimidazoles-2-carbamatos, la mayor eficacia se encontró con el metil carbamato, disminuyendo la misma a medida que la cadena alquílica es más larga.

En cuanto a la actividad comparada de los bencimidazoles sustituidos en 5, Spaldova y Corba, 1.979, observan que la sustitución del carbono (mebendazol, flubendazol) unido al radical cíclico en 5 por un azufre (fenbendazol, oxfendazol), resulta en una disminución o



pérdida completa de actividad sobre larvas musculares, mientras que si el azufre se introduce en una cadena alifática (albendazol) se mantiene la eficacia, la cual se pierde cuando se sustituye el azufre por un oxígeno (oxibendazol); así

concluyen que fenbendazol (excepto a dosis altas), oxibendazol y oxfendazol sólo son activos sobre la fase intestinal de *T. spiralis*, mientras que parbendazol, mebendazol, cambendazol y albendazol lo son sobre ambas fases, intestinal y tisular.

Gómez Barrio y col. 1986 realizaron importantes aportaciones sobre la adaptación de *Trichinella* al cribado farmacológico *in vivo* e *in vitro*, para lo cual valoraron la actividad antihelmíntica de albendazol, mebendazol, oxfendazol, oxibendazol y parbendazol sobre *T. spiralis* y *T. pseudospiralis*, encontrando que el albendazol era el fármaco más activo *in vitro*; mientras que *in vivo* era el mebendazol el más activo frente a la fase parenteral, seguido de parbendazol, fenbendazol y finalmente albendazol.

Posteriormente Latif-La y Surin, 1.993, utilizaron este modelo experimental en la fase de preadultos y adultos para el cribado comparado de 8 bencimidazol carbamatos: mebendazol, flubendazol, oxibendazol, oxfendazol, albendazol, 7090163 proflubendazol, 708118 "cianido"

bencimidazol y 78012 "selenio" bencimidazol, administrados oralmente a ratones. Compuestos con el sustituyente en posición 5 portador de un átomo de carbono, azufre, oxígeno, resultaron más potentes que aquellos cuyo sustituyente era selenio o un grupo CN, además su eficacia era mayor en la fase enteral inmadura que en gusanos adultos. Estos mismos autores resaltaron la importancia de este modelo en el desarrollo de nuevos derivados bencimidazólicos, con una posible actividad frente a parásitos tisulares como pueden ser las filarias.

Todos los autores que han estudiado el efecto triquinelicida de los bencimidazoles sobre la fase intestinal, coinciden en señalar que a medida que los vermes maduran en el intestino, su susceptibilidad al tratamiento se ve disminuida. Existen un número de factores, extensibles a otros helmintos, que pueden influir en la respuesta al tratamiento de la fase entérica: mudas, variación en la localización de los vermes con respecto a la mucosa o diferencias

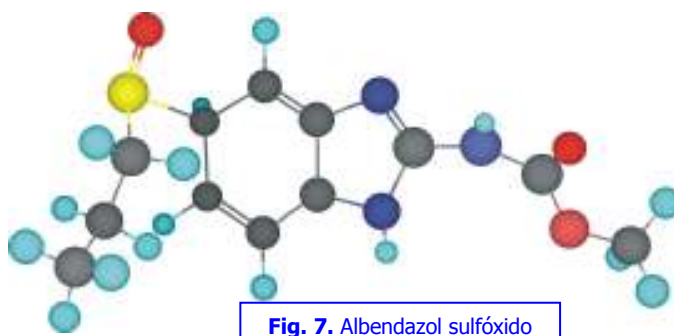


Fig. 7. Albendazol sulfóxido

bioquímicas básicas en el metabolismo energético entre los estados larvario y adulto, (Campbell, 1.967). Así, los vermes inmaduros que utilizan vías fermentativas casi exclusivamente deben ser particularmente vulnerables a la acción quimioterapéutica de aquellos antihelmínticos que inhiben el sistema de la fumarato reductasa y sus reacciones asociadas a la fosforilación oxidativa (McCracken, 1.978).

*T. spiralis*, ha sido utilizado como modelo experimental, para determinar el modo de acción de bencimidazoles y derivados, bien a nivel citoesquelético (Jiménez-González, 1.991), bien por su acción a nivel microsomal, por inhibición de algún sistema enzimático (Rodríguez-Cabeiro, 1.985; Criado Fornelio, 1.987).

Por último, destacar que la presencia de parásitos, puede modificar las condiciones del hospedador al cual parasita, produciéndose en consecuencia, una modificación en la farmacocinética del medicamento, que puede tanto potenciar sus efectos secundarios, como hacerlo ineficaz. Dada la importancia de la monitorización de los fármacos en un hospedador, se han realizado estudios de comportamiento de bencimidazoles y derivados en el modelo *T. spiralis*/ratón, para establecer la influencia que ejercen los distintos cambios estructurales que sufren las células del hospedador, en la evolución de los distintos bencimidazoles (Velebný, 1992 a, 1992 b); así cambios producidos en el pH intestinal influyen en la absorción y excreción de fármacos; los procesos inflamatorios afectan a la constante de eliminación y aclaramiento;

por último, cambios en la estructura del músculo estriado modifican la distribución de estos fármacos.

Estudios posteriores realizados sobre rata Wistar, utilizando un modelo de isquemia/reperfusión, considerado como modelo inflamatorio, han mostrado una reducción en la absorción y metabolismo del albendazol, concluyendo por tanto que los procesos fisiopatológicos que implican respuesta inflamatoria afectan a la biotransformación de algunos fármacos modificando su comportamiento farmacocinético. (Molina, 2007)

Recientemente se han realizado estudios en musmón (*Ovis musimon*) infectados con *Dicrocoelium dendriticum* y tratados con albendazol, donde se ha estudiado la alteración en los procesos de biotransformación de enzimas hepáticos, observándose que en los animales infectados se producía un incremento en la biotransformación hepática de albendazol. La velocidad de formación de albendazol sulfóxido y sulfona se incrementó significativamente (Skalova, 2007). Estos cambios obviamente pueden tener consecuencias farmacológicas, toxicológicas o fisiológicas.

#### 4.2. SINTESIS DE BENCIMIDAZOLES.

El bencimidazol como su nombre indica, es un anillo bicíclico en el cual el benceno se ha unido a las posiciones 4 y 5 del heterociclo (imidazol). Los compuestos bencimidazólicos en general, y bencimidazol carbamatos en particular, son materiales cristalinos, con un gran número de cristales completamente fundidos y relativamente insolubles en agua. Aquellos compuestos en los que no están sustituidos los átomos de nitrógeno del imidazol poseen características tanto ácidas como básicas.

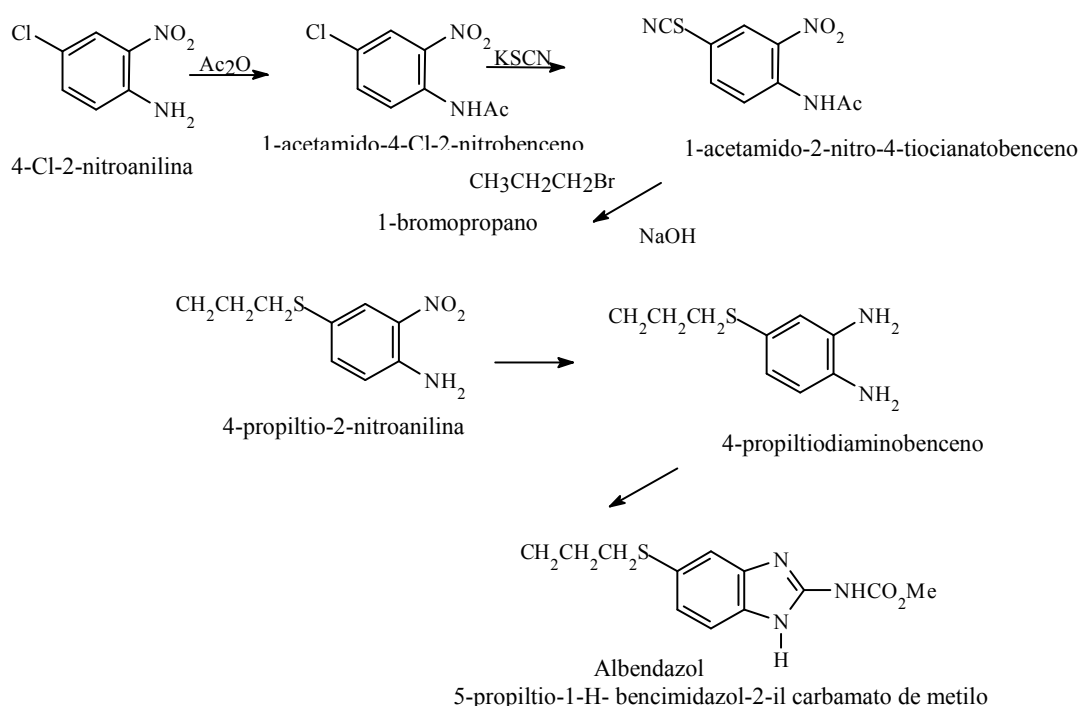
Las modificaciones del anillo bencimidazólico han sido realizadas durante la búsqueda de nuevos fármacos con actividad antihelmíntica. Combinaciones y modificaciones realizadas sobre las posiciones 2 y 5 de la molécula, han sido las que han dado la mayor parte de fármacos activos.

El descubrimiento en 1.961 del 2-(4-tiazolil) bencimidazol (tiabendazol), el cual posee un amplio espectro de acción frente a parásitos gastrointestinales, fue el punto de partida que abrió una nueva era en el tratamiento de las helmintosis parasitarias.

En los estudios iniciales, un grupo de investigadores de Merck preparó tiabendazol por condensación de orto-fenilendiamina con tiazol-4-carboxamida en presencia de un agente deshidratante, ácido polifosfórico.

Más tarde se descubrió que tanto tiabendazol como el 2-fenilbencimidazol sufrían una hidroxilación enzimática en la posición 5 para dar un compuesto inactivo y por lo tanto limitaba su efectividad. Para superar este problema, los investigadores comenzaron a preparar la segunda generación de bencimidazoles con una serie de modificaciones estructurales que permitieran prevenir esta inactivación por metabolismo. Este estudio permitió encontrar gran cantidad de bencimidazoles antihelmínticos (cambendazol, parabendazol, mebendazol, cicloabendazol, albendazol, oxibendazol, fenbendazol y oxfendazol), y muchos métodos de preparación.

#### 4.2.1. Síntesis del albendazol.



Los pasos requeridos para la síntesis del albendazol muestran como el anillo bencénico puede ser modificado antes de su inclusión en el sistema bencimidazol. La molécula de 4-cloro-2-nitroanilina, es acetilada con anhídrido acético para dar 1-acetamido-4-cloro-2-nitrobenceno. Tratado posteriormente con tiocianato potásico da lugar al intermedio 1-acetamido-2-nitro-4-tiocianatobenceno. En el siguiente paso se producen de forma simultánea 2 reacciones, por un lado la conversión del grupo tiocianato y por otro la eliminación del acético dejando el grupo amina libre, esto se lleva a cabo mediante el 1-bromopropano en presencia de una base (NaOH). La reducción del grupo nitro de la posición 2 da lugar a la formación de una diamina, la cual se cicla dando lugar a la molécula de albendazol.

#### 4.3. MECANISMO DE ACCION DE BENCIMIDAZOLES.

En general el mecanismo de acción de los agentes antihelmínticos, está estrechamente relacionado con aquellas funciones que resultan vitales para el parásito. Los requerimientos fisiológicos para la supervivencia de los nematodos adultos parásitos está restringido a mantener los niveles energéticos apropiados, vía catabolismo de carbohidratos y a mantener un lugar apropiado de alimentación, vía coordinación muscular.

La generación de energía en helmintos envuelve un proceso de fermentación anaeróbica, en el cual la ingesta de glucosa es reducida a ácidos orgánicos y a alcohol, siendo esta energía utilizada por el parásito para su motilidad y reproducción. Diferencias en las enzimas implicadas en la respiración y en sistemas de producción energética entre parásito y hospedador, han sido dianas potenciales en la quimioterapia antiparasitaria.

La mayoría de los antihelmínticos disponibles ejercen un efecto antiparasitario por interferir con:

- Metabolismo energético de parásito.
- Coordinación neuromuscular.
- Función microtubular.

Un sitio específico de interferencia en el metabolismo energético es la fosforilación oxidativa de ADP a ATP, para la cual es preciso la penetración del medicamento en la mitocondria del parásito.

La acción sobre la coordinación neuromuscular es debida a la hiperpolarización de la célula muscular, que será consecuencia de una elevación en la permeabilidad de membrana a los iones cloruro. Este fenómeno es más fácilmente observable en estudios *in vitro* (Delatour y col, 1988) y se traduce en una parálisis espástica del helminto.

Los primeros estudios sobre el modo de acción de bencimidazoles apuntaban hacia el metabolismo de carbohidratos. Recogidos en la bibliografía existen numerosos datos que avalan esta teoría, estudiando comparativamente el efecto de varios bencimidazoles sobre cepas bencimidazol-resistentes y susceptibles de *H. contortus*.

Lacey, 1988, en una revisión bibliográfica expone una acción de distintos bencimidazoles sobre el metabolismo anaerobio, mediante la inhibición del enzima fumarato reductasa por tiabendazol, impidiendo que el NADH en presencia del enzima fumarato reductasas se oxide,

bloqueando así, la oxidación celular y el transporte de electrones a nivel de la célula (Prichard, 1973); para cambendazol, fenbendazol, oxfendazol y mebendazol se encontró una baja sensibilidad en aislamientos bencimidazol-resistentes (Malkin y Camacho, 1972; Romanowski, Rhoads, 1975; Rahman y Bryant, 1977).

Los bencimidazoles y sus derivados también han demostrado inhibir la recaptación de glucosa tanto *in vivo* como *in vitro* en numerosas especies de helmintos tales como *A. suum*, *T. spiralis*, *S. mansoni*, *M. expansa* e *H. diminuta*, en algunos casos asociado a la depleción de los niveles de glucógeno compensatorio de los parásitos, reserva energética indispensable; este efecto, junto con la acumulación de acetil-colinesterasa, ha sido también observado con albendazol, parbendazol, oxibendazol y oxfendazol. Una inhibición en la captación de glucosa fue vista también en *F. hepática*, *T. colubriformis*, *N. dubius*, e *H. contortus* (Behm y Bryant, 1985).

Sin embargo Lacey concluye que los diversos efectos de los bencimidazoles, tanto a nivel bioquímico como celular, se deben fundamentalmente a la interacción de este fármaco con una proteína del citoesqueleto eucariota, la tubulina.

Estudios recientes han demostrado que este mecanismo es el más importante ya que, tanto la inhibición del enzima fumarato reductasa como el transporte de glucosa, que afectan al metabolismo energético, van a originar una alteración de los microtúbulos citoplasmáticos, por acción de los fármacos sobre la tubulina, produciendo entonces la autólisis de la célula.

La tubulina es la subunidad funcional de los microtúbulos, que participan en funciones tan importantes como el transporte de materiales dentro de la célula. Si los bencimidazoles inducen la desaparición de los microtúbulos, se produce un bloqueo en el transporte de vesículas secretoras en las células del tegumento o intestino de los helmintos, lo que ocasiona alteración en las membranas, seguido de una disminución en la absorción y digestión de los nutrientes.

Si bien está clara la importancia de los microtúbulos en la división celular de eucariotas, cabe destacar el efecto metabólico que esta proteína citoesquelética tiene de forma directa o indirecta en la homeostasis celular.

El microtúbulo, como su nombre indica, es un orgánulo tubular hueco, con un diámetro aproximado en su lumen de 15 nm, diámetro externo de 25 nm y longitud variable. Por microscopía electrónica se observa que el microtúbulo comprende series de 13 protofilamentos. Esto es característico de microtúbulos de mamíferos *in vivo*, pero es dependiente de la especie.

Así, en nematodos el número de protofilamentos ha sido caracterizado para especies de vida libre, siendo series de 11 las más comúnmente observadas.

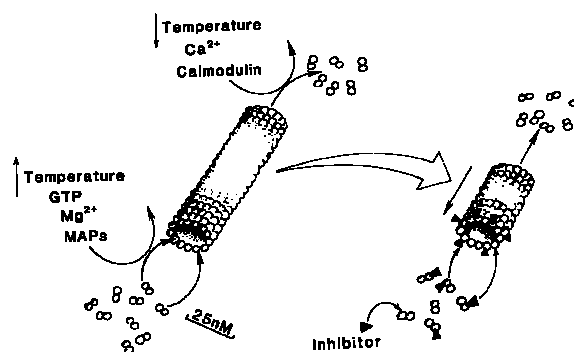
La subunidad microtubular, tubulina, es una proteína dimérica, compuesta por una subunidad  $\alpha$  y otra  $\beta$  de aproximadamente 50 KDa cada una. Estructuralmente las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son proteínas heterogéneas producto de familias multigenes y de modificaciones post-transduccionales. Se ha realizado un análisis de la secuencia de tubulinas de una gran variedad de especies y estas muestran un alto grado de homología.

La unión de los microtúbulos ocurre vía polimerización de la tubulina, un proceso dinámico que requiere GTP, Hay tres fases diferenciadas:

- Nucleación, la formación del núcleo de un corto microtúbulo.
- Elongación, la adición de dímeros de tubulina  $\alpha\beta$  u oligómeros de la misma para el crecimiento de la cadena microtubular.
- Estado estacionario, en el que se desarrolla un equilibrio dinámico donde no hay un cambio neto en la longitud del microtúbulo.

En el estado estacionario, es donde se piensa que hay una constante adición de tubulina en un extremo del microtúbulo que se balancea con una pérdida de tubulina en el otro extremo.

Los microtúbulos y la tubulina se encuentran en equilibrio dinámico, los niveles de tubulina dimérica y microtúbulos poliméricos son controlados por proteínas reguladoras endógenas y cofactores. De hecho, la formación de tubulina oligomérica es esencial *in vitro* para la unión a los microtúbulos. Este equilibrio puede verse alterado tanto *in vivo* como *in vitro*, por sustancias exógenas conocidas como inhibidores microtubulares. La mayoría, aunque no todos los inhibidores, ejercen su acción uniéndose a la tubulina, previniendo de este modo la asociación entre ellas y el consiguiente crecimiento o formación de microtúbulos. Esto genera una especie de decapación



**Fig. 8.** Los microtúbulos establecen un estado estacionario con fusión-depleción de dímeros de tubulina.

por parte del microtúbulo, ya que por un lado se impide la unión de nuevas subunidades de tubulina y por el otro el propio microtúbulo en su zona terminal continua su disociación, con la consiguiente disminución de su longitud. La regulación de este equilibrio *in vitro* se lleva a cabo

a través de cofactores endógenos tales como GTP,  $Mg^{2+}$ , proteínas de asociación microtubular (MAPs),  $Ca^{2+}$  y calmodulina. Aquí el aumento de temperatura favorece la polimerización, mientras que la reducción induce la despolimerización.

La tubulina contiene sitios de unión de alta afinidad para el  $Mg^{2+}$  y el  $Ca^{2+}$ . Estos iones *in vitro* tienen acciones opuestas, mientras que el  $Mg^{2+}$  se requiere para la unión de tubulinas, el  $Ca^{2+}$ , bien libre o formando complejos con la calmodulina, inhiben la unión e inducen la despolimerización.

Una implicación de este fenómeno es que no es necesario inhibir la unión de todos los dímeros de tubulina para inhibir la polimerización, basta con inhibir simplemente una capa de microtúbulo.

Los inhibidores microtubulares son un grupo de compuestos de diversa estructura producidos por hongos, plantas, organismos marinos, posiblemente por eucariotas superiores y más recientemente de forma sintética. Todos ellos muestran un amplio espectro de actividad y toxicidad no selectiva frente a los eucariotas. De hecho, algunos inhibidores bien caracterizados, como la vinblastina y vincristina han encontrado un uso específico en la quimioterapia del cáncer, si bien la mayoría son demasiado tóxicos para su uso en terapéutica.

Para apreciar la importancia del mecanismo de inhibición microtubular, es necesario considerar la naturaleza del equilibrio tubulina-microtúbulo, no sólo como un proceso bioquímico aislado, sino formando parte de la célula eucariota y el organismo en general.

Un número importante de funciones de los microtúbulos a nivel celular han sido descritas:

- División celular.
- Mantenimiento de la forma celular.
- Motilidad celular.
- Secreción celular.
- Absorción de nutrientes.
- Transporte intracelular.

La ruptura del equilibrio tubulina-microtúbulo puede ser visto como una inducción a una cascada de cambios bioquímicos y fisiológicos que de una manera directa o indirecta dan como resultado la pérdida de la homeostasis celular.

Borgers y De Nollin fueron los primeros en hablar acerca de la desintegración de la matriz de microtúbulos en células intestinales de *Ascaris suum* tratadas con mebendazol. Estudios posteriores confirmaron esta observación en otras especies de helmintos sensibles a los bencimidazoles. Al mismo tiempo investigadores de Janssen Pharmaceuticals indicaron que el nocodazol (un análogo del mebendazol) era un potente inhibidor de la polimerización de tubulinas en mamíferos. Mayor evidencia del mecanismo de acción de bencimidazoles tubulina-dependientes se obtuvo en estudios de polimerización sobre tubulinas cerebrales de ganado ovino y bovino.

Analizando todos estos estudios, se observó que existía una selectividad de los bencimidazoles hacia la tubulina de helmintos, manteniendo bajos niveles de toxicidad para la tubulina de mamíferos. La primera hipótesis que apareció a este respecto fue avanzada por Friedman y Platzer en 1980, donde indicaban que tanto fenbendazol como mebendazol eran más potentes como inhibidores de la tubulina de *Ascaris suum* que de la tubulina de mamíferos.

Kohler y Bachmann, 1981, concluyeron que la selectividad de los bencimidazoles estaba relacionada con la diferente farmacocinética del fármaco entre el hospedador y el parásito. De hecho se llega a comparar la afinidad y fuerza de unión de la tubulina de helmintos con los bencimidazoles, con la del enlace tubulina de mamíferos-colchicina, que es un potente inhibidor. Tanto es así, que el complejo tubulina-bencimidazol, al igual que el complejo colchicina-tubulina cerebral de mamífero es pseudoirreversible y aunque el enlace no es covalente, una vez unido, el ligando no puede retirarse fácilmente sin desnaturalizar la proteína.

Sin embargo, otros autores indican diferencias entre las formas isomórficas de las tubulinas de mamíferos y nematodos parásitos (Tang y Prichard, 1988; 1989), lo que podría explicar la diferente interacción de los bencimidazoles con las tubulinas en parásitos y hospedador. Estudios realizados con oxfendazol y tiabendazol mostraron una tan baja afinidad por la tubulina de mamíferos, que resultaba insuficiente para bloquear la polimerización tubular. No obstante, se han realizado estudios *in vitro* en los que se ha observado que el albendazol es un potente inhibidor de la proliferación de células cancerígenas (Pourgholami y col., 2000; 2006) (Morris, 2001).

La explicación de esta selectividad puede estar relacionada con la estabilidad de los enlaces carbónicos. Estos son característicos de los bencimidazol carbamatos sustituidos en la posición 5, sin embargo, aquellos bencimidazoles no sustituidos o sin enlaces carbónicos estables también presentan cierta afinidad por la tubulina de helmintos.

Esta selectividad demostrada en cuanto al enlace de los bencimidazoles a la tubulina de helmintos genera un argumento fundamental para entender a ésta como el lugar de acción de estos fármacos.

#### 4.3.1. Lugares específicos de unión.

Aquellos compuestos que perturban la unión de los microtúbulos e inhiben la mitosis, tienen profundos efectos en el crecimiento celular. Los inhibidores mitóticos son selectivamente tóxicos para las células en proliferación, ya que aquellas células que no sufren división, no requieren la separación mitótica provocada por los centríolos y por lo tanto son resistentes. Muchos inhibidores mitóticos han encontrado utilidad clínica como agentes antitumorales.

Hay diferentes mecanismos por los cuales los inhibidores mitóticos pueden romper el microtúbulo. Algunos compuestos se unen a la tubulina e impiden su incorporación a los polímeros, siendo la diana el proceso dinámico de estado estacionario del ensamblaje microtubular. Estos compuestos provocan la despolimerización microtubular y por lo tanto el bloqueo mitótico.

Los bencimidazoles actúan a nivel del sitio de unión de la colchicina, ésta es un derivado de la tropolona, y es un potente inhibidor de la mitosis celular. Su actividad antitumoral está limitada y por ello su principal uso es para el tratamiento de la gota. La colchicina es el clásico ejemplo de inhibidor mitótico que rompe la unión microtubular por enlaces de alta afinidad a lugares determinados o sitios de unión en el dímero  $\alpha\beta$  de la tubulina. La colchicina no tiene actividad en microtúbulos intactos, pero actúa sobre el estado estacionario perturbando el equilibrio dinámico. Tras la unión de la colchicina a la tubulina (a un sitio de unión diferente del sitio GTP), se piensa que existe un cambio conformacional para formar un complejo estable tubulina-colchicina, capaz de unirse al extremo en crecimiento del microtúbulo y bloquear posteriores uniones. De esta forma se previene el posible ataque de otros dímeros de tubulina a este extremo, y además se favorece la despolimerización del microtúbulo.

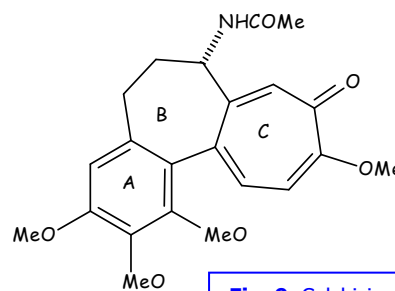


Fig. 9. Colchicina

Los elementos más importantes de la estructura de la colchicina que contribuyen a la unión a la tubulina son los anillos A y C. Una particular relación espacial entre estos anillos es necesaria. El anillo B no es necesario para el enlace, de hecho, derivados que sólo contienen los anillos A y C mantienen la actividad. Por otro lado, los metoxilos del C1 y del C10 son

necesarios para la unión, aunque la presencia de un grupo tiometil en el C10 puede ser tolerada. Los metoxilos de los carbonos 2 y 3 no son necesarios.

Otro inhibidor que bloquea al microtúbulo, es la podofilotoxina, esta sustancia es un alcaloide obtenido de una planta, capaz de unirse a un sitio especial superpuesto al lugar de unión de la colchicina. Al igual que esta, la podofilotoxina es una sustancia que previene la unión de los microtúbulos en la célula. El hecho de que la podofilotoxina y la colchicina se unan a dos lugares solapados en la tubulina, está soportado por dos hallazgos: la podofilotoxina impide la unión de la colchicina a la tubulina, y la tropolona (el anillo C de la colchicina) inhibe la unión de la colchicina, pero no de la podofilotoxina. Se piensa que la podofilotoxina se une a la tubulina a través del anillo trimetoxifenil, que es una estructura análoga a la de la colchicina.

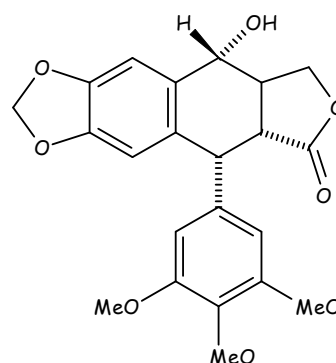


Fig. 10. Podofilotoxina

Los bencimidazoles, se unen a la tubulina, por los mismos lugares que colchicina y podofilotoxina. Los bencimidazoles inhiben competitivamente la unión de la colchicina a la tubulina, siendo el mebendazol el inhibidor más potente, y mostrando una afinidad por la tubulina mayor que la podofilotoxina.

Estudios recientes relacionan 6 aminoácidos de la  $\beta$  tubulina como los implicados en la sensibilidad a bencimidazoles.

El albendazol es efectivo frente a varios helmintos, protozoos y microsporidios, sin embargo es relativamente ineficaz frente a infecciones producidas por *Enterocytozoon bieneusi*. Una probable explicación para la resistencia clínica observada al albendazol fue descubierta a partir del análisis de secuencias de  $\beta$  tubulina de *E. bieneusi* aisladas de un ser humano y de un macaco de la India infectados. La  $\beta$  tubulina de este microsporidio tiene una sustitución en Glu(198), el cual es uno de los 6 aminoácidos que determinan la sensibilidad a bencimidazoles (Akiyoshi y col, 2007).

Por todo lo anterior, podemos concluir diciendo que en parásitos, la acción farmacológica de los bencimidazoles, consiste básicamente en una acción frente al equilibrio tubulina-microtúbulo, en el estado estacionario.

El conocimiento de la interacción fármaco-tubulina, de su eficacia y su modo de acción, permiten definir nuevas directrices en el desarrollo de nuevos fármacos que de alguna forma, exploten esta vía de acción.

#### 4.4. FARMACOCINETICA DE BENCIMIDAZOLES.

Los conceptos de farmacocinética y biodisponibilidad son importantes en la investigación biomédica de nuevos fármacos, así como en el uso clínico óptimo de nuevas formulaciones de los mismos. La farmacocinética estudia como el principio activo objeto de análisis se absorbe, distribuye, metaboliza y excreta en un organismo vivo. Por otra parte, la biodisponibilidad es un parámetro farmacocinético que nos indica la cantidad de medicamento que ha alcanzado la circulación general.

Para obtener un rendimiento máximo en cuanto a eficacia se refiere, tras la administración de un fármaco, debemos controlar una serie de parámetros referentes a la serie L.A.D.M.E.

##### 4.4.1. Administración, absorción y distribución.

Los agentes antihelmínticos son corrientemente administrados en dosis únicas por distintas vías. La baja solubilidad en agua de algunos ha sido el gran inconveniente para la elaboración de formulaciones de administración parenteral a animales domésticos, que no resultaran irritantes.

Asimismo, se ha sustituido el uso de dosis únicas simples por otras alternativas, como puede ser la incorporación del medicamento en la alimentación o en el agua de bebida, para su administración en dosis inferiores, pero en terapia prolongada. Un inconveniente mayor que el propio sistema de administración, sería la diferencia de consumo individual entre animales.

Existen otros sistemas de administración, en dosis únicas, mediante la inyección intrarumial (administración a nivel entérico por vía parenteral) (Borgsteede y Reid, 1982), disponibles comercialmente para oxfendazol, fenbendazol y albendazol. Esta permitiría una administración rápida y fácil, así como, evitaría la posibilidad de un "by pass" vía surco esofágico, tras la administración oral. Más recientemente se han desarrollado otras formas de administración, mediante un dispositivo, el cual queda retenido en el rumen, o más precisamente en el retículo adyacente. Estas liberan su contenido de una forma continua o pulsátil. El objetivo de estas formas de administración es reducir costes asociados al tratamiento de un gran número de animales, así gozan de una serie de ventajas como facilitar la administración, reduciendo la frecuencia de los tratamientos; prolongar la duración de la acción antihelmíntica manteniendo

unas concentraciones plasmáticas estables, evitando fluctuaciones y limitar los niveles residuales. Sin embargo surgen una serie de inconvenientes asociados a la aparición de formas de resistencia; la inducción enzimática acelera la degradación de medicamentos, pudiendo producir un daño potencial (Dorchies, 1990). Los diferentes regímenes de dosificación influyen en la actividad antihelmíntica de los fármacos, así la infusión continua de albendazol a ruminantes resulta más eficaz que la administración de dosis simples diarias (Kwan y col., 1988). Experimentalmente, también se han desarrollado modelos de administración intraperitoneal, buscando la disminución de la toxicidad sistémica del albendazol para aquellos procesos patológicos (carcinomatosis peritoneal) donde se puede producir una exposición prolongada a altas concentraciones del fármaco. En los ensayos comparados de esta vía frente a la oral se observa una disminución significativa en los niveles plasmáticos del principal metabolito del albendazol (albendazol sulfóxido) (Cai y col., 2007).

Si bien, muchos parásitos residen en el lumen gastrointestinal, otros se ubican en puntos más alejados del intestino como el hígado o los pulmones; donde, para que el antihelmíntico realice su acción, es esencial la absorción del mismo.

El epitelio gástrico, al igual que el epitelio intestinal, actúa como una barrera lipófila frente a la absorción del albendazol y mebendazol. Estudios *in vivo* realizados en ratas administrando albendazol mediante un método de perfusión intestinal con recirculación y a nivel gástrico sin recirculación (Prieto, 1988), demostraron una mayor absorción a nivel estomacal, alcanzando concentraciones mayores en sangre que cuando esta absorción se producía a nivel intestinal. Prieto indica que la absorción del albendazol es debida a un proceso de difusión simple; la baja absorción intestinal y gástrica del albendazol se debe a su limitada solubilidad en los fluidos gastrointestinales (Marriner, 1986; Prieto, 1991).

La absorción del albendazol a nivel estomacal es debida a que la solubilidad de éste es mayor en medios ácidos, luego podemos favorecer esta absorción enlenteciendo el vaciamiento gástrico, por una dieta rica en grasas (Ali, 1992). Coincidiendo con los resultados obtenidos por Marriner y col., 1986; Lange y col., 1988, en estudios farmacocinéticos con albendazol en humanos, observaron un aumento en la biodisponibilidad de éste cuando era administrado junto con alimentos grasos, sugiriendo además que el proceso de absorción requiere bilis y, en consecuencia, una circulación enterohepática anómala puede afectar a los procesos de absorción y eliminación, recomendando una monitorización de pacientes con equinocosis para prevenir efectos secundarios del antihelmíntico (Cotting y col., 1990).

Las interacciones producidas en la terapia con albendazol administrado junto con alimentos grasos han sido descritas por numerosos autores, así, Awadzi y col., en 1994, observan un

aumento de cuatro veces en la biodisponibilidad del albendazol, cuando se administran grasas junto con las comidas, a pacientes con oncocercosis. Homeida y col., en 1994, observaron un efecto sinérgico en cuanto a eficacia antiparasitaria frente a parásitos intestinales, al administrar praziquantel y albendazol en dosis de 40 mg/kg de peso y 400 mg/kg de peso, respectivamente, describiendo una modificación en el parámetro  $AUC_{0-\infty}$  ( $ABC_{0-\infty}$ ) para ambos fármacos según el tipo de terapia, así, en presencia de comida el AUC (ABC) de praziquantel se incrementó en 2,6 veces, 8 veces en el caso del albendazol; el AUC (ABC) de albendazol sulfóxido se incrementó en 4,5 veces tras la administración conjunta de ambos fármacos y 12 veces en la terapia conjunta combinada con comida grasa.

También se ha demostrado que el herbario en rumiantes, tras el tratamiento con albendazol, actúa como un depósito del fármaco, permitiendo mantener concentraciones plasmáticas durante períodos de tiempo prolongados. La producción de una forma amorfa de oxfendazol por tratamiento con ácidos (Chick y col., 1987) permitió que tras su administración oral, se produjese una rápida y completa absorción comparada con la forma cristalina; además se duplicó la actividad antihelmíntica.

Existen otras sustancias que, aunque no afectan a la cinética de absorción del albendazol (simple difusión), sí que producen una disminución en el grado de absorción; como en el caso del etanol, administrado de forma aguda o crónica a ratas (Justel y col., 1994) a excepción del etanol al 5 %, en cuyo caso se observa una mejor solubilización del fármaco.

Los procesos fisiopatológicos que implican respuesta inflamatoria pueden afectar la absorción y la biotransformación de algunos fármacos modificando su comportamiento farmacocinético (Molina y col, 2007).

Durante la fase intestinal de *T. spiralis*, se produce una disminución del pH debido al proceso inflamatorio, el cual favorece la solubilidad de los bencimidazoles y como consecuencia, una mayor biodisponibilidad biológica y una más lenta eliminación, mientras que la absorción no se ve influenciada (Velebný y col., 1992).

La mayoría de los compuestos bencimidazólicos muestran una unión a las proteínas plasmáticas menor del 50 % (unión del albendazol a seroalbúmina y hemoglobina bovina < 10 %; (Galtier y col., 1991)). Tanto el albendazol como sus metabolitos son ampliamente distribuidos, sulfóxidos y sulfonas penetran en las células sanguíneas y tejidos, debido a su diferente polaridad y liposolubilidad (Galtier, 1991; Lanusse y Prichard, 1993a); esta propiedad podría contribuir a una actividad antihelmíntica frente a parásitos localizados en tejidos como pulmón, sistema hepatobiliar y pared gastrointestinal.

#### 4.4.2. Metabolismo y excreción.

Los antihelmínticos bencimidazólicos son ampliamente metabolizados en todas las especies de mamíferos estudiados, siguiendo un patrón común, aunque los porcentajes de sus metabolitos varían sustancialmente (Delatour, 1986). Los bencimidazoles, tras su administración, se caracterizan por una corta semivida, con predominio de sus productos metabólicos en plasma y tejidos, así como, en excreciones (Fetterer y Rew, 1984; Gottschall, 1990). Los metabolitos se encuentran en orina o heces aunque la presencia en este último, se debe más a su baja absorción que a la excreción biliar.

Los metabolitos primarios son producto de un proceso de oxidación e hidrólisis, resultando moléculas más polares y solubles en agua que los productos de partida. Posteriormente se produce una fase de conjugación, importante en la detoxificación de los productos derivados de bencimidazoles. Los metabolitos producto de la oxidación e hidrólisis son conjugados con ácido glucurónico y/o sulfato, produciendo un incremento de polaridades (Hennessy, 1985, 1989), lo que facilita la excreción urinaria o biliar.

Estas reacciones son catalizadas por enzimas microsomales o citosólicas, siendo su actividad influenciada por factores externos (edad, sexo, patologías, asociaciones terapéuticas, etc.), con variaciones interindividuales o interespecíficas.

Las monooxigenasas de función mixta se encuentran ensambladas en el interior de la bicapa lipídica del retículo endoplasmático o en las mitocondrias. Estas, catalizan diversas reacciones de oxidación de sustratos tanto exógenos como endógenos.

El citocromo P450 microsomal es un elemento catalítico terminal de un sistema oxidativo de la cadena de transporte electrónico y requiere para su actuación la presencia de una reductasa, a la cual está íntimamente ligada.

Otras proteínas enzimáticas implicadas en las reacciones de fase I, son las flavín monooxigenasas, las cuales catalizan las N- y S-oxidaciones, las xantín-oxidasas y alcohol deshidrogenasas del citosol o las monoamino-oxidasas y glutatión-peroxidasas contenidas en las mitocondrias.

La presencia del átomo de azufre en bencimidazoles sustituidos en posición 5, les caracteriza para un proceso de sulfoxidación hepática, aunque el proceso de biotransformación por una oxidación en el heteroátomo nucleofílico de azufre puede producirse en otros tejidos. Fenbendazol, albendazol y triclabendazol administrados como tal o como profármacos (febantel

o netobimin), son metabolizados a sus respectivos sulfóxidos por las flavín monooxigenasas microsomales y a sulfonas por un proceso dependiente del citocromo P450 (Hennessy y col., 1987; Souhaili-El amri y col., 1987, 1988; Delatour, 1990 b; Lubega, 1991). La reacción inversa de reducción de sulfóxidos en sulfuros, se ha descrito en el tracto gastrointestinal para albendazol, triclabendazol y fenbendazol.

La hidrólisis de la función carbamato constituye la ruta de metabolización principal de flubendazol, fenbendazol y albendazol, permaneciendo su metabolito 2-amino sulfona y derivados, en los tejidos.

En algunos casos las reacciones metabólicas también afectan al anillo bencimidazólico, como el caso de la N-metilación de tiabendazol y albendazol (Galtier, 1991a). Los bencimidazoles que portan una cetona en posición 5, como mebendazol y flubendazol sufren una fuerte reducción a alcoholes por las cetona-reductasas.

Con respecto al albendazol, la presencia del átomo de azufre en la cadena lateral tiene una gran importancia en su metabolismo, puesto que la sulfoxidación de este átomo es la ruta metabólica más importante de este fármaco (Gyurik y col., 1981).

Estudios previos demostraron la existencia de un proceso oxidativo a nivel de los microsomas hepáticos de ratones (Douch y Buchanan, 1979), atribuyendo este proceso a un citocromo P450-dependiente de monooxigenasas, pero estudios posteriores demostraron, que la sulfoxidación del albendazol para convertirlo en su metabolito activo, albendazol sulfóxido, corría a cargo de un citocromo flavín monooxigenasa (FMO) (Ziegler, 1980; Hajjar y Hodgson, 1980) que a diferencia del P450, carece del grupo hemo.

En estudios *in vitro*, realizados con microsomas hepáticos de ratas, se apreció una rápida oxidación NADPH dependiente que originaba el sulfóxido (Fargetton y col., 1986). Los efectos producidos por agentes inductores e inhibidores de la sulfoxidación del albendazol han sido utilizados como método cualitativo para el análisis del papel del citocromo P450 dependiente de monooxigenasas y flavín monooxigenasas en el metabolismo de éste. Así la formación del sulfóxido se inhibe con clorpromacina, fenbendazol, metimazol, tiabenzamida y trianilcipromina (sustratos alternativos del FMO) mientras que metirapona, SKF525A, monóxido de carbono e imidazol (inhibidores clásicos del citocromo P450) no modifican la sulfoxidación. Estos datos sugieren que el proceso de sulfoxidación no es catalizado por un sistema P450 dependiente de monooxigenasas, sino que el sistema enzimático implicado corresponde a las flavín monooxigenasas.

La coadministración de ABZ e inhibidores de oxidasas microsomales, determina cambios importantes en el perfil farmacocinético del ABZ, con un aumento significativo de los parámetros  $C_{m\acute{a}x}$  y  $ABC_{0-48h}$ ; lo que se traduce en una mejora equivalente de su actividad farmacológica. Con el uso de la metirapona se alcanzan actividades antihelmínticas más altas que con el metimazol, sin embargo con éste los incrementos relativos de eficacia resultan claramente superiores (López García, 1997).

El empleo de metimazol produce una reducción en la producción de albendazol sulfóxido, principalmente a expensas de ABZSO (+), lo que contribuye a comprender mejor la enantioselectividad del metabolismo del albendazol (Solana, 2000).

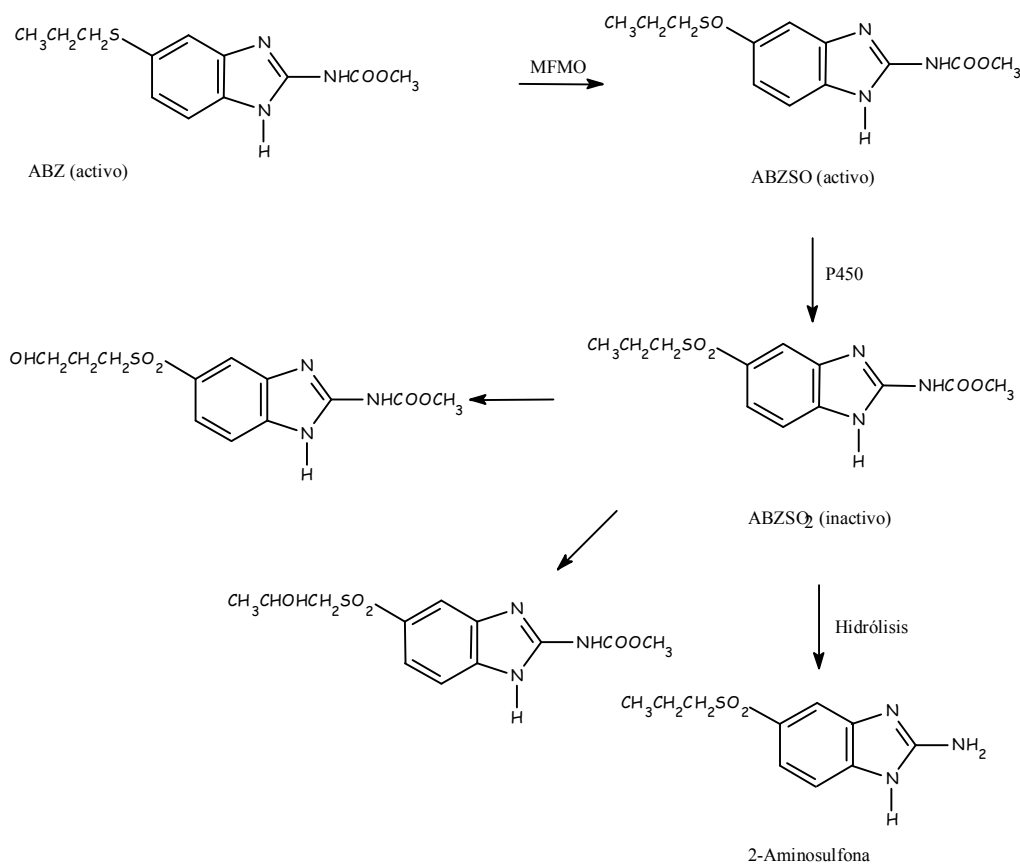
Por otro lado, el estado nutricional también afecta al metabolismo enantioselectivo, así, estados de desnutrición pueden afectar a la formación de ABZSO (+) mediado por FMO (Virkel, 2000).

Otros estudios sobre el metabolismo del albendazol, llevados a cabo por Amri y col., 1987; con microsomas de hígado de cerdo y con formas purificadas de los citocromos P450 y FMO indican que ambos sistemas contribuyen a la oxidación inicial del albendazol. La actuación del P450 se ve confirmada al reducirse la formación del sulfóxido por adición de un anticuerpo contra la reductasa P450.

Estudios recientes balancean la aportación de cada complejo enzimático, indicando que *in vitro*, el citocromo P450 contribuye en un 70% aproximadamente frente a un 30% del FMO, en la oxidación del albendazol a albendazol sulfóxido, siendo el componente CYP (CYP3A4) el principal grupo del complejo enzimático P450 (Rawden, 2000).

El citocromo P450, en una reacción bifásica, es el encargado de oxidar el sulfóxido a sulfona, en un segundo paso más lento e irreversible (Souhaili-El-Amri, 1988); sin embargo esta segunda fase puede variar en los diferentes hospedadores.

Si bien el citocromo P450 (CYP) induce el proceso oxidativo del albendazol, a su vez, tanto el albendazol como el albendazol sulfóxido muestran potencia inhibitoria sobre la actividad del enzima. Estudios realizados en microsomas hepáticos de ratas y musmón demuestran que el fármaco puede actuar tanto como inductor como inhibidor del mismo enzima (Baliharova, 2005).



Sucesivas oxidaciones del albendazol conducen a la formación de metabolitos más polares y menos activos. En términos de unión a las tubulinas del parásito, el modo de acción putativo de los bencimidazoles, el albendazol de partida es más potente que el sulfóxido, mientras que la sulfona es inactiva antihelmínticamente (Lacey, 1990; Lubega y Prichard, 1991). Por tanto la oxidación del albendazol a albendazol sulfóxido y posteriormente a sulfona, se traduce en una considerable disminución de la actividad antihelmíntica.

Tanto la sulfona como el sulfóxido son los metabolitos predominantes en plasma, siendo también los metabolitos mayoritarios en orina. Las proporciones de ambos varían según la especie en la que se realice el ensayo. Delatour y col., 1991; encontraron una menor biodisponibilidad del albendazol sulfóxido en cabras respecto a los valores encontrados en ovejas, lo que coincide con los valores obtenidos para el oxfendazol por Bogan y col., 1987.

La rápida aparición del albendazol sulfóxido en plasma es atribuible a un efecto de primer paso hepático, hecho por el cual el albendazol sólo se encuentra en sangre en trazas (Lanusse, 1991; Delatour, 1990; Lanusse y Prichard, 1990). La eficiente sulfoxidación *in vitro* del albendazol por los microsomas hepáticos del ganado ovino (Galtier, 1986) también puede ser explicado por la rápida desaparición del albendazol en plasma, tras la administración

intravenosa a ganado vacuno (Galtier, 1991). Sin embargo la sulfoxidación puede tener lugar también en el tracto gastrointestinal (Lanusse, 1992; Delatour, 1986), así como en tejidos y fluidos extrahepáticos (Galtier, 1991).

Por otra parte, puede existir un intercambio de ambos metabolitos: albendazol y sulfóxido, entre plasma y fluidos gastrointestinales por un proceso de difusión dependiente de pH (Lanusse, 1992b), o porque el sulfóxido sea segregado por la bilis, siendo reducido a albendazol por las bacterias gastrointestinales. Esta reducción puede ser de gran importancia para la terapéutica de parásitos gastrointestinales, por convertir el sulfóxido en el compuesto de partida, más activo farmacológicamente, de hecho; McKellar y Scott en 1990, encontraron eficacias similares para albendazol, sulfóxido y netobimin en el tratamiento de nematodos de ovejas y ganado vacuno.

Es importante señalar que la relación sulfóxido/sulfona es un buen indicador de la oxidación del producto de partida, así como de la relativa abundancia de ambos metabolitos en plasma. Esta relación decrece al administrar albendazol durante períodos de tiempo prolongado a ovejas, comparado con la administración de dosis únicas (Delatour, 1990), en ratas (Souhaili-El-Amri, 1988) y a humanos con equinococosis (Steiger, 1990); este hecho es atribuible a un proceso de autoinducción del sistema microsomal hepático, causado por la prolongada presencia de albendazol o sulfóxido, la cual conduce a un incremento en la sulfoxidación, produciendo un aumento de las concentraciones plasmáticas de sulfona y una disminución de sulfóxido. Esta inducción enzimática se evidenció por la medida de la actividad enzimática de monooxigenasas y su concentración por la técnica de E.L.I.S.A., antes y después del tratamiento sostenido con albendazol (10,6 mg/kg/día) a ratas (Souhaili-El-Amri, 1988), comprobándose un incremento en la actividad de monooxigenasas por el aumento en la concentración de la hemoproteína citocromo P450c. En líneas celulares de hepatoma en humano, sulfóxido y menos sulfona, inducen la actividad del citocromo P448 y UDP-glucuroniltransferasa. La administración de oxfendazol a conejos durante 10 días consecutivos a las dosis comprendidas entre 4,5 y 22,5 mg/kg/día, indujo un incremento de la concentración total del citocromo P450 hepático y más específicamente, de la familia P450IA y sus correspondiente monooxigenasas (Gleizes, 1991). El tratamiento del cultivo de hepatocitos de conejos con oxfendazol (10mM) induce los isoenzimas P450IA1, IA2 y IIIAG como lo demuestra el incremento de los niveles de ARNm que codifica para estos tres isoenzimas del P450 (Gleizes, 1991). En ratones la administración de una terapia sostenida con albendazol en presencia de inhibidores, disminuye las concentraciones plasmáticas de albendazol sulfóxido en relación a las terapias únicas, lo que puede indicar el efecto inductor de oxidación del albendazol sulfóxido por las altas concentraciones de albendazol alcanzadas (López García, 1998). Un efecto inductor

del metabolismo hepático por parte de bencimidazoles y sus sulfóxidos puede tener un impacto negativo en la eficacia clínica de estos compuestos.

La oxidación del albendazol para dar lugar a la sulfona es sin duda la ruta metabólica más importante, pero una vez que ha tenido lugar, existen otras rutas tan importantes como ésta. El metabolito 2-amino sulfona, consecuencia de la oxidación del azufre y la hidrólisis del grupo carbamato, se ha encontrado en todos los mamíferos en alto porcentaje, excepto en ratón. Existen otros metabolitos "sulfona" resultantes de la hidroxilación de la cadena lateral (Gottschall, 1990).

La presencia de parásitos puede modificar la capacidad de metabolizar fármacos y otros xenobióticos alterando las enzimas biotransformadoras, estos cambios pueden tener consecuencias farmacológicas, toxicológicas o fisiológicas (Skalova, 2007).

El porcentaje de excreción urinaria con respecto al total, también varía en las diferentes especies animales, alcanzando valores tan dispares como el 59,1 %, observado en vacas y el 19,5 % en ratones (Gyurik, 1981). El metabolito mayoritario en orina de vacas, ratones, ovejas y ratas es el albendazol, con porcentajes que varían entre el 22,9 % y el 26,6 %, mientras que la sulfona constituye tan sólo el 6 % de los metabolitos excretados. La excreción fecal del albendazol puede ser debida al porcentaje de fármaco no absorbido o a la existencia del ciclo enterohepático.

#### 4.4.3. Quiralidad molecular del albendazol sulfóxido.

Es interesante hacer referencia a los estudios que se han llevado a cabo a fin de comprobar la importancia de la quiralidad de los metabolitos sulfóxido del albendazol, ya que todos los pasos en farmacocinética se han descrito enantiómero dependiente (absorción, unión a receptores, biotransformación y aclaramiento), además la estereoquímica en terapéutica advierte que los enantiómeros exhiben efectos cuantitativa y cualitativamente diferentes.

La molécula de albendazol sulfóxido presenta un centro de asimetría ( $R\text{-SO-R}'$ ), lo que origina, que en distintas especies de animales tratados con albendazol, se hayan identificado dos enantiómeros (Delatour, 1990 a; 1991). En plasma de ovejas el cociente albendazol sulfóxido (+)/albendazol sulfóxido (-) extrapolado a tiempo cero fue de 75/25, sin embargo en ratas, perros y hombre apareció la mezcla racémica (Delatour, 1991 b), si bien, pasado el tiempo el enantiómero (+)R predominaba en perros y hombre, mientras que el (-)R lo hacía en ratas.

La administración de netobimin, precursor de albendazol, a ovejas mostró una relación ABZSO (+)/ABZSO (-) de 6 a 1, concluyendo que el netobimin es completamente transformado a albendazol por la flora gastrointestinal y el albendazol absorbido se metaboliza en sus metabolitos sulfóxido y sulfona. El comportamiento específico de los enantiómeros probablemente refleja la diferente enantioselectividad de los sistemas enzimáticos hepáticos responsables de la sulfoxidación y sulfonación del albendazol (Gokbulut, 2006)

Esta diferencia en la relativa concentración de cada enantiómero ha sido relacionada con la contribución que la flavín monooxigenasa y el citocromo P-450 tienen en el proceso de sulfoxidación del albendazol (Delatour, 1991). Estos autores han sugerido que el enantiómero (-), en mayor medida que el (+), podría ser el sustrato del citocromo P-450, para la formación de la sulfona, hecho que estaría relacionado con un incremento lineal en la concentración del enantiómero (+) en tiempos más tardíos, mientras que el sistema flavín monooxigenasa sería el responsable de la aparición de enantiómero (+). Este hecho fue descrito con anterioridad por Waxman, 1982; Light, 1982, mediante estudios *in vitro* al incubar el sustrato 4-tolil etil sulfóxido (estructura relacionada químicamente con el albendazol), con citocromo P-450 de ratas, obteniendo selectivamente el enantiómero (+), mientras que el segundo aisló el enantiómero (-), tras la incubación con flavín monooxigenasa. Probablemente, al menos en ratas, y posiblemente en perros y humanos (Delatour, 1991b), ambos sistemas enzimáticos actúen simultáneamente de modo que la concentración de albendazol sulfóxido extrapolado a tiempo cero sea la racémica.

La inhibición de los sistemas enzimáticos proporciona un mayor detalle de las implicaciones enantioselectivas, así se observa que la flavín monooxigenasa, mediadora en la sulfoxidación hepática del albendazol, es 100% enantioselectiva hacia el ABZSO (+), mientras que se encontró que el CYP450 estaba mayoritariamente implicado en la producción de ABZSO (-) en el hígado (Virkel, 2006).

Los cambios producidos en las concentraciones plasmáticas totales de (+)/(-) con el tiempo, podrían ser consecuencia de una enantioselectividad por el sustrato del citocromo P-450, dependiente de la reacción de sulfoxidación (Souhaili El Amri, 1988; Auret, 1968). De acuerdo con esta interpretación, la selectiva consumición de uno de los enantiómeros de albendazol sulfóxido es responsable del incremento proporcional de su antípodo.

La enantioselectividad en la excreción renal del ABZSO puede considerarse un mecanismo complementario al metabolismo responsable de la acumulación plasmática de ABZSO (+) (Lanchote, 2006).

Todavía se desconoce cual de estos dos enantiómeros es el principal responsable de la actividad farmacológica, aunque algunos autores apuntan hacia el albendazol sulfóxido (+) (Bogan, 1980; Delatour, 1991) por ser el enantiómero que mayormente se encuentra en el plasma, mientras que el enantiómero (-), lo haría en menor grado.

Esta teoría se ve respaldada por los estudios *ex vivo* realizados en modelo murino de *T. spiralis*, en el que las larvas se sometieron a incubación con los diferentes enantiómeros (+), (-) y racémico, evaluando su posterior capacidad infectiva. A bajas concentraciones únicamente el ABZSO (+) consiguió una reducción significativa en la viabilidad larvaria (Bolás, 2004).

## **5. UTILIDAD DE LAS CICLODEXTRINAS EN LA SOLUBILIZACION DEL ALBENDAZOL.**

El interés por la investigación de complejos y su aplicación en terapéutica a lo largo del siglo pasado ha ido en aumento. Comenzando por los primeros complejos inorgánicos, que tanta utilidad han tenido y todavía tienen, tales como los complejos de dextrano-hierro en veterinaria o aplicación humana como el BAL, un derivado del mercaptano que durante la primera guerra mundial se empleó con frecuencia para el tratamiento de intoxicaciones por gases venenosos derivados del arsénico.

Actualmente la investigación de los complejos se centra en compuestos orgánicos, ya que éstos constituyen el principal grueso del arsenal terapéutico. Algunos de estos complejos son producidos de manera natural, tal el es caso de micobacterias que contienen una pequeña cantidad de oligosacáridos derivados de maltosa metilada que pueden formar complejos y solubilizar ácidos grasos derivados del coenzima A, compuestos intermedios en la síntesis de ácidos grasos.

De las distintas sustancias que se pueden emplear para la formación de complejos, probablemente las ciclodextrinas son las más utilizadas en terapéutica, encontrándose disponibles en distintos tipos, en grandes cantidades y a precios razonables.

Las ciclodextrinas son sustancias que prácticamente carecen de toxicidad (son hidratos de carbono). Muchas características de principios activos se pueden modificar mediante la inclusión de los mismos en complejos con ciclodextrinas. De esta manera se puede mejorar la estabilidad, las características organolépticas y biodisponibilidad, o bien facilitar su manipulación (Duchene y col., 1989). También mediante la formación de complejos se pueden aumentar las características de solubilidad de principios activos poco solubles. En realidad este tipo de

complejos resulta, en cierto modo, una imitación del complejo que se forma entre muchos fármacos y algunas proteínas plasmáticas o bien con proteínas tisulares del organismo y que sirven para solubilizar moléculas poco solubles.

### 5.1. PROPIEDADES Y CARACTERÍSTICAS DE LAS $\beta$ -CICLODEXTRINAS.

Las ciclodextrinas se conocen desde hace aproximadamente un siglo, en 1.981 fueron aisladas por Villiers por la degradación de productos del almidón. La descripción de su preparación, aislamiento y sus principales características fueron detalladas por Schärddinger entre 1.903 y 1.911 (Duchene y col., 1989).

La capacidad de formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas y sus derivados se conocen desde hace bastante tiempo, pero su empleo era sumamente restringido por tres factores esenciales:

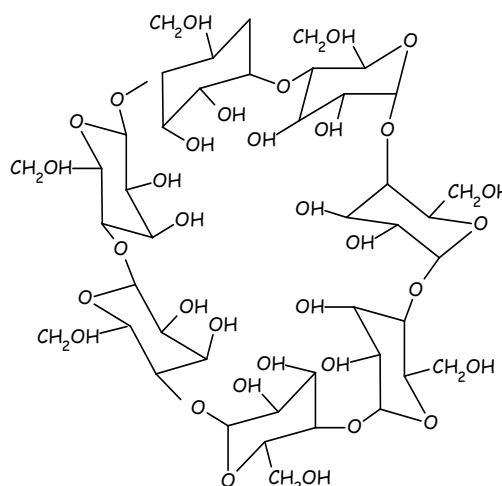
- Las ciclodextrinas eran escasas y de muy elevado precio.
- Su contaminación era frecuente en el proceso de obtención, lo que daba lugar a problemas de toxicidad.
- Escaso conocimiento químico y enzimático, que no era suficiente para su aplicación industrial a gran escala.

Actualmente estos problemas han sido solventados y se emplean en diversas industrias tales como alimentación, cosmética, etc.

Las ciclodextrinas son un grupo iónico de oligosacáridos cíclicos en el que las unidades de glucosa se unen por enlace glucosídico  $\alpha$  1,4; y que presentan una cavidad hidrófoba. Por ello, poseen la propiedad de formar un tipo especial de complejo conocido como complejo de inclusión molecular. Tales complejos proporcionan un método de englobamiento de

otro compuesto químico conocido como "invitado" dentro del agente complejante, que es conocido como "hospedador", sin formación de enlaces covalentes entre ambos.

En esta disposición, la glucosa forma unidades cerradas con una conformación de tipo silla, y la estabilización del anillo adicional es favorecida por la formación de puentes de hidrógeno



**Fig. 11.**  $\beta$ -ciclodextrina

entre los grupos hidroxilos secundarios de las glucosas sucesivas alrededor del anillo de las ciclodextrinas. La unión de los hidrógenos intramoleculares es confirmada por análisis de rayos X. El análisis por RMN indica, a su vez, que esta estructura rígida y anular es también mantenida en la solución (Amaizo, 1988). De este modo, las ciclodextrinas presentan una cavidad, cuyas dimensiones son constantes y específicas para cada tipo de ciclodextrina.

Las ciclodextrinas son solubles en el agua, esta característica deriva de la localización de todos los grupos hidroxilos libres de cada unidad de glucosa sucesiva sobre el borde de estas moléculas con forma de "toroide" (forma muy parecida a una rosquilla). Las ciclodextrinas tienen los grupos hidroxilos primarios situados sobre el carbono en posición 6, sobre el lugar más estrecho, y los hidroxilos secundarios situados en posición 2 y 3, en el lugar más ancho.

Estos dos grupos de hidroxilos les confieren polaridad y buenas características de solubilidad.

Las características derivadas de esta estructura molecular son las siguientes:

- La estructura anular no tiene las características reductoras de otros azúcares.
- No se descompone en medio alcalino caliente.
- Son resistentes a la hidrólisis por la mayoría de los ácidos orgánicos y a las diversas  $\alpha$ -amilasas, y son completamente resistentes a las  $\beta$ -amilasas y a los fermentos de levaduras.
- Poseen una gran estabilidad térmica, con una temperatura de descomposición de aproximadamente 300°C.

Los tres tipos de ciclodextrinas que existen y de los que derivarán posteriormente los demás, son:

- $\alpha$ -ciclodextrina, que contiene 6 unidades de glucosa.
- $\beta$ -ciclodextrina, que contiene 7 unidades de glucosa.
- $\chi$ -ciclodextrina, que contiene 8 unidades de glucosa.

Las aplicaciones de las ciclodextrinas son muy variadas. Concretamente en la industria farmacéutica se emplean para modificar las características de solubilidad (bien para retrasarla o para aumentarla), mejorar las características organolépticas, aumentar la estabilidad y para facilitar la manipulación de diversos principios activos.

En cuanto a otras propiedades industriales y analíticas de las ciclodextrinas son muy variadas y se utilizan con muchos fines. A continuación describimos, como ejemplos, su empleo en técnicas de cromatografía y separación de moléculas:

- Las ciclodextrinas insolubilizadas con polímeros, se pueden utilizar en cromatografía. Estas moléculas tienen propiedades quirales y además se pueden formar los complejos embebidos en una capa de gel dando lugar a una matriz-soporte apta para separaciones cromatográficas. La separación cromatográfica de los compuestos en todos los geles está basada en la inclusión selectiva, un fenómeno útil en la separación de diferentes compuestos o enantiómeros o en la adsorción específica, ésta bastante empleada en separación enzimática. En las ciclodextrinas poliméricas que contienen geles, las cavidades de las mismas muestran los efectos específicos de éstas, mientras que las uniones cruzadas muestran efectos parecidos a los del Sephadex (Szejtli, 1979).

De este modo, hay compuestos que pueden ser separados con ciclodextrinas en base de gel, permitiendo la separación de aminoácidos e incluso la separación de algunos racémicos; así en el caso del ácido mandélico se logra separar selectivamente el R(-) (Zsardon, 1983).

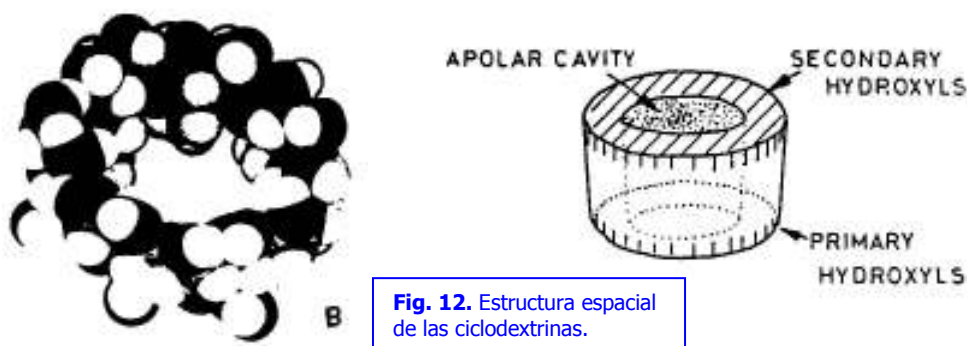
- Las  $\beta$ -ciclodextrinas también pueden ser utilizadas como sistema fosforimétrico a temperatura ambiente, para esta aplicación es necesario que las ciclodextrinas actúen como un medio de soporte organizado donde quede apresada la molécula fosforescente (procedimiento que se conoce como de inmovilización de moléculas). Para ello, se emplean en este sistema tres tipos de ciclodextrinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Al tener las ciclodextrinas forma de toroide, se pueden obtener tres volúmenes diferentes internos de naturaleza hidrofóbica. Es una técnica de gran selectividad, ya que la interacción entre las moléculas de ciclodextrinas y la molécula fosforescente depende de las dimensiones de la molécula fosforescente. Los complejos formados son hidrosolubles y química y estructuralmente estables, contrastando su estabilidad con la del método de agregados micelares, en el que se trata de un equilibrio dinámico. Las ciclodextrinas forman, pues, complejos de inclusión con una gran variedad de moléculas en condiciones entálpicamente favorables, pudiendo además obtenerse y aislarse éstas en forma de estado sólido.

Asimismo, el efecto del volumen de las cavidades es sorprendente, por ejemplo el fenantreno muestra intensa fosforescencia a T<sup>a</sup> ambiente con la  $\beta$ -ciclodextrina, pero no con la  $\alpha$ -ciclodextrina. También permite separar una mezcla de moléculas fosforescentes de otras que no lo son. No obstante, el principal problema con el que nos enfrentamos es la amortiguación de la fosforescencia por el efecto del oxígeno.

## 5.2. FORMACION DE COMPLEJOS DE INCLUSION CON CICLODEXTRINAS.

La característica más intrigante derivada de la estructura de las ciclodextrinas es su capacidad para formar complejos de inclusión, en tres dimensiones, con una extensa variedad de moléculas que por tener un tamaño adecuado, van a poderse incluir total o parcialmente dentro de la cavidad hidrófoba central de la ciclodextrina.

La única región de unión de la cavidad central de la ciclodextrina consta de tres bandas, cada una sobre la anterior: dos bandas de grupo C-H, y entre ellas, una banda de oxígenos glucosídicos, constituyendo de este modo, una formación cooperativa de sitios de unión y creando un microambiente relativamente poco polar (Amaizo, 1988).



La unión de las moléculas que se incorporan dentro de las ciclodextrinas (moléculas hospedadoras) no es fija o permanente, y va a ser gobernada por un equilibrio dinámico, permitiendo así una fácil asociación o disociación. Las fuerzas de unión dependen de cómo se ajusten geométricamente las moléculas "huésped" e "invitada" y de las interacciones específicas locales entre sus superficies atómicas.

La fuerza conductora de los complejos de inclusión es un proceso compuesto por variedad de fuerzas débiles interaccionando simultáneamente, incluyendo:

- Interacciones hidrofóbicas.
- Fuerzas de Van der Waals.
- Fuerzas de dispersión de London.
- Liberación de alta energía sobre el agua por la inclusión de la molécula a incluir.
- Liberación de la tensión conformacional en un aducto de ciclodextrina en agua.

Los complejos pueden estar formados en solución o en estado cristalino, y mientras que el agua es el típico solvente de elección, los complejos de inclusión pueden estar acompañados de sistemas de cosolventes y con algunos solventes no acuosos.

En solución acuosa, la cavidad apolar de las ciclodextrinas está ocupada por las moléculas de agua, que está en un estado energético desfavorable, por la repulsión polar-apolar, siendo fácilmente reemplazable por una molécula invitada adecuada, que sea menos polar que el agua.

La ciclodextrina es la molécula "hospedadora" y la forma conductora de la formación de complejo es la sustitución de las moléculas de agua de alta entalpía por una adecuada molécula a incluir. Los complejos de ciclodextrinas son altamente estables y su solubilidad en agua suele ser reducida, con lo que serán rápidamente separadas de la solución en forma cristalina. De este modo, la esencia de la encapsulación o formación de los complejos de inclusión es que una o más moléculas "invitadas" están contenidas en una molécula "hospedadora".

La estructura de la ciclodextrina cristalina no es exactamente idéntica a la de la estructura del complejo en solución. En un estado de disolución, la molécula a incluir o parte de ella se localiza dentro de la cavidad de la ciclodextrina y el resto del complejo es rodeado por una multicapa de moléculas de agua. En el estado cristalino, las moléculas "invitadas" pueden estar localizadas o no dentro de la cavidad de la ciclodextrina pero también entre los anillos de las ciclodextrinas y así se forma un complejo de inclusión del cristal en forma de enrejado. Al mismo tiempo, algunas moléculas de ciclodextrina pueden presentar algún contenido en agua. De esta manera, los complejos cristalinos de las ciclodextrinas con principios activos es raro que presenten una estequiometría estricta (Szejtli, 1982). Además, al no existir enlaces covalentes entre las moléculas "invitadas" y "huésped", los complejos de inclusión bajo condiciones fisiológicas son fácilmente dissociables.

También la complejación está involucrada en toda aplicación industrial de las ciclodextrinas; en muchos casos los complejos son preparados por cristalización en forma más o menos pura y empleados como tal. De cualquier forma, hay casos en los que la complejación es sólo un estado de transición y se manifiesta por sí misma o sólo por sus efectos, por ejemplo en la catálisis o separación de mezclas químicas con ciclodextrinas.

La complejación puede ser estudiada por varios métodos; así en solución por RMN, dicroísmo circular, solubilidad, cambios espectrales en U.V. o en visible, efectos catalíticos, polarografía, porcentaje de difusión, etc.; en complejos sólidos, por métodos de rayos X, difusión, métodos termoanalíticos, sublimación, etc., (Szejtli, 1982)

De esta manera general, en la preparación de complejos de inclusión el método más empleado es la agitación de la solución acuosa de ciclodextrinas junto con la molécula

“invitada” o la disolución de ésta. Después del equilibrio, el agua se elimina, bien por congelación desecado o secado por nebulización, o por otro método conveniente. Luego, el producto microcristalino se separa por filtración o bien por tamización.

La duración de la complejación en un medio acuoso está caracterizada por la constante de disociación o de estabilidad del complejo, sólo complejos con una constante comprendida entre 200 y 5000 M<sup>-1</sup> parecen ser adecuados para aplicaciones prácticas (Szejtli, 1988). Los complejos demasiado lábiles producen una liberación prematura del principio activo, y los complejos demasiado estables provocan una cesión retardada del mismo. Para ciertos compuestos, existe correlación entre las fuerzas de unión y algunas propiedades de las moléculas “invitadas” tales como: polarizabilidad, volumen molar, refracción molar y coeficiente de partición entre un medio apolar y un medio acuoso; pero no se cumple de manera global.

### 5.3. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA COMPLEJACION.

El empleo de las ciclodextrinas y sus derivados para mejorar la estabilidad, biodisponibilidad y palatabilidad de los principios activos, ha sido enormemente investigado.

Las ventajas más importantes de los complejos de ciclodextrinas son:

- Los compuestos líquidos pueden transformarse en productos sólidos facilitando así su manipulación, siendo una forma muy adecuada para la fabricación de comprimidos.
- Los compuestos volátiles se pueden estabilizar evitándose pérdidas por evaporación, mejorando así su rendimiento.
- Los complejos de inclusión en ciclodextrinas de compuestos muy oxidables, favorecen la estabilidad ya que protegen a las moléculas del contacto con el aire.
- El mal sabor de algunos principios activos puede ser enmascarado por la formación de complejos.
- Tanto la solubilidad en magnitud como en velocidad de principios activos poco solubles, puede ser aumentada.
- En sangre se pueden alcanzar niveles más altos tras la administración oral de principios activos poco solubles en agua, si son complejados con ciclodextrinas (mejora la biodisponibilidad).

Las limitaciones, que presentan la formación de complejos, se pueden resumir en:

- La principal limitación es si el principio activo puede formar algún complejo con una fuerza de disociación distinta a la que se desea con las ciclodextrinas. Los más

importantes parámetros para determinar la formación de complejos de inclusión de una molécula son su hidrofobicidad y su geometría con relación a la cavidad de estas ciclodextrinas.

- Otra limitación se refiere a la estequiometría de los complejos; normalmente los complejos principio activo:ciclodextrina poseen una relación 1:1; 1:2; ó 3:2., lo que suele implicar el uso de grandes cantidades de ciclodextrina con respecto al principio activo a incluir en el complejo.

#### 5.4. APLICACIONES DE LAS CICLODEXTRINAS.

En los últimos 35 años, el número de patentes descritas como complejos de principios activos en ciclodextrinas ha crecido considerablemente. A modo de ejemplo, con sus ventajas respecto a las formulaciones convencionales, recogemos las siguientes:

**Prostaglandinas:** Mejoran la estabilidad de las prostaglandinas (Szejtli, 1980) y pueden ser administradas tanto por vía oral como intravenosa (Castillo, 1994). Por otro lado, la prostaglandina I<sub>2</sub>-β-ciclodextrina posee un ligero efecto anticoagulante que la prostaglandina I<sub>2</sub> por sí sola no posee (Castillo, 1994).

**Vitaminas liposolubles:** Mejoran su estabilidad en presencia de luz y oxígeno, facilitando su formulación con sales minerales (Szejtli, 1980). La complejación parece ser adecuada para procesos farmacéuticos con componentes multivitamínicos.

**Barbitúricos:** Hay estudios que indican que se mejora la solubilidad de los barbitúricos y sus niveles en sangre se pueden aumentar (Castillo, 1994). También se ha observado una reducción de la DE<sub>50</sub> de los barbitúricos con el principio activo complejado en relación con los no complejados (Castillo, 1994).

**Antineoplásicos:** La toxicidad de este grupo de fármacos puede ser disminuida por la complejación con β ciclodextrina (Castillo, 1994), como se ha comprobado con el 5 fluoruracilo. Otros productos como el benzaldehído y el 3 tiofeno carboxialdehído al formar complejos con β ciclodextrina muestran propiedades anticancerígenas que por sí solos no mostraban (Mitsubishi, 1980).

**Esteroides:** La baja solubilidad en agua de hormonas como la testosterona, se puede aumentar considerablemente por complejación con ciclodextrinas metiladas (Stadler y col, 1982).

Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos: Algunos principios activos, tales como la indometacina, provocan como efecto indeseable el peligro de ulceración y erosión de la mucosa gástrica; este principio activo no logra formar complejo cristalino con las ciclodextrinas, pero en solución se ha establecido la existencia de un complejo de estequiometría 1:2. Estudios con este complejo resultaron que reducía la ulceración estomacal en un 50% (Szejtli y col., 1978).

Anestésicos locales: La formación del complejo de lidocaína con dimetil- $\beta$ -ciclodextrina, mostró por vía inyectable, en ratas, un efecto anestésico que era aproximadamente el doble que el procedente de una dosis equivalente de lidocaína al estado de clorhidrato (Ferenczy y col., 1982).

Usos varios: El antibiótico cloranfenicol forma complejos con  $\beta$ -ciclodextrinas y este complejo ha demostrado poseer una mayor solubilidad que el compuesto original (Castillo, 1994).

El ácido trans-10-hidroxi- $\alpha$ -decenoico, principal componente de la jalea real, muestra una gran estabilidad al ser complejoado con ciclodextrinas (Castillo, 1994).

En casos de envenenamiento, por ejemplo, con barbitúricos, las ciclodextrinas se emplean en diálisis peritoneal (Perrin y col, 1978); pues parece ser que las ciclodextrinas disueltas en solución fisiológica van a lavar la cavidad peritoneal.

Otro aspecto fundamental de la aplicación de las ciclodextrinas es en el campo de la cosmética, con el fin de estabilizar ingredientes activos, sustancias volátiles; y evitando oxidaciones, reacciones fotoinducidas, descomposiciones térmicas, olores y sabores desagradables e irritación en la piel (Castillo, 1994).

Uno de los hallazgos más inesperados ha sido la actividad anticoccidiósica que ha demostrado frente a *Cryptosporidium parvum*. Se preparó un ensayo de viabilidad de ooquistes expuestos a  $\beta$  ciclodextrina, dando como resultado una alta proporción de ooquistes no viables (81,5%) (Castro-Hermida y col., 2000).

# **MATERIALES Y METODOS**

---

## 6. MATERIALES.

### 6.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Los animales de experimentación utilizados han sido ratones de la estirpe SWISS CD-1 (Charles River, España), machos y hembras, de características uniformes en cuanto a peso y edad para constituir los distintos lotes experimentales.

Los animales se disponían en jaulas de tamaño adecuado, y se mantenían en el animalario a temperatura constante de 20-25°C y ciclo de luz controlado, suministrándoles agua y comida *ad libitum* durante todo el período de experimentación.

### 6.2. PARASITO.

Se utilizó la cepa GM-1 de *Trichinella spiralis*. Fue aislada de un gato montés (*Felis sylvestris*), capturado en Asturias en 1963 y mantenido desde entonces en el laboratorio mediante pases periódicos por rata y ratón. La comprobación de los caracteres específicos de la cepa GM-1 fue realizada por BOEV en 1978 en el Instituto Helminológico de Alma-Ata (URSS) mediante pruebas de entrecruzamiento con el aislamiento estándar de *T. spiralis*. Posteriormente ha sido caracterizada isoenzimáticamente por Pozio en 1992 como *T. spiralis*, aislamiento MFEL/ES/G2 GM-1 ISS48, encontrándose depositada en el Centro de Referencia de *Trichinellosis* (Instituto Superior de Sanidad de Roma), Italia.

### 6.3. FARMACOS.

Albendazol suministrado por GlaxoSmithKline (London, United Kingdom).

Ricobendazol suministrado por Chemo Ibérica (Alcalá de Henares, Madrid, España) .

Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina suministrado por Cerestar (Bélgica).

Neguvon<sup>®</sup> (éster dimetílico del ácido (2,2,2-tricloro-1-hidroxietil)-fosfórico, Bayer, S.A. (Berlin, Germany).

Sulfato de atropina, Bayer, S.A. (Berlin, Germany).

Penicilina, Sigma Chemical Co., (St. Louis, Missouri, USA).

Estreptomina, Sigma Chemical Co., (St. Louis, Missouri, USA).

Anfotericina B, Squibb Industria Farmacéutica, S. A., (Madrid, España).

### 6.4. REACTIVOS.

Pepsina 2000 FIP-U/g, Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

Acido clorhídrico concentrado, Panreac (Barcelona, España).  
Cloruro sódico, Panreac (Barcelona, España).  
Cloruro potásico, Panreac (Barcelona, España).  
Sulfato de magnesio, Merck (Darmstadt, Germany).  
Fosfato dihidratado de potasio, Merck (Darmstadt, Germany).  
Fosfato de sodio, Panreac (Barcelona, España).  
Glucosa, Panreac (Barcelona, España).  
Metanol para HPLC, LabScan (Dublin, Ireland).  
Acido ortofosfórico, Panreac (Barcelona, España).  
Acetonitrilo, LabScan (Dublin, Ireland).  
Uretano (15%), Sigma Chemical Co., (St. Louis, Missouri, USA). Ver métodos 7.2.2.  
Cloroformo, Panreac (Barcelona, España).  
Heparina, Altana Pharma, S. A. (Madrid, España).  
Carboximetil celulosa sódica de baja viscosidad, Serva (Heidelberg, Germany).  
Medio de cultivo solución tamponada de Hanks (HBSS), ver métodos 7.1.7.  
Tampón PBS, Panreac (Barcelona, España).  
Formol al 10% tamponado, Panreac (Barcelona, España).

#### 6.5. EQUIPOS Y APARATOS.

Picadora Moulinex, (España).  
Agitador/incubador New Bruswick, New Bruswick Scientific. (New Jersey. USA).  
Copas de sedimentación.  
Cámara McMaster.  
Microscopio óptico Olympus BH-2, Olympus Optical Co., LTD, (Japan).  
Pipetas y micropipetas.  
Agitador magnético Velp Scientifica (Italy).  
Balanza Mettler PC 2200 (Switzerland).  
Centrífuga Hettich Universal 32 (Germany).  
Filtros Millipore PVDF Durapore® de 45µm, Millipore Co., (Boston, Massachussets, USA).  
Equipo de cromatografía líquida modular Gilson (Villers le Bels, Francia), compuesto por 2 bombas isocráticas 305 y 306, 1 módulo mezclador 805, 1 módulo detector UV 116, 1 muestreador automático 231 XL y un integrador Spectra Physics SP-270.  
Equipo de cromatografía líquida modular Jasco (Tokio, Japón), compuesto por 1 bomba isocrática Jasco PU 1580, 1 unidad mezcladora LG 2080-02, 1 desgasificador DG 2080-53, 1 módulo detector UV 1575, un muestreador automático 231 XL y un integrador Jasco Borwin 1,5 JMBS developments.

Columna C18 Hypersil® 5µm, 250x4,6 mm (Madrid, España).  
Columna AGP quiral 5 µm, 100x4,0 mm I.D., ChromTech AB (Sweden).  
Columna Hypersil® BDS ODS2 5 µm, 250x4,6 mm (Madrid, España).  
Concentrador Savant Speedvac® (Holbrook, New cork, USA).  
Balanza de precisión Mettler Toledo (Switzerland).  
Espectrofotómetro Becton DU-6 (Irving, California, USA).  
Lupa binocular Olympus SZH, Olympus Optical Co., LTD, (Japan).  
Baño termostatizado Memmert (Schwabach, Germany).  
PHmetro Crison Micro pH 2000, Crison Instruments, S. A., (Barcelona, España).  
Botes de digestión.  
Gasas de filtrado.  
Vasos de precipitado de diferentes volúmenes.  
Tubos Falcon.  
Botellas de cultivo de 250 ml, Nunc A. S. (Roskilde, Denmark).  
Incubador de microaerobiosis al 5% CO<sub>2</sub>, Nuair US Autoflow (Plymouth, USA).  
Baño de Ultrasonidos Selecta (Barcelona, España).  
Sonda de ultrasonidos dr. Hielscher UP 50 H, dr. Hielscher GmbH, (Germany).  
Tubos Eppendorf.  
Ultracentrifuga Biofuse 17RS, Heraeus Sepatech.  
Placas de Petri.  
Placas de 24 pocillos Costar (Corning, Albany, New Cork, USA).  
Diverso material de vidrio.

## **7. METODOS.**

### **7.1. METODOS PARASITOLÓGICOS.**

#### **7.1.1. Dosis infectante y dosis terapéuticas administradas.**

Los ratones fueron infectados con 300±50 larvas de *Trichinella spiralis*, en los experimentos de mejora de la actividad antihelmíntica mediante complejación en ciclodextrinas, análisis de la modificación de la pauta posológica durante la fase migratoria y estudio del perfil farmacocinético durante la fase intestinal del parásito.

La dosis infestante para el estudio *ex vivo* e *in vitro* del metabolismo del albendazol en el parásito fue de 800-1000 ± 50 larvas de *Trichinella spiralis* ya que la finalidad era obtener el mayor número posible de larvas enquistadas por ratón.

Las formulaciones y dosis con las que se realizaron los estudios fueron las siguientes:

- ✓ Biodisponibilidad y efecto antihelmíntico de ABZ en ciclodextrinas:
  - Fase intestinal.
    - . Albendazol en CMC\* 5 mg/kg de peso.
    - . Albendazol en OH-P-β-CD\*\* 5 mg/kg de peso.
    - . Albendazol en CMC\* 10 mg/kg de peso.
    - . Albendazol en OH-P-β-CD\*\* 10 mg/kg de peso.
  - Fase migratoria.
    - . Albendazol en CMC\* 50 mg/kg de peso.
    - . Albendazol en OH-P-β-CD\*\* 50 mg/kg de peso.
    - . Albendazol en CMC\* 100 mg/kg de peso.
    - . Albendazol en OH-P-β-CD\*\* 100 mg/kg de peso.
  - Fase muscular.
    - . Albendazol en CMC\* 50 mg/kg de peso.
    - . Albendazol en OH-P-β-CD\*\* 50 mg/kg de peso.
    - . Albendazol en CMC\* 100 mg/kg de peso.
    - . Albendazol en OH-P-β-CD\*\* 100 mg/kg de peso.
- ✓ Modificación de la pauta posológica durante la fase migratoria.
  - . Albendazol en OH-P-β-CD\*\* 50 mg/kg de peso.
- ✓ Estudio del perfil farmacocinética durante la fase intestinal.
  - . Albendazol en OH-P-β-CD\*\* 10 mg/kg de peso.
- ✓ Farmacocinética en el parásito.
  - . Albendazol en OH-P-β-CD\*\* 0,5 µg/ml.
  - . Ricobendazol en OH-P-β-CD\*\* 0,5 µg/ml.

- . Ricobendazol en OH-P- $\beta$ -CD\*\* 1  $\mu$ g/ml.
- . Ricobendazol en OH-P- $\beta$ -CD\*\* 2  $\mu$ g/ml.
- . Ricobendazol en OH-P- $\beta$ -CD\*\* 4  $\mu$ g/ml.

\* Carboximetil celulosa sódica.

\*\* Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

#### 7.1.2. Infección con larvas obtenidas previa digestión de la canal.

Se sigue la técnica de Martínez Fernández (1978), con ligeras modificaciones. Se parte de ratones infectados para el mantenimiento de las cepas de *Trichinella* en el laboratorio, que son sacrificados por sobredosis de cloroformo. Una vez pelados y eviscerados, se tritura la canal con una picadora Moulinex y se añade el líquido de digestión cuyos componentes son: 0,5% de pepsina (Merck 2000 FIP-U/g), 0,7% de ácido clorhídrico concentrado (Panreac) y 0,9% de cloruro sódico (Panreac), en agua destilada, preparando 100 cc por cada 10 g de carne de la canal.

El homogenizado, así obtenido, se dispone en frascos de plástico con tapón de rosca y se lleva a un agitador de incubación New Brunswick a 37°C y 200 r.p.m. durante 2 horas.

Concluida la digestión, el contenido del frasco se pasa por mallas tipo gasa sanitaria de 24 hilos/cm<sup>2</sup> y el líquido filtrado se recoge en copas de sedimentación. Se deja en reposo el tiempo suficiente para que las larvas sedimenten (aproximadamente 20 minutos) y posteriormente se sifona el sobrenadante. El sedimento se traslada a un tubo Falcon con solución fisiológica.

Finalizado el proceso anterior se procede al recuento de las larvas obtenidas, utilizando para ello una cámara de recuento McMaster y un microscopio óptico Olympus BH. El llenado de la cámara se realiza con una pipeta pasteur provista de bulbo de goma, disponiendo el recipiente con las larvas sobre un agitador magnético para conseguir una homogeneización en la toma de muestra.

Se realizan 2 recuentos (un total de 4 celdas), y se calcula la media aritmética, el valor obtenido es el que representa la cantidad de larvas por celda, o lo que es lo mismo la cantidad de larvas en 0,15 ml de líquido (1x1x0,15cm), este valor se multiplica por 6,66; para obtener así el número de larvas por mililitro, que a su vez referido al volumen inicial nos da el número total de larvas aisladas por ratón; teniendo en cuenta el número de larvas a inocular 300 $\pm$ 50 y el volumen del inóculo (0,3 ml aprox.) se aplican los cálculos matemáticos necesarios. Cuando,

para obtener el volumen final adecuado es necesario concentrar o diluir la suspensión inicial de larvas, se deben volver a realizar los pertinentes recuentos según las pautas indicadas.

Seguidamente se lleva a cabo la inoculación de los lotes experimentales mediante sonda buco-gástrica, manteniendo siempre la suspensión de las larvas en continua agitación para que las tomas sean homogéneas.

En el caso de requerir grandes volúmenes de larvas, como ocurre en el estudio de farmacocinética en parásito, se procede exactamente igual que el caso anterior hasta conocer el número de larvas por mililitro, como el objetivo final es disponer de 250.000 larvas por botella de cultivo se prepara un pool de larvas con todas las obtenidas de las canales de los ratones, que posteriormente se separan en grupos homogéneos, tras varios lavados para eliminar cualquier posible resto de líquido de digestión.

### 7.1.3. Aplicación de los fármacos.

Tanto en el ensayo de optimización de la biodisponibilidad y efecto antihelmíntico del albendazol como en la modificación de la pauta posológica en la fase migratoria y en el estudio farmacocinética en animal infectado, previamente a la preparación de las concentraciones a ensayar, se disponen los ratones en los lotes correspondientes, hallando su peso medio en una balanza. Las dosis son calculadas en función del peso medio de cada lote y la administración se realiza mediante sonda buco-gástrica.

El fármaco ensayado se dispone en dos formulaciones diferentes, carboximetil celulosa como control e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina como fármaco objeto del estudio.

En el caso de la formulación en carboximetil celulosa sódica el albendazol se suspende en este vehículo al 1%. Esta suspensión se realiza mediante un homogenizador, manteniendo la misma en continua agitación durante la aplicación (ver 7.2.1.).

La solución de albendazol en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, se prepara anteriormente (ver 7.2.3.) y se administra como tal.

El antihelmíntico utilizado para la supresión de la población intestinal, en las experiencias sobre la fase migratoria de *Trichinella spiralis*, es Neguvon<sup>®</sup> a la dosis de 70 mg/kg de peso, administrado en el día 9 post-infección por vía oral (0,2ml), conjuntamente con sulfato de atropina, en dosis de 0,05 mg/kg de peso, vía intramuscular (50 $\mu$ l), para paliar los efectos secundarios que podría producir el organofosforado.

En el ensayo de farmacocinética del albendazol en *Trichinella spiralis* el fármaco previamente preparado en una solución de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en una concentración inicial de 100  $\mu\text{g/ml}$  se lleva al medio HBSS en las botellas de cultivo donde se mantienen las 250.000 larvas, tras realizar los cálculos oportunos para obtener las concentraciones finales requeridas y referidas en el punto 7.1.2. Una vez obtenidas las concentraciones oportunas las botellas de cultivo se llevan a incubación en estufa a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 7.1.4. Digestión de la canal y recuento de larvas.

Se sigue la técnica indicada en el apartado 7.1.2.; los ratones una vez sacrificados se pelan y evisceran; cada canal se tritura y homogeniza con la cantidad proporcional al peso, de líquido de digestión. A continuación se pasa a un frasco de plástico que se mantiene en incubación en un agitador New Brunswick a 37°C y 200 r.p.m. durante el período de tiempo necesario (aprox. 2,00 horas) para obtener una digestión total de la canal.

El material digerido se pasa por una malla y el líquido filtrado, correspondiente a cada canal, se lleva a vasos de precipitados de 200 ml, procediéndose al recuento en cámaras McMaster.

#### 7.1.5. Recuperación de adultos y recuento.

Se sigue la técnica de Denham y Martínez (1970). Se sacrifican los animales por sobredosis de cloroformo y se procede a la apertura de la cavidad abdominal, tomando el intestino delgado que se separa por tracción a partir del duodeno. Se abre longitudinalmente con ayuda de unas tijeras y se trocea en porciones de 5 a 7 cm, que se recogen en gasas hidrófilas de 24 hilos/cm<sup>2</sup> y se introducen en botes de heces de plástico de 100 ml de capacidad, con tapón de rosca, conteniendo solución salina fisiológica. Estos botes se incuban a 37°C durante 3 horas, para producir la autólisis de la mucosa y la consecuente liberación de los vermes.

Transcurrido el período de incubación, se retiran las mallas con los intestinos y se recupera el contenido del bote en el cual se hallan los adultos sedimentados.

Mediante trompa de vacío, se sifona la cantidad de solución salina que sobra para hacer posible el recuento en placa de petri reticulada.

Los recuentos se realizan mediante lupa binocular, calculándose posteriormente las medias aritméticas de los mismos.

#### 7.1.6. [Preparación del intestino para su estudio histopatológico.](#)

Se sacrifican los animales por sobredosis de cloroformo y se procede a la apertura de la cavidad abdominal, tomando el intestino delgado que se separa por tracción a partir del duodeno. Se toman porciones intermedias de 5 cm aproximadamente de cada una de las porciones intestinales, duodeno, yeyuno e íleon que se fijan en placas de petri mediante formol al 10% tamponado durante 5 minutos aproximadamente. Una vez transcurrido este período de tiempo en el cual se fijan las estructuras celulares, procedemos a abrir longitudinalmente las porciones intestinales y las enrollamos en un vástago (émbolo de jeringa de insulina) con la luz intestinal hacia el exterior. El vástago con la muestra montada se introduce en tubos de plástico con formol tamponado cubriéndolas. Las muestras son remitidas al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Niño Jesús para su posterior estudio histopatológico, que fue realizado siguiendo las prácticas habituales con la tinción de hematoxilina-eosina.

#### 7.1.7. [Preparación del medio HBSS.](#)

El medio de cultivo HBSS se utiliza para el mantenimiento de *Trichinella spiralis*.

En un vaso de precipitado se añaden los siguientes elementos para obtener 250 ml de medio HBSS:

CINa	2 gr
CIK	0,1 gr
MgSO <sub>4</sub> – 7 H <sub>2</sub> O	0,05 gr
Fosfato diH – K 0,4 mM	0,015 gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 12 H <sub>2</sub> O	0,125 gr
Glucosa 50mM	2,25 gr
Penicilina	12,5 mg
Estreptomicina	12,5 mg
Anfotericina B	0,5 ml

A continuación se añaden los 250 ml de agua destilada y se lleva a agitación durante 15 minutos aproximadamente. Se ajusta el pH a 7,2 y se esteriliza por filtración.

## 7.2. [METODOS FARMACEUTICOS.](#)

### 7.2.1. [Preparación de la suspensión de albendazol en carboximetil celulosa sódica.](#)

La carboximetil celulosa sódica es un sólido que se adquiere comercialmente en forma de polvo blanquecino. La preparación como medio de suspensión se realiza al 1%.

Para ello tomamos 1 gr de carboximetil celulosa sódica y la depositamos en un vaso de precipitados, a continuación añadimos 100 ml de agua destilada. La carboximetil celulosa es de difícil disolución, por lo que para facilitar este proceso se lleva a un agitador magnético (e incluso se puede usar calor). Se mantiene en agitación entre 1,5 y 2,5 horas, obteniéndose al final un líquido viscoso.

Una vez obtenida la suspensión base, se añade el albendazol en cantidad suficiente para obtener la concentración deseada. Se mantiene en agitación constante para conseguir una suspensión homogénea.

#### 7.2.2. Preparación de la solución anestésica.

El uretano es un anestésico general de acción rápida; para la anestesia de ratones se prepara en una concentración al 15%.

Para la preparación pesamos 15 gr de uretano que llevamos a 100 ml de agua destilada. Se agita hasta disolución en agitador magnético.

#### 7.2.3. Preparación de la solución de albendazol en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

La solución de albendazol en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina se realiza en medio ácido.

Para ello preparamos un tampón ácido a partir de HCl 0,2M, tomando 4,1 ml de ácido clorhídrico (HCl) al 37% y llevándolo a 200 ml de agua destilada. A continuación se añade la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina al 20% (para 50 ml se añaden 10 mg), y una vez disuelto se añade el albendazol a la solución, se lleva a baño de ultrasonidos y se mantiene ésta en constante agitación en agitador magnético (aprox. 4 horas), posteriormente se procede a filtrar la solución y se analiza por espectrofotometría para verificar la concentración.

#### 7.2.4. Obtención de los enantiómeros puros.

Para purificar los enantiómeros de albendazol sulfóxido (ricobendazol) a partir de una mezcla racémica, se utilizó un aparato de cromatografía líquida modular Jasco (ver materiales, sección aparatos). Antes de la inyección, las muestras fueron filtradas a través de un filtro de 0,45  $\mu$ m Durapore® PVDF. El ricobendazol racémico fue inyectado en el cromatógrafo a una concentración de 0,1 mg/ml y la separación quiral fue llevada a cabo de acuerdo a una versión modificada del método descrito previamente por Delatour y col., 1990, García y col., 1999. De una forma resumida, se utilizaron una columna quiral glicoproteína ácido 1 alfa, una fase móvil

con un buffer fosfato sódico y una velocidad de flujo de 0,9 ml/min. Las muestras fueron analizadas a 290 nm y bajo esas condiciones los tiempos de retención para los enantiómeros (-) y (+) del albendazol sulfóxido (ricobendazol) fueron 3,1 y 10,5 minutos, respectivamente. Las muestras líquidas fueron recogidas de acuerdo a los tiempos de retención de los enantiómeros. Las muestras fueron concentradas a sequedad en vacío a una temperatura de 70°C en un concentrador Savant Speedvac. Las muestras recuperadas fueron analizadas por el mismo método de cromatografía descrito anteriormente, pero incluyendo 2-propanol (1 ml/l) como aditivo en la fase móvil. Bajo estas condiciones los tiempos de retención tras la inyección fueron de 2,6 minutos para ricobendazol (-) y de 4,6 minutos para ricobendazol (+). Para su uso en los ensayos biológicos, las muestras concentradas se disolvieron en agua acidificada desionizada (pH=2) y posteriormente diluidas a una concentración adecuada en el medio de cultivo.

### 7.3. [METODO DE ESTUDIO BIOFARMACEUTICO Y FARMACOCINETICO.](#)

#### 7.3.1. [Animales de experimentación.](#)

##### ✓ **Biodisponibilidad y efecto antihelmíntico de ABZ en ciclodextrinas:**

Se utilizan ratones Swiss CD-1 machos de 30-35 gr de peso del mismo sexo y edad, dispuestos en distintos lotes. El número de animales por lote es de 6 por cada punto a determinar y formulación en las diferentes experiencias realizadas.

##### ✓ **Estudio del perfil farmacocinético durante la fase intestinal.**

Se utilizan ratones Swiss CD-1 machos de 30-35 gr de peso del mismo sexo y edad, dispuestos en distintos lotes. El número de animales por lote es de 6 por cada punto a determinar.

##### ✓ **Farmacocinética en el parásito.**

Se lleva a cabo sobre larvas L<sub>1</sub> de la cepa GM-1 de *Trichinella spiralis*, obtenidas por digestión de canales de ratones previamente infectados con 1000±50 larvas. Se genera un pool global de larvas que posteriormente se separan en grupos homogéneos de aproximadamente 250.000 larvas/grupo.

### 7.3.2. Formulaciones y dosis utilizadas.

#### ✓ **Biodisponibilidad y efecto antihelmíntico de ABZ en ciclodextrinas:**

Las formulaciones y dosis con las cuales se realizó el estudio farmacocinético fueron las siguientes:

- . Albendazol en CMC\*, 50 mg/kg de peso.
- . Albendazol en OH-P-β-CD\*\*, 50 mg/kg de peso.
- . Albendazol en CMC\*, 100 mg/kg de peso.
- . Albendazol en OH-P-β-CD\*\*, 100 mg/kg de peso.

\* Carboximetil celulosa sódica.

\*\* Hidroxipropil-β-ciclodextrina.

Todos los fármacos se administraron por vía oral mediante sonda buco-gástrica.

#### ✓ **Estudio del perfil farmacocinético durante la fase intestinal**

La formulación y dosis a la que se realizó el estudio fue:

- . Albendazol en OH-P-β-CD, 10 mg/kg de peso.

El fármaco se administró por vía oral mediante sonda buco-gástrica.

#### ✓ **Farmacocinética en el parásito.**

Las formulaciones y dosis con las cuales se realizó el estudio farmacocinético fueron las siguientes:

- . Albendazol en OH-P-β-CD 0,5 µg/ml.
- . Ricobendazol en OH-P-β-CD 0,5 µg/ml.
- . Ricobendazol en OH-P-β-CD 1 µg/ml.
- . Ricobendazol en OH-P-β-CD 2 µg/ml.
- . Ricobendazol en OH-P-β-CD 4 µg/ml.

Todos los fármacos se obtuvieron a partir de una solución inicial de 100 µg/ml que se llevaron posteriormente en el medio HBSS a las concentraciones finales requeridas y referidas anteriormente.

### 7.3.3. Obtención de muestras sanguíneas.

Para la obtención de muestras los ratones se anestesian con uretano al 15%, una vez alcanzado el plano de anestesia quirúrgica (pérdida del reflejo oculo-parpebral), la sangre se obtiene directamente por apertura de la caja torácica, con la precaución de dejarla fluir libremente, evitando de este modo que ésta pueda quedar diluida con el contenido de fluidos de los distintos órganos. Se recoge mediante pipetas pasteur limpias y heparinizadas, depositándolas individualmente en eppendorfs. La toma de muestras se realiza a tiempos de 0,25; 0,5; 0,75; 1,5; 3; 6 y 24 horas.

Tras la extracción, la sangre se centrifuga durante 10 minutos a 7000 r.p.m., separando el plasma del resto de los componentes sanguíneos y se congela en eppendorfs a -20°C, hasta el momento de su análisis mediante HPLC.

### 7.3.4. Obtención de muestras en el parásito.

Una vez llevadas las larvas a incubación en microaerobiosis en la estufa al 5% de CO<sub>2</sub>, y pasados los tiempos correspondientes a cada ensayo, se extraen las botellas de cultivo de la estufa y se deja sedimentar el material biológico durante 15 minutos.

Pasado este tiempo de todas y cada una de las botellas se toma una muestra de medio para valorar la concentración de fármaco existente en el mismo y el resto de medio se aspira para llevar las larvas a sequedad intentando evitar que restos del medio puedan interferir en el análisis. Las larvas se llevan a tubos de 10 ml previamente identificados y se realizan varios lavados en PBS atemperado para eliminar las trazas de fármaco que haya quedado sobre la cutícula.

El contenido de cada tubo de 10 ml se va a dividir en tubos eppendorf que se mantienen en hielo para evitar la degradación de la larva, y seguidamente se somete a sonicación en pulsos de 10 segundos a la máxima potencia hasta lograr la rotura completa del parásito, lo que se comprueba microscópicamente.

El homogenizado resultante se extrae con acetonitrilo y se centrifuga a 10.000 r.p.m. durante 20 minutos, separando por un lado el sedimento y por otro el sobrenadante, que se llevan a congelación.

Valoraremos la concentración de fármaco en el sobrenadante.

#### 7.3.5. Determinación de la concentración de albendazol y sus metabolitos mediante HPLC.

En primer lugar se procede a descongelar las muestras a temperatura ambiente (1 hora aprox.), durante este tiempo procedemos a la titulación de tubos de ensayo y viales, así como a la preparación de la fase móvil que utilizaremos en el HPLC tanto para el albendazol (400 ml de H<sub>2</sub>O; 5,5 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 600 ml de metanol) como para sus metabolitos (800ml de H<sub>2</sub>O, 188 µl de ácido ortofosfórico al 85% y 200 ml de acetonitrilo).

Tomamos los eppendorf ya descongelados donde se encontrará el plasma sanguíneo de los ratones o el citosol en el caso de los parásitos y procedemos a quitar el tapón mucoso formado, con una micropipeta (20-200 µl). Seguidamente medimos la cantidad de material que oscilará en torno a 400 µl que iremos depositando en un tubo de ensayo previamente titulado y al que añadiremos 2 ml de metanol para HPLC. Realizamos este proceso con todas las muestras y las tapamos con parafilm.

Se agitan los tubos en un agitador manual entre 1-2 minutos aproximadamente. Una vez bien mezclado se centrifugan durante 10 minutos a velocidad media (4000-6000 r.p.m.), para precipitar las proteínas.

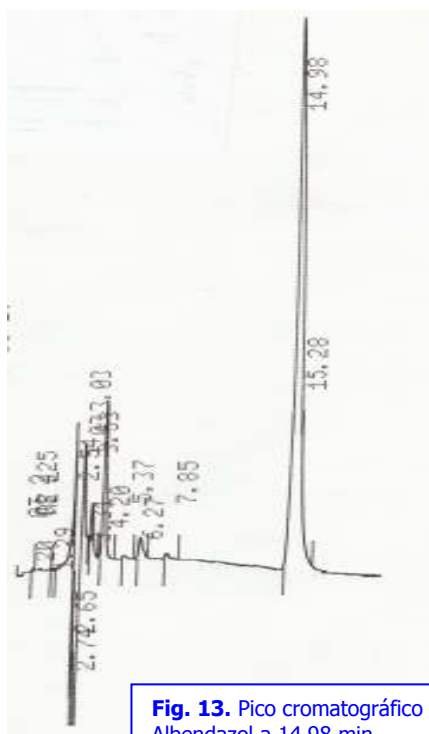
El líquido sobrenadante, en el que se encuentra el fármaco, se vierte en unos vasitos de cristal (usando uno por punto). Se filtra el líquido mediante jeringa a través de filtro millipore de membrana de nylon de 0,45 micrómetros y se procede al llenado de los viales de inyección del HPLC. Una vez lleno el vial se cierra con pistola taponadora para evitar al máximo la evaporación.

Los viales se inyectan en el HPLC utilizando el muestreador automático para determinar las concentraciones de albendazol y sus metabolitos.

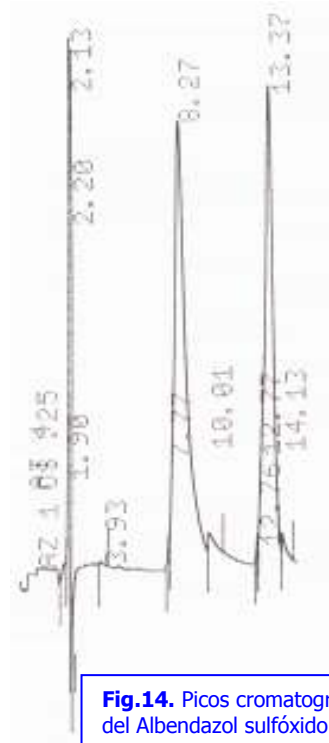
Se prepara una recta patrón tomando 50 mg del principio activo a valorar, disolviéndolo en 5 ml de ácido fórmico y 95 ml de metanol, hasta enrasar a 100 ml en matraz aforado y se agita 30 segundos aproximadamente. De esta forma se obtiene una concentración de 0,5 mg/ml. A partir de aquí se realizan diluciones seriadas para obtener la recta patrón.

Se utilizó para el análisis un equipo de cromatografía líquida modular Gilson.

Los ensayos de Albendazol se han llevado a cabo según el método de HPLC descrito en la USP 24 (2000). Para esto usamos una columna C<sub>18</sub> (Hypersil®), y una fase móvil formada por



**Fig. 13.** Pico cromatográfico del Albendazol a 14,98 min.



**Fig.14.** Picos cromatográficos del Albendazol sulfóxido y sulfona a 8,27 y 13,37 min.

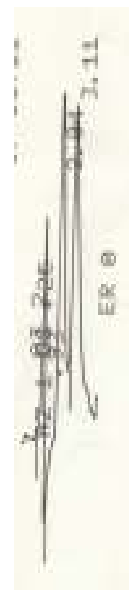
5,5 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> disuelto en 400ml de agua y mezclados con 600ml de metanol con un flujo de 1ml/min. Las muestras se analizaron a una longitud de onda de 291nm. En estas condiciones el tiempo de retención fue de 14,98 minutos. Para validar los datos la linealidad del método ha sido estudiada en un rango entre 0,01 y 1 µg/ml, el coeficiente de correlación obtenido fue siempre al menos de 0,99. El límite de detección para el Albendazol fue 4 ng/ml y la precisión inter día fue de 2,9%.

El Albendazol sulfóxido y la sulfona son los principales metabolitos del Albendazol y ambos han sido analizados usando el método descrito por García y col., 1999. Se usó una columna Hypersil® BDS ODS2 y una fase móvil compuesta por 800ml de agua, con 188 µl de ácido ortofosfórico al 85% y 200ml de acetonitrilo con un flujo de 1,5ml/min. Las muestras se analizaron a una longitud de onda de 290 nm. En estas condiciones el tiempo de retención del Albendazol sulfóxido fue de 8,27 min y de 13,37 min para la sulfona. Para validar los datos la linealidad del método ha sido estudiada en un rango entre 0,01 y 1 µg/ml, obteniéndose un coeficiente de correlación de al menos 0,99. El límite de detección para el Albendazol sulfóxido

fue 13 ng/ml y el de la sulfona de 10 ng/ml, la precisión inter día fue de 4% y 4,5%, respectivamente.

### 7.3.6. Determinación de enantiómeros.

Para poder realizar el análisis cuantitativo de los enantiómeros del Albendazol sulfóxido ABZSO (+) y ABZSO (-), las muestras fueron en primer lugar analizadas por el procedimiento descrito en el apartado anterior, procedimiento que no es quiral. Conociendo el tiempo de retención del Albendazol sulfóxido, se procedió a recolectar las muestras par su posterior análisis. Estas muestras fueron concentradas a sequedad a 70°C, usando un concentrador Savant Speedvac®. Posteriormente las muestras fueron redisueltas y filtradas mediante un filtro PVDF Durapore® de 0,45µm. El ensayo quiral fue hecho de acuerdo al método previamente descrito por García y col., 1999. Para ello se empleó un columna quiral AGP y una fase móvil formada por un buffer fosfato sódico (8mM, pH 7,0) con 1,25 ml de 2-propanol y un flujo de 0,9 ml/min. Las muestras fueron analizadas a una longitud de onda de 290 nm. En esas condiciones el tiempo de retención fue de 2,0 minutos para ABZSO (+) y de 3,1 minutos para ABZSO (-). Para validar los datos la linealidad del método ha sido estudiada en un rango entre 0,01 y 1 µg/ml, obteniéndose un coeficiente de correlación de al menos 0,99. El límite de detección y la precisión inter día fueron los mismos para cada enantiómero, correspondiendo a 3 ng/ml y 3,5%, respectivamente.



**Fig.15.** Resolución quiral de ABZSO.

### 7.3.7. Análisis estadístico.

En las pruebas biofarmacéuticas y farmacocinéticas,  $T_{m\acute{a}x}$  y  $C_{m\acute{a}x}$  han sido consideradas como los valores medios máximos, usando al menos 6 elementos por cada punto, estos elementos proceden de varios grupos seriados de 6 ratones a los que se ha sometido a la prueba de *chi cuadrado* ( $\chi^2$ ) de Chauvenet para eliminación de valores aberrantes. El  $ABC_{0 \rightarrow \infty}$  fue calculada para el principal metabolito ABZSO, como la suma del  $ABC_{0 \rightarrow 24h}$  y  $ABC_{24 \rightarrow \infty}$ . El  $ABC_{0 \rightarrow 24h}$  ha sido calculada mediante el método de los trapecios, mientras que el  $ABC_{24 \rightarrow \infty}$  fue calculada a partir de la concentración a 24 horas y la constante de eliminación  $K_e$ . La  $K_e$  fue calculada a partir de las fases finales de las gráficas concentración/tiempo. El estudio estadístico se realizó mediante análisis de varianza de una sola vía (test de ANOVA) sobre los parámetros farmacocinéticos.

En las pruebas de actividad farmacológica, sobre las muestras extraídas a partir de las poblaciones consideradas, se han estimado los siguientes parámetros: media aritmética, desviación estándar y *t* de Student (como método comparativo de las dos muestras). Una vez determinada la *t* de Student, se establece su significación estadística, considerando no significativos aquellos valores con  $p > 0,05$ . Las poblaciones consideradas se han establecido a partir de un grueso de población global sometida a pruebas, a las que se les ha validado mediante el método de la *chi cuadrado* ( $\chi^2$ ) de Chauvenet para la eliminación de valores aberrantes.

# RESULTADOS

---

## **8. RESULTADOS.**

### **8.1. MEJORA DE LA BIODISPONIBILIDAD Y ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA DEL ALBENDAZOL MEDIANTE LA FORMULACION EN COMPLEJOS DE INCLUSION.**

#### **8.1.1. Actividad antiparasitaria.**

##### **8.1.1.1. Fase intestinal.**

Las tablas 1 a 5 recogen los resultados obtenidos del tratamiento durante la fase intestinal de una infección experimental de *T. spiralis*, con dos muestras de albendazol, administradas en una dosis única a las 24 horas post-infección.

Las muestras administradas corresponden a dos formulaciones diferentes de albendazol, una de ella formulada en una suspensión de carboximetil celulosa (Tablas 1 y 2) y la otra formando un complejo en una solución de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrinas (Tablas 3 y 4). A su vez estas dos formulaciones se administraron a dosis de 5 y 10 mg/kg de peso.

En todos los casos, tanto en el lote control como en los problemas, se realizó el recuento de gusanos recuperados del intestino delgado, determinándose la media aritmética, desviación estándar y eficacia expresada como porcentaje de reducción de adultos recuperados en los lotes problema, con respecto al control. Además se valoró la eficacia comparada de las dos formulaciones, analizando el diferente porcentaje de reducción que ambas expresaban frente al control, así como la reducción que la formulación de albendazol en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina mostraba frente a la de referencia.

Los datos relativos a la formulación de referencia muestran un descenso significativo tanto en la dosis de 5 mg/kg de peso con una reducción del 44,24%, como en la de 10 mg/kg de peso en la que se alcanza una reducción del 67,69%. Mayor reducción muestran los datos obtenidos a partir de la solución de albendazol en ciclodextrina donde se consiguen reducciones del 69,1 y 98,84% para las dosis de 5 y 10 mg/kg de peso, respectivamente. Trasladando estas reducciones a una escala de comparación entre las dos formulaciones podemos decir que la formulación de albendazol en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina es un 44,58% más eficaz para la dosis de 5 mg/kg de peso y un 96,41% para la dosis de 10 mg/kg de peso que la de referencia formulada en carboximetil celulosa sódica (Tabla 5).

La significación estadística de estos porcentajes de reducción se determinó previo cálculo de la *t* de Student, considerándose significativos aquellos porcentajes con valor de *p* inferior a 0,05.

En estos análisis, como reflejan los datos enunciados anteriormente, se comprueba que en el tratamiento de preadultos de *T. spiralis* ambas formulaciones presentan un rango de actividad considerable y un porcentaje de reducción estadísticamente significativo. Por otro lado se demuestra que la formulación de albendazol en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina mejora cuantitativamente la actividad del principio activo.

## RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO FRENTE A LA FASE INTESTINAL

**TABLA 1.** ALBENDAZOL EN CARBOXIMETIL CELULOSA 5 MG/KG PESO

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de adultos	GRUPO TRATADOS Nº de adultos
1	130	59
2	112	69
3	107	51
4	145	67
5	136	88
6	106	67
7	110	53
8	129	78
9	112	80
10	120	61
Cálculos		
Media	120,7	67,3
Desviación estándar	13,54	11,95
% de reducción		<b>44,24</b>
t de Student		3,969
Grado de significación		0,000

**TABLA 2.** ALBENDAZOL EN CARBOXIMETIL CELULOSA 10 MG/KG PESO

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de adultos	GRUPO TRATADOS Nº de adultos
1	130	36
2	112	42
3	107	28
4	145	26
5	136	36
6	106	39
7	110	46
8	129	36
9	112	59
10	120	42
Cálculos		
Media	120,7	39
Desviación estándar	13,54	9,33
% de reducción		<b>67,69</b>
t de Student		4,208
Grado de significación		0,000

## RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO FRENTE A LA FASE INTESTINAL

**TABLA 3.** ALBENDAZOL EN HIDROXIPROPIL-B-CICLODEXTRINA 5 MG/KG PESO

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de adultos	GRUPO TRATADOS Nº de adultos
1	130	35
2	112	32
3	107	49
4	145	28
5	136	41
6	106	39
7	110	32
8	129	38
9	112	26
10	120	53
Cálculos		
Media	120,7	37,3
Desviación estándar	13,54	8,67
% de reducción		<b>69,1</b>
t de Student		4,22
Grado de significación		0,000

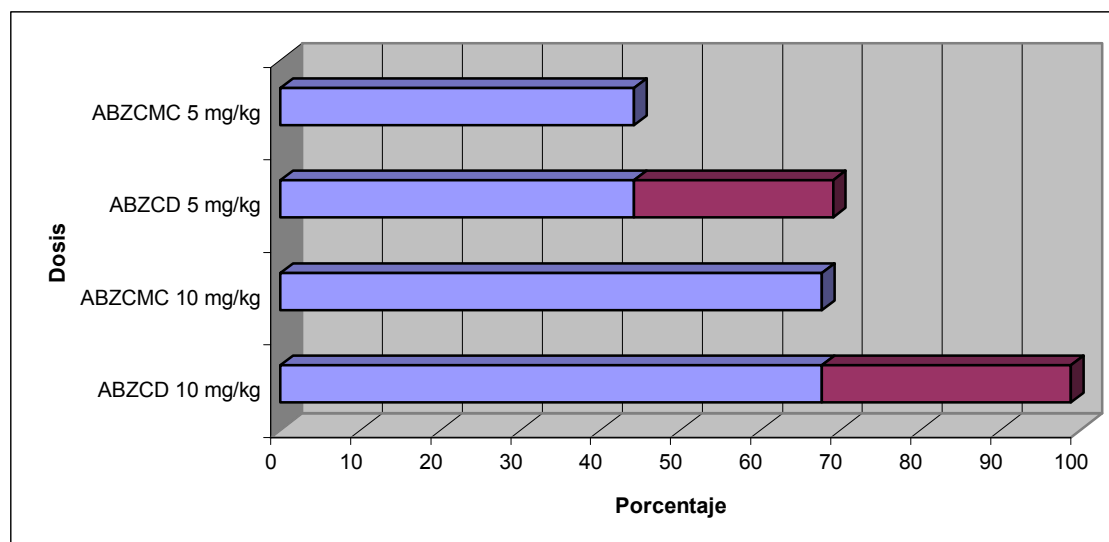
**TABLA 4.** ALBENDAZOL EN HIDROXIPROPIL-B-CICLODEXTRINA 10 MG/KG PESO

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de adultos	GRUPO TRATADOS Nº de adultos
1	130	0
2	112	6
3	107	1
4	145	4
5	136	2
6	106	0
7	110	0
8	129	1
9	112	0
10	120	0
Cálculos		
Media	120,7	1,4
Desviación estándar	13,54	2,07
% de reducción		<b>98,84</b>
t de Student		4,308
Grado de significación		0,000

## RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO FRENTE A LA FASE INTESTINAL

**TABLA 5.** COMPARACION DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA DE CARBOXIMETIL CELULOSA FRENTE A HIDROXIPROPIL-B-CICLODEXTRINA

Nº de ratones	DOSIS DE 5 MG/KG DE PESO		DOSIS DE 10 MG/KG DE PESO	
	GRUPO CMC Nº de adultos	GRUPO HPBCD Nº de adultos	GRUPO CMC Nº de adultos	GRUPO HPBCD Nº de adultos
1	59	35	36	0
2	69	32	42	6
3	51	49	28	1
4	67	28	26	4
5	88	41	36	2
6	67	39	39	0
7	53	32	46	0
8	78	38	36	1
9	80	26	59	0
10	61	53	42	0
Cálculos				
Media	67,3	37,3	39	1,4
Desviación estándar	11,95	8,67	9,33	2,07
% de reducción		<b>44,58</b>		<b>96,41</b>
t de Student		3,637		4,126
Grado de significación		0,000		0,000

**Fig. 16.** Porcentajes comparados de reducción de adultos en la fase intestinal

#### 8.1.1.2. Fase migratoria.

Las tablas 6 a 10 recogen los resultados obtenidos del tratamiento de una infección experimental con *T. spiralis* durante la fase migratoria. Durante este experimento se administraron dos tratamientos con albendazol en régimen de dosis múltiple, los días 13, 14 y 15 post-infección.

Se probaron dos formulaciones diferentes de albendazol, una de ella formulada en una suspensión de carboximetil celulosa (Tablas 6 y 7) y la otra formando un complejo en una solución de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrinas (Tablas 8 y 9). A su vez estas dos formulaciones se administraron a dosis de 50 y 100 mg/kg de peso.

En todos los casos y tanto en el lote control como en los problemas, se realizó el recuento de larvas obtenidas por digestión de la canal, determinándose la media aritmética, desviación estándar y eficacia, expresada como porcentaje de reducción de larvas recuperadas en los lotes problema, con respecto al control. Además se valoró la eficacia comparada entre las dos formulaciones, analizando el diferente porcentaje de reducción que ambas expresaban frente al control y comparando la reducción que el lote formulado en el complejo de inclusión de ciclodextrina mostraba frente al de referencia (carboximetil celulosa).

Los datos relativos a la formulación de referencia muestran un descenso no significativo tanto en la dosis de 50 mg/kg de peso con una reducción del 38,55%, como en la de 100 mg/kg de peso en la que se alcanza una reducción del 52,02%. Mayor reducción muestran los datos obtenidos a partir de la solución de albendazol en ciclodextrina donde se consiguen reducciones del 48,26 y 56,44% para las dosis de 50 y 100 mg/kg de peso, respectivamente. Trasladando estas reducciones a una escala de comparación entre las dos formulaciones podemos decir que la formulación de albendazol en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina es un 15,8% más eficaz para la dosis de 50 mg/kg de peso y un 9,21% para la dosis de 100 mg/kg de peso que la de referencia formulada en carboximetil celulosa sódica (Tabla 10).

La significación estadística de estos porcentajes de reducción se determinó previo cálculo de la t de Student, considerándose significativos aquellos porcentajes con valor de  $p$  inferior a 0,05.

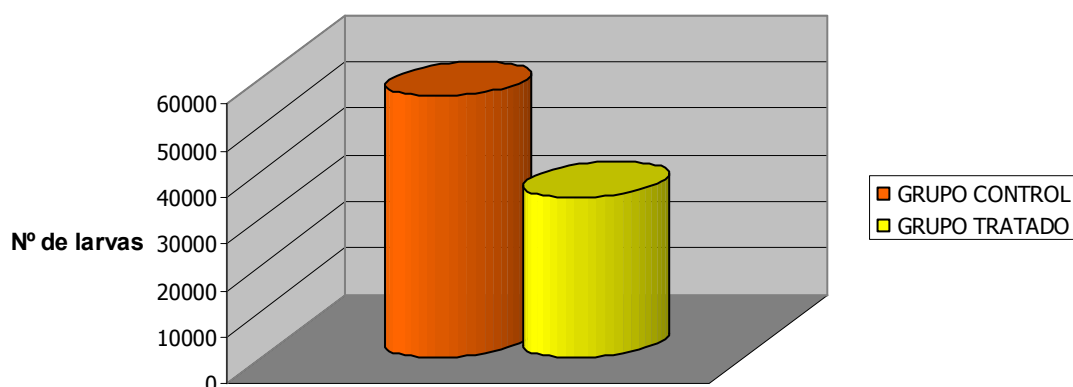
En estos análisis se comprobó que en el tratamiento de embriones emigrantes de *T. spiralis* ambas formulaciones presentan un rango de actividad similar, siendo ésta la fase más refractaria del tratamiento, ya que los porcentajes de reducción son bajos aunque estadísticamente significativos. Por otro lado se demostró que la nueva formulación de

albendazol en complejos de inclusión de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina mejora ligeramente la actividad del principio activo, sin que el porcentaje de reducción resulte estadísticamente significativo para ninguna de las dos dosis del ensayo.

## RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO FRENTE A LA FASE MIGRATORIA

**TABLA 6.** ALBENDAZOL EN CARBOXIMETIL CELULOSA 50 MG/KG PESO

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de larvas	GRUPO TRATADOS Nº de larvas
1	58608	42091,2
2	53013,6	40226,4
3	52081,2	48484,8
4	59673,6	64335,6
5	49683,6	23709,6
6	60073,2	25974
7	60606	33166,8
8	59274	67399,2
9	56610	51681,6
10	64069	39560,4
11	55544,4	22244,4
12	50482,8	16650
13	56476,8	19580,4
14	52341,7	17182,8
15	51976,2	12980,4
16	54786,3	24908,4
Cálculos		
Media	55956,28	34386
Desviación estándar	4166,27	16963,52
% de reducción		<b>38,55</b>
t de Student		2,948
Grado de significación		0,000

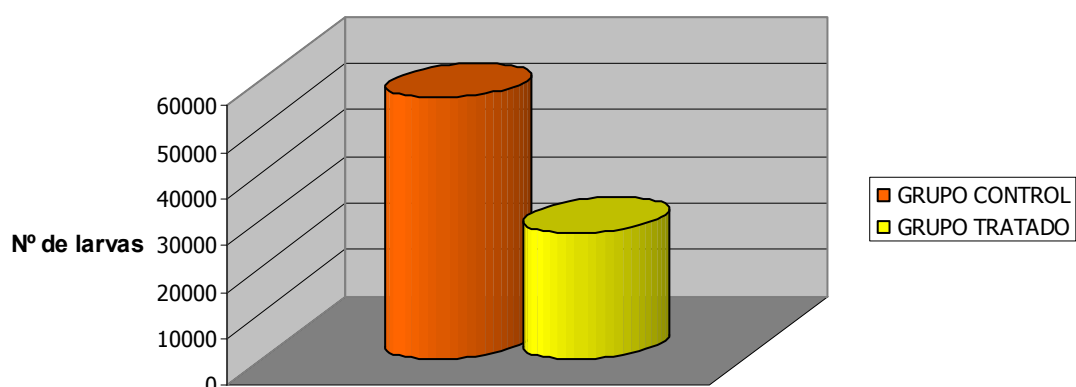


**Fig. 17.** Comparativa del grupo control frente a albendazol formulado en carboximetilcelulosa sódica a dosis de 50 mg/kg de peso

## RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO FRENTE A LA FASE MIGRATORIA

**TABLA 7.** ALBENDAZOL EN CARBOXIMETIL CELULOSA 100 MG/KG PESO

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de larvas	GRUPO TRATADOS Nº de larvas
1	58608	14918,4
2	53013,6	35830,8
3	52081,2	43023,6
4	59673,6	42357,6
5	49683,6	17848,8
6	60073,2	43423,2
7	60606	15984
8	59274	12387,6
9	56610	17982
10	64069	31168,8
11	55544,4	38628
12	50482,8	15850,8
13	56476,8	15051,6
14	52341,7	28504,8
15	51976,2	21041,6
16	54786,3	35564,4
Cálculos		
Media	55956,28	26847,87
Desviación estándar	4166,27	11594,91
% de reducción		<b>52,02</b>
t de Student		3,808
Grado de significación		0,000

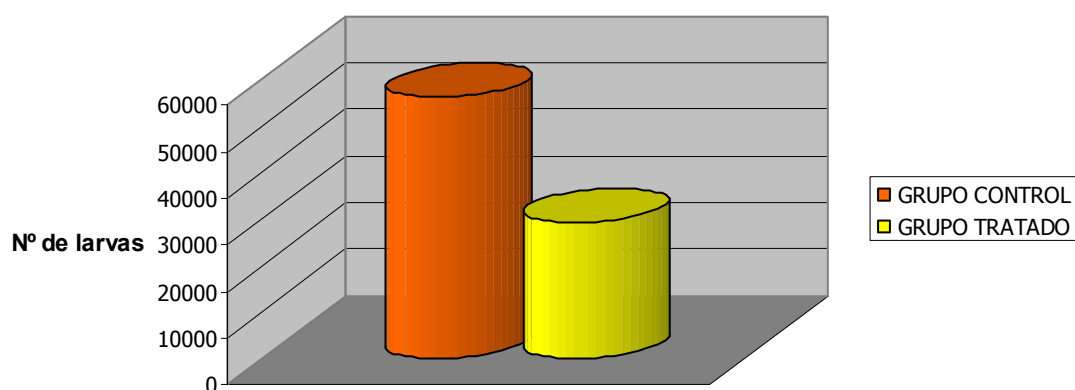


**Fig. 18.** Comparativa del grupo control frente a albendazol formulado en carboximetilcelulosa sódica a dosis de 100 mg/kg de peso

## RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO FRENTE A LA FASE MIGRATORIA

**TABLA 8.** ALBENDAZOL EN HIDROXIPROPIL-B-CICLODEXTRINA 50 MG/KG PESO

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de larvas	GRUPO TRATADOS Nº de larvas
1	58608	41824,8
2	53013,6	34765,2
3	52081,2	47419,2
4	59673,6	24109,2
5	49683,6	41292
6	60073,2	38494,8
7	60606	32634
8	59274	38628
9	56610	46486,8
10	64069	34498,8
11	55544,4	14385,6
12	50482,8	11322
13	56476,8	10922,4
14	52341,7	13852,8
15	51976,2	13719,6
16	54786,3	18914,4
Cálculos		
Media	55956,28	28954,35
Desviación estándar	4166,27	13320,61
% de reducción		<b>48,26</b>
T de Student		3,593
Grado de significación		0,000

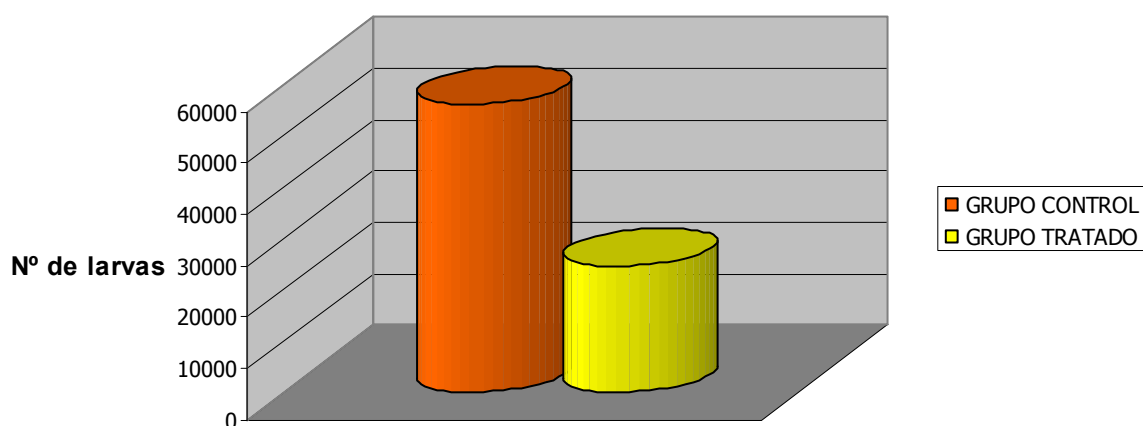


**Fig. 19.** Comparativa del grupo control frente a albendazol formulado en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a dosis de 50 mg/kg de peso

## RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO FRENTE A LA FASE MIGRATORIA

**TABLA 9.** ALBENDAZOL EN HIDROXIPROPIL-B-CICLODEXTRINA 100 MG/KG PESO

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de larvas	GRUPO TRATADOS Nº de larvas
1	58608	22910,4
2	53013,6	25174,8
3	52081,2	32500,8
4	59673,6	31302
5	49683,6	39693,6
6	60073,2	22910,4
7	60606	23576,4
8	59274	20379,6
9	56610	21445,2
10	64069	8391,6
11	55544,4	15984
12	50482,8	9324
13	56476,8	38812,3
14	52341,7	37201,6
15	51976,2	32203,8
16	54786,3	8206,5
Cálculos		
Media	55956,28	24376,06
Desviación estándar	4166,27	10414,3
% de reducción		<b>56,44</b>
T de Student		3,958
Grado de significación		0,000

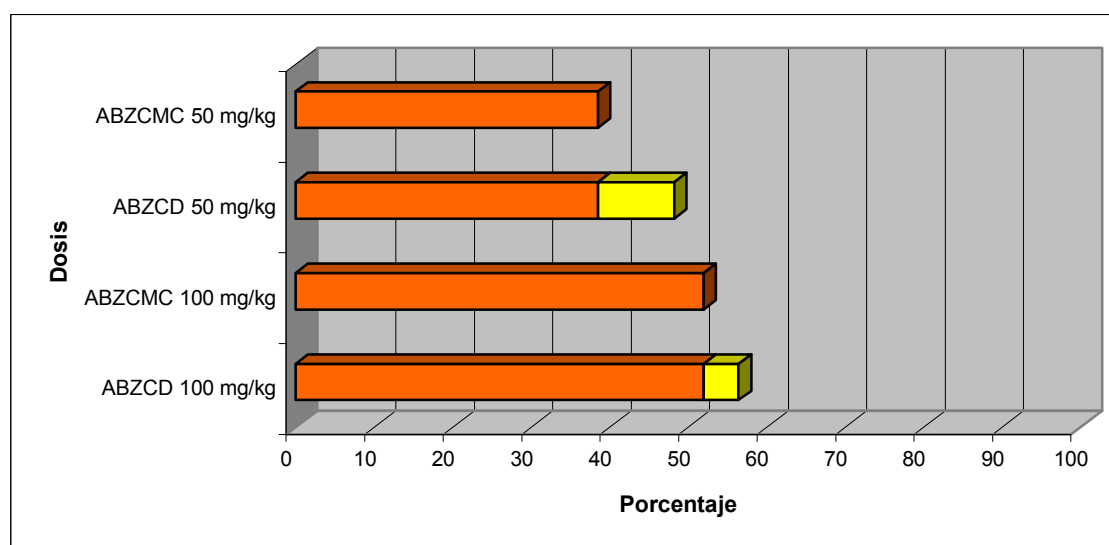


**Fig. 20.** Comparativa del grupo control frente a albendazol formulado en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a dosis de 100 mg/kg de peso

## RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO FRENTE A LA FASE MIGRATORIA

**TABLA 10.** COMPARACION DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA DE CARBOXIMETIL CELULOSA FRENTE A HIDROXIPROPIL-B-CICLODEXTRINA 50 MG/KG PESO

Nº de ratones	DOSIS DE 50 MG/KG DE PESO		DOSIS DE 100 MG/KG DE PESO	
	GRUPO CMC Nº de larvas	GRUPO HPBCD Nº de larvas	GRUPO CMC Nº de larvas	GRUPO HPBCD Nº de larvas
1	42091,2	41824,8	14918,4	22910,4
2	40226,4	34765,2	35830,8	25174,8
3	48484,8	47419,2	43023,6	32500,8
4	64335,6	24109,2	42357,6	31302
5	23709,6	41292	17848,8	39693,6
6	25974	38494,8	43423,2	22910,4
7	33166,8	32634	15984	23576,4
8	67399,2	38628	12387,6	20379,6
9	51681,6	46486,8	17982	21445,2
10	39560,4	34498,8	31168,8	8391,6
11	22244,4	14385,6	38628	15984
12	16650	11322	15850,8	9324
13	19580,4	10922,4	15051,6	38812,3
14	17182,8	13852,8	28504,8	37201,6
15	12980,4	13719,6	21041,6	32203,8
16	24908,4	18914,4	35564,4	8206,5
Cálculos				
Media	34386	28954,35	26847,87	24376,06
Desviación estándar	16963,52	13320,61	11594,91	10414,3
% de reducción		<b>15,8</b>		<b>9,21</b>
t de Student		1,054		0,517
Grado de significación		0,129		0,551

**Fig. 16.** Porcentajes comparados de reducción de larvas en la fase migratoria

### 8.1.1.3. Fase muscular.

Las tablas 11 a 15 recogen los resultados obtenidos del tratamiento de una infección experimental con *T. spiralis* durante la fase muscular. Durante este experimento se administraron dos formulaciones de albendazol en régimen de dosis múltiple, los días 34, 35 y 36 post-infección.

Se ensayaron dos formulaciones diferentes de albendazol, una de ellas formulada en una suspensión de carboximetil celulosa (Tablas 11 y 12) y la otra formando un complejo en una solución de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrinas (Tablas 13 y 14). A su vez estas dos formulaciones se administraron a dosis de 50 y 100 mg/kg de peso.

En todos los casos y tanto en el lote control como en los problemas, se realizó el recuento de larvas obtenidas por digestión de la canal, determinándose la media aritmética, desviación estándar y eficacia, expresada como porcentaje de reducción de larvas recuperadas en los lotes problema, con respecto al control. Además se valoró la eficacia comparada entre las dos formulaciones, analizando el diferente porcentaje de reducción que ambas expresaban frente al control y comparando la reducción que el lote formulado en el complejo de inclusión de ciclodextrina mostraba frente al de referencia (carboximetil celulosa).

Los datos relativos a la formulación de referencia muestran un descenso significativo tanto en la dosis de 50 mg/kg de peso con una reducción del 25,15%, como en la de 100 mg/kg de peso en la que se alcanza una reducción del 35,49%. Mayor reducción muestran los datos obtenidos a partir de la solución de albendazol en ciclodextrina donde se consiguen reducciones del 56,46 y 97,53% para las dosis de 50 y 100 mg/kg de peso, respectivamente. Trasladando estas reducciones a una escala de comparación entre las dos formulaciones podemos decir que la formulación de albendazol en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina es un 41,84% más eficaz para la dosis de 50 mg/kg de peso y un 96,18% para la dosis de 100 mg/kg de peso que la de referencia formulada en carboximetil celulosa sódica (Tabla 15).

La significación estadística de estos porcentajes de reducción se determinó previo cálculo de la *t* de Student, considerándose significativos aquellos porcentajes con valor de *p* inferior a 0,05.

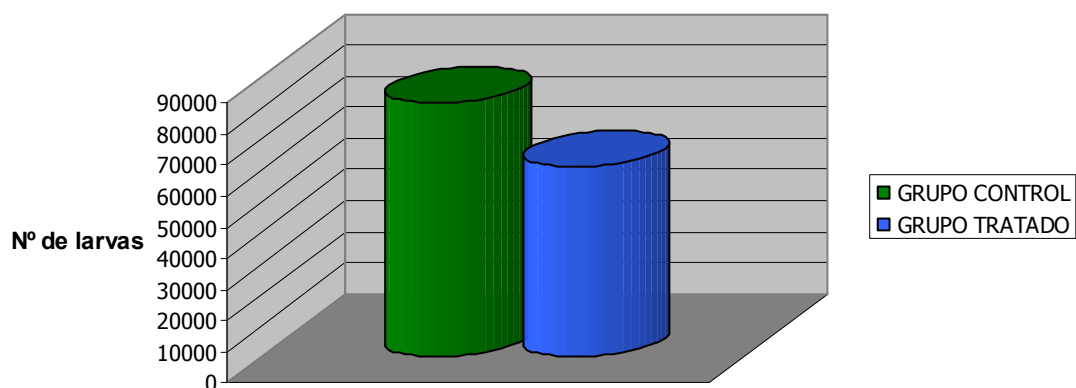
En este estudio se comprobó que en el tratamiento de larvas enquistadas de *T. spiralis* ambas formulaciones presentan un rango de actividad dispar, rozando la significación estadística, para la formulación de albendazol en la suspensión de carboximetil celulosa en la dosis de 50 mg/kg de peso, mientras que para el resto de dosis y formulaciones resultan

claramente significativas desde el punto de vista estadístico. Por otro lado se demostró que la nueva formulación de albendazol en complejos de inclusión de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina mejora considerablemente la actividad del principio activo, siendo estadísticamente significativo el porcentaje de reducción en todos los casos.

## RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO FRENTE A LA FASE MUSCULAR

**TABLA 11.** ALBENDAZOL EN CARBOXIMETIL CELULOSA 50 MG/KG PESO

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de larvas	GRUPO TRATADOS Nº de larvas
1	75283,7	117482,4
2	69930	87246
3	69980,8	42091,2
4	60379,2	62470,8
5	78215,8	84182,8
6	92546,5	29570,4
7	78721,2	36230,4
8	78055,2	65667,6
9	62204,4	133999,2
10	63003,6	35164,8
11	110556	37962
12	98654,9	19580,4
13	82546,8	33033,6
14	79976,2	54478,8
15	106706,3	66333,6
16	100089,4	72727,2
Cálculos		
Media	81678,12	61138,82
Desviación estándar	15791,35	32282,49
% de reducción		<b>25,15</b>
t de Student		1,695
Grado de significación		0,045

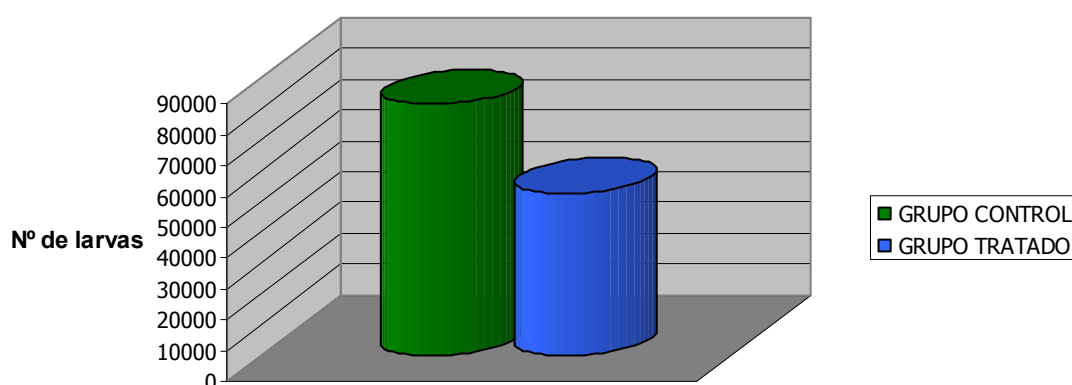


**Fig. 22.** Comparativa del grupo control frente a albendazol formulado en carboximetil celulosa sodica a dosis de 50 mg/kg de peso

## RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO FRENTE A LA FASE MUSCULAR

TABLA 12. ALBENDAZOL EN CARBOXIMETIL CELULOSA 100 MG/KG PESO

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de larvas	GRUPO TRATADOS Nº de larvas
1	75283,7	51948
2	69930	65934
3	69980,8	72061,2
4	60379,2	44755,2
5	78215,8	67399,2
6	92546,5	22910,4
7	78721,2	94572
8	78055,2	57009,6
9	62204,4	57276
10	63003,6	36496,8
11	110556	55810,8
12	98654,9	37562,4
13	82546,8	53013,6
14	79976,2	12787,2
15	106706,3	73260
16	100089,4	40226,4
Cálculos		
Media	81678,12	52688,93
Desviación estándar	15791,35	20302,29
% de reducción		<b>35,49</b>
t de Student		2,797
Grado de significación		0,003

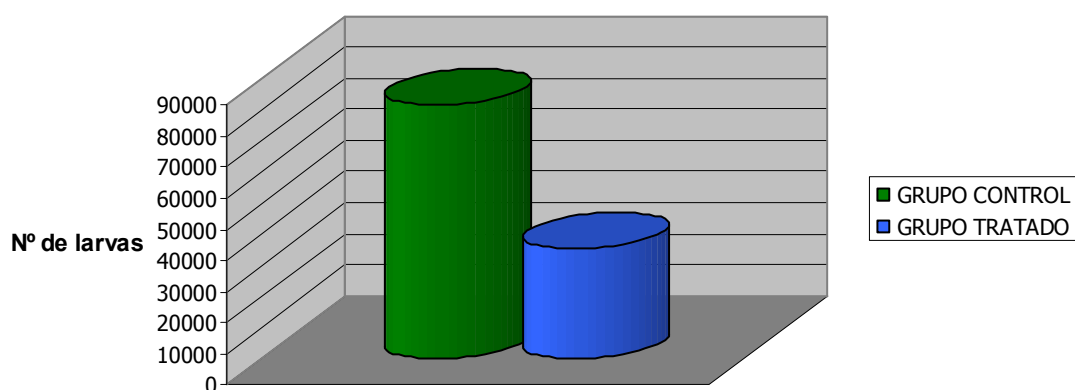


**Fig. 23.** Comparativa del grupo control frente a albendazol formulado en carboximetil celulosa sodica a dosis de 100 mg/kg de peso

## RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO FRENTE A LA FASE MUSCULAR

**TABLA 13.** ALBENDAZOL EN HIDROXIPROPIL-B-CICLODEXTRINA 50 MG/KG PESO

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de larvas	GRUPO TRATADOS Nº de larvas
1	75283,7	27572
2	69930	72194
3	69980,8	1465,2
4	60379,2	58874,4
5	78215,8	23842,8
6	92546,5	77389,2
7	78721,2	14650,2
8	78055,2	38095,2
9	62204,4	17031,6
10	63003,6	41691,6
11	110556	10731,6
12	98654,9	26506,8
13	82546,8	31168,8
14	79976,2	26506,8
15	106706,3	81118,8
16	100089,4	20131,2
Cálculos		
Media	81678,12	35560,64
Desviación estándar	15791,35	24408,60
% de reducción		<b>56,46</b>
t de Student		3,332
Grado de significación		0,000

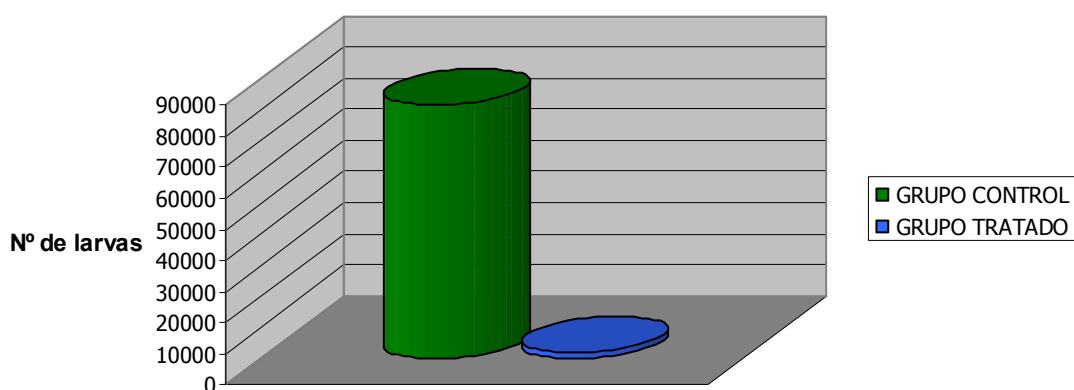


**Fig. 24.** Comparativa del grupo control frente a albendazol formulado en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a dosis de 50 mg/kg de peso

## RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO FRENTE A LA FASE MUSCULAR

**TABLA 14.** ALBENDAZOL EN HIDROXIPROPIL-B-CICLODEXTRINA 100 MG/KG PESO

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de larvas	GRUPO TRATADOS Nº de larvas
1	75283,7	1185,8
2	69930	3916
3	69980,8	266,4
4	60379,2	532,8
5	78215,8	5875,2
6	92546,5	4275,2
7	78721,2	2868
8	78055,2	4079,2
9	62204,4	133,2
10	63003,6	799,2
11	110556	666
12	98654,9	2170,8
13	82546,8	3303,6
14	79976,2	1731,6
15	106706,3	110
16	100089,4	301,4
Cálculos		
Media	81678,12	2013,40
Desviación estándar	15791,35	1820,69
% de reducción		<b>97,53</b>
t de Student		4,246
Grado de significación		0,000

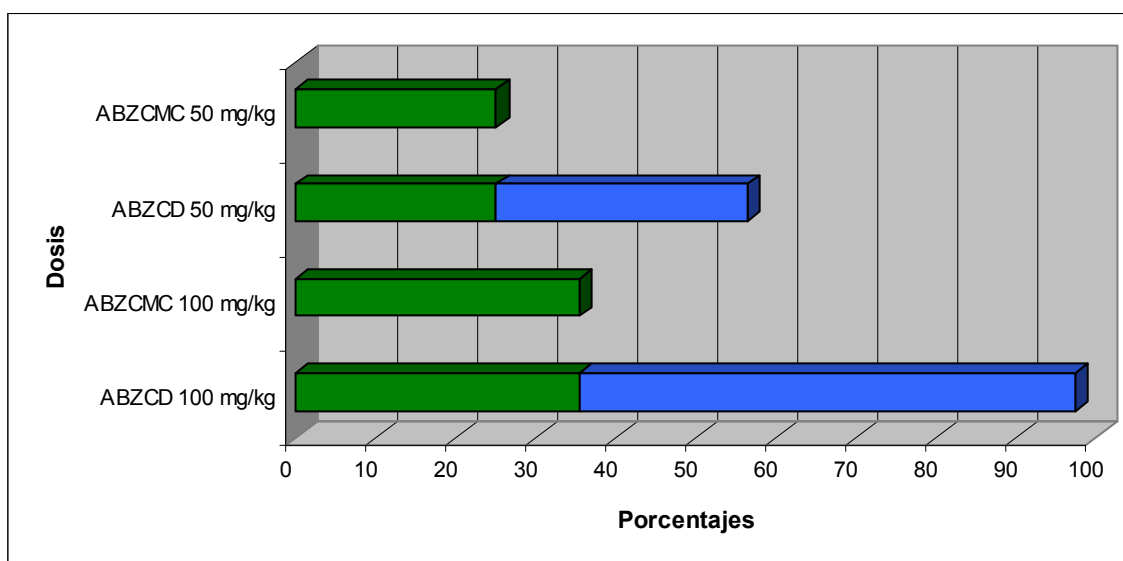


**Fig. 25.** Comparativa del grupo control frente a albendazol formulado en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a dosis de 100 mg/kg de peso

## RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO FRENTE A LA FASE MUSCULAR

**TABLA 15.** COMPARACION DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA DE CARBOXIMETIL CELULOSA FRENTE A HIDROXIPROPIL-B-CICLODEXTRINA

Nº de ratones	DOSIS DE 50 MG/KG DE PESO		DOSIS DE 100 MG/KG DE PESO	
	GRUPO CMC Nº de larvas	GRUPO HPBCD Nº de larvas	GRUPO CMC Nº de larvas	GRUPO HPBCD Nº de larvas
1	117482,4	27572	51948	1185,8
2	87246	72194	65934	3916
3	42091,2	1465,2	72061,2	266,4
4	62470,8	58874,4	44755,2	532,8
5	84182,8	23842,8	67399,2	5875,2
6	29570,4	77389,2	22910,4	4275,2
7	36230,4	14650,2	94572	2868
8	65667,6	38095,2	57009,6	4079,2
9	133999,2	17031,6	57276	133,2
10	35164,8	41691,6	36496,8	799,2
11	37962	10731,6	55810,8	666
12	19580,4	26506,8	37562,4	2170,8
13	33033,6	31168,8	53013,6	3303,6
14	54478,8	26506,8	12787,2	1731,6
15	66333,6	81118,8	73260	110
16	72727,2	20131,2	40226,4	301,4
Cálculos				
Media	61138,82	35560,64	52688,93	2013,40
Desviación estándar	32282,49	24408,60	20302,29	1820,69
% de reducción		<b>41,84</b>		<b>96,18</b>
t de Student		1,845		3,856
Grado de significación		0,073		0,000

**Fig. 26.** Porcentajes comparados de reducción de larvas en la fase muscular

### 8.1.2. Estudio de los parámetros farmacocinéticos y biofarmacéuticos.

La tabla 16 muestra el análisis de los datos obtenidos del estudio biofarmacéutico del albendazol en sus dos formulaciones. Los parámetros farmacocinéticos valorados son la  $t_{m\acute{a}x}$ ,  $C_{m\acute{a}x}$ ,  $ABC_{0\rightarrow\infty}$ ,  $K_e$  y  $t_{1/2}$ , a las dosis de 50 y 100 mg/kg de peso para el albendazol y sus metabolitos, el albendazol sulfóxido y la sulfona. La  $t_{m\acute{a}x}$  se expresa en horas, la  $C_{m\acute{a}x}$  en  $\mu\text{g/ml}$ , el ABC en  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ , la  $K_e$  en  $\text{horas}^{-1}$ , y finalmente la semivida plasmática ( $t_{1/2}$ ) en horas.

A partir de los datos obtenidos se puede establecer una correlación entre el perfil farmacocinético y la actividad antiparasitaria entre ambas formulaciones, a partir del metabolito mayoritario y principal responsable de la actividad farmacológica, el albendazol sulfóxido o ricobendazol. Así para la formulación de referencia a dosis de 100 mg/kg de peso se puede observar que el ABC aumenta desde 42,36  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  a 100,24  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  para la formulación mejorada, correlacionándose con los porcentajes de reducción frente a los controles que aumentan también desde 35,51 a 97,54% para cada una de las formulaciones, respectivamente. De igual forma a dosis de 50 mg/kg de peso las ABC son 30,92  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  para la formulación de CMC, y de 57,18  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  para la formulación en CD, obteniéndose unas reducciones de larvas de 25,17 y 56,47% respectivamente.

En los valores obtenidos del albendazol también se observa un incremento considerable en la  $C_{m\acute{a}x}$  que va desde 0,068  $\mu\text{g/ml}$  para la dosis de 50 mg/kg de peso en la formulación de referencia hasta los 0,35  $\mu\text{g/ml}$  para la formulación en complejos de ciclodextrina. Lo mismo ocurre para la dosis de 100 mg/kg de peso, donde los valores van de 0,1  $\mu\text{g/ml}$  a 0,38  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. El ABC también muestra un incremento considerable en la dosis de 50 mg/kg de peso al pasar de 0,20  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  (CMC) a 0,49  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  en la formulación de ciclodextrinas, sin embargo este incremento no es tan importante cuando la dosis analizada es la de 100 mg/kg de peso donde paramos de 0,73  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  a 0,99  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  respectivamente.

Importante destacar el gran incremento en ABC que sufre el metabolito inactivo albendazol sulfona en ambas dosis pasando de 0,87  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  a 2,19  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  y 3,53  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ .

**TABLA 16.** ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO FARMACOCINETICO DEL ALBENDAZOL EN CARBOXIMETIL CELULOSA SODICA E HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINA A DOSIS DE 50 Y 100 MG/KG DE PESO

ALBENDAZOL CMC			ALBENDAZOL CD	
	50mg/kg	100mg/kg	50mg/kg	100mg/kg
<b>T<sub>máx</sub></b>	0,5 h	1,6 h	0,25 h	0,41 h
<b>C<sub>máx</sub></b>	0,068ug/ml	0,1 ug/ml	0,35ug/ml	0,38 ug/ml
<b>ABC</b>	0,20 ug.h/ml	0,73 ug.h/ml	0,49 ug.h/ml	0,99 ug.h/ml
<b>Ke</b>	0,74 h <sup>-1</sup>	0,07 h <sup>-1</sup>	0,35 h <sup>-1</sup>	0,13 h <sup>-1</sup>
<b>t<sub>1/2</sub></b>	0,92 h	8,89 h	1,94 h	5,25 h
<b>F(bd relat.)</b>			<b>241,97%</b>	<b>136,08%</b>

ALBENDAZOL SULFÓXIDO CMC			ALBENDAZOL SULFÓXIDO CD	
	50mg/kg	100mg/kg	50mg/kg	100mg/kg
<b>T<sub>máx</sub></b>	1,25 h	1,75 h	1,5 h	1,75 h
<b>C<sub>máx</sub></b>	4,76ug/ml	5,13 ug/ml	7,91ug/ml	14,42 ug/ml
<b>ABC</b>	30,92 ug.h/ml	42,36 ug.h/ml	57,18 ug.h/ml	100,24 ug.h/ml
<b>Ke</b>	0,10 h <sup>-1</sup>	0,18 h <sup>-1</sup>	0,146 h <sup>-1</sup>	0,20 h <sup>-1</sup>
<b>t<sub>1/2</sub></b>	6,74 h	3,75 h	4,74 h	3,43 h
<b>F(bd relat.)</b>			<b>184,93%</b>	<b>236,60%</b>

ALBENDAZOL SULFONA CMC			ALBENDAZOL SULFONA CD	
	50mg/kg	100mg/kg	50mg/kg	100mg/kg
<b>T<sub>máx</sub></b>	2 h	1,5 h	0,75 h	1,56 h
<b>C<sub>máx</sub></b>	0,23ug/ml	0,29 ug/ml	0,24ug/ml	0,62 ug/ml
<b>ABC</b>	0,87 ug.h/ml	0,87 ug.h/ml	2,19 ug.h/ml	3,53 ug.h/ml
<b>Ke</b>	0,23 h <sup>-1</sup>	0,23 h <sup>-1</sup>	0,11 h <sup>-1</sup>	0,33 h <sup>-1</sup>
<b>t<sub>1/2</sub></b>	2,98 h	2,98 h	5,85 h	2,05 h
<b>F(bd relat.)</b>			<b>251,36%</b>	<b>405,07%</b>

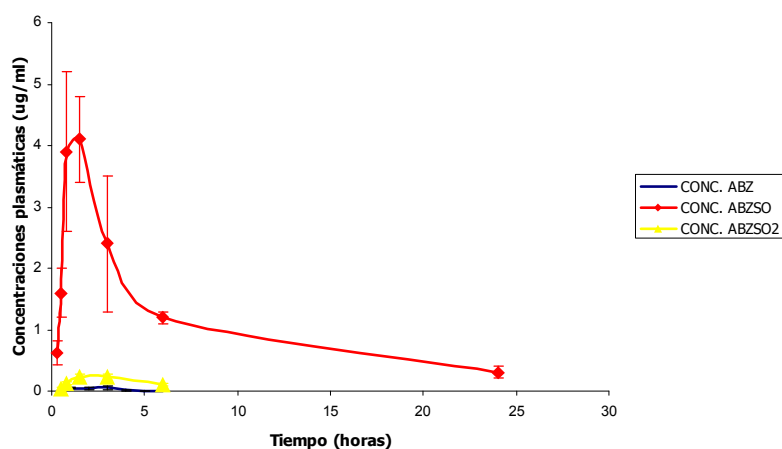
#### 8.1.2.1. [Farmacocinética comparada del albendazol a la dosis de 50 mg/kg de peso.](#)

Se procede al estudio comparado de los perfiles farmacocinéticos del albendazol formulados en suspensión en carboximetil celulosa sódica (Tabla 17) y en solución formando complejos de inclusión en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (Tabla 18). El análisis estadístico de los datos mediante la  $t$  de Student, pone de manifiesto la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para los niveles plasmáticos del albendazol a tiempos de 0,25 y 0,5 horas, administrado bajo las dos formulaciones. Para el metabolito activo albendazol sulfóxido, la significación se extiende hasta las 6 horas. Los perfiles obtenidos para el metabolito inactivo albendazol sulfona, bajo las dos formulaciones objeto del estudio, mostraron diferencias significativas en el ABC a las 2 dosis ensayadas y en los parámetros  $t_{máx}$ ,  $t_{1/2}$  y  $K_e$  a las dosis de 50 mg/kg de peso.

No se observan diferencias significativas en cuanto a la cinética de separación enantiomérica del albendazol sulfóxido bajo las dos formulaciones (Tablas 19 y 20). Los porcentajes de enantiómero ABZSO (+) y ABZSO (-) calculados mediante análisis polarimétrico, ponen de manifiesto que a partir de una proporción  $-/+$  del 62,6/37,4 y del 64,5/35,5 a los 15 minutos de la administración en las formulaciones de carboximetil celulosa sódica e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, respectivamente, se produce un aumento paulatino en la proporción del ABZSO (-) hasta alcanzar porcentajes del 80% a las 6 horas en ambas formulaciones.

**TABLA 17.** PERFIL FARMACOCINETICO DE LA SUSPENSION DE ALBENDAZOL EN CARBOXIMETIL CELULOSA SÓDICA ADMINISTRADO A LA DOSIS DE 50 mg/kg DE PESO

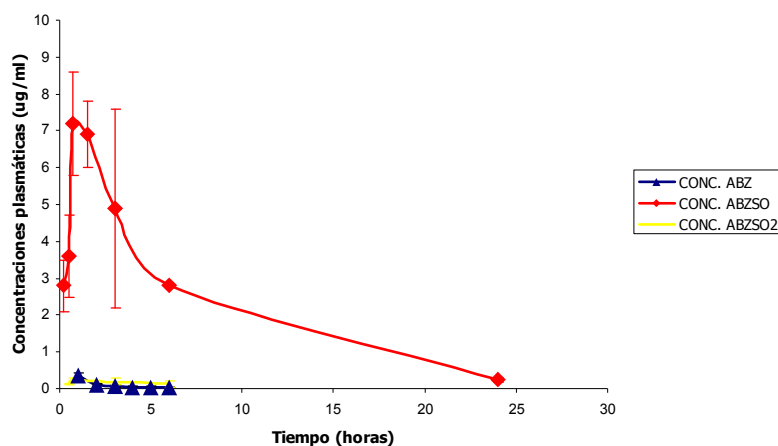
TIEMPO (h)	CONC ALZ (µg/ml)	D.S.	CONC ABZSO (µg/ml)	D.S.	CONC ABZSO <sub>2</sub> (µg/ml)	D.S.
0,25	0,05	0,01	<b>0,62</b>	0,2		
0,5	0,04	0,02	<b>1,6</b>	0,4	0,05	0,02
0,75	0,06	0,03	<b>3,9</b>	1,3	0,12	0,02
1,5	0,02	0,01	<b>4,1</b>	0,7	0,23	0,06
3	0,01	0	<b>2,4</b>	1,1	0,23	0,06
6	0,01	0	<b>1,2</b>	0,1	0,1	0,02
24			<b>0,31</b>	0,1		



**Fig. 27.** Perfil farmacocinético de la suspensión de albendazol en carboximetil celulosa sódica administrado a la dosis de 50 mg/kg de peso

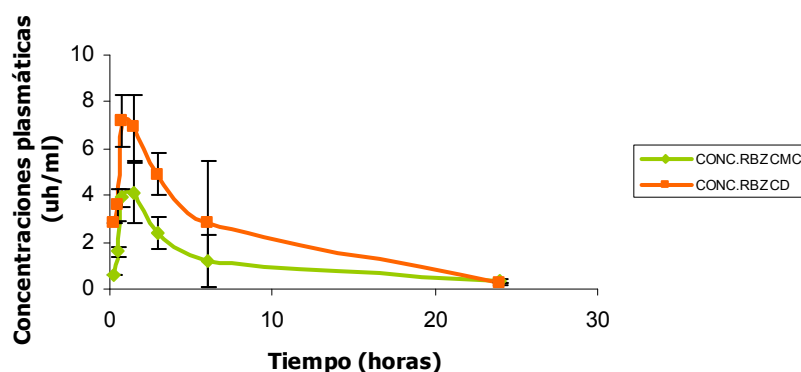
**TABLA 18.** PERFIL FARMACOCINETICO DE LA SOLUCION DE ALBENDAZOL EN HIDROXIPROPIL-β-CICLODEXTRINA ADMINISTRADO A LA DOSIS DE 50 mg/kg DE PESO

TIEMPO (h)	CONC ALZ (µg/ml)	D.S.	CONC ABZSO (µg/ml)	D.S.	CONC ABZSO <sub>2</sub> (µg/ml)	D.S.
0,25	0,35	0,07	<b>2,8</b>	0,7		
0,5	0,11	0,02	<b>3,6</b>	1,1	0,13	0,03
0,75	0,06	0,03	<b>7,2</b>	1,4	0,24	0,04
1,5	0,04	0,02	<b>6,9</b>	0,9	0,22	0
3	0,04	0,03	<b>4,9</b>	2,7	0,19	0,1
6	0,02	0	<b>2,8</b>	0	0,13	0,1
24			<b>0,24</b>	0,05		



**Fig. 28.** Perfil farmacocinético de la suspensión de albendazol en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina administrado a la dosis de 50 mg/kg de peso

Dado que el metabolito mayoritario, y por lo tanto al que se le asigna la actividad farmacológica es el albendazol sulfóxido o ricobendazol, en la figura 29 mostramos las curvas farmacocinéticas comparadas de las dos formulaciones objeto de estudio, donde se observa claramente como la complejación de la molécula proporciona una mayor biodisponibilidad.

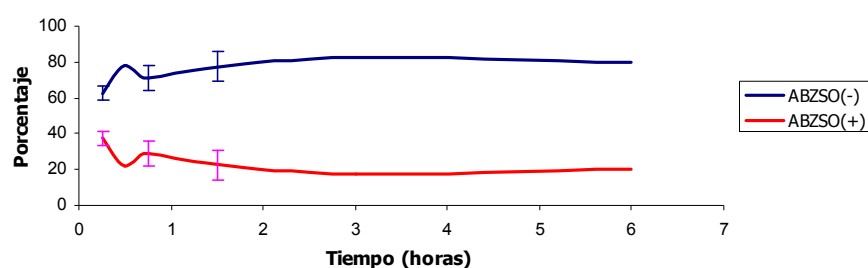


**Fig. 29.** Curvas de biodisponibilidad comparada del albendazol sulfóxido (RBZ) formulado en carboximetil celulosa sódica frente al formulado en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a la dosis de 50 mg/kg de peso

Se realizó análisis enantiomérico del albendazol sulfóxido (Tablas 19 y 20), observándose un mayor porcentaje del enantiómero (-), opuestamente a los datos referidos en otros estudios con diferentes especies de hospedador donde ha sido el enantiómero (+) el predominante. Esta tendencia se muestra tanto en la formulación de referencia como en la complejada.

**TABLA 19.** ANALISIS ENANTIOMERICO DE LA MOLECULA DE ALBENDAZOL SULFOXIDO FORMULADO EN CARBOXIMETIL CELULOSA SODICA A LA DOSIS DE 50 mg/kg DE PESO

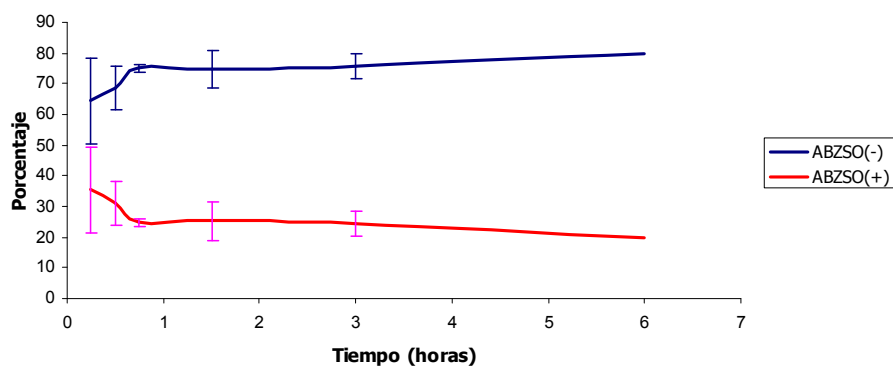
TIEMPO	ABZSO (-) %	D.S.	ABZSO (+) %	D.S.
0,25	62,6	3,9	37,4	3,9
0,5	78,2		21,8	
0,75	71	7,1	29	7,1
1,5	77,6	8,2	22,4	8,2
3	82,5		17,5	
6	<b>80</b>		<b>20</b>	



**Fig. 30.** Perfil enantiomérico del albendazol sulfóxido en carboximetil celulosa sódica a la dosis de 50 mg/kg de peso

**TABLA 20.** ANALISIS ENANTIOMERICO DE LA MOLECULA DE ALBENDAZOL SULFOXIDO FORMULADO EN HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINA A LA DOSIS DE 50 mg/kg DE PESO

TIEMPO	ABZSO (-) %	D.S.	ABZSO (+) %	D.S.
0,25	64,5	14	35,5	14
0,5	68,8	7,1	31,2	7,1
0,75	75,2	1,3	24,8	1,3
1,5	74,8	6,3	25,2	6,3
3	75,7	4,2	24,3	4,2
6	<b>80</b>		<b>20</b>	



**Fig. 31.** Perfil enantiomérico del albendazol sulfóxido en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a la dosis de 50 mg/kg de peso

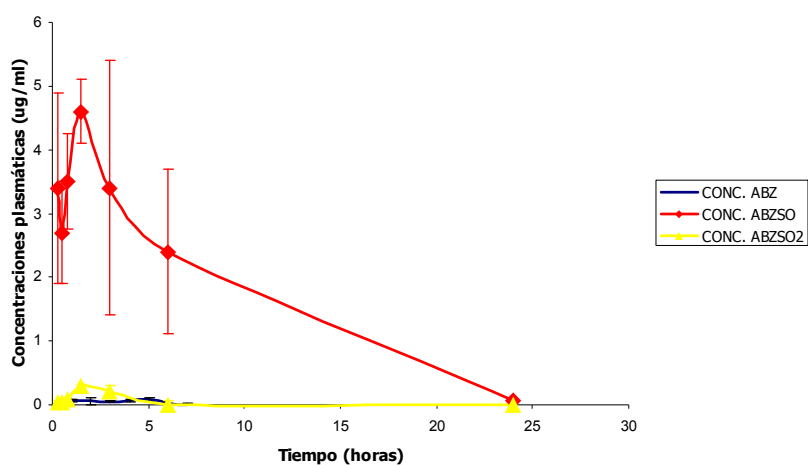
#### 8.1.2.2. [Farmacocinética comparada del albendazol a la dosis de 100 mg/kg de peso.](#)

Se procede al estudio comparado de los perfiles farmacocinéticos del albendazol formulados en suspensión en carboximetil celulosa sódica (Tabla 21) y en solución formando complejos de inclusión en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (Tabla 22). El análisis estadístico de los datos mediante la t de Student, pone de manifiesto la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para los niveles plasmáticos del albendazol hasta 1,5 horas, administrado bajo las dos formulaciones, mientras que para el metabolito activo albendazol sulfóxido, la significación se extiende hasta las 24 horas. Los perfiles obtenidos para el metabolito inactivo albendazol sulfona, muestran diferencias significativas para las concentraciones que van desde el punto 0,5 horas hasta el de 6 horas, a favor de la formulación de ciclodextrinas.

No se observan diferencias significativas en cuanto a la cinética de separación enantiomérica del albendazol sulfóxido bajo las dos formulaciones (Tablas 23 y 24). Los porcentajes de enantiómero ABZSO (+) y ABZSO (-) calculados mediante análisis polarimétrico, ponen de manifiesto que a partir de una proporción  $-/+$  del 51,7/48,3 y del 54,5/45,5 a los 15 minutos de la administración en las formulaciones de carboximetil celulosa sódica e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, respectivamente, se produce un aumento paulatino en la proporción del ABZSO (-) hasta alcanzar porcentajes del 80% a las 6 horas en ambas formulaciones.

**TABLA 21.** PERFIL FARMACOCINETICO DE LA SUSPENSION DE ALBENDAZOL EN CARBOXIMETIL CELULOSA SODICA ADMINISTRADO A LA DOSIS DE 100 mg/kg DE PESO

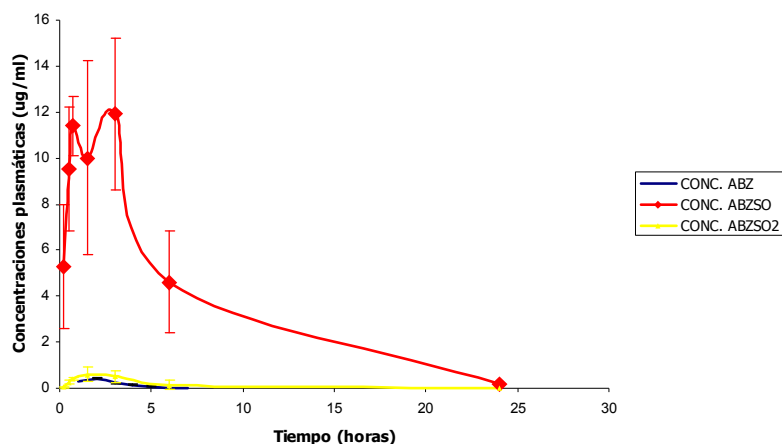
TIEMPO (h)	CONC ALZ (µg/ml)	D.S.	CONC ABZSO (µg/ml)	D.S.	CONC ABZSO <sub>2</sub> (µg/ml)	D.S.
0,25	0,06	0,02	<b>3,4</b>	1,5	0,04	0,03
0,5	0,06	0,05	<b>2,7</b>	0,8	0,05	
0,75	0,05	0,01	<b>3,5</b>	0,75	0,093	
1,5	0,06	0,02	<b>4,6</b>	0,5	0,296	0,03
3	0,08	0,03	<b>3,4</b>	2	0,209	0,08
6	0,02		<b>2,4</b>	1,3	0	0,07
24	0,01	0,02	<b>0,074</b>	0,01	0	



**Fig. 32.** Perfil farmacocinético de la suspensión de albendazol en carboximetil celulosa sódica administrado a la dosis de 100 mg/kg de peso

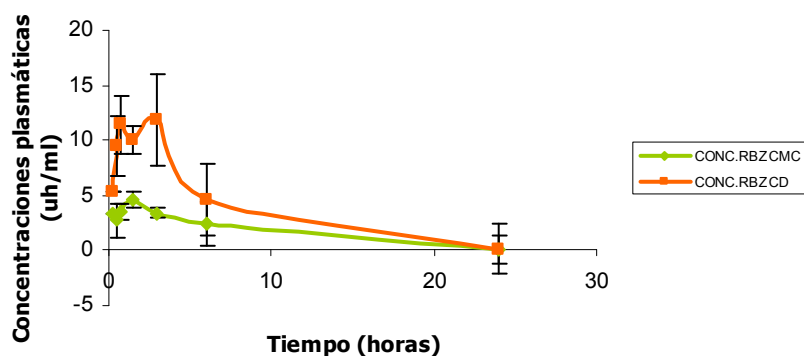
**TABLA 22.** PERFIL FARMACOCINETICO DE LA SOLUCION DE ALBENDAZOL EN HIDROXIPROPIL-β-CICLODEXTRINA ADMINISTRADO A LA DOSIS DE 100 mg/kg DE PESO

TIEMPO (h)	CONC ALZ (µg/ml)	D.S.	CONC ABZSO (µg/ml)	D.S.	CONC ABZSO <sub>2</sub> (µg/ml)	D.S.
0,25	0,3		<b>5,3</b>	2,7	0,035	0,035
0,5	0,43	0,01	<b>9,5</b>	2,7	0,244	0,085
0,75	0,22	0,03	<b>11,4</b>	1,3	0,387	0,045
1,5	0,13	0,03	<b>10</b>	4,2	0,6	0,31
3	0,08	0,04	<b>11,9</b>	3,3	0,5	0,26
6	0,02		<b>4,6</b>	2,2	0,14	0,18
24	0,01		<b>0,15</b>	0,05	0	



**Fig. 33.** Perfil farmacocinético de la suspensión de albendazol en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina administrado a la dosis de 100 mg/kg de peso

Dado que el metabolito mayoritario, y por lo tanto al que se le asigna la actividad farmacológica es el albendazol sulfóxido o ricobendazol, en la figura 34 mostramos las curvas farmacocinéticas comparadas de las dos formulaciones objeto de estudio, donde se observa claramente como la complejación de la molécula proporciona una mayor biodisponibilidad.

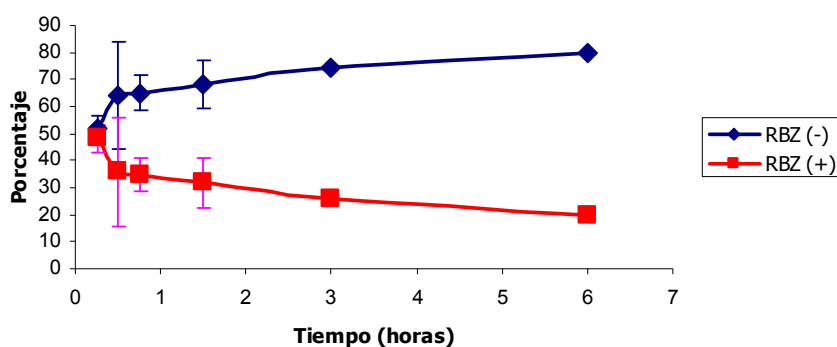


**Fig. 34.** Curvas de biodisponibilidad comparada del albendazol sulfóxido (RBZ) formulado en carboximetil celulosa sódica frente al formulado en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a la dosis de 100 mg/kg de peso

Se realizó análisis enantiomérico del albendazol sulfóxido (Tablas 23 y 24), observándose un mayor porcentaje del enantiómero (-), opuestamente a los datos referidos en otros estudios con diferentes especies de hospedador donde ha sido el enantiómero (+) el predominante. Esta tendencia se muestra tanto en la formulación de referencia como en la complejada.

**TABLA 23.** ANALISIS ENANTIOMERICO DE LA MOLECULA DE ALBENDAZOL SULFOXIDO FORMULADO EN CARBOXIMETIL CELULOSA SODICA A LA DOSIS DE 100 mg/kg DE PESO

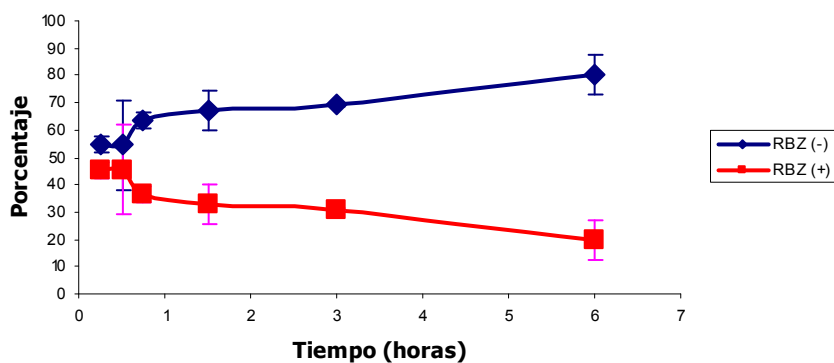
TIEMPO	ABZSO (-) %	D.S.	ABZSO (+) %	D.S.
0,25	51,7	5,1	48,3	5,1
0,5	64,1	20	35,9	20
0,75	65,1	6,3	34,9	6,3
1,5	68,2	9	31,8	9
3	74,1		25,9	
6	<b>80</b>		<b>20</b>	



**Fig. 35.** Perfil enantiomérico del albendazol sulfóxido en carboximetil celulosa sódica a la dosis de 100 mg/kg de peso

**TABLA 24.** ANALISIS ENANTIOMERICO DE LA MOLECULA DE ALBENDAZOL SULFOXIDO FORMULADO EN HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINA A LA DOSIS DE 100 mg/kg DE PESO

TIEMPO	ABZSO (-) %	D.S.	ABZSO (+) %	D.S.
0,25	54,5	2,8	45,5	2,8
0,5	54,6	16,4	45,4	16,4
0,75	63,4	3	36,6	3
1,5	67,2	7,2	32,8	7,2
3	69	0,4	31	0,4
6	<b>80,1</b>	<b>7,3</b>	<b>19,9</b>	<b>7,3</b>



**Fig. 36.** Perfil enantiomérico del albendazol sulfóxido en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a la dosis de 100 mg/kg de peso

## 8.2. MODIFICACION DE LA PAUTA POSOLOGICA DEL TRATAMIENTO FRENTE A LA FASE MIGRATORIA DE *TRICHINELLA SPIRALIS*.

Las tablas 25 a 31 recogen los resultados obtenidos durante el estudio de modificación de la pauta posológica del tratamiento frente a la fase migratoria del ciclo biológico del parásito. Durante este experimento se administró albendazol en régimen de dosis múltiple (50 mg/kg de peso) formulado en complejo de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, administrado por sonda buco-gástrica, bajo las siguientes pautas:

- 1º grupo: días 7, 8 y 9 post infección (Tabla 25).
- 2º grupo: días 10, 11 y 12 post infección (Tabla 26).
- 3º grupo: días 13, 14 y 15 post infección (Tabla 27).
- 4º grupo: días 16, 17 y 18 post infección (Tabla 28).
- 5º grupo: días 19, 20 y 21 post infección (Tabla 29).
- 6º grupo: días 22, 23 y 24 post infección (Tabla 30).

En este estudio se emplearon ratones machos de la estirpe Swiss CD-1 de un peso aproximado de 35 gr, dispuestos en distintos lotes de 10 animales cada uno.

En todos los casos y tanto en el lote control como en los problemas, el sacrificio de los ratones se realizó a partir del día 45 post infección. En el recuento de larvas obtenidas por digestión de la canal se determinó la media aritmética, desviación estándar y eficacia, expresada como porcentaje de reducción de larvas recuperadas en los lotes problema, con respecto al control.

La significación estadística del porcentaje de reducción se determinó previo cálculo de la  $t$  de Student, considerándose significativos aquellos porcentajes con valor de  $p$  inferior a 0,05.

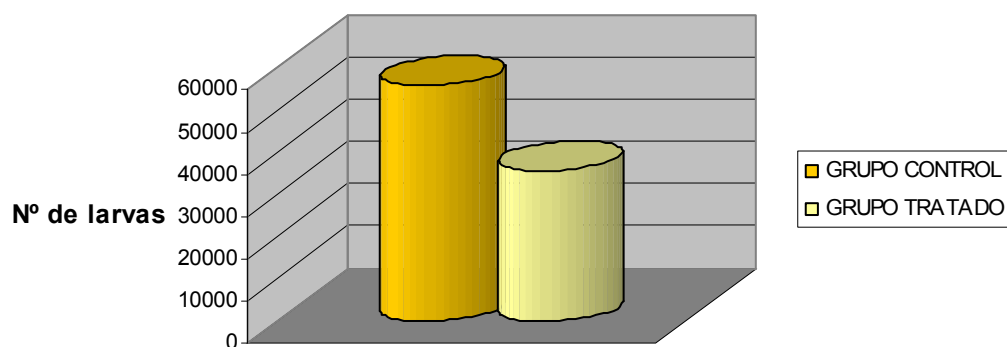
Se comprobó que para todas las pautas terapéuticas referidas el rango de actividad fue similar, confirmando que esta fase del ciclo biológico es la de mayor complejidad en el tratamiento. Los porcentajes de reducción, si bien más bajos que en las otras fases, resultan estadísticamente significativos.

## RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO FRENTE A LA FASE MIGRATORIA

ALBENDAZOL EN HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINA 50 MG/KG PESO

TABLA 25. PAUTA POSOLOGICA ESTABLECIDA: DIAS 7, 8 Y 9 POST INFECCION

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de larvas	GRUPO TRATADOS Nº de larvas
1	54498,8	35764,2
2	48559,4	31435,2
3	67998,6	30702,6
4	56943	17649
5	45651	49017,6
6	57209,4	37562,4
7	45031,6	26107,2
8	62268	21445,2
9	61712,2	51881,4
10	56342,2	53213,4
Cálculos		
Media	55621,42	35477,82
Desviación estándar	7468,03	12530,48
% de reducción		<b>36,22</b>
t de Student		3,126
Grado de significación		0,002

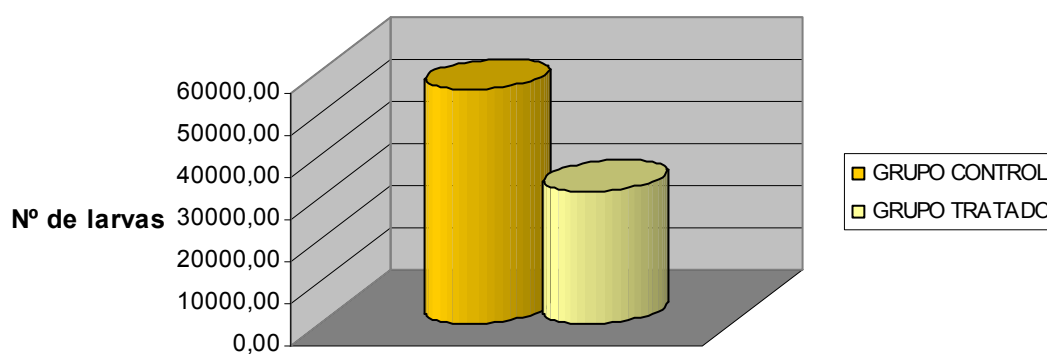


**Fig. 37.** Comparativa del grupo control frente a albendazol formulado en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a dosis de 50 mg/kg de peso, con una modificación en la pauta posológica establecida los días 7, 8 y 9 p.i.

## RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO FRENTE A LA FASE MIGRATORIA

ALBENDAZOL EN HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINA 50 MG/KG PESO**TABLA 26.** PAUTA POSOLOGICA ESTABLECIDA: DIAS 10, 11 Y 12 POST INFECCION

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de larvas	GRUPO TRATADOS Nº de larvas
1	54498,8	34898,4
2	48559,4	39027,6
3	67998,6	33300
4	56943	35164,8
5	45651	35431,2
6	57209,4	26839,8
7	45031,6	31035,6
8	62268	31834,8
9	61712,2	23909,4
10	56342,2	22377,6
Cálculos		
Media	55621,42	31381,92
Desviación estándar	7468,03	5406,58
% de reducción		<b>43,58</b>
t de Student		3,883
Grado de significación		0,000048766

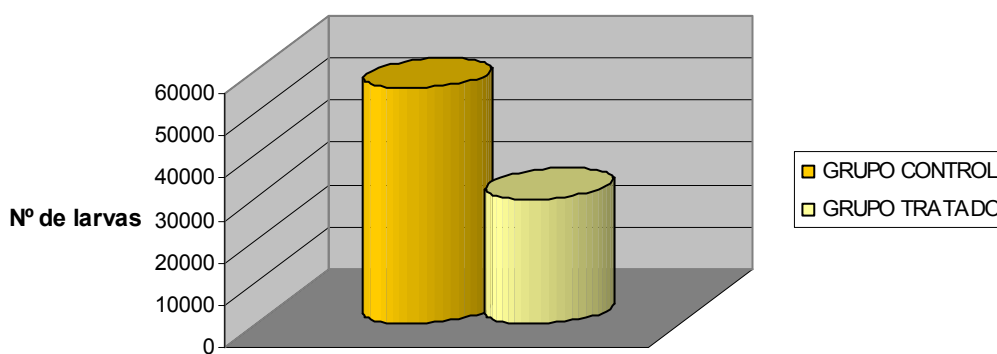


**Fig. 38.** Comparativa del grupo control frente a albendazol formulado en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a dosis de 50 mg/kg de peso, con una modificación en la pauta posológica establecida los días 10, 11 y 12 p.i.

## RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO FRENTE A LA FASE MIGRATORIA

ALBENDAZOL EN HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINA 50 MG/KG PESO**TABLA 27.** PAUTA POSOLOGICA ESTABLECIDA: DIAS 13, 14 Y 15 POST INFECCION

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de larvas	GRUPO TRATADOS Nº de larvas
1	54498,8	22975,64
2	48559,4	12787,2
3	67998,6	32234,4
4	56943	41272
5	45651	38761,2
6	57209,4	31596,4
7	45031,6	33966
8	62268	22091,2
9	61712,2	31568,4
10	56342,2	26991,2
Cálculos		
Media	55621,42	29424,36
Desviación estándar	7468,03	8455,49
% de reducción		<b>47,10</b>
t de Student		3,774
Grado de significación		0,000

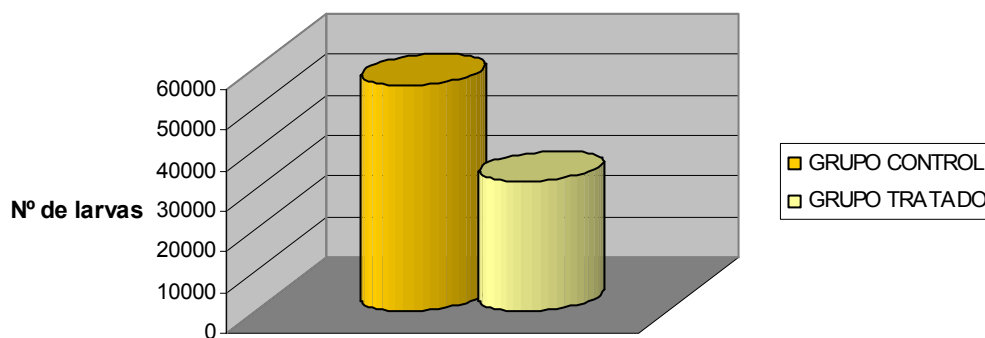


**Fig. 39.** Comparativa del grupo control frente a albendazol formulado en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a dosis de 50 mg/kg de peso, con una modificación en la pauta posológica establecida los días 13, 14 y 15 p.i.

## RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO FRENTE A LA FASE MIGRATORIA

ALBENDAZOL EN HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINA 50 MG/KG PESO**TABLA 28.** PAUTA POSOLOGICA ESTABLECIDA: DIAS 16, 17 Y 18 POST INFECCION

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de larvas	GRUPO TRATADOS Nº de larvas
1	54498,8	5860,8
2	48559,4	38361,6
3	67998,6	32367,6
4	56943	21578,4
5	45651	73926
6	57209,4	20246,4
7	45031,6	35031,6
8	62268	29304
9	61712,2	32101,2
10	56342,2	30001,8
Cálculos		
Media	55621,42	31877,94
Desviación estándar	7468,03	17476,09
% de reducción		<b>42,69</b>
t de Student		2,971
Grado de significación		0,007333181

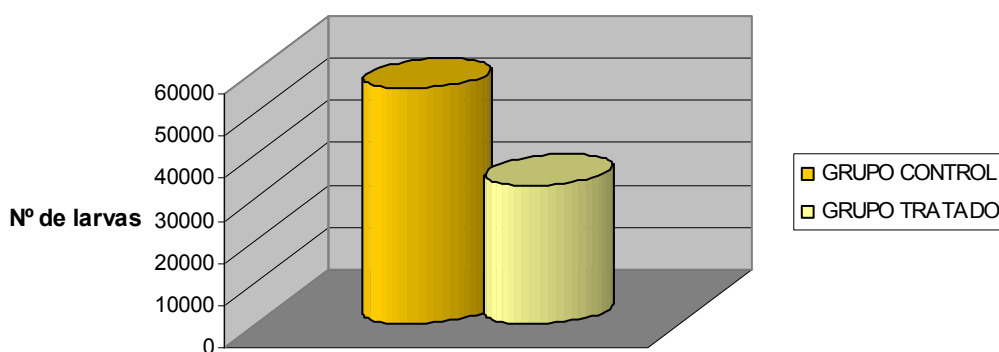


**Fig. 40.** Comparativa del grupo control frente a albendazol formulado en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a dosis de 50 mg/kg de peso, con una modificación en la pauta posológica establecida los días 16, 17 y 18 p.i.

## RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO FRENTE A LA FASE MIGRATORIA

ALBENDAZOL EN HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINA 50 MG/KG PESO**TABLA 29.** PAUTA POSOLOGICA ESTABLECIDA: DIAS 19, 20 Y 21 POST INFECCION

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de larvas	GRUPO TRATADOS Nº de larvas
1	54498,8	33832,8
2	48559,4	10256,4
3	67998,6	33566,4
4	56943	27572,4
5	45651	36765,7
6	57209,4	33699,6
7	45031,6	50616
8	62268	44488,8
9	61712,2	28721,2
10	56342,2	29009,8
Cálculos		
Media	55621,42	32852,91
Desviación estándar	7468,03	10743,18
% de reducción		<b>40,93</b>
t de Student		3,452
Grado de significación		0,000

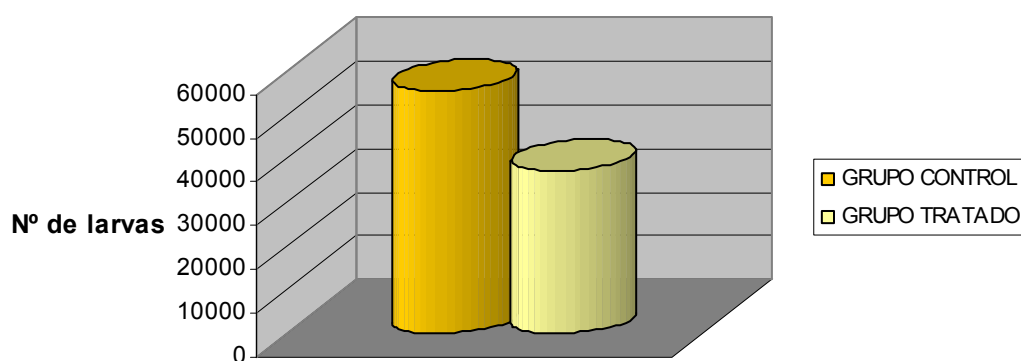


**Fig. 41.** Comparativa del grupo control frente a albendazol formulado en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a dosis de 50 mg/kg de peso, con una modificación en la pauta posológica establecida los días 19, 20 y 21 p.i.

## RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO FRENTE A LA FASE MIGRATORIA

ALBENDAZOL EN HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINA 50 MG/KG PESO**TABLA 30.** PAUTA POSOLOGICA ESTABLECIDA: DIAS 22, 23 Y 24 POST INFECCION

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de larvas	GRUPO TRATADOS Nº de larvas
1	54498,8	41928,4
2	48559,4	21178,8
3	67998,6	15717,6
4	56943	21598,4
5	45651	37029,6
6	57209,4	59653,6
7	45031,6	51415,2
8	62268	51508,4
9	61712,2	32367,6
10	56342,2	40252,5
Cálculos		
Media	55621,42	37265,01
Desviación estándar	7468,03	14634,67
% de reducción		<b>33,00</b>
t de Student		2,789
Grado de significación		0,010055063

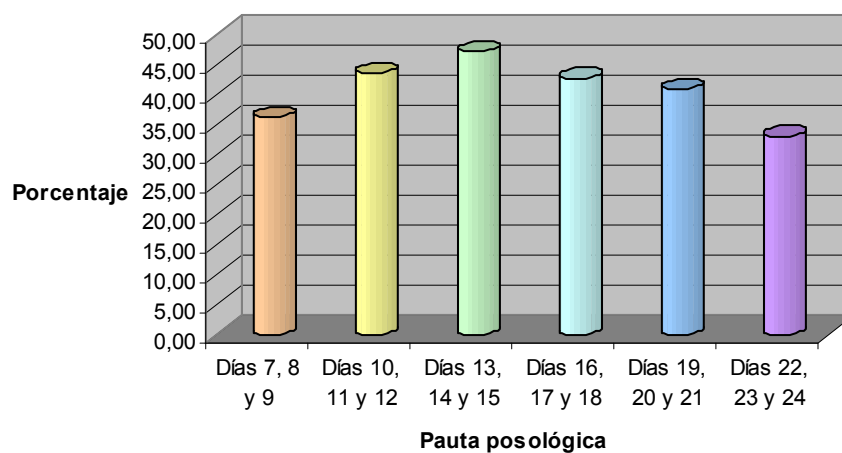


**Fig. 42.** Comparativa del grupo control frente a albendazol formulado en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a dosis de 50 mg/kg de peso, con una modificación en la pauta posológica establecida los días 22, 23 y 24 p.i.

## RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO FRENTE A LA FASE MIGRATORIA

**TABLA 31.** RESUMEN DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS DE MODIFICACION DE LA PAUTA POSOLOGICA

DIAS POST INFECCION						
	7 – 9	10 – 12	13 - 15	16 - 18	19 - 21	22 - 24
MEDIA	35477,82	31381,92	29424,36	31877,94	32852,91	37265,01
DESV ST	12530,48	5406,58	8455,49	17476,09	10743,18	14634,67
% RED.	36,22	43,58	47,10	42,69	40,93	33,00

**Fig. 43.** Porcentajes de reducción de larvas comparados según la pauta posológica establecida a lo largo del tiempo

### 8.3. MODIFICACION EN LA ABSORCION DE ALBENDAZOL COMO CONSECUENCIA DE UNA INFECCION INTESTINAL POR *T. SPIRALIS*.

La alteración del epitelio intestinal, como consecuencia del proceso infectivo de *Trichinella spiralis*, ofrece un marco inigualable de estudio para valorar la modificación que, teóricamente, se debe producir en la absorción del fármaco albendazol. Los diferentes estados por los que este epitelio pasa a lo largo de la fase intestinal del ciclo del nematodo, nos puede dar una visión de cómo esta alteración puede condicionar la absorción de fármacos y por tanto su biodisponibilidad.

#### 8.3.1. Datos parasitológicos.

Las tablas 32 a 35 recogen los resultados obtenidos en número de adultos recolectados del intestino delgado, determinándose la media y la desviación estándar, los días 1 (control) (Tabla 32), 5 (Tabla 33), 10 (Tabla 34) y 22 (Tabla 35) post infección.

Se utilizaron en este estudio ratones Swiss CD-1, machos de 30-35 gr de peso, que fueron distribuidos en diferentes lotes de 10 animales cada uno.

En todos los casos los ratones fueron infectados con  $300 \pm 50$  larvas de *Trichinella spiralis*, obtenidas mediante digestión de canales de ratones previamente infectados.

Los animales fueron hidratados y alimentados *ad libitum* y en ningún caso se les administró fármaco alguno.

**TABLA 32.** RECUENTO DE ADULTOS REALIZADO EN LOS ANIMALES  
SACRIFICADOS EN EL DIA 1 POST-INFECCION (CONTROL)

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de adultos
1	130
2	112
3	107
4	145
5	136
6	106
7	110
8	129
9	112
10	120
Cálculos	
Media	<b>120,7</b>
Desviación estándar	13,54

**TABLA 33.** RECUENTO DE ADULTOS REALIZADO EN LOS ANIMALES  
SACRIFICADOS EL DIA 5 POST INFECCION

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de adultos
1	91
2	107
3	93
4	66
5	138
6	112
7	123
8	92
9	61
10	109
Cálculos	
Media	<b>99,2</b>
Desviación estándar	23,83

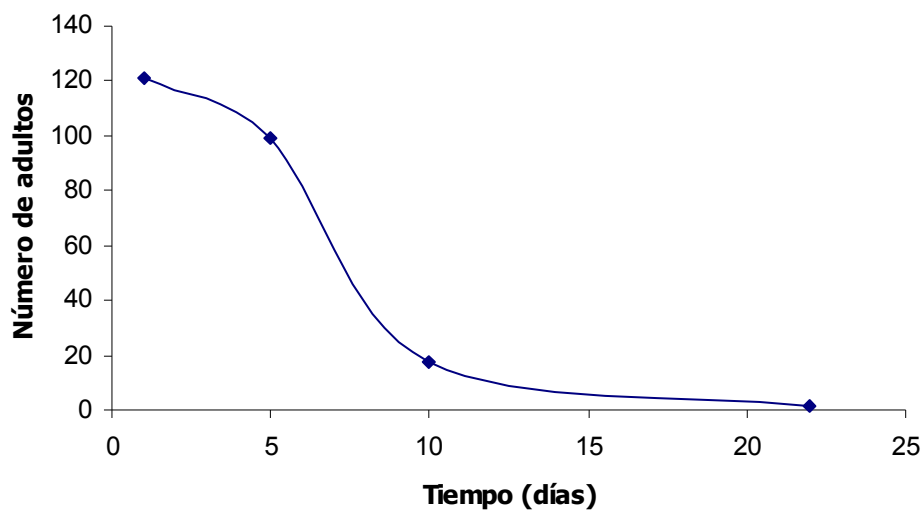
**TABLA 34.** RECUENTO DE ADULTOS REALIZADO EN LOS ANIMALES  
SACRIFICADOS EL DIA 10 POST INFECCION

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de adultos
1	35
2	13
3	5
4	4
5	31
6	23
7	12
8	39
9	3
10	11
Cálculos	
Media	<b>17,6</b>
Desviación estándar	13,43

**TABLA 35.** RECUENTO DE ADULTOS REALIZADO EN LOS ANIMALES  
SACRIFICADOS EL DIA 22 POST INFECCION

Nº de ratones	GRUPO CONTROL Nº de adultos
1	1
2	0
3	0
4	0
5	3
6	0
7	1
8	0
9	0
10	1
Cálculos	
Media	<b>1,6</b>
Desviación estándar	3,44

En la figura 44 se observa gráficamente la evolución en el número de adultos a lo largo del tiempo durante la fase intestinal.



**Fig. 44.** Evolución en el número de adultos durante la fase intestinal

### 8.3.2. Datos farmacocinéticos.

Las tablas que a continuación aparecen muestran el análisis de los datos obtenidos del estudio biofarmacéutico del albendazol (Tabla 36) y del albendazol sulfóxido (Tabla 37) en animal infectado. Los parámetros valorados son la  $t_{máx}$ ,  $C_{máx}$  y  $ABC_{0-6}$ .

En el estudio de biodisponibilidad oral se emplearon 144 ratones Swiss CD1 de un peso aproximado de 30-35 g, alimentados *ad libitum*, que posteriormente fueron separados en 4 grupos.

El albendazol se preparó en una solución al 20% (p/v) de HPCD (hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina) en HCl 0,2M. El pH final de la solución fue de 0,92.

De los 4 grupos de ratones, uno se empleó como control de biodisponibilidad en animales sin infectar, separándose posteriormente en 6 lotes de 6 ratones cada uno, obteniendo muestras de sangre a los tiempos que a continuación se detallan: 0,25; 0,5; 0,75; 1; 6 y 24 horas. Estas muestras fueron heparinizadas, centrifugadas individualmente y hasta su análisis por HPLC los plasmas fueron congelados a  $-30^{\circ}\text{C}$ .

Los otros tres grupos fueron infectados con  $300 \pm 50$  larvas (L1) de *Trichinella spiralis* GM1 obtenidas tras la digestión de las canales de ratones mantenidos como stock.

La dosis de fármaco administrada fue de 10 mg/kg de peso.

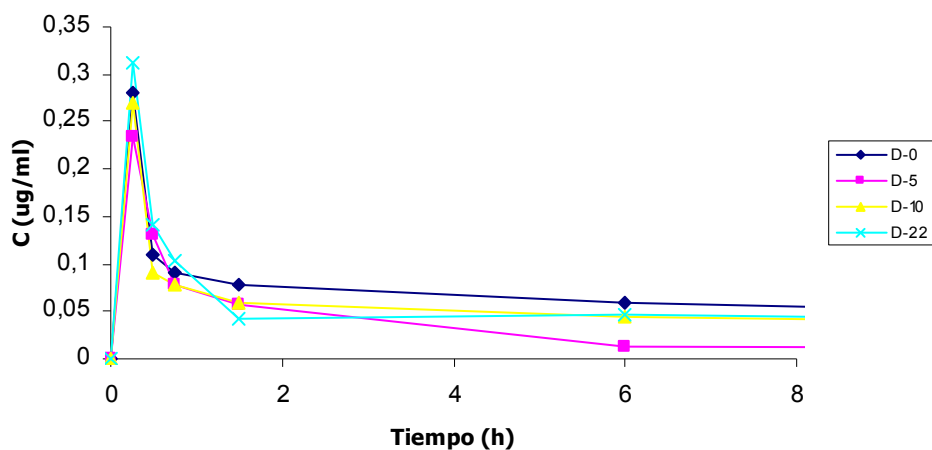
En los grupos infectados se procedió a la toma de muestras los días 5, 10 y 22 intentando cubrir diferentes estadios en la fase inflamatoria intestinal.

De la misma manera que el grupo control, los grupos infectados fueron separados en 6 lotes de 6 animales cada uno y la toma de muestras fue en los mismos tiempos que el control: 0,25; 0,5; 0,75; 1; 6 y 24 horas. Estas muestras de sangre fueron heparinizadas y centrifugadas individualmente. Tras estos procesos las muestras fueron congeladas hasta la realización del análisis por HPLC.

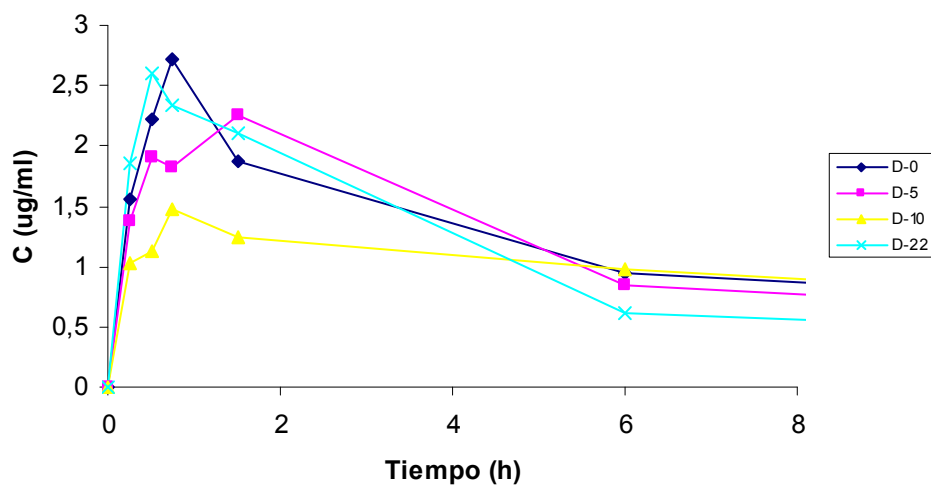
El análisis de las muestras se realiza mediante un cromatógrafo líquido modular Jasco.

**TABLA 36. DATOS FARMACOCINETICOS DEL ALBENDAZOL**

DIAS POST INFECCIÓN				
	1 (CONTROL)	5	10	22
$T_{m\acute{a}x}$	0,25 h	0,25 h	1,25 h	1,5 h
$C_{m\acute{a}x}$	0,28 $\mu\text{g/ml}$	0,35 $\mu\text{g/ml}$	4,76 $\mu\text{g/ml}$	7,91 $\mu\text{g/ml}$
ABC	<b>0,52 <math>\mu\text{g.h/ml}</math></b>	<b>0,33 <math>\mu\text{g.h/ml}</math></b>	<b>0,42 <math>\mu\text{g.h/ml}</math></b>	<b>0,42 <math>\mu\text{g.h/ml}</math></b>

**Fig. 45.** Perfil farmacocinético del albendazol en animal infectado**TABLA 37. DATOS FARMACOCINETICOS DEL ALBENDAZOL SULFOXIDO**

DIAS POST INFECCIÓN				
	1 (CONTROL)	5	10	22
$T_{m\acute{a}x}$	0,75 h	1,5 h	0,75 h	0,75 h
$C_{m\acute{a}x}$	2,71 $\mu\text{g/ml}$	2,26 $\mu\text{g/ml}$	1,48 $\mu\text{g/ml}$	2,33 $\mu\text{g/ml}$
ABC	<b>9,31 <math>\mu\text{g.h/ml}</math></b>	<b>9,74 <math>\mu\text{g.h/ml}</math></b>	<b>6,88 <math>\mu\text{g.h/ml}</math></b>	<b>9,41 <math>\mu\text{g.h/ml}</math></b>

**Fig. 46.** Perfil farmacocinético del albendazol sulfóxido en animal infectado

8.3.3. Datos histopatológicos.**TABLA 38. RESUMEN DE DATOS DEL ESTUDIO HISTOPATOLOGICO**

Id	Ratón	Día	Loc	Infl Ag	Criptitas	Abcesos cript	Úlcera	Infl Cro	Atrofia	Parásito	Dilatac Linf
1	1	0	D	0	0	No	No	0	No	No	
2	1	0	Y	0	0	No	No	0	No	No	
3	1	0	I	0	0	No	No	0	No	No	
4	1	5	D	2	2	No	No	1	No	No	
5	1	5	Y	2	1	No	No	1	No	Sí	
6	1	5	I	1	0	No	No	2	No	Sí	
7	2	5	D	1	0	No	No	1	No	Sí	
8	2	5	Y	1	0	No	No	0	No	Sí	
9	2	5	I	0	0	No	No	0	No	No	
10	3	5	D	0	0	No	No	1	No	Sí	
11	3	5	Y	1	0	No	No	0	No	Sí	
12	3	5	I	1	1	No	No	1	No	Sí	
13	4	5	D	0	0	No	No	0	No	No	
14	4	5	Y	1	0	Sí	No	0	No	Sí	
15	4	5	I	2	1	No	No	1	No	Sí	
16	5	5	D	0	0	No	No	0	No	Sí	
17	5	5	Y	1	0	No	No	1	No	Sí	
18	5	5	I	1	0	No	No	0	No	Sí	
19	1	10	D	2	2	No	No	2	No	No	
20	1	10	Y	3	2	No	No	2	No	Sí	
21	1	10	I	3	2	No	No	1	No	Sí	
22	2	10	D	3	2	Sí	No	1	No	No	
23	2	10	Y	3	2	No	No	2	No	Sí	
24	2	10	I	3	2	No	No	1	No	Sí	
25	3	10	D	3	2	No	No	2	No	No	
26	3	10	Y	3	2	No	No	2	No	Sí	
27	3	10	I	2	1	No	No	1	No	No	
28	4	10	D	2	1	No	No	2	No	No	
29	4	10	Y	3	2	No	No	2	No	Sí	
30	4	10	I	3	2	No	No	1	No	Sí	
31	5	10	D	2	3	No	No	1	No	No	
32	5	10	Y	3	2	Sí	No	2	No	Sí	
33	5	10	I	2	2	No	No	1	No	No	
34	1	22	D	1	2	No	No	0	No	No	
35	1	22	Y	0	1	No	No	0	No	No	
36	1	22	I	0	1	No	No	0	No	No	
37	2	22	D	1	2	No	No	0	No	No	
38	2	22	Y	1	2	No	No	0	No	No	
39	2	22	I	1	1	No	No	0	No	No	
40	3	22	D	1	2	No	No	0	No	No	
41	3	22	Y	1	1	No	No	1	No	No	
42	3	22	I	2	2	No	No	1	No	No	
43	4	22	D	1	1	No	No	1	No	No	
44	4	22	Y	0	0	No	No	0	No	No	
45	4	22	I	1	1	No	No	0	No	No	
46	5	22	D	1	1	No	No	0	No	No	
48	5	22	Y	0	0	No	No	0	No	No	
51	5	22	I	0	0	No	No	0	No	No	

D: Duodeno; Y: Yeyuno; I: Íleon

Intensidad de la inflamación: 0: Ausente; 1: Leve; 2: Moderada; 3: Severa

En la tabla 38 se resumen los resultados del estudio histopatológico del intestino delgado de los animales infectados, realizado en los días 1 (control), 5, 10 y 22 post infección. En este caso los animales se distribuyeron en 4 lotes de 5 animales cada uno.

#### GRUPO CONTROL

El estudio histológico de segmentos de duodeno, yeyuno e íleon de los ratones control, muestran en la lámina propia un componente inflamatorio habitual, de escasa intensidad, constituido por linfocitos, células plasmáticas y polimorfonucleares neutrófilos aislados. No se observan signos de inflamación aguda como: criptitis, abscesos crípticos o úlceras, ni tampoco hallazgos de inflamación crónica con alteración arquitectural como atrofia vellositaria.



Fig. 47. Sección intestinal grupo control

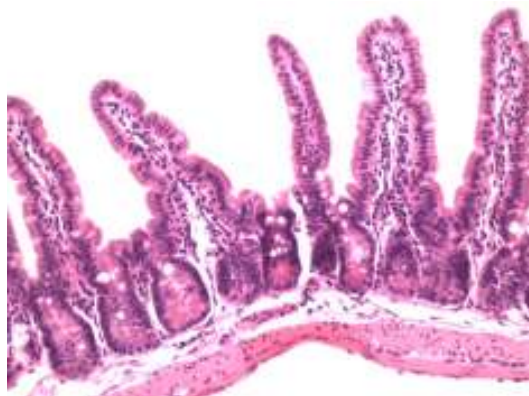


Fig. 48. Sección intestinal grupo control

#### GRUPO DIA 5 POST INFECCION

Los 5 ratones infectados y sacrificados el día 5 presentan en los segmentos de intestino delgado estudiados: duodeno, yeyuno e íleon, los siguientes hallazgos:

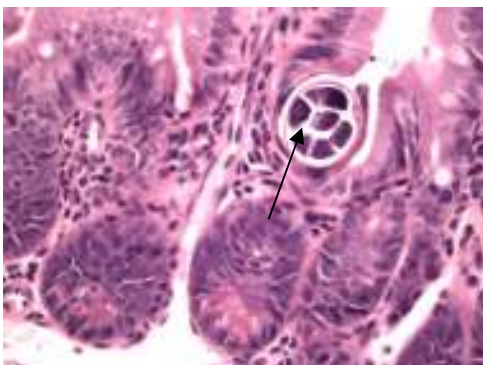
- Inflamación aguda leve (1: polimorfonucleares en escasa cantidad y de forma salpicada ) en los ratones 2, 3, 4 y 5, a nivel de duodeno y yeyuno ( ratón 2), yeyuno e íleon ( ratones 3 y 5) y yeyuno ( ratón 4 )
- Inflamación aguda moderada (2: polimorfonucleares formando pequeños grupos de forma salpicada ) en los ratones 1 y 4, a nivel de duodeno y yeyuno ( ratón 1) e íleon ( ratón



Fig. 49. Sección intestinal grupo día 5

4) y criptitis ( polimorfonucleares en el epitelio de las criptas ) en duodeno y yeyuno de ratón 1 e íleon de ratones 3 y 4). Solamente en un ratón ( ratón 4) y a nivel de yeyuno se observa un absceso críptico ( polimorfonucleares en la luz de las criptas).

- Inflamación crónica leve en todos los segmentos intestinales del ratón 1, en el duodeno de los ratones 2 y 3, en el íleon del ratón 4 y en el yeyuno del ratón 5.



**Fig. 50.** Sección de un adulto de *T.spiralis*

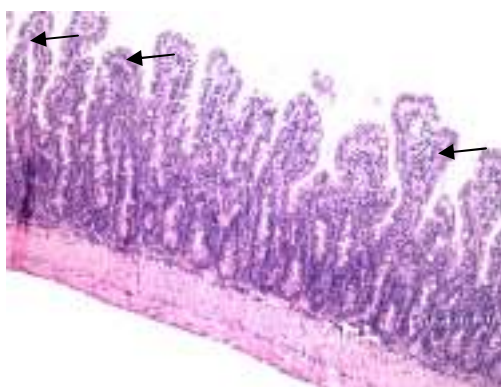
En todos los ratones se observó la presencia de *Trichinella*, apreciándose en todos los segmentos estudiados (duodeno, yeyuno e íleon) en los ratones 3 y 5; en yeyuno e íleon en los ratones 1 y 4 y a nivel de duodeno y yeyuno en el ratón 2.

En ninguno de los ratones de este período se observó ulceración del epitelio, ni atrofia vellositaria.

#### GRUPO DIA 10 POST INFECCION

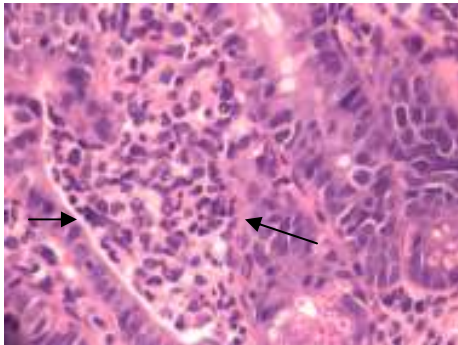
Los 5 ratones infectados y sacrificados el día 10 presentan en los segmentos de intestino delgado estudiados: duodeno, yeyuno e íleon, los siguientes hallazgos :

- Inflamación aguda severa ( 3 : numerosos polimorfonucleares que se extienden a todos los niveles de la lámina propia y de forma difusa ) en todos los ratones, afectando a todos los segmentos en los ratones 2 y 4 , a yeyuno e íleon en el ratón 1, a duodeno y yeyuno en el ratón 3 y a yeyuno en el ratón 5 .
- Inflamación aguda moderada en algunos segmentos de todos los ratones, excepto en el ratón 2; en el duodeno en los ratones 1 y 4, en íleon en el ratón 3 y en duodeno e íleon en el ratón 5. Todos los ratones y en todos los segmentos presentan imágenes de criptitis y se observan abscesos crípticos en el duodeno del ratón 2 y en el yeyuno del ratón 5.



**Fig. 51.** Polimorfonucleares en lámina propia

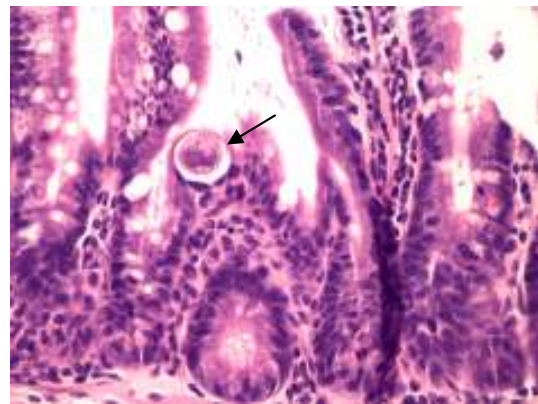
- Inflamación crónica moderada (2: infiltrado inflamatorio de linfocitos y plasmáticas de moderada intensidad) en duodeno y yeyuno de los ratones 1, 3 y 4 y yeyuno de los ratones 2 y 5.



**Fig. 52.** Acceso críptico

- Inflamación crónica leve en duodeno e ileon de los ratones 2 y 5, e íleon de los ratones 1 3 y 4.

En todos los ratones se observa la presencia de *Trichinella* no evidenciándose en ninguno de ellos en todos los segmentos intestinales estudiados, apreciándose únicamente en yeyuno e íleon en los ratones 1,2 y 4 y en yeyuno en los ratones 3 y 5.



**Fig. 53.** Sección de adulto de *T. spiralis*

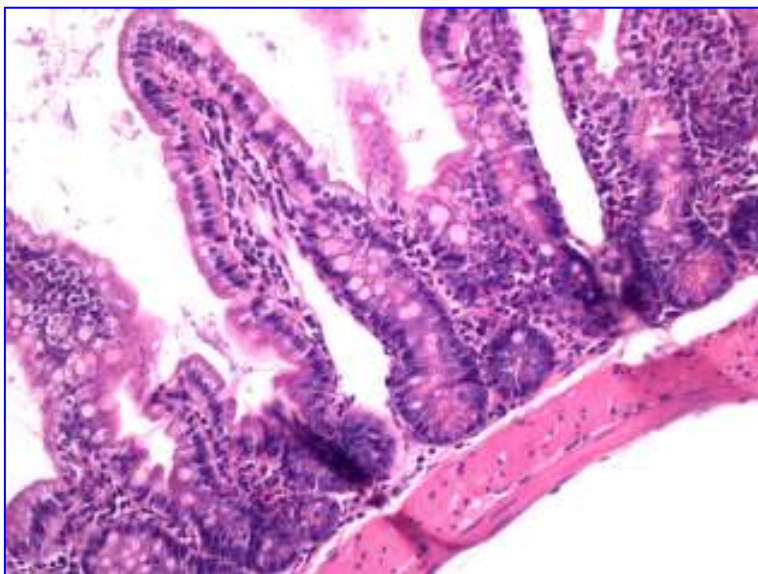
No se observó ulceración ni atrofia vellositaria en ninguno de los ratones.

#### GRUPO DÍA 22 POST INFECCION

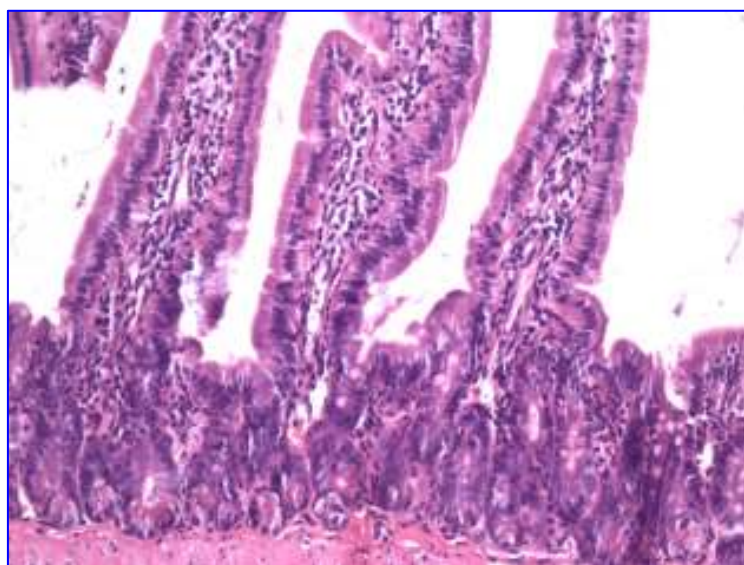
Los 5 ratones infectados y sacrificados el día 22 presentan en los segmentos de intestino delgado estudiados: duodeno, yeyuno e íleon, los siguientes hallazgos:

- Inflamación aguda leve o ausente a nivel de duodeno en todos los ratones, afectando también a yeyuno y a íleon en los ratones 3 y 4 respectivamente, sin evidencias de abscesos crípticos.
- Inflamación crónica leve o ausente a nivel de yeyuno e ileon se evidencia en los ratones 2 y 3 y únicamente en duodeno en el ratón 4, los demás no presentan cambios inflamatorios crónicos significativos.

En ninguno de los ratones de este período se objetivó la presencia de *Trichinella*, abscesos crípticos, úlcera, ni atrofia vellositaria.



**Fig. 54.** Sección intestinal grupo día 22



**Fig. 55.** Sección intestinal grupo día 22

#### 8.4. MODELO DE ESTUDIO FARMACOCINETICO DEL ALBENDAZOL SULFOXIDO EN LARVAS MUSCULARES DE *TRICHINELLA SPIRALIS*.

El estudio del comportamiento farmacocinética del albendazol en el hospedador ha sido realizado en numerosas ocasiones, sin embargo, el comportamiento del mismo en el parásito se está empezando a abordar actualmente y sólo en determinadas especies parasitarias que por su tamaño lo permiten. En nuestro caso y dado que nuestro modelo experimental es *Trichinella spiralis*, hemos querido desarrollar un modelo de estudio que nos permita entender la realidad en este nematodo.

##### 8.4.1. Ensayos *ex vivo*.

El estudio se basa en un modelo *ex vivo* en el que el parásito se encuentra en contacto con el fármaco y pasado un período de tiempo determinado se administra a ratones para determinar su infectividad.

Las larvas de *Trichinella spiralis* GM1 (MFEL/SP/G2/GM1 cepa ISS48; Centro de Referencia de *Trichinella*, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia) fueron obtenidas de las canales de ratones previamente infectados, mediante digestión artificial estándar. Tras el aislamiento, las larvas fueron separadas usando un aparato Baerman y posteriormente lavadas 10 veces por sedimentación pasiva con una solución buffer fosfato que contenía antibióticos. Las larvas fueron suspendidas ( $500 \pm 50$  larvas/ml) en un medio de cultivo consistente en una solución Hanks (HBSS) con antibiótico (50 unidades/ml de penicilina y 50  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomina (Sigma Chemical Co.). En estas condiciones el 68% de las larvas incubadas mantuvieron su capacidad infectiva frente a un control no incubado.

Para evaluar los diferentes compuestos, se añadieron 0,2 ml de suspensión con larvas a cada uno de los pocillos de una placa de 24 (Costar) y se mezclaron con 1,8 ml de solución, bien de ricobendazol racémico o bien de uno u otro de los enantiómeros purificados según el punto 7.2.5 de materiales y métodos. Se ensayaron diferentes concentraciones de cada solución en 6 pocillos de cada placa, mientras que como control, 6 de los pocillos se incubaron sólo con larvas en el medio pero sin fármaco. Tras 24 horas en un incubador convencional de microaerobiosis (5%  $\text{CO}_2$ ) a 37°C las larvas fueron observadas utilizando un microscopio de luz invertida. Después de retirar cuidadosamente 1,5 ml de medio de cada pocillo, las larvas contenidas en los restante 0,5 ml ( $100 \pm 10$ ), fueron administradas a los correspondientes 6 ratones machos Swiss CD1 de 8 semanas de edad. Como control se utilizó otro grupo de 6

ratones de características homogéneas al que se infectó 24 horas antes con larvas recién aisladas. Cinco días después de la infección (6 días para el control) los ratones fueron sacrificados mediante sobredosis de cloroformo, retirando su intestino delgado por tracción y abriéndolo longitudinalmente. Cada intestino se llevó a gasas sanitarias siendo incubados en solución salina durante 4 horas a 37°C. Pasado este tiempo se retiraron los intestinos y se procedió al recuento de los gusanos adultos liberados del mismo, mediante un microscopio óptico.

El número medio de gusanos obtenidos de animales infectados con las larvas tratadas fue comparado con aquellos obtenidos a partir de animales infectados con larvas incubadas pero no tratadas, utilizando la *t* de Student como parámetro estadístico. El grado de significación fue establecido en  $P < 0,05$  y  $P < 0,01$ .

Después de 24 horas de incubación en medio, sólo se produjo un 33,9% de reducción en la viabilidad larvaria como muestra la tabla 39. Mientras que 66,8 gusanos fueron recuperados de los animales infectados con larvas no incubadas, este dato desciende a 44,1 cuando los animales fueron infectados con las larvas control que habían sido incubadas durante 24 horas en el medio solo. Esta reducción puede reflejar el efecto nocivo que una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> puede provocar en el mantenimiento de las larvas, hecho corroborado en un estudio anterior que mostró que para mantener totalmente la capacidad infectiva de las larvas de *T. spiralis* cultivadas en un medio de cultivo celular, eran necesarias condiciones de total anaerobiosis (Bolás, 2002). Sin embargo bajo esas condiciones anaeróbicas, las larvas no son sensibles a los fármacos (probablemente debido a una condición hipobiótica), por lo tanto, es necesario algún grado de aerobiosis para poder detectar actividad antihelmíntica.

Se evaluaron concentraciones de racémico de ricobendazol en un rango entre 0,06 y 1 µg/ml (Tabla 39). La observación visual de las larvas al microscopio óptico tras la incubación no mostró diferencias entre las larvas tratadas y no tratadas, en ninguna de las concentraciones analizadas. Sin embargo en el ensayo de viabilidad larvaria era presumible que el racémico de ricobendazol tendría una elevada actividad en la reducción de la viabilidad de las larvas a concentraciones de 0,25; 0,5 y 1 µg/ml. A estas concentraciones la viabilidad y capacidad de infección de las larvas se redujo entre un 92,5 y un 99,6% comparado con el control sin tratar. Menor actividad, pero todavía significativa, fue registrada a la concentración de 0,12 µg/ml (74,3%), mientras que a 0,06 µg/ml no se observó una reducción significativa ( $P < 0,05$ ).

Por otro lado comparamos la actividad antilarvaria del racémico de ricobendazol, ricobendazol (+) y ricobendazol (-) a concentraciones de 0,5 µg/ml (experimento 1) y 0,1 y 0,01 µg/ml (experimento 2). Todos los compuestos fueron muy activos a 0,5 µg/ml,

produciendo una reducción significativa ( $P < 0,01$ ) en viabilidad larvaria comparada con el control (Tabla 40). El ricobendazol (+) todavía presentó alta actividad a la concentración de 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , produciendo una reducción de 84,4% en viabilidad ( $P < 0,01$ ), la cual fue mayor que la observada para el racémico de ricobendazol (69,3%,  $P < 0,05$ ). A esta concentración el ricobendazol (-) no produjo una reducción significativa en viabilidad larvaria (30,1%). Ninguno de los tres compuestos fue significativamente activo a la dosis de 0,01  $\mu\text{g/ml}$ , dando lugar a reducciones de 0,00; 33,4 y 26,61% para el racémico de ricobendazol, ricobendazol (+) y ricobendazol (-) respectivamente ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, observamos alguna evidencia de que ricobendazol (+) a 0,01  $\mu\text{g/ml}$  puede provocar una respuesta significativa y esto será objeto de estudios futuros más detallados.

**TABLA 39.** VIABILIDAD LARVARIA DESPUES DEL TRATAMIENTO *IN VITRO* CON ALBENDAZOL SULFOXIDO (RICOBENDAZOL) A DIFERENTES CONCENTRACIONES

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Media de gusanos adultos (DS)	% Reducción *
	66,8 (21,49 <sup>①</sup> )	-
Control	44,16 (10,20)	-
1	0,33 (0,47)	92,50 <sup>②</sup>
0,5	0,16 (0,37)	99,63 <sup>②</sup>
0,25	0,66 (1,10)	98,50 <sup>②</sup>
0,12	11,33 (7,27)	74,34 <sup>③</sup>
0,06	39,16 (16,20)	11,32

\* Comparado con el control sin tratar

① Larvas no incubadas

②  $p < 0,01$

③  $p < 0,05$

**TABLA 40.** VIABILIDAD LARVARIA DESPUES DEL TRATAMIENTO "IN VITRO" CON LOS ENANTIOMEROS DE ALBENDAZOL SULFOXIDO (RICOBENDAZOL) A DIFERENTES CONCENTRACIONES

	Media de gusanos adultos	(DS)	% Reducción
<b>Experimento 1</b>			
Control	70,50	10,59	
Compuesto (0,5 µg/ml)			
Racémico RBZ	6,16	2,85	91,26*
RBZ (+)	2,30	2,21	96,7*
RBZ (-)	7,60	2,21	89,2*
<b>Experimento 2</b>			
Control	49,00	7,18	
Compuesto (0,1 µg/ml)			
Racémico RBZ	15,03	5,19	69,32**
RBZ (+)	7,66	2,98	84,36*
RBZ (-)	32,46	25,18	30,08
Compuesto (0,01 µg/ml)			
Racémico RBZ	56,10	10,15	0,00*
RBZ (+)	32,81	26,8	33,04
RBZ (-)	38,41	24,56	21,61

\*  $P < 0,01$

\*\*  $P < 0,05$

#### 8.4.2. Ensayos *in vitro*.

El estudio se lleva a cabo *in vitro*, habiendo establecido dos líneas de trabajo, por un lado manteniendo la misma concentración de fármaco en el medio y alargando los períodos de contacto y por otro estableciendo un período de contacto único pero modificando las concentraciones en el medio.

Las larvas de *Trichinella spiralis* fueron obtenidas de los canales de ratones previamente infectados, mediante digestión artificial estándar. Tras el aislamiento, las larvas fueron separadas usando un aparato Baerman y posteriormente lavadas 10 veces por sedimentación pasiva con una solución buffer fosfato. Tras realizar un recuento de larvas en el microscopio óptico mediante cámara de McMaster, para determinar el número total de larvas obtenidas, éstas se concentran en un mínimo volumen que posteriormente se dispersará en un medio consistente en una solución Hanks (HBSS) con antibiótico (50 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina (Sigma Chemical Co.), al que además se le añadirán el fármaco ricobendazol en cantidad suficiente para obtener finalmente una concentración total de 0,5

µg/ml. Se realiza una distribución homogénea de la suspensión de larvas en distintas botellas de cultivo de 250 ml, esta distribución se realiza mediante agitación continuada y toma de muestra mediante jeringa, muestra que es transportada a la botella de cultivo, alcanzando finalmente un volumen de 125 ml de medio donde se encontrarán dispersas 250.000 larvas aproximadamente.

Para evaluar la cantidad de fármaco que el parásito incorpora, los resultados se compararon frente a un control basado en un proceso idéntico al indicado anteriormente con la única excepción de que al medio de cultivo no se le añadió ricobendazol.

Las botellas de cultivo son llevadas a la incubadora de microaerobiosis (5% CO<sub>2</sub>) donde permanecerán el período de tiempo prescrito. Una vez finalizado el mismo, se retiran de la incubadora y se toman muestras del medio, el resto se retira y las larvas vuelven a lavarse para eliminar posibles restos de medio. Las larvas obtenidas se someten a sonicación y extracción como indica el punto 7.3.4 del apartado materiales y métodos, y posteriormente se realiza el análisis mediante HPLC como indica el punto 7.3.5.

En la tabla 41 se muestran los datos correspondientes al ensayo en el que el material parasitario se pone en contacto con el fármaco a una concentración de 0,5 µg/ml durante un período de tiempo que oscila entre la 1 y las 18 horas. La concentración de ricobendazol observada en el medio de cultivo no muestra alteraciones significativas a lo largo del tiempo, manteniéndose con valores que oscilan entre 0,55 µg/ml al inicio del ensayo y 0,47 µg/ml a las 18 horas, también se mantiene estable el balance de enantiómeros sin prácticamente oscilaciones a lo largo de todo el ensayo (50 – 46%). Las concentraciones de albendazol sulfona son prácticamente indetectables, dada la pequeña cantidad de este metabolito presente en el medio, que en muchos casos y por la técnica de cromatografía utilizada puede hacernos dudar, ya que los picos aparecen muy próximos a la línea base y pueden llevar ciertas impurezas. Los datos obtenidos en el lisado de larvas muestran una acumulación de ricobendazol en el parásito a lo largo del tiempo con concentraciones que van desde los 0,031 µg/g de larva en aquellas obtenidas en la primera hora de incubación los 0,094 µg/g de larva a las 18 horas, produciéndose los mayores cambios de concentración a partir de las 6 horas. El balance de enantiómeros también sufre cambios importantes a partir de las 6 horas, predominando el ricobendazol (+) que llega a alcanzar un porcentaje del 76,9% a las 18 horas de incubación. Las concentraciones de albendazol sulfona son indetectables en el lisado de larvas.

**TABLA 41.** DINAMICA DE LAS CONCENTRACIONES DE ALBENDAZOL SULFOXIDO (RICOBENDAZOL) EN EL MEDIO DE CULTIVO Y EN EL LISADO DE LARVAS

En el medio de cultivo.

Muestra	Concentración teórica (µg/ml)	Concentración ABZ-SO (µg/ml)	(-) ABZ-SO (%)	Concentración ABZ-SO <sub>2</sub> (µg/ml)
Medio inicial	0,5	0,55	50	< 0,01
1 h	0,5	0,58	50	< 0,01
2 h	0,5	0,58	48	< 0,01
4 h	0,5	0,58	46	< 0,01
6 h	0,5	0,58	42	< 0,01
10 h	0,5	0,58	50	< 0,01
18 h	0,5	0,47	46	< 0,01

En el lisado larvario.

Muestra	Concentración ABZ-SO (µg/g de larva)	(-) ABZ-SO (%)	Concentración ABZ-SO <sub>2</sub> (µg/ml)
L1	0,031	53,2	Indetectable
L2	0,038	50,4	Indetectable
L4	0,031	43,8	Indetectable
L6	0,035	39	Indetectable
L10	0,055	31	Indetectable
L18	0,094	23,1	Indetectable

En la tabla 42 se muestran los datos correspondientes al ensayo en el que el material parasitario se pone en contacto con el fármaco a diferentes concentraciones: 0,5; 1; 2 y 4 µg/ml durante un período de tiempo concreto, 2 horas. En este experimento no se valora el porcentaje de enantiómero ya que a las dos horas éste aún se mantiene en el valor del racémico (50%). El análisis por cromatografía del medio de cultivo nos permite validar que las concentraciones de fármaco añadidas son las correctas con leves fluctuaciones de 0,1-0,2 µg/ml de variación con respecto a la concentración teórica. En el lisado de larvas de *Trichinella spiralis* observamos como la concentración de ricobendazol va aumentando a medida que aumenta la concentración en el medio, siguiendo una farmacocinética lineal en los dos primeros puntos (0,5 µg/ml – 0,076 µg/g de larva y 1 µg/ml – 0,147 µg/g de larva) que se pierde a partir de los 2 µg/ml donde la concentración de ricobendazol en el lisado de larva resulta algo menor que la esperada en una farmacocinética lineal. La concentración de albendazol sulfona, al igual que ocurría en el experimento anterior es indetectable a pesar del aumento de concentración en el medio de cultivo.

**TABLA 42.** CONCENTRACION DE ALBENDAZOL SULFOXIDO (RICOBENDAZOL) EN LOS EXTRACTOS DE LARVAS TRAS 2 HORAS DE INCUBACION CON EL FARMACO A DIFERENTES CONCENTRACIONES

En el medio de cultivo.

Concentración teórica ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentración ABZ-SO ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentración ABZ-SO <sub>2</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
0,5	0,65	< 0,01
1	1,06	< 0,01
2	2,1	< 0,01
4	4,2	< 0,01

En el lisado larvario.

Muestra	Concentración ABZ-SO ( $\mu\text{g/g}$ de larva)	Concentración ABZ-SO <sub>2</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
L0,5	0,076	Indetectable
L1	0,147	Indetectable
L2	0,204	Indetectable
L4	0,323	Indetectable

## **DISCUSSION**

---

## 9. DISCUSION.

El albendazol es un antihelmíntico de amplio espectro con baja solubilidad, lo que limita su absorción oral (Jung y col., 1998). Este hecho puede ser beneficioso para el tratamiento de infecciones por parásitos localizados a nivel intestinal, pero es un inconveniente cuando se quieren tratar infecciones de carácter sistémico. El albendazol forma una solución coloidal al añadir el agente suspensor carboximetil celulosa. La capacidad de formar una suspensión homogénea es limitada, dando lugar, como consecuencia, a una distribución no uniforme, en la que la dosificación del principio activo a lo largo del tiempo puede variar.

En este sentido, análisis de albendazol en carboximetilcelulosa sódica realizados durante los estudios farmacocinéticos, muestran una gran diferencia entre las dosis que se aplican al principio de un ensayo con respecto a aquellas referidas a los últimos lotes, en los que además, el volumen de suspensión habrá disminuido a medida que se ha ido administrando fármaco a los diferentes ratones. De esta forma, muestras extraídas a las  $24 \pm 2$  horas de su preparación, al iniciar el ensayo contenían un 30% menos de concentración de albendazol que el control de dosificación establecido; los grupos que se pautaban 2,5 horas después del inicio recibían un 95% del control de dosificación, y aquellos ratones tratados al final del ensayo, 5 horas aproximadamente después del inicio, eran administrados con un 120% del control de dosificación (sobredosificados en un 20%). Esto genera una elevada variabilidad que se une a la propia variabilidad interindividual de los ensayos *in vivo*.

Por esta razón no es de extrañar que en numerosas ocasiones se hayan realizado trabajos encaminados a aumentar la solubilidad de los bencimidazoles y su biodisponibilidad. Con la finalidad de preparar soluciones de albendazol se han seguido diferentes métodos. Por ejemplo, como fármaco básico su solubilidad puede verse incrementada por ionización en medio ácido, pero aunque esto aumenta su solubilidad, no es lo suficiente como para preparar dosis terapéuticas. Otra forma de mejorar la solubilidad es la adición de agentes surfactantes, como el polisorbato y las sales biliares, o cosolventes como el Transcutol® (Torrado y col., 1996b; Torrado y col., 1997; Redondo y col., 1998). Desafortunadamente muchos de estos agentes irritan la mucosa gástrica y su uso debe ser restringido siempre que sea posible. Otro recurso farmacotécnico para mejorar la solubilidad del albendazol es la elaboración de dispersiones sólidas con polivinilpirrolidona (Torrado y col., 1996b; López y col., 1997), si bien el método de elaboración, en rotavapor y el uso de cosolvente orgánicos, así como la alta cantidad de agentes complejantes, es una limitación en la aplicación práctica en estos productos. Recientemente, el uso de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina ha hecho posible obtener soluciones de albendazol con altas concentraciones (Castillo y col., 1999; Pier y col., 1999), cuya preparación

resulta tan sencilla como la suspensión en carboximetilcelulosa. Esta formulación mantiene constante la concentración de principio activo administrado a lo largo del tiempo y por otro lado son totalmente inocuas vía oral al no absorberse, siendo metabolizadas por ciertas bacterias del colon. Ello determina que esta formulación resulte mucho más ventajosa en su uso experimental.

El albendazol se caracteriza por presentar un amplio margen terapéutico ( $DL_{50}$  para el ratón de 3000 mg/kg de peso, determinada por SKF labs. Philadelphia. P. a.). En cuanto a eficacia se han llevado a cabo estudios destinados a conocer su actividad frente a parasitismos comunes en ganado ovino y vacuno, realizándose pruebas no solamente en ganado infectado experimentalmente, sino también en brotes naturales de infección. Todos estos estudios han confirmado que el albendazol manifiesta una actividad útil frente a parásitos gastrointestinales, vermes pulmonares, tenias, y formas adultas de *Fasciola sp*, así como frente a protozoos como *Giardia* y microsporidios (éstos actualmente considerados hongos). Recientemente y debido a su principal mecanismo de acción, interacción con la tubulina, se está utilizando en la quimioterapia oncológica con resultados muy esperanzadores.

*Trichinella spp.*, debido a su peculiar ciclo biológico, constituye uno de los modelos experimentales más idóneos para el cribado de sustancias con un posible carácter antihelmíntico. La eficacia antihelmíntica de fármacos pertenecientes al grupo de bencimidazoles frente al nematodo *T. spiralis* en las diferentes fases de su ciclo biológico, ha sido ampliamente estudiada, encontrando, al igual que nosotros, una mayor susceptibilidad en la terapia antihelmíntica, en las fases más tempranas, es decir, en los estados inmaduros del parásito (Spaldova y Corba, 1979; Gómez Barrio y col., 1986; Latif-La y Surin, 1993). Por el contrario, frente a parásitos tisulares y sistémicos es necesario administrar dosis altas o terapias sostenidas, para alcanzar concentraciones eficaces. Aunque en el caso del mebendazol se hayan encontrado eficacias similares en el tratamiento de larvas enquistadas y preadultos de *T. spiralis* (Martínez Fernández, 1979) aún cuando la solubilidad es limitada. Su alta eficacia frente a larvas enquistadas se atribuye a una colaboración entre la inmunidad mediada por células (hipersensibilidad retardada), actuando sobre los quistes, y el fármaco, actuando sobre la larva (Martínez Fernández, 1982). Este efecto no ha sido descrito en la terapia con albendazol.

Dado el bajo nivel de albendazol detectado en sangre, la actividad antiparasitaria es atribuida al albendazol sulfóxido (ricobendazol).

En el estudio de eficacia de nuestras dos formulaciones partimos inicialmente del análisis de la fase intestinal, como estadio más susceptible del ciclo biológico, así para la formulación de referencia obtenemos porcentajes de reducción de 44,24 (Tabla 1) y 67,69 (Tabla 2) para las

dosis de 5 y 10 mg/kg de peso respectivamente. En la formulación de ciclodextrinas estos ratios aumentan hasta un 69,10 (Tabla 3) y un 98,84% para las mismas dosis (Tabla 4), lo que significaría unos incrementos porcentuales relativos de actividad del 44.58% para la dosis de 5 mg/kg y del 96,41% para la de 10 mg/kg (Tabla 5). Aunque inicialmente se había justificado que la baja solubilidad de estos fármacos, y como consecuencia su pobre absorción, eran los promotores reales de una mayor actividad antiparasitaria, producto de una mayor exposición del parásito al fármaco en las fases tempranas del ciclo biológico de *Trichinella spiralis*, parece que estos datos revelan una hipótesis diferente, ya que el incremento de actividad puede ser debido al tipo de asentamiento que *T. spiralis* muestra en el intestino, pues al enhebrarse en los enterocitos se le podría asignar una localización intracelular (Despommier, 1983; Capo y col., 1984), por lo que la mayor absorción presumible de la formulación en ciclodextrinas favorecería este efecto antihelmíntico.

La fase migratoria es el único período, junto con el breve tiempo en el cual las L<sub>1</sub> permanecen en el estómago tras la infección, en el que *Trichinella* se comporta como un parásito extracelular.

La ruta en el hospedador que sigue *Trichinella* hasta alcanzar su nuevo nicho intracelular ha sido estudiada por numerosos investigadores (Cerfotaine, 1895; Askenazy, 1895; Graham, 1897; Staubli, 1905; Berntzen, 1965; Nelson y col., 1966; Basten y Beeson, 1970; Harley y Gallicchio, 1971). Las evidencias más importantes se apoyan en dos estudios sobre ratas en los que el conducto torácico fue canulado durante la infestación. En el primer estudio, los embriones fueron recogidos en grandes cantidades entre el día 6 y 7 p.i. (Basten y Beeson, 1970). Sin embargo, éste fue un hallazgo accidental, ya que el objetivo era recoger linfocitos y no gusanos. En el segundo, realizado por Harley y Gallicchio en 1971, se canuló a los animales infectados con 3000 larvas *per os*, desde el día 4 al 15 p.i., recogiendo además las larvas durante su emigración en sangre, fluido abdominal y en varios órganos incluyendo pulmones, hígado y riñones. Se observó que el 60% de las larvas migratorias se recogían en linfa y el resto en los diferentes órganos, especialmente en el hígado y los pulmones. A pesar de que en este estudio se llegaba a la conclusión de que la vía predominante de migración era la vía linfática, posteriormente Wang y Bell en 1986, demostraron que las larvas pasaban a través de la mucosa intestinal hacia el torrente sanguíneo y no a los vasos linfáticos como hasta entonces se había creído (Despommier, 1976), y luego por vía porta entraban en el hígado y sólo una pequeña proporción pasaba a los vasos linfáticos y migraba a través del conducto torácico a la circulación venosa central.

La localización definitiva de las larvas va a ser el músculo esquelético estriado. Se han realizado diversos estudios para determinar qué músculos esqueléticos son los infestados con

preferencia, tanto en infestaciones naturales como en experimentales, en una amplia variedad de hospedadores, incluyendo cerdos (Thornbury, 1897; Olsen y col., 1964), ratones (Barriga, 1978; Stewart y Charnega, 1980), rata (Leonard y Beahm, 1941; Oliver, 1961) y hombre (Forrester y col., 1961). De ellos se desprende que el asentamiento muscular estaría influenciado bien por los estímulos eléctricos de las células hospedadoras (Hughes y Harley, 1977) y las reacciones del sistema nervioso de las triquinas, o bien por tratarse de músculos más activos, como diafragma y masetero (Despommier, 1983). Sin embargo, en otros trabajos se detecta una mayor correlación entre la localización física del músculo y el porcentaje de recuperación de larvas (Stewart y Charnega, 1980), con cierta tendencia a situarse en la parte anterior del cuerpo.

El número de larvas infestantes recuperadas a día 30 post-infección ha sido usado por numerosos investigadores como índice de éxito de la infestación para un hospedador dado, observándose grandes variaciones entre unos y otros, lo cual se puede explicar por:

- El número de gusanos adultos que se llegan a establecer en el intestino del hospedador.
- El número de embriones puestos por hembra.
- La longevidad de los adultos en el nicho intracelular intestinal.
- La supervivencia de los embriones durante la migración.
- El establecimiento con éxito y desarrollo de la larva infestante L<sub>1</sub> en su nicho muscular.

Además, en los procesos infectivos hay que tener en cuenta que la larviposición puede durar aproximadamente 4 semanas llegando en algunos casos a alcanzar las 16 semanas. Durante este tiempo pueden producirse hasta aproximadamente 500 larvas por hembra, aunque depende de algún modo del número de gusanos presentes y de la existencia o no de infección previa (la producción por hembra es menor en las infecciones intensas y en los huéspedes previamente infectados) (Chirasak, 1971; Kennedy, 1978). Los machos pueden inseminar varias hembras y éstas, copular dos o más veces durante el curso de la infección (Campbell, 1983)

Todo esto nos hace considerar a la fase migratoria como la etapa más difícil de analizar por la ambigüedad que se puede producir en la interpretación de los resultados, además las variables indicadas anteriormente hacen necesario establecer criterios estrictos en el diseño experimental para evitar la variabilidad intrínseca asociada a este período y que en los puntos anteriores hemos descrito.

Además de los errores propios que el ciclo biológico del parásito nos puede llevar a cometer, el establecimiento de una pauta estándar de tratamiento entre los días 13, 14 y 15 puede hacernos arrastrar errores debidos a interacciones con la fase intestinal (longevidad de adultos) y muscular (asentamiento de los primeros embriones en su nicho definitivo).

Administrando Neguvon® eliminamos posibles errores del estadio intestinal, ya que procedemos a la eliminación de los adultos que a pesar de la propia respuesta inmune del hospedador se "resisten" a abandonar el nicho intramulticelular, sin embargo sí que es posible que nuestro objetivo pueda ser en alguna manera desvirtuado por aquellos gusanos "precozes" que realizan su asentamiento muscular.

Sobre las experiencias realizadas observamos que la formulación en complejos de ciclodextrinas no mejora de una forma significativa los resultados de actividad frente a la formulación en carboximetil celulosa. De esta forma los ratones tratados con albendazol de referencia a dosis de 50 mg/kg de peso redujeron su carga larvaria frente al control en un 38,55% (Tabla 6), siendo esta reducción de un 52,02% en el caso de 100 mg/kg de peso (Tabla 7). Los resultados obtenidos con la nueva formulación de ciclodextrinas frente al control de referencia se sitúan en un 48,26% (Tabla 8) y en un 56,44% (Tabla 9) para las dosis de 50 y 100 mg/kg respectivamente. Esto produce una reducción comparada de un 15,80% en la dosis de 50 mg/kg de peso en la formulación de ciclodextrinas frente a la de carboximetilcelulosa y de un discreto 9.21% en la de 100 mg/kg (Tabla 10).

Para analizar las posibles incidencias de esta fase, estudiamos también un abanico que abarcaba desde el día 7 p.i. hasta el día 24 p.i., procediendo en todos los ensayos a la eliminación de "errores intestinales" administrando Neguvon® el día 6 post-infección. A todos los grupos se les administró únicamente la formulación de albendazol en una solución de hidroxipropil-β-ciclodextrina a una dosis de 50 mg/kg de peso.

Los datos obtenidos indican que en los primeros días de pauta se alcanza una reducción del 36,22% (días 7, 8 y 9) (Tabla 25), seguida de un ascenso hasta alcanzar el máximo en los días 13, 14 y 15 con un 47,10% de reducción (Tabla 27), porcentaje que posteriormente decrece hasta un 33,00% en los días 22, 23 y 24 (Tabla 30).

Spaldonova y Corba en 1979 obtuvieron una reducción del 50% de eficacia sobre *T. spiralis* al administrar 100 mg/kg de peso de albendazol en un intervalo de 4 días entre el 8 y el 11; Gómez Barrio en 1985 obtuvo el 52,72% de reducción en ese mismo intervalo y dosis frente a *T. pseudospiralis*. Keittivuti en 1989 obtuvo una eficacia del 36,22%, administrando 50 mg/kg de peso los días 10, 11 y 12.

Estos resultados no dejan cuando menos de ser sorprendentes. En el inicio del estudio al observar que se incrementaba el porcentaje de reducción a medida que aumentábamos las días de la pauta, empezamos a pensar que la actividad quizá estuviese siendo debida en parte a un efecto sobre posibles larvas ya pre-enquistadas, sin embargo al descender de nuevo a partir del día 16, aunque no de forma significativa, esto destruyó nuestra deducción inicial.

Estos datos no nos aportan demasiada luz sobre el efecto del fármaco en esta fase; una interpretación que podría sugerirse es una mayor susceptibilidad metabólica del parásito en determinados intervalos. Este análisis también se podría completar con un estudio inmunológico para ver qué tipo de respuesta se está produciendo, y si ésta se puede relacionar con los datos obtenidos, como en su momento ocurrió con el mebendazol en la fase muscular, en el que se vio que la acción antihelmíntica era un combinado de efecto farmacológico e inmunológico.

Sin lugar a dudas la fase migratoria es la más refractaria al tratamiento, probablemente debido a que esta fase implica siempre estados en distinto nivel de desarrollo, a diferencia de las fases intestinal y muscular, en las que en un período corto de tiempo se produce la maduración del estado y la consiguiente estabilidad en el mismo. En el caso de larvas emigrantes se puede barrer un período de tiempo más o menos largo en el que pueden coexistir larvas recién puestas con otras que están en fase de pre-enquistamiento y en consecuencia su susceptibilidad a fármacos puede ser muy diferente al encontrarse en una situación metabólica distinta. Esta dificultad podría paliarse tratando de sincronizar el estado mediante la inyección endovenosa de los embriones obtenidos por larviposición *in vitro*.

El tratamiento en la fase muscular se sitúa entre las días 34, 35 y 36 y los resultados obtenidos para la formulación convencional a dosis de 50 mg/kg de peso dan una reducción de un 25,17% frente al control (Tabla 11), siendo ésta de un 33,51% para la dosis de 100 mg/kg de peso (Tabla 12). El complejo de albendazol-ciclodextrina produjo una reducción de 56,47% en 50 mg/kg (Tabla 13) y de 97,54% en 100 mg/kg de peso (Tabla 14), lo que supone una elevación considerable del ratio de actividad de una formulación frente a la otra. Porcentualmente la formulación de albendazol en ciclodextrinas es un 41,84% más eficaz que la de referencia en carboximetilcelulosa, a dosis de 50 mg/kg, mientras que en la dosis más alta (100 mg/kg) el incremento relativo de eficacia se sitúa en un 96,18% (Tabla 15).

Estos datos mejoran los obtenidos para otras formulaciones de albendazol, como las dispersiones sólidas en polivinilpirrolidona, tanto en la fase intestinal, como en la migratoria y muscular, siendo además comparable la reducción en la fase migratoria con los datos obtenidos para soluciones líquidas de albendazol con promotores de absorción (López, 1996).

Si se acepta el principio de que la disolución juega un papel primordial en la biodisponibilidad y que se pueden establecer correlaciones entre ambos valores para muchas sustancias medicamentosas, será cierto que, cuanto más soluble sea un principio activo, menos problemas de biodisponibilidad tendrá, siendo la solución acuosa la forma más fácilmente absorbible, lo que la convierte en un patrón de referencia idóneo para apreciar la biodisponibilidad de otras formas de dosificación más complejas.

Por tanto, para realizar correctamente un ensayo de biodisponibilidad, será preciso administrar a los sujetos una forma de dosificación fácilmente absorbible.

Sin embargo es relativamente frecuente cometer determinados errores en la evaluación de los datos. El más común consiste en la comparación de los datos obtenidos en estudios diferentes del mismo principio activo. Tres factores contribuyen a esta apreciación errónea:

- Variabilidad biológica: Son diferencias atribuibles a las características inherentes a cada grupo de individuos, para evitarlo se intentan homogenizar al máximo los grupos de trabajo.
- Diferencias de metodología: Parámetros como la ingesta de alimentos antes y después de la administración del fármaco pueden tener efectos muy significativos en la absorción de los mismos. Nuestros animales eran alimentados *ad libitum*, intentando de esta manera homogenizar también al máximo el estudio, el fármaco se aplicaba a la misma hora a todos los animales de los diferentes grupos.
- Técnicas analíticas diferentes: En todos nuestros ensayos se utilizó la misma metodología y sistema analítico de valoración.

Muchos estudios de disolución *in vitro* han sido realizados para explicar la absorción *in vivo* y en ellos se prueba que el incremento en la biodisponibilidad es atribuible al incremento en la solubilidad y a la disolución del principio activo (Frijlink y col., 1987; Tokumura, 1986; Torres-Labandeira y col., 1991).

Nosotros hemos analizado la evolución temporal de las concentraciones de albendazol y sus metabolitos albendazol sulfóxido y albendazol sulfona, tras la administración oral de una suspensión de albendazol en carboximetil celulosa sódica y una solución oral de albendazol en complejos de inclusión de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, a iguales dosis (50 y 100 mg/kg de peso), en ratones Swiss CD-1.

En primer lugar se confirman los resultados obtenidos por otros autores en diferentes especies (Galtier y col., 1986; Lanusse y col., 1991; Delatour y col., 1990; Lanusse y Prichard,

1990), acerca de las bajas concentraciones plasmáticas de albendazol obtenidas, hecho que se produce como consecuencia del inminente metabolismo debido al efecto de primer paso hepático. La formulación en ciclodextrinas modifica significativamente todos los parámetros farmacocinéticos, tanto a la dosis de 50 como de 100 mg/kg, con incremento de los parámetros  $C_{m\acute{a}x}$ , ABC,  $K_e$  y  $t_{1/2}$  y disminución de  $t_{m\acute{a}x}$  (Tabla 16). Asimismo y también en concordancia con otras especies el albendazol sulfóxido resulta ser el metabolito más abundante en sangre, con mejoras también significativas en los parámetros farmacocinéticos  $C_{m\acute{a}x}$  y ABC; tras la administración en complejos de ciclodextrinas, a las dosis de 50 y 100 mg/kg (4,76  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 30,92  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  y 7,91  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 57,18  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ , respectivamente). Los parámetros  $K_e$  y  $t_{1/2}$  no se ven modificados, mientras que el retraso observado en la  $t_{m\acute{a}x}$  (1,5 horas en la formulación de albendazol en ciclodextrinas frente a 1,25 en la formulación de albendazol en carboximetilcelulosa) no se observa a la dosis de 100 mg/kg (1,75 horas en ambas). Las mejoras en los parámetros farmacocinéticos  $C_{m\acute{a}x}$  y ABC obtenidos con la formulación de albendazol en ciclodextrinas se traducen en incrementos significativos en la actividad antihelmíntica, tanto frente a las fases entéricas, como parenterales enquistadas, como se evidenció en trabajos anteriores.

En cuanto a la cinética del metabolito inactivo albendazol sulfona también se observan modificaciones tras la administración de la formulación de albendazol en ciclodextrinas en relación a la de carboximetilcelulosa, siendo de destacar el incremento significativo del ABC, tanto a las dosis de 50 como 100 mg/kg (0,87  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  a 2,19  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  y 0,87  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  a 3,53  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ) y el marcado retraso de  $t_{m\acute{a}x}$  para las dosis de 50 mg/kg (2 horas a 0,75 horas).

Hay que resaltar que las características farmacocinéticas del albendazol varían entre las diferentes especies estudiadas (Delatour, 1991), así el  $t_{m\acute{a}x}$  para el sulfóxido del albendazol es aproximadamente de 4 horas en humanos y perros; de 6 a 8 horas en ratas, 10 horas en ovejas, 20 horas en cabras y cerca de 24 horas en terneros. Los experimentos realizados en ratones Swiss CD-1 demuestran que el  $t_{m\acute{a}x}$  se logra en tiempos cortos inferiores a las 2 horas, ello puede ser debido a las variaciones propias de las especies diferentes o efectos del vaciamiento gástrico (Prieto, 1991), puesto que nuestra administración es de modo independiente a las comidas.

En el estudio del albendazol se ha observado que la absorción a nivel estomacal es debida a que la solubilidad de éste es mayor en medios ácidos, luego podemos favorecer esta absorción enlenteciendo el vaciamiento gástrico por una dieta rica en grasas (Ali, 1992).

Como hemos visto, del albendazol se conoce su comportamiento farmacocinético y el de sus principales metabolitos (albendazol-sulfóxido y sulfona) en los modelos comunes de animales

de laboratorio, así como en varias especies domésticas de interés, determinándose la disponibilidad del fármaco en el entorno del parásito. Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos de entrada y posterior comportamiento del fármaco en el interior de los parásitos está limitado a unas pocas especies representativas de helmintos. La farmacocinética de los antihelmínticos, incluye la absorción de los mismos, distribución, metabolismo y eliminación en el hospedador y determina la concentración de fármaco que accede al entorno del parásito. Sin embargo, la acción de los antihelmínticos también depende de la disponibilidad que la sustancia activa tenga para alcanzar el receptor específico dentro del parásito.

El modo de entrada de los fármacos, su biotransformación y acumulación de metabolitos activos en el interior del helminto, son factores importantes a la hora de optimizar la eficacia de los tratamientos y condiciona las posologías establecidas.

Los nematodos se encuentran en contacto con el entorno a través de su superficie externa. Tradicionalmente, la cutícula de los nematodos ha sido considerada como una barrera limitante a la entrada de moléculas dentro del parásito. Sin embargo, aunque en los nematodos la ruta oral es operativa, hay evidencias de que la difusión transcuticular es la ruta predominante de acceso de fármacos a su interior (Alvarez y col., 2001; Solana y col., 2000; García-Llamazares y col., 1998; Geary y col., 1995).

Geary y col., 1995 sugiere que la difusión pasiva a través del componente lipídico de la cutícula del parásito puede ser el factor limitante en el proceso de entrada de fármacos al interior del helminto y que la difusión transcuticular es la principal ruta de adquisición de antihelmínticos de amplio espectro en nematodos, en contraposición a la ingesta oral.

Dado que esta difusión se produce a favor de gradiente de concentración, cuanto mayor sea el período de contacto fármaco-parásito más cantidad de sustancia activa alcanzará la diana farmacológica (Mottier y col., 2006).

El incremento de concentración de fármaco en el interior del parásito se produce, por tanto, en función del tiempo, como así lo demuestra nuestra prueba donde, a mayor período de exposición (18 horas) mayor concentración de fármaco se alcanza ( 0,094 µg/g de larva).

Por otro lado, la absorción de albendazol sulfóxido depende claramente de la concentración del mismo en el entorno del parásito, mostrando una farmacocinética lineal como muestra nuestro ensayo.

El receptor específico para el albendazol, en los nematodos, es la tubulina. El albendazol como tal, es un profármaco ya que al ser absorbido por el hospedador sufre inmediatamente efecto de primer paso hepático, dando como resultado un metabolito activo, albendazol sulfóxido o ricobendazol y otro inactivo, albendazol-sulfona. El albendazol sulfóxido, responsable de la actividad, tiene un centro de asimetría que da lugar a dos enantiómeros (+) y (-) (Delatour y col., 1990 a; 1991). En el metabolismo del hospedador estos enantiómeros tienen variabilidad en función de la especie, de esta forma para ratas y ratones el enantiómero (-) es el predominante, mientras que en perro, oveja, hombre, etc., es el (+) el predominante (Delatour, 1991 b). Esto ha llevado a pensar que el enantiómero (+) es el responsable de la actividad terapéutica, ya que las dosis activas requeridas en este grupo son menores que cuando tratamos ratas o ratones.

Pero esta actividad puede deberse a dos razones fundamentales, bien porque realmente el enantiómero (-) carece de toda la actividad por su conformación espacial, o bien porque el parásito es capaz de acumular en su interior uno solo de los enantiómeros eliminando el otro (metabolismo enantioselectivo).

En los ensayos realizados por nosotros a una concentración de 0,5 µg/ml durante un período de tiempo comprendido entre 1 y 18 horas hemos podido comprobar cómo existe un equilibrio, con la presencia de la molécula racémica, en los primeros momentos del ensayo. Este equilibrio se rompe a partir de las 6 horas mostrándose un acúmulo de enantiómero (+) en el parásito que llega a un 76,9% a las 18 horas, lo que implicaría la presencia de sistemas enzimáticos enantioselectivos (Tabla 41).

La sensibilidad del parásito a los enantiómeros puros se ha estudiado en los ensayos *ex vivo* y sus resultados sugieren que el enantiómero (+) del albendazol sulfóxido es probablemente el responsable de la actividad frente a helmintos (Bolás y col., 2004). Sin embargo se requeriría una total separación de estos enantiómeros o bien su síntesis química, para realizar pruebas más definitivas que validaran totalmente esta hipótesis. Sin embargo nosotros creemos que, aún pendientes de estos logros, es interesante avanzar estos hallazgos a partir de nuestro modelo *ex vivo* de actividad antihelmíntica. La purificación total de los enantiómeros no se puede lograr mediante cromatografía líquida de alta resolución porque cada fracción de enantiómero contiene aproximadamente un 15% de su isómero opuesto. Por ello parece probable que la actividad mostrada por el RBZ (-) a 0,5 µg/ml, pueda realmente ser debida a la contaminación presente de RBZ (+) (equivalente a 0,075 µg/ml). La conveniencia de nuestro modelo *ex vivo* para el análisis de la actividad antihelmíntica está soportada por el hecho de que los helmintos, a diferencia de los mamíferos, oxidan ABZ de una forma no enantiomérica selectiva (Solana y col., 2001). Por otro lado, parece improbable que las larvas de *T. spiralis*

puedan convertir el racémico de RBZ y los enantiómeros a ABZ, contrariamente a lo que ocurre con el cestodo *Moniezia expanda* con albendazol sulfóxido (Solana y col., 2001) ya que en nuestro caso no se registró actividad para el enantiómero (-).

Las formas farmacéuticas de administración oral son las más utilizadas por varias causas: ser la vía natural de entrada, no presentar ninguna dificultad su administración, y seguridad en casos de sobredosificación al poderse recurrir al lavado gástrico o inducción al vómito.

Sin embargo presenta ciertos inconvenientes:

- El pH del jugo gástrico o las enzimas proteolíticas pueden destruir el fármaco.
- Existen fármacos irritantes de la mucosa gástrica (p.ej., AINES o hidrato de cloral).
- Posibilidad de efecto de primer paso hepático.

La mayoría de los fármacos administrados vía oral buscan una acción sistémica tras un proceso de absorción. Sólo en algunos casos se busca la acción local, para lo cual se utilizan fármacos con baja o nula solubilidad en agua que impida su absorción.

El inicio de la acción de un fármaco administrado por vía oral tiene lugar en función de la rapidez con la que el medicamento, una vez liberado, sea absorbido. El punto inicial de absorción de fármacos, aunque muy reducido, es la mucosa bucal; la capacidad de absorción se ve incrementada para algunos fármacos en el estómago, pero, sin lugar a dudas, es la mucosa intestinal la gran protagonista en la absorción de medicamentos.

Los factores que influyen en la absorción oral de fármacos son difíciles de predecir, ya que, además de los factores fisiológicos como el pH, cantidad y tipo de alimentos, existen oscilaciones individuales, así como procesos patológicos que no permiten llegar a conclusiones válidas.

Los procesos fisiopatológicos que implican respuesta inflamatoria pueden afectar la absorción y la biotransformación de algunos fármacos modificando su comportamiento farmacocinético (Molina y col, 2007). La presencia de parásitos en el intestino, puede modificar las condiciones del hospedador y su capacidad de metabolizar fármacos y otros xenobióticos alterando las enzimas biotransformadoras, estos cambios pueden tener consecuencias farmacológicas, toxicológicas o fisiológicas (Velebný, 1992a, 1992b), (Skalova y col, 2007), y es por tanto, un factor a tener en cuenta a la hora de desarrollar un modelo de estudio de biodisponibilidad de fármacos administrados por vía oral.

Con la llegada de las larvas L<sub>1</sub> de *Trichinella spiralis* al intestino se inicia un proceso inflamatorio que culmina con la eliminación natural del parásito. Las larvas L<sub>1</sub> rápidamente se introducen en su nicho intracelular, estructura consistente en una fila de células epiteliales columnares en las cuales la larva penetra, llegando a encontrarse enhebrada en esta fase del ciclo hasta en 117 células columnares (Campbell, 1983). Sorprendentemente, no se produce desintegración de las células del hospedador como consecuencia de la penetración de la larva, sino que la propia célula se alarga para acomodar al parásito, formando un sincitio (Wright, 1979). Estas larvas alcanzan la madurez sexual aproximadamente en 30 horas (Wu y Kingscote, 1957; Villella, 1958; Berntzen, 1965; Ali Khan, 1966; Shanta y Meerovitch, 1967; Kozek, 1971, 1975) y tras el apareamiento se producen los embriones. Si bien el duodeno es el lugar en el que la mayoría de las larvas se establecen, la presencia del parásito en el sincitio activa la respuesta inmunitaria desencadenando una inflamación que se extiende a todos los segmentos intestinales. Durante la migración de los embriones al músculo estriado la inflamación intestinal disminuye, consecuencia de la eliminación espontánea de adultos por parte del hospedador.

Velebný y col., en 1992 realizaron un estudio en el que analizaban el efecto que la infección intestinal por *Trichinella spiralis* en un modelo murino, podía tener en la absorción de <sup>3</sup>H-cambendazol. En el estudio observaron que mientras que los niveles plasmáticos (C<sub>máx</sub>) eran similares en ratones controles e infectados, el ABC y la biodisponibilidad fueron significativamente mayores en ratones infectados frente a controles, y además la constante de eliminación y el aclaramiento plasmático mostraban diferencias en función de los estadios de la infección, siendo más lenta la eliminación en el grupo tratado en fase muscular. En el estudio se hace continua referencia al proceso inflamatorio desencadenado por la presencia del parásito a pesar de que en ningún momento se indica la realización del análisis histopatológico. No obstante, teniendo en cuenta los puntos elegidos para el estudio (días 3 y 26 p.i.) es altamente improbable que los cambios farmacocinéticos apreciados para cambendazol sean debidos al estado inflamatorio intestinal (no manifiesto en estos días), sino más bien a la presencia y localización de los parásitos en el sincitio intestinal.

En nuestro estudio damos vital importancia al estado de la mucosa como barrera al paso de sustancias, estado que obviamente se va a ver alterado, además de por la presencia del parásito, por el proceso inflamatorio que desencadena. Así, en nuestro estudio la biodisponibilidad del fármaco, reflejada en el ABC, se mantiene equiparable a los controles en las primeras fases de la infección (día 5 p.i.), viéndose disminuida en la fase de mayor deterioro de la mucosa como consecuencia del proceso inflamatorio (día 10 p.i.), con recuperación posterior (día 22 p.i.) hasta alcanzar niveles similares a los observados en el control sano (Tabla 37).

Los datos farmacocinéticos fueron contrastados con el estudio histopatológico que muestra claramente la evolución de la mucosa intestinal. Así, tanto en los controles sanos como en los primeros estadios de la infección (día 5 p.i.) no se observan signos de inflamación intestinal, sin embargo, estos son patentes el día 10 p.i., con la presencia de abundante infiltrado a base de linfocitos, células plasmáticas y polimorfonucleados, hiperplasia de las células de Panneth con una tendencia migratoria ascendente hacia la zona apical de la microvellosidad, dato que previamente había sido descrito por Kamal en un estudio relativo a infecciones experimentales por helmintos (Kamal y col., 2002). Además la presencia de secciones de las larvas en varios de los cortes estudiados, ha permitido apreciar ciertos signos de aparente daño en el parásito, con posible desorganización estructural, dato que previamente no había sido descrito, y que nos ha llevado a pensar en la respuesta inflamatoria como posible responsable de esta alteración. Por otro lado, parece evidente que el proceso inflamatorio inducido por la infección intestinal por *Trichinella* es transitorio, hecho que no había sido descrito anteriormente, permitiendo la recuperación anatómica y funcional de la mucosa intestinal (día 22 p.i.). Todo esto reafirma la asunción de que la fase intestinal del ciclo biológico de este parásito es un medio utilizado por el mismo para alcanzar el músculo, verdadero nicho parasitario que garantizará su transmisión y supervivencia en la naturaleza.

En resumen, los resultados del estudio histopatológico se correlacionan por tanto con los del estudio farmacocinético y ponen de manifiesto que tras el proceso inflamatorio desencadenado por la infección intestinal, que culmina en la autocuración, se sucede una restauración de la mucosa que determina la recuperación de la capacidad de absorción del fármaco hasta niveles comparables a los registrados en los animales sanos.

# CONCLUSIONES

---

## **10. CONCLUSIONES.**

### **PRIMERA:**

El recurso tecnológico de formación de complejos de inclusión de albendazol en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrinas, determina cambios importantes en su perfil farmacocinético, con un aumento significativo de los parámetros  $C_{m\acute{a}x}$  y  $ABC_{0\rightarrow\infty}$ . Estos cambios suponen una mejora en la biodisponibilidad, lo que se traduce en un aumento significativo de la actividad frente a las fases intestinal y muscular de la infección por *T. spiralis*.

### **SEGUNDA:**

La formulación de albendazol en carboximetilcelulosa sódica e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrinas no modifica el perfil enantiomérico del metabolito activo albendazol sulfóxido, lo que indica que ambas formulaciones no influyen en la biotransformación del albendazol.

### **TERCERA:**

La modificación de la pauta posológica durante la fase migratoria, no supone ninguna mejoría en el tratamiento, manteniéndose ésta como la fase más compleja, desde el punto de vista terapéutico, del ciclo biológico de *Trichinella spiralis*.

### **CUARTA:**

La infección intestinal por *Trichinella spiralis* induce una inflamación aguda temporal y transitoria que remite tras la autoexpulsión de los adultos, sucediéndose la recuperación anatómica y funcional de la mucosa intestinal.

### **QUINTA:**

En el tratamiento de la trichinellosis murina por albendazol, la infección intestinal disminuye la biodisponibilidad del fármaco, si bien más tarde, tras la resolución del proceso inflamatorio, ésta se recupera no afectando, por tanto, al tratamiento frente a la fase muscular.

**SEXTA:**

Los ensayos *ex vivo* llevados a cabo con los enantiómeros purificados de albendazol sulfóxido ponen de manifiesto que el enantiómero (+) es el principal responsable de la actividad antihelmíntica.

**SÉPTIMA:**

La incorporación de ricobendazol al interior de la larva L1 se produce a favor de gradiente de concentración mostrando una farmacocinética lineal, lo que indica un paso preferente por difusión transcuticular. Las larvas acumulan el enantiómero albendazol sulfóxido (+), principal responsable de la actividad farmacológica.

# **BIBLIOGRAFIA**

---

**11. BIBLIOGRAFIA.****A**

ABIA-VEGA, P; BOLÁS FERNÁNDEZ, F; MARTINEZ FERNÁNDEZ, A.R.; 1982. The anthelmintic action of albendazole upon *Trichinella pseudospiralis*. Rev. Iber. Parasitol, Spec. Vol.: 509-518.

ABOUL-ATTA, N; DENHAM, D.A.; 1978. The effect of 5-benzimidazo-2-(4-thiazolyl) benzimidazole on *Trichinella spiralis*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72 (6): 671-672.

ADAMS,E.J; STEPHENSON,L.S; LATHAN,M.C Y KINOTI,S.N. 1994. Physical activity and growth of Kenyan school children with hookworm, *T.trichura* and *A.lumbricoides* infection are improved after treatment with albendazole. J. Nutr. 124 (8): 1199-1206.

AGUINALDO, A.M; TURBEVILLE, J. M; LINFORD, L. S; RIVER, M. C; GAREY, J. R; RALFT, R. A; LAKE, J. A. 1997. Evidence for a clade of nematodes arthropods and other moulting animals. Nature. 387 (6632): 489-492.

AHMAD, M.A; MIR, A.S; PANDIT, B.A; KIRMANI, M.A. 1990. Albendazole in the treatment of gastrointestinal nematodes in sheep. Vet. Parasitol. 4 (1): 77-78.

AKIYOSHI, D. E; WEISS, L. M; FENG, X; WILLIAMS, B. A; KEELING, P. J; ZHANG, Q; TZIPORI, S. 2007. Analysis of the beta-tubulin genes from *Enterocytozoon bienersi* isolates from a human and rhesus macaque. J. Eukaryot. Microbiol. 54(1): 38-41.

ALCAINO, H. A; GORMAN, T. R; ELORRIETA, M. B; 1984. A comparison between the efficacy of thiabendazole and febantel on experimental trichinellosis in rats. Vet. Parasitol. 14(2): 153-157.

ALI, D. N; CHICK, B. F. 1992. Effect of feed type on the kinetic disposition of oxfendazole. Res. Vet. Sci. 52: 382-383.

ALI, D. N; HENNESSY,D R. 1993. The effect of feed intake on the rate of flow of digesta and the disposition and activity of oxfendazole in sheep. Int. J. Parasitol. 28/4: 477-484.

ALI KHN, Z. 1966 The post-embryonic development of *Trichinella spiralis* with special reference to ecdysis. J. Parasitol. 52: 248-259.

ALIZADEH, A; RANJBAR, M; KASHANI, K. M; TAHERI, M. M; BODAGHI, M. 2006. Albendazole versus metronidazole in the treatment of patients with giardiasis in the Islamic Republic of Iran. East Mediterr. Health. 12(5): 548-554.

AL-KARAWI, M.A; YASAWY, M. I; MOHAMED, A. R. E. 1993. Combination of praziquantel and albendazole in the treatment of hydatid disease. (Correspondence) Saudi Med. J. 13(5): 248.

ALVAREZ, A. I; IMPERIALE, F. A; SANCHEZ, S. F; MURNO, G. A; LANUSSE, C. E. 2000. Uptake of albendazole and albendazole sulphoxide by *Haemonchus contortus* and *Fasciola hepatica* in sheep. Vet. Parasitol. 94: 75-89.

ALVAREZ, A. I; MOTTIER, M. L; SANCHEZ, S. F; LANUSSE, C. 2001. *Ex vivo* difusión of albendazole and its metabolite into *Ascaris suum* and *Fasciola hepatica*. Parasitol. Res. 87: 929-934.

ALVAREZ, A. I; MERINO, G; MOLINA, A. J; PULIOD, M. M; MCKELLAR, Q. A; PRIETO, J. G. 2006. Role of ABC transporters in veterinary drug research and parasite resistance. Curr. Drug Deliv. 3(2): 199-206.

ALVAREZ, A. I; MOTTIER, M. L; LANUSSE, C. 2007. Drug transfer into target helminth parasites. Trends Parasitol. 23(3): 97-104.

AMAIZO. 1988. Cavitron ciclodextrin. From America Maizo Products Company.

AMRI, H. S; FARGENTON, X; BENOIT; TOTIS, M; BATT, A. 1988. Inducing effects of albendazole on rat liver drug metabolizing enzymes and metabolite pharmacokinetics. Toxicol. Appl. Pharmacol. 92: 141-149.

ASKANAZY, M. 1895. Zur Lehre von der Trichinosis. Virchows Arch. Pathol. Anat. 141: 42-71.

AURET, B. J; BOYD, D. R; HENBEST, H. B. 1968. Stereoselectivity in the oxidation of sulphoxides to sulphones in the presence of *Aspergillus niger*. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 2374-2376.

AVERKIN, E. A. Y COL., 1975. Methyl 5(6)phenylsulfonyl-2-benzimidazole carbamate, a new potent anthelmintic. Med. Chem. 18: 1164-1166.

AWDZI, K; HERO, M; OPOKU, N; BUTTNER, D. W; COVENTRY, P; PRIME, M. A; ORME, M; EDWARDS, G. 1994. The chemotherapy of onchocercosis XVII. A clinical evaluation of albendazole in patients with onchocercosis; effects of food and pretreatment with ivermectin on drug response and pharmacokinetics. Trop. Med. Parasitol. 45 (3): 203-208.

## B

BACKWINKEL, K. P; THEMANN, H. 1972. Elektronenmikroskopische untersuchungenber die pathomorphologie der Trichinellose. Beitr. Patho. 146: 259-271.

BALIHAROVA, V; VELIK, J; FIMANOVA, K; LAMKA, J; SZOTAKOVA, B; SAVLIK, M; SKALOVA, L. 2005. Inhibitory effect of albendazole and its metabolites on cytochromes P450 activities in rat and mouflon in vitro. Pharmacol. Rep. 57(1): 97-106.

BALIHAROVA, V; SKALOVA, L; MAAS, R. F; DE VRIEZE, G; BULL, S; FINK-GREMMELS, J. 2003. The effects of benzimidazole anthelmintics on P4501A in rat hepatocytes and HepG2 cells. J. Pharm. Pharmacol. 55(6): 773-781.

BALTAR, P; SANTAMARIA, M. T; LEIRO; QUINTERO, P Y COL., 1989. Estudio de la eficacia de Netobimin (Hapasil®) contra *Trichinella* en ratones CD1. Rev. Iber. Parasitol. 49 (2): 193-197.

BANY, J; LACH, J; GOLINSKA, Z. 1992. Efficacy of albendazole against *Trichinella pseudospiralis* and *Trichinella spiralis* in mice. Wiad Parazytol. 38(3-4): 143-146.

BARRIGA, O. O. 1978. Reliability of muscle samples to estimate *Trichinella* infections in the mouse. J. Parasitol. 64: 954-955.

BASTEN, A; BEESON, P. B. 1970. Mechanism of eosinophilia. II. Role of the lymphocyte. J. Exp. Med. 131: 1288-1304.

- BAUER, T. M; BRUHWILER, J; ASCHWANDEN, M; WAGNER, S; SCHWANDER, J. 1994. Neurocysticercosis. Dtsch. Med. Wochenschr. 119(6): 175-179.
- BEHM, C. A; BRYANT, C. 1985. The modes of action of some modern ntelmintic. In resistance in nematodes to anthelmintic drugs. (Edited by Anderson y Waller P. J.) pp 57-67. CSIRO Division of animal health, Glebe. NSW.
- BELL, R. G. 1985. Genetics of adult *Trichinella spiralis* rejection during primary infection. In trichinellosis. (ICT 6) C. Kim (ed) State University of New York Press, Albeny, p 77-83.
- BENOIT, E; BESSE, S; DELATOUR, P. 1992. Effect of repeated doses of albendazole on enantiomerism of its sulfoxide metabolite in goats. Am. J. Vet. Res. 53 (9): 1163-1165.
- BERNTZEN, A. K. 1965. Comparative growth and development of *Trichinella spiralis* *in vitro* and *in vivo* with a redescription of the life cycle. Exp. Parasitol. 16: 74-106.
- BEKISK, O; YA, L; BURAK, I. I; KOLOSOVA, M. O. 1979. A search for active preparations in the carbamate benzimidazole group for the therapy of trichineliasis. Med. Par. I. Paraz. Bolez. 48 (4): 32-35.
- BOCKARIE, M. J; TAVUL, L; IBAM, I; KASTENS, W; HAZLETT, F; TISCH, D. J; ALPERS, M. P; KAZURA, J. W. 2007. Efficacy of single-dose diethylcarbamazine compared with diethylcarbamazine combined with albendazole against *Wuchereria bancrofti* infection in Papua New Guinea. Am. J. Trop. Med. Hyg. 76(1): 62-66.
- BOGAN, J. A; BENOIT, E; DELATOUR, P. 1987. Pharmacokinetics of oxfendazole in goats: a comparision with sheep. J. Vet. Pharmacol. Ther. 10: 305-309.
- BOGAN, J. A; MARRINER, S. E. 1980. J. Pharm. Sci. 69: 422-433.
- BOLÁS FERNÁNDEZ, F; MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. R; SANTOS, M. C. 1981. Anthelmintic effect of oxfendazole, febantel and tioxidazol on the various stages of *Trichinella* spp. In Trichinellosis (Ed. C. W. Kim; E. J. Ruitenber; J. S. Teppema Reedbooks Ltd; Surrey, UK. P: 331-335.
- BOLÁS FERNÁNDEZ, F; RAMA IÑÍGUEZ, S; TORRADO DURÁN, J.J. 2004. *Ex vivo* anthelmintic activity of albendazole-sulphoxide enantiomers. J. Parasitol. 90(2): 407-409.
- BONATO, P. S; OLIVEIRA, A. R; SANTANA, F. J; FERNÁNDES, B. J; LANCHOTE, V. L; GONZÁLEZ, A. E; GARCÍA, H. H; TAKAYANAGUI, O. M. 2007. Simultaneous determination of albendazole metabolitos, praziquantel and its metabolito in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal. 44(2): 558-563.
- BOGERS, M; DE NOLLIN, S. 1975. Ultrastructural changes in *Ascaris suum* intestine after mebendazole treatment *in vivo*. J. Parasitol. 60: 110-112.
- BOGERS, M; DE NOLLIN, S; VERHEYEN, A; DE BRABANDER, M; THIENPONT, D. 1975b. Effects of new anthelmintics on the microtubular system of parasite. In Microtubules and Microtubulu inhibitors. (Edited by Bogers y De Brabander m) p: 497-508. North Holand/Elsevier. Amsterdam.

BONDIAU, P. Y; PEVRADE, F; BIRSWITLÉ, I; THYSS, A; BRUNETON, J. N; MARCY, P. Y; MONDAIN, V. 1993. Bone hydatidosis. Pseudosarcomatous aspect. Presse Med. 22(29): 1367.

BORGSTEEDE, F. H. M; REID. 1982. Oxfendazole efficacy in calves: a comparison of oral and intramuscular routes of administration. Vet. Parasitol. 4: 139-141.

BORGSTEEDE, F. H; DERCKSEN, D. D; HUIJERBS, R. 2007. Doramectin and albendazole resistance in sheep in The Netherlands. Vet. Parasitol. 144(1-2): 180-183.

BOULOS, L. M; ABU SAMRA, L. M; AMIN, S. M; EL NASERY, S. F; Y COL., 1987. Effect of albendazole on enteral and parenteral phases of *Trichinella spiralis*. J. Egypt. Soc. Parasitol. 17 (1): 341-346.

BRUCE, R. G. 1974. The formation and utilization of schistosome secretory globules in *Trichinella spiralis*. In Trichinellosis. (ICT6) C. Kim (ed) Intext Educational Publishers, New York, p. 43-48.

### C

CAI, Z. Y; GALETTIS, P; LU, Y; MORRIS, D. L; POURGHOLAMI, M. H. 2007. Pharmacokinetics of albendazole in New Zealand white rabbits: oral versus intraperitoneal administration. Anticancer Res. 27(1A): 417-422.

CAMPBELL, W. C. 1967. Distribution of *Trichinella spiralis* in the small intestine of young mice. J. Parasitol. 53: 395-397.

CAMPBELL, W. C; REW, R. 1986. Chemotherapy of parasitic diseases. Plenum press. New York, London. 655 pag.

CAMPBELL, W. C. 1983. *Trichinella* and Trichinosis. Plenum Press. New York, London.

CAMPBELL, W. C. 1990. Benzimidazoles: veterinary uses. Parasitol. Today. 6 (4); 130-133.

CAPO, V; DESPOMMIER; SILVERSTEIN, S. 1984. The site of ecdysis of the L1 larva of *Trichinella spiralis*. J. Parasitol. 70: 992-994.

CASTILLO, J. A; PALOMO CANALES, J; GARCIA, J. J; LASTRES, J. L; BOLÁS, F; TORRADO, J. J. 1999. Preparation and characterization of albendazole beta-cyclodextrin complexes. Drug Dev. Ind. Pharm. 25 (12): 1241-1248.

CASTILLO, J. A. 1994. Aplicación de las  $\beta$ -ciclodextrinas en la solubilización del albendazol. Tesina de licenciatura. Facultad de Farmacia. UCM

CASTRO HERMIDA, J. A; FREIRE SANTOS, F; OTEIZA LÓPEZ, A. M; ARES MAZAS, E. 2000. Unexpected activity of  $\beta$ -cyclodextrin against experimental infection by *Cryptosporidium parvum*. J. Parasitol. 86 (5): 1118-1120.

CASULLI, A; MORALES, M. A; GALLINELLA, B; TURCHETTO, L; POZIO, E. 2006. 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin improves the effectiveness of albendazole against encapsulated larvae of *Trichinella spiralis* in a murine model. J. Antimicrob. Chemother. 58(4): 886-890.

CERFONTAINE, P. 1895. Contribution a l'étude de la trichinose. Arch. Biol. 13: 125-145.

CHIRASAK, K. 1971. Output of larvae and life span of *Trichinella spiralis* in relation to worm burden and superinfection in the mouse. J. Parasitol. 57: 289-297.

CLARKSON, M. J; MORRIS, D. L; STALLBAUEMER, M. F; PRITCHARD, J. E; CHINNERY, J. B. 1986. Albendazole treatment of pulmonary hydatid cysts in naturally infected sheep. In Proceeding of second International Symposium on taeniasis/cysticercosis and echinococcosis/hidatidosis 2-7 December 1985. 187-195.

CHICK, B; RUNKEL, R; PEARSON, I. 1987. Method of enhancing activity of benzimidazole anthelmintic. Proc. 12<sup>th</sup> conf. W. A. A. V. P. Abstrac. 11B-1. Montreal. Canadá.

CRIADO FORNELIO, A; RODRIGUEZ CAABEIRO, F; JIMÉNEZ GONZÁLEZ, A. 1987. The mode of action of some benzimidazole drugs on *T.spiralis*. Parasitol. Res. 95 (1): 61-70.

CRISTOFOL, C; VIRKEL, G; ALVAREZ, L; ARBOIX, M; LANUSSE, C. E. 2000. Comparative disposition of ricobendazole enantiomers after intravenous and subcutaneous administration of a racemic formulation to calves. Biopharm. Drug Dispos. 21: 303-311.

CRISTOFOL, C; VIRKEL, G; ALVAREZ, L; SANCHEZ, S; ARBOIX, M; LANUSSE, C. E. 2001. Albendazole sulphoxide enantiomeric ratios in plasma and target tissues after intravenous administration of ricobendazole to cattle. J. Vet. Pharmacol. Therap. 24: 117-124.

COOK, G. C. 1990. Use of benzimidazole chemotherapy in human helminthiasis: indications and efficacy. Parasitol. Today. 6 (4): 133-136.

CORBA, J; KRUPICER, I; LEGENY, J; STOFFA, P; ANDRASKO, H. 1988. Aldifal (albendazole) a new broad-spectrum anthelmintic for ruminants. Veterinárství. 38 (3) 121-122.

CORBA, J; KRUPICER, I; LEGENY, J; JURIS, P; VESELÝ, L. 1991. Effect of a controlled-released albendazole capsule on parasitism and productivity of sheep. Vet. Parasitol. 40 (3-4): 273-279.

CORBA, J; LEGENY, J; VESELÝ, L. 1992. Comparison of the efficacy of two albendazole preparations on the course of helminthosis and sheep production. Veterinárství. 42 (9): 334-335.

CORBA, J; KRUPICER, I; VARANDY, M; PET'KO, B. 1994. Effect of bolus administration of albendazole into the rumen on gastrointestinal nematodes and the *D.dendriticum* nematode in sheep. Vet. Med. (Praha). 39 (6): 297-304.

COTTING, J; ZEUGIN, T; STEIGER, V; REICHEN, J. 1990. Albendazole kinetic in patients with echinococcosis. Delayed absorption and impaired elimination in cholestasis. Eur. J. Clin. Pharmacol. 38: 605-608.

CURRY, A ; CANNING, E. V. 1993. Human microsporidiosis. J. Infect. 27(3): 229-236.

## D

DELATOUR, P; CURE, M. C; BENOIT, E; GARNIER, F. 1986. Netobimin: preliminary investigations on metabolism and pharmacology. J. Vet. Pharmacol. Ther. 9: 230-234.

- DELATOUR, P; BESSE, S; ROMDANE, M. 1988. Pharmacocinétique et activité microcoeliciae du thiophanate et son metabolite majeur chez les ruminants. Ann. Rech. Vet. 19: 119-122.
- DELATOUR, P Y COL., 1988b. Metabolism, mode of action and pharmacokinetics of anthelmintics for ruminants. Rev. Med. Vet. (Toulouse). 139 (1): 47-52.
- DELATOUR, P; BENOIT, E; LECHENET, J; BESSE, S. 1990. Pharmacokinetics in sheep and cattle of albendazoles administered by intraruminal slow release capsule. Res. Vet. Sci. 48: 271-275.
- DELATOUR, P; BENOIT, E; CAUDE, M; TAMBUTE, A. 1990a. Species differences in the generation of the chiral sulphoxide metabolite of albendazole in sheep and rats. Chirality. 2: 156-160.
- DELATOUR, P; BENOIT, E; GARNIER, F; BESSE, S. 1990b. Chirality of the sulphoxide metabolites of fenbendazole and albendazole in sheep. J. Vet. Pharmacol. Ther. 13: 361-366.
- DELATOUR, P; BENOIT, E; BESSE, S; BOUKRAA, A. 1991b. Comparative enantioselectivity in the sulphoxidation of albendazole in man, dog, rats. Xenobiotica. 21,2: 217-221.
- DELATOUR, P; GARNIER, F; BENOIT, E; CAUDE, I. 1991. Chiral behaviour of the metabolite albendazol sulphoxide in sheep, goats and cattle. Res. Vet. Sci. 50: 134-138.
- DEL BRUTTO, O. H; ROOS, K. L; COFFEY, C. S; GARCIA, H. H. 2006. Meta-analysis: Cysticidal drugs for neurocysticercosis: albendazole and praziquantel. Ann. Intern. Med. 145(1): 43-51.
- DEL ESTAL, J. L.; ALVAREZ, A. I; VILLAVERDE, C; JUSTEL, A; PRIETO, J. G. 1994. Increased systemic bioavailability of albendazole when administered with surfactants in rats. Int. J. Pharmacology. 102 (1-3): 257-260.
- DEL NOZAL, M. J; TORIBIO, L; BERNAL, J. L; NIETO, E. M; JIMENEZ, J. J. 2002. Separation of albendazole sulfoxide enantiomers by chiral supercritical-fluid chromatography. J. Biochem. Biophys Methods. 54(1-3): 339-345.
- DENHAM, D. A; MARTINEZ, A. R. 1970. Studies with methyridine and *Trichinella spiralis*. 2. The use of the drug to study the rate of larval production in mice. J. Helminthol. 44: 357-363.
- DESPOMMIER, D. D. 1973. A circular thermal migration device for the rapid collection of large numbers of intestinal helminths. J. Parasitol. 59 (5): 933-935.
- DESPOMMIER, D. D. 1975 Adaptive changes in muscle fibers infected with *Trichinella spiralis*. J. Parasitol. 74: 477-496.
- DESPOMMIER, D. D; MULLER, M. 1976. The stichosome and its secretion granules in the mature muscle larva of *Trichinella spiralis*. J. Parasitol. 62: 775-785.
- DESPOMMIER, D. D. 1983. Biology. In *Trichinella* and Trichinosis. W.C. Campbell (Ed.) Plenum Press, New York. p: 75-142.
- DESPOMMIER, D. D. 1993. *Trichinella spiralis* and the concept of niche. J. Parasitol. 79 (4): 472-482.

DEROUIN, F ; GANGNEUX, J. P ; 2007. Changing patterns of disease and treatment of opportunistic parasitic infections in patients with AIDS. Curr. Opin. Infect. Dis. 11(6): 711-716.

DIETERICH, D, T ; LEW, E. A; KOTLER, D. P. 1994. Treatment with albendazole for intestinal disease due *Enterozytozoon bieneusi* in patients with AIDS. J. Infect. Dis. 169(1): 178-183.

DORCHIES, P; LAHITTE, J. D. DE; ALZIEU, J. P; POTHIER, F. 1989. Treatment and prevention of helminthoses on sheep by an intrareticular slow-release device containing albendazole. Rev. Méd. Vet. (Toulouse). 138 (2): 101-108.

DORCHIES, P. H. 1990. Les progrès de la chimiothérapie antiparasitaire a la lumière D'ICOPA VII. Conference prononcé lors du Symposium de Parasitologie ARKOVET, CIBA-GEIGY. 2-3 octobre 1990.

DOUCH, P. G. C; BUCHANAN, L. L. 1979. Some properties of the sulphoxidases and sulphoxide reductases of cestode *Moniezia expansa*, the nematode *Ascaris summ* and mouse liver. Xenobiotica. 9: 675-679.

DUCHENE, D; VAUTION, C; GLAMOT, F. 1989. Cyclodextrin, their value in pharmaceutical Technology. Pharmaceutical Technology Drug Stability. (Ed) Ellis Horwood Ltd.

## E

ELLIOT, A. M; KIZZA, M; QUIGLEY, M. A; NDIBAZZA, J; NAMPIJJA, M; MUHANGI, L; MORISON, L; NAMUJU, P. B; MUWANGA, M; KABATEREINE, N; WHITWORTH, J. A. 2007. The impact of helminths on the response to immunization and on the incidence of infection and disease in childhood in Uganda: design of a randomized, double-blind, placebo-controlled, factorial trial of deworming interventions delivered in pregnancy and early childhood [ISRCTN32849447]. Clin. Trials. 4(1): 42-57.

EDWARDS, G; BRECKENRIDGE, A. 1988. Clinical pharmacokinetic of antihelmintic drugs. Clin. Pharmacokinet. 15: 67-93.

EVARD, B; CHIAP, P; PIEL, G; VAN HEES, T; GHALMI, F; LOSSON, B; DELATTRE, L. 1998. Influence of cyclodextrins on the solubility and the pharmacokinetics of albendazole. Ninth International Symposium on Cyclodextrins, Santiago de Compostela, 31 May- 3 Jun. Abstrac 3-P-8.

EVARD, B; CHIAP, P; DE TULLIO, P; GHALMI, F; PIEL, G; VAN HEES, T; CROMMEN, J; LOSSON, B; DELATTRE, L. 2002. Oral bioavailability in sheep of albendazole from a suspension and from a solution containing hydroxypropil-beta-cyclodextrin. J. Control Release. 85(1-3): 45-50.

## F

FARGETTON, X; GALTIER, P; DELATOUR, P. 1986. Sulphoxidation of albendazole by cytochrome p450 independent monooxygenase from rat liver microsomes. Vet. Res. Commun. 10: 314-324.

FERENCZY, T; SZABO, P; SERFEZE, J; STADLER SZOKE, A; SZEJTLI, J. 1982. In International Symposium Cyclodextrin. Szejtli 443. Ed. Rediel Publ. Co. Doerdrecht and Akademiai Kiado, Budapest, Hungary.

FERNANDO, S. SE; DENHAM, D. A. 1976. The effects of mebendazole and fenbendazole against *T.spiralis* in mice. J. Parasitol. 62: 874-876.

FETTERER, R. H; REW, R. S. 1984. Interaction of *Fasciola hepatica* with albendazole and its metabolites. J. Vet. Pharmacol. Ther. 7: 113-118.

FLOHR, C; TUYEN, L. N; LEWIS, S; MINH, T. T; CAMPBELL, J; BRITTON, J; WILLIAMS, H; HIEN, T. T; FARRAR, J; QUINNELL, R. J. 2007. Low efficacy of mebendazole against hookworm in Vietnam: Two randomized controlled trials. Am. J. Trop. Med. Hyg. 76(4): 732-736.

FORMENTINI, E. A; MESTORINO, N; ERRECALDE, J. O. 2005. Pharmacokinetics of ricobendazole after intravenous, intraruminal and subcutaneous administration in sheep. Vet. Res. Commun. 29(7) : 595-608.

FORRESTER, A. T ; NELSON, G. S ; SANDER, G. 1961. The first record of an outbreak of trichinosis in Africa south of the Sahara. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 55: 503- 513.

FOURESTIE, V; BOUGNOUX, M; ANCELLE, T; LIANCE, M; ROUDOUT-THOURAVER, F; NAGA, H; PAIRON PEUNACHIONI, M; RAUSS, A; LEJONC, J. 1988. Randomized trial of albendazole versus thiabendazole plus flubendazole during a outbreak of human Trichinellosis. Parasitol. Res. 75: 36-41.

FRIJLINK, H. W; VISSER, J; DRENTH, B. F. 1987. Determination of cyclodextrin in biological fluids by HPLC with negative colorimetric detection using post-column complexation with phenolphthalein. J. Chromatogr. 415(2): 325-333.

## G

GALTIER, P; ALVINERIE, M; PLUSQUELLEC, Y; TUFENKJI, A. E.; HOUIN, G. 1991. Decrease in albendazole sulphonation during experimental fascioliasis in sheep. Xenobiotica. 21 (7): 917-924.

GALTIER, P. 1991a. Metabolisme des benzimidazoles et activité inductrice enzymatique. Rev. Med. Vet. (Toulouse). 142 (8-9): 633-636.

GALTIER, P; ALVINERIE, M; STEIMER, J; FRANTECHEAU, P; PLUAQUEVEC, Y; HOUIN, G. 1991. Simultaneous pharmacokinetics modeling of a drug and two metabolites. Application to albendazole in sheep. J. Pharm. Scis. 80: 3-10.

GALTIER, P; ALVINERIE, M; DELATOUR, P. 1986. In vitro sulfoxidation of albendazole by ovine liver microsomes: Assay and frequency of various xenobiotics. Am. J. Vet. Res. 46: 447-450.

GARCÍA, J. J; BOLÁS FERNÁNDEZ, F; TORRADO, J. J. 1999. Quantitative determination of albendazole and its main metabolites in plasma. J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 723 (1-2): 265-271.

GARCÍA, J. J; BOLÁS FERNÁNDEZ, F; TORRADO, J. J. 2001. Improving bioavailability and anthelmintic activity of albendazole by preparing albendazole-cyclodextrin complexes. Parasite. (2Suppl): S188-S190.

GARCÍA, J. J; BOLÁS FERNÁNDEZ, F; TORRADO, J. J. 2003. Bioavailability and efficacy characteristics of two different oral liquid formulations of albendazole. Int. J. Pharm. 250: 351-358.

GARCIA-LLAMAZARES, J. L; ALVAREZ DE FELIPE, A. I; REDONDO CARDEÑA, P. A; PRIETO FERNANDEZ, J. G. 1998. Echinococcus granulosus: membrana permeability of secondary hidatid cysts to albendazole sulphoxide. Parasitol. Res. 84(5): 417-420.

- GARDINER, C. H. 1976. Habitat and reproductive behaviour of *Trichinella spiralis*. J. Parasitol. 62 (6): 865-870.
- GAZDER, A. J; ROY, J. 1987. Albendazole suspension in the treatment of intestinal helminthiasis in children. Curr. Ther. Res. Clin. Exp. 41 (3): 324-327.
- GEARY, T. G; BOWMAN, J. W; FRIEDMAN, A. R; MAULE, A. G; DAVIS, J. P; WINTERROWD, C. A; KLEIN, R. D; THOMPSON, D.P. 1995. The pharmacology of FMRamide-related neuropeptides in nematodes: new opportunities for rational anthelmintic discovery. Int. J. Parasitol. 25(11): 1273-1280.
- GHARIZANOVA, T; TORLAKOV, I; ZHELYASKOV, N; TODOROVA, N; SHEIKOV, N. 1972. Antinematodic activity of 2-substituted benzimidazoles. Advance in Antimicrobial and Antineoplastic Chemotherapy. (Ed. M. Hejzlar; M Semonsky; S. Masak) Univ. Park. Press, Baltimore. P: 449-451.
- GIL-GRANDE, , L. A; RODRIGUEZ CAABEIRO, F; PRIETO, J, G; SANCHEZ RUANO, J. J; BRASA, C; AGUILAR, L; GARCIA HOZ, F. 1993. Randomised controlled trial of efficacy of albendazole in intra-abdominal hydatid disease. Lancet. 342 (8882): 1269-72.
- GLEIZES, C; EECKOUTTE, C; PINEUT, T; ALVINERIE, M; GALTIER, P. 1991. Inducing effect of oxfendazole on cytochrome P450IA2 in rabbit liver. Consequences on cytochrome P450 dependent monooxygenases. Biochem. Pharmacol. 41 (12): 1813-1820.
- GLEIZES, C; LARRIEU, C; EECKOUTTE, C; PINEAU, T; GALTIER, P. 1991. Comparative inductibility of cytochrome P450 by oxfendazole and fenbendazole: use primary cultures of rabbit hepatocytes. Acta Vet. Scand. Suppl. 87: 230-232.
- GOKBULUT, C ; CIRAK, V. Y; SENLIK, B. 2006. Plasma disposition and faecal excretion of netobimin metabolites and enantiospecific disposition of albendazole sulphoxide produced in ewes. Vet. Res. Commun. 30(7): 791-805.
- GÓMEZ BARRIO, A. 1985. Susceptibilidad a antihelmínticos de *T.pseudospiralis* y utilidad de *Trichinella* spp. para el cribado *in vitro*. Tesis Doctoral.
- GÓMEZ BARRIO, A; MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. R; SERRADOR REDONDO, M. 1986. Comparative activity of various anthelmintics in relation to the time of muscular infection by *Trichinella pseudospiralis*. Wiad Parazytol. 32 (2): 314-317.
- GÓMEZ BARRIO, A; BOLÁS FERNÁNDEZ, F; MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. R. 1986. Evaluación de un método diseñado para la utilización de *Trichinella* en el cribado farmacológico "in vitro". Rev. Iber. Parasitol. 46 (3): 311-315.
- GOTTSCHALL, D. W; THEODORIDES, V. J; WANG, R. 1990. The metabolism of benzimidazole anthelmintics. Parasitol. Today. 4: 115-124.
- GOTTMANN, H; KROKER, R; UNGEMACH, F. R. 1991. Investigations on the biotransformation of mebendazole using an isolated perfused rat gut system. Xenobiotica. Vol 21, nº 11: 1431-1439.
- GOULD, S. E. 1970. In Trichinellosis in man and animals. S. E. Gould (ed) Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Illinois, p: 147-189.
- GOLDSMITH, R.S. 1988. Recent advances in the treatment of helminthic infections: ivermectin, albendazole and praziquantel. Parasitic infections, Churchill Livingstone, New York. pp: 327-347.

GRAHAM, J. Y. 1897. Beiträge zur Naturgeschichte der *Trichina spiralis*. Arch. Mikrosk. Anat. 50: 219-275.

GUNDLACH, J. L; UCHACZ, S; SADZIKOWSKI, A; TAMCZUK, K. 1991. Albendazole and luxabendazole, broad spectrum benzimidazole derivatives for treatment of helminthoses in ruminants. Med. Weterynaryjna. 47 (8): 364-365.

GUTIERREZ PALOMINO, P; HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, S; MARTÍNEZ GÓMEZ, F; ACOSTA GARCÍA, I. 1988. Muscular phase of *T.spiralis* treated with oxfendazole. Proceeding of the seventh International Conference on Trichinellosis. Spain: 490-493.

GYURIK, R. J; CHOW, A. W; ZABER, B; BRUNER, E. L; MILLER, J.A; VILLANI, A. J; PETKA, L. A; PARISH, R. C. 1981. Metabolism of albendazole in cattle, sheep, rats and mice. Drug Met. Disp. 9: 503-508.

## H

HAJJAR, N. P; HODGSON, E. 1980. Flavine adenine dinucleotide dependent monooxygenase: its role in the sulphoxidation of pesticides in mammals. Science. 209: 1134-1136.

HARLEY, J. P; GALLICHICO, V. 1971. *Trichinella spiralis*: Migration of larvae in the rat. Experientia. 30: 11-12.

HAQUE, A; HOLLISTER, W. S; WILLCOX, A; CANNING, E. . 1993. The antimicrosporidial activity of albendazole. J. Invertebr. Pathol. 62(2): 171-177.

HE, W; NIU, B. H; DOU, L. Q; ZHANG, L; SUN, X. Q. 1986. Efficacy of some chemicals (albendazole, etc.) against larvae of *Trichinella spiralis* and their toxicity in artificially infected rats. J. Vet. Sci. 1: 16-21.

HENNESY, D. R; LACEY, E; PRICHARD, R. K; STEEL, J. V. 1985. Potentiation of the anthelmintic activity of oxfendazole by parbendazole. J. Vet. Pharmacol. Ther. 8 (3): 270-5.

HENNESY, D. R; LACEY, E; PRICHARD, R. K; STEEL, J. V. 1987. The kinetics of triclabendazole disposition in sheep. J. Vet. Pharmacol. Ther. 10: 64-72.

HENNESY, D. R; STEEL, J. V; LACEY, E; EAGLESON, G. K; PRICHARD, R. K. 1989. The disposition of albendazole in sheep. J. Vet. Pharmacol. Ther. 12: 421-429.

HOMEIDA, M; LEAHY, W; COPELAND, S; ALI, M. M; HARRON, D. W. 1994. Pharmacokinetic interaction between praziquantel and albendazole in Sudanese men. Ann. Trop. Med. Parasitol. 88 (5): 551-559.

HRCKOVA, G; VELEBNY, S; HORAK, J. 1993. A morphological study of effects of liposomized albendazole on the muscle phase of *T.spiralis* in mice. J. Helminthol. 67: 24-30.

HRCKOVA, G; VELEBNY, S. 1994. Studies on the effects of free and liposomized albendazole on infections of *Mesocestoide corti tetrahyridia* (cestoda: Cyclophyllidea) in laboratory mice. Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 107 (1): 71-77.

HUGHES, W. L; HARLEY, J. P. 1977. *Trichinella spiralis*: Taxes of first stage migratory larvae. Exp. Parasitol. 42: 363-373.

## J

JACOBS, C; KAYSER, O; MULLER, R.H. 2000. Nanosuspensions as a new approach for the formulation for the poorly soluble drug tarazepide. Int. J. Pharm. 196 (2): 161-164.

JIMÉNEZ GONZÁLEZ, A; DE ARMAS SERRA, C; CRIADO FORNELIO, A; CASADO ESCRIBANO, N; RODRIGUEZ CAABEIRO, F; DÍEZ, J. C. 1991. Preliminary characterization and interaction of tubulin from *Trichinella spiralis* larvae with benzimidazole derivates. Vet. Parasitol. 39: 89-99.

JUNG, H; HURTADO, M; SÁNCHEZ, M; MEDINA, M. T; SOTELO, J. 1992. Clinical pharmacokinetics of albendazole in patients with brain cysticercosis. J. Clin. Pharmacol. 32 (1): 28-31.

JUNG, H; MEDINA, L; GARCIA, L; FUENTES, I; MORENO ESPARZA, R. 1998. Absorption studies of albendazole and some physicochemical properties of the drug and its metabolito albendazol sulphoxide. J. Pharm. Pharmacol. 50: 43-48.

JUSTEL, A; ALVAREZ, A. J; ALONSO, M. L; ESTAL-DEL, J. L; VILLAVARDE, C; BARRIO, J. P; PRIETO, J. G. 1994. Influence of ethanol on gastric absorption and metabolism of albendazole and mebendazole. Drug Alcohol. Dep. 36 (1): 49-55.

## K

KABATEREINE, N. B; BROOKER, S; KOUKOUNARI, A; KAZIBWE, F; TUKAHEBWA, E. M; FLEMING, F. M; SHANG, Y; WEBSTER, J. P; STOTHARD, J. R; FENWICK, A. 2007. Impact of a national helminth control programme on infection and morbidity in Ugandan schoolchildren. Bull. World Health Organ. 85(2): 91-99.

KALAISELVAN, R; MOHANTA, G. P; MANNA, P. K; MANALAVAN, R. 2006. Inhibition of albendazole crystallization in poly(vinylpyrrolidone) solid molecular dispersions. Pharmazie. 61(7): 618-624.

KAMAL, D; DEHLAWI, M. S; BRUNET, L. R; WAKELIN, D. 2002. Paneth and intermediate cell hyperplasia induced in mice by helminths infections. Parasitology. 125(Pt 3): 275-281.

KARUNAKARAN, C. S; DENHAM, D. A. 1980. A comparison of the anthelmintic effects of oxfendazole and oxbendazole on *Trichinella spiralis* in mice. J. Parasitol. 66 (6): 929-932.

KEITTIVUTY, A; KEITTIVUTY, B. 1989. Anthelmintic effects of albendazole, mebendazole and diethylcarbamazine on *Trichinella spiralis* in mice. J. Sci. Soc. Thailand. 15: 49-54.

KENNEDY, M. W. 1978. Kinetics of establishment, distribution and expulsion of the enteral phase of *Trichinella spiralis* in the NIH strain of mouse, in: *Trichinellosis* (C. Kim and Z. Pawlowski, eds.), University Press of New England, Hanover, New Hampshire. pp. 193-205.

KHOLER Y BACHMANN. 1981. Intestinal tubulin as possible target for chemotherapeutic action of mebendazol in parasitic nematodes. Mol. Biochem. Parasitol. 4: 325-336.

KOLOSOVA, M. O; OZERETSKOSKAYA, N. N; PEREVERZEVA, E. V. 1976. A new class of active trichinellicides. In Mat. Dokl. Iloi vsesoy. Konf. Po. Probl. Trikhinelleza. Cheloveka i zhivotnykh. (17-18 Maya).

- KOZEK, W. J. 1971a. The molting pattern in *Trichinella spiralis* I. A light microscope study. J. Parasitol. 57: 1015-1028.
- KOZEK, W. J. 1971b. The molting pattern in *Trichinella spiralis* II. An electron microscopy study. J. Parasitol. 57: 1029-1038.
- KOZEK, W. J. 1975. *Trichinella spiralis*: Morphological characteristics of male and female intestine-infecting larvae. Exp. Parasitol. 37: 380-387.
- KRISTEK, J; MARJANOVIC, K; DMITROVIC, B; KRAJINOVIC, Z; SAKIC, K. 2005. *Trichinella spiralis* and breast carcinoma: a case report. Coll. Antropol. 29(2): 775-777.
- KUMAR, A; LAL, B. K; CHATTOPADHYAY, T. K. 1993. Hydatid disease of the liver – non surgical options. J. Assoc. Physicians India. 41(7): 437-438.
- KWAN, L. C; GYURIK, R. J; CHIMES, N; RITCH, G. M; THEODORIDES, V. J. 1988. Influence of dosing regimens on the anthelmintic activity of albendazole in sheep. J. Control. Release. P: 33-38.
- L**
- LA ROSA, G; POZIO, E; ROSSI, P; MURREL, K. D. 1992. Allozyme análisis of *Trichinella* isolates from various hosts species and geographical regions. J. Parasitol. 78: 641-646.
- LATIF-LA; SURIN, J. 1993. Relationship between the anthelmintic activity of eight derivates of benzimidazole carbamates against *Trichinella spiralis* and their chemical structure. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 46 (5-6): 203-214.
- LACEY, E. 1988. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. Int. J. Parasitol. 18 (7): 805-893.
- LACEY, E. 1990. Mode of action of benzimidazoles. Parasitol. Today. 6: 112-115.
- LANCHOTE, V. L; TAKAYANAGUI, O. M; MATEUS, F. H. 2004. Enantioselective renal excretion of albendazole metabolites in patients with neurocysticercosis. Chirality. 16(8): 520-525.
- LANGE, H; EGGERS, R; BIRCHER, J. 1988. Increased systemic availability of albendazole when taken with a fatty meal. Eur. J. Clin. Pharmacol. 34: 315-317.
- LANUSSE, C. E; RANJAN, S; PRICHARD, R. K. 1990. Comparison of pharmacokinetic variables for two injectable formulations of netobimin administered to calves. Am. J. Vet. Res. 51 (9): 1459-1463.
- LANUSSE, C. E; TRUDEAU, C; RANJAN, S; PRICHARD, R. K. 1991. Pharmacokinetic profiles of netobimin metabolites after oral administration of zwitterion and trisamine formulations of netobimin to cattle. J. Vet. Pharmacol. Ther. 14: 101-108.
- LANUSSE, C. E; NARE, B; GASCON, H; PRICHARD, R. K. 1992. Metabolism of albendazole sulphoxide by rumial and intestinal fluids of sheep and cattle. Xenobiotica. 4: 419-426.

LANUSSE, C. E; NARE, B; PRICHARD, R. K. 1993. Comparative sulphoxidation of albendazole by sheep and cattle liver microsomes and the inhibitory effect of methimazole. Xenobiotica, 23 (3): 285-295.

LANUSSE, C. E; PRICHARD, R. K. 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. Vet. Parasitol. 49: 123-158.

LANUSSE, C. E; PRICHARD, R. K. 1993a. Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants. Drug. Metab. Rev. 25 (3): 235-279.

LATHAM, M. C; STEPHENSON, L. S; ELLIOT, T. C; HALL, A; CROMPTON, D. W. 1983. Nutritional status, parasitic infections and health of road workers in 4 areas of Kenya. I Trans. R. Soc. Trop. Hyg. 77(1): 41-48; II, III, IV East Afric. Med. J. 60(2): 75-80; 60(4): 221-227; 60(5): 282-289.

LEONARD, A. B; BEAHM, E. H. 1941. Studies on the distribution of *Trichinella* larvae in the albino rat. Trans. Kans. Acad. Sci. 44: 419-433.

LIGHT, D. R; WAXMAN, D. J; WALSH, C. 1982. Studies on chirality sulfoxidations monooxygenase and hog liver FAD-containing monooxygenase. Biochemistry, 21: 2490-2498.

LOPEZ GARCÍA, M. L. 1996. Potenciación de la actividad antihelmíntica del albendazol mediante modificaciones en su biodisponibilidad y metabolismo. Tesis Doctoral.

LOPEZ GARCÍA, M. L; TORRADO, S; TORRADO, S; MARTÍNEZ, A. R; BOLÁS, F. 1997. Improvement of albendazole efficacy against enteral, but not parenteral stages of *Trichinella spiralis* by preparing solid dispersions in polyvinylpyrrolidone. Chemotherapy, 43 (6): 430-435.

LOPEZ GARCÍA, M. L; TORRADO DURAN, S; TORRADO DURAN, J; MARTÍNEZ FERNANDEZ, A. R; BOLÁS FERNANDEZ, F. 1997. Albendazole versus ricobendazole (albendazole sulphoxide) against enteral and parenteral stages of *Trichinella spiralis* in mice. Int. J. Parasitol. 27: 781-785.

LOPEZ GARCÍA, M. L; TORRADO, S; TORRADO, S; MARTÍNEZ, A. R; BOLÁS, F. 1998. Methimazole-mediated enhancement of albendazole oral bioavailability and anthelmintic effects against parenteral stages of *Trichinella spiralis* in mice: the influence of the dose-regime. Vet. Parasitol. 75 (2-3): 209-219.

LUBEGA, G; PRICHARD, R. K. 1991. Interaction of benzimidazole anthelmintics with *H. contortus* tubulin: binding affinity and anthelmintic efficacy. Exp. Parasitol. 73: 203-213.

## M

MACDONALD, L. M; ARMSON, A; THOMPSON, A. R; REYNOLDS, J. A. 2004. Characterisation of benzimidazole binding with recombinant tubulin from *Giardia duodenalis*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Cryptosporidium parvum*. Mol. Biochem. Parasitol. 138(1): 89-96.

MALKIN, M. F; CAMACHO, R. M. 1972. The effect of thiabendazole on fumarate reductase from thiabendazole-sensitive and resistance *Haemonchus contortus*. J. Parasitol. 58: 845-846.

- MARRINER, S. E.; MORRIS, D. L; DICKSON, B; BOGAN, J. A. 1986. Pharmacokinetics of albendazole in man. Europ. J. Clin. Pharmacol. 30: 705-708.
- MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. R. 1978. Algunos efectos de los corticosteroides sobre el ciclo endógeno de *Trichinella spiralis*. Trab. Comp. Biol. 7: 181-219.
- MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. R; BOLÁS FERNÁNDEZ, F; GARATE ORMAECHEA, T. 1982. The influence of adoptive immunity on the action of mebendazole against encysted larvae of *Trichinella spiralis*. Rev. Iber. Parasitol. Spec Vol: 389-396.
- MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. R. 1979. Tratamiento de la triquinosis experimental. Efecto límite del mebendazol contra larvas enquistadas. Rev. Iber. Parasitol. 39 (1-4): 305-312.
- MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. R; MARTÍNEZ GRUEIRO, M; ALBARRÁN GÓMEZ, E; CADORNIGA CARRO, R; FERNÁNDEZ SÁNCHEZ, C. 1990. Actividad antihelmíntica de una nueva formulación de mebendazol. Rev. Iber. Parasitol. 50: 353-358.
- MAVROVA, A. T; ANICHINA, K. K ; VUCHEV, D. I ; TSENOV, J. A ; DENKOVA, P. S; KONDEVA, M. S; MICHEVA, M. K. 2006. Antihelminthic activity of some newly synthesized 5(6)-(un)substituted-1H-benzimidazol-2-ylthioacetyl piperazine derivatives. Eur. J. Med. Chem. 41(12): 1412-1420.
- MCCRACKEN, R. O; 1978. Efficacy of mebendazole and albendazole against *Trichinella spiralis* in mice. J. Parasitol. 64 (2): 214-219.
- MCCRACKEN, R. O; LIPKOWITZ, K. B. 1990. Structure activity relationship of benzothiazole and benzimidazole anthelmintics: a molecular modeling approach to *in vivo* drug efficacy. J. Parasitol. 853-864.
- MCCRACKEN, R. O; STILLWELL, W. H. 1991. A possible biochemical mode of action for benzimidazole anthelmintics. Int. J. Parasitol. 21 (1): 99-104.
- McKELLAR, Q. A; SCOTT, E. W. 1990. The benzimidazole anthelmintic agents – review. J. Vet. Pharmacol. Ther. 13: 223-247.
- MERINO, G; JONKER, J. W; WAGENAAR, E; PULIDO, M. M; MOLINA, A. J; ALVAREZ, A. I; SCHINKEL, A. H. 2005. Transport of anthelmintic benzimidazole drugs by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). Drug. Metab. Dispos. 33(5): 614-618.
- MERINO, G; MOLINA, A. J; GARCIA, J. L; PULIOD, M. M; PRIETO, J. G; ALVAREZ, A. I. 2003. Intestinal elimination of albendazole sulfoxide: pharmacokinetic effects of inhibitors. Int. J. Pharm. 263(1-2): 123-132.
- MOLINA, A. J; MERINO, G; PRIETO, J. G; REAL, R; MENDOZA, G; ALVAREZ, A. I. 2007. Absorption and metabolism of albendazole alter intestinal ischemia/reperfusion. Eur. J. Pharm. Sci. 31(1): 16-24.
- MORENO, L; ECHEVARRIA, F; MUÑOZ, F; ALVAREZ, L; SANCHEZ BRUNI, S; LANUSSE, C. 2004. Dose-dependent activity of albendazole against benzimidazole-resistant nematodes in sheep: relationship between pharmacokinetics and efficacy. Exp. Parasitol. 106 (3-4): 150-157.

MOTTIER, M. L; ALVAREZ, L. I; PIS, M. A; LANUSSE, C. E. 2003. Transtegumental diffusion of benzimidazole anthelmintics into *Moniezia benedeti*: correlation with their octanol-water partition coefficients. Exp. Parasitol. 103(1-2): 1-7.

MOTTIER, L; ALVAREZ, L; CEBALLOS, L; LANUSSE, C. 2006. Drug transport mechanisms in helminth parasites: Passive difusión of benzimidazole anthelmintics. Exp. Parasitol. 113: 49-57.

MORRIS, D. L; JOURDAN, J. L ; POURGHOLAMI, M. H. 2001. Pilot study of albedazole in patients with advanced malignant cancer. Effect on serum tumor markers/high incidence of neutropenia. Oncology. 61(1): 42-46.

MURRAY, M; ALISON, M; YASSA, V. 1992. Hepatic microsomal metabolism of the anthelmintic benzimidazole fenbendazole: Enhanced inhibition of cytochrome P450 reactions by oxidized metabolites of the drug. Chem. Res. Toxicol. 5 (1): 60-66.

MURRELL, K. D; POZIO, E. 2000. Trichinellosis: The zoonosis that won't go quietly. Int. J. Parasitol. 30 (2000): 1339-1349.

## N

NA-BANGCHANG, K; KIETINUM, S; PAWA, K. K; HANPITALPONG, W; NA-BANGCHANG, C; LAZDINS, J. 2006. Assesments of pharmacokinetic drug interactions and tolerability of albendazole, praziquantel and ivermectin combinations. Trans R Soc Trop Med Hyg. 100(4): 335-345.

NELSON, G. S; BLACKIE, E. J; MUKUNDI, S. 1966. Comparative studies of geographical strains of *Trichinella spiralis*. Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg. 60: 471-480.

NEW, R. R. C; WEN, H; CRAIG, P. S; ZOU, P. F; MERDAN, A; SANG, Y. H. 1994. Efficacy of albendazole administered orally is improves by encapsulation liposomes. J. Control. Release. 28 (1-3): 350-351.

NOBILIS, M; JIRA, T; LISA, M; HOLCAPEK, M; SZOTAKOVA, B; LAMKA, J; SKALOVA, L. 2007. Achiral and chiral high-performance liquid chromatographic determination of flubendazole and its metabolites in biomatrices using UV photodiode-array and mass spectrometric detection. J. Chromatogr. A. 1149(1): 112-120.

## O

OLIVER, V. L. 1961. The distribution of trichinae larvae in the muscles of experimentally infected rats. Dissertation, University of Alabama. 56 pp.

OLSEN, B. S; VILLELLA, J. B; GOULD, S. E. 1964. Distribution of *Trichinella spiralis* in muscle of experimentally infected swine. J. Parasitol. 50: 489-495.

OZERETSKOVSKAJA, N. N; CHERNYAEVA, A. I; KOLOSOVA, M. D. 1971. Search for the specific therapy for trichinellosis in white mice. V. Cholo phenil derivatives of benzimidazoles in experimental trichinellosis in white mice. Med. Par. i Paraz. Bolez. 40: 411-414.

## P

- PALOMARES ALONSO, F; PILIADO, J. C; PALENCIA, G; ORTIZ PLATA, A; JUNG COOK, H. 2007. Efficacy of nitazoxanide, tizoxanide and tizoxanide/albendazole sulphoxide combination against *Taenia crassiceps* cysts. J. Antimicrob. Chemother. 59(2): 212-218.
- PEREZ SERRANO, J; CASADO, N; DENEGRI, G; RODRÍGUEZ CAABEIRO, F. 1994. The effects of albendazol and albendazol sulphoxido combination therapy on *Echinococcus granulosus in vitro*. Int. J. Parasitol. 24 (2): 219-224.
- PERRIN, H. J; FIELD, F. P; HANSEN, D. A; MUFSEN, R. A; TERESIAN, G. 1978. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharm. 19: 373.
- PIER, G; EVRARD, B; VAN-HEES, T; LLABRES, G, DELATTRE, L. 1999. Development of a parenteral and of an oral formulation of albendazole with cyclodextrins. Stp. Pharma. Sci. 9 (3): 257-260.
- PLA DELFINA, J. M; DEL POZO OJEDA, A. 1982. Manual de Iniciación a la Biofarmacia (Farmacocinética aplicada). Ed. Facultad de Farmacia. Barcelona.
- POURGHOLAMI, M. H; AKHTER, J; WOON, L; BOLTON, E; MORRIS, D. L. 2000. In vitro inhibition of human liver cancer cells by albendazole. Proceeding of the American Association for Cancer Research Annual Meeting. Vol 41: 656.
- POURGHOLAMI, M. H; WOON, L; ALMAJD, R; AKHTER, J; BOWERY, P; MORRIS, D. L. 2001. *In vitro* and *in vivo* suppression of growth of hepatocellular carcinoma cells by albendazole. Cancer Lett. 165(1): 43-49
- POURGHOLAMI, M. H; YAN CAI, Z; LU, Y; WANG, L; MORRIS, D. L. 2006. Albendazole : a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor and malignant ascites formation in OVCAR-3 tumor-bearing nude mice. Clin. Cancer Res. 12(6): 1928-1935.
- PRIETO, J. G; ALONSO, M. L; JUSTEL, A; SANTOS, L. 1988. Tissue levels of albendazole after *in vivo* intestinal and gastric absorption in rats. J. Pharm. Biomed. Anal. 6 (6-8): 1059-1063.
- PRIETO, J. G; JUSTEL, A; DEL ESTAL, J. L; BARRIO, J. P; ALVAREZ. 1991. Comparative study on gastric absorption of albendazole and mebendazole in rats. Comp. Biochem. Physiol. 100 (3): 397-400.
- PRICHARD, R. K. 1986. The pharmacology of anthelmintics in livestock. Int. J. Parasitol. 17: 473-482.
- PRICHARD, R. K. 1973. The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics. Int. J. Parasitol. 3: 409-417.
- PURKENSON, M; DESPOMMIER, D. D. 1974. Fine structure of the muscle phase of *Trichinella spiralis* in the mouse. Trichinellosis. (Ed. C. W. Kim), Intext, New York, p: 7-23.

**R**

- RAHMAN, M.S; BRYANT C. 1977. Studies of regulatorie metabolism in *Moniezia expansa*: effects of cambendazole and mebendazole. Int. J. Parasitol. 7: 403-409
- RAMIREZ, T; EASTMOND, D. A; HERRERA, L. A. 2007. Non-disjunction events induced by albendazole in human cells. Mutat. Res. 626(1-2): 191-195.

RAWDEN, H. C; KOKWARO, G. O; WARD, S. A; EDWARDS, G. 2000. Relative contribution of cytochromes P450 and flavin-containing monooxygenases to the metabolism of albendazole by human liver microsomes. Br. J. Clin. Pharmacol. 49 (4): 313-322.

REDONDO, P. A; ALVAREZ, A. I; GARCÍA, J. L; VILLAVERDE, C; PRIETO, J. G. 1998. Influence of surfactants on oral bioavailability of albendazole based on the formation of the sulphoxide metabolites in rats. Biopharm. Drug Dispos. 19: 65-70.

REDONDO, P. A; ALVAREZ, A. I; GARCÍA, J. L; LARRODE, O. M; MERINO, G; PRIETO, J. G. 1999. Presystemic metabolism of albendazole: experimental evidence of an efflux process of albendazole sulfoxide to intestinal lumen. Drug Metab. Dispos. 53 (7): 1582-1584.

RIGTER, I. M; SCHIPPER, H. G; KOOPMANS, R. P; VAN KAN, H. J; FRIJLINK, H. W; KAGER, P. A; GUCHELAAR, H. J. 2004. Relative bioavailability of three newly developed albendazole formulations: a randomized crossover study with healthy volunteers. Antimicrob. Agents Chemother. 48(3): 1051-1054.

ROBINSON, M. W; MCFERRAN, N; TRUDGETT, A; HOEY, L; FAIRWEATHER, I. 2004. A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. J. Mol. Graph. Model. 23(3): 275-284.

RODRIGES, J. M; BORIES, C; EMERY, I; FESSI, H. 1995. Development of an injectable formulation of albendazole and *in vivo* evaluation of its efficacy against *Echinococcus multilocularis*. Metacestode. Int. J. Parasitol. 25 (12): 1437-1441.

RODRÍGUEZ CAABEIRO, F; CRIADO, A; JIMÉNEZ, A; ESTEPA, E. 1985. Succinate dehydrogenase and fumarate reductase activity in *Trichinella spiralis* and the mode of action of some anthelmintics. Wiad. Parazytol. 31 (3): 253-256.

RODRÍGUEZ CAABEIRO, F; CRIADO FORNELIO, A; JIMÉNEZ GONZÁLEZ, A. 1985. A comparative study of succinate dehydrogenase fumarate reductase complex in the genus *Trichinella*. Parasitology. 91: 577-583.

ROMANOWSKI, R. D; RHOADS, M. L; COLGLAZIER, M. L; KATES, K. C. 1975. Effects of cambendazole, thiabendazole and levamisole on fumarate reductase in cambendazole-resistant and sensitive strains of *Haemonchus contortus*. J. Parasitol. 61: 777-778.

RUITENBERG, E. J; ELGERSMA, A; KRUIZINGA, W; LEENSTRA, F. 1977. *Trichinella spiralis* infection in congenitally athymic (nude) mice. Inmunology. 33: 581-587.

## S

SANCHEZ, M; SUASTEGUI, R; GONZALEZ ESQUIVEL, D; SOTELO, J; JUNG, H. 1993. Pharmacokinetic comparison of two albendazole dosage regimens in patients with neurocysticercosis. Clin. Neuropharmacol. 16(1): 77-82.

SANCHEZ, S; SALLOVITZ, J; SAVIO, E; MCKELLAR, Q; LANUSSE, C. 2000. Comparative availability of two oral dosage forms of albendazole in dogs. Vet. J. 160(2): 153-156.

SANMARTIN DURAN, M. L. 1979. Respuesta macrofágica post-tratamiento con mebendazol. Acción sobre la misma de inmunomodificantes. Rev. Iber. Parasitol. 39 (1-4): 625-636.

- SANMARTIN DURAN, M. L.; MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. R.; TORO ROJAS, M.; RODRIGUEZ CAABEIRO, F. 1980. Acción del mebendazol sobre larvas enquistadas de *Trichinella spiralis*. I evolución histopatológica. Rev. Iber. Parasitol. 40(1): 27-47.
- SANMARTIN DURAN, M. L.; MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. R.; RODRIGUEZ CAABEIRO, F. 1980. Correlation between *Trichinella* spp. self cure and peritoneal cells in experimentally infected mice. In Trichinellosis. (ICT5) (Ed. Kim, C. W; Ruitenberg, E. J; Teppema, J). Noordisk Zee. The Netherlands. 123-128.
- SCHWAB, A. E; CHURCHER, T. S; SCHWAB, A. J; BANASEZ, M. G; RPICHARD, R. K. 2007. An analysis of the population genetics of potential multi-drug resistance in *Wuchereria bancrofti* due to combination chemotherapy. Parasitology. 134(Pt. 7): 1025-1040.
- SHANTA, C. S; MEEROVITCH, E. 1967. The life cycle of *Trichinella spiralis* I. The intestinal phase of development. Can. J. Zool. 45: 1255-1260.
- SKALOVA, L; KRIZOVA, V; CVILINK, V; SZOTAKOVA, B; STORKANOVA, L; VELIK, J; LAMKA, J. 2007. Mouflon (*Ovis musimon*) dicrocoeliosis: Effects of parasitosis on the activities of biotransformation enzymes and albendazole metabolism in liver. Vet. Parasitol. 146(3-4): 254-262.
- SOLANA, H. D; SALLOVITZ, J. M; NAJLE, R; RODRÍGUEZ, J. A; LANUSSE, C. E. 2000. Liver sulphoxidative metabolism of albendazole in rat: Enantioselectivity and effect of methimazole. Methods find Exp. Clin. Pharmacol. 22 (2): 83-88.
- SOLANA, H. D; RODRIGUEZ, J. A; LANUSSE, C. 2001. Comparative metabolismo f albendazole and albendazole sulphoxide by different helminto parasites. Parasitol. Res. 87: 275-280.
- SOLANA, H. D; SALLOVITZ, J. M; RODRIGUEZ, J. A; LANUSSE, C. 2002. Enantioselective binding of albendazole sulphoxide to cytosolic proteins from helminto parasites. Methods Find Exp. Clin. Pharmacol. 24(1): 7-13.
- SOUHAILI-EL-AMRI, H; FARGETTON, X; DELATOUR, P. 1987. Sulphoxidation of albendazole by FAD-containing and cytochrome P450 dependent monooxygenase from pig liver microsomes. Xenobiotica. 17: 1159-1168.
- SOUHAILI-EL-AMRI, H; MOTHE, O; TOTIS, M; MASSON, C; BATT, A; DELATOUR, P; SIEST, G. 1988. Albendazol sulfonation by rat liver cytochrome P450c. J. Pharmacol. Exp. Ther. 246: 758-764.
- SOUHAILI-EL-AMRI, H; FARGETTON, X; BENOIT, E; TOTIS, M. 1988. Inducing effect of albendazole on rat-liver drug-metabolizing enzymes and metabolite pharmacokinetics. Toxicol. Appl. Pharmacol. 92 (1): 141-149.
- SPALDOVA, R; CORBA, J. 1979. Relationship between the antitrichinellous effect of seven derivates of benzimidazole carbamates and their chemical structure. Folia Parasitol. 26 (2): 145-149.
- SPALDOVA, R. 1981. Efficacy of febantel on *Trichinella spiralis* larvae in white mice. In Trichinellosis. (Ed. C. W. Kim; E. J. Ruitenberg; J. S. Teppema) Reedbooks Ltd. Surrey, UK. p: 323-325.
- STADLER SZOKE, A; SZEJTLI, J. 1982. A forecast for application of cyclodextrin in the Pharma. Industry. (Ed) Reidel Publ. Co. Doerdrecht and Akademiai Kiado, Budapest, Hungary.

STAUBLI, C. 1905. Klinische und experimentelle Untersuchungen über Trichinosis. Verh. Kongress. Med. (Wiesbaden). 22: 353-362.

STEIGER, V; COTING, J; REICHEN, J. 1990. Albendazole treatment of echinococcosis in humans: effects on microsomal metabolism and drug tolerance. Clin. Pharmacol. Ther. 47: 347-353.

STEPHENSON, L. S; LATHAM, M. C; KURZ, K. M; KINOTI, S. N. 1989. Single dose metrifonate or praziquantel treatment in Kenya children II. Effects on growth in relation to *Schistosoma haematobium* and hookworm egg count. Am. J. Trop. Med. Hyg. 41(4): 445-453.

STEWART, G. L; CHARNIGA, L. M. 1980. Distribution of *Trichinella spiralis* in muscles of the mouse. J. Parasitol. 66: 688-689.

STOLL, N. R. 1947. This wormy world. J. Parasitol. 33: 1-18.

SURI, W; KALRA, V. 1994. Neurocysticercosis. Med. J. Aust. 160(4): 231-232.

SZEJTLI, J. 1982. Cyclodextrin and their inclusion complexes. Akademiai kiado. Budapest.

SZEJTLI, J; SZENTE, L; DARIEL, A; VIRAG, S; SEBASTYEN, G; MANDI, L. 1978. Hung. Patent. 176215.

SZEJTLI, J; SEBASTYEN, G. 1979. Resorption, metabolism and toxicity studies on the peroral application of beta-cyclodextrin. Starch. 31: 385-389.

## T

TANG, Y. H; PRICHARD, R. K. 1988 a. Scanning electron microscopic observation on the effects of pyquiton and microscopic observation on the tegument of *Clonorchis sinensis*. J. Parasitol. 6(2): 123-125.

TANG Y. H; PRICHARD, R. K. 1989. Characterization of tubulin from *Brugia malayi* and *Brugia pahangi*. Mol. Biochem. Parasitol. 32: 145-152.

THOMPSON, R. 1999. Looking for the next millenium. Parasitol. Today. 15: 320-325.

THORNBURY, F. J. 1897. The pathology of trichinosis: Original observation. Univ. Med. Mag. 10: 64-79.

TOKUMURA, T; NANBA, M; TSUSHIMA, Y; TATSUIISHI, K; KAYANO, M; MACHIDA, Y; NAGAI, T. 1986. Enhancement of bioavailability of cinnarizine from its beta-cyclodextrin complex on oral administration with DL-phenylalanine as a competing agent. J. Pharm. Sci. 75(4): 391-394.

TORRADO DURAN, S. 1994. Estudio farmacéutico de nuevas formulaciones Galénicas de albendazol. Tesis Doctoral.

TORRADO, S; TORRADO, S; CADORNIGA, R; TORRADO, J. J. 1996<sup>a</sup>. Formulation parameters of albendazole solution. Int. J. Pharm. 140: 45-50.

TORRADO, S; TORRADO, S; TORRADO, J. J; CADORNIGA, R. 1996<sup>b</sup>. Preparation, dissolution and characterization of albendazole solid dispersions. Int. J. Pharm. 140: 247-250.

TORRADO, S; LOPEZ, M. L; TORRAGO, G; BOLAS, F; TORRADO, S; CADORNIGA, R. 1997. A novel formulation of albendazole solution: oral bioavailability and efficacy evaluation. Int. J. Pharm. 156: 181-187.

TORRES ACOSTA, J. F; DZUL CANCHE, U; AGUILAR CABALLERO, A. J; RODRIGUEZ VIVAS, R. I. 2003. Vet. Parasitol. 114(1): 33-42.

TORRES LABANDEIRA, J. J; DAVIGNON, P; PITHA, J. 1991. Oversaturated solutions of drug in hydroxypropylcyclodextrins: parenteral preparation of pancratistatin. J. Pharm. Sci. 80(4): 384-386.

## V

VELEBNÝ, S; TOMASOVICOVÁ, R; STPCZYNSKA, S. 1992a. Pharmacokinetics of <sup>3</sup>H-cambendazole in mice in the course of experimental trichinellosis. Helminthologia. 29: 207-210.

VELEBNÝ, S; TOMASOVICOVÁ, R; STPCZYNSKA, S. 1992b. Comparative pharmacokinetics of fenbendazole and cambendazole in the course of the intestinal phase of trichinellosis in mice. Helminthologia. 29: 79-81.

VIGNATI, L; TURLIZZI, E; MONACI, S; GROSSI, P; KANTER, R; MONSHOUWER, M. 2005. An in vitro approach to detect metabolite toxicity due to CYP3A4-dependent bioactivation of xenobiotics. Toxicology. 216(2-3): 154-167.

VILLELLA, J. B. 1958. Observations on the time and number of molts in the intestinal phase of *Trichinella spiralis*. J. Parasitol. 44: 41.

VIRKEL, G; LIFSCHITZ, A; SORACI, A; SANSINANEA, A; LANUSSE, C. 2000. Enantioselective liver microsomal sulfoxidation of albendazole in cattle: Effect of nutritional status. Xenobiotica. 30 (4): 381-393.

VIRKEL, G; IMPERIALE, F; LIFSCHITZ, A; PIS, A; ALVAREZ, A; MERINO, G; PRIETO, J; LANUSSE, C. 2003. Effect of amphiphilic surfactant agents on the gastrointestinal absorption of albendazole in cattle. Biopharm. Drug Dispos. 24(3): 95-103.

VIRKEL, G; LIFSCHITZ, A; SALLOVITZ, J; PIS, A; LANUSSE, C. 2004. Comparative hepatic and extrahepatic enantioselective sulfoxidation of albendazole and fenbendazole in sheep and cattle. Drug Metab. Dispos. 32(5): 536-544.

## W

WAGHORN, T. S; LEATHWICK, D. M; RHODES, A. P; JACKSON, R; POMROY, W. E; WEST, D. M; MOFFAT, J. R. 2006. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep farms in New Zealand. N. Z. VET. J. 54(6): 271-277.

WAGHORN, T. S; LEATHWICK, D. M; RHODES, A. P; JACKSON, R; POMROY, W. E; WEST, D. M; MOFFAT, J. R. 2006. Prevalence of anthelmintic resistance on 62 beef cattle farms in the North Island of New Zealand. N. Z. VET. J. 54(6): 278-282.

WAKELIN, D; DENHAM, D. A. 1983. The immune response. In Trichinella and Trichinosis. W. C. Campbell (ed). Plenum Press, New York, p: 265-308.

WAXMAN, D. J; LIGHT, D. R; WALSH. 1982. Chiral sulphoxidation catalized by rat liver cytochromes P450. Biochemistry. 21: 2499-2507.

WEBER, R; SAVER, B; CUTHY, R; NADAL, D. 1993. Intestinal coinfection with *Enterozytozoon bieneusi* and *Cryptosporidium* in a human immunodeficiency virus infected child with chronic diarrhea. Clin. Infec. Dis. 17(3): 480-483.

WOJTKOWIAK, A; BOCZON, K; WANDURSKA-NOWAK, E; DERDA, M. 2007. Evaluation of effect of albendazole on the kinetics of cytosolic glutathione transferasa in skeletal muscle during experimental trichinellosis in mice. Parasitol. Res. 100(3): 647-651.

WRIGHT, K. A. 1979. *Trichinella spiralis*. An intracelular parasite in the intestinal phase. J. Parasitol. 65: 441-445.

WU, L. Y; KINGSCOTE, A. A. 1957. Studies on *Trichinella spiralis* II. Times of final molts, spermatozoa formation, ovulation and insemination. Can. J. Zool. 35: 207-211.

WU, Z; MEDLICOTT, N. J; RAZZAK, M; TUCKER, I. G. 2005. Development and optimization of a rapid HPLC method for analysis of ricobendazole and albendazole sulfone in sheep plasma. J. Pham. Biomed. Anal. 39(1-2): 225-232.

#### Y

YANG, Z. Y; WANG, Z. Y; XU, G. S. 1984. Appearance, dissaperance and morphological variations of adults *Trichinella spiralis*. J. Vet. Sci. Thecnol. (shouyiz Keji Azzhi) 20-22.

YANG, W. P; SHEN, Y. P; SHAO, J. O; DONG, K; ZHONG, T; HU, Y. L; XU, Z. L. 1994. Effect of combined chemotherapy against human intestinal nematode eggs. Chung-Kuo-Chi-Shen-Chung-Hsush-Yu-Chi-Sheng-Chung-Ping Tsa-Chih. 12 (1): 52-55.

YASAWI, M; AL-KARAWI, M. A; MOHAMED, A. R. 1993. Combination of albendazole and praziquantel in the treatment of hidatid disease. Trp. Med. Parasitol. 44(3): 192-194.

YEPES MULIA, L; MORALES HURTADO, R; VIVEROS GUZMAN, N; CEDILLO RIVERA, R; HERNANDEZ LUIS, F; CASTILLO, R; HERNANDEZ CAMPOS, A; MUÑOZ, O. 1999. Evaluation of albendazole prodrugs in experimental trichinellosis. Arch. Med. Res. 30(5): 368-374.

#### Z

ZIEGLE, D. M. 1980. Microsomal flavin containing monooxygenase, oxygenation of nucleophilic nitrogen and sulfur containing compounds. Inz. Enzymatic Basis of Detoxification. Jacoby W. B. Ed. Academic Press. New York, p: 201-227.

ZSADON, B; DECSEI, L; SZILASI, M; TUDOS, F; SZEJTLI, J. 1983. Inclusion chromatography of enantiomers of indole alkaloids on a cyclodextrin polymer stationary phase J. Chromatogr. 270: 127-134.

**ANEXOS**

---

## Quantitative determination of albendazole and its main metabolites in plasma

Juan José García<sup>a</sup>, Francisco Bolás-Fernández<sup>a</sup>, Juan José Torrado<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Dpto. Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal, 28040, Madrid, Spain

<sup>b</sup>Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal, 28040, Madrid, Spain

Received 3 June 1998; received in revised form 23 October 1998; accepted 26 October 1998

### Abstract

Three different and complementary chromatographic methods are described for quantitative determination of albendazole (ABZ) and its two main metabolites: albendazole sulphoxide (SOABZ) and albendazole sulphone (SO<sub>2</sub>ABZ). ABZ, SOABZ and SO<sub>2</sub>ABZ can be quantified by two RP-HPLC methods with an ODS2 column and two different mobile phases. One of methanol–water (60:40) for ABZ and a second one of phosphoric acid in water–acetonitrile (80:20) for SOABZ and SO<sub>2</sub>ABZ. SOABZ bears an asymmetric sulphur centre. Quantitative assay of (+) SOABZ and (–) SOABZ can be performed by HPLC. A chiral AGP column and a mobile phase of sodium phosphate buffer (8 mM, pH 7.0) containing different amounts of 2-propanol between 0 to 2% were used. Pharmacokinetic characteristics of ABZ following oral administration of a liquid formulation of ABZ (12 mg/kg) in mice has been studied with these three complementary HPLC methods and the results are reported. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Albendazole

### 1. Introduction

Albendazole (ABZ) is a benzimidazole anthelmintic drug used in the treatment of helminthiasis in animals and man. Following oral administration the sulphide (ABZ) is oxidized to sulphoxide (SOABZ), which has an asymmetric sulphur centre. Another metabolite of ABZ is the sulphone (SO<sub>2</sub>ABZ). SOABZ is an active metabolite which is known as Ricobendazole. SO<sub>2</sub>ABZ is an inactive metabolite. Several other metabolites have been reported previously [1].

Anthelmintic activity of ABZ and SOABZ can be

studied in the *Trichinella spiralis* model in mice [2]. By using this model the anthelmintic activity can be determined either in the enteral and/or parenteral stages of this parasite infection. We have recently reported some data about the relationship between anthelmintic activity and pharmacokinetic characteristics [2,3]. Following oral administration ABZ is present at very low concentration in plasma samples. Meanwhile, its main and active metabolite, SOABZ, is present at higher concentrations. For this reason bioavailability of ABZ formulations is frequently studied with regard to SOABZ concentrations. Recently, we have reported a HPLC method to assay SOABZ and SO<sub>2</sub>ABZ in plasma [4]. In order to achieve a complete pharmacokinetic study of ABZ

\*Corresponding author.

formulations not only do SOABZ and SO<sub>2</sub>ABZ have to be quantified, but also ABZ and the two enantiomers (+) and (-) of SOABZ. Quantitative assay of the two enantiomer forms of SOABZ has been studied previously based on chiral-AGP [5] or (*S*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoyl)tyrosine [6] columns.

Although there are many analytical methods reported for quantitative assay of ABZ and its main metabolites, most of them require complex processes of sample preparation, such as previous extraction procedures for the samples with organic solvents, followed by evaporation and redissolution [7,8]. Other methods require the use of high volumes of solvents to elute the different components of samples. Thus, the final concentration of these compounds are very low and subsequent evaporation and redissolution steps are also needed [9].

In the present contribution three different and complementary HPLC methods which are useful for the quantitative assay of ABZ and its main metabolites in plasma are described. These analytical methods do not require complex previous treatment of the samples. Special attention has been paid to the determination of quantitation limits for ABZ and its main metabolites. Quantitation limits have been calculated as the lowest concentration of ABZ or its metabolites which gives rise to a signal capable of being quantified by the integrator (signal-to-noise ratio=5).

These methods have been used for the pharmacokinetic study of ABZ after oral administration in mice. Several complete ABZ pharmacokinetic studies have been reported for animals such as goats, cattle, sheep, rats, dogs,... [10-13] but there are not many reported data on pharmacokinetic studies of ABZ in mice.

## 2. Experimental

### 2.1. Apparatus

Analytical chromatography was performed with a modular liquid chromatograph equipped with a Gilson 305 isocratic pump, an automatic sampler (Gilson 231 XL) fitted to a 100- $\mu$ l sampling loop (Rheodyne), a variable wavelength detector (Gilson 116) and an integrator (Spectra-Physics SP-270).

### 2.2. Chemicals

ABZ and SO<sub>2</sub>ABZ were a gift from Smith-Kline Beecham Pharmaceuticals (London, UK). SOABZ was a gift from Chemo Ibérica (Alcala de Henares, Spain). HPLC grade acetonitrile and methanol were obtained from Lab-Scan (Dublin, Ireland). All other chemicals were analytical grade from Panreac (Barcelona, Spain).

### 2.3. Quantitative assay of ABZ

Analysis was performed on a Spherisorb ODS2 column (200 $\times$ 0.46 mm, 5  $\mu$ m) from Teknokroma (Barcelona, Spain). A mobile phase of methanol-water (60:40) at a constant flow-rate of 1 ml/min was employed. Samples were measured at 291 nm. The linearity of the method was studied in the range between 0.075-10  $\mu$ g/ml. The results were analysed by linear regression and the correlation coefficients obtained were always at least 0.99. The quantitation limit for ABZ, defined as the lowest concentration of ABZ which gives rise to a signal capable of being quantified by the integrator (signal-to-noise ratio=5), was found to be 0.07  $\mu$ g/ml. The specificity of the methods was checked with a blank mouse plasma sample and no significant interference was observed. Inter-day precision was 3.1% during three consecutive days for a plasma sample of concentration 0.5  $\mu$ g/ml expressed as relative standard deviation (RSD).

### 2.4. Quantitative assay of SOABZ and SO<sub>2</sub>ABZ

A Kromasil ODS2 column (200 $\times$ 0.46 mm, 5  $\mu$ m) from Teknokroma (Barcelona, Spain) was used as the stationary phase. A mobile phase containing 800 ml of a water solution with 188  $\mu$ l of phosphoric acid 85% and 200 ml of acetonitrile was used at a constant flow-rate of 1 ml/min. Samples were measured at 290 nm. Validation data of this method can be summarised as follows. Linearity of the method was studied in the range between 0.05-10  $\mu$ g/ml. The results were analysed by linear regression and the correlation coefficients obtained were always at least 0.99 for SOABZ and 0.98 for SO<sub>2</sub>ABZ. The quantitation limits for SOABZ and SO<sub>2</sub>ABZ were 0.031 and 0.037  $\mu$ g/ml, respectively. The specificity

of the methods was checked with a blank mouse plasma sample and no interferences at the retention times of SOABZ and SO<sub>2</sub>ABZ were observed. Inter-day precisions were 3.6 and 4.3%, respectively, during three consecutive days for plasma samples of concentration 0.1 µg/ml of SOABZ and 0.1 µg/ml of SO<sub>2</sub>ABZ expressed as relative standard deviation (RSD).

#### 2.5. Quantitative assay of (+) SOABZ and (-) SOABZ

A chiral-AGP (100×4 mm, 5 µm) column from ChromTech (Stockholm, Sweden) was used. Samples were measured at 290 nm. A mobile phase of sodium phosphate buffer (8 mM, pH 7.0) containing different amounts of 2-propanol between 0 to 2% was used at a constant flow-rate of 0.9 ml/min. Validation data depends on the 2-propanol concentration in the mobile phase. Highest sensitivity was achieved when 2% 2-propanol was used in the mobile phase. Validation data when 2% of 2-propanol is used are as follows. Linearity of the method was studied in the range between 0.05–1.5 µg/ml of (-) and (+) SOABZ. The results were analysed by linear regression and correlation coefficients obtained were always at least 0.99 for (-) SOABZ and 0.98 for (+) SOABZ. Quantitation limits for (-) SOABZ and (+) SOABZ were 0.04 and 0.05 µg/ml, respectively. Specificity of the methods was checked with a blank mouse plasma sample and no interferences at the retention times of (-) SOABZ and (+) SOABZ were observed. Inter-day precisions were 5.3 and 7.2%, respectively, during three consecutive days for a plasma concentration sample of 0.05 µg/ml of (-) SOABZ and 0.05 µg/ml of (+) SOABZ expressed as relative standard deviation (RSD).

#### 2.6. Pharmacokinetic study

ABZ was solubilised in water by using a hydroxypropyl-β-cyclodextrin solution. This solution was orally administered by a single dose of 12 mg/kg to Swiss CD-1 mice (weight 30±3 g). Following drug administration, groups of six mice were sacrificed and blood samples were collected at different times (0.25, 0.5, 0.75, 1.5, 3, 6 and 24 h). Blood samples were heparinized and centrifuged

individually after the extraction. Plasma samples were frozen until the HPLC analysis.

#### 2.7. Sample preparation and quantitative assay

Two ml of methanol was added to aliquots of plasma (400 µl) to precipitate proteins. After vortex-mixing for 5 min, samples were centrifuged at 3000 g for 10 min and filtered through a nylon 0.45-µm filter (Teknokroma, Spain). In order to quantify ABZ concentration, 100-µl aliquots of the filtered fractions were injected into the HPLC system under the conditions described for the ABZ assay. A second assay under the analytical conditions described for SOABZ and SO<sub>2</sub>ABZ quantification was done. Liquid fractions were collected at the retention time of SOABZ. Finally, these samples were assayed in order to quantify proportions of the two enantiomers of SOABZ.

### 3. Results and discussion

For a complete pharmacokinetic assay of ABZ and its main metabolites, several analytical methods are required. In a previous report we have used only one analytical RP-HPLC method [2]. This method [2] used the same analytical conditions that we have described for the ABZ assay but with a mobile phase containing 50% of methanol. With these conditions we were able to quantify SOABZ, but we could not detect ABZ at the low concentrations which are present after oral administration. Now we have to increase the sensitivity of the method by using a higher proportion of methanol in the mobile phase (60%). A mobile phase with a 60% of methanol mixed with a phosphate buffer is also proposed by USP 23 to quantify ABZ [14]. Fig. 1 shows the results of the assay of a plasma sample containing 0.3 µg/ml of ABZ. The retention time for ABZ is 18.8 min. Unfortunately, this method can not quantify the two main metabolites because under these conditions they have the same retention time (approximately 4.5 min). For this reason a second HPLC assay method is required to separate and quantify the two main metabolites of ABZ. This new method has been validated and reported recently [4]. Fig. 2 shows the assay of a mouse plasma sample

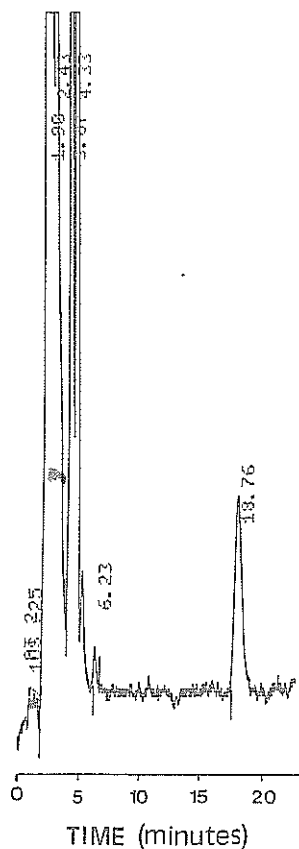


Fig. 1. Chromatogram of a mouse plasma sample following oral administration of ABZ. Retention time for ABZ is 18.8 min.

after oral administration of ABZ. Retention times for SOABZ and SO<sub>2</sub>ABZ are 5.5 and 15.9 min. The retention time with this method for ABZ is too long (more than 40 min) which means that there are practical problems in quantifying the low concentrations of ABZ which are present after oral administration. In fact, in some articles about the pharmacokinetics of ABZ, the analytical methods were not sensitive enough to assay ABZ, and bioavailability of ABZ after oral administration was studied based on its main metabolite SOABZ which is also active [2,15–16]. In order to assay ABZ, SOABZ and SO<sub>2</sub>ABZ at least two different HPLC methods are required.

Fig. 3 shows in a semilogarithmic scale the pharmacokinetic profile of ABZ, SOABZ and

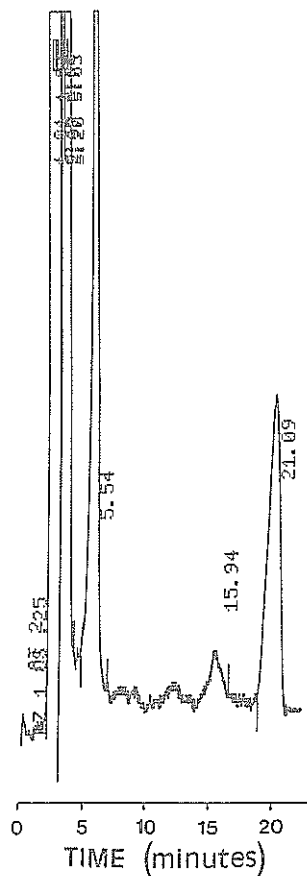


Fig. 2. Chromatogram of a mouse plasma sample showing peaks for SOABZ (5.5 min), SO<sub>2</sub>ABZ (15.9 min) and an unknown substance (21.1 min).

SO<sub>2</sub>ABZ in mice following oral administration of ABZ (12 mg/kg). As was previously reported in other animal species [10–13,15,16] SOABZ is the main metabolite in mouse plasma. Its concentration is higher than ABZ, although it was possible to detect ABZ in this study.  $C_{max}$  for ABZ and SOABZ are obtained at 15 min. These  $t_{max}$  are probably due to the good bioavailability characteristics of the liquid formulation of ABZ-cyclodextrin. Cyclodextrins are currently used as solubilisers and absorption enhancers and a similar effect on the absorption of mebendazole has been reported previously [17]. Metabolisation of ABZ to SOABZ is a fast process which can be done in the gut prior to absorption or following oral absorption by a first-pass hepatic

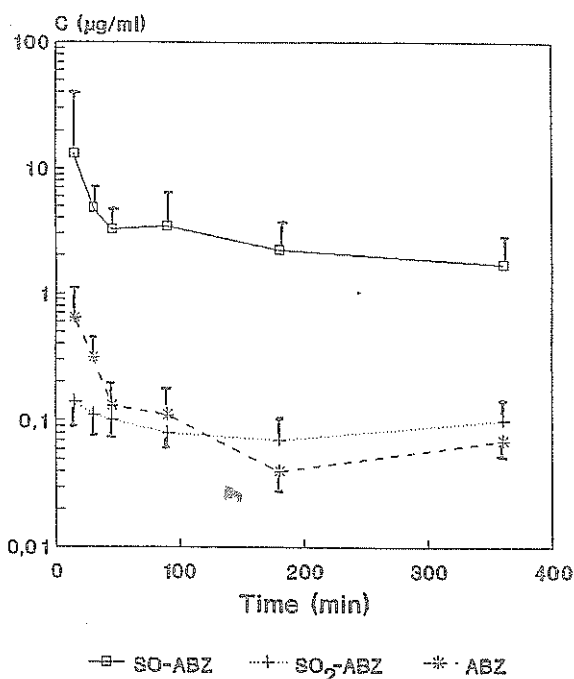


Fig. 3. Semilogarithmic scale of SOABZ, SO<sub>2</sub>ABZ and ABZ plasma concentrations versus time following oral administration of ABZ in mice (mean values and standard deviations of six animals).

process as was reported by Galtier et al. [15]. For these two reasons, rapid absorption and fast metabolism rate, ABZ and SOABZ concentration levels are maximum at the first experimental point available (15 min). SO<sub>2</sub>ABZ concentrations following oral administration are low.  $t_{max}$  For SO<sub>2</sub>ABZ is not clear under our experimental conditions. In other animal studies  $t_{max}$  for SO<sub>2</sub>ABZ has been reported to be between 6 and 30 h [6,10–13,15].

In order to quantify the two enantiomers of SOABZ, we have used the same method reported by Lienne et al. [5] with a few modifications. Wavelength of detection has been changed from 220 nm to 291 nm to facilitate baseline balance. 2-Propanol at 2% concentration is proposed as a component of the mobile phase to quantify low concentrations of enantiomers. Table 1 shows the characteristics of the chromatographic methods depending on the percentage of 2-propanol in the mobile phase (0, 1 or 2%). Fig. 4 shows chiral resolution of SOABZ of a mouse

Table 1

Influence of the addition of 2-propanol to the aqueous mobile phase on the resolution of SOABZ enantiomers

2-Propanol (%, v/v)	$k'_2$ <sup>a</sup>	$\alpha$ <sup>b</sup>	$R_s$ <sup>c</sup>	Quantitation limit (µg/ml)	
				(+)	(-)
0	13.1	2.4	2.2	0.41	0.21
1	4.6	2.0	2.0	0.13	0.10
2	2.5	1.6	1.1	0.05	0.04

<sup>a</sup> The retention factor  $k'_2$  (of the second enantiomer eluted) was calculated as follows:  $k'_2 = (t_{R2} - t_0)/t_0$ , where  $t_0$  was measured by injection of methanol.

<sup>b</sup> Selectivity  $\alpha = k'_2/k'_1$ .

<sup>c</sup>  $R_s$  (Resolution factor) = 2 (distance between the two enantiomer peak position/sum of the band widths of the two peaks at their bases);  $R_s = 2(t_{R2} - t_{R1})/(w_1 + w_2)$ .

plasma sample after oral ABZ administration when 2% of 2-propanol is used in the mobile phase.

Table 1 shows how when 2-propanol is added, retention factor ( $k'$ ), selectivity ( $\alpha$ ), resolution factor ( $R_s$ ) and quantitation limits change. For high SOABZ concentration, the best chromatographic conditions are obtained when 2-propanol is not added, as was previously described by Lienne et al. [5]. Unfortunately, in the pharmacokinetic studies, very low



Fig. 4. Chromatogram showing chiral resolution of SOABZ in a mouse plasma sample following oral administration of ABZ.

concentrations of SOABZ are collected for the enantiomeric assay. For this reason 2-propanol at 2% was selected as the mobile phase because at this concentration quantitation limits are lower. The experimental quantitation limit was found to be between 0.04 and 0.41  $\mu\text{g/ml}$  depending on the enantiomer and percentage of 2-propanol in the mobile phase.

Fig. 5 shows the enantiomeric proportions of (+) and (-) SOABZ. These proportions are similar to those reported by Delatour and coworkers in rats [6,11] and are different to sheep, goats, dogs, cattle and man [6,10–13]. Enantiomer (-) SOABZ is dominant in rats and mice, while (+) SOABZ is dominant in sheep, goats, dogs, cattle and man. In addition, the plasma concentration ratio (+)/(-) is not a constant and changes with time. The enantiomeric ratio at time 0 is not accessible experimentally, but by extrapolation of the curves it can be considered to be close to a racemate in mice. These are the enantiomeric proportions in the liquid formulation. The plasma concentration ratio (+)/(-) decreases with time and at 24 h is approximately 25/75%. Differences in enantiomer metabolism can be due to enantioselective enzymatic processes of SOABZ [11].

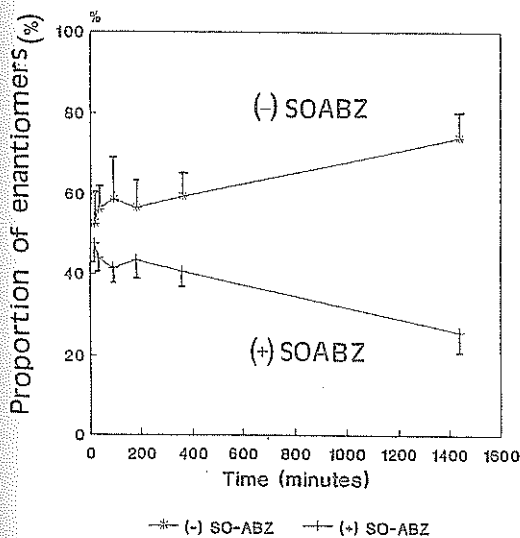


Fig. 5. Evolution versus time of the percentage of the enantiomers of SOABZ in mouse plasma (mean values and standard deviations of six animals).

It can be concluded from the present work that for a complete ABZ pharmacokinetic study several chromatographic methods can be used. We propose the use of three HPLC methods instead of just one or two as has been done in most of the papers already published. First, ABZ should be quantified. Then, SOABZ, the main and active metabolite of ABZ, and  $\text{SO}_2\text{ABZ}$  must also be quantified. Finally, proportions of enantiomers (+) and (-) of SOABZ can also be determined. It can be emphasised that no complex preparation steps are required with the three HPLC analytical methods proposed in this work for pharmacokinetic assay of ABZ and its main metabolites.

#### Acknowledgements

The authors thank Dr. Torrellas (Smith-Kline Beecham) for ABZ and  $\text{SO}_2\text{ABZ}$  samples and Mr. C. Picornell (Chemo Ibérica) for SOABZ samples.

#### References

- [1] B. Zaber, R.J. Gyurik, A.W. Chow, B. Zaber, E.L. Brunner, J.A. Miller, A.J. Villani, L.A. Petka, R.C. Parish, *Drug Metab. Dispos.* 9 (1981) 503.
- [2] M.L. Lopez-García, S. Torrado-Duran, J. Torrado-Duran, A.R. Martínez Fernández, F. Bolas-Fernández, *Int. J. Parasitol.* 27 (1997) 781.
- [3] S. Torrado, M.L. Lopez, G. Torrado, F. Bolas, S. Torrado, R. Cadorniga, *Int. J. Pharm.* 156 (1997) 181.
- [4] S. Rueda-Polo, J. Torrado, F. Bolas, S. Torrado, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 21 (1998) 2327.
- [5] M. Lienne, M. Caude, R. Rosset, A. Tambute, *J. Chromatogr.* 472 (1989) 265.
- [6] P. Delatour, E. Benoit, M. Caude, A. Tambute, *Chirality* 2 (1990) 156.
- [7] S.E. Marriner, D.L. Morris, B. Dyckson, J.A. Bogan, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 30 (1986) 705.
- [8] G.B.A. Okelo, B. Hagos, J.N. Nganga, J.O. Ogeto, *East African Med. J.* 70 (1993) 643.
- [9] M. Hurtado, M.T. Medina, J. Sotelo, H. Jung, *J. Chromatogr.* 494 (1989) 403.
- [10] E. Benoit, S. Besse, P. Delatour, *Am. J. Vet. Res.* 53 (1992) 1663.
- [11] P. Delatour, E. Benoit, S. Besse, A. Boukraa, *Xenobiotica* 21 (1991) 217.
- [12] P. Delatour, F. Garnier, E. Benoit, I. Caude, *Res. Vet. Sci.* 50 (1991) 134.

- [13] P. Delatour, E. Benoit, F. Garnier, S. Besse, *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 13 (1990) 361.
- [14] United States Pharmacopoeia 23, National Formulary 18, Suppl. 1, 1994, p. 2424.
- [15] P. Galtier, M. Alvinerie, J.L. Steimer, P. Francheteau, Y. Plusquellec, G. Houin, *J. Pharm. Sci.* 80 (1991) 3.
- [16] T. Zeugin, T. Zysset, J. Cotting, *Ther. Drug Monit.* 12 (1990) 187.
- [17] Y. Chiba, N. Kohri, K. Iseki, K. Miyazaki, *Chem. Pharm. Bull.* 39 (1991) 2158.

RESEARCH PAPER

## Preparation and Characterization of Albendazole $\beta$ -Cyclodextrin Complexes

J. A. Castillo,<sup>1</sup> J. Palomo-Canales,<sup>1</sup> J. J. Garcia,<sup>2</sup>  
J. L. Lastres,<sup>1</sup> F. Bolas,<sup>2</sup> and J. J. Torrado<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica and <sup>2</sup>Dpto. Parasitología,  
Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Pza. Ramón  
y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

### ABSTRACT

Albendazole (ABZ), mebendazole (MBZ), and ricobendazole (RBZ) are low-soluble anthelmintic benzimidazole carbamate drugs. To increase their aqueous solubility, three different types of  $\beta$ -cyclodextrins (CyDs):  $\beta$ -cyclodextrin (CD), hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HPCD), and methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MCD) were used. Solubility depended on the type of CyDs. Increased solubility was obtained when the more substituted CyDs (HPCD or MCD) were used instead of nonsubstituted CD. Stability constants were calculated assuming a 1:1 stoichiometry. Calculated stability constant values depended on initial solubility of drug and pH of the medium. Solid ABZ complexes were prepared by coprecipitation and freeze-drying methods. These products were compared with physical mixtures of ABZ and CyDs. The characterization of these products was made by differential scanning calorimetry (DSC) and drug release studies. True inclusion complexes were obtained only by the freeze-drying method. Drug release studies showed that the freeze-dried inclusion complexes increased the solubility rate of ABZ, although a supersaturation effect was observed when drug release studies were performed in nonsink conditions. A bioavailability study on mice was done with a formulation of ABZ:HPCD complex and was compared to a conventional ABZ suspension. A significantly ( $p < .05$ ) shorter  $T_{max}$  of absorption was obtained by using the complex formulation. Greater and significant ( $p < .05$ ) differences for AUC and  $C_{max}$  were observed.

**Key Words:** Albendazole; Bioavailability; Cyclodextrin; Solubility.

\*To whom correspondence should be addressed. Fax: 34-1-3941736. E-mail: torrado1@eucmax.sim.ucm.es

## INTRODUCTION

Benzimidazole carbamates are anthelmintic drugs widely used in the treatment of intestinal and tissue nematode infections and, in higher doses, for therapy of echinococcosis. Among the different benzimidazole carbamates, we chose mebendazole (MBZ), albendazole (ABZ), and ricobendazole (RBZ). Figure 1 shows the chemical structures of these molecules. These drugs usually exhibit low water solubility, which reduces absorption by the oral tract (1).

In previous works, solid dispersion formulations were prepared with polyvinylpyrrolidone (2) and liquid formulations with Transcutol® (3) to improve the aqueous solubility and dissolution characteristics of ABZ. In this work, our aim was to study the effect of different cyclodextrins (CyDs) on ABZ solubility characteristics and their effect on bioavailability. To this end, we chose three different CyDs:  $\beta$ -cyclodextrin (CD), hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HPCD), and methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MCD), which were mixed with ABZ in two media, distilled water or acid buffer. MBZ and RBZ are two other benzimidazole carbamate anthelmintic drugs less and more soluble, respectively, than ABZ; these were also solubilized with CyDs. The type of CyD with the best solubility results was used to prepare solid complexes of ABZ by means of coprecipitation and freeze-drying methods. The resultant products were characterized by differential scanning calorimetry (DSC) and dissolu-

tion release studies. A bioavailability study in mice was done with the best formulation to compare its characteristics with those of a reference suspension formulation.

## MATERIALS

Albendazole (Smithkline Beecham Pharmaceutical, UK), mebendazole (Sigma, St. Louis, MO), ricobendazole (Chemo Ibérica, Spain),  $\beta$ -cyclodextrin (Amaizo, USA), hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (Janssen, Belgium), methyl- $\beta$ -cyclodextrin (Ringdex, France), Explo-tab (FMC, USA), and Avicel PH 101 (FMC) were used for the experiments.

## METHODS

### Solubility Studies

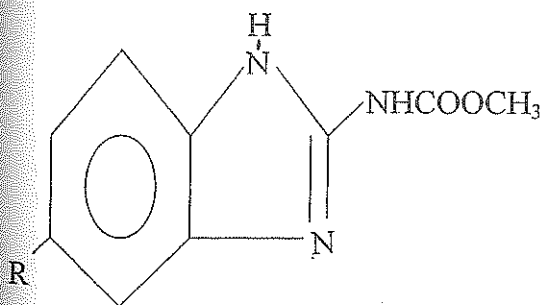
The solubility studies were carried out according to the method described by Higuchi and Connors (4). Different types and concentrations of CyDs were employed to prepare solutions in distilled water or in acid medium (ClH/ClK 0.2 M, pH 1.2), and an excess amount of the different drugs (MBZ, ABZ, or RBZ) was added. The tubes were closely fitted, sonicated for 15 min and then shaken at approximately 15 rpm and heated at 37°C for 1 week. Samples were made in triplicate. The suspensions were filtered through a 0.45- $\mu$ m filter, properly diluted, and assayed for drug concentration by ultraviolet UV spectrophotometrical analysis at 284 nm for MBZ, 291 nm for ABZ, and 289 nm for RBZ. The stability constants were calculated from the solubility diagrams assuming a 1:1 stoichiometry.

### Elaboration of Inclusion Complexes

Solid complexes were prepared using different ratios of ABZ and HPCD. The ratios were calculated on a molecular basis, and the following proportions were prepared: 1:1, 1:1.5, and 1:2. The complexes were made by the coprecipitation and freeze-drying methods.

### Coprecipitation Method

For the coprecipitation, ABZ was dissolved in the minimum amount of ethanol, and HPCD was dissolved in distilled water. The mixture was stirred for 1 hr, and then it was slowly evaporated at room temperature. After 7 days, a crystalline powder was precipitated, recovered,



MBZ	R = -CO-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
ABZ	R = -S-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>
RBZ	R = -SO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>

Figure 1. Structures of different anthelmintic benzimidazole carbamates: mebendazole (MBZ), albendazole (ABZ), and ricobendazole (RBZ).

and sieved through a 0.247-mm mesh. The product was stored in a desiccator with silica gel for 3 days.

#### Freeze-Drying Method

For freeze-drying, ABZ was dissolved in acid medium (CIH/CIK 0.2 M, pH 1.2), and HPCD was dissolved in distilled water. The mixture of both solutions was stirred at room temperature for 24 hr and then freeze-dried for 2 days. The product was sieved through a 0.247-mm mesh. Complexes with MCD were also made in a 1:1 ratio in the same conditions as complexes formed with HPCD.

#### Elaboration of Physical Mixtures

Physical mixtures of ABZ and HPCD were prepared in the same molar ratios as inclusion complexes. To this end, the components were mixed with pestle and mortar, then the mixture was sieved through 0.247 mesh and stored in a desiccator with silica gel for 3 days.

#### In Vitro Characterization

##### Differential Scanning Calorimetry

Inclusion complexes, physical mixtures, free drug, and HPCD were subjected to DSC studies using DSC polymer equipment. The temperatures ranged between 35°C and 350°C, with a heat flow of 0.5 cal/°C min.

##### Dissolution Rate Studies

Dissolution rate profiles for the different products (ABZ as the raw material, physical mixtures, and complexes) were evaluated. To avoid floating of the products, the different samples were mixed with Explotab (5%), as the disintegrant agent, and Avicel PH 101, as diluent, and compacted at low tableting pressure. The disintegration time of the resultant products was always less than 5 min. The amount of ABZ for each experiment varied between 2 mg (sink conditions) and 50 mg (nonsink conditions). The dissolution studies were carried out in a USP 23 apparatus, method II. Dissolution media were 900 ml of distilled water or acid medium. The temperature of the study was 37°C, and the system was stirred at 100 rpm. Samples were taken at different time intervals: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, and 60 min. They were then filtered and assayed by UV spectrophotometrical analysis at 291 nm. Experiments were made in triplicate.

#### In Vivo Characterization: Bioavailability Study

The bioavailability of ABZ:HPCD freeze-dried complex at a 1:1 ratio was compared with a conventional ABZ suspension. Both formulations were administered orally in a single dose of 20 mg/kg to Swiss CD-1 mice (weight  $30 \pm 3$  g). After drug administration, groups of 6 mice were sacrificed, and blood samples were collected at different times (0.25, 0.5, 0.75, 1.5, 3, and 6 hr). Blood samples were heparinized and centrifuged individually after the extraction. Plasma samples were frozen until the high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis, previously described (5).

The  $T_{max}$  and  $C_{max}$  were estimated as the mean values of time ( $T_{max}$ ) taken to achieve maximum plasma concentrations ( $C_{max}$ ) for each of the 6 mice used at each time point. The areas under the plasma concentration-time curve between 0 hr and 6 hr ( $AUC_{0-6}$ ) were calculated by the trapezoidal method (6). Comparative statistical study among formulations was performed by a one-way analysis of variance (ANOVA) test.

## RESULTS AND DISCUSSION

Figures 2, 3, and 4 show phase solubility diagrams for MBZ, ABZ, and RBZ, respectively, in distilled water. Figures 5, 6, and 7 show results in acid medium. The solubility of these drugs increases linearly with increasing concentration of CyDs. According to the Higuchi and Connors method (4), the phase solubility diagrams in our experimental conditions can be considered as  $A_L$  types. This behavior is characteristic of complexation with the stoichiometric ratio of drug: CyD of 1:1. The apparent stability constants  $K_c$  of the different anthelmintic drugs with the different CyDs in distilled water or in acid buffer medium were calculated from the slope and intercept  $S_0$  of the initial straight-line portion of the diagram according to the following equation:  $K = \text{Slope}/S_0$  (1 - slope).

Tables 1 and 2 show results of  $K_c$  ( $M^{-1}$ ) and  $r$  values (in parentheses) for the different drug: CyD systems in distilled water and acid buffer medium, respectively. The stability constants correlate with the interaction forces between guest (drug) and CyD. In our systems, the stability constants usually have low values, which means a weak association-dissociation in both media tested.  $K_c$  values are characteristic of the pH in the liquid medium and also depend on the benzimidazole carbamate drug and type of CyD.  $K_c$  values between 200 and 5000  $M^{-1}$

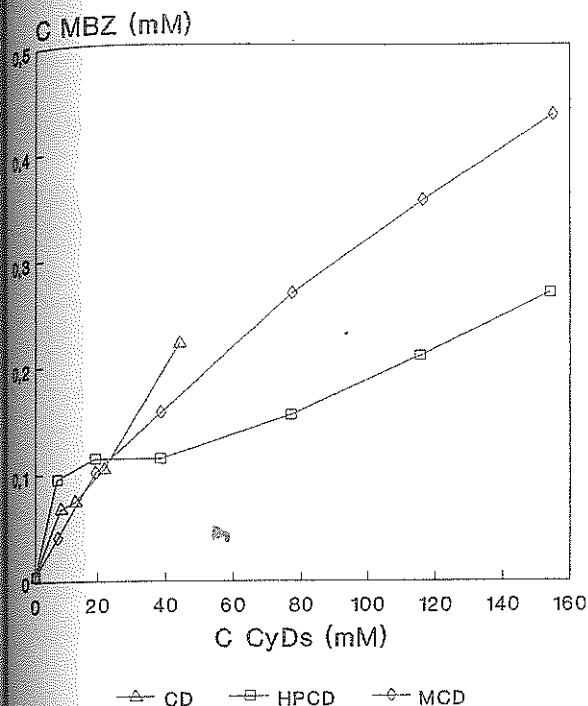


Figure 2. Phase solubility diagram of MBZ in distilled water in the presence of different CyDs.

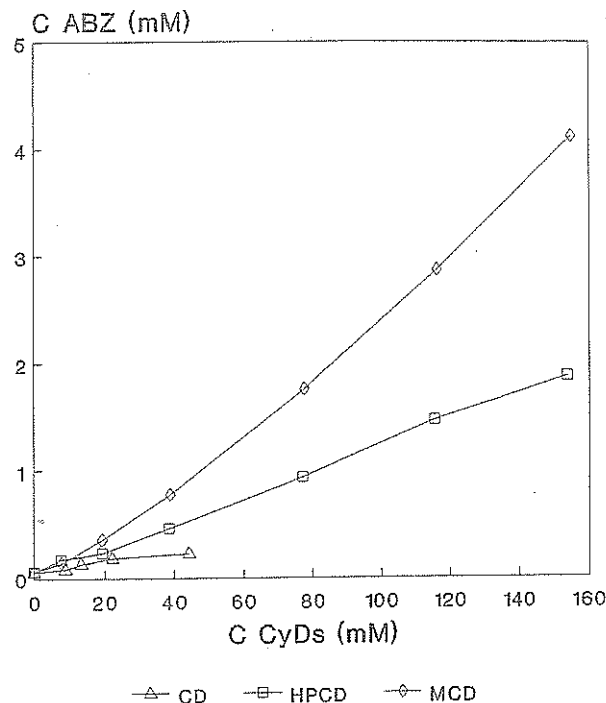


Figure 3. Phase solubility diagram of ABZ in distilled water in the presence of different CyDs.

are considered by various authors as the most suitable for the improvement of bioavailability of poorly soluble drugs (7). According to these criteria, the best results for the benzimidazole carbamate drugs are obtained with the less-soluble drugs (MBZ and ABZ). Clearly, drug solubility affects  $K_c$  values. When drug solubility increases,  $K_c$  values decrease. This effect can be due to the hydrophobicity of the drug and has been reported previously for some other molecules (8). If inclusion of CyDs depends on hydrophobicity of the drug, when hydrophobicity decreases (and water solubility increases),  $K_c$  must be lower.

Tables 1 and 2 and Figs. 2–7 show how drug solubility depends on the amount and type of CyD. The type of CyD that produces the highest solubilization effect depends also on the drug. For example, for the least-soluble drug (MBZ), the highest solubilization effect was achieved with CD. Nevertheless, for the more-soluble drugs (ABZ and RBZ), the best results were obtained with the most-soluble CyD (MCD).

At acid pH (1.2), higher solubility values were obtained due to the ionization effect of the three drugs, although with a lower stability constant than in distilled water. Benzimidazole carbamate drugs are basic drugs, so in acid medium they are in ionized form, which is

most soluble, but as reported previously, ionized molecules produce weaker interactions with the hydrophobic cavities of CyDs than un-ionized ones (9,10). At acid pH, MBZ and RBZ increase their solubility by CyDs without regard to the type of CyD. For ABZ, the greatest solubilization effect was obtained with MCD.

It can be concluded from this part of the work that, for MBZ, ABZ, and RBZ, drug solubility can be increased with CyDs. The best results depend on the drug, type of cyclodextrin, and pH of the medium.

Among the different CyDs studied, HPCD was chosen to prepare solid inclusion complexes because of its low toxicity and high solubilization effect in ABZ. Solid inclusion complexes were prepared by coprecipitation and freeze-drying techniques.

Figure 8 shows the DSC results for ABZ, HPCD, physical mixtures, coprecipitation, and freeze-drying systems at a ratio of 1:1. For the ABZ sample, a sharp endothermic peak is observed between 200.6°C and 200.9°C. The peak is not a clear single peak. In fact, it can be considered a double peak, which can be indicative of polymorphous or enantiomeric compounds. The ABZ polymorphous form has been reported by Zhu, Yang, and Botha (11). In the thermogram of HPCD, three endothermic peaks are observed. In the range of temperatures be-

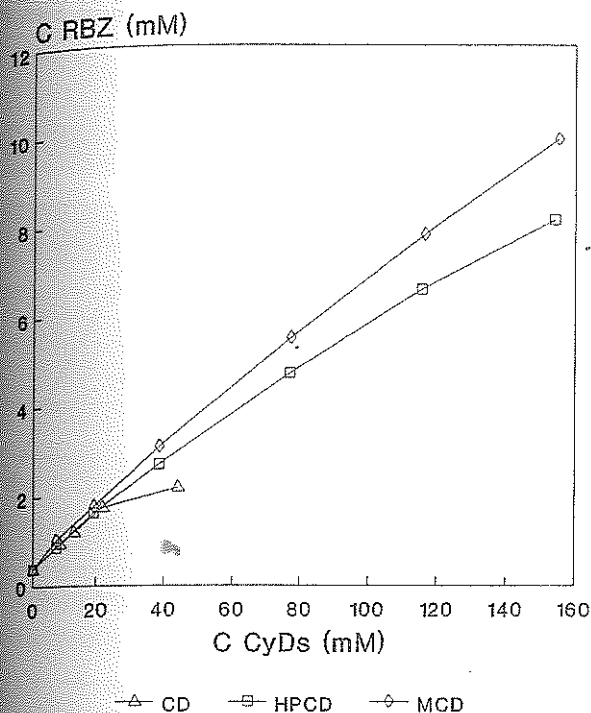


Figure 4. Phase solubility diagram of RBZ in distilled water in the presence of different CyDs.

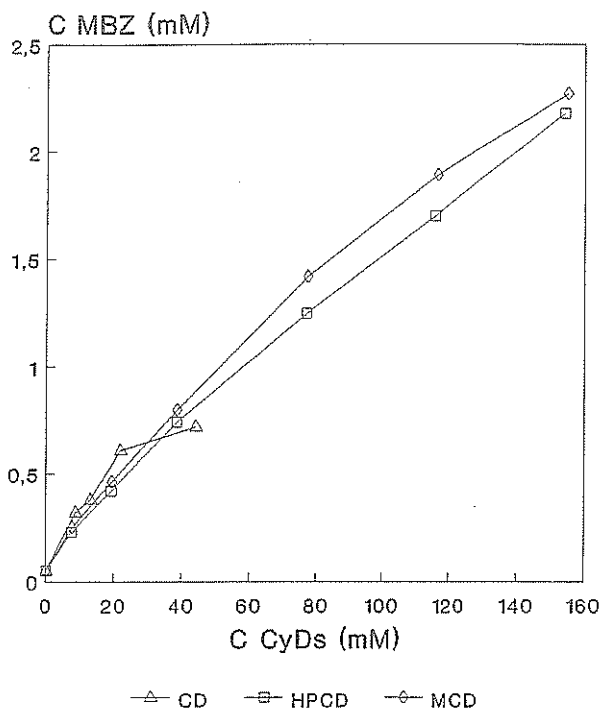


Figure 5. Phase solubility diagram of MBZ in acid buffer medium (CIK/CIH 0.2 M) in the presence of different CyDs.

tween 65°C and 75°C, a decomposition of approximately 1/3 of the weight of CyD is produced. In the range between 90°C and 100°C, loss of water is produced (the moisture content of the sample assayed by desiccation was between 3% and 4%). Near 350°C, the endothermic peak corresponding to HPCD fusion is observed. The physical mixture of ABZ and HPMC shows a behavior that can be considered a superposition of its two components. In the ABZ:HPCD systems obtained by the coprecipitation method, the DSC technique shows the endothermic peak corresponding to the melting of ABZ. Although this peak is partially reduced in size when compared to the ABZ as a raw material, the presence of this peak indicates that a true inclusion complex has not been achieved. Nevertheless, in the ABZ:HPCD systems obtained by the freeze-drying method, the endothermic peak corresponding to melting of ABZ is not present. A new peak appears at temperatures between 260°C and 270°C that can be attributed to melting of true inclusion complexes.

Figure 9 shows the dissolution rate profile of different ABZ samples in sink conditions. Solid systems, obtained by coprecipitation and freeze-drying methods, show faster and greater solubility than the reference ABZ and physical mixtures of ABZ:HPCD. The high ABZ disso-

lution obtained by the coprecipitation method is probably because most of the ABZ molecules are surrounded by HPCD molecules, which increase the hydrophilic characteristics of ABZ. Solid systems obtained by freeze-drying methods show the highest solubility rates at the beginning of the dissolution test (approximately 10 min). Later, a small decrease on solubility was observed. This effect is more important when the dissolution test is performed in nonsink conditions (see Fig. 10). For the solid systems obtained by coprecipitation and freeze-drying methods, an increase of solubility is achieved when the proportion ABZ:HPCD is increased to molar ratios 1:1.5 and 1:2 (results are not shown). Figure 9 shows there are few differences in dissolution between reference ABZ and the physical mixture of ABZ:HPCD. Perhaps, a slight enhancement of dissolution is achieved in the physical mixtures that can be due to the formation of a hydrodynamic layer of CyDs surrounding the ABZ particles in the acid medium. A similar effect was noticed by Ismail (12,13).

Figure 10 shows the dissolution rate profile of the different ABZ formulations in nonsink conditions. In clinical therapy, the doses of ABZ can be as high as 800 mg. With this amount of ABZ, perhaps sink conditions are not obtained in the digestive system. Dissolution tests in

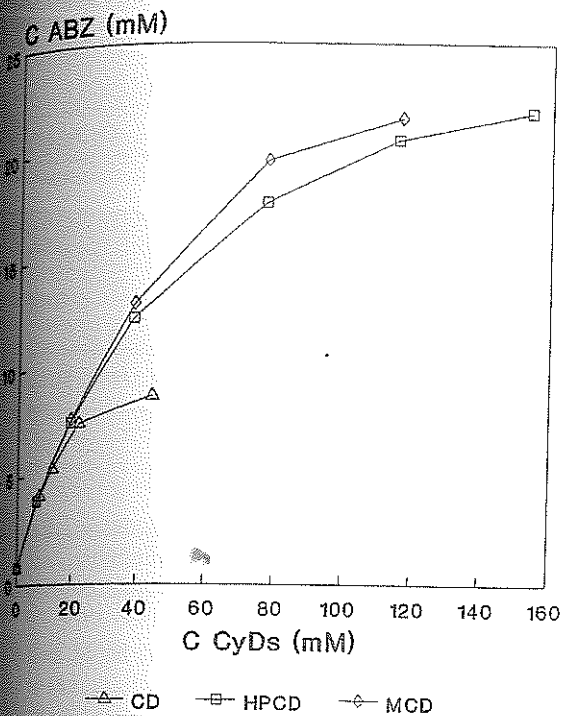


Figure 6. Phase solubility diagram of ABZ in acid buffer medium (CIK/CIH 0.2 M) in the presence of different CyDs.

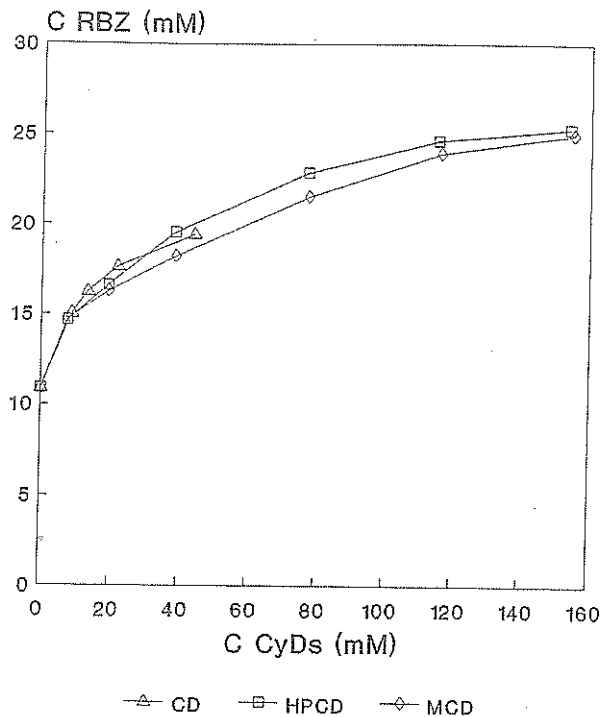


Figure 7. Phase solubility diagram of RBZ in acid buffer medium (CIK/CIH 0.2 M) in the presence of different CyDs.

acid buffer medium with 50 mg of ABZ samples were used to find the effect of being in nonsink conditions. These experimental conditions are probably more similar to the in vivo real situation than the experiments carried out with low doses of ABZ, which were used in order to be in sink conditions. In these dissolution conditions, the enhancement of solubility at some points of the dissolution test can be five times that of the reference. MCD and HPCD were employed to prepare inclusion complexes with ABZ. The effect on ABZ dissolution of these two different CyDs is very similar in acid buffer medium. The precipitation phenomenon observed and discussed in Fig. 9 is also observed in Fig. 10. This effect is even more evident in nonsink conditions than under sink conditions, probably because higher doses of ABZ are used; for this reason, ABZ precipitation is produced more markedly. This effect has been observed for piroxicam-polyethylene glycol 4000 in solid dispersions (14), nifedipine with polyethylene glycol 6000 and hydroxypropylmethyl cellulose (15), and different drug: CyD systems (16,17). This process has been described as a supersaturation phenomenon that can produce discrepancies between in vitro dissolution test results and in vivo bioavailability results.

According to Pedersen (18), this effect can explain why, in some works, worse biological results than those expected are obtained.

A liquid formulation of ABZ with HPCD was chosen for bioavailability studies. The oral bioavailability of this new formulation was compared with an ABZ suspension. Both formulations were orally administered in mice. Plasma samples were taken at different times, and drug concentration was assayed by HPLC. Due to the fast

Table 1

Drug Solubility in Distilled Water

Drug/CyD	CD	HPCD	MCD
MBZ	1026 (0.99)	304.7 (0.95)	588.5 (0.99)
ABZ	68.9 (0.95)	203.7 (0.99)	455.2 (0.99)
RBZ	108.3 (0.96)	139.3 (0.99)	171 (0.99)

K<sub>c</sub> (M<sup>-1</sup>) and r values (in parentheses) for the different drug: CyD systems.

Table 2

Drug Solubility in Acidic Medium

Drug/CyD	CD	HPCD	MCD
MBZ	289.6 (0.93)	270 (0.99)	288.2 (0.99)
ABZ	260.7 (0.91)	200.2 (0.95)	282.1 (0.96)
RBZ	19.5 (0.90)	8.69 (0.93)	8.3 (0.95)

$K_c$  ( $M^{-1}$ ) and  $r$  values (in parentheses) for the different drug: CyD systems.

ABZ metabolism, its main metabolite RBZ, which has also anthelmintic properties, was assayed. So, bioavailability characteristics of ABZ were studied depending on the RBZ concentrations obtained after ABZ administration. Mean plasma concentration time results are shown in Fig. 11. The following bioavailability parameters were

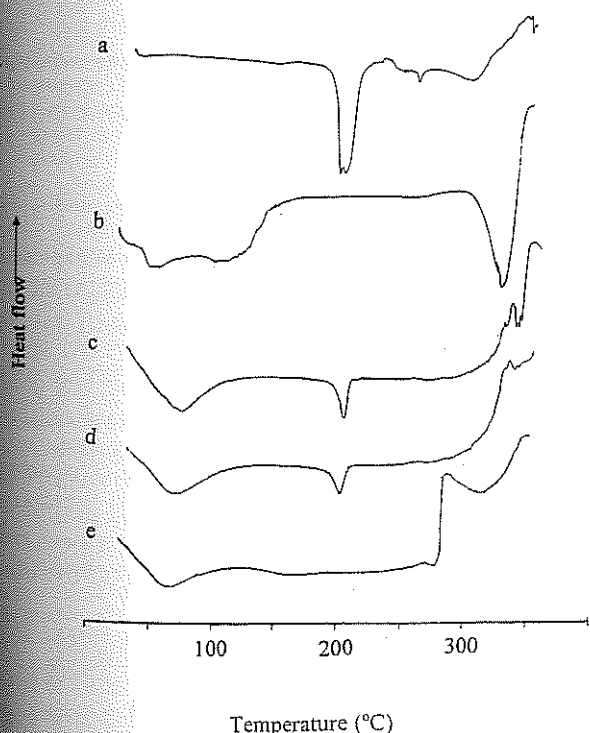


Figure 8. DSC thermograms of the following compounds: (a) albendazole; (b) HPCD; (c) physical mixture in a 1:1 ratio; (d) coprecipitation complex in a 1:1 ratio; and (e) freeze-dried complex in a 1:1 ratio.

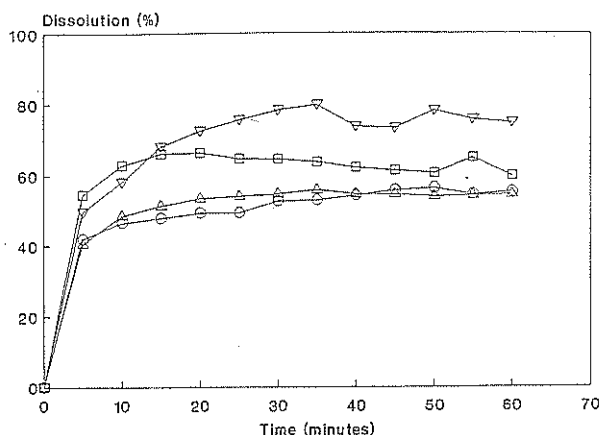


Figure 9. Dissolution rate profile in sink conditions in acid buffer medium for  $\circ$ , ABZ;  $\Delta$ , physical mixture in a 1:1 ratio;  $\nabla$ , coprecipitation complex in a 1:1 proportion; and  $\square$ , freeze-dried complex in a 1:1 ratio.

determined:  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ , and  $AUC_{0-6\text{ hr}}$ ; they are shown in Table 3. Significant differences ( $p < .05$ ) were obtained for the  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ , and  $AUC_{0-6\text{ hr}}$  values. When ABZ is administered as a liquid solution (HPCD complex), faster absorption is achieved than with the reference formulation of ABZ suspension. Similar results have been described previously using liquid solutions of ABZ solubilized by Transcutol (19) and with HPCD (20) and compared to suspensions.

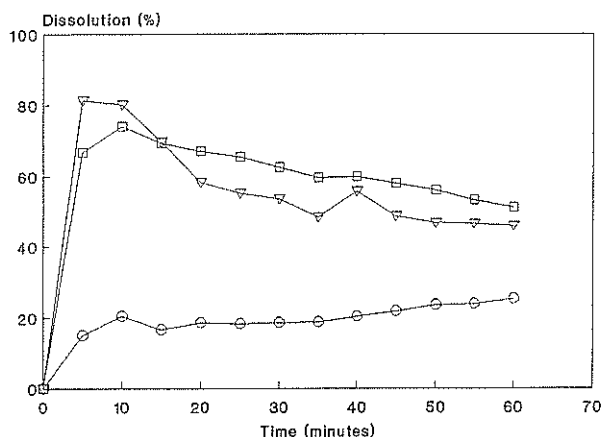


Figure 10. Dissolution rate profile in nonsink conditions in acid buffer medium for  $\circ$ , ABZ;  $\square$ , freeze-dried complex with HPCD in a 1:1 proportion; and  $\nabla$ , freeze-dried complex with MCD in a 1:1 ratio.

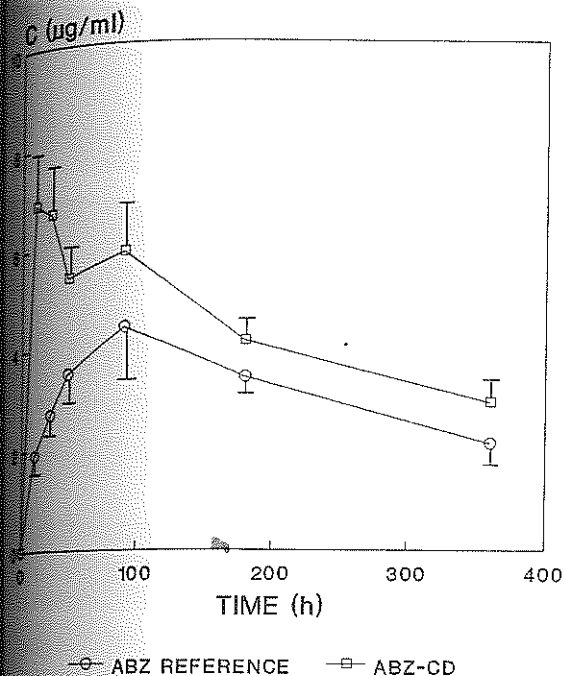


Figure 11. Mean plasma concentration-time profiles of RBZ for oral administration of two ABZ formulations equivalent to 50 mg ABZ/kg. Each point represents the average  $\pm$  SE of three experiments. The freeze-dried complex of ABZ with HPCD is in a 1:1 ratio.

## CONCLUSIONS

Anthelmintic: CyD complexes can be obtained to increase the solubility of different benzimidazole carbamate drugs. To this end, HPCD and MCD are better options than CD. The freeze-drying method is useful for obtaining true inclusion complexes. Meanwhile, the coprecipitation method is also useful for obtaining solid products, although no true inclusion complexes were obtained. Products obtained by freeze-drying and coprecipitation methods had better solubility characteristics than ABZ as a raw material. The bioavailability results show that ABZ: HPCD complexes had faster absorption than a

conventional ABZ suspension formulation. Furthermore, higher and significant ( $p < .05$ ) values of AUC and  $C_{max}$  were obtained.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dra. Torrellas (Smith-Kline Beecham) for the ABZ samples. We also thank Mr. C. Picornell (Chemo Ibérica) for the RBZ samples and Mrs. Espert (ISISA) for the MCD samples.

## REFERENCES

1. C. Villaverde, A. I. Alvarez, J. L. del Estal, and J. G. Prieto, *Dev. Pharmacol. Ther.*, 19, 27 (1992).
2. S. Torrado, S. Torrado, J. J. Torrado, and R. Cadórniga, *Int. J. Pharm.*, 140, 247 (1996).
3. S. Torrado, S. Torrado, R. Cadórniga, and J. J. Torrado, *Int. J. Pharm.*, 140, 45 (1996).
4. T. Higuchi and K. A. Connors, *Adv. Anal. Chem. Instrum.*, 4, 117 (1965).
5. M. L. López-García, S. Torrado, S. Torrado, A. R. Martínez, and F. Bolas, *Vet. Parasitol.*, 75, 209 (1998).
6. M. Rowland and T. N. Tozer, *Clinical Pharmacokinetics. Concepts and Applications*, Lea and Febiger, Philadelphia, 1989, pp. 459-463.
7. J. L. Blanco, J. Vila-Jato, F. Otero, and S. Anguiano, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 17, 943 (1991).
8. T. Loftsson and M. E. Brewster, *Pharm. Technol. Eur.*, 9, 26 (1997).
9. K. H. Fromming and J. Szejtli, *Cyclodextrins in Pharmacy*, Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 1994, p. 49.
10. T. Loftsson and M. E. Brewster, *J. Pharm. Sci.*, 85, 1017 (1996).
11. J. Zhu, Y. Yang, and S. A. Botha, *Pharm. Res.*, 12, S-199 (1995).
12. S. Ismail, *STP Pharma Sci.*, 1, 321 (1991).
13. S. Ismail, *STP Pharma Sci.*, 2, 181 (1992).
14. M. Fernández, M. V. Margarit, I. C. Rodríguez, and M. Cerezo, *Int. J. Pharm.*, 98, 29 (1993).
15. M. Sugimoto, T. Okagaki, S. Narisawa, Y. Koida, and K. Nakajima, *Int. J. Pharm.*, 160, 11 (1998).
16. G. F. Palmieri, D. Galli-Angeli, G. Giovannucci, and S. Martelli, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 23, 27 (1997).
17. M. Pedersen, S. Bjerregaard, J. Jacobsen, A. R. Laarsen, and A. M. Sorensen, *Int. J. Pharm.*, 165, 57 (1998).
18. M. Pedersen, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 23, 331 (1997).
19. S. Torrado, M. L. López, G. Torrado, F. Bolas, S. Torrado, and R. Cadórniga, *Int. J. Pharm.*, 156, 181 (1997).
20. B. Evrard, P. Chiap, G. Piel, T. Van Hees, F. Ghalimi, B. Losson, and L. Delattre, abstract 3-P-8, Ninth International Symposium on Cyclodextrins, Santiago de Compostela, May 31-June 3, 1998.

Table 3

### Bioavailability Results

Formulation	$T_{max}$ (hr)	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	AUC <sub>0-6</sub> ( $\mu\text{g hr/ml}$ )
ABZ:HPCD	0.33 (0.14)	7.6 (0.68)	26.17 (2.7)
ABZ reference	1.25 (0.43)	4.51 (0.6)	18.7 (2.1)

# IMPROVING BIOAVAILABILITY AND ANTHELMINTIC ACTIVITY OF ALBENDAZOLE BY PREPARING ALBENDAZOLE-CYCLODEXTRIN COMPLEXES

GARCÍA-RODRIGUEZ J.J.\*, TORRADO J.\*\* & BOLÁS F.\*

## Summary :

The bioavailability and anthelmintic activity of albendazole-cyclodextrin complexes (ABZ-CDC) compared to albendazole suspensions in carboxymethylcellulose (ABZ-CMC) was assessed in a mouse model for *Trichinella* infections. Swiss CD-1 mice experimentally infected with *T. spiralis* were treated with both formulations against enteral (adult worms) and parenteral (migrating and encysted larvae). Oral bioavailability was assessed in age matched mice treated with 50 mg/kg of both formulations. The anthelmintic effects and plasma concentration of the active metabolite albendazole-sulphoxide (ABZSO) enantiomer (-) were significantly increased following administration of ABZ-CDC in relation to ABZ-CMC.

**KEY WORDS :** albendazole, bioavailability, *Trichinella*, cyclodextrins.

Albendazole (ABZ) is a broad spectrum antiparasitic drug acting against protozoa and helminth parasites. Following oral administration ABZ is quickly biotransformed in its active intermediate metabolite albendazole-sulphoxide (ABZSO) which subsequently is oxidized to the inactive form of sulphone (ABZSO<sub>2</sub>) (Gyurik *et al.*, 1981). ABZSO exhibits chirality with two enantiomeric forms present in plasma (Delatour *et al.*, 1990). As other benzimidazole-carbamates ABZ is poorly soluble in water and therefore its absorption by the oral tract is reduced (Villaverde *et al.*, 1992). In the present paper the oral bioavailability and anthelmintic activity of ABZ formulated as solid complexes in hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (ABZ-CDC) was evaluated in a mouse model for experimental trichinellosis.

## MATERIAL AND METHODS

### PARASITE

The MFEL/ES/S2 GM-1-ISS48 isolate of *T. spiralis* was used. The methods for infection and worm collection were those described by Denhan & Martínez (1970).

Departamento de Parasitología\* y Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica\*\*. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Spain.

Tel.: 34-91- 394 18 18 - Fax: 34-91-394 18 15

E-mail: bolás@eucomax.sim.ucm.es

## DRUGS AND FORMULATIONS

ABZ was supplied by Chemo Iberica Co (Spain). ABZ suspension was prepared in 0.5 % sodium-carboxymethylcellulose (ABZ-CMC). ABZ-CDC were prepared by the co-precipitation and freeze-drying methods (Castillo *et al.*, 1999)

## INFECTIONS AND TREATMENTS

Swiss CD-1 mice aged eight weeks were purchased from Charles River, France. For anthelmintic assays animals were each infected with 300 larvae of *T. spiralis* and then orally treated with albendazole against three different stages of the life cycle as summarised in table I.

Stage	Dose (mg/kg)	Treatment (Days p.i.)	Worm counting (Days p.i.)
Adult	5, 10	1	6
Migrating larvae	50, 100	13, 14, 15	30
Encysted larvae	50, 100	35, 36, 37	45

Table I. - Treatment schedule.

## ORAL BIOAVAILABILITY

Age matched animals to those used for infection were treated with 50 mg/kg of ABZ-CMC or ABZ-CDC. Thereafter, five mice per each sample point were anaesthetised with 15 % urethan solution and their blood collected from the heart by cardiac puncture at points 0.25, 0.5, 0.75, 1.5, 3, 6, 24, 48 and 72 hours post-treatment and the corresponding sera individually tested for ABZ, ABZSO (+, -) and ABZSO<sub>2</sub> metabolites by HPLC (García J.J. *et al.*, 1999).

## RESULTS

The pharmacokinetic profiles of ABZSO following administration of ABZ-CMC and ABZ-CDC is shown in Fig. 1. Absorption was quicker when

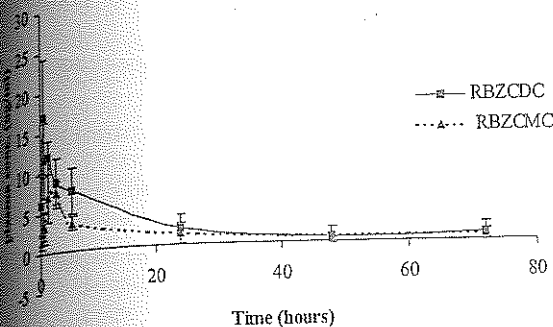


Fig. 1. - Plasma concentrations of ABZSO in plasma of mice following oral administration of 50 mg/kg of ABZ-CMC or ABZ-CDC. Each point represent the Mean  $\pm$  standard deviation of five samples.

ABZ was included in CDC than when suspended in CMC (ABZSO  $T_{max}$  = 0.5 h and 3 h respectively). ABZSO plasma concentrations achieved were significantly higher following administration of ABZ-CDC than ABZ-CMC ( $C_{max}$  = 16.96  $\mu$ g/ml and 7.53  $\mu$ g/ml,  $AUC_{0-24}$  = 78.185  $\mu$ g.h/ml and 34.296  $\mu$ g.h/ml, respectively). Plasma concentrations of ABZ and ABZSO were at the base level (data not shown). Administration of ABZ-CDC significantly increases the proportion of the more abundant enantiomer ABZSO (Figs 2 and 3). Comparison of anthelmintic effects of both formulations is summarised in Fig. 4.

DISCUSSION

Results from this work show that cyclodextrins are good drug formulating devices as significant higher bioavailability of ABZSO is achieved when ABZ is administered included in cyclodextrin in relation to conventional suspension in CMC. The higher plasma concentrations for ABZSO following treatment with ABZ-CDC could result in the increased anthelmintic effects against all stages of *Trichinella* life cycle, specially those against intestinal and muscular stages. This improvement in pharmacokinetics as well as in anthelmintic effects of ABZ-CDC against intestinal stages is comparable to that obtained with ABZ formulated in solid dispersion in PVP (Lopez *et al.*, 1997) however ABZ-CDC complexes are easier to prepare and of higher chemical stability. The enantiomeric profiles of ABZSO are similar to those previously reported in mice (García *et al.*, 1999) and in rats (Delatorre *et al.*, 1990). The proportion of the supposed more abundant enantiomer (-) is significantly increased following administration of ABZ-CDC with respect to ABZ-CMC. This could indicate that this form is the main responsible for anthelmintic activity.

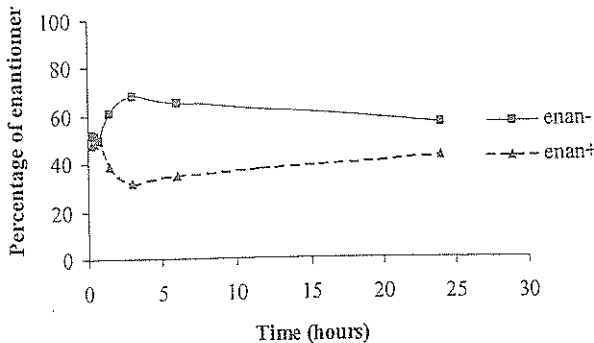


Fig. 2. - Enantiomeric separation of ABZSO in plasma of mice following oral administration of 50 mg/kg of ABZ-CMC. Each point represent the mean of five samples.

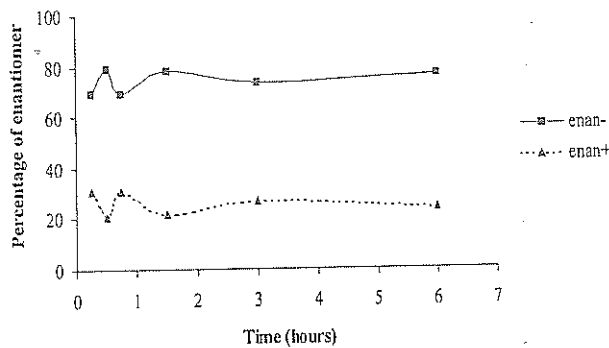


Fig. 3. - Enantiomeric separation of ABZSO in plasma of mice following oral administration of 50 mg/kg of ABZ-CDC. Each point represent the mean of five samples.

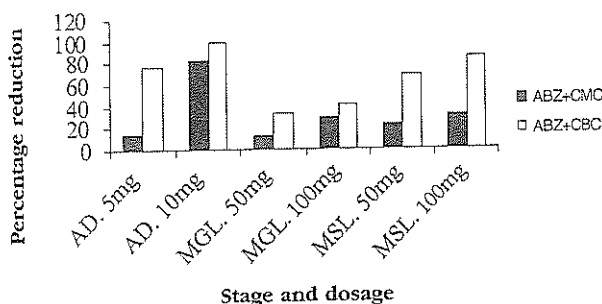


Fig. 4. - Anthelmintic activities of ABZ-CMC and ABZ-CDC against different stages of *T. spiralis* in mice (AD: Adult worms, MGL: Migrating larvae; MSL: Encysted muscle larvae).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was founded by project FIS n° 99/0118

## REFERENCES

- CASTILLO J.A., PALOMO-CANALES J., GARCIA J.J., LASTRES J.L., BOLAS, F. & TORRADO J.J. Preparation and characterization of albendazole  $\beta$ -cyclodextrin complexes. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1999, 25, 1241-1248.
- DELATOUR P., BENOIT E., CAUDE M. & TAMBUTE A. Species differentiating the generation of the chiral sulphoxide metabolite of albendazole in sheep and rats. *Chirality*, 1990, 2, 156-160.
- DENHAM D. & MARTINEZ A.R.M. Studies with methyridine and *Trichinella spiralis*. II. The use of the drug to study the rate of larval production in mice. *Journal of Helminthology*, 1970, 44, 357-363.
- GARCIA J.J., BOLAS-FERNANDEZ F. & TORRADO J.J. Quantitative determination of albendazole and its main metabolites in plasma. *Journal of Chromatography B*, 1999, 723, 265-271.
- GYURIK R. J., CHOW A.W., ZABER B., BRUNER E.L., MILLER J. A., VILLANI A.J., PETKA L.A. & PARISH R.C. Metabolism of albendazole in cattle, sheep, rats and mice. *Drug metabolism and disposition*, 1981, 9, 503-508.
- LOPEZ M.L., TORRADO S., TORRADO S., MARTINEZ A.R. & BOLAS F. Improvement of albendazole efficacy against enteral, but not against parenteral stages of *Trichinella spiralis* by preparing solid dispersion in polyvinylpyrrolidone. *Chemotherapy*, 1997, 43, 430-435.
- VILLAVERDE C., ALVAREZ I., DEL ESTAL J.L. & PRIETO J.G. Albendazole and mebendazole uptake by isolated enterocytes. *Dev. Pharmacol. Ther.*, 1992, 19, 27-31.



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

international  
journal of  
pharmaceutics

International Journal of Pharmaceutics 250 (2003) 351–358

[www.elsevier.com/locate/ijpharm](http://www.elsevier.com/locate/ijpharm)

## Bioavailability and efficacy characteristics of two different oral liquid formulations of albendazole

Juan José García<sup>a</sup>, Francisco Bolás<sup>a</sup>, Juan José Torrado<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal, 28040 Madrid, Spain

Received 19 December 2001; received in revised form 17 July 2002; accepted 8 October 2002

### Abstract

The oral bioavailability and anthelmintic efficacy in mice of a new formulation of albendazole (ABZ) dissolved in a solution of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HPCD) are compared with a conventional ABZ suspension of carboxymethylcellulose. Plasma concentrations of ABZ and albendazole sulphoxide (ABZ-SO), its active and main metabolite, were assayed by HPLC. The  $AUC_{0-\infty}$  and  $C_{max}$  values obtained for both ABZ and ABZ-SO, after administration of the ABZ-HPCD solution were significantly higher ( $P < 0.01$ ) than those obtained from the ABZ suspension. Although, the differences between the ABZ and ABZ-SO- $T_{max}$  values were found not to be significant, regardless of the formulation. The anthelmintic activities against enteral (pre-adult) and parenteral (migrating and encysted larvae) stages of *Trichinella spiralis* were studied in mice. The ABZ solution was more efficient against pre-adult and encysted larvae than the ABZ suspension. The efficacy differences between both formulations against the migrating larvae, were found to be not significant ( $P < 0.05$ ). For the migrating parasite stage, there was a linear correlation between the anthelmintic activity and pharmacokinetic parameters with respect to the ABZ- $AUC_{0-\infty}$  value. Meanwhile, for the muscular encysted parasite stage, better relationships were obtained for  $AUC_{0-\infty}$  and  $C_{max}$  values from ABZ-SO, which had correlation coefficients of 0.996 and 0.987, respectively.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Albendazole; Bioavailability; Activity; Efficacy; Cyclodextrin; Pharmacokinetic

### 1. Introduction

Albendazole (ABZ), methyl [5-(propyl-thio)-1-H-benzimidazole-2-yl] carbamate, is a broad spectrum anthelmintic drug with low aqueous solubility, which may limit its oral absorption (Jung et al., 1998). In order to prepare ABZ solutions, different formulation approaches have been ex-

\* Corresponding author. Tel.: +349-13-94-1727; fax: +349-13-94-1736

E-mail address: [torradol@farm.ucm.es](mailto:torradol@farm.ucm.es) (J.J. Torrado).

perimented in the last years. For instance, since ABZ is basic in nature, its solubility could be increased by ionisation in an acid medium, although this increase in solubility is not enough for the preparation of high ABZ concentration doses. Another way of increasing its solubility is by addition of surfactant agents, such as polysorbate and bile salts, or cosolvent agents, like Transcutol® (Torrao et al., 1996a, 1997; Rondono et al., 1998). Some of these excipients may also have some absorption enhancer effects, which can be useful on increasing the oral bioavailability of ABZ formulations. Unfortunately, many of these agents can also be irritant to the digestive system linings and so its use must be restricted, whenever possible. Alternatively, the ABZ solubility can be improved by elaboration of solid dispersions with polyvinylpyrrolidone (Torrao et al., 1996b; Lopez et al., 1997); although the elaboration method, rotatory evaporator and the use of organic co-solvents, and the high quantity/concentrations of the complexing agent are the application limiting factors for these products. Recently, the use of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HPCD), has facilitated the formulation of high concentration of ABZ solutions (Castillo et al., 1999; Piel et al., 1999).

The aim of this paper, is to compare the bioavailability and anthelmintic activities/characteristics of HPCD-ABZ solution-formulation to a conventional reference ABZ suspension in sodium carboxymethylcellulose. Moreover, the correlation between the bioavailability and anthelmintic efficacy was studied. Thus, different doses of ABZ (50–100 mg/kg) were orally administered to mice and blood samples were taken for analysis of ABZ concentration and its main metabolites by HPLC (García et al., 1999). Furthermore, the anthelmintic activity of ABZ formulations was studied in the *Trichinella spiralis* model in mice at three different stages (pre-adult, migrating and encysted larvae) of the parasite infection. This in vivo model allows us to study the efficacy at both the enteral stage (pre-adult) and at the parenteral stage (migrating and encysted larvae). Therefore, the model can be used to verify whether a certain formulation might be indicated for various stages of helminthic infections or not (López-García et al., 1997, 1998).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

ABZ and albendazole sulphone (ABZ-SO<sub>2</sub>) were kindly supplied by Glaxo-Smithkline (England). Albendazole sulphoxide (ABZ-SO) was a gift from Chemo Ibérica (Madrid, Spain). HPCD was supplied by Cerestar Ibérica (Barcelona, Spain). All the products and materials used in this study comply with the pharmaceutical and analytical standards, respectively.

### 2.2. ABZ formulations (8 mg/ml) and determination of dispensing error

- ABZ solution was prepared by dissolution of ABZ in a solution of 20% (w/v) HPCD in 0.2 M HCl. The final pH of the solution was 0.92.
- ABZ suspension was prepared in 0.5% (w/v) sodium-carboxymethylcellulose of low viscosity grade (Panreac, Spain).

Dispensing error was determined by injecting/dosing ten samples. In order to achieve an adequate homogeneity the ABZ suspension was stirred by means of a magnetic stirrer while sampling. Then, the samples were assayed by HPLC and the coefficient of variation of the mean value was used as the dispensing error.

### 2.3. Oral bioavailability study

Swiss CD-1 mice weighing 30–35 g were employed. Food and water were supplied ad libitum. The formulations were administered orally via bucco-gastric tube. Each ABZ dosage form (solution or suspension) was administered at doses of 50 and 100 mg/kg. After drug administration, the mice were divided into groups of at least six, and later the animals were sacrificed and blood samples were collected at the following time intervals: 0.25, 0.5, 0.75, 1.5, 3, 6 and 24 h. Lastly, the blood samples were heparinized and centrifuged individually. After the extraction process, the blood samples were frozen until HPLC analysis.

### 2.3.1. HPLC analysis

A modular liquid chromatograph equipped with a Gilson 305 and 306 isocratic pump, an automatic sampler (Gilson 231 XL) fitted to a 100  $\mu$ l sampler loop (Rheodyne), a variable wavelength detector (UV-1575, JASCO) and an integrator (Spectra-Physics SP-270) was used.

In order to precipitate proteins, 2 ml of methanol were added to each aliquot (0.4 ml) of plasma sample. After vortex-mixing for 1 min, samples were centrifuged at  $3000 \times g$  for 10 min and filtered through PVDF Durapore<sup>®</sup> 0.45  $\mu$ m filter (Millipore). In order to quantify ABZ concentration, 100  $\mu$ l of the filtered aliquot-fractions were injected into the HPLC system.

The ABZ assay was conducted according to the HPLC methods described in USP 24 (2000), using a 5  $\mu$ m C<sub>18</sub> (Hypersil<sup>®</sup>) 250  $\times$  4.6 mm column and a mobile phase containing 5.5 g of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dissolved in 400 ml of water and mixed with 600 ml of methanol at a flow rate of 1 ml/min. Samples were analysed at 291 nm. Under these conditions, the retention time was 15 min. Validation data for the method can be summarised as follows, the linearity was studied at the range between 0.01–1  $\mu$ g/ml and the correlation coefficients were approximately 0.99. The obtained ABZ quantitation limit (signal-to-noise ratio = 5) and inter-day precision were 4 ng/ml and 2.9%, respectively.

ABZ-SO and ABZ-SO<sub>2</sub> are the two main metabolites of ABZ and both of them were assayed basing on the method previously described by Garcia et al. (1999). Hypersil<sup>®</sup> BDS ODS2 column (250  $\times$  4.6mm, 5  $\mu$ m) and a mobile phase containing 800 ml of water with 188  $\mu$ l of phosphoric acid 85% and 200 ml of acetonitrile at a flow rate of 1.5 ml/min were used. The obtained samples were measured at 290 nm. Under these conditions, the retention times were 8.5 and 13 min for ABZ-SO and ABZ-SO<sub>2</sub>, respectively. Validation data for the method are summarised as following, the linearity was studied in the range between 0.01 and 1  $\mu$ g/ml and the obtained correlation coefficients were approximately 0.99. The quantitation limits for ABZ-SO and ABZ-SO<sub>2</sub> (signal-to-noise ratio = 5), were 13 and 10 ng/ml, respectively. Whilst, the inter-day precision were 4

and 4.4%, for ABZ-SO AND ABZ-SO<sub>2</sub>, respectively.

In order to proceed with the quantitative assay on (+)ABZ-SO and (–)ABZ-SO, the samples were first assayed by the previously described non-chiral procedure and liquid samples were collected in accordance with the ABZ-SO retention time. Then, the samples were concentrated to dryness in vacuum at 70 °C using a Savant Speedvac<sup>®</sup> concentrator. Then the samples were dissolved in 1 ml of mobile phase and filtered through PVDF Durapore<sup>®</sup> 0.45  $\mu$ m filter (Millipore). The chiral assay was performed according to the method previously described by Garcia et al. (1999). A chiral-AGP column (100  $\times$  4 mm, 5  $\mu$ m) and a mobile phase containing sodium phosphate buffer (8 mM, pH 7.0) with 1.25 ml of 2-propanol at a flow rate of 0.9 ml/min were used. The collected samples were analysed at 290 nm. Under these conditions, retention times for (–)ABZ-SO and (+)ABZ-SO were 2.0 and 3.1 min, respectively. The validation data for the chiral assay method can be summarised as follows: the linearity studied in the range between 0.01 and 1  $\mu$ g/ml and the obtained correlation coefficients were at least 0.99. On the other hand, the (–)ABZ-SO and (+)ABZ-SO quantitation limit and inter-day precision for the two enantiomers are similar such that 3 ng/ml and 3.5%, respectively.

### 2.3.2. Bioavailability parameters

$T_{\max}$  and  $C_{\max}$  were estimated as the mean values of time ( $T_{\max}$ ) taken to achieve maximum plasma concentrations ( $C_{\max}$ ) for the six mice with the highest ABZ plasma concentration for each administered formulation. The  $AUC_{0-\infty}$  was calculated, for ABZ and ABZ-SO, as the sum of  $AUC_{0-24}$  and  $AUC_{24-\infty}$ . Also, the  $AUC_{0-24}$  was calculated by the trapezoidal rule method and  $AUC_{24-\infty}$  was estimated as the quotient between  $C_{24}$  and  $K_e$ . The  $K_e$  was calculated as the slope, from the final phase of the log concentration–time curves. Comparative statistical studies on the bioavailability between the two formulations were performed by a one-way analysis of variance (ANOVA) test, and the possible correlation between the bioavailability parameters and the anthelmintic efficiency was studied by linear

correlation analysis and the corresponding correlation coefficients were estimated (Statgraphics, version 4.0).

#### 2.4. Evaluation of the efficacy of ABZ dosage forms on *Trichinella spiralis* model

The GM-1 isolate of *T. spiralis* was used. The isolate was isoenzymatically identified at *T. spiralis* (Reference Centre for Trichinellosis Istituto Superiore di Santá, Rome) and kept under the code MFEL/ES/S2 GM-1-ISS48 (La Rosa et al., 1992). In order to evaluate the anthelmintic activity of the formulations, groups of ten mice per treatment-dose were orally infected with  $300 \pm 50$  L1 muscle larvae isolated from infected mice carcasses, following an artificial digestion as described by Martínez-Fernández (1978). The same doses of ABZ formulations (suspension or solution) were administered orally by buccogastric tube. Groups of ten mice per formulation and parasite stage were kept as controls, and were administered with vehicle alone. Treatments were applied at three different stages (pre-adult, migrating larvae and encysted larvae) of the parasite. For the pre-adult parasite stage, the formulations were administered 24-h post-infection (p.i.) at 5 and 10 mg/kg.

For treatment of the migrating larvae, first of all, it was necessary to remove the adults remaining in the gut without affecting the migratory new born larvae (Denham and Martínez, 1970). This was achieved by treating both, the control and experimental groups, on day 9 p.i., with trichophon (Neguvon, Bayer S.A., Spain) at 90 mg/kg administered orally plus one intramuscular injection of atropine sulphate (Bayer S.A.), at 1 mg/kg. Later on, the ABZ formulations were administered at 50 and 100 mg/kg on days 13, 14 and 15 p.i. Treatment against encysted larvae was given at 50 and 100 mg/kg, on days 34, 35 and 36 p.i.

The effectiveness of the treatment against pre-adult stages was assessed on day 6 p.i., after sacrificing the mice (previously anaesthetised with ether) by cervical dislocation. The numbers of adult worms remaining in the gut were collected and counted in accordance with the method described by Denham and Martínez (1970).

The measurement of drug effects on the migrating larvae, was carried out on day 30 p.i. by sacrificing the mice; the animals were skinned, eviscerated and their carcasses processed to free the muscle larvae, as described by Martínez-Fernández (1978). A similar procedure was followed for the estimation of the drug effectiveness against the encysted larvae, except that the animals sacrifice and larval counting were carried out on day 46 p.i.

The comparative statistical anthelmintic efficiency studies between the different drug formulations were performed by paired student *t*-test. A *P* value of less than 0.05 was considered as significant.

### 3. Results and discussion

Fig. 1 shows the mean ABZ drug concentrations after the oral administration of the two different liquid formulations at doses of 50 and 100 mg/kg. It is clear from this figure that the cyclodextrin solution improves ABZ oral bioavailability in relation to the conventional oral suspensions. Due to fast ABZ degradation rate, its plasma concentrations are very low. Under our experimental conditions, its apparent elimination constant was  $0.33 \pm 0.1$  per h. For this reason, in our previous studies, the bioavailability of different ABZ drug formulations has been studied by using the ABZ-SO concentration data, which is its main

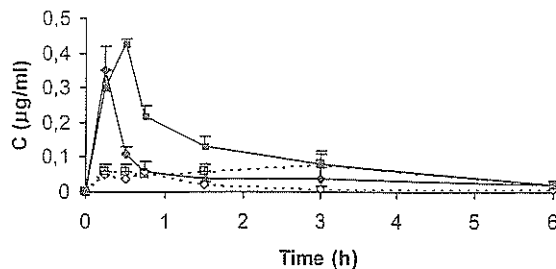


Fig. 1. Mean ABZ plasma concentration-time profiles after oral administration of two ABZ formulations at doses of 50 and 100 mg/kg. Each point represent the average  $\pm$  S.D. of six experiments. Key:  $\blacklozenge$ , solution at 50 mg/kg;  $\diamond$ , suspension at 50 mg/kg;  $\blacksquare$ , solution at 100 mg/kg and  $\square$ , suspension at 100 mg/kg.

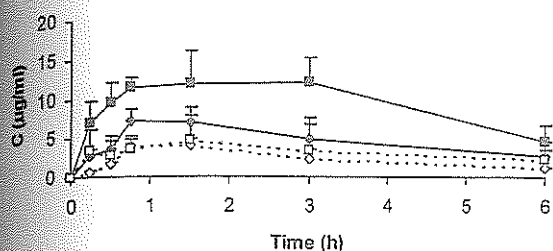


Fig. 2. Mean ABZ-SO plasma concentration–time profiles after oral administration of two ABZ formulations at doses of 50 and 100 mg/kg. Each point represents the average  $\pm$  S.D. of six experiments. Key:  $\blacklozenge$ , solution at 50 mg/kg;  $\diamond$ , suspension at 50 mg/kg;  $\blacksquare$ , solution at 100 mg/kg and  $\square$ , suspension at 100 mg/kg.

active metabolite (Torrado et al., 1997). Fig. 2, shows the ABZ-SO plasma levels for the ABZ solution and suspension formulations for the two studied doses. These results are similar to those reported for ABZ, since high drug concentrations were obtained from the administration of cyclodextrin liquid solutions compared with the ABZ suspensions. But ABZ-SO is a chiral molecule with two enantiomers that may have different activity. Therefore, for comparative purposes, it is important to study their proportions at different time-intervals, in order to verify the possible drug formulation effect on the ABZ-SO enantiomeric proportions. Fig. 3 shows how after the oral administration of the different ABZ formulations to mice, the (–)ABZ-SO enantiomer results in a slower drug degradation rate compared with the (+)ABZ-SO enantiomer and hence the (–)ABZ-SO becomes the predominant enantiomeric form in vivo. These proportions are similar to those previously reported in rats (Delatour et al., 1990a, 1991a), and more recently in mice (Garcia et al., 1999). The (–)ABZSO enantiomer is predominant in rats and mice, while (+)ABZSO is predominant in sheep, goats, dogs, cattle and man (Delatour et al., 1990a,b, 1991a,b; Benoit et al., 1992). Under our experimental conditions, no significant differences ( $P < 0.05$ ) in respect to the ABZ-SO enantiomeric proportions, were found among the formulations. Consequently, the mean ABZ-SO results can be used for the correlation studies between bioavailability and efficiency.

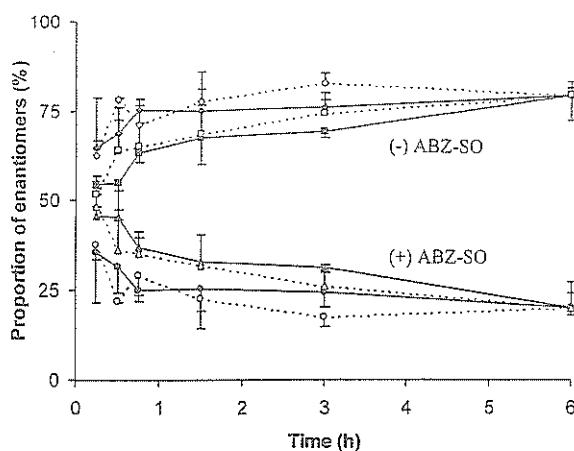


Fig. 3. Evolution vs. time of the enantiomeric proportions (%) of the ABZ-SO enantiomers in mouse plasma (mean values and S.D. of six animals) for the two formulations at the doses of 50 and 100 mg/kg. Key:  $\blacklozenge$ , (–)ABZ-SO solution at 50 mg/kg;  $\diamond$ , (–)ABZ-SO suspension at 50 mg/kg;  $\blacksquare$ , (–)ABZ-SO solution at 100 mg/kg;  $\square$ , (–)ABZ-SO suspension at 100 mg/kg;  $\bullet$ , (+)ABZ-SO solution at 50 mg/kg;  $\circ$ , (+)ABZ-SO suspension at 50 mg/kg;  $\blacktriangle$ , (+)ABZ-SO solution at 100 mg/kg and  $\triangle$ , (+)ABZ-SO suspension at 100 mg/kg.

Low ABZSO<sub>2</sub> concentrations were obtained after the HPLC assay, usually less than 5% of the ABZSO value. In order to simplify the manuscript the plasma concentrations of the inactive ABZSO<sub>2</sub> are not included.

Finally, Fig. 4 shows the anthelmintic efficacy results for both formulations, ABZ solution and suspension, in the three different *T. spiralis* stages: adult worms, migrating and encysted larvae. In terms of efficacy, there is a significant improvement ( $P < 0.05$ ), when ABZ solution was used compared with ABZ suspension at the adult worms and encysted larvae stages. The effect of the ABZ solution against encysted larvae is of great importance, since this formulation can be useful for treatment of inoperable or disseminated cases of other systemic helminthic infections such as hydatidosis or neurocysticercosis. The anthelmintic activity of both formulations against the enteral parasite stages could be related to their bioavailability properties.

Tables 1 and 2 show the effectiveness, expressed as the mean percentages of parasites reduction, and some bioavailability parameters,  $AUC_{0-\infty}$ ,

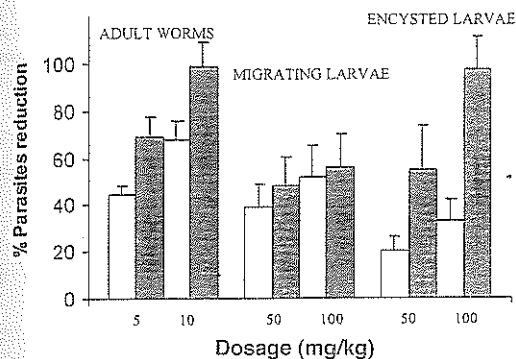


Fig. 4. Antiparasitic efficacy results expressed as the percentages of reduction in parasite loads obtained for the two formulations, ABZ solution (white bars); and ABZ suspension (white/crossed bars), at different doses on the three *T. spiralis* life stages. The values are expressed as the mean and standard deviation for ten animals.

$T_{max}$  and  $C_{max}$  for ABZ and ABZ-SO, for the two liquid formulations at the two assayed doses. From these studies, it is evident that the HPCD solution with respect to CMC suspension, significantly ( $P < 0.01$ ) increases the  $AUC_{0-\infty}$  and  $C_{max}$  values for both ABZ and its main active metabolite ABZ-SO, though the  $T_{max}$  values for both ABZ and ABZ-SO were no significantly different ( $P < 0.05$ ). Similar bioavailability characteristics

of ABZ liquid formulations has previously been reported (Castillo et al., 1999; Evrard et al., 1998; García-Rodríguez et al., 2001).

The correlation coefficients between the bioavailability parameters and the anthelmintic efficacy for the migratory and encysted parasite stages are also shown in Tables 1 and 2. It is also clear that  $T_{max}$  can not be adequately correlated with the activity/drug efficacy tested on the two studied infection stages. However, the  $AUC_{0-\infty}$  and  $C_{max}$  values, under certain conditions could be well correlated with the anthelmintic activity. Previously, López-García et al. (1997), showed that ABZ has a more potent anthelmintic activity than its active metabolite ABZ-SO. According to this criteria, a better correlation between activity and ABZ bioavailability parameters would be expected than between activity and ABZ-SO pharmacokinetic parameters. For the migrating parasite stage there was neither significant ( $P < 0.05$ ) improvement effect between the two tested liquid formulations nor the ABZ-SO pharmacokinetic characteristics/parameters have good correlation with the activity, but the ABZ- $AUC_{0-\infty}$  could be significantly correlated with activity.

However, for the muscular parasite stage, both the  $AUC_{0-\infty}$  and  $C_{max}$  values of ABZSO are better linearly correlated with activity than the ABZ bioavailability parameters. The possible explanation for this better correlation relationship

Table 1

Correlation between the anthelmintic efficiency on the *T. spiralis* at the migrating stage and the bioavailability properties, for both ABZ and its main active metabolite ABZ-SO, for two liquid formulations of ABZ: as suspension in CMC and solution of HPCD, at two doses (50 and 100 mg/kg)

	Efficiency reduction (%)	ABZ			ABZ-SO		
		$AUC_{0-\infty}$ ** ( $\mu\text{g h/ml}$ )	$C_{max}$ ** ( $\mu\text{g/ml}$ )	$T_{max}$ (h)	$AUC_{0-\infty}$ ** ( $\mu\text{g h/ml}$ )	$C_{max}$ ** ( $\mu\text{g/ml}$ )	$T_{max}$ (h)
CMC-50	39.2	0.20	0.07	0.5	30.9	4.8	1.25
HPCD-50	48.4	0.49	0.35	0.25	57.2	7.9	1.75
CMC100	51.9	0.73	0.09	0.75	42.4	5.1	2
HPCD-100	55.8	0.99	0.39	0.33	100.2	14.4	1.75
Correlation coefficient	-	0.97*	0.61	-0.07	0.79	0.7	0.83

The possible statistical significant differences between the bioavailability parameters ( $AUC$ ,  $C_{max}$  and  $T_{max}$ ) obtained either from CMC or HPCD formulations were studied by ANOVA test, while the possible correlation between these bioavailability parameters and the anthelmintic efficiency were studied by linear correlation. Key: \*, Significant ( $P < 0.05$ ); \*\*, significant ( $P < 0.01$ ).

Table 2  
Correlation between the anthelmintic efficiency on the *T. spiralis* encysted larval stage and the bioavailability properties, for both ABZ and its main active metabolite ABZ-SO, for two liquid formulations of ABZ: as suspension in CMC and solution of HPCD, at two doses (50 and 100 mg/kg)

	Efficiency reduction (%)	ABZ			ABZ-SO		
		AUC <sub>0-∞</sub> ** (µg h/ml)	C <sub>max</sub> ** (µg/ml)	T <sub>max</sub> (h)	AUC <sub>0-∞</sub> ** (µg h/ml)	C <sub>max</sub> ** (µg/ml)	T <sub>max</sub> (h)
CMC-50	19.9	0.20	0.07	0.5	30.9	4.8	1.25
HPCD-50	55.1	0.49	0.35	0.25	57.2	7.9	1.75
CMC100	33.0	0.73	0.09	0.75	42.4	5.1	2
HPCD-100	97.5	0.99	0.39	0.33	100.2	14.4	1.75
Correlation coefficient	-	0.81	0.90	-0.59	0.99**	0.99*	0.35

The possible statistical significant differences between the bioavailability parameters (AUC, C<sub>max</sub> and T<sub>max</sub>) obtained either from CMC or HPCD formulations were studied by ANOVA test, while the possible correlation between these bioavailability parameters and the anthelmintic efficiency were studied by linear correlation. Key: \*, Significant ( $P < 0.05$ ); \*\*, significant ( $P < 0.01$ ).

between ABZ-SO anthelmintic activity and pharmacokinetic parameters on the encysted larvae stage with respect to ABZ, may be related to the differences in drug concentration and elimination constants. In Figs. 1 and 2, we can observe that there are higher plasma concentration and lower elimination constant values for ABZ-SO than ABZ. As a result, higher AUC<sub>0-∞</sub> values are obtained for the ABZ-SO than for ABZ (see Tables 1 and 2). The AUC higher values (ca. 108 times) may sufficiently compensate the observed differences on activity. Moreover, the longer permanence of the ABZ-SO molecules in the body may facilitate the access to the muscular encysted parasites, and hence justifying its better correlation with anthelmintic activity.

Another important difference between the two liquid formulations, is the significant ( $P < 0.01$ ) low value of the dispensing error for the solution in comparison to the suspension. The syringe volumetric error during the solution dispensing is 1.3%, and the dispensing error for the suspension formulation is 12.4%, since suspension stirring during dispensing process, alone, is not sufficient enough to achieve a uniform solution. Nevertheless, this difference on dispensing process between the formulations does not have a clear cut effect on the in vivo results, due to the high variation coefficients of the drug concentrations (usually around 20%), regardless of the administered formulation. The variation coefficients for

the anthelmintic activity between are close to 30%, which are higher than those obtained for the drug concentrations. Even though, the variation coefficients for the anthelmintic activity between both types of liquid formulations, are similar.

In conclusion, the ABZ liquid solution elaborated with HPCD has higher AUC<sub>0-∞</sub> and C<sub>max</sub> values than the ABZ suspension. The liquid solution is significantly ( $P < 0.05$ ) more active against *T. spiralis* infection at the enteral and muscular stages than the conventional CMC suspension. On the other hand, for the migrating parasite infection stage, the best correlation coefficient between activity and bioavailability parameters/characteristics are obtained from the ABZ-AUC<sub>0-∞</sub> value. Meanwhile, for the muscular parasite infection stage, better correlation coefficients between ABZ-SO activity and pharmacokinetic parameters/characteristics is obtained for the AUC<sub>0-∞</sub> and C<sub>max</sub> values. Contrary, the T<sub>max</sub> values seem to have no linear correlation with the anthelmintic effects.

#### Acknowledgements

We thank Dr Torrellas (Glaxo-Smithkline), C. Picornell (Chemo Ibérica) and J. Guerrero (Cere-star Ibérica) for kindly supplied us with different materials.

## References

- Benoit, E., Besse, S., Delatour, P., 1992. Effect of repeated doses of albendazole on enantiomerism of its sulfoxide metabolite in goats. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1663–1665.
- Castillo, J.A., Palomo-Canales, J., García, J.J., Lastres, J.L., Torrado, J.J., 1999. Preparation and characterization of albendazole  $\beta$ -cyclodextrin complexes. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25, 1241–1248.
- Delatour, P., Benoit, E., Caude, M., Tambute, A., 1990a. Species differences in the generation of the chiral sulfoxide metabolite of albendazole in sheep and rats. *Chirality* 2, 156–160.
- Delatour, P., Benoit, E., Garnier, F., Besse, S., 1990b. Chirality of the sulfoxide metabolites of fenbendazole and albendazole in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 13, 361–366.
- Delatour, P., Benoit, E., Besse, S., Boukraa, A., 1991a. Comparative enantioselectivity in the sulfoxidation of albendazole in man, dogs and rats. *Xenobiotica* 21, 217–221.
- Delatour, P., Garnier, F., Benoit, E., Caude, I., 1991b. Chiral behaviour of the metabolite albendazole sulfoxide in sheep, goats and cattle. *Res. Vet. Sci.* 50, 134–138.
- Denham, D., Martínez, A.R., 1970. Studies with methyridine and *Trichinella spiralis*. 2. The use of the drugs to study the rate of larval production in mice. *J. Helminthol.* 44, 357–363.
- Evrard, B., Chiap, P., Piel, G., Van Hees, T., Ghalmi, F., Losson, B., Delattre, L., 1998. Influence of cyclodextrins on the solubility and the pharmacokinetics of albendazole. Ninth International Symposium on Cyclodextrins, Santiago de Compostela, 31 May–3 June, abstract 3-P-8.
- García, J.J., Bolás-Fernández, F., Torrado, J.J., 1999. Quantitative determination of albendazole and its main metabolites in plasma. *J. Chromatogr. B* 723, 265–271.
- García-Rodríguez, J.J., Torrado, J., Bolás, F., 2001. Improving bioavailability and anthelmintic activity of albendazole by preparing albendazole–cyclodextrin complexes. *Parasite* 8, S188–S190.
- Jung, H., Medina, L., García, L., Fuentes, I., Moreno-Esparza, R., 1998. Absorption studies of albendazole and some physicochemical properties of the drug and its metabolite albendazole sulfoxide. *J. Pharm. Pharmacol.* 50, 43–48.
- La Rosa, G., Pozio, E., Rossi, P., Murrell, K.D., 1992. Allozyme analysis of *Trichinella* isolates from various hosts species and geographical regions. *J. Parasitol.* 78, 641–646.
- Lopez, M.L., Torrado, S., Torrado, S., Martínez, A.R., Bolás, F., 1997. Improvement of albendazole efficacy against enteral, but not against parenteral stages of *Trichinella spiralis* by preparing solid dispersions in polyvinylpyrrolidone. *Chemotherapy* 43, 430–435.
- López-García, M.L., Torrado-Duran, S., Torrado-Duran, J., Martínez-Fernández, A.R., Bolás-Fernández, F., 1997. Albendazole versus ricobendazole (albendazole sulfoxide) against enteral and parenteral stages of *Trichinella spiralis* in mice. *Int. J. Parasitol.* 27, 781–785.
- López-García, M.L., Torrado, S., Torrado, S., Martínez, A.R., Bolás, F., 1998. Methimazole-mediated enhancement of albendazole oral bioavailability and anthelmintic effects against parenteral stages of *Trichinella spiralis* in mice: the influence of the dose-regime. *Vet. Parasitol.* 75, 209–219.
- Martínez-Fernández, A.R., 1978. Algunos efectos de los corticosteroides sobre el ciclo endógeno de *Trichinella spiralis*. *Trabajos Compostelanos de Biología* 7, 181–219.
- Piel, G., Evrard, B., Van Hees, T., Llabrés, G., Delattre, L., 1999. Development of a parenteral and of an oral formulation of albendazole with cyclodextrins. *STP Pharm. Sci.* 9, 257–260.
- Redondo, P.A., Alvarez, A.I., García, J.L., Villaverde, C., Prieto, J.G., 1998. Influence of surfactants on oral bioavailability of albendazole based on the formation of the sulfoxide metabolites in rats. *Biopharm. Drug Dispos.* 19, 65–70.
- Torrado, S., Torrado, S., Cadorniga, R., Torrado, J.J., 1996a. Formulation parameters of albendazole solution. *Int. J. Pharm.* 140, 45–50.
- Torrado, S., Torrado, S., Torrado, J.J., Cadorniga, R., 1996b. Preparation, dissolution and characterization of albendazole solid dispersions. *Int. J. Pharm.* 140, 247–250.
- Torrado, S., López, M.L., Torrado, G., Bolás, F., Torrado, S., Cadorniga, R., 1997. A novel formulation of albendazole solution: oral bioavailability and efficacy evaluation. *Int. J. Pharm.* 156, 181–187.