

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGIA FARMACÉUTICA

ESTUDIO FARMACÉUTICO DE
NUEVAS FORMULACIONES GALÉNICAS DE ALBENDAZOL.

Memoria presentada para optar
al grado de Doctor por:
SUSANA TORRADO DURAN

Directores:

Prof. Dr. D. RAFAEL CADORNIGA CARRO

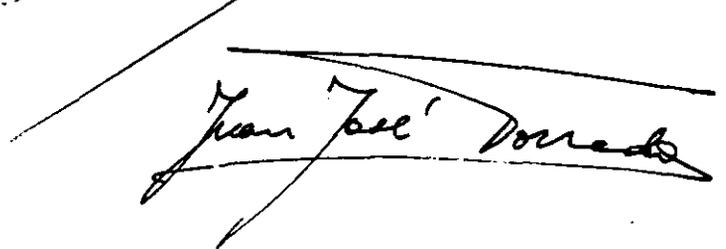
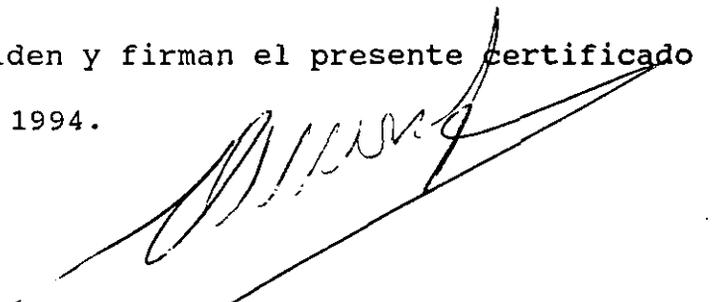
Prof. Dr. D. JUAN J. TORRADO DURAN

MADRID, JULIO 1994.

D. RAFAEL CADORNIGA CARRO, CATEDRÁTICO DE FARMACIA Y TECNOLOGIA FARMACÉUTICA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, Y D. JUAN JOSÉ TORRADO DURAN, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGIA FARMACÉUTICA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICAN: Que la presente Tesis Doctoral, elaborada por la Graduada en Farmacia Dña. Susana Torrado Durán sobre "ESTUDIO FARMACÉUTICO DE NUEVAS FORMULACIONES GALÉNICAS DE ALBENDAZOL" ha sido realizada bajo la dirección de los profesores que suscriben, en el laboratorio del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y hallándose concluida se autoriza su presentación a fin de que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

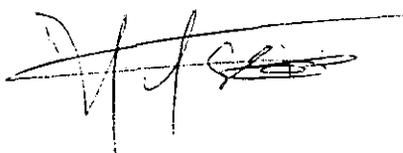
Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado en Madrid, a 6 de Junio de 1994.



D. JOSE LUIS LASTRES GARCIA, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGIA FARMACÉUTICA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICA: Que la presente Tesis Doctoral, elaborada por la Graduada en Farmacia Dña. Susana Torrado Durán sobre "ESTUDIO FARMACÉUTICO DE NUEVAS FORMULACIONES GALÉNICAS DE ALBENDAZOL" ha sido realizada bajo la dirección de los profesores D. Rafael Cadórniga Carro y D. Juan José Torrado Durán, en el laboratorio del Departamento de Frmacia y Tecnología Farmacéutica y hallandose concluida se autoriza su presentación a fin de que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expide y firma el presente certificado en Madrid, a 6 de Junio de 1994.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. Lastres', written over a horizontal line.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero expresar mi agradecimiento a los directores de esta Tesis Doctoral, D. Rafael Cadórniga y D. Juan José Torrado, por su apoyo y ayuda para que esta memoria pudiera realizarse.

También quiero agradecer a mi padre D. Juan José Torrado Valeiras su constante estímulo y apoyo en todo momento para que continuara con mi formación académica.

Mi agradecimiento a mi hermano Santiago cuya ayuda ha sido imprescindible para la realización de esta tesis doctoral. Así como al resto de mi familia ya que todos han colaborado y ayudado en los momentos difíciles.

Por supuesto mi agradecimiento a los Dep. de Química Inorgánica, Físico-Química y Bromatología por su asesoramiento y colaboración, especialmente a D. Juan Carlos Doadrio, Dña Gloria Frutos, Dolores Rodriguez y M José Villanueva.

Deseo agradecer a todo el Dep. de Parasitología su constante colaboración, especialmente a los profesores D. Antonio Martinez y D. Francisco Bolás. Y a Dña Ana Luz López cuya tesis doctoral que versa sobre tratamiento de *T. spiralis* con albendazol está próxima a su conclusión.

Por último mi agradecimiento a los profesores José Luis Lastres, M Paloma Ballesteros y Paloma Frutos así como a todos mis compañeros del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica por su ayuda y amistad.

A MARTA Y ALEXIS.

ABREVIATURAS UTILIZADAS.

ABC. Área bajo la curva.

Ac. Ácido.

ALB. Albendazol.

ALBSO. Albendazol sulfóxido.

ALBSO₂. Albendazol sulfona.

BZ. Benciliimidazoles.

C. Concentración.

col. Colaboradores.

Cs. Coeficiente de solubilidad.

csp. Cantidad suficiente para.

°C. Grados celsius.

DS. Dispersión sólida.

FMO. Citocromo Flavín monooxigenasa.

HPLC. Cromatografía de líquidos de alta resolución.

Kg. Kilogramo.

M. Molar.

mg. Miligramo.

min. Minutos.

ml. Mililitro.

mm. Milímetro.

mM. Milimolar.

μg. Microgramo.

μl. Microlitro.

n. Número de muestras.

PA. Principio activo.

PEG. Polietilenglicol.

p.i. Post infección.

PM. Peso molecular.

PVP. Polivinilpirrolidona.

sp. Especie.

spp. Especies.

RX. Rayos X.

tr. Tiempo de retención.

UA. Unidades de absorbancia.

UV. Ultravioleta.

v/v. Volumen/volumen.

| | |
|--|----|
| INTRODUCCION..... | 1 |
| OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO. | 6 |
| | |
| PARTE GENERAL..... | 11 |
| | |
| A. LOS BENCIMIDAZOLES : EL ALBENDAZOL..... | 12 |
| 1. SINTESIS Y TIPOS DE BENCIMIDAZOLES..... | 12 |
| 2. MECANISMO DE ACCIÓN DE BENCIMIDAZOLES..... | 18 |
| 3. FARMACOCINÉTICA DE LOS BENCIMIDAZOLES: ALBENDAZOL.... | 24 |
| 4. UTILIDADES VETERINARIAS DE LOS BENCIMIDAZOLES EN DISTINTOS TIPOS DE GANADO: EL ALBENDAZOL..... | 35 |
| 5. MODO DE ADMINISTRACIÓN DE LOS BENCIMIDAZOLES EN EL ÁMBITO VETERINARIO..... | 41 |
| 6. LOS BENCIMIDAZOLES EN CLÍNICA HUMANA: ALBENDAZOL..... | 43 |
| | |
| B. SOLUBILIDAD DE SÓLIDOS EN LÍQUIDOS: EXALTACIÓN DE LA SOLUBILIDAD..... | 53 |
| 1. SOLUBILIDAD DE SOLUTOS EN LÍQUIDOS..... | 53 |
| 2. FACTORES QUE AFECTAN A LA SOLUBILIDAD DE SÓLIDOS EN LÍQUIDOS..... | 57 |

| | |
|---|-----|
| C. DISPERSIONES SÓLIDAS..... | 62 |
| 1. DEFINICIÓN Y TIPOS DE DISPERSIONES SÓLIDAS..... | 63 |
| 1.1. TIPOS DE DISPERSIONES SÓLIDAS SEGÚN LA ESTRUCTURA FÍSICA Y QUÍMICA..... | 63 |
| 1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS SEGÚN EL MÉTODO DE OBTENCIÓN..... | 66 |
| 2. LA POLIVINILPIRROLIDONA COMO VEHÍCULO EN DISPERSIONES SÓLIDAS..... | 73 |
| 3. POLIETILENGLICOL COMO VEHÍCULO EN DISPERSIONES SÓLIDAS..... | 75 |
| 4. ESTABILIDAD DE LAS DISPESIONES SÓLIDAS..... | 78 |
| 5. MECANISMO DE DISOLUCIÓN DE DISPERSIONES SÓLIDAS..... | 88 |
| 6. APLICACIONES DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS..... | 100 |
| | |
| PARTE EXPERIMENTAL..... | 107 |
| | |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 108 |
| 1. REACTIVOS E INSTRUMENTAL..... | 108 |
| 1.1. REACTIVOS UTILIZADOS..... | 108 |
| 1.1.1. Calidad análisis..... | 109 |
| 1.1.2. Otros..... | 110 |
| 1.1.3. Soluciones tampón..... | 110 |
| 1.2. INSTRUMENTAL UTILIZADO..... | 112 |
| 2. MÉTODOS..... | 114 |
| 2.1. MÉTODOS ANALÍTICOS DEL ALBENDAZOL..... | 114 |

INDICE.

| | |
|--|-----|
| 2.1.1. HPLC..... | 114 |
| 2.1.1.1. Método de análisis del albendazol como materia prima y en producto terminado..... | 114 |
| 2.1.1.2. Método de determinación del albendazol y ricobendazol en muestras biológicas..... | 117 |
| 2.1.2. Espectrofotometría U.V..... | 122 |
| 2.1.3. Validación de métodos analíticos..... | 125 |
| 2.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO..... | 140 |
| 2.3. ESPECTROSCOPIA DE RX POR ENERGÍAS DISPERSIVAS..... | 141 |
| 2.4. DIFRACCIÓN DE RX..... | 141 |
| 2.5. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO..... | 141 |
| 2.6. COEFICIENTE DE SOLUBILIDAD..... | 143 |
| 2.6.1. Validación del método del coeficiente de solubilidad por el método de ultrasonidos frente al método de agitación..... | 148 |
| 2.7. VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN..... | 150 |
| 2.8. MÉTODO DE OBTENCION DE LAS FORMULACIONES LIQUIDAS..... | 151 |
| 2.9. MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DISPERSIONES SÓLIDAS..... | 152 |
| 2.10. MÉTODO DE ESTUDIO DE LA HUMEDAD EN EL EQUILIBRIO..... | 154 |

INDICE.

| | |
|---|-----|
| 2.11. MÉTODO DE ESTUDIO DE ESTABILIDAD ACCELERADO..... | 155 |
| 2.12. MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA..... | 158 |
| 2.13. MÉTODO DE ESTUDIO BIOFARMACÉUTICO Y FARMACOCINÉTICO..... | 161 |
| 2.14. ESTADÍSTICA..... | 161 |
| RESULTADOS..... | 163 |
| 1. ANÁLISIS DE MATERIA PRIMA..... | 164 |
| 1.1. HPLC..... | 164 |
| 1.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO..... | 164 |
| 1.3. ESPECTROSCOPIA DE RX POR ENERGÍAS DISPERSIVAS..... | 167 |
| 1.4. DIFRACCIÓN DE RX..... | 170 |
| 1.5. BARRIDO CALORIMETRICO DIFERENCIAL..... | 174 |
| 1.6. COEFICIENTE DE SOLUBILIDAD..... | 183 |
| 1.7. VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN..... | 183 |
| DISCUSIÓN PARCIAL..... | 183 |
| 2. ELABORACIÓN DE FORMULACIONES Y CARACTERIZACION..... | 188 |
| 2.1. FORMULACIONES LÍQUIDAS..... | 188 |
| 2.2. DISPERSIONES SÓLIDAS..... | 195 |
| 2.2.1. Caracterización de la dispersión sólida seleccionada..... | 205 |

INDICE.

| | |
|---|-----|
| 2.2.1.1. Microscopía electrónica de barrido..... | 205 |
| 2.2.3. Espectrofotometría de dispersión de RX..... | 205 |
| 2.2.4. Difracción de RX..... | 205 |
| 2.2.5. Calorimetría diferencial de barrido..... | 208 |
| 2.2.6. Estudio de humedad en el equilibrio (H.E.)..... | 210 |
| 3. ESTUDIO DE ESTABILIDAD..... | 212 |
| 5.1. ESTABILIDAD DE FORMULACIONES LÍQUIDAS..... | 212 |
| 5.2. ESTABILIDAD DE DISPERSIONES SÓLIDAS..... | 223 |
| 4. ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE LAS FORMULACIONES ESTUDIADAS..... | 227 |
| 5. ESTUDIO BIOFARMACÉUTICO Y FARMACOCINÉTICO DE LAS FORMULACIONES SELECCIONADAS..... | 232 |
| DISCUSION FINAL..... | 247 |
| CONCLUSIONES..... | 265 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 269 |

INTRODUCCIÓN.

INTRODUCCION.

El problema de las infecciones producidas por helmintos es muy amplio y de gran importancia tanto en la práctica médica como en la veterinaria.

En general las helmintiasis afectan de tal manera tanto a los humanos como al ganado que representan, por si mismos, el más importante grupo de infecciones del planeta.

La relevancia económica de las infecciones por helmintos tiene gran repercusión en el ámbito ganadero. Concretamente, se ha comprobado, en el tratamiento regular del ganado con bencimidazoles, que la administración conjunta de los fármacos y la alimentación, provoca un aumento de peso en los animales.

La prevalencia de las helmintiasis intestinales ha variado poco desde el año 47. Para resaltar la importancia de estas infecciones se podría decir que existen 10^{10} Ascaris que pesan 1.000 toneladas y que cada día envían al medio ambiente 100 toneladas de huevos (Horton, 1990a).

Por otra parte se estima que los cestodos con el rosetelo armado infectan a 800 millones de personas y que producen una pérdida de sangre total diaria de 2×10^6 l, lo que equivale al desangramiento completo de una población de 400.000 habitantes cada día.

(Sánchez, 1993), (Suri, 1994) y (Baver, 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.

En los últimos 30 años, se ha abierto todo un campo de investigación encaminado a la mejora de la solubilidad de aquellos fármacos escasamente solubles, que presentan problemas en su absorción y por lo tanto observan una biodisponibilidad errática. El recurso farmacotécnico conocido como "Dispersión Sólida" se basa en la dispersión de uno o más principios activos en un vehículo inerte al estado sólido (Sekiguchi, 1961).

Para la realización de la presente tesis doctoral se selecciona este recurso farmacotécnico, continuando con una línea de investigación existente en el Departamento para la obtención de dispersiones sólidas de otro bencilimidazol (Fernandez, 1988) con la que ya se obtuvieron buenos resultados, Asimismo, se desarrolla una nueva línea de investigación de formulaciones líquidas de albendazol utilizando cosolventes como recurso para exaltar la solubilidad.

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a la colaboración del Departamento de Parasitología de esta Facultad. En el Departamento de Parasitología se han planificado y llevado a cabo los estudios de actividad antiparasitaria de las distintas

Actualmente el impacto económico y sanitario de las helmintiasis ya ha comenzado a ser apreciado. Los estudios de Stephenson (Stephenson, 1989) y Latham (Latham, 1983) en Africa demuestran que el crecimiento y la capacidad física de los niños puede aumentar con la desparasitación.

El descubrimiento del tiabendazol en 1961 abrió las puertas del desarrollo e investigación de todo un grupo químico y terapéutico: los bencilimidazoles. En la práctica clínica solamente tres antihelmínticos del grupo de los bencilimidazoles se utilizan corrientemente: albendazol, flubendazol y mebendazol se utilizan corrientemente. En los últimos estudios se ha demostrado que el albendazol no sólo es altamente efectivo y seguro (presenta pocos efectos secundarios) para el tratamiento de las infecciones provocadas por helmintos sino que también actúa eficazmente en el tratamiento de otras infecciones parasitarias de tipo protozoario. Y concretamente es cada vez más frecuentemente utilizado en infecciones oportunistas de microsporidios en enfermos de SIDA (Haque, 1993), (Dieterich, 1994), (Weber, 1993) y (Curry, 1993).

El albendazol presenta una escasa solubilidad y por lo tanto una absorción también escasa, lo que unido a su rápido metabolismo hace que se utilice más frecuentemente a nivel de parásitos intestinales. Y que sólo en dosis altas y prolongadas sea efectivo en el tratamiento de infecciones sistémicas. Concretamente a nivel humano se ha demostrado ya una efectividad del albendazol frente a infecciones sistémicas como son la hidatidosis (Yasawy, 1993), (Kumar, 1993), (Bondiau, 1993) y la neurocisticercosis

INTRODUCCIÓN.

formulaciones y constituye parte de una línea de trabajo conjunta de ambos departamentos.

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO.

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO.

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO.

Objetivo: La elaboración y posterior caracterización de nuevas formulaciones de albendazol de solubilidad exaltada. Las formulaciones desarrolladas son de dos tipos: Dispersiones sólidas y formulaciones líquidas.

Planteamiento: Dividimos el trabajo en 6 fases.

1.- Puesta a punto de Técnicas analíticas del albendazol:

1. HPLC. Se utilizan dos métodos de análisis:

a). Análisis del albendazol y principales productos de degradación que se emplea en el análisis de albendazol como materia prima y en los estudios de estabilidad de las formulaciones obtenidas.

b). Análisis de albendazol y su principal producto de metabolización (Ricobendazol). Método que se emplea para estudiar las características biofarmacéuticas y farmacocinéticas de las formulaciones.

2. Espectrofotometría U.V. Se emplea en los estudios de velocidad de disolución.

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO.

3. Microscopía electrónica de barrido. Análisis morfológico del albendazol como materia prima.

4. Estudio del espectro de difracción de rayos x del albendazol como materia prima.

5. Barrido calorimétrico diferencial (DSC).

2. Elaboración de dispersiones sólidas de albendazol.

Se obtienen utilizando polivinilpirrolidona como vehículo. Se estudia el efecto de tres PVP con distinto peso molecular (3.000; 17.000 y 25.000). También se estudia la posible influencia de la proporción de albendazol: PVP (1:10; 1:20 y 1:40).

3. Elaboración de formulaciones líquidas de albendazol.

Se selecciona el pH más adecuado en función del coeficiente de solubilidad del albendazol en soluciones tampón de distinto pH e igual fuerza iónica. Se recurre al empleo de cosolventes y tensoactivos como exaltadores de la solubilidad. Con este fin se utilizan: Aceite de ricino polioxietilenado (Cremophor^R EL), soluciones de laurilsulfato sódico, etoxidiglicol (Transcutol^R) y derivado polioxietilenado del laureato de sorbitano (Tween^R 20).

4. Caracterización farmacotécnica de las formulaciones elaboradas.

a). Solubilidad. Se estudia la solubilidad, tanto en magnitud (Cs) como en velocidad (Método de disolución, aparato I USP XXII).

b). Morfología de las formulaciones sólidas (dispersiones sólidas) mediante microscopía electrónica de barrido y difracción de rayos X.

c). Homogeneidad del albendazol en las dispersiones sólidas mediante espectroscopía de rayos X por energías dispersivas.

d). Se estudia la posible interacción entre vehículo y principio activo en las dispersiones sólidas mediante el estudio del barrido calorimétrico diferencial.

e). Estabilidad química de las formulaciones elaboradas.

5. Se eligen las formulaciones con mejores características de solubilidad para los estudios "in vivo".

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO.

6. Comparación de la actividad y efecto antiparasitario frente a *T. spiralis* del albendazol y de las nuevas formulaciones de albendazol obtenidas.

Se comparan las siguientes formulaciones:

- Albendazol patrón (SKF Beecham Pharmaceuticals).
- Albendazol genérico (Chemo Ibérica S.A.).
- Dispersión sólida de albendazol patrón y Kollidón^R 12
1:20.
- Dispersión sólida de albendazol genérico y Kollidón^R 12
1:20.
- Formulación líquida albendazol patrón.
- Formulación líquida albendazol genérico.

7. Determinación de las características biofarmacéuticas y farmacocinéticas de distintas formulaciones de albendazol tras su administración oral a ratones.

A. LOS BENCIMIDAZOLES: EL ALBENDAZOL.

Aunque ningún agente quimioterápico puede considerarse perfecto los bencimidazoles han revolucionado la clínica médica y veterinaria en los últimos 10-15 años. Estos bencilimidazoles presentan actividad antiprotozoaria y antihelmíntica frente a especies como: *Taenia saginata*, *Taenia solium*, *Echinococcus spp*, *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides*, *Capillaria philippinensis*, *Dracunculus medinensis*, *Enterobius vermicularis*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis*, *Ternidens deminatus*, *Trichinella spiralis*, *Trichostrongylus spp* y *Trichuris trichiuria* (Martindale, 1993).

1. SINTESIS Y TIPOS DE BENCIMIDAZOLES.

Desde la síntesis del tiabendazol en 1961 se han sintetizado miles de bencimidazoles que se han ensayado para comprobar su actividad antihelmíntica pero menos de 20 de ellos han llegado a tener utilización comercial.

El bencimidazol es un anillo bicíclico en el que el benceno se encuentra en posición 4 y 5 del heterociclo. Los compuestos que no presentan sustituciones en el átomo de H presentan carac-

terísticas ácidas y básicas.

Las modificaciones del anillo del bencimidazol se encuentran reflejadas en la figura 1 (Townsend, 1990). Los fármacos que han presentado mayor actividad son aquellos que incluyen sustituciones en los carbonos 2 y 5.

La síntesis de los bencilimidazoles generalmente se realiza en dos pasos. Primero se obtiene el anillo benceno con los dos grupos amino y el radical de sustitución que se haya elegido. A continuación se cierra el anillo del derivado 1,2 diaminobenceno para formar el anillo del imidazol. Este puede ser el final de la síntesis, aunque esta también puede continuar con adición de otros sustituyentes exocíclicos como se puede observar en la figura 2 (Townsend, 1990).

La formación de metabolitos inactivos tras la hidroxilación enzimática en la posición 5 ha originado toda una línea de investigación con el fin de preparar una generación de bencilimidazoles con las modificaciones estructurales necesarias que impidan esta inactivación como por ejemplo el cambendazol, que presenta en posición 5 un derivado 5-isoproxicarbonilamino.

Tras un estudio sistemático de modificaciones de la posición 2 del tiabendazol, la compañía Smith Kline and French encontró actividad antihelmíntica en los compuestos con derivados tio-carbonados. Lo que originó la síntesis de 2-acil amino

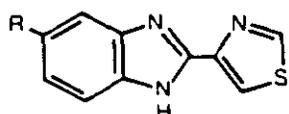
bencimidazoles, 2-bencimidazolcarbamatos 2-bencimidazolureas. De los que el más activo es el 2-metil carbamato. Al primer compuesto de investigación, el parbendazol (5-butil 2 bencilimidazol carbamato) le siguieron los compuestos desarrollados por Janssen Farmacéutica: mebendazol, flubendazol y ricobendazol y los descubiertos por Smith Kline and French : albendazol (Theodorides, 1976), oxibendazol y fenbendazol y por Syntex: oxfendazol. Todos ellos se encuentran recogidos en la figura 1.

En la figura 3 se puede observar un esquema de la síntesis del albendazol (Theodorides, 1976), aunque éste no es el único mecanismo de síntesis de este compuesto (Barker, 1973).

Por otra parte se han obtenido una serie de compuestos a partir de la sustitución en posición 6: imidazo (1,2- α) pyridine-2 carbamato (Bochis, 1981).

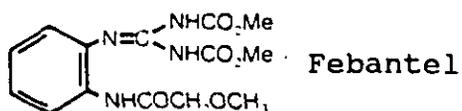
Existen también ejemplos de promedicamentos como son el metil tiofanato (Delatour, 1986a), febantel y netobimin.

Bencimidazoles

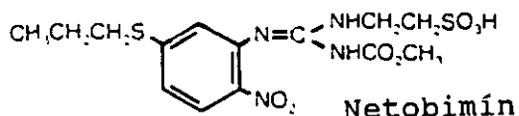


R = H Tiabendazol

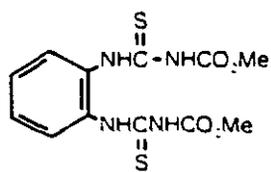
R = (CH₂)₂CHOCONH- Cambendazol



Febantel

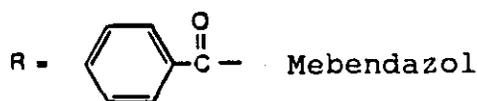
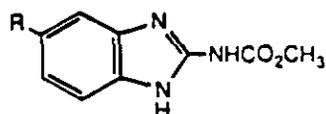


Netobimín

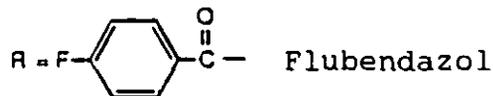


Metil Tiofanato

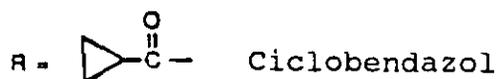
Bencimidazol carbamatos



Mebendazol



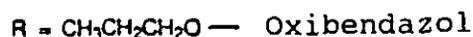
Flubendazol



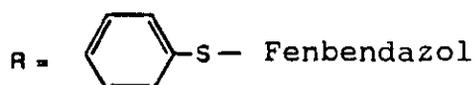
Ciclobendazol



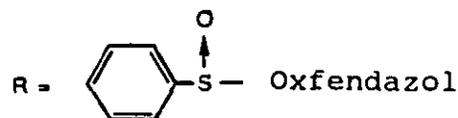
Albendazol



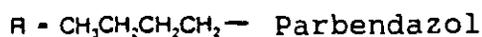
Oxibendazol



Fenbendazol



Oxfendazol



Parbendazol

Figura 1. Modificaciones en el anillo del bencimidazol.

Tipos de bencimidazoles.

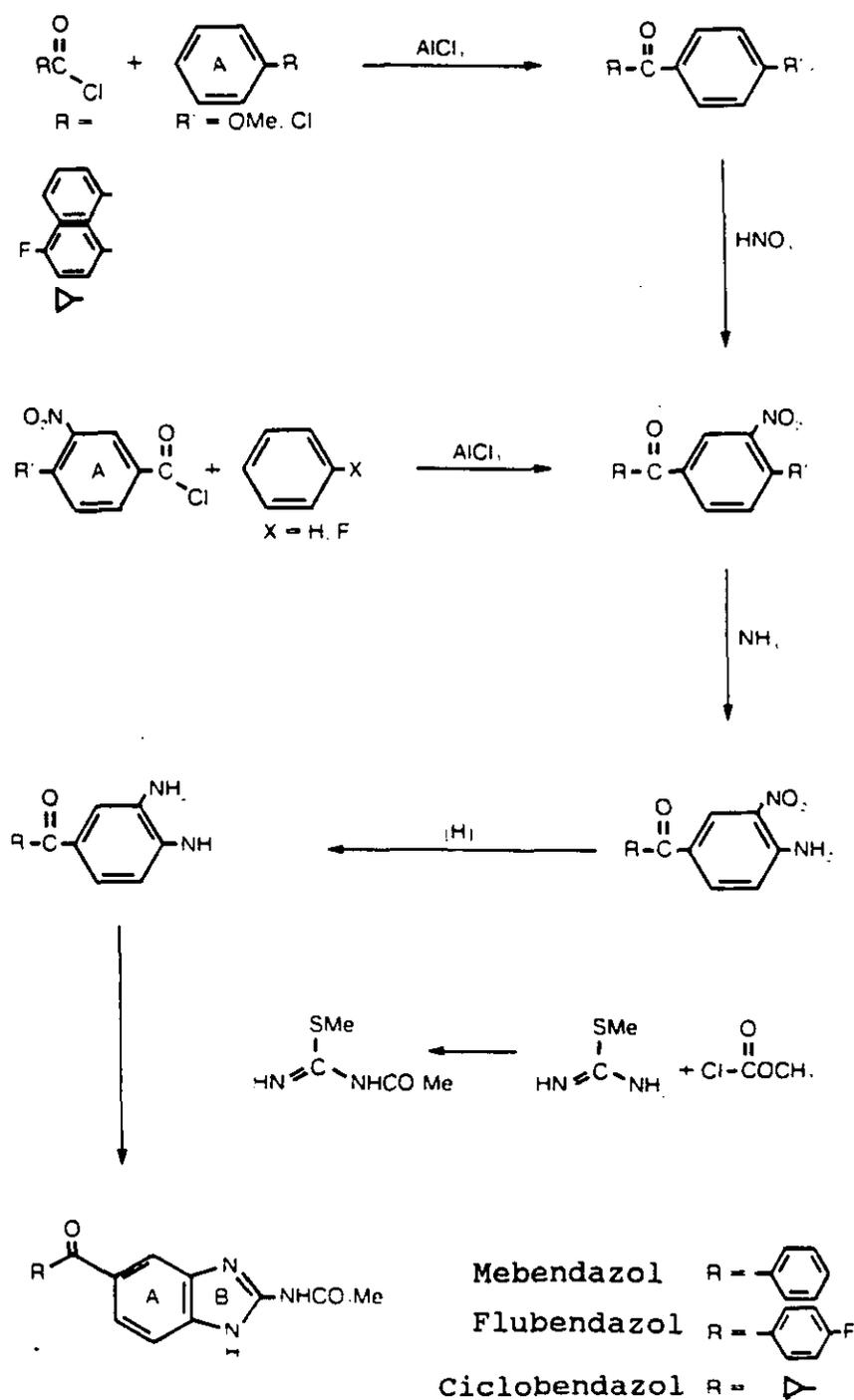


Figura 2. Síntesis de los bencilimidazoles.

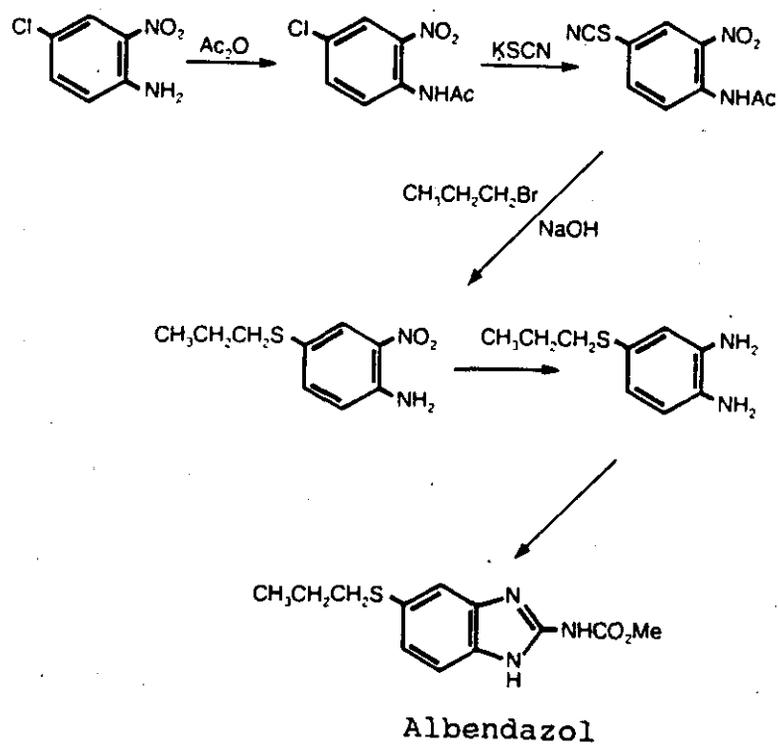


Figura 3. Síntesis del albendazol.

2. MECANISMO DE ACCIÓN DE BENCIMIDAZOLES.

El antihelmíntico ideal debe ser selectivamente tóxico para el ganado. Este objetivo normalmente se consigue mediante las propiedades farmacocinéticas inherentes al compuesto que causan que el parásito quede expuesto a concentraciones mayores del agente antihelmíntico que las células del hospedador, o bien mediante una acción de inhibición de los procesos metabólicos vitales para el parásito.

Los helmintos parásitos deben mantener un sitio de alimentación apropiado, y los nematodos y trematodos deben ingerir activamente y desplazar alimentos a través de sus sistemas digestivos para mantener el estado de energía que requiere la coordinación neuromuscular adecuada.

La base farmacológica del tratamiento para helmintos generalmente implica interferencia con uno o ambos de los procesos de energía lo que causa la muerte posterior por inanición del parásito; o falta de coordinación neuromuscular, que da lugar a su parálisis y posterior expulsión.

Por lo tanto y según su mecanismo de acción los antihelmínticos se pueden clasificar en:

- Antihelmínticos que actúan directa o indirectamente en los procesos de energía.

* Inhibidores de la polimerización de la tubulina.

Bencimidazoles y Probencimidazoles.

* Desacopladores de la función oxidante.

Salicilanilidas y fenoles sustituidos.

* Inhibidores de enzimas de vía glicolítica.

Closulón.

- Antihelmínticos que interfieren la coordinación neuromuscular.

* Inhibidores de la colinesterasa:

Organofosfatos (coumafós, crumofato, diclorvós, haloxón, naftolofós y triclorfón).

* Agonistas colinérgicos.

Imidazotioles (levamisol y tetramisól).

Piridinas (morantel y pirantel).

En una reciente revisión Lacey concluye que a pesar de los distintos efectos a nivel bioquímico y molecular de los bencilimidazoles, su principal mecanismo de acción es su actuación a nivel de la proteína citoesquelética de las células eucariotas: la tubulina (Lacey, 1990)

Esta tubulina es una proteína dimérica que conforma los microtúbulos. Estos microtúbulos además coexisten en un equilibrio dinámico con una proporción determinada de tubulina que se encuentra regulada por proteínas y cofactores (Lacey, 1988). Este equilibrio puede verse afectado por sustancias exógenas conocidas como inhibidores de los microtúbulos.

La mayoría, aunque no todos estos inhibidores, ejercen su acción uniéndose a la tubulina e impidiendo la asociación de estas subunidades para la formación de los microtúbulos. El inhibidor se une a la porción terminal del microtúbulo preparada para asociarse, al mismo tiempo que el microtúbulo se está disociando por el otro extremo, lo que origina la reducción de la longitud del microtúbulo (Lacey, 1990).

Los inhibidores de los microtúbulos comprenden un amplio grupo de compuestos estructuralmente diversos de origen fúngico, vegetal, microorganismos marinos, animales eucarióticos y también compuestos de origen sintético. Todos estos compuestos presentan un espectro amplio en cuanto a su selectividad y una toxicidad no selectiva frente al género eucariota.

Borges y De Nollin (Borgers, 1975) fueron los primeros en observar una desintegración de la matriz microtubular en las células intestinales de *Ascaris suum* tras ser tratados con mebendazol. Aunque otros estudios posteriores confirman esta observación en otras especies de helmintos sensibles a

bencimidazoles (Verheyen, 1976).

Aproximadamente al mismo tiempo, las investigaciones llevadas a cabo por la industria Janssen Farmacéutica revelan que el nocodazol (un compuesto análogo del mebendazol) es un potente inhibidor de la polimerización de la tubulina de los mamíferos (Hoebeke, 1976).

La evidencia de un mecanismo de acción de los benzimidazoles dependiente de la tubulina se obtuvo tras estudiar la polimerización de la tubulina cerebral ovina y bovina (Friedman, 1980). Asimismo se ha confirmado que los bencimidazoles compiten con la colchicina en su unión al receptor (la tubulina) (Friedman, 1980). Por otra parte existen estudios que correlacionan la inhibición de la polimerización cerebral de la tubulina en ovejas con la utilización de los bencimidazoles como inhibidores del crecimiento celular en ratones leucémicos L₁₂₁₀ (Lacey 1985a y b).

Los bencimidazoles representan el grupo más específico de antihelmínticos de amplio espectro, aunque también muestran actividad frente a células de mamíferos y hongos. Este hecho plantea la cuestión de por qué estos bencimidazoles presentan una gran selectividad frente a los helmintos y sin embargo poca o nula toxicidad a nivel de las células de los mamíferos.

Asimismo, es necesario señalar que la cinética de unión de los bencimidazoles como inhibidores de la polimerización de la

tubulina es paradójica, primero, puesto que la toxicidad en mamíferos de los bencimidazoles es muy lenta. Y segundo, porque existe sin embargo una selectividad de los bencimidazoles por la tubulina de los helmintos (Lacey, 1988) y (Dawson, 1983). Otros investigadores suponen que esta selectividad es originada por la diferente farmacocinética de los bencimidazoles en el hospedador y en el parásito (Kohler, 1981).

La unión de la colchicina a la tubulina es pseudoirreversible y este complejo resiste la extracción con carbón (Lacey, 1986). En este sentido, una serie de autores relacionan la unión de los bencimidazoles a la tubulina de algunas especies de helmintos (uniones estables a la extracción con carbón) con la selectividad de estas especies por algunos bencimidazolcarbamatos (Lacey, 1988). Aunque posteriormente se observó que eran los bencimidazol carbamatos sustituidos en el carbono 5 los que presentaban una unión a tubulina helmíntica y cuya unión sin embargo no es resistente a dicha extracción como es el caso del tiabendazol (Lacey, 1990), lo que sugiere que la estabilidad de dicha unión a la extracción no es por sí sola determinante de la selectividad de los bencimidazoles.

Se han desarrollado métodos in vitro que permiten predecir la actividad larvívica de los antihelmínticos en función de su afinidad por la tubulina. Esta afinidad se encuentra directamente relacionada con la capacidad del compuesto de inhibir la unión de mebendazol marcado (H^3 -mebendazol) a la tubulina. Concre-

tamente a excepción del mebendazol el resto de los bencimidazoles presentan una correlación entre su capacidad de inhibición de la unión del H³-mebendazol a la tubulina y su valor de DL50 en el estado larvario.

Por otra parte otras líneas de investigación han demostrado que los bencimidazoles como el mebendazol disminuyen la captación de glucosa reduciéndose la síntesis del glucógeno y del ATP. Lo cual puede ser explicado mediante la teoría de que la inhibición del transporte y el metabolismo energético son consecuencia del fallo en la función microtubular.

Finalmente otros autores proponen otro mecanismo de acción para el albendazol y otros derivados del bencimidazol carbamato que incluyen una descarga de protones a través de la membrana celular, lo que conlleva interrupciones bioenergéticas (McCracken, 1982).

Sin embargo es necesario señalar que existen otros mecanismos de acción postulados para los bencimidazoles como son la inhibición de la fumarato-reductasa y la inhibición de la captación de la glucosa.

3. FARMACOCINÉTICA DE LOS BENCIMIDAZOLES: ALBENDAZOL.

3.1. ABSORCION Y DISTRIBUCION DE LOS BENCILIMIDAZOLES: ALBENDAZOL.

Si bien muchos parásitos gastrointestinales residen en el lumen intestinal, o cerca de la mucosa gastrointestinal, otros parásitos grandes residen en puntos más alejados del intestino como el hígado o los pulmones; y para poder combatir estos parásitos es esencial la absorción desde el intestino del antihelmíntico administrado por vía oral.

El epitelio gástrico al igual que el epitelio intestinal actúa como una barrera lipófila frente a la absorción del albendazol y el mebendazol. Si se representa la constante de la velocidad de absorción (mM min^{-1}) frente a la concentración inicial del medicamento perfundido en el estómago del hospedador (rata) se observa que la absorción desde el lumen gástrico sigue una cinética de primer orden en la que el valor de la pendiente es equivalente a la constante de difusión del albendazol (Prieto, 1991). Según los resultados obtenidos de sus experiencias algunos autores indican que el proceso de absorción del albendazol es debido a un mecanismo de difusión simple (Prieto, 1991). Y que el hecho de la baja absorción intestinal y gástrica del albendazol se debe a su limitada solubilidad en los fluidos gastrointestinales (Marriner, 1986) y (Prieto, 1991).

La solubilidad del albendazol al ser mayor en medios ácidos como se ve reflejado en nuestros propios estudios a lo largo de esta tesis doctoral hace que este medicamento se encuentre solubilizado en mayor cantidad en el estómago. Por lo que una mayor permanencia del fármaco en el estómago proporciona una mayor absorción. Esto explica la exaltación de la biodisponibilidad en los estudios en los que se administra conjuntamente con una dieta rica en grasas, lo que enlentece el vaciamiento gástrico (Ali, 1992).

En los rumiantes, la administración directamente en el abomaso a través de la hendidura esofágica puede aumentar la de absorción de los antihelmínticos. El herbario por su parte actúa como un depósito del fármaco a partir del cual se pueden mantener concentraciones plasmáticas durante periodos prolongados, y hace que el pasaje del fármaco a través del tracto gastro-intestinal sea más lento. En general los bencimidazoles son más eficaces si se depositan directamente en el herbario y menos eficaces si se inyectan dentro del abomaso.

Cuando los bencimidazoles sufren biotransformación, se originan compuestos electrofílicos: estos metabolitos pueden conjugarse en el organismo de forma no extraíble fácilmente por solventes como ocurre con el albendazol, mebendazol y cambendazol.

3.2. METABOLISMO Y EXCRECION DE LOS BENCIMIDAZOLES: EL ALBENDAZOL.

Aunque las reacciones metabólicas generalmente se asocian a la desintoxicación de productos químicos, estos mismos sistemas enzimáticos pueden en ocasiones aumentar la toxicidad por la formación de compuestos intermedios de gran actividad. Tras la formación de estos compuestos activos se puede producir la reacción de los mismos con otros compuestos naturales (proteínas, lípidos, etc) formandose enlaces covalentes. La presencia de estos compuestos puede alterar el normal funcionamiento de la células, produciendose toxicidades específicas de un órgano, teratogenicidad o incluso la muerte (Mitchell, 1981). Además de la posible toxicidad, los metabolitos pueden tener aumentada o disminuida su actividad farmacológica con respecto al compuesto químico inicial.

Todos estos hechos deben ser tenidos en cuenta antes de formular un medicamento y dosificarlo puesto que afectan directamente a la eficacia y seguridad del mismo.

Los bencilimidazoles antihelmínticos se metabolizan en el organismo de los mamíferos tras su administración oral. El compuesto originario tiene generalmente una semivida corta y sus metabolitos predominan en plasma, tejidos y excreciones (Gottscharl, 1990).

En general los bencimidazoles tienen una solubilidad en agua limitada. Sus metabolitos principales se originan por oxidación e hidrólisis y son todos más solubles que el compuesto originario. Frecuentemente también se produce la conjugación y en ocasiones estos conjugados son los productos mayoritarios de la metabolización.

Los metabolitos se encuentran en orina y heces aunque la presencia en esta última se atribuye más a su baja absorción que a la excreción biliar. Las rutas metabólicas de los distintos bencimidazoles son similares aunque los porcentajes de los metabolitos varían substancialmente (Delatour, 1986).

Estructuralmente todos los bencimidazoles contienen un núcleo bencimidazol y difieren en los grupos sustituidos en el carbono 2 (R_1) y en el carbono 5 (R_2) como puede verse en la figura 1 con la excepción del tiabendazol y el cambendazol donde $R_1 =$ tiazolil se sustituye por el grupo carbamato $R_1 = -NH CO_2 - CH_3$

El metabolismo principal y la toxicidad de estos compuestos está generalmente controlada por el radical R_2 existiendo una gran variedad de reacciones metabólicas de tipo o fase I que afectan a este radical como:

- hidroxilación (tiabendazol, parabendazol)
- S-oxidación (albendazol, fenbendazol)
- reducción (mebendazol).

Asímismo, también se produce una decarboxilación por hidrólisis del grupo carbamato originando una amina.

Finalmente en algunos casos las reacciones metabólicas también afectan al anillo bencimidazol como en el caso de la N-metilación (Delatour, 1986b).

3.2.1. Metabolismo del albendazol.

La presencia de un átomo de azufre en la cadena lateral del albendazol tiene una gran importancia en su metabolismo, puesto que el mismo se caracteriza por la oxidación de este heteroátomo nucleofílico. El albendazol se oxida rápidamente originándose el sulfóxido que es activo. Posteriormente el sulfóxido se oxida aún más a sulfona, producto que es inactivo (Delatour, 1990a) y (Lubega, 1991). En la figura 4 se observan algunas de las rutas metabólicas del albendazol.

Antes de 1960 se creía que todas las oxigenaciones dependientes del NADPH eran catabolizadas por el citocromo P450. Estudios posteriores muestran la existencia de un citocromo flavín monooxigenasa (enzima de Zigler o FMO) que a diferencia del P450 no contiene el grupo hemo. Este enzima es el catalizador de los compuestos que contienen nitrógeno nucleofílico o azufre como aminas terciarias, aminas secundarias, hidrazidas, tio-carbamidas, tioaminas, tioles, sulfidas y disulfidas. Y no

interviene en la oxidación de N-alquilamidas, N-alquilcarbamatos o amina aromáticas heterocíclicas. No actúa sobre especies químicas con carga negativa y sí oxida compuestos neutros carentes de grupos polares. Este enzima se ha detectado en humanos, ratas, conejos, cobayas, ratones y en el reino fúngico.

Cuando se incubó albendazol con microsomas hepáticos de oveja se apreció una rápida oxidación NADPH dependiente que originaba el sulfóxido. Esta formación del sulfóxido se inhibe con clorpromazina, fenbendazol y metimazol (substratos alternativos del FMO) mientras que no se aprecia esta inhibición con los inhibidores clásicos del citocromo P 450 (monóxido de carbono e imidazol) lo que indica que la oxidación del albendazol a albendazol sulfóxido es catalizada por el citocromo FMO.

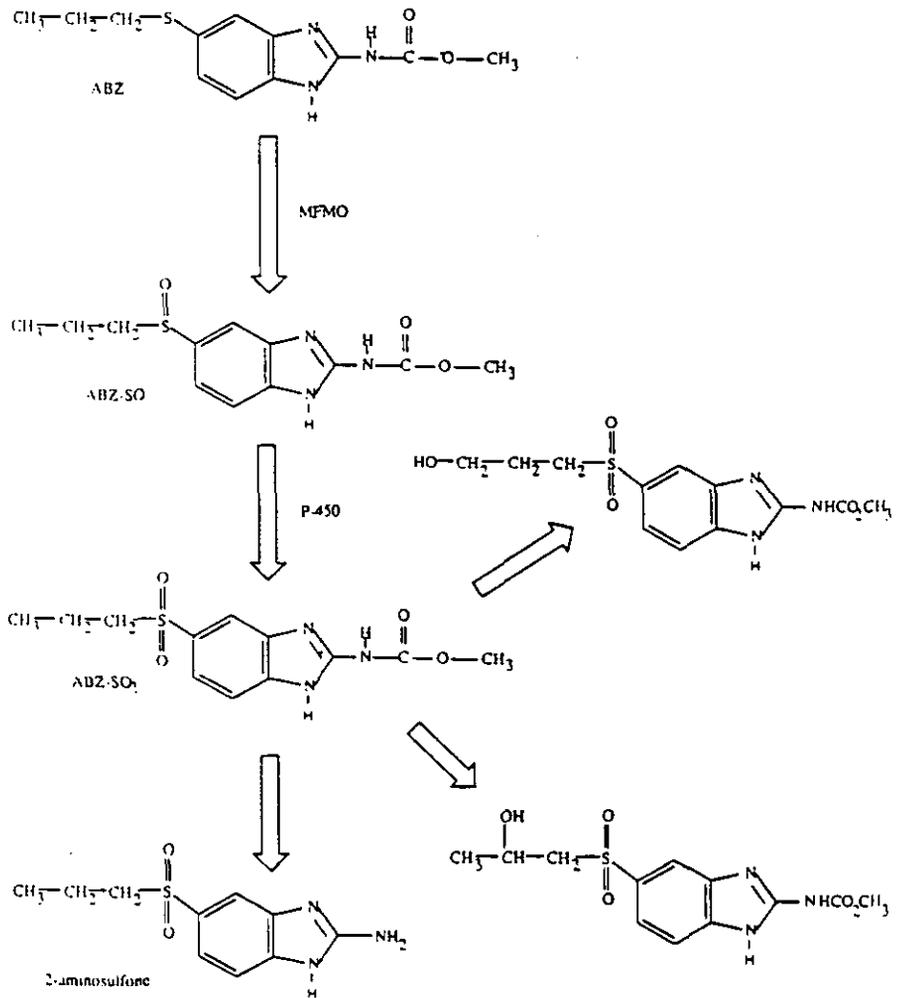


Figura 4. Algunas de las rutas metabólicas del albendazol.

Estudios posteriores del metabolismo del albendazol llevados a cabo por Amri y col (Amri, 1987) con microsomas de hígado de cerdo y con formas purificadas de P450 y FMO indican que ambos sistemas contribuyen a la oxidación inicial del albendazol. Y concretamente la actuación del P450 se ve confirmada porque al añadir un anticuerpo de la reductasa P450 la formación de sulfóxido decrece en un 37%.

También se ha demostrado para otros compuestos la oxidación de un compuesto concreto por dos enzimas diferentes (Tynes, 1983).

Por el contrario, la oxidación a sulfona se atribuye únicamente al citocromo P450 (Amri, 1988) puesto que la adición de un inhibidor del P450 que a su vez es estimulador del FMO (n-octamina), anula completamente la formación de la sulfona.

Es importante asimismo señalar la existencia de estudios que indican que el albendazol induce su propio metabolismo (Benoit, 1992). Ratas previamente tratadas con albendazol durante 10 días presentan un incremento del 10% en sus niveles de citocromo P450 y la actividad del mismo está aumentada en 30 veces.

Tanto la sulfona como el sulfóxido, son los metabolitos predominantes en plasma (Lanusse, 1990a) y también son los metabolitos mayoritarios en orina. Las proporciones de ambos metabolitos varían según la especie en la que se realiza el

estudio (Delatour, 1990a), aunque todos los trabajos coinciden en que sólo existen en sangre trazas de albendazol sin metabolizar (Lanusse, 1991) (Lanusse, 1992a) y (Benoit, 1992) lo que se atribuye a un fuerte efecto de primer paso hepático (Lanusse, 1991). Aunque también se produce una oxidación del albendazol a nivel del tracto gastrointestinal (primer paso hepático) (Lanusse, 1992 b), (Lanusse, 1993b). Por otra parte el albendazol sulfóxido también puede volver desde el plasma al tracto gastrointestinal por difusión o segregado en la bilis (Velbny, 1992) y (Hennessy, 1989) y ser reducido por la flora intestinal a albendazol (Lanusse, 1992b). Y también se han observado lentas transformaciones de albendazol a sulfóxido y sulfona en los fluidos ileal y ruminal y oxidaciones a sulfóxido y sulfona extrahepáticas (Lanusse, 1992b).

Es interesante señalar la existencia de estudios que muestran un mayor nivel de metabolitos de albendazol en aquellos animales que se encontraban infectados (fase intestinal de la triquinelosis) tras la administración oral de albendazol, lo que se podría explicar por un pH intestinal más bajo durante esta fase de la infección, por la inflamación intestinal que produce esta infección (Velebny, 1992) o por la autoinducción enzimática.

La oxidación del albendazol para dar lugar a una sulfona es sin duda la primera reacción metabólica pero una vez que ha tenido lugar existen numerosas rutas metabólicas tan importantes como ella.

El metabolito 2-amino sulfona tiene lugar tras la oxidación del azufre y la hidrólisis del grupo carbamato, se presenta en altas proporciones en todos los mamíferos excepto en el ratón. Existen otros metabolitos "sulfona" resultantes de la hidroxilación de la cadena lateral como la 2-hidroxipropil sulfona y la 3 hidroxipropil sulfona (Gottschall, 1990)

Otras rutas metabólicas minoritarias son la hidroxilación aromática y la metilación en el nitrógeno o el azufre.

También 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 y de otros bencimidazoles.

Todos los pasos en la farmacocinética se han descrito como posiblemente enantio dependientes: absorción, unión a receptores y proteínas plasmáticas, biotransformaciones y aclaramientos.

Concretamente el albendazol sulfóxido presenta un centro de asimetría ($R-SO-R'$) lo que origina que en el plasma existan los enantiómeros $(-)$ SO ALB y $(+)$ SO ALB (Delatour, 1990a), encontrándose en diferentes proporciones según la especie animal (Delatour, 1990b) y (Delatour, 1991a). En ratas el enantiómero $(-)$ SO ALB se encuentra en mayor proporción, mientras que en ovejas, cabras y terneros que el metabolito $(+)$ SO ALB aumenta enormemente con relación al $(-)$ SO ALB (Delatour, 1991b).

Los niveles iniciales de los enantiomeros no difieren tanto como cuando han transcurrido ya 36 h. Estos niveles iniciales pueden ser consecuencia de que los dos enzimas que catalizan la primera reacción de oxidación a sulfóxido (el citocromo P-450 y el FAD) son enantioselectivos opuestos (Ziegler, 1989). Los niveles tan diferentes a las 36 h entre ambos enantiomeros puede ser explicado porque la sulfonación del sulfóxido en oveja, cabras y terneros es una reacción dependiente el citocromo P-450 (Amri, 1988). Y este sulfóxido que es estereodepediente consume selectivamente el enantiomero (-)SO ALB, con lo que el enantiomero (+)SO ALB se encuentra a un nivel muy alto en plasma, pudiendo ser este enantiomero el responsable en mayor medida de la actividad antihelmíntica (Bogan, 1980).

Los metabolitos del albendazol originados tras administración oral de netobimín presentan fenómeno Flip-Flop (la velocidad de aparición de sus metabolitos es mayor que su velocidad de eliminación) (Lanusse, 1993a).

El porcentaje de excreción urinaria con respecto del total, también varía con respecto del animal de experimentación utilizado y va desde un 59,1% en vaca hasta un 19,5% en ratones (Gyurik, 1981). El metabolito mayoritario en orina en los animales utilizados (vaca, ratón, oveja y rata) es el albendazol con proporciones entre 22,9 y 26,6% mientras que la sulfona constituye tan solo el 6% del total de los metabolitos excretados.

La excreción fecal del albendazol puede ser debida a la proporción no absorbida del mismo o a la existencia de un ciclo enterohepático.

4. UTILIDADES VETERINARIAS DE LOS BENCIMIDAZOLES EN DISTINTOS TIPOS DE GANADO: ALBEMDAZOL.

Los bencimidazoles se introdujeron en la sanidad animal para el control de los nematodos gastrointestinales no solo para el tratamiento de animales de granja (ovejas, cabras, vacas, aves de corral y cerdos), sino también en animales de compañía (caballos y perros). Su uso se extendió rápidamente debido a que las ventajas que ofrecían eran mayores que las de los medicamentos anteriores como puede ser su amplio espectro de acción contra los estados inmaduros del parásito y su seguridad para el hospedador.

Los bencimidazoles no presentan efectos tóxicos y se ha demostrado que el tratamiento rutinario del ganado con este tipo de medicamentos incluso en casos de parasitismo leve proporciona ventajas económicas. De forma que los bencilimidazoles son de gran utilidad no solo terapéutica sino también en epidemiología por su amplia actividad que incluye nematodos extraintestinales y tenias (Campbell, 1990).

4.1. GANADO VACUNO.

Aunque los BZ se desarrollaron originariamente para el control de nematodos intestinales algunos miembros de este grupo químico son activos frente a estados maduros e inmaduros de *Dictyocaulus spp* y otros son activos frente al gusano a dosis elevadas.

En general los BZ son débilmente efectivos frente a *Trichuris sp* en rumiantes. Se absorben del tracto gastrointestinal y tras su paso hepático el medicamento o los metabolitos vuelven al rumen (vía sangre) y al intestino delgado (por el conducto biliar o vía sanguínea). La velocidad de absorción y excreción urinaria varía ampliamente en función del medicamento (Prichard, 1987), existiendo una mayor eficacia a este nivel con absorciones lentas y prolongadas con la existencia de un ciclo entre tejidos entéricos y parenterales.

Los nuevos compuestos (fenbendazol, oxfendazol y albendazol) presentan una actividad desde moderada a buena frente a estados de desarrollo larvario, larvas y adultos. El general los BZ son activos frente a las siguientes especies:

Haemonchus placei

Ostertagia ostertagi

Trichostrongylus axei

Bunostomum phlebotomum

Nematodirus helvetianus

Cooperia punctata

Cooperia oncophora

Trichostrongylus columbriformis

Oesophagostomum radiatum

Dictyocaulus viviparus

4.2. GANADO OVINO Y CAPRINO.

Incluso los BZ más antiguos son activos frente a estados larvarios si se aumenta la dosificación. Y el tratamiento es más efectivo si se prolonga durante varios días.

Las especies que afectan al ganado ovino y caprino y que son sensibles al tratamiento con BZ son:

Haemonchus contortus

Ostertagia spp

Trichostrongylus spp

Nematodirus spp

Bunostomum trigorocephalum

Chabertia ovina

Oesophagostomum colombianum

Oesophagostomun venulosum

Strongyloides papillosus

Dictyocaulus filaria.

Los medicamentos empleados en el tratamiento del ganado

caprino son los mismos que los utilizados en ovejas aunque las dosificaciones son las mismas que las empleadas con el ganado vacuno.

4.3. GANADO PORCINO.

La administración de los bencimidazoles en este tipo de ganado se realiza conjuntamente con la alimentación por razones de conveniencia y eficacia. La mayoría de los BZ son activos frente a los estados adultos de :

Ascaris suum

Hyostrogylus rubidus

Oesophagostomum spp.

Los nuevos BZ son activos frente a los adultos de *Tricuris suis* y algunos de los BZ son activos frente a los estados inmaduros de varias especies.

4.4. GANADO CABALLAR.

En este tipo de ganado algunos BZ deben administrarse a dosis elevadas para que tengan actividad frente a *Pascaris suum* y *Strongyloides westeri*.

La mayoría de las especies de *Strongyloides* son altamente susceptibles a los BZ aunque los estados larvarios tisulares y

los *Strongyloides* pequeños son menos susceptibles que las fases lumbinales.

El tratamiento generalmente se administra en la alimentación. Las especies de nematodos susceptibles al tratamiento con BZ en caballos son:

Pascaris equorum

Strongylus edentatus

Strongylus equinus

Strongylus vulgaris

Cyliclocyclus spp

Gyalocephalus spp

Poteriostomum spp

Trichonema spp

Cyathostomum spp

Cylocostephanus spp

Triodontophorus spp

Oxyuris equi.

4.5. PERROS.

La administración de los BZ en perros se lleva acabo en varios días para obtener resultados satisfactorios (Campbell, 1990) en dosis de : oxibendazol (5mg/Kg), mebendazol (22mg/kg) fenbendazol (50mg/Kg y oxfendazol (10mg/Kg). Las especies de gusanos con gancho contra los que se utilizan son:

Uncenaria stenocephala

Ancylostoma caninum

Y los ascaris:

Toxocara canis

Toxocaris leonina y

Trichuris vulpis.

4.6. AVES DE CORRAL.

Los BZ mas utilizados en aves son el mebendazol y el flubendazol administrados diariamente de forma conjunta con la alimentación durante 1-2 semanas.

Algunos BZ son activos frente a ciertos platelmintos. Así el cambendazol, febantel, oxfendazol y fenbendazol son activos frente a *Moniezia spp*. El albendazol por otra parte es también activo frente a *Moniezia spp* y a dosis elevadas frente a los adultos de *Fasciola*.

El promedicamento Netobimin es activo frente a *Moniezia spp*

y *Dicrocoelium* y a dosis elevadas también es activo frente a los adultos de *Fasciola*.

El Flubendazol es activo frente a *Raillietina cestillus*. Leofendazol frente a *Taenia hydatigena* y el mebendazol frente a *Taenia pisiformis* y otras *Taenia spp.*

Por otra parte los BZ se asocian con otros fármacos para el tratamiento de *Gastrophilus larvae*, *Fasciola hepática*, *Dirofilaria immitis* y varios gusanos.

5. MODO DE ADMINISTRACIÓN DE LOS BENCIMIDAZOLES EN EL ÁMBITO VETERINARIO.

Los BZ se administran generalmente en formas orales y a dosis única.

Se comercializan desde hace 30 años, por lo que el desarrollo y mercado de estos medicamentos se ha extendido. Un sólo fabricante de BZ, tiene comercializadas 21 formulaciones distintas de su producto (suspensiones, polvos, pastas, promezclas alimentarias...).

Asímismo se ha sustituido el uso de dosis simples únicas por

otras alternativas, como puede ser la incorporación del medicamento en bloques alimentarios para su administración en dosis inferiores y prolongadas.

Otra forma de administración, esta en dosis única, es la inyección intraruminal, que es una administración a nivel entérico por vía parenteral.

Existen otras formas de administración oral y liberación prolongada (Gyurik, 1988) (Zimmerman, 1988) (Barger, 1993) y (Ali, 1992), incluso de forma intermitente. El objetivo de estas formas de administración es reducir costes asociados al tratamiento de gran número de animales.

Otras formas de administración oral son aquellas que se diseñan de forma que quedan retenidas en el rumen o más precisamente en el retículo adyacente. Una de ellas, para uso en ganado vacuno, libera oxfendazol durante 4 meses en periodos separados de tres semanas. El funcionamiento del dispositivo consiste en la erosión continua de un disco de una mezcla magnésica que de forma periódica deja expuesto un comprimido anular de oxfendazol en el fluido intraruminal.

Existe otro dispositivo de cesión controlada, en este caso de albendazol para ganado vacuno, en el que la liberación periódica se encuentra controlada por un sistema electrónico con unas pequeñas pilas alcalinas (el periodo total es de tres meses).

Hay otro dispositivo de liberación controlada continua también de albendazol diseñado para ovejas, con un periodo total de liberación de tres meses. El medicamento se administra en cápsulas, junto con unas alas de plástico que mantienen la cápsula en el fluido ruminal. La cápsula dispone de 6 comprimidos de albendazol, que sucesivamente se ponen en contacto con el orificio final de la cápsula gracias a un dispositivo provisto de un muelle metálico (Delatour, 1990c).

Es necesario tener en cuenta en la administración de los BZ que estos medicamentos presentan embriotoxicidad en condiciones de experimentación por lo que es necesario consultar a los fabricantes de los mismos de forma previa a su administración en las primeras fases de embarazo.

6. LOS BENCIMIDAZOLES EN CLÍNICA HUMANA: ALBENDAZOL.

El primer benzimidazol introducido en la medicina clínica, el tiabendazol presentaba, como ya se ha dicho, unas aplicaciones limitadas debido a sus numerosos efectos secundarios: anorexia, náuseas, vómitos, alteraciones epigástricas, vértigo, prurito, eritema (eritema multiforme), diarrea, dolor de cabeza, fatiga, hipocalcemia, bradicardia, hipotensión y decaimiento (Cook, 1990). Por ello que se comenzó a utilizar, y se ha seguido utilizando

ampliamente, el mebendazol en el tratamiento de las nematodiasis intestinales (Cook, 1989).

La administración del mebendazol en USA y el Reino Unido es sólo bajo prescripción nominal. Pero en Francia, la mayoría de Africa, Oriente Medio, Caribe, Asia y Latino América no existen limitaciones de este tipo.

Sin embargo, el agente antihelmíntico de amplio espectro más efectivo es el albendazol (Ramalingam, 1983). Una de sus principales características es su rápida absorción (comparada con la de los otros bencilimidazoles) desde el intestino delgado por lo que alcanza concentraciones tisulares altas, incluso cuando se administra a dosis relativamente bajas.

El albendazol desde su aparición en el año 1979 ha sido sometido a un gran número de ensayos clínicos (Colaud, 1984).

En la actualidad este fármaco está siendo también utilizado en el tratamiento antimicrosporídeo, en las infecciones oportunistas en pacientes de SIDA (Haque, 1993), (Dieterich, 1994), (Weber, 1993) y (Curry, 1993).

El albendazol se encuentra disponible en el mercado en forma de comprimidos de 200 mg y en suspensiones con un contenido de 100 mg de albendazol en 5 ml. Este compuesto no presenta prácticamente efectos secundarios cuando se administra en

periodos de 1-3 días, aunque existen casos descritos de dolor epigástrico, diarrea, dolor de cabeza, náuseas, insomnio, vértigo y cansancio.

Los tratamientos quimioterápicos prolongados para hidatidosis y neurocisticercosis raramente se presentan acompañados de fiebre, leucopenia reversible, alopecia (Toma, 1993), altas concentraciones de transaminasas y de hepatitis. La seguridad de este fármaco aún no ha sido establecida en niños y está contraindicado su uso en embarazadas debido a los datos obtenidos de teratogenicidad y mutagenicidad (Cook, 1993). Así mismo debe ser utilizado con precaución en casos de cirrosis hepática.

En la tabla 1 se encuentran reflejadas las infecciones helmínticas susceptibles de tratamiento con albendazol, y en la tabla 2 las dosificaciones empleadas. En la mayoría de los ensayos clínicos, la velocidad de cura fué mayor con el albendazol que con el mebendazol. Las infecciones por cestodos con el rostro armado como el *Ancylostoma duodenale*, el *Necator americanus* y el *Ascaris lumbricoides* responden rápidamente.

Las dos infecciones colorrectales mayoritarias producidas por los nematodos *Trichuris trichuria* y *Enterobius vermicularis* también responden al tratamiento con BZ (Janssens, 1985) y (Cook, 1986).

Una de las infecciones intestinales por nematodos de difícil

tratamiento es el *Strongyloides stercolaris* puesto que presenta un ciclo de autoinfección endógena. Este nematodo es importante en dos contextos. Primero en el lumen del intestino delgado donde interfiere en la absorción intestinal originando un síndrome de malabsorción intestinal. Y segundo en el síndrome de hiperinfección que generalmente, aunque no siempre, tiene lugar en los casos de inmunosupresión. Durante dos décadas el tiabendazol, ha sido el agente quimioterápico utilizado para el tratamiento de este organismo a pesar de sus efectos secundarios desagradables. Actualmente se está utilizando el albendazol para el tratamiento de infecciones por *S. stercolaris* (Cook, 1989) (Ramalingam, 1983) (Colaud, 1984), puesto que sus efectos secundarios son mínimos y transitorios y que con administraciones de 2-3 días e intervalos de una semana se consigue el 100% de curación (Pungpak, 1987). Aunque es necesario señalar que no todos los resultados de experimentación son tan esperanzadores por lo que las pautas de dosificación del albendazol que deben utilizarse en este caso todavía se están discutiendo. También conviene señalar que la experiencia clínica en Sudamérica demuestra que otro bencimidazol, el cambendazol, es también muy activo frente al *S. stercolaris* (Grove, 1989).

El albendazol también se ha mostrado efectivo (400 mg diarios/durante 10 días) en el tratamiento de las infecciones intestinales de *Capillaria philippinensis* con resultado muy satisfactorio (curación) en 15 de los 16 pacientes a los que se les administró (Cross, 1987).

| Nematodos Intestinales | Albendazol |
|--|------------|
| Intestino delgado | |
| <i>Ascaris lumbricoides</i> | + |
| <i>Strongyloides stercoralis</i> | + |
| <i>Capillaria philippinensis</i> | + |
| <i>Angiostrongylus costaricensis</i> | ? |
| Tramo colorectal | |
| <i>Trichuris trichuria</i> | + |
| <i>Enterobius vermicularis</i> | + |
| Nematodos sistémicos | |
| <i>Trichinella spiralis</i> | + |
| <i>Gnathostoma spinigerum</i> | + |
| <i>Angiostrongylus cantonensis</i> | ? |
| Larvas cutáneas migratorias | + |
| Larvas viscerales migratorias | ± |
| <i>Onchocerca volvulus</i> | ? |
| Cestodos sistémicos | |
| <i>Echinococcus granulosus</i> | + |
| <i>E. multilocularis</i> | + |
| Neurocisticercosis (<i>Taenia solium</i>) | + |

Tabla 1. Infecciones helmínticas en humanos susceptibles de tratamiento con albendazol.

| Albendazol | |
|--|------------------------------------|
| Nematodos Intestinales | 400 mg diarios (1-2 dias) |
| <i>Strongyloides stercoralis</i> | 400 mg diarios (3 dias) |
| Síndrome de hiperinfección | 400 mg diarios (15 dias) |
| <i>Capillaria philippinensis</i> | 400 mg diarios (10 dias) |
| Nematodos sistémicos | 200 mg 2 veces dia (10-20 dias) |
| Cestodos sistémicos | |
| <i>Echinococcus sp.</i> | 400 mg diarios (28 dias) |
| Neurocisticercosis (<i>Taenia solium</i>) | 15 mg/Kg dias (30 dias) |

Tabla 2. Dosificaciones de albendazol en el tratamiento de las infecciones helmínticas en humanos.

6.1. INFECCIONES SISTÉMICAS POR NEMATODOS EN HUMANOS.

Se han realizado un ensayo clínico en el que se comparan los resultados obtenidos en las infecciones por *Trichinella spiralis* (poco frecuentes) tras 18 días de administración de albendazol frente a la administración, en otro grupo de pacientes de Tiabendazol y flubendazol. El ensayo se realizó sobre 117 individuos afectados y los resultados fueron similares, aunque en un exámen serológico de 59 de los pacientes, 16 meses después, se observó que los parásitos habían sido eliminados en 21 de los pacientes tratados con albendazol frente a sólo 10 de los tratados con tiabendazol ($p < 0.01$) (Fourestié, 1988).

Tradicionalmente las infecciones por larvas migratorias cutaneas y viscerales, tradicionalmente son tratadas con tiabendazol. El albendazol es generalmente efectivo en el tratamiento de las infecciones cutáneas (Wolf, 1993), (Suntharasamai, 1992), (Caumes, 1993), (Kollaritsch, 1993) (Caumes, 1993), y en el caso de las infecciones viscerales provocadas por *Toxocara canis* el albendazol se muestra superior en eficacia al tiabendazol (Stürchler, 1989).

6.2. INFECCIONES HEPÁTICAS.

El albendazol se utiliza en la práctica en el tratamiento de las infecciones producidas por *Clonorchis sinensis* y *Opisthorchis sp.*

6.3. CESTODOS DEL INTESTINO DELGADO

Los bencimidazoles se presentan en la actualidad como tratamiento de las infecciones sistémicas producidas por cestodos. Aunque su eficacia en el tratamiento de las infecciones causadas por *Taenia saginata* y *Taenia solium* son actualmente cuestionadas (Fran, 1986).

6.4. INFECCIONES SISTÉMICAS POR CESTODOS.

La hidatidosis y cisticercosis presentan como hecho común el causar lesiones derivadas de una ocupación espacial. En la hidatidosis, el órgano más afectado es el hígado y en la cisticercosis, el sistema nervioso central. Hace una década, el único tratamiento para la hidatidosis era la cirugía, con el grave problema de presentar un 10% de mortalidad y una elevada

recurrencia.

El primero de los BZ utilizados en su tratamiento fué el mebendazol, con dosis de 50 mg/Kg diarios durante tres meses. Esta dosificación es necesaria debido a la baja absorción oral de este tipo de medicamento, aunque sus efectos secundarios (agranulocitosis, reacciones anafilácticas y glomerulonefritis) junto con su errática biodisponibilidad, suponen un serio inconveniente.

Con el fin de evitar dichos problemas, los últimos estudios clínicos en este campo de investigación se dirigen hacia el albendazol (Gil-Grande, 1993), (Yasawy, 1993), (Van-Nieuwkerk, 1993), (Kumar, 1993), (Agrawal, 1993), (El-Mufti, 1993), (Bondiau, 1993) y (Van-Sinner, 1993), cuyo metabolito activo (el albendazol sulfóxido) difunde libremente a través de la membrana parasitaria alcanzándose una concentración efectiva en el fluido quístico y en el quiste en general. Asimismo existen referencias bibliográficas del tratamiento de las infecciones por *Echinococcus granulosus* con albendazol (800 mg diarios) (Horton, 1989) y en *E. multilocularis* presentandose mejores resultados en el tratamiento de la infección producida por *E. granulosus*. Al mismo tiempo que no aparecen efectos secundarios graves.

Existen también datos esperanzadores en la utilización del albendazol en hidatidosis cerebral (Todorov, 1988) y (Liu, 1993) (Moskopp, 1993), aunque los mejores resultados se obtienen en el

tratamiento de las infecciones pulmonares (debido a la delgada membrana quística). Sin embargo, los quistes hepáticos y las localizaciones óseas de los mismos responden peor al tratamiento.

La mayoría de los expertos admiten que en casos de hidatidosis diseminadas o inoperables la terapia con albendazol es beneficiosa (Horton, 1989). Y lo que es más, este compuesto químico debiera siempre administrarse en el período prequirúrgico, puesto que parece ser que en una pauta posológica de un mes con 10 mg/Kg diarios se produce la muerte de la mayoría de los protoescolex (Horton, 1989). Son precisamente este tipo de datos los que hacen aún mas interesantes aquellos estudios encaminados a mejorar la biodisponibilidad de este fármaco.

Finalmente, añadir, que se recomienda también la utilización del albendazol en el tratamiento de las neurocisticercosis (Sánchez, 1993), (Kapil, 1993), (Medina, 1993), (Guerra, 1993), (Suri, 1994), (Baver, 1994), (Barry, 1993), (Mukherjee, 1993), (Del-Brutto, 1993), (Botero, 1993), (Chotmongkol, 1993) y (Dharnidharka, 1993) sobre todo en aquellos casos en los que el prazicuantel se muestra ineficaz (Sotelo, 1988).

B. SOLUBILIDAD DE SÓLIDOS EN LÍQUIDOS: EXALTACIÓN DE LA SOLUBILIDAD.

Para que tenga lugar la absorción de los principios activos a través de las membranas biológicas, los solutos deben encontrarse casi siempre en forma molecular dispersa, es decir, disueltos. Por lo que el estudio de la solubilidad de los principios activos y los factores que la afectan es especialmente importante en las ciencias farmacéuticas.

En el presente capítulo sólo haremos referencia a la solubilidad de sólidos en líquidos.

Asímismo sólo haremos referencia a algunos de los factores que afectan a la solubilidad como son la presencia de aditivos, el tamaño de partícula, los solutos electrolitos débiles, la naturaleza del solvente (cosolventes) y las características del cristal, aunque existen otros factores como son el del ión común, la temperatura, la estructura molecular del soluto y la utilización de sales de medicamentos.

1. SOLUBILIDAD DE SOLUTOS EN LIQUIDOS.

Podemos utilizar un modelo simple para el estudio del proceso de disolución. La energía requerida en el proceso (w) será igual a la suma de la energía necesaria para separar las moléculas de soluto (w_{22}) más la energía que es necesario aplicar

para que se cree un espacio entre las moléculas de solvente (w_{11}) y la energía de interacción entre soluto y solvente (w_{12}).

El grado de interacción entre soluto y solvente dependerá de la naturaleza física y química del soluto (de su grado de ionización). Esta energía de interacción soluto-solvente sería $2w_{12}$ si la interacción se lleva a cabo con una molécula de soluto y dos de solvente. De esta forma toda la energía necesaria para el proceso de disolución ideal desarrollado por una molécula de solvente será:

$$w = w_{22} + w_{11} - 2w_{12}$$

Y para n moléculas de solvente será:

$$w = n (w_{22} + w_{11} - 2w_{12})$$

Si esta energía (w) es negativa, el proceso será exotérmico; y si es positiva el proceso de solución es endotérmico.

Para un solvente determinado w_{11} es constante, pero el tamaño de la cavidad que se necesita crear depende del tamaño de la molécula de soluto, y así se demuestra que la solubilidad de moléculas de la misma naturaleza disminuye al aumentar su peso molecular. Asimismo en estas series de compuestos aparecer una correlación entre el comportamiento en la fusión y la solubilidad. Lo que se explica que el punto de fusión sea un reflejo de la fuerza de cristalización que a su vez se ve reflejado en la magnitud de la energía w_{22} . Formas polimórficas que tienen distintos puntos de fusión, tienen distintos coeficientes de

solubilidad, y por lo tanto, distinta biodisponibilidad.

La ecuación que describe la solubilidad de un sólido (expresado en fracción molar X_2) que forma una solución ideal y que relaciona su punto de fusión (T_f), temperatura (T) y calor de fusión (H_f) es:

$$\log X_2 = \frac{-H_f}{2,303R} \cdot \frac{T_f - T}{T_f T}$$

Con lo que la solubilidad a una temperatura dada T será mayor cuanto menor sea el calor de fusión y el punto de fusión.

En los casos no ideales, las interacciones entre las moléculas de soluto y solvente (w_{12}) puede ser positivo o negativo. Para tener en cuenta tales interacciones se sustituye la fracción molar por la actividad (a_2) de forma que la fórmula quedaría:

$$\log a_2 = \frac{-H_f}{2,303R} \frac{T_f - T}{T_f T}$$

Y así:

$$\log X_2 = \frac{-H_f}{2,303R} \frac{T_f - T}{T_f T} - \log \gamma_2$$

donde γ_2 es el coeficiente de actividad que depende de las propiedades de soluto y solvente.

2. FACTORES QUE AFECTAN A LA SOLUBILIDAD DE SÓLIDOS EN LÍQUIDOS.

2.1. PRESENCIA DE ADITIVOS.

Las sustancias aditivas pueden aumentar o disminuir la solubilidad de un soluto en un solvente dado. El efecto de un aditivo depende en gran medida de la influencia que tiene en la estructura del agua o en su capacidad para competir con las moléculas de solvente y de agua.

Según la eq. de Setschenow la cuantificación del efecto de un aditivo en la solubilidad de otro soluto obedece a la expresión:

$$\log \frac{S_0}{S} = KC_a$$

Donde S es la solubilidad en presencia del aditivo, C_a es la concentración del aditivo, S_0 es la solubilidad en ausencia del aditivo y K es el coeficiente de exaltación. K es positivo cuando el coeficiente de actividad aumenta con el aditivo y es negativo cuando el coeficiente de actividad disminuye con el aditivo. Es decir si K es negativo la solubilidad se ve exaltada.

2.2. INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA.

La velocidad de disolución es principalmente función de la superficie de las partículas de soluto. Una reducción del tamaño de partícula aumenta la superficie y por lo tanto la velocidad de disolución. Las moléculas que se encuentran en las capas superficiales están en un estado de alta energía puesto que no tienen moléculas a su alrededor a las que se encuentren unidas y su energía libre es mayor que la de las moléculas que se encuentran en el interior. Al disminuirse el tamaño de partícula, en gran medida, una proporción significativa de las moléculas se encuentra en un estado de energía diferente. La solubilidad (S_r) varía con el radio de partícula (r) de acuerdo con la eq.:

$$\log \frac{S_r}{S_\infty} = \frac{2\sigma V}{2,303RT\rho r}$$

Donde S_∞ es la solubilidad del sólido cuando las partículas son grandes ($r \rightarrow \infty$), σ es la energía interfacial de las partículas en el solvente. V es el volumen molar de las partículas y ρ es la densidad del sólido. Sin embargo el aumento teórico de la solubilidad de las partículas muy pequeñas no siempre se cumple en la práctica posiblemente debido a la dificultad de humectación de las partículas muy pequeñas (Lachman, 1970), y a la posible agregación y aglomeración de las partículas por su energía interfacial que se ha aumentado y por las consiguientes fuerzas de atracción de Van der Waals entre

moléculas no polares (Chiou, 1971).

2.3. SOLUTOS ELECTROLITOS DÉBILES.

La gran mayoría de los medicamentos son electrolitos orgánicos y por lo tanto hay cuatro parámetros que determinan su solubilidad:

- El grado de ionización.
- El tamaño molecular.
- La interacción de los grupos sustitutivos con el solvente.
- Las propiedades del cristal.

En este capítulo estudiaremos la solubilidad de electrolitos débiles y la influencia del pH en la solubilidad acuosa.

De los puntos indicados sólo nos ocuparemos de dos: Influencia de cosolventes en la interferencia soluto-solvente, y polimorfismo y solvatación.

2.4. NATURALEZA DEL SOLVENTE: COSOLVENTES.

El recurso de la utilización de mezclas de solvente se utiliza cuando la solubilidad en un solvente es limitada o cuando las características de estabilidad de las sales solubles impiden su uso. Muchas de las formulaciones farmacéuticas son sistemas compuestos. La adición de nuevos solventes complica la aplicación de modelos teóricos que permitan predecir la solubilidad en estas mezclas de solventes.

Entre los solventes miscibles con el agua utilizados en formulaciones farmacéuticas se pueden incluir glicerol, propileno, glicol, alcohol etílico y polioxietilenglicol. Los aditivos influyen en las energías interfaciales soluto-solvente o en las energías de disociación de los electrolitos mediante cambios de la constante dieléctrica.

Un descenso de la constante dieléctrica reduce la ionización lo que originaría un descenso en la solubilidad. Pero este efecto puede verse contrarrestado por una mayor afinidad de las especies en presencia del cosolvente.

Finalmente, conviene recordar que la importancia de la naturaleza del solvente se ve reflejada en el histórico aforismo "semejante disuelve a semejante". En este sentido es necesario puntualizar que con frecuencia para satisfacer esta condición de

semejanza se utilizan mezclas de solvente en los que el principio activo tiene una mayor solubilidad.

2.5. CARACTERISTICAS DEL CRISTAL: POLIMORFISMO Y SOLVATACION.

Las fuerzas de interacción con las moléculas adyacentes en la red determinan el valor de la entalpía de red. Las interacciones dependen de las posiciones relativas y las orientaciones de las moléculas en el cristal. Cuando las moléculas se disponen en diferentes formas unas con respecto a otras en la estructura de red, se originan distintas formas cristalinas que se conocen como polimorfos y que, consecuentemente, poseen distintas energías de red. La forma polimórfica con la menor energía libre será la más estable y poseerá el punto de fusión más alto.

C. DISPERSIONES SÓLIDAS.

El método de exaltar la disolución de un fármaco escasamente soluble mediante su incorporación en una fase soluble o matriz fué inicialmente propuesto por Sekiguchi y Obi en 1961 (Sekiguchi, 1961). Como matriz hidrosoluble se utilizó urea y el método de preparación fué el de fusión. El concepto fué posteriormente ampliado por Tachibana y Nakamura que utilizaron PVP como vehículo y el método de disolución para preparar dispersiones acuosas de fármacos orgánicos escasamente solubles (Tachibana, 1965).

Las matrices utilizadas tienen distintas propiedades físicas y fisicoquímicas. Aunque en su mayor parte se pueden clasificar en: azúcares, polímeros solubles, surfactantes o ácidos solubles. Las técnicas de preparación utilizadas son también diversas.

En la actualidad, el término dispersión sólida también se aplica a los sistemas que contienen matrices insolubles. Las formas farmacéuticas que se obtienen a partir de este tipo de dispersiones sólidas pueden ser considerados como sistemas matriciales y no son objeto de estudio por nuestra parte.

1. DEFINICIÓN Y TIPOS DE DISPERSIONES SÓLIDAS.

Una dispersión sólida se define como la dispersión de uno o más principios activos en un vehículo inerte al estado sólido (Sekiguchi, 1961).

1.1. TIPOS DE DISPERSIONES SÓLIDAS SEGUN LA ESTRUCTURA FÍSICA Y QUÍMICA.

Los tipos de dispersiones sólidas fueron clasificados en primer lugar en cuanto a su estructura química y física por Chiou y Riegelman (Chiou, 1971) en:

1.1.1. Mezclas Eutécticas simples.

Se obtienen por rápida solidificación de la mezcla de dos componentes al estado líquido (fundidos) con completa mixcibilidad líquida y sin solución sólida. Termodinámicamente este sistema se considera como una mezcla física íntima de dos compuestos cristalinos. Los espectros de difracción de RX de estas mezclas eutécticas presentan los picos de los espectros de mezclas físicas porque no hay solución al estado sólido.

1.1.2. Soluciones sólidas.

El soluto sólido se encuentra disuelto en un solvente al estado sólido. Se llama también cristal mixto puesto que ambos componentes cristalizan en un sistema homogéneo monofásico.

1.1.2.1. Soluciones sólidas continuas (Isomorfas, Completas o Ilimitadas).

Los componentes son solubles al estado sólido en todas las proporciones.

1.1.2.2. Soluciones sólidas discontinuas.

Son solubles al estado sólido en determinadas proporciones. Se puede decir que casi todas las sustancias son solubles al estado sólido con otras sustancias siempre que la proporción del principio activo sea lo suficientemente pequeña (aunque casi no se podría detectar).

1.1.2.3. Solución sólida sustitucional.

La molécula de soluto sustituye a una molécula de solvente. Por lo tanto ambos tamaños de moléculas deben semejarse (el tamaño de sus diámetros deben diferir en menos del 15%).

1.1.3. Precipitados amorfos en un vehículo cristalino.

Los polvos amorfos presentan una velocidad de disolución mayor debido a que su energía como ya se ha visto es menor. Posiblemente se formen con más facilidad mediante la técnica de enfriamiento rápido.

1.1.4. Formación de complejos o compuestos.

No son dispersiones sólidas propiamente dichas pero se forman durante el proceso de producción.

La PVP puede formar complejos insolubles con algunos principios activos como son la penicilina, novocaina, hexobarbital, quinina etc.

1.1.5. Mecanismos misceláneos o de combinación.

En ocasiones una dispersión sólida no pertenece a uno de los cuatro tipos descritos anteriormente sino que es una mezcla de varios de ellos.

Los métodos de determinación de los distintos tipos de dispersiones sólidas son el análisis térmico diferencial, la difracción de RX, la microscopía y los estudios de velocidad de cesión de medicamento.

1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS SEGUN EL MÉTODO DE OBTENCIÓN.

Atendiendo al método de obtención las dispersiones sólidas se pueden clasificar en :

1.2.1. Método de fusión.

Este método que fué propuesto originalmente por Sekiguchi y Obi en 1961 (Sekiguchi, 1961) mostraba la diferencia en la absorción humana de dos tipos de mezclas de sulfatiazol: una mezcla eutéctica obtenida por fusión y una mezcla física. Dentro de los métodos de fusión y según el proceso de obtención de dispersiones sólidas que se utilice se pueden distinguir dos tipos de métodos: el métodos de cofusión y el método de fusión del vehículo.

1.2.1.1. Método de cofusión.

Se basa en el hecho de que un sistema binario posee un punto de fusión diferente y a la vez inferior al de sus componentes. El punto de fusión de un sistema binario depende de su composición (además de la naturaleza de los componentes y de su concentración en la mezcla).

El vehículo y el principio activo se reducen al mismo tamaño

granulométrico antes de realizar la mezcla. Esta mezcla física se calienta mediante una placa calefactora, o bien por inmersión en un baño de aceite, y se somete a una agitación constante hasta la obtención de un líquido cofundido homogéneo.

Este cofundido es posteriormente enfriado a temperatura ambiente o bien en forma acelerada mediante un refrigerante. La mayoría de los cofundidos necesitan a continuación un período de reposo de unos pocos días en un desecador en presencia de un agente deshidratante como el anhídrido fosfórico o el gel de sílice (Ravis, 1981). La masa sólida así obtenida se pulveriza en un mortero o en un molino de bolas y a continuación se tamiza.

Las ventajas de este método son la simplicidad y la reproducibilidad de la fabricación. Así mismo, el enfriamiento rápido del cofundido permite obtener una solución saturada del principio activo en el vehículo o una dispersión del principio activo en estado amorfo en este vehículo (Jefeure, 1985).

Los inconvenientes son en primer lugar la dificultad de la utilización de este método con aquellos principios activos que se descomponen o bien se evaporan por la fusión. A fin de prevenir la oxidación de los fármacos, el proceso se puede llevar a cabo en presencia de un gas inerte (Sekiguchi, 1961). Y para evitar el problema de la sublimación se utiliza un tubo sellado (Rabinder, 1980).

1.2.1.2. Método por fusión previa del vehículo.

El método se basa en la fusión de una cierta cantidad de vehículo. A continuación se añade el principio activo. La mezcla se calienta lo que sea preciso y se agita hasta que el principio activo esté disuelto, o hasta que la dispersión tenga un aspecto homogéneo, y a continuación se enfria. Al igual que en el caso anterior el enfriamiento puede ser lento a temperatura ambiente (McGinity, 1983) o bien rápida mediante inmersión en un baño de hielo. Finalmente, la mezcla sólida es pulverizada y tamizada.

Las ventajas de este método son las mismas que las del método anterior. A lo que se le añade que como el punto de fusión del vehículo (generalmente PEG) suele ser bajo (65-70°C) no se presentan los problemas de inestabilidad química del producto debida al calentamiento a altas temperatura ni el problema de evaporación (Stavchansky, 1983).

El principal inconveniente de este método es que la dispersión del principio activo está limitada por su solubilidad.

Mediante la utilización de esta técnica se han obtenido dispersiones sólidas de principios activos líquidos (Chiou, 1971a).

1.2.2. Método del solvente: Coprecipitados.

Este método de preparación de dispersiones sólidas por coprecipitación se basa en la disolución del principio activo y del vehículo en un solvente común que posteriormente es eliminado por evaporación. Los solventes que generalmente se utilizan son etanol (Ravis, 1981) (Rabinder, 1980a y b) (McGinity, 1983), (Chiba, 1991), (Yuasa, 1993) y (Yuasa, 1993), metanol (Miralles, 1982) o cloroformo (El-Gamal, 1978).

1.2.2.1. Factores que afectan a la estructura de las dispersiones sólidas obtenidas por el método del solvente.

- Temperatura de evaporación del solvente (Salama, 1981).
- Duración del proceso (Chemtob, 1985).
- Proceso de desecación, según sea mediante aire frío (Ravis, 1981), a 2°C (Rabanon, 1983) o en presencia de anhídrido fosfórico (Rabinder, 1980a y b).

Según el proceso de desecación que se siga los polimorfos obtenidos no son los mismos (Graf, 1982) o incluso pueden producirse forma amorfas o cristalinas (Junginger, 1976) y (Corrigan, 1974).

- Naturaleza del solvente (El-Dalsh, 1982). La utilización de distintos solventes conduce a la obtención de diferentes polimorfos cuyas velocidades de disolución no son equivalentes.

También es importante señalar la influencia del porcentaje

de vehículo que en el caso de la PVP debe ser elevado si se quiere obtener una dispersión amorfa del principio activo (Sugimoto, 1980) y (Sumnu, 1986).

La principal ventaja del método de los solventes es que no se produce la descomposición térmica de las sustancias activas, ya que la evaporación del solvente se realiza a bajas temperaturas (Lefebre, 1985). Su mayor inconveniente es el empleo de solventes orgánicos por su riesgo al ser inflamables o tóxicos. La cantidad de solvente a utilizar dependerá de la solubilidad del principio activo en él. Por otro lado la eliminación total del solvente es difícil y una retención residual del mismo puede conducir a la formación de pseudo-polimorfos (Florence, 1988). Por lo que la reproducibilidad del método de obtención no es tan buena como en el caso del método de fusión.

1.2.3. Método mixto.

Este método se basa en la disolución del principio activo en un solvente orgánico. Posteriormente esta solución se adiciona sobre el vehículo que previamente ha sido fundido. Por último se elimina el solvente (Chiou, 1971) (Vila Jato, 1983) (Fernandez, 1992) y (Fernandez, 1993).

Este método permite evitar la descomposición térmica de los

principios activos. Pero su principal desventaja es que puede conducir a la formación de pseudopolimorfos.

1.2.4. Método de Trituración.

Este método de obtención de dispersiones sólidas utiliza generalmente como vehículo la PVP.

Es el método alternativo cuando no se quieren utilizar disolventes orgánicos. Para la interposición del principio activo se utilizar un molino de rodillo, obteniéndose unos coprecipitados con el principio activo en forma amorfa (Nozawa, 1985). Existen referencias bibliográficas de dispersiones sólidas obtenidas mediante este método con las que se obtuvieron mejoras en la disolución y la biodisponibilidad de los fármacos estudiados (Kigasawa, 1981) (Patente japonesa, 1989 y 1990).

En la tabla 3 se encuentran reflejadas algunas de las dispersiones sólidas obtenidas por el método de trituración.

| Principio activo | Forma | Mejora en la disolución |
|--------------------------|----------------|-------------------------|
| Acridina | amorfo | + |
| Amobarbital | amorfo | + |
| Clordiazepóxido | par. amorfo | + |
| Acetato de Cloromadinona | no determinado | + |
| Clonazepán | par. amorfo | + |
| Diacetilmidecamicín | amorfo | no determinado |
| Diazepán | par. amorfo | + |
| Griseofulvina | amorfo | + |
| Indobufén Der. | amorfo | + |
| Kitasamicín | no determ. | + |
| Medacepán | par. amorfo | + |
| Menadiona | amorfo | + |
| Midecamicín | amorfo | + |
| Nifedipina | amorfo | + |
| Nitracepán | par. amorfo | + |
| Oxitetraciclina | par. amorfo | + |
| Fenacetina | amorfo | + |
| Fenitoina | amorfo | + |
| Fenotiazina | amorfo | + |
| Prednisolona | no determ. | + |
| Probucol | no determ. | + |

Tabla 3. Dispersiones sólidas obtenidas por el método de trituración (BASF, 1992).

2. LA POLIVINILPIRROLIDONA COMO VEHÍCULO EN DISPERSIONES SÓLIDAS.

La polivinilpirrolidona se define (Martindale, 1993) como una mezcla de polímeros sintéticos esencialmente lineales de 1-vinil-2 pirrolidona con diferentes longitudes de cadena y distintos pesos moleculares. la clasificación de la PVP se puede hacer por lo tanto en función de su peso molecular que se encuentra comprendido entre 10.000 y 700.000. Sus propiedades físicas varían en función de dicho peso molecular. Así por ejemplo la solubilidad disminuye a medida que aumenta el peso molecular, al mismo tiempo que aumenta la viscosidad de sus soluciones.

Comercialmente a las PVP se les asigna un número K que depende de la viscosidad de las soluciones que forman. Las PVP con diferentes valores de K presentan distintas propiedades.

Otro parámetro utilizado en la clasificación de las PVP es su solubilidad o nó en agua, y su posible administración parenteral. Los requerimientos exigidos a las PVP para su uso farmacéutico se encuentran descritos en las diferentes farmacopéas (Farmacopéa Europea, 1988), (USP XXII, 1990) y (British pharmacopoeia, 1993).

Las primeras dispersiones sólidas con antibióticos y PVP se describen ya en los años 60.

Las PVP actúan como excelentes auxiliares en las dispersiones y soluciones sólidas aumentando su solubilidad (Merkle, 1981), (Zingone, 1994), (Lefeure, 1985), (Badawan, 1991), (Sekikawa, 1983), (Gupta, 1991), (Singla, 1990) y (Corrigan, 1983) porque:

- Posee excelentes propiedades de hidrofília.
- Se dispone de distintas PVP de diferente peso molecular.
- Forma complejos solubles en agua con muchos principios activos (Deshpande, 1983).
- Es soluble en muchos solventes distintos.

Las dispersiones sólidas preparadas con PVP pueden modificar la cristalización de algunos principios activos ((Corrigan, 1976) y (Sekikawa, 1978). Según esta cristalización (en las DS) los principios activos (PA) se pueden clasificar en:

- PA en los que la cristalización es inhibida y/o retardada (sulfisoxazol y sulfametiazol).
- PA en los que la cristalización es retardada pero no inhibida (sulfamerazina).
- PA en los que la cristalización no es inhibida ni retardada.

También existen referencias que demuestran la formación de complejos con PVP (Thakkar, 1977), (Chemtob, 1989) y (Deshpande, 1983).

El PM de la PVP influye en la inhibición o en el retraso de la cristalización de los PA Según el principio activo utilizado puede ser más efectiva una PVP de mayor o menor PM (Sekikawa, 1978), (Corrigan, 1976) y Abdel-Rahman, 1989). Aunque existen autores como Simonelli, Mehta e Higuchi que señalan que si la PVP utilizada tiene un elevado PM es necesaria una mayor cantidad de la misma en la DS para inhibir la cristalización (Simonelli, 1969) y (Chemtob, 1989).

En cuanto a la influencia de porcentaje de PVP en la velocidad de disolución de los coprecipitados existen algunas experiencias que demuestran que si se utilizan PVP de bajo PM (10.000-40.000) la velocidad de disolución aumenta si se aumenta la proporción del vehículo (Deshpande, 1983), (Takayama, 1980) y (Chemtob, 1989).

3. EL POLIETILENGLICOL COMO VEHÍCULO EN DISPERSIONES SÓLIDAS.

La adición de PEG aumenta la solubilidad de los PA poco solubles en agua tanto a partir de mezclas físicas como en el caso de las DS (Ramadan, 1987), (Jafari, 1988) Y (Vera, 1991). Esta mejora en la solubilidad es debida a la presencia de un entorno hidrófilo alrededor del PA que favorece la disolución.

Como en el caso de la PVP, el aumento en la velocidad de disolución de las DS de PEG va a depender de algunos factores concretos como puede ser el método de preparación (solvente o cofusión) siendo mejor según algunos autores utilizar el método de fusión con el PEG (Draguet-Brughmans, 1979), (Ravis, 1981) y (Du, 1993).

Así mismo se han apreciado diferencias en la velocidad de disolución de las dispersiones sólidas según el PM del PEG utilizados aunque no se puede afirmar que como regla general el uso de PEG de mayor o menor Pm sea más adecuado. La elección del tipo de PEG a utilizar dependerá del PA y de su concentración en la dispersión puesto que los resultados de los diversos autores son muy variados (Geneidi, 1980).

Según Salib y Ebian (Salib, 1978) el papel jugado por el PM del PEG en la disolución de un principio activo poco soluble en agua dependerá de la concentración del PA. Para concentraciones superiores al 5% existe poca diferencia entre los cofundidos de PEG 6.000 y 20.000, pero para concentraciones más bajas, la utilización del PEG 20.000 favorece la formación de soluciones de inclusión mientras que con el PEG 6.000 la diferencia de dimensiones entre el PA y el vehículo es insuficiente para formar estas soluciones de inclusión.

Según Chiou y Riegelman (Chiou, 1977) el PM de los PA para

que puedan formar soluciones de inclusión debe ser entre 400 y 500.

En el caso de los coprecipitados Draguet-Brughmans (Draguet-Brughmans, 1979) han comprobado que la DS de meprobamato y PEG 4.000 y 20.000 la velocidad de disolución aumenta al aumentar el PM del PEG. Aunque otros autores trabajando con otros PA. obtienen distintos resultados (Salama, 1981) y (Geneidi, 1980).

En general la elección del PEG dependerá del PA utilizado y de su concentración en la dispersión.

Otro factor a tener en cuenta en la obtención de DS de PEG por el método de fusión es la agitación durante el proceso de solidificación. Por regla general una agitación constante durante el proceso de solidificación conduce a una disminución del tamaño del cristal, habiéndose encontrado incluso una velocidad de disolución mayor en los casos en los que el enfriamiento se produce con agitación continua, independientemente de que la solidificación se realice en un baño de hielo o a temperatura ambiente.

4. ESTABILIDAD DE DISPERSIONES SÓLIDAS.

Los PA asociados a vehículos pueden sufrir alteraciones físicas o químicas. Las alteraciones químicas dan lugar a la degradación del PA y las alteraciones físicas originan transformaciones a estados polimórficos que presentan distintas características de disolución.

4.1. ESTABILIDAD QUÍMICA.

Las inestabilidades químicas de las DS se encuentran menos reflejadas en la bibliografía que sus alteraciones físicas aunque existen casos tan importantes como el de las DS de nifedipina-PVP que se degrada completamente después de 6 meses de almacenamiento a 21 o a 40°C y con una humedad relativa del 75% (Sugimoto, 1980).

En la obtención de DS por el método de fusión son varios los autores que observan la aparición de distintas coloraciones en las DS de PA como son la griseofulvina (Chiou, 1969) y el dicumarol (Ravis, 1981) con PEG de distintos Pm.

La utilización de distintos azúcares también origina la aparición de coloraciones en las DS de distintos esteróides (Allen, 1977).

También existe referencias a la aparición de coloración en las DS de diazepam con manitol y con ácido cítrico (Henry, 1983).

La aparición de dichas coloraciones no significa necesariamente que se haya producido una degradación de los p.a. sino que en ocasiones puede ser debida a la descomposición de los azúcares (Allen, 1977), del sorbitol (Henry, 1983) o del ácido succínico (Chiu, 1973).

Aunque también puede ocurrir que la aparición de la coloración ponga de evidencia la degradación del PA como ocurre con la asociación de la digoxina y el PEG 6.000 (Ciu, 1970).

4.2. ESTABILIDAD FÍSICA.

En el caso de las inestabilidades físicas de las DS, esto presenta un problema mayor puesto que con facilidad pueden evolucionar a una recristalización del PA o a un aumento del tamaño de las partícula de PA.

En el caso de las mezclas eutécticas, las partículas dispersadas tienden a aumentar de tamaño y tiende a producirse una reducción de la energía interfacial del sistema. Esta evolución de las partículas tiende a verse aumentado con la temperatura y el tiempo de almacenamiento.

Para las soluciones sólidas el efecto físico más importante es la precipitación del PA a partir de las soluciones saturadas. La solubilidad de los constituyentes de las soluciones sólidas continuas o discontinuas disminuye a medida que desciende la temperatura de fusión. Cuando se obtiene una solución sólida y se disminuye bruscamente la temperatura desde una temperatura elevada a la temperatura ambiente se obtiene una solución sólida metaestable con un exceso de PA disuelto que tiende a precipitar para disminuir la energía libre total del sistema. Los estados vítreos son formas metaestables que tienden a evolucionar a formas más estables lo que se puede producir rápida o lentamente.

Las formas metaestables (o amorfas) de las DS son

susceptibles de sufrir los mismos cambios en la conservación.

Estas afirmaciones se encuentran comprobadas en la bibliografía existente de DS y así por ejemplo el estado vítreo de los cofundidos obtenidos con enfriamiento rápido de primidona-ác. cítrico se desvitrifican rápidamente a los 3 días de conservación a 60°C (Summers, 1976). Y la estabilidad física de los sistemas vítreos de fenobarbital-sacarosa es extremadamente sensible a la humedad (Ritche, 1984).

En aquellos sistemas en los que el PA se dispersa al estado amorfo la recristalización puede detectarse mediante los estudios de difracción de RX (Sugimoto, 1980) y (Ravis, 1981).

Otro de los estudios de estabilidad de las DS es la observación de los cambios que tengan lugar en la cinética de disolución tras un período de almacenamiento largo. Por ejemplo tras dos años de almacenamiento las DS de fenitoina-PVP presenta igual cinética de disolución que en el momento de su obtención.

La velocidad de disolución de las DS puede ser simplemente diferente de la de la muestra recién preparada (Roquecave-Anastasiadou, 1983), enlentecida (Henry, 1983) y (Sugimoto, 1980) o acelerada (Ford, 1977) aunque este último caso es menor frecuente.

Existen referencias de dispersiones sólidas con el PA en estado amorfo que son estables como es el caso de las DS de indometacia y PVP, que permanecen estables en condiciones de almacenamiento de 69 a 79% de humedad relativa y a una temperatura de 30°C (Imaizumi, 1983).

En la tabla 4 se pueden observar los resultados de estabilidad física y química de las distintas DS de PA y PVP.

PARTE GENERAL.

| Principio activo | Química | | Física | |
|--------------------------------------|---------|---|--------|---|
| | B | I | B | I |
| Amoxicilina | | * | | |
| Clordiacepóxido | | * | | |
| Clortalidona | | | * | |
| Clonacepán | | | * | |
| Colecalciferol | * | | | |
| Diacetilmidecamicín | | | * | |
| Diacepám | * | | * | |
| Metanosulfonato de dihidroergotamina | | | * | |
| Etilestrenol | | * | | |
| Flunitracepám | | | * | |
| Furosemida | * | | * | |
| Griseofulvina | | | | * |
| Hidrocortisona | * | | * | |
| Acetato de hidrocortisona | | | | * |
| Hidroflumetiazida | | | | * |

Tabla 4. Estabilidad física y química de distintas dispersiones sólidas de PVP en comparación con la de los principios activos. Clave: buena (B) o inferior (I).

| Principio activo | Química | | Física | |
|-----------------------|---------|---|--------|---|
| | B | I | B | I |
| Ibuprofeno | * | | | |
| Loracepám | * | | | |
| Linestrenol | | * | | |
| Medacepám | * | | | |
| Nabilona | | | | * |
| Nifedipino | * | | * | * |
| Nitracepán | | | * | |
| Nitrofurantoína | * | | | |
| Fenobarbital | | | * | |
| Fenilbutazona | * | | | * |
| Fenitoína | * | | * | |
| Prostaglandina | * | | | |
| Reserpina | * | | | |
| Sulfato de salbutamol | * | | * | |
| Sulfametiazol | | | * | |

Tabla 4 (continuación). Estabilidad física y química de distintas dispersiones sólidas de PVP en comparación con la de los principios activos. Clave: buena (B) o inferior (I).

| Principio activo | Química | | Física | |
|------------------|---------|---|--------|---|
| | B | I | B | I |
| Sulfisoxazol | | | | * |
| Testosterona | | | * | |
| Tinidazol | | * | | |

Tabla 4 (continuación). Estabilidad física y química de distintas dispersiones sólidas de PVP en comparación con la de los principios activos.

Clave: buena (B) o inferior (I).

4.3. INFLUENCIA DEL MÉTODO DE OBTENCIÓN EN LA ESTABILIDAD DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS.

Como ya se ha señalado existen una serie de factores relacionados con el método de preparación que pueden influir en la solubilidad de la DS final.

La utilización de un método de preparación u otro puede influir en la solubilidad aunque en este sentido los resultados obtenidos por los diferentes autores son distintos. En el caso de las DS de diazepam-PEG 4.000 la obtención a partir del método de fusión o del de coprecipitación no influye en el resultado final de la disolución (Takayama, 1982).

Las dispersiones sólidas obtenidas por coprecipitación presentaron en cambio una mayor solubilidad que las obtenidas por el método de fusión en el caso de las asociaciones de sulfabenzamida-PEG 6.000 y sulfabenzamida-manitol (McGinity, 1975), ác. nalidíxico-hexamina y ác. nalidíxico- Myrj^R 59 (El-Gindy, 1983) y diazepam-PEG 4.000 (Roquecave-Anastasiadou, 1983).

Las disoluciones de los principios activos fueron más rápidas en el caso de las DS obtenidas por el método de fusión de fenacetina-urea (Daavis, 1980), sulfabenzamida-urea y sulfabenzamida-dextrosa (McGinity, 1975)); ác. nalidíxico-PEG

6.000 y ác. nalidíxico-urea.

5. MECANISMO DE DISOLUCIÓN DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS.

Las dispersiones sólidas constituyen uno de los recursos farmacotécnicos utilizados para mejorar la solubilidad de aquellos principios activos que son escasamente solubles en medios acuosos. Cuando un fármaco poco soluble en agua, se administra por vía oral, la velocidad de absorción se encuentra controlada por su velocidad de disolución en el tracto gastrointestinal, por lo que la utilización de los métodos farmacotécnicos de exaltación de la solubilidad, como es el caso de las dispersiones sólidas, mejora la biodisponibilidad de los medicamentos poco solubles.

Las dispersiones sólidas son sistemas multicomponentes por lo que su disolución conllevará la solubilización simultánea de varias fases.

5.1. MODELO DE LOS SISTEMAS NO INTERACCIONANTES.

Uno de los modelos de disolución, concretamente el modelo de sistemas no interaccionantes, fue propuesto por Higuchi en 1965 (Higuchi, 1965). Según este modelo, si existen grandes diferencias entre las solubilidades de fármaco y de vehículo, éste último no actuará mejorando la disolución del fármaco, excepto para proporciones vehículo-principio activo muy elevadas. Y la velocidad de disolución del sistema no puede ser nunca

superior a la de los componentes por separado. Este modelo aplicado a las dispersiones sólidas presenta numerosas limitaciones, siendo incapaz de justificar el aumento en la velocidad de disolución conseguido con estos sistemas.

Por este motivo, el propio Higuchi amplió sus estudios de modelo de disolución para las situaciones en las que existe interacción entre los componentes, bien por formación de complejos solubles o por cambios al estado sólido.

La formación de complejos solubles entre vehículos y principios activos explica la obtención de velocidades de disolución superiores a la de los componentes puros. Y el máximo de disolución se alcanza en este tipo de proceso a una concentración específica de los dos componentes. Este mismo modelo matemático describe la velocidad de disolución de los complejos de B-ciclodextrinas.

Este modelo presupone que si no se producen cambios en el estado sólido durante la elaboración de las dispersiones sólidas prácticamente no habrá diferencia entre ellas y las mezclas físicas. Como en la práctica suelen existir diferencias significativas entre ambas, esto sugiere la posibilidad de que se produzcan cambios en el estado sólido (polimorfos, amorfos, solvatos...) Este modelo de los sistemas no interaccionantes predice que fármacos y vehículos se disuelven conjuntamente hasta la casi total disolución de uno de ellos, existiendo un porcen-

taje crítico de fármaco y vehículo durante el proceso de disolución y en este porcentaje crítico, los perfiles de liberación serán lineales bajo condiciones "sink". Para el resto de los porcentajes, el componente en exceso (fármaco o vehículo) formará una capa porosa en la superficie que supone una barrera adicional retrasando la disolución de la otra fase y originando unos perfiles de disolución más curvados. Este modelo de disolución explica la mejora en la velocidad de disolución para las situaciones en las que el vehículo se encuentra en bajas proporciones. Cuando el vehículo se emplea en altas proporciones y la velocidad de disolución está exaltada es necesario recurrir al modelo de velocidad de disolución controlada por el vehículo.

5.2. MODELO DE VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN CONTROLADA POR EL VEHÍCULO.

Para los sistemas con una baja concentración de fármaco, este principio activo queda dispersado como finas partículas o disolución sólida en el vehículo. Si el fármaco no interfiere en la velocidad de disolución del vehículo la velocidad de disolución para distintos principios activos en idénticas proporciones será la misma.

Por otra parte si el fármaco está presente en la dispersión sólida en forma de finas partículas y su disolución está controlada por el vehículo, la disolución dependerá principalmente del

tamaño de partícula del principio activo liberado al medio de disolución. Una disminución en este tamaño de partícula originaría un aumento en la velocidad de disolución de las dispersiones sólidas frente a las mezclas físicas aunque no existan interacciones al estado sólido.

5.3. MODELO DE LA VELOCIDAD DE DISOLUCION AL ESTADO SÓLIDO.

Esta teoría propuesta por Ford, establece un modelo general del modo de liberación de los principios activos dispersos en un vehículo a partir de discos de superficie constante con distintas proporciones de principio activo. Con lo que se establece un gráfico dividido en cinco zonas A, B, C, D y E (ver figura 5).

La zona A corresponde a las velocidades de disolución cuando las concentraciones de fármaco en el disco son muy bajas. El aumento en la velocidad de disolución es lineal con respecto al aumento en la concentración de fármaco en el disco. En esta zona la disolución no se ve afectada por ningún factor (es el valor máximo de la velocidad de disolución) como pudiera ser la precipitación del fármaco o la formación de una fina dispersión del principio activo en la superficie del disco por su reducido tamaño de partícula se redissuelve inmediatamente. El valor máximo de la velocidad de disolución es aquel en el que la concentración de fármaco en el disco es el máximo al que las partículas de principio activo liberadas en la superficie son capaces de

disolverse. A concentraciones superiores las opartículas se disuelven con más dificultad y tienden a aglomerarse.

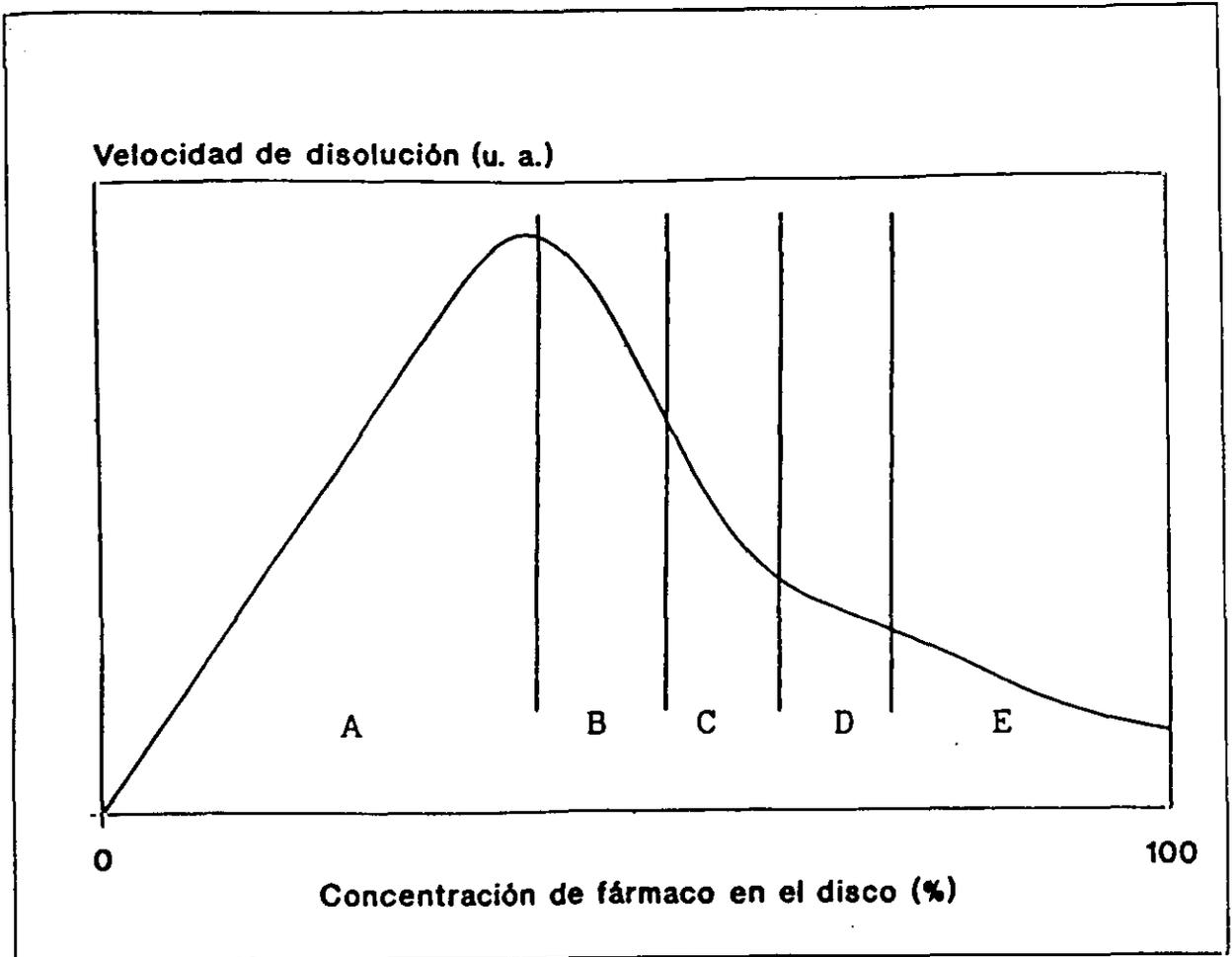


Figura 5. Diagrama esquemático del efecto del porcentaje de fármaco en la velocidad de disolución intrínseca.

En la zona B, se forman aglomerados compuestos únicamente por fármaco y que no participan en la disolución.

En la zona C, aumenta el fenómeno de aglomeración desprendiéndose algunos aglomerados que contienen también vehículo. Pudiendo aparecer nuevos picos en la disolución. En esta zona la disolución es lenta y errática.

En la zona D, las fuerzas de cohesión son tan importantes que los aglomerados no se desprenden y la disolución es muy lenta.

En la zona E la concentración de principio activo es tan elevada que el vehículo se disuelve dejando en la superficie del disco una capa del principio activo que se disolvrá lentamente, prácticamente a la misma velocidad a la que se disuelve el fármaco puro.

Los estudios de Ford con las dispersiones sólidas de glutetimida y PEG 6000 hasta un 10% de fármaco se corresponden con la zona donde la velocidad de disolución está controlada por el vehículo.

5.4. MECANISMOS QUE EXPLICAN EL AUMENTO EN LA VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN.

5.4.1. Reducción del tamaño de partícula.

Originalmente el aumento en la velocidad de disolución de las dispersiones sólidas se atribuyó a la reducción del tamaño de partícula del principio activo.

Sekiguchi y Obi (Sekiguchi, 1961) demostraron que sus dispersiones sólidas presentaban un aumento en la velocidad de disolución por formación de un eutéctico. En los sistemas eutécticos, la reducción del tamaño de partícula se debe a una cristalización simultánea del fármaco y el vehículo y en ellos el crecimiento de los cristales se ve retardado por la lenta migración y la dificultad de la nucleación en un medio viscoso (Attia, 1982).

5.4.2. Disminución de la agregación y aglomeración.

En ocasiones al micronizar un principio activo se obtienen una disminución en la velocidad de disolución del mismo en contra de lo esperado. Esto es debido a que en estos casos aumenta su tendencia agregarse. Y es esta tendencia a la agregación lo que se evita con la formación de las dispersiones sólidas.

5.4.3. Mejora de la humectabilidad de las partículas.

El vehículo utilizado en las dispersiones sólidas puede disminuir la tensión superficial del medio de disolución permitiendo un incremento en la humectabilidad de las partículas.

En los sistemas eutécticos, cada cristal de fármaco, está íntimamente rodeado por el vehículo hidrosoluble. Este vehículo se disuelve rápidamente al entrar en contacto con el agua lo que permite una mejor humectación de las partículas del fármaco. Además la humectabilidad al ser aumentada puede retardar la aglomeración o agregación de las partículas.

5.4.4. Aumento de la solubilidad del fármaco.

Este incremento en la solubilidad de las partículas se debe a dos causas principales:

a. La obtención de formas metaestables de mayor solubilidad como es nuestro caso.

b. A un efecto solubilizante del vehículo sobre el fármaco que se hace máximo en la capa de difusión puesto que en esta zona la concentración del vehículo es mucho mayor que en el resto del medio de disolución.

Aunque el aumento en la solubilidad no es un factor imprescindible para la mejora en la velocidad de disolución de

las dispersiones sólidas, como se ha demostrado en alguna ocasión.

5.4.5. Modificación en la naturaleza cristalina del fármaco.

Durante el proceso de elaboración de las dispersiones sólidas, el fármaco puede obtenerse en un estado distinto al inicialmente presente, en una simple mezcla física, encontrándose polimorfos, amorfos, solvatos e incluso complejos.

Si el fármaco en su nuevo estado presenta mayor solubilidad permanece estable en la dispersión y no revierte a la forma menos soluble al ponerse en contacto con el medio de disolución podrá esperarse un aumento en la velocidad de disolución respecto a la correspondiente mezcla física.

Durante el proceso de envejecimiento de las dispersiones sólidas, las formas cristalinas pueden evolucionar hacia otros estados cristalinos de menor o mayor velocidad de disolución; también se han descrito situaciones similares causadas por la simple pulverización del sólido.

5 4.5.1. Polimorfismo y estados amorfos.

El estado amorfo es el más inestable termodinámicamente. Se genera por enfriamiento súbito del fundido o por precipitación

rápida de soluciones orgánicas. El compuesto amorfo es más soluble que la misma especie química cristalizada, incluyendo cualquier polimorfo (Siminelli, 1969), (Corrigan, 1983) y (Babar, 1983). Aunque también puede ser menos soluble (Badawi, 1980).

5.4.5.2. Solvatos.

La recristalización de muchas sustancias a partir de una solución puede conducir a la formación de un compuesto sólido que contenga moléculas de disolvente como parte integrante de su estructura cristalina: son los nominados solvatos o hidratos, en el caso de ser el agua el disolvente atrapado. Los solvatos pueden considerarse formas seudopolimórficas ya que su solubilidad y velocidad de disolución pueden diferir considerablemente de las que presenta la forma no solvatada (Corrigan, 1974).

5.4.5.3. Complejos.

Aunque existen discrepancias entre la inclusión o no de los complejos en el grupo de las dispersiones sólidas, tradicionalmente han sido incluidos en este grupo.

Los complejos pueden formarse en el seno de las dispersiones sólidas o en el medio de disolución tras la liberación del principio activo. Los complejos formados pueden tener mayor o menor solubilidad que el compuesto puro.

5.4.6. Disminución de la energía de activación.

Algunas teorías explican el aumento en la velocidad de disolución de las dispersiones sólidas por un descenso en la energía de activación de la disolución.

En la mayoría de los casos no es un único factor el responsable en la mejora de la velocidad de disolución de las dispersiones sólidas sino la suma de varios de ellos.

De la experiencia de los distintos investigadores se desprende que los principales factores que controlan la liberación de estos sistemas son el porcentaje de fármaco-vehículo y la naturaleza física de la dispersión sólida.

5.4.6. Formación de coacervatos.

La formación de coacervatos en la superficie del coprecipitado y el solvente también puede explicar el aumento de la velocidad de disolución para algunos coprecipitados de bajo peso molecular (Draguet-Brughmans, 1979) y (Badawi, 1980).

En el caso de que el vehículo se disuelva llevando disperso el medicamento en el medio de disolución, la cesión del medicamento (v_m) es dependiente del producto de la velocidad de disolución del vehículo (v_v) por la proporción de medicamento presen-

te (concentración del medicamento/concentración del vehículo).
Lo que concuerda con las experiencias de Simonelli (Simonelli,
1969).

$$C_m = \frac{V_v \cdot C_{\text{medicamento}}}{C_{\text{vehículo}}}$$

6. APLICACIONES DE LAS DISPERSIONES SOLIDAS.

Existen numerosas referencias en la bibliografía en las que se ensaya la utilización de otros vehículos distintos a la PVP y el PEG en la obtención de las dispersiones sólidas como son la urea, distintos azúcares, etc.

En la tabla 5 se pueden observar los distintos principios activos formulados en dispersiones sólidas. Treinta materiales distintos han sido utilizados como vehículos para dispersiones sólidas (tabla 6). Las propiedades químicas y fisicoquímicas de dichos vehículos son muy distintas y en general se pueden clasificar como azúcares, polímeros solubles, surfactantes o ácidos solubles.

En la actualidad existen dispersiones sólidas utilizadas en formulaciones comerciales de los laboratorios Sandoz- Wander (Griseofulvina+PEG) y Lilly (nabilona+PVP) (cesanet+Grispeg).

Los principales inconvenientes de las DS que hacen que no existan más formulaciones comercializadas que incluyan DS son en primer lugar, la utilización frecuente de disolventes orgánicos en su obtención (coprecipitados) y en segundo lugar la alta proporción del vehículo que generalmente se requiere.

| Principio Activo | Vehículo |
|-------------------------------|---|
| Acetato de betametasona | Dextrosa (Allen, 1977) Galactosa " Sacarosa " |
| Acetato de cortisona | Dextrosa (Allen, 1977) Galactosa " Sacarosa " |
| Acetato de hidrocortisona | PVP (BASF, 1992) Sorbitol (Allen, 1977) Manitol " Sacarosa " |
| Acetato de prednisolona | PEG (Chemtob, 1985) PVP (BASF, 1992) |
| Acetohexamida | PVP (Graf, 1982) |
| Acido acetilsalicílico | PVP (Chemtob, 1985) |
| Acido benzoico | ácido cítrico (Chemtob, 1989) |
| Acido mefenámico | PEG (Ramadan, 1987) PVP " |
| Acido Nalidíxico | PVP (Sekikawa, 1978) PEG (Chemtob, 1989) |
| Acido oxolínico | PVP (Lefeure, 1985) |
| Alopurinol | PVP (BASF, 1992) |
| Aminopirina | PVP (BASF, 1992) |
| Aminosalicilato de feniramina | Eudragit ^R (BASF, 1992) |
| Amoxicilina | PVP (BASF, 1992) |
| Azapropazona | PEG (Ramadan, 1987) PVP " |
| Cafeína | PVP (Sekikawa, 1978) PEG (Chemtob, 1985) |

Tabla 5. Principios activos y vehículos formulados en dispersiones sólidas.

| | |
|----------------------------|---|
| Cinarizina | PVP (Chemtob, 1989) |
| Ciprofloxacino | PEG (Francés, 1991) |
| Cloranfenicol | PEG (Chemtob, 1985) PVP (Chemtob, 1989) |
| Clonazepam | PVP (BASF, 1992) |
| Clordiazepóxido | PVP (BASF, 1992) |
| Clorotiazida | PEG (Chemtob, 1989) |
| Clorpropamida | Urea (Ford, 1977) PVP (Chemtob, 1989) |
| Clortalidona | Urea (Ford, 1977) PVP (BASF, 1992) |
| Colecalciferol | PVP (BASF, 1992) |
| Cumarina | PVP (Sekikawa, 1983) PEG (Ravis, 1981) |
| Diacetilmidcamicina | PVP (BASF, 1992) |
| Diazepam | Polióles (Geneidi, 1980) PEG (Henry, 1983) |
| Dicumarol | PVP (Sekikawa, 1983) PEG (Ravis, 1981) |
| Digitoxina | PEG (Chemtob, 1985) PVP (Chemtob, 1989) |
| Digoxina | PVP (Chemtob, 1989) PEG (Chemtob, 1985) Urea |
| Dimetilbifenil carboxilato | PVP (Gu, 1989) PEG " Urea " |
| Espironolactona | PVP (El Dalsh, 1982) Polióles PEG (Chemtob, 1985) |
| Etilestrenol | PVP (BASF) |
| Etopósido | PEG (Du, 1993) |
| Fenacetina | Urea (Daavis, 1980) PEG " |
| Fenilbutazona | PVP (BASF, 1992) |
| Fenitoina | PVP (Nozawa, 1985) PEG (Stauchansky, 1983) |
| Fenobarbital | PVP (Corrigan, 1983) PEG (Chemtob, 1985) Ac. cítrico (Ritche, 1984) Sacarosa " Urea " |
| Floctafenina | PEG (Ramadan, 1987) PVP " |

Tabla 5 (continuación). Principios activos y vehículos formulados en dispersiones sólidas.

| | |
|--|--|
| Flunitracepán | PVP (BASF, 1992) |
| Glafenina | PVP (Ramadán, 1987) PEG " |
| Glibenclamida | PEG (Chemtob, 1985) PVP (Chemtob, 1989) |
| Glutetimida | PEG (Ford, 1983) Renex ^R 650 |
| Griseofulvina | PEG (Chemtob, 1985) PEG-Tween 20 (Veiga, 1993) Pentaeritriol (Chiou, 1969) Pentaeritriol tetraacetato " Ac. succínico " Ac. cítrico " Poli(vinil-metil/eter/ anhídrido maléico) (Flego, 1988) Estearato de PEG (Rabinder, 1980a) PVP (BASF, 1992) |
| Hidroclorotiazida | PVP (Chemtob, 1989) Xilitol " |
| Hidrocortisona | PVP (BASF, 1992) Sorbitol (Allen, 1978) Manitol " Sacarosa " |
| Hidroflumetiazida | PVP (BASF, 1992) |
| Ibuprofeno | PVP (BASF, 1992) |
| Indometazina | PEG (Imaizumi, 1983) PVP (Chemtob, 1989) Fosfatidilcolina (Fujii, 1993) |
| Lorazepám | PVP (BASF, 1992) |
| Linestrenol | PVP (BASF, 1992) |
| Ketoprofeno | PVP (Chemtob, 1989) |
| Medazepam | PVP (BASF, 1992) |
| Mebendazol | PEG (Chiba, 1991) PVP (Fernandez, 1988) |
| Mefrusida | PVP (BASF, 1992) |
| Meprobamato | PEG (Draguet-Brughmans, 1979) PVP (BASF, 1992) |
| Metanosulfonato de Dihidroergotamina | PVP (BASF, 1992) |
| 2- metil 3(4etoxifenil) 3-4- Dihidroquinazolinona | PVP (BASF, 1992) |
| 17-metiltestosterona | PEG (Chemtob, 1985) |

Tabla 5 (continuación). Principios activos y vehículos formulados en dispersiones sólidas.

| | |
|----------------------|--|
| Nabilona | PVP (Thakkar, 1977) |
| Niclosamida | PEG (Chemtob, 1985) |
| Nifedipina | PVP (Chemtob, 1989) |
| Nistatina | PVP (BASF, 1992) |
| Nitrato de miconazol | PVP (Jarafi, 1988) Urea " PEG " |
| Nitrazepam | PVP (BASF, 1992) |
| Nitrofurantoina | PVP (El-Gamal, 1978) PEG " Urea " Ac. deoxicólico (Chemtob, 1989) |
| Oxifenbutazona | PVP (Chowdary, 1989) HMPC " |
| Oxitetraciclina | PVP (BASF, 1992) |
| Oxodipino | PEG (Vera, 1991) PEG Teen (Veiga, 1993) |
| Papaverina | PEG (Chemtob, 1985) |
| Paracetamol | PEG (Vila-Jato, 1983) |
| Piroxicam | PEG (Fernandez, 1993) |
| Prednisolona | Sorbitol (Allen, 1978) Manitol " Sacarosa " |
| Prednisona | PVP (BASF, 1992) |
| Primidona | Ac. cítrico (Chemtob, 1989) |
| Propilfenazona | PVP (BASF, 1992) |
| Propiltiouracilo | PVP (Abdel-Rahman, 1989) |
| Prostaglandina | PVP (BASF, 1992) |

Tabla 5 (continuación). Principios activos y vehículos formulados en dispersiones sólidas.

| | |
|-----------------------|--|
| Reserpina | PVP (BASF, 1992) Ac. colánico (Chemtob, 1989) Eudragit ^R |
| Sulfabenzamida | PEG (Chemtob, 1985) Manitol " Ac. cítrico " Ac. succínico " Glucosa " |
| Sulfamerazina | PVP (Duchene, 1985) PEG (Salib, 1978) |
| Sulfametiazol | PVP (Sekikawa, 1978) Urea (Chemtob, 1985) |
| Sulfametizol | PVP (Sekikawa, 1978) |
| Sulfametoxazol | Sacarosa (Chemtob, 1989) PVP (Singla, 1990) |
| Sulfametoxidiazina | PEG (McGinity, 1983) |
| Sulfato de Salbutamol | PVP (BASF, 1992) |
| Sulfisoxazol | PVP (Sekikawa, 1978) Polisorbato 80 " PEG " |
| Teofilina | Monoéster poli(metilvinil/éter/ anhídrido maleico) (Moneghini, 1990) |
| Testosterona | PEG (Chemtob, 1985) PVP (BASF, 1992) |
| Tinidazol | PVP (BASF, 1992) |
| Tolbutamida | PEG (Rabinder, 1980a) Estearato de PEG " Glucosa (Chemtob, 1989) Manitol " Macrogol " PVP (Chemtob, 1989) |
| Trimetoprim | Sorbitol (Chemtob, 1985) Glucosa " Galactosa " Maltosa " Estearato de PEG " |

Tabla 5 (continuación). Principios activos y vehículos formulados en dispersiones sólidas.

| Azúcares | Materiales poliméricos |
|--|--|
| Dextrosa Galactosa Sucrosa Sorbitol Maltosa Xilitol Manitol Lactosa | Polivinilpirrolidona Polivinilpolipirrolidona Polietilenglicol Hidroxipropilmetil celulosa Metilcelulosa Pectina Hidroxipropilcelulosa Ciclodextrinas Galactoman |
| Misceláneos | Surfactantes |
| Pentaeritritetetracetato Hidroxialquilxantinas Urea Uretano Pentaeritriol | Estearato de polioxietileno Renex Poloxamer 188 Texafor ATP Ác. Deoxicólico Tween Span |
| Acidos Ac. Succinico Ac. cítrico | |

Tabla 6. Vehículos utilizados en la obtención de dispersiones sólidas.

PARTE ESPERIMENTAL.

A. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. MATERIAL: REACTIVOS E INSTRUMENTAL.

1.1. REACTIVOS UTILIZADOS.

Acetato sódico (Merck)

Ácido acético (Panreac)

Ácido clorhídrico (Merck)

Albendazol (Chemo Ibérica S.A.)

Albendazol (SmithKline Beecham Pharmaceuticals)

Alcohol etílico 96° (Panreac)

Carboximetilcelulosa sódica

Cloruro potásico (Merck)

Cloruro sódico (Panreac)

Cremophor^R EL (Panreac)

Fosfato disódico (Panreac)

Fosfato monosódico (Panreac)

Glicina.

N-Hexano (Panreac).

Polivinil pirrolidona:

Kollidon^R 12PF (BASF)

Kollidon^R 17PF (BASF)

Kollidon^R 25 (BASF)

Span^R 85 (Sigma)

Transcutol^R (Gattefosse)

Tween^R 20

1.1.1. Calidad análisis.

Mebendazol (Janssen)

Ricobendazol (Albendazol sulfóxido) (Robert Young and Co)

Metanol (Panreac)

Metanol HPLC (Merck)

N-hexano (Merck).

1.1.2. Otros.

Columna C₁₈ Lichrosorb RP18, 10µm, 200x4,6 mm.

Columna C₁₈ Nucleosil, 7µm, 100x4 mm.

Cepa del parásito *Trichinella spiralis* GM-1

Cepa del hospedador: Ratonés Swiss CD-1 (30-35g) (Charles River Spain)

1.1.3. Soluciones tampón.

Solución tampón pH 1,2.

KCl 0,2 M250 ml

HCl 0,2 M425 ml

Agua destilada csp...1000 ml

Solución tampón pH 2.

NaCl 5 M23,15 ml

Solución NaCl 1 M y Glicina 1 M5,3 ml

HCl 2 N7,35 ml

Agua destilada csp1000 ml

Solución tampón pH 3,5.

| | |
|------------------------------|----------|
| NaCl 5 M | 23,15 ml |
| NaCl 1 M y Glicina 1 M | 18,3 ml |
| HCl 2 M | 0,85 ml |
| Agua destilada csp | 1000 ml |

Solución tampón pH 4,5.

| | |
|--------------------------|---------|
| NaCl 5 M | 13,2 ml |
| Acetato sódico 2 M | 10 ml |
| Ác. acético 8,5 M | 5,75 ml |
| Agua destilada csp | 1000 ml |

Solución tampón pH 5,5.

| | |
|--------------------------|---------|
| NaCl 5 M | 13,2 ml |
| Acetato sódico 2 M | 10 ml |
| Ác. acético 8,5 M | 0,6 ml |
| Agua destilada csp | 1000 ml |

Solución tampón pH 6,5.

| | |
|------------------------------|---------|
| NaCl 5 M | 24 ml |
| Fosfato disódico 0,5 M | 8,3 ml |
| Fosfato monosódico 4 M | 1,7 ml |
| Agua destilada csp | 1000 ml |

Solución tampón pH 7,5.

| | |
|------------------------------|----------|
| NaCl 5 M | 24 ml |
| Fosfato disódico 0,5 M | 11,25 ml |
| Fosfato monosódico 4 M | 0,8 ml |
| Agua destilada csp | 1000 ml |

1.2. INSTRUMENTAL UTILIZADO.

Peachímetro Crison micropH 2002.

Espectrofotómetro

- Perkin Elmer 55B

- Beckman DU 6.

Karl-Fischer 658 KF Processor y Dossimat Metrhom Ltd.

Agitador magnético con placa calefactora.

Analizador térmico diferencial Mettler 6000.

Espectrofotómetro de RX Modelo Link-EXL.

Microscopio electrónico de barrido Jeol JSM 6400.

Liofilizador Telstar.

Cromatógrafo de líquidos Gilson (Bombas 305 y 306, módulo manométrico 805, mezclador 811B, detector UV mod. 116, inyector de muestras 231XL y 401C e integrador Spectra

Physics 4270).

Difractómetro de RX Siemens.

2. MÉTODOS.

2.1. MÉTODOS ANALÍTICOS DEL ALBENDAZOL.

Los métodos analíticos utilizados para la cuantificación del albendazol, sustancias relacionadas, productos de degradación y metabolismo son la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y la técnica espectrofotométrica.

2.1.1. HPLC.

Se ponen a punto dos técnicas analíticas. Una para el análisis de riqueza y productos de degradación para los estudios de estabilidad y otra para los análisis del albendazol y metabolitos en muestras biológicas para los ensayos "in vivo".

2.1.1.1. Método de análisis del albendazol como materia prima y en producto terminado.

Condiciones cromatográficas:

- Columna C₁₈ Nucleosil, 7 µm, 100 x 4 mm.
- Fase móvil:
 - Flujo: 1 ml/min.
 - Composición: Metanol: Agua (50:50) (v/v)

- Volumen de inyección: 20 μ l
- Detector:
 - Longitud de onda 291 nm.
 - Sensibilidad 0,2
- Integrador:
 - Atenuación: 8
 - Velocidad del papel 0,25 cm/min.
 - Tiempo de análisis 19 min.

- Determinación cualitativa del albendazol. Se trabaja con un estándar interno (mebendazol). Se disuelve una cantidad conocida de albendazol (patrón) (concentración 100 μ g/ml) y de mebendazol (concentración 100 μ g/ml) en metanol. La figura 6 muestra el cromatograma característico de una muestra de albendazol con un estándar externo de mebendazol. El tiempo de retención del albendazol es de 15 min., mientras que el del mebendazol es de 9 min. El tiempo de retención relativo del albendazol es de 1,88 min. respecto al tiempo de retención del estándar interno.

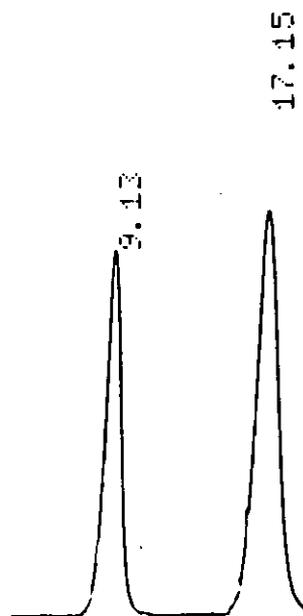


Figura 6. Cromatograma característico de una muestra de albendazol con un estándar externo de mebendazol.

- Determinación cuantitativa del albendazol. Se pesa exactamente una cantidad de 50 mg de albendazol (patrón) que se lleva a 250 ml con metanol. A partir de esta solución madre se toman fracciones alicuotas de 1; 1,5; 2,5; 3,5; 5; 6,5 y 7,5 ml que se llevan a 10 ml con metanol. Se realizan 3 determinaciones de cada punto. La recta de calibrado del albendazol obtenida es:

$$ABC = -13.802 + 4466,1 C (\mu\text{g/ml})$$

$$r^2 = 0,9961 \quad n = 21$$

2.1.1.2. Método de determinación del albendazol y ricobendazol en muestras biológicas.

El método analítico permite analizar el albendazol y su principal metabolito, el ricobendazol, en muestras biológicas.

Condiciones cromatográficas:

- Columna C₁₈ Lichrosorb RP18, 10 μ m, 200x4,6 mm.
- Fase móvil:
 - Flujo: 1 ml/min.
 - Composición: Metanol: Agua (60:40) (v/v)
- Volumen de inyección: 20 μ l.

- Detector:
 - Longitud de onda 291 nm.
 - Sensibilidad 0,025
- Integrador:
 - Atenuación: 4
 - Velocidad del papel 0,25 cm/min.
 - Tiempo de análisis 7 min.

Preparación de las muestras biológicas. A aproximadamente 400 μ l de plasma se les añaden 2 ml de metanol. Tras agitación de la muestra y posterior centrifugación, se extrae el sobrenadante que se filtra por un filtro de 45 μ m y se analiza por HPLC.

Determinación cualitativa del ricobendazol (Selectividad). Se disuelve una cantidad conocida de albendazol sulfóxido (ricobendazol) en metanol (en una concentración aproximada de 0,5 μ g/ml). El tiempo de retención aproximado del ricobendazol es de 5 min. La figura 7 muestra el cromatograma típico de una muestra de ricobendazol (tr 4,46) y de albendazol (tr 13,68). A continuación se prepara una muestra de plasma a la que se le añade ricobendazol (en concentración conocida) y se comprueba que aparece un pico con el mismo tiempo de retención que el patrón.

- Determinación cuantitativa del ricobendazol. Se pesa exactamente una cantidad de 50 mg de ricobendazol (patrón) que se lleva a 100 ml con metanol. 1 ml de esta solución se lleva a 100 ml con metanol. A partir de esta solución madre se toman fracciones alicuotas de 0,5; 1; 2; 3 y 5 ml que se llevan a 10 ml con metanol. Se realizan 3 determinaciones de cada punto. La recta de calibrado del ricobendazol obtenida es:

$$ABC = -4.814 + 47.262 C (\mu\text{g/ml})$$

$$r^2 = 0,9982 \quad n = 15$$

Se calculan el intervalo de cuantificación, la repetibilidad y la reproducibilidad del método.

El intervalo de cuantificación son los valores extremos de concentraciones entre los que se analizan las muestras biológicas. Para el ricobendazol y en nuestras condiciones de trabajo está comprendido entre 0,25 y 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

La repetibilidad es la medida de la variación observada en el método, en las condiciones más favorables de trabajo tomadas por el mismo analista en un día de trabajo. Para su estudio se repite tres veces el análisis de una muestra de ricobendazol de concentración 0,4 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados son los siguientes: 14.023; 13.333;

12.876; 12.814; 13.207; 12.453 y 13.213. Con estos datos se calcula el coeficiente de variación que es de un 3,3%.

La reproducibilidad es la medida de la variación observada en el método en las condiciones normales de trabajo por el mismo analista en tres días distintos. Se determina al menos dos veces cada día una misma muestra y los valores medios de los resultados obtenidos cada día son: 104.901; 112.252 y 107.175. Con estos datos se calcula el coeficiente de variación que es de 2,8%.

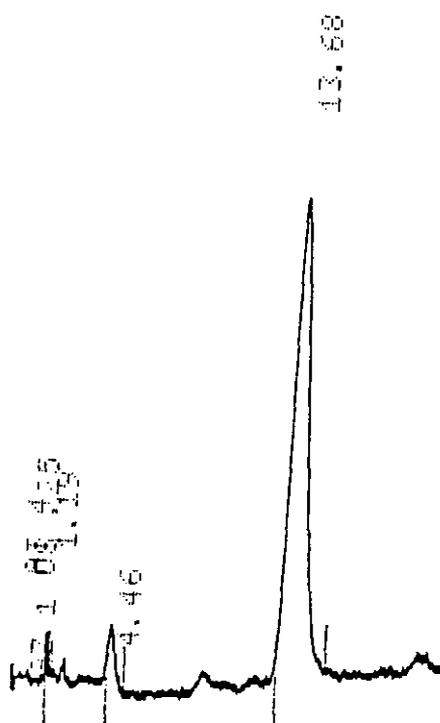


Figura 7. Cromatograma típico del ricobendazol y albendazol.

2.1.2. Espectrofotometría UV.

Se pone a punto la técnica de análisis espectrofotométrico para la cuantificación del albendazol en los estudios de velocidad de cesión.

El análisis espectrofotométrico del albendazol se realizó en las soluciones tampón pH 1,2; 2; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5 y 7,5.

Una cantidad exactamente pesada de albendazol (patrón) (aproximadamente 50 mg) se disuelvan en 5 ml de ác. fórmico y se llevan a 25 ml con la solución tampón utilizada en cada caso. Se toma 1 ml de dicha solución y se lleva a 100 ml con solución tampón. A partir de esta solución madre (20 $\mu\text{g/ml}$) se toman fracciones alícuotas de 1; 2; 3; 4; 5; 6 y 8 ml que se llevan a 10 ml con solución tampón. Se realizan 3 determinaciones de cada punto.

Determinación del máximo de absorbancia. Se realizan los barridos espectrofotométricos entre 200 y 400 nm de cada una de las soluciones con las distintas soluciones tampón empleadas. Las soluciones de albendazol en solución tampón pH 1,2; 2; 3,5; 6,5 y 7,5 presentan un máximo de absorbancia a 291 nm mientras que a pH 5,5 y 4,5 el máximo de absorbancia es a 293 nm. A modo de ejemplo se muestra el barrido espectrofotométrico del albendazol en solución tampón pH 1,2 (figura 8).

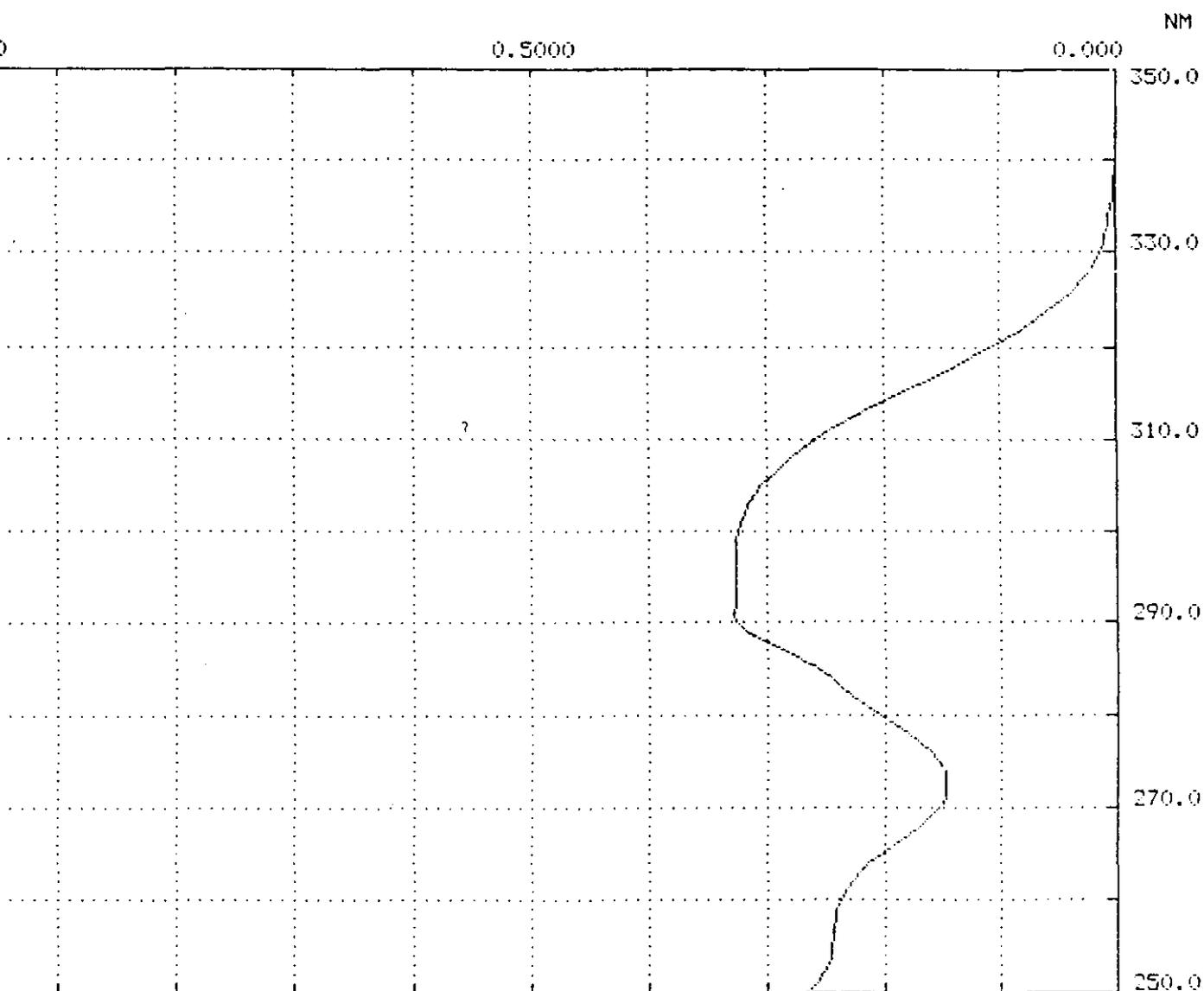


Figura 8. Barrido espectrofotométrico entre 350 y 250 nm del albendazol en solución tampón pH 1,2.

Análisis cuantitativo del albendazol. Para las soluciones tampón de pH 1,2; 2; 3,5; 6,5 y 7,5 se mide la absorbancia a 291 nm de las distintas soluciones y se comprueba que existe una relación directa entre concentraciones y absorbancias. Las rectas de calibrado obtenidas fueron:

* solución tampón pH 1,2

$$\text{U.A.} = -0,007392 + 0,03751 C (\mu\text{g/ml})$$

$$r^2 = 0,9993 \quad n = 28$$

* solución tampón pH 2

$$\text{U.A.} = 0,000716 + 0,03710 C (\mu\text{g/ml})$$

$$r^2 = 0,9999 \quad n = 21$$

* solución tampón pH 3,5

$$\text{U.A.} = -0,001013 + 0,03755 C (\mu\text{g/ml})$$

$$r^2 = 0,9996 \quad n = 21$$

* solución tampón pH 6,5

$$\text{U.A.} = 0,02260 + 0,03724 C (\mu\text{g/ml})$$

$$r^2 = 0,9994 \quad n = 21$$

* solución tampón pH 7,5

$$U.A. = 0,005129 + 0,03717 C (\mu\text{g/ml})$$

$$r^2 = 0,9996 \quad n = 21$$

Para las soluciones tampón pH 4,5 y 5,5, se mide la absorbancia a 293 nm de las distintas soluciones y se comprueba que existe una relación igualmente directa entre concentraciones y absorbancias. Las rectas de calibrado obtenidas fueron:

* solución tampón pH 4,5

$$U.A. = 0,00818 + 0,03708 C (\mu\text{g/ml})$$

$$r^2 = 0,9984 \quad n = 21$$

* solución tampón pH 5,5

$$U.A. = 0,02775 + 0,03633 C (\mu\text{g/ml})$$

$$r^2 = 0,9967 \quad n = 21$$

2.1.3. Validación de métodos analíticos del albendazol: HPLC y espectrofotometría.

Al no estar incluido el albendazol como principio activo en las distintas farmacopeas (Farmacopea Europea, 1988), (British Pharmacopoeia, 1993) y (USP XXII, 1990), los distintos métodos

analíticos empleados en el análisis de este principio activo han de ser sometidos a un proceso previo de validación analítica.

A continuación se muestran los resultados del estudio de validación del método espectrofotométrico y HPLC para el albendazol como materia prima y producto terminado.

En el estudio de validación se comprueba la resolución (A), linealidad (B), límite de cuantificación (C) y la especificidad (D).

A. Resolución.

La resolución (R) entre dos picos cromatográficos fué calculada según la siguiente ecuación (USP XXII, 1990):

$$R = \frac{2 (t_2 - t_1)}{W_1 + W_2}$$

Donde t_2 y t_1 son los tiempos de retención y W_1 y W_2 son las anchuras de los picos.

La resolución entre el albendazol y el estándar interno (mebendazol) da valores de $R = 10,02$.

El cromatograma del albendazol y de sus productos de

degradación se puede observar en la figura 9. En los estudios de estabilidad la resolución se calcula entre el albendazol ($t_r = 15,37$ min) y su principal producto de degradación ($t_r = 2,34$ min) y es de $R = 21,72$. El tiempo de retención relativo del albendazol es de 1,68 min y de su producto de degradación de 0,25 min respecto al tiempo de retención del estándar interno.

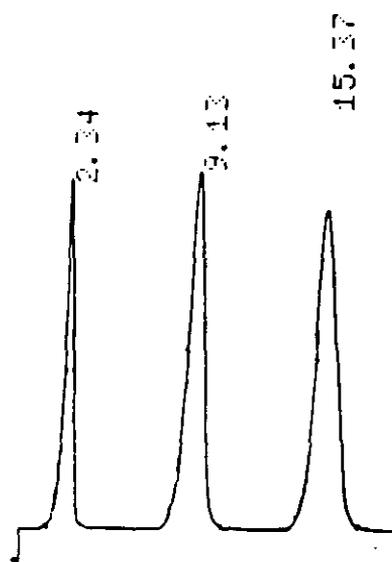


Figura 9. Cromatograma del albendazol y de sus productos de degradación.

Los valores de resolución obtenidos en ambos casos son buenos. Concretamente el valor de resolución del método analítico de HPLC para el análisis de albendazol y sus productos de degradación indica que no existen interferencias en el análisis entre el albendazol y sus productos de degradación. Por lo que se considera esta técnica de HPLC de elección para los estudios de uniformidad de contenido y estabilidad.

En la técnica espectrofotométrica se observa que en el análisis de las muestras degradadas sí existe interferencia entre el albendazol y sus productos de degradación. Una muestra de albendazol degradado con una concentración de 8 $\mu\text{g/ml}$ en solución tampón pH 1,2 presenta un máximo de absorbancia desplazado a 295 nm. Mientras que el albendazol sin degradar presenta un máximo a 291 nm. (ver figura 10) por lo que esta técnica se considera que no puede ser empleada en los estudios de degradación.

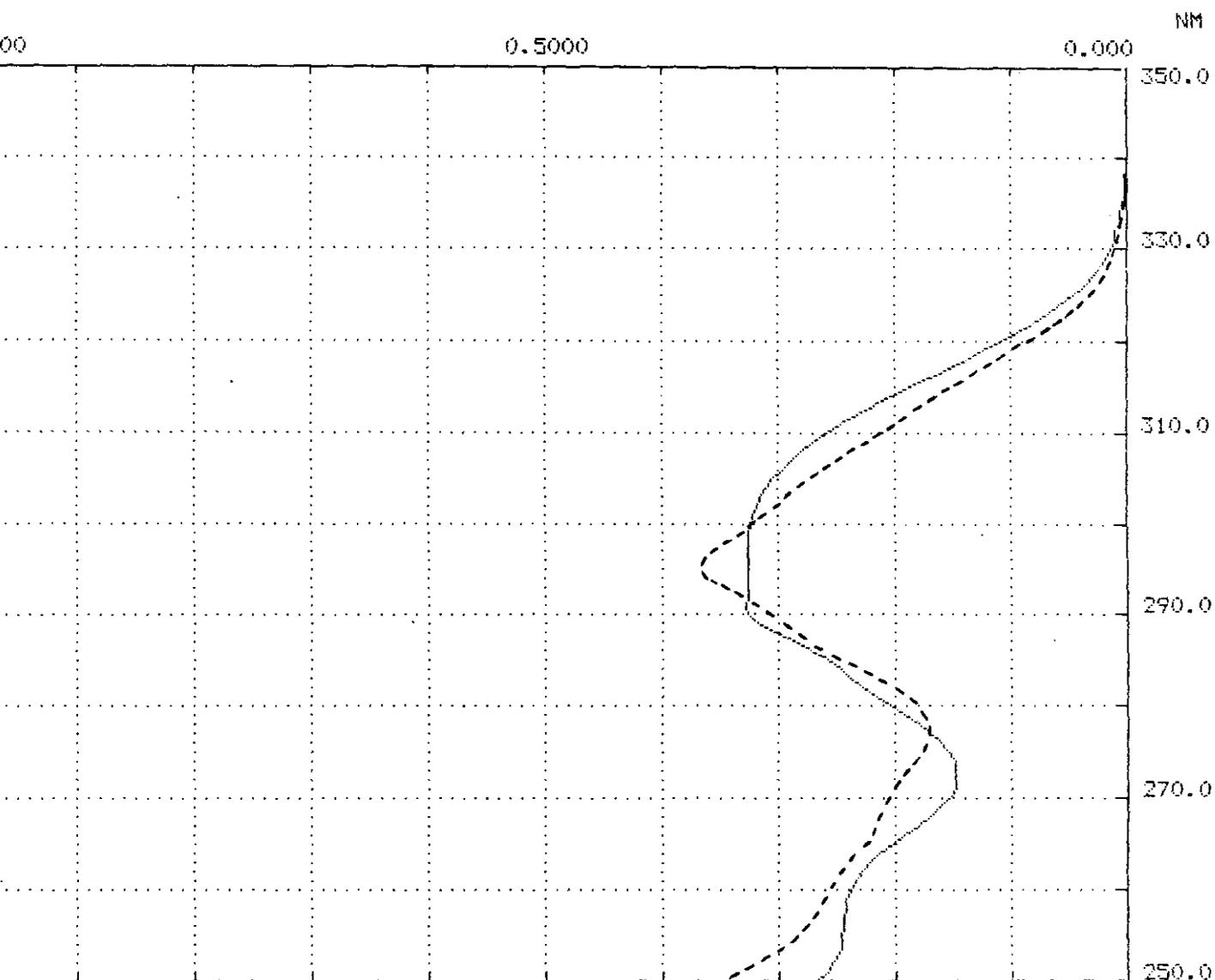


Figura 10. Barridos espectrofotométricos del albendazol (9 µg/ml) (-----) y del albendazol degradado (8 µg/ml) (———).

B. Linealidad.

Se entiende por linealidad la capacidad de un método analítico de obtener resultados proporcionales a la concentración de analito en la muestra.

En el estudio de la linealidad se determina: el intervalo de la concentración, intervalo de confianza para la pendiente, el valor de intercepción y un test de linealidad.

* El intervalo de concentración para el cual el método presenta una buena linealidad es en el análisis por HPLC entre 0 y 150 $\mu\text{g/ml}$, y en el del método espectrofotométrico entre 2 y 20 $\mu\text{g/ml}$.

* El intervalo de confianza para la pendiente se calcula por análisis de regresión mediante la siguiente ecuación:

$$b \pm t S_b$$

Donde t es el valor de la t -Student para $n-2$ grados de libertad y S_b es la varianza de la pendiente.

El intervalo de confianza de la pendiente para el método de HPLC es:

$$4.466,1 \pm 385,75$$

Este valor lo consideramos aceptable.

El intervalo de confianza de la pendiente para el método

espectrofotométrico (en solución tampón pH 1,2) es de:

$$0,03751 \pm 0,000390$$

* El valor de intersección se calcula mediante la ecuación:

$$a \pm t S_s$$

Donde t es el valor de la t -Student para $n-2$ grados de libertad y una probabilidad $p < 0,05$ y S_s es la varianza del valor de intersección.

Si el valor cero se encuentra dentro de los límites de intersección, este método se dice que no tiene "sesgo" y se considera proporcional.

El método de HPLC presenta un valor de intersección de:

$$- 13.802,45 \pm 30.261,489.$$

Por lo tanto se considera que el método de HPLC en el intervalo de concentraciones estudiado es proporcional a sus valores de area bajo la curva (ABC) ya que incluye el cero entre sus límites.

El método espectrofotométrico presenta un valor de intersección de:

$$- 0,007392 \pm 0,0046997$$

Este método no incluye el cero entre sus límites y por lo tanto sí presenta sesgo.

* Ensayo de linealidad. Si bien en muchos estudios analíticos (Sampath, 1990) y (Wilhelm, 1992) se emplea el coeficiente de determinación (r^2) como valor de linealidad, este no es suficiente ya que los resultados experimentales a ambos lados de la recta de análisis tienden a aumentar la linealidad.

Mediante el ensayo de linealidad, al trabajar con desviaciones estándar se evita este error analítico.

El test de linealidad se calcula mediante la desviación estandar relativa de la pendiente (S_b rel %) según la ecuación:

$$S_b \text{ rel } \% = \frac{S_b}{b} \cdot 100$$

Donde S_b es la varianza de la pendiente (b). El valor de tolerancia para la varianza relativa de la pendiente está comprendido entre 2 y 5%.

El valor obtenido en el análisis de albendazol mediante el método de HPLC es de 3,11. Valor que si bién esta dentro del intervalo de confianza, es superior al valor de varianza relativa de la pendiente obtenido para el método espectrofotométrico (0,50).

Los resultados de linealidad se encuentran reflejados en la tabla 7.

C. Límite de detección y de cuantificación.

El límite de detección se define como la cantidad mínima de analito que se puede detectar en una muestra.

El límite de cuantificación lo podemos definir como la mínima cantidad de analito que se puede cuantificar en una muestra con aceptable precisión y exactitud.

Existen distintas técnicas para la determinación del límite de detección teórico según la ec. propuesta por (Morelli, 1983) que ya ha sido empleada en otros trabajos de experimentación (Torrado-Santiago, 1994).

$$D.L. = S_0^2 \left(\frac{n-2}{n-1} \right)^{1/2} \frac{t_p}{b}$$

Donde n es el número de muestras, t_p es el valor de la t-Student para n-2 grados de libertad y una probabilidad de $p < 0,05$, b es la pendiente y S_0^2 es el cuadrado de la varianza que caracteriza la dispersión de las muestras con respecto a la línea de regresión.

| | Método analítico | |
|--|---------------------------------|-------------------------------|
| | HPLC | Espectrofotométrico |
| Intervalo de concentraciones | 0 - 150 $\mu\text{g/ml}$ | 2 - 20 $\mu\text{g/ml}$ |
| Intervalo de confianza para la pendiente | 4.466,1 \pm 385,75 | 0,03751 \pm 0,000390 |
| Valor de intersección | - 13.802,45 \pm 30.261,489 | - 0,007392 \pm 0,0046997 |
| Ensayo de linealidad | 3,11 | 0,50 |

Tabla 7. Resultados de linealidad para los métodos de análisis del albendazol: HPLC y espectrofotométrico.

Existen distintas técnicas para la determinación del límite de cuantificación (L.C.). Así en aquellos métodos separativos como el HPLC se puede determinar en función de la relación entre el ruido que aparece en el blanco y la menor cantidad de analito obtenido experimentalmente. La relación se obtiene según la ec. propuesta por Milter (Milter, 1993):

$$L.C. = 10 \frac{SEÑAL}{RUIDO}$$

En aquellos métodos no separativos como es el espectrofotométrico, la determinación del límite de cuantificación (L.C.) se obtiene según la siguiente ec:

$$L.C. = \frac{\bar{y} + K \cdot Sb}{b}$$

Donde \bar{y} es la media de las respuestas para n blancos, K es una constante que para el límite de cuantificación es 10. S_b es la desviación estándar de los n blancos y b es la pendiente.

Los resultados obtenidos en la determinación del límite de detección y cuantificación para ambos métodos analíticos de albendazol se resumen en la tabla 8.

| | Método analítico. | |
|--------------------------|-------------------|---------------------|
| | HPLC | Espectrofotométrico |
| Límite de detección | 3,364 | ----- |
| Límite de cuantificación | 11,684 | 0,480 |
| Selectividad | si | si/no |
| Especificidad | si | no |
| Tiempo de análisis | 5 min. | 25 min. |

Tabla 8. Características generales de los métodos de análisis del albendazol.

En general, el método estadístico da valores, más bajos en ambos métodos de análisis y se aproximan más a los valores calculados experimentalmente con una desviación estándar relativa aceptable ($RDS < 2$).

D. Selectividad y especificidad.

Se dice que un método analítico es selectivo cuando es capaz de determinar cualitativamente el analito sin interferencia de ningún otro compuesto.

El método de HPLC, se muestra como selectivo y específico para el estudio de nuestro analito, comprobándose que no existe ninguna sustancia que interfiera en el análisis de las distintas formulaciones de nuestro analito (dispersiones sólidas y formulaciones líquidas). Mientras que el método espectrofotométrico es selectivo en el análisis de dichas formulaciones aunque no lo es en el estudio de estabilidad.

COMENTARIO A LOS MÉTODOS ANALÍTICOS.

En función de los resultados obtenidos de la validación de los métodos analíticos químicos, ambos métodos, HPLC y espectrofotometría U.V., se encuentran validados para la determinación del albendazol.

Las características generales de ambos métodos se encuentran reflejadas en la tabla 8.

En función de las necesidades del estudio galénico que se realice en cada caso se elige el método analítico más adecuado.

El método espectrofotométrico presenta mayor exactitud y un menor tiempo de análisis que el método por HPLC lo que le hace de elección para los estudios de uniformidad de contenido de las formulaciones y para los ensayos de velocidad de disolución.

El método de análisis de albendazol por HPLC presenta una mayor selectividad lo que le convierte en el método de elección para el análisis de las muestras de los estudios de estabilidad.

2.2. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM).

El estudio de la morfología de las distintas muestras se realizó mediante un microscopio electrónico de barrido modelo Jeol JSM 6400. Las muestras se suspenden previamente en n-hexano, solvente en el que tanto el albendazol como la polivinilpirrolidona son insolubles, a continuación se secan las muestras a vacío y se someten a un proceso de recubrimiento con una capa de oro de 15 nm que permitirá su observación por SEM.

2.3. ESPECTROSCOPIA DE RX POR ENERGÍAS DISPERSIVAS (EDS).

La distribución del principio activo, el albendazol, en el interior de la dispersión sólida de polivinilpirrolidona se puede observar mediante la dispersión de energía que producen los átomos de azufre (que se encuentran en la molécula del albendazol) y que se determinan mediante un espectrofotómetro de rayos X modelo Link-EXL del Centro de Microscopía de la U.C.M.

2.4. DIFRACION DE RAYOS X.

La estructura cristalina de las distintas muestras se evalúa mediante una técnica de difracción de rayos X. Las distintas muestras son expuestas a una radiación de Cu K α ($\lambda=1.5418 \text{ \AA}$) en un difractómetro Siemens con un intervalo de 2θ desde 5° a 70° y con una intensidad de 1000. Las distintas muestras se fijan al porta mediante presión.

2.5. BARRIDO CALORIMÉTRICO DIFERENCIAL (DSC).

El barrido calorimétrico diferencial se realiza mediante un equipo Mettler 6.000. Todas las muestras se analizan en cubetas de aluminio cerradas herméticamente bajo una corriente de nitrógeno.

El ciclo de calentamiento se lleva a cabo mediante una constante de calentamiento de $10^\circ \text{ min}^{-1}$ entre 25° y 300°C . El peso de las muestras es entre $2,0$ y $5,0 \text{ mg}$ para las muestras que contienen únicamente albendazol y de $10,0 \text{ mg}$ para las muestras de dispersiones sólidas y las mezclas físicas de polivinilpirrolidona

(Kollindon^R K-12) y albendazol.

Para el estudio de recristalización, las muestras son 5,0 mg de principio activo que se someten a dos ciclos de calentamiento, el primer ciclo ascendente con temperaturas comprendidas entre 25 y 300°C, con una constante de calentamiento de 10° min⁻¹, seguido de un proceso de enfriamiento rápido, con una constante de enfriamiento de 320° min⁻¹ y una vez enfriado, se somete a un segundo ciclo de calentamiento en las mismas condiciones que el primero.

2.6. COEFICIENTE DE SOLUBILIDAD.

Para el estudio del coeficiente de solubilidad se pone a punto un método de estudio basado en la disolución en un baño de ultrasonidos que se valida frente a un método de disolución en un baño con agitación y temperatura constante ampliamente utilizado.

* Estandarización del método de disolución en baño de ultrasonidos.

El principal inconveniente que presenta la técnica de ultrasonidos en la determinación de la solubilidad de determinados principios activos es que pueda producir alteraciones sobre la estructura del principio activo, así como la posibilidad de provocar cambios en algunas variables físico-químicas como pueden ser la temperatura o posibles evaporaciones del solvente que podrían alterar los resultados de solubilidad obtenidos por este método, lo que nos obliga a una estandarización del mismo.

Las distintas variables que estudiaremos son:

- Tiempo de permanencia de las muestras en el baño de ultrasonidos.
- Temperatura a la que se mantiene la muestra.
- Volumen del solvente a utilizar.

La elección de los valores de estas variables durante el estudio del coeficiente de solubilidad se hace en función de la estabilidad del albendazol y de la naturaleza del solvente en el que se evalúa el coeficiente de solubilidad.

Para la estandarización del método se tomaron distintas muestras de albendazol que se someten al baño de ultrasonidos a una frecuencia de 47 KHz empleando en todas ellas como solvente una solución de pH 1,2, con una temperatura comprendida entre 25 y 40 grados centígrados. Las distintas muestras se atemperan antes de su lectura en un baño termostaticado a 25°C. Las variables estudiadas son el volumen de la solución adicionado y el tiempo de permanencia en el baño de ultrasonidos. Las distintas muestras se filtran mediante un filtro Millipore de 45 μm y se efectúa la lectura espectrofotométrica a 291 nm. Los análisis se realizan en todo los casos por triplicado.

Volumen de solución tampón PH 1,2

| Volumen | CS (mg/ml) | σ_{n-1} | Diferencia |
|-------------|------------|----------------|------------|
| 25 ml..... | 0,417 | 0,035 | NS |
| 50 ml..... | 0,409 | 0,028 | NS |
| 100 ml..... | 0,422 | 0.041 | NS |

No existe una diferencia significativa (t-Student) en el intervalo de volumen estudiado ($p < 0,01$) respecto al volumen de solvente a utilizar.

En nuestros estudios estandarizaremos el método empleando

en lo sucesivo matraces de 25 ml.

Tiempo de permanencia en el baño de ultrasonido

| Tiempo | CS (mg/ml) | σ_{n-1} | Diferencia |
|--------|------------|----------------|------------|
| 15m | 0,387 | 0,078 | S |
| 30m | 0,408 | 0,052 | NS |
| 60m | 0,411 | 0,027 | NS |
| 90m | 0,421 | 0,024 | NS |

En este estudio se observa una diferencia significativa (t-Student) ($p < 0.01$) para tiempos inferiores a los treinta minutos, mientras que no se aprecian diferencias significativas cuando los tiempos están comprendidos entre treinta y noventa minutos.

Las soluciones son transparentes, incoloras y no presentan degradación como pudo comprobarse mediante análisis por HPLC. Las muestras que han estado sometidas en el baño de ultrasonidos a tiempos superiores a las dos horas treinta minutos muestran la aparición de una cierta coloración en las soluciones filtradas de albendazol indicativa de la alteración del albendazol por la aparición de los grupos cromóforos que son los responsables de esta coloración en las soluciones. Al valorar cuantitativamente estas soluciones mediante se obtiene un pico característico con un tiempo de retención de 2,40 minutos característico de los productos de degradación del albendazol, como veremos

posteriormente en los estudios de estabilidad. En nuestro estudio estandarizaremos el método en lo sucesivo con un tiempo de permanencia en el baño de ultrasonido de sesenta minutos, tiempo que permite la solubilización del albendazol sin provocar su degradación.

- Condiciones del método de estudio del coeficiente de solubilidad por ultrasonidos.

Las condiciones para el estudio del coeficiente de solubilidad del albendazol y de sus formulaciones, por este método, son:

1. Las muestras se suspenden con sus solventes en matraces de 25 ml.
2. El tiempo de permanencia de estas muestras en el sonicador es de sesenta minutos.
3. Posteriormente las muestras se atemperan a 25°C en un baño termostático.
4. Se filtra a través de un filtro de 45 μm .
5. Lectura espectrofotométrica a 291 nm.

* Coeficiente de solubilidad por el método de agitación.

Este método se ha utilizado para validar el método de ultrasonidos. Su principal inconveniente es el elevado tiempo de agitación (24 h) y el hecho de que al estar sometido durante este período de tiempo a una temperatura de 37°C se puede producir una evaporación de los solventes.

- Condiciones del estudio del coeficiente de solubilidad por el método de agitación.

Las condiciones de aplicación de este método para el estudio del coeficiente de solubilidad del albendazol son:

1. Las muestras se suspenden en 100 ml de su solvente y se someten a una temperatura constante de 37°C.
2. El tiempo de permanencia de estas muestras en el baño de agitación es de 24 h.
3. Posteriormente las muestras se atemperan a 25°C. en un baño termostaticado.
4. Se filtra a través de un filtro de 45 μm .
5. Lectura espectrofotométrica del albendazol a 291 nm.

2.6.1. Validación del método de coeficiente de solubilidad por el método de ultrasonidos frente al método de agitación.

Se compararan los valores de solubilidad del albendazol en solución tampón pH 1,2 obtenidos con ambos métodos.

La reproducibilidad inter e intra días y el tiempo de duración del análisis del albendazol para ambos métodos en la determinación del coeficiente de solubilidad se observa en la tabla 10. En esta tabla se puede comprobar que no existen diferencias significativas ($p < 0.005$) entre ambos métodos pudiendo emplearse cualquiera de ellos para el estudio de la solubilidad del albendazol.

Seleccionamos el método de estudio de los coeficientes de solubilidad por ultrasonidos debido a que los tiempos de análisis son más cortos (60 min).

| | MÉTODO | | Diferencia |
|--------------------------------|------------------|------------------|-----------------|
| | Ultrasonidos | Agitación | |
| Reproducibilidad inter-días | 0.420 (0.021) | 0.422 (0.027) | NS (p< 0.01) |
| Reproducibilidad intra-días | 0.416 (0.057) | 0.428 (0.034) | NS (p< 0.01) |
| Tiempo análisis | 1 h. | 24 h. | |

Tabla 9. Valores de coeficientes de solubilidad del albendazol (mg/ml) y desviación estandard (entre paréntesis) obtenidos por dos métodos distintos.

2.7. ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN.

El método empleado es el método I de la farmacopéa americana. (USP XXII, 1990).

* Condiciones:

- Medio de disolución: solución tampón pH 1,2.
- Volumen del medio de disolución: 1000 ml.
- Velocidad de giro del cestillo: 100 rpm.
- Temperatura del ensayo: 37°C.
- Tamaño de partícula seleccionada: 850 - 1000 μm .

Debido a la marcada hidrofobicidad del albendazol tiende a flotar en el medio de disolución. Con el fin de evitar que flote se selecciona un tamaño de partícula adecuado que quede retenido en el cestillo.

La cantidad de albendazol fué de aproximadamente de 20 mg (o su equivalente en las formulaciones de dispersión sólida) para cada ensayo. Los ensayos se realizan por triplicado.

Se determina y compara la eficacia de disolución de cada fórmula a distintos tiempos según la ecuación propuesta por Khan y Rhodes (Khan, 1972).

La eficacia de disolución (E.D.) es un parámetro adecuado para la evaluación de la disolución "in vitro" sugerido por Khan y Rhodes (Khan, 1972) y que se define como el área bajo la curva de disolución para un cierto tiempo t , expresado como el porcentaje del área del rectángulo definido por el 100% de disolución para ese tiempo t .

$$E.D. = \frac{\int_0^t y dt}{Y_{100} t} 100\%$$

El área bajo la curva se determina mediante el programa estadístico DATALAB.

Se calcula la eficacia de disolución (E.D.) a tres tiempos distintos: 60; 180; y 480 minutos y se comparan los resultados de las distintas formulaciones mediante un análisis de varianza.

2.8. MÉTODO DE OBTENCIÓN DE FORMULACIONES LÍQUIDAS.

Para la preparación de las formulaciones líquidas y con el fin de conseguir elevadas concentraciones del albendazol en la solución se utiliza el baño de ultrasonidos para la disolución del albendazol en el vehículo.

Una cantidad de albendazol, de aproximadamente 50 mg, se

solubiliza en el medio de disolución seleccionado (100 ml) mediante inmersión del matraz en el baño de ultrasonidos durante 60 minutos. La solución de albendazol así obtenida se filtra por un filtro de 45 μm y se analiza mediante espectrofotometría u.v.

Se estudia el efecto del pH (1,2; 2; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5 y 7,5) y también la combinación con distintos disolventes (aceite de ricino polioxietileno, etilendiglicol, y tensoactivos (Tween 20 y lauril sulfato sódico)).

Clave de las formulaciones líquidas obtenidas:

FLAG: Albendazol genérico en solución H (Transcutol en solución tampón pH 1,2 al 40 %) al 0,5 %.

FLAP: Albendazol patrón en solución H (Transcutol en solución tampón pH 1,2 al 40 %) al 0,5 %.

2.9. MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DISPERSIONES SÓLIDAS.

El método de obtención de las dispersiones sólidas fué el de los cosolventes utilizando como solvente común etanol, que posteriormente es eliminado en un rotavapor.

En 400 ml del solvente común (etanol) se disuelve el vehículo de la dispersión sólida (PVP) y en otros 400 ml de

etanol se disuelve el albendazol. Una vez mezcladas las dos soluciones, se elimina el etanol en un rotavapor a vacío y a una temperatura de 50°C. A continuación se somete la dispersión sólida así obtenida a un proceso análogo a la fase de desecación, una liofilización para eliminar totalmente el solvente.

Se estudia el efecto del PM de la PVP utilizada (3.000; 17.000 y 25.000) y de las distintas proporciones albendazol: vehículo (1:10; 1:20 y 1:40).

Clave de las dispersiones sólidas obtenidas:

AGK1210: Albendazol genérico Kollidón^R 12PF 1:10.

AGK1710: Albendazol genérico Kollidón^R 17PF 1:10.

AGK2510: Albendazol genérico Kollidón^R 25 1:10.

AGK1220: Albendazol genérico Kollidón^R 12PF 1:20.

AGK1240: Albendazol genérico Kollidón^R 12PF 1:40.

APK1210: Albendazol patrón Kollidón^R 12PF 1:10.

APK1710: Albendazol patrón Kollidón^R 17PF 1:10.

APK2510: Albendazol patrón Kollidón^R 25 1:10.

APK1220: Albendazol patrón Kollidón^R 12PF 1:20.

2.10. MÉTODO DE ESTUDIO DE HUMEDAD EN EL EQUILIBRIO.

Se estudia la humedad en el equilibrio del albendazol genérico, de las distintas polivinilpirrolidonas utilizadas (K 12PF, K 17PF y K 25) y de las formulaciones AGK1210, AGK1710 Y AGK2510.

Las condiciones del estudio son:

Temperatura 25°C.

Las muestras se introducen en tubos de ensayo de boca ancha, que se depositan en el interior de desecadores con distintas humedades relativas.

Las humedades relativas utilizadas son 31; 36 y 50%. Dichas humedades relativas se obtienen mediante el empleo de las siguientes sales:

- 31 % - MgBr_2
- 36 % - NaI
- 50 % - $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$

El análisis de las muestras (por triplicado) se realiza con una balanza Mettler de IR mediante pérdida de humedad. La temperatura a que se someten las muestras es de 105°C y se considera finalizado el análisis cuando la pesada es estable durante 120 segundos.

2.11. MÉTODO DE ESTUDIO DE ESTABILIDAD ACELERADO.

El estudio de estabilidad acelerado se hace de la formulación líquida FLAG seleccionada para los estudios "in vivo".

La estabilidad la representamos en función del intervalo de tiempo que tardan sus valores iniciales en reducirse al 90% .

Para la realización de este estudio acelerado de estabilidad se sigue el método isotérmico de Arrhenius a cuatro temperaturas diferentes.

El análisis de las distintas muestras expresadas como porcentaje de albendazol se realiza mediante un método de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), según procedimiento descrito en el apartado 2.1.1.1.

Condiciones del estudio de inestabilidad acelerada:

- Temperatura. El estudio de inestabilidad acelerada se realiza con dos lotes L1 y L2 a cuatro temperaturas diferentes de 4; 25, 45 y 70° C.

- Tiempo de toma de muestra: Las diferentes muestras se tomarán en los siguientes intervalos de tiempo:

- Para las temperaturas de 4°C, se toman muestras a 0; 14;

36; 51; 75 y 96 días.

- Para la temperatura de 25° C, se toman muestras a 0; 7; 14; 51; 70 y 96 días.

- Para la temperatura de 45°C, se toman las muestras a 0; 9; 18; 25; 36 y 45 días.

- Para la temperatura de 70°C, se toman las muestras a 0; 5; 11; 15; 20 y 32 días.

- Número de muestras para cada punto de estabilidad. Cada dato del estudio de estabilidad será el resultado del valor medio de al menos tres análisis.

- Orden de reacción. Su cinética de degradación se puede ajustar a una cinética de orden cero o de orden uno. La selección del orden de reacción se realiza mediante un estudio estadístico, Franquesa, (1985).

Orden Cero:

$$C' = C_0 + K t$$

Orden Uno:

$$\ln C' = \ln C_0 + K' t$$

Donde:

C' : Porcentaje de albendazol total a tiempo t.

C_0 : Porcentaje de albendazol total a tiempo 0.

K : Constante de reacción de orden cero.

K' : Constante de reacción de orden uno.

t : Tiempo en días.

2.12. MÉTODO DE ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA.

Se estudia la actividad de varias formulaciones sobre el parásito *T. spiralis* (aislamiento GM-1) en el hospedador (ratones Swiss CD-1 de 30 a 35 g de peso, distribuidos en lotes de 10 animales). El inóculo infestante es de 300 ± 50 larvas ratón.

Se estudia la actividad antiparasitaria en tres tipos de fases de *T. spiralis*.

2.12.1. Actividad antiparasitaria sobre preadultos de *Trichinella spiralis*.

Aplicación de los fármacos: el tratamiento antihelmíntico se aplica 24 h p.i. (post infección) en dosis únicas diarias.

Antihelmínticos ensayados:

- Albendazol patrón: 10 mg/Kg, 5 mg/Kg y 2,5 mg/Kg.
- Albendazol genérico: 10 mg/Kg y 5 mg/Kg.
- FL Alb generico: 5 mg/Kg y 2,5 mg/Kg.
- DS Alb generico K-12 1:20: 10 mg/Kg, 5 mg/Kg y 2,5 mg/Kg.

El fármaco se administra mediante sonda buco-gástrica suspendido en una solución de carboximetilcelulosa sódica al 1%. Los animales se mantienen con agua y alimento "ad libitum".

Resultados: Se obtienen por sacrificio de los animales a los 8 días post-tratamiento y la eficacia se determinará por recuento de adultos obtenidos del intestino delgado.

2.12.2. Actividad antiparasitaria sobre larvas emigrantes de *Trichinella spiralis*.

Aplicación de los fármacos: previamente al tratamiento antihelmíntico, los animales eran tratados el día 9 p.i. con Neguvón 60 mg/Kg mediante sonda buco-gástrica + 0,05 mg/Kg de sulfato de atropina (via intramuscular), al objeto de eliminar la población adulta remanente en el intestino.

El tratamiento antihelmíntico se aplica durante los días 13, 14 y 15 p.i..

Antihelmínticos ensayados:

- Albendazol patrón: 100 mg/Kg y 50 mg/Kg.
- Albendazol genérico: 100 mg/Kg y 50 mg/Kg.
- FL Alb generico: 50 mg/Kg y 25 mg/Kg.
- DS Alb generico K-12 1:20: 100 mg/Kg y 50 mg/Kg.

El fármaco se administra mediante sonda buco-gástrica suspendido en una solución de carboximetilcelulosa sódica al 1%. Los animales se mantienen con agua y alimento "ad libitum".

Determinación de la eficacia: Los animales son sacrificados el día 30 p.i. y la eficacia se expresa en función de los porcentajes de reducción en el número total de larvas aisladas de cada lote tratado con respecto al correspondiente testigo.

2.12.3. Actividad antiparasitaria sobre larvas enquistadas de *Trichinella spiralis*.

Aplicación de los fármacos: El tratamiento antihelmíntico se aplica durante los días 34, 35 y 36 p.i..

Los antihelmínticos ensayados son:

- Albendazol patrón: 100 mg/Kg y 50 mg/Kg.
- Albendazol genérico: 100 mg/Kg y 50 mg/Kg.
- FL Alb generico: 100 mg/Kg, 50 mg/Kg y 25 mg/Kg.
- DS Alb generico K-12 1:20: 100 mg/Kg y 50 mg/Kg.

El fármaco se administra mediante sonda buco gástrica suspendido en una solución de carboximetilcelulosa sódica al 1%, los días 34, 35 y 36 p.i.. Los animales se mantienen con agua y alimento "ad libitum".

Resultados: Se obtienen por sacrificio de los animales a los 10 días post-tratamiento y la eficacia se expresa en función de los porcentajes de reducción en el número total de larvas aisladas de cada lote tratado con respecto al correspondiente

testigo.

2.13. MÉTODO DE ESTUDIO BIOFARMACÉUTICO Y FARMACOCINÉTICO.

El estudio farmacocinético de las formulaciones seleccionadas se realiza en ratones Swiss CD-1 (30-35 g). La administración se hace mediante sonda buco-gástrica. La dosis administrada en todos los casos es de 50 mg/Kg y las formulaciones sólidas se suspenden previamente en solución de carboximetilcelulosa sódica al 1%.

Para cada punto de tiempo del estudio se utilizan tres ratones que son sacrificados a ese tiempo dado. Tras la extracción se hepariniza y centrifuga la sangre de cada ratón por separado. A continuación se congelan las muestras de plasma y se analizan por la técnica de HPLC previamente descrita.

Para el análisis por HPLC, se toma un volumen de 400 μ l de plasma que se mezcla con 2 ml de metanol y se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se filtra por un filtro Millipore HVLP de 45 μ m y se analiza por HPLC el albendazol y el albendazol sulfóxido (ricobendazol).

Las formulaciones en las que se realiza el estudio farmacocinético son:

- Albendazol patrón.
- Albendazol genérico.
- Formulación líquida de Alb patrón.
- Formulación líquida de Alb genérico.
- DSAPK12 1:20.
- DSAGK12 1:20.

A partir de los datos experimentales se calculan los siguientes parámetros biofarmacéuticos y farmacocinéticos: t_{max} (experimental) y C_{max} (experimental) y área bajo la curva entre los tiempos 0 y 6 horas según el método de los trapecios (modelo independiente) (Rowland, 1989).

2.14. ESTADÍSTICA.

Se comparan los resultados obtenidos en los estudios de velocidad de disolución (eficacia de disolución) y los parámetros biofarmacéuticos de t_{max} , C_{max} y ABC_{0-6h} mediante análisis de varianza de una vía realizados con el programa de estadística STATGRAPHICS versión 6.0.

RESULTADOS.

1. ANÁLISIS DE MATERIA PRIMA.

1.1. HPLC.

Para determinar la riqueza del albendazol suministrado por Chemo Ibérica S.A. se toma como patrón el albendazol suministrado por Smith Kline Beecham Pharmaceuticals.

El valor medio de riqueza obtenido es de 92,5 % y la desviación estandard de 7,2 % (n=3).

1.2. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).

La morfología del albendazol se muestra en las microfotografías de la figuras 11. Las partículas de albendazol se presentan forma de pequeños cristales aciculares, de tamaño comprendido entre 10-15 μm . La polivinilpirrolidona Kollindon^R pesenta una forma esférica característica reflejada en la bibliografía (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 1986) (figura 12).

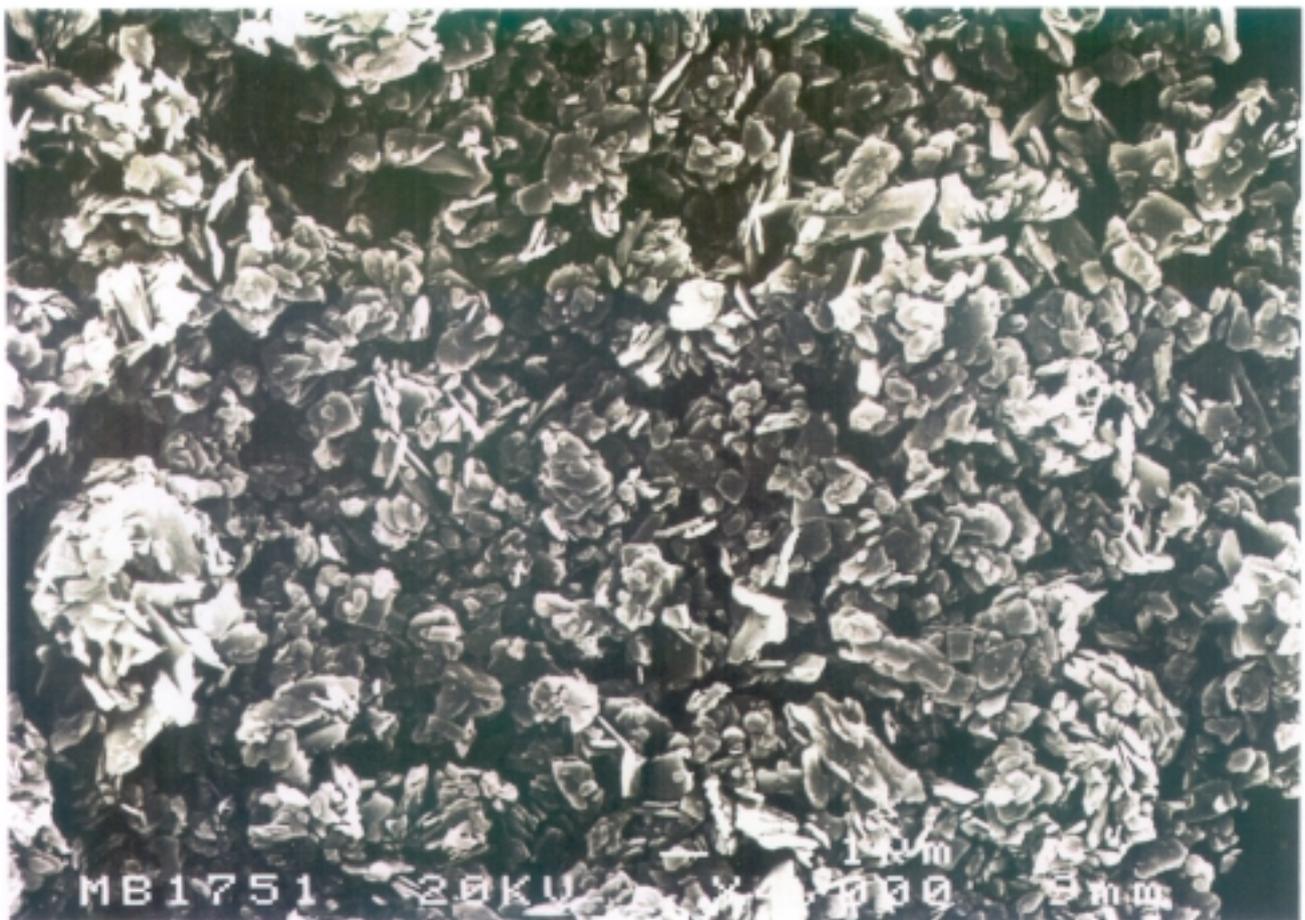


Figura 11. Morfología del albendazol genérico. Microfotografía obtenida en microscopio electrónico de barrido Jeol JSM 6.400.

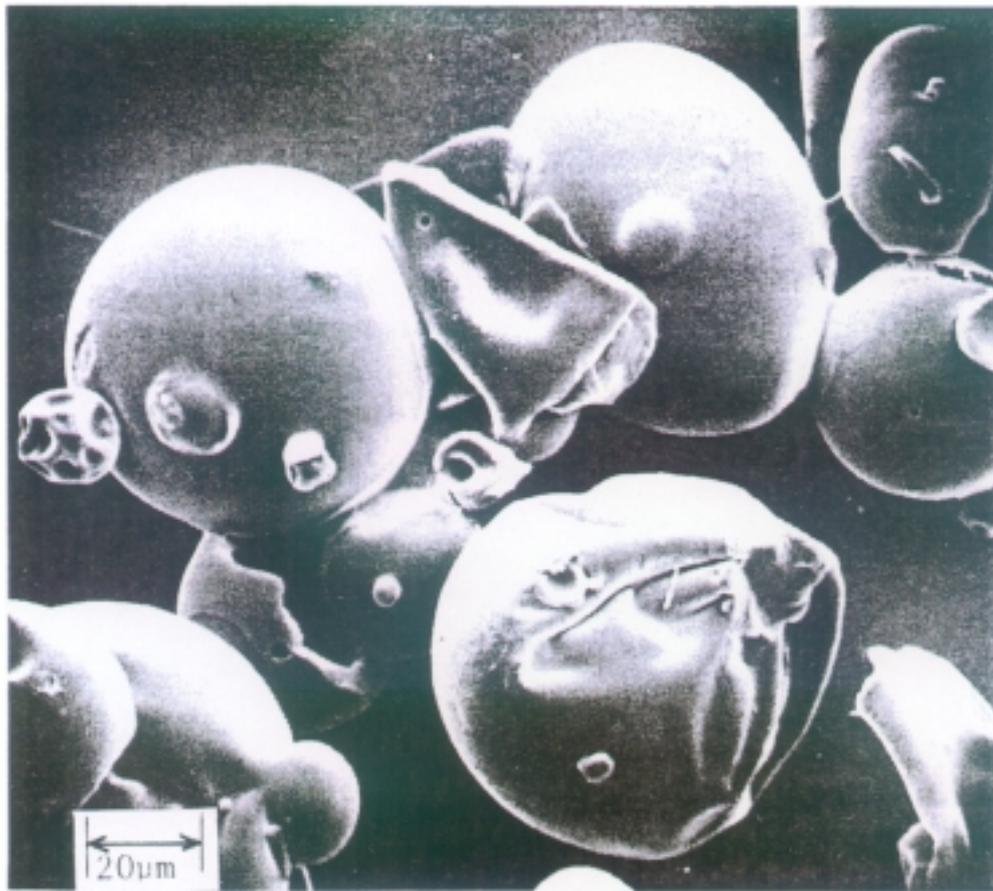


Figura 12. Morfología de la PVP (K 12PF). (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 1986).

1.3. ESPECTROSCOPÍA DE RX POR ENERGÍAS DISPERSIVAS (EDS).

El albendazol presenta un átomo de azufre en su estructura molecular, mientras que la polivinilpirrolidona no incluye el azufre en su estructura. Este hecho hace que al someter las muestras de albendazol y polivinilpirrolidona a un detector de dispersión de energías de RX se obtiene para el albendazol un pico característico en la banda que corresponde al azufre mientras que en el espectro de la PVP este pico no aparece como se puede apreciar en las figuras 13 y 14.

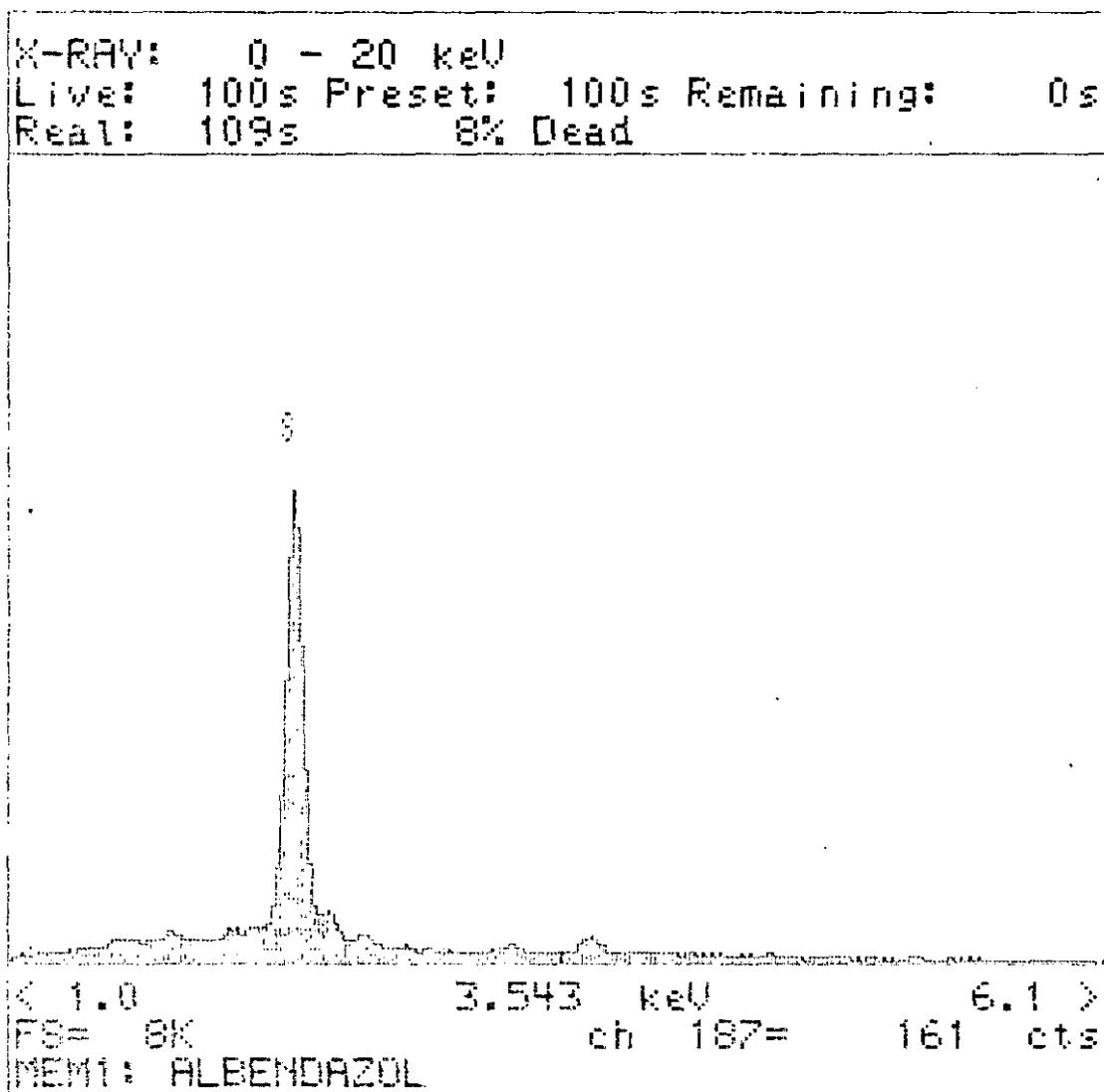


Figura 13. Espectro de RX por energías dispersivas de albendazol.

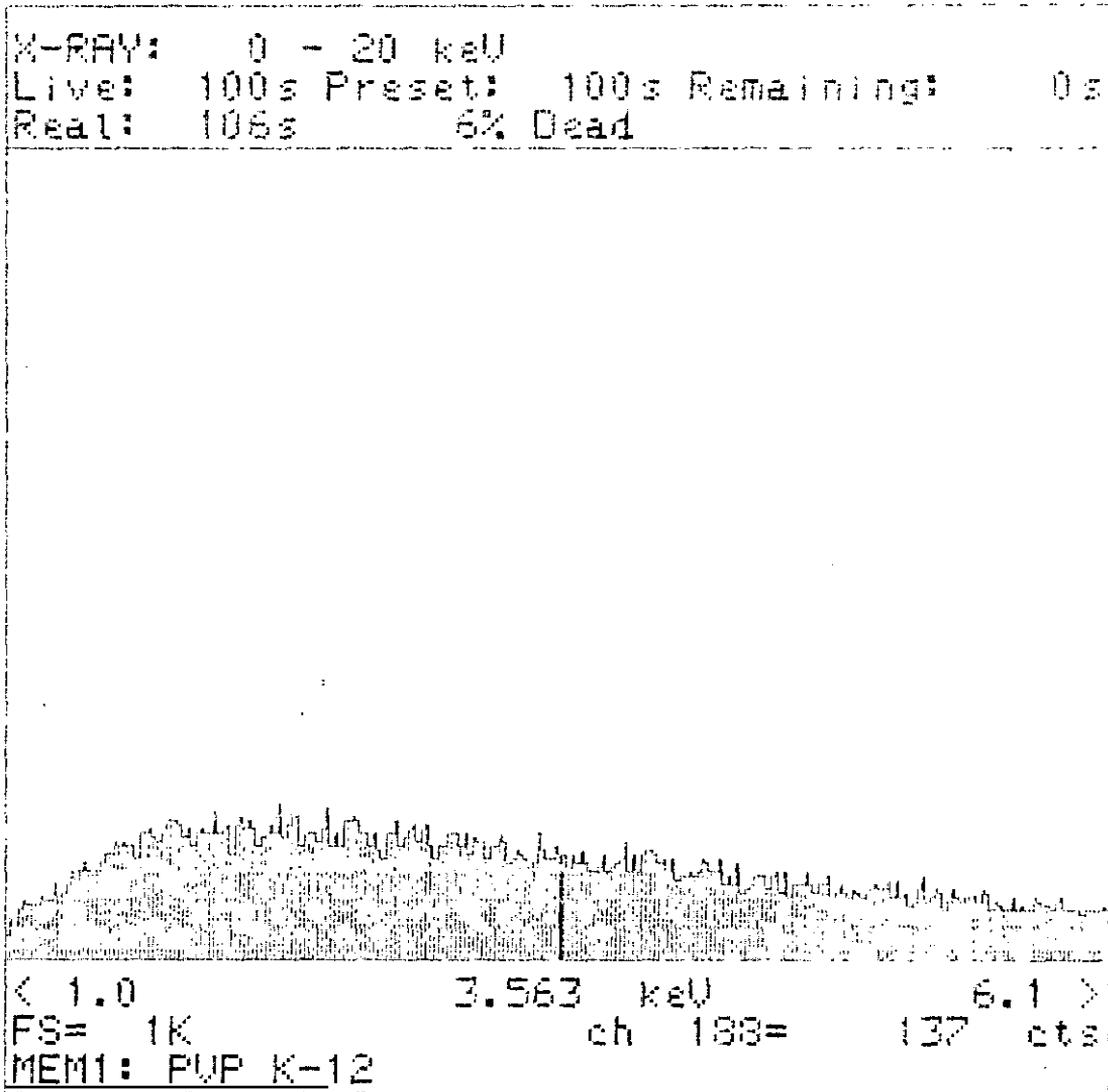


Figura 14. Espectro de RX por energías dispersivas de la PVP (K 12PF).

1.4. DIFRACCIÓN DE RAYOS X.

Se recurre a esta técnica para comparar la estructura cristalina de las dos muestras de albendazol de que se dispone.

Los parametros de difracción de rayos X, representados a partir de los picos que definen la estructura cristalina del albendazol patrón y del genérico se muestran en las figuras 15 y 16.

En la tabla 10, se comparan los valores obtenidos en dos muestras de albendazol, el que consideramos como patrón (albendazol de SKF) frente al albendazol que suministra Chemo Ibérica S.A.

A partir de las áreas de los picos de los dos tipos de albendazol, se puede determinar el grado de cristalización relativo del albendazol genérico con respecto al patrón. El grado de cristalización relativo del albendazol genérico es de 82 %.

A la vista de los resultados obtenidos para las dos materias primas de albendazol, concluimos que existe un peor grado de cristalización en el albendazol suministrado por Chemo Ibérica S.A.

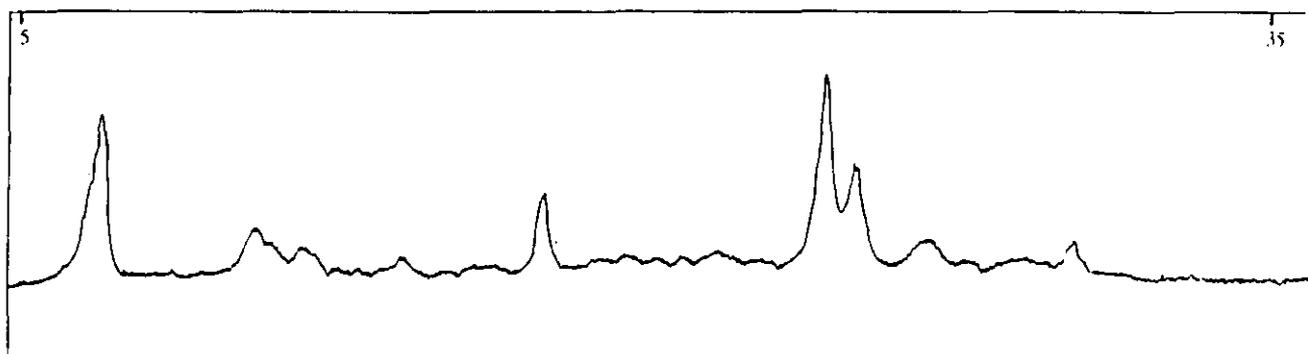


Figura 15. Espectro de difracción de RX del albendazol patrón.

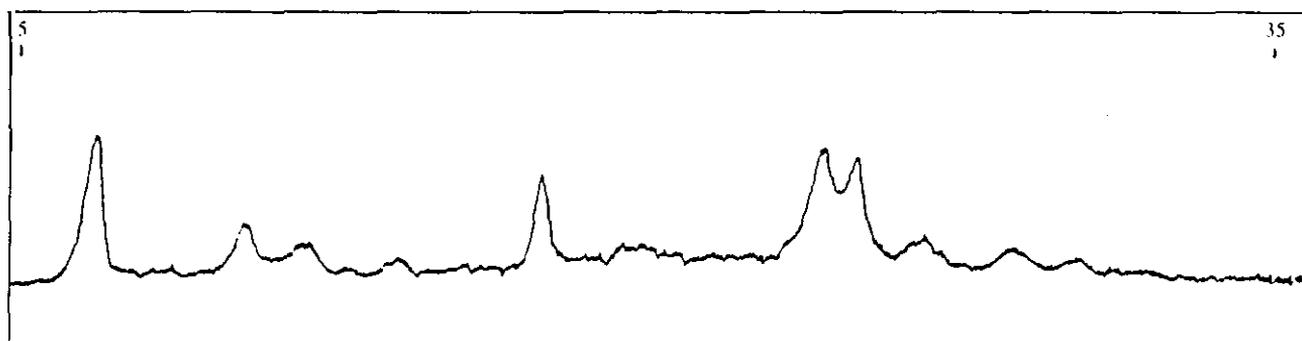


Figura 16. Espectro de difracción de RX del albendazol genérico.

| Albendazol patrón | | | Albendazol genérico | | |
|-------------------|-----------|------------------------|---------------------|-----------|------------------------|
| 2 θ | distancia | I/I _{max} (%) | 2 θ | distancia | I/I _{max} (%) |
| 50,6 | 1,802 | 1,0 | 50,4 | 1,809 | 1,0 |
| 45,2 | 2,004 | 1,0 | 44,8 | 2,021 | 1,0 |
| 36,5 | 2,459 | 1,0 | 36,4 | 2,466 | 1,0 |
| 30,4 | 2,938 | 14,8 | 30,4 | 2,938 | 10,4 |
| 28,8 | 3,097 | 4,3 | 28,8 | 3,097 | 18,7 |
| 26,9 | 3,311 | 25,2 | 26,9 | 3,311 | 21,7 |
| 25,2 | 3,531 | 32,2 | 25,2 | 3,531 | 32,2 |
| 24,5 | 3,630 | 73,0 | 24,4 | 3,645 | 40,0 |
| 22,2 | 4,001 | 1,0 | 19,9 | 4,458 | 1,0 |
| 17,7 | 5,007 | 38,3 | 19,6 | 4,525 | 1,0 |
| 14,3 | 6,188 | 1,0 | 17,6 | 5,035 | 49,6 |
| 11,1 | 7,557 | 6,9 | 14,3 | 6,188 | 1,0 |
| 10,8 | 8,185 | 13,9 | 11,9 | 7,431 | 3,5 |
| 7,0 | 2,617 | 100,0 | 10,4 | 8,499 | 33,9 |
| | | | 6,9 | 12,800 | 84,0 |

Tabla 10. Difractograma del albendazol genérico y del patrón.

3.5. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).

En primer lugar se estudian los termogramas de dos muestras de albendazol patrón y genérico (figuras 17 y 18). Estas muestras presentan termogramas diferentes.

En el termograma del albendazol patrón aparece un primer pico endotérmico a 157°C que corresponde a su temperatura de transición vítrea (T_g), y un segundo pico endotérmico a 220,1°C que corresponde con su temperatura de fusión (T_f). Este segundo pico presenta un hombro a 238°C. La presencia de estos dos picos endotérmicos puede justificarse por la existencia de anisótropos, polimorfos, isómeros ópticos, a un producto de degradación o a un producto intermedio de síntesis.

En el termograma del albendazol genérico aparece un primer pico endotérmico a 157°C que corresponde a su temperatura de transición vítrea (T_g), y un segundo pico endotérmico a 218,4°C que corresponde con su temperatura de fusión (T_f). Este segundo pico presenta al igual que ocurre con el patrón un hombro a 238°C.

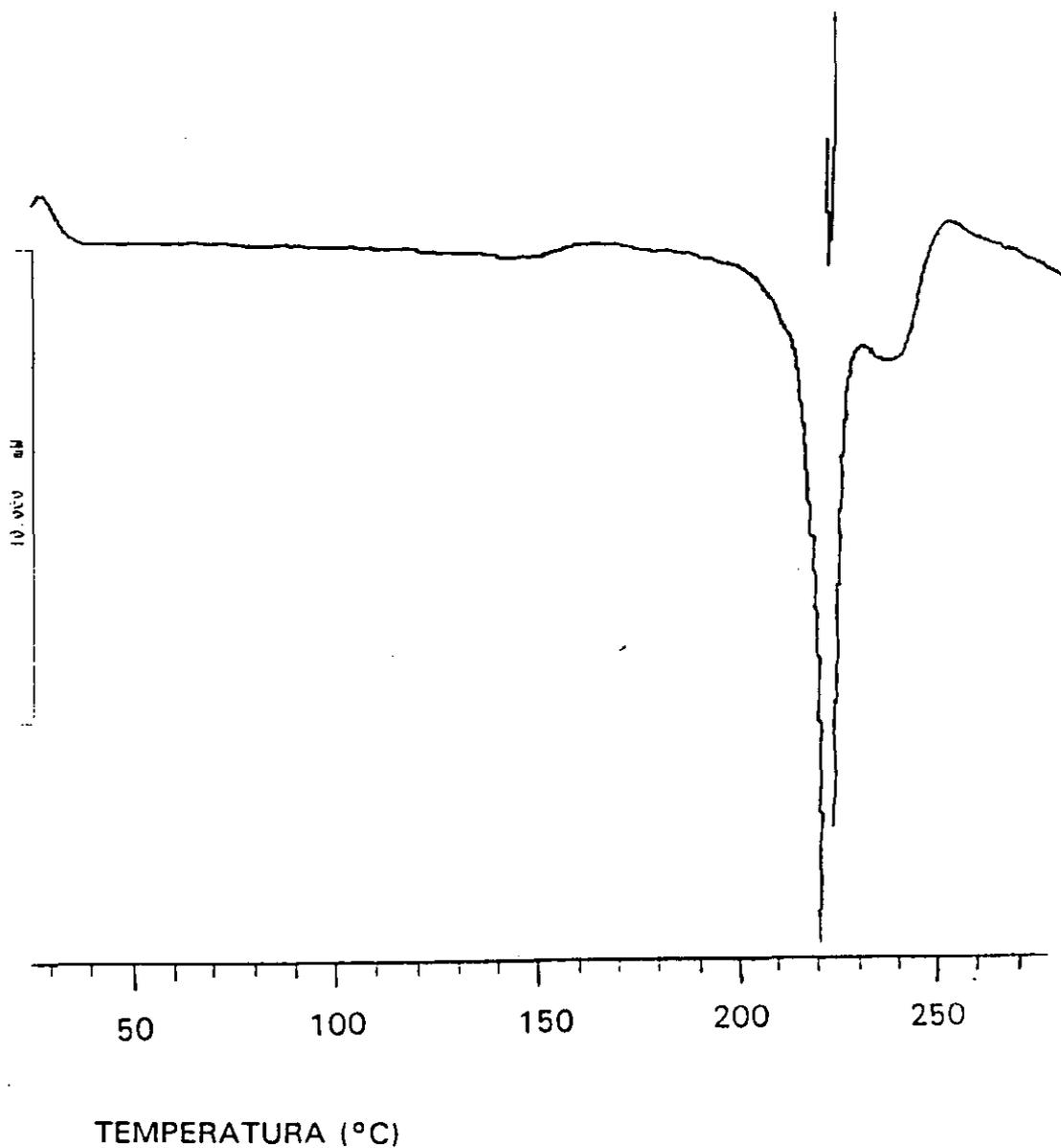


Figura 17. Termograma del albendazol patrón.

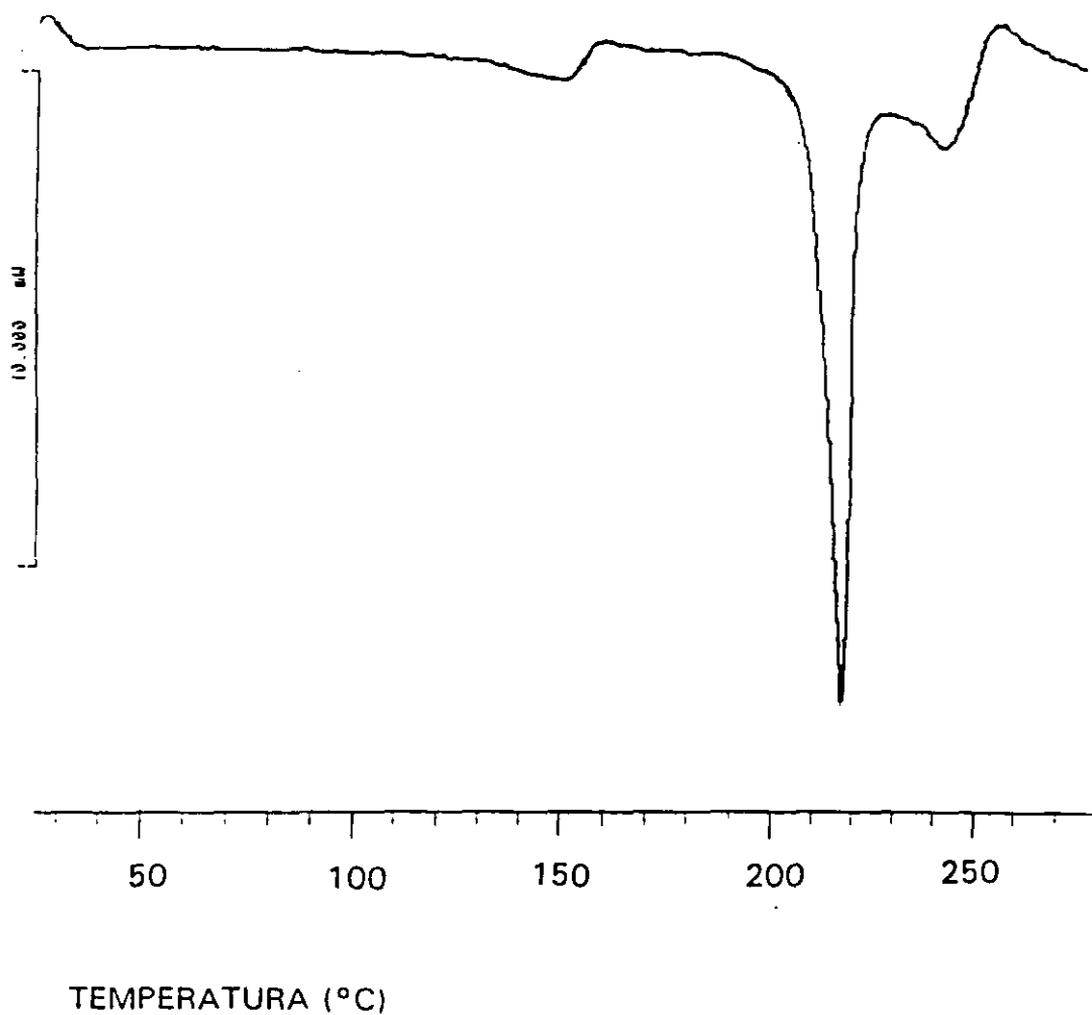


Figura 18. Termograma del albendazol genérico.

La temperatura de transición (T_g) ya ha sido determinada para distintos principios activos como son el cloramfenicol, la griso-fulvina, la indometacina, la glutetimida y el paracetamol (Ford, 1989). La temperatura de transición de cada principio activo es característica del mismo y su desplazamiento es indicativo de la existencia de algún tipo de asociación intramolecular.

La temperatura de fusión (T_f) de los albendazoles estudiados coinciden con los datos existentes en la bibliografía (208°C) (Horton, 1990) si se tienen en cuenta las variaciones debidas a los aparatos.

El segundo pico endotérmico que presenta el albendazol puede ser debido, como ya se ha indicado, a la existencia de distintas formas anisótropas que puedan tender con el tiempo a la forma más estable (monotropismo). Para comprobar si son anisótropos se sometieron ambos tipos de albendazol a unas condiciones de almacenamiento forzadas (temperatura de 45°C) durante 4 meses. Los barridos calorimétricos diferenciales realizados cada 15 días durante estos cuatro meses no muestran un aumento de ninguno de los dos picos endotérmicos por lo que se concluye que no son debidos a la pre-

sencia de distintas formas anisótropas. A modo de ejemplo se muestra en la figura 19 el termograma del albendazol genérico a los 4 meses de estar sometido a 45°C.

Al no haberse detectado isómeros ópticos del albendazol (patrón y genérico) por polarimetría, este segundo pico endotérmico se considera que puede ser debido a distintas formas polimorfas del albendazol, o, más probablemente, a un producto de degradación o a un producto intermedio de síntesis del mismo.

Para descartar que este segundo pico endotérmico de la muestra de albendazol se deba a un producto de degradación sometemos la muestra de albendazol genérico a un doble estudio. Primero se evalúa la muestra después de un primer ciclo de calentamiento entre 25 y 300°C en el que aparecen los dos picos endotérmicos a 218,4 y 238°C respectivamente. Al abrir la cápsula se observa que se ha formado una masa caramelizada que indica la existencia de alteraciones químicas en la molécula de albendazol por la aparición de grupos cromóforos. Esta alteración química se ve confirmada al analizar mediante la técnica de HPLC esta muestra obtenida tras el estudio de DSC al no aparecer el pico característico del albendazol y sí el pico característico de su producto de degradación.

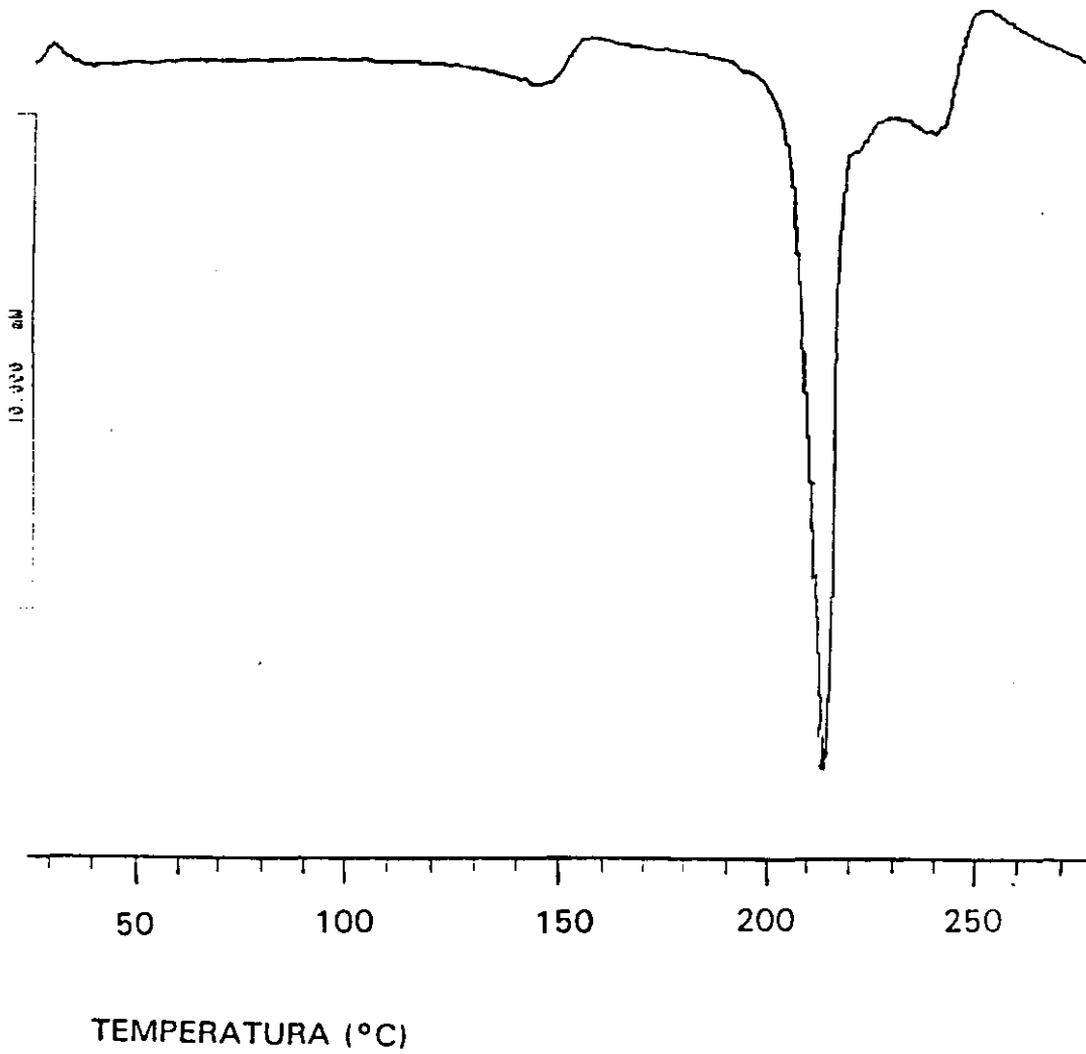


Figura 19. Termograma del albendazol genérico a tras 4 meses de almacenamiento a 45°C.

Al someter esta misma materia prima a un doble ciclo de calentamiento (figura 20). El termograma no presenta ninguna alteración en la línea de base, esta falta de señal en el termograma nos indica que la muestra una vez sometida al primer ciclo de calentamiento se funde perdiendo su estructura cristalina y da lugar a un producto de degradación amorfo que no recrystaliza durante el ciclo de enfriamiento. Por lo que el segundo pico de fusión (238°C) del albendazol no puede ser atribuido a dicho producto de degradación.

La PVP es un polímero semicristalino con una temperatura de transición vítrea de 124,3°C (K-12) y una zona de fusión entre 125 y 180°C, como se puede observar en la figura 21. La temperatura de transición vítrea determinada se encuentra dentro de los límites marcados por Tan (Tan, 1976) para los valores de T_g de la PVP comprendidos entre 54 y 175°C según el Pm y la cantidad de agua que presente la PVP estudiada.

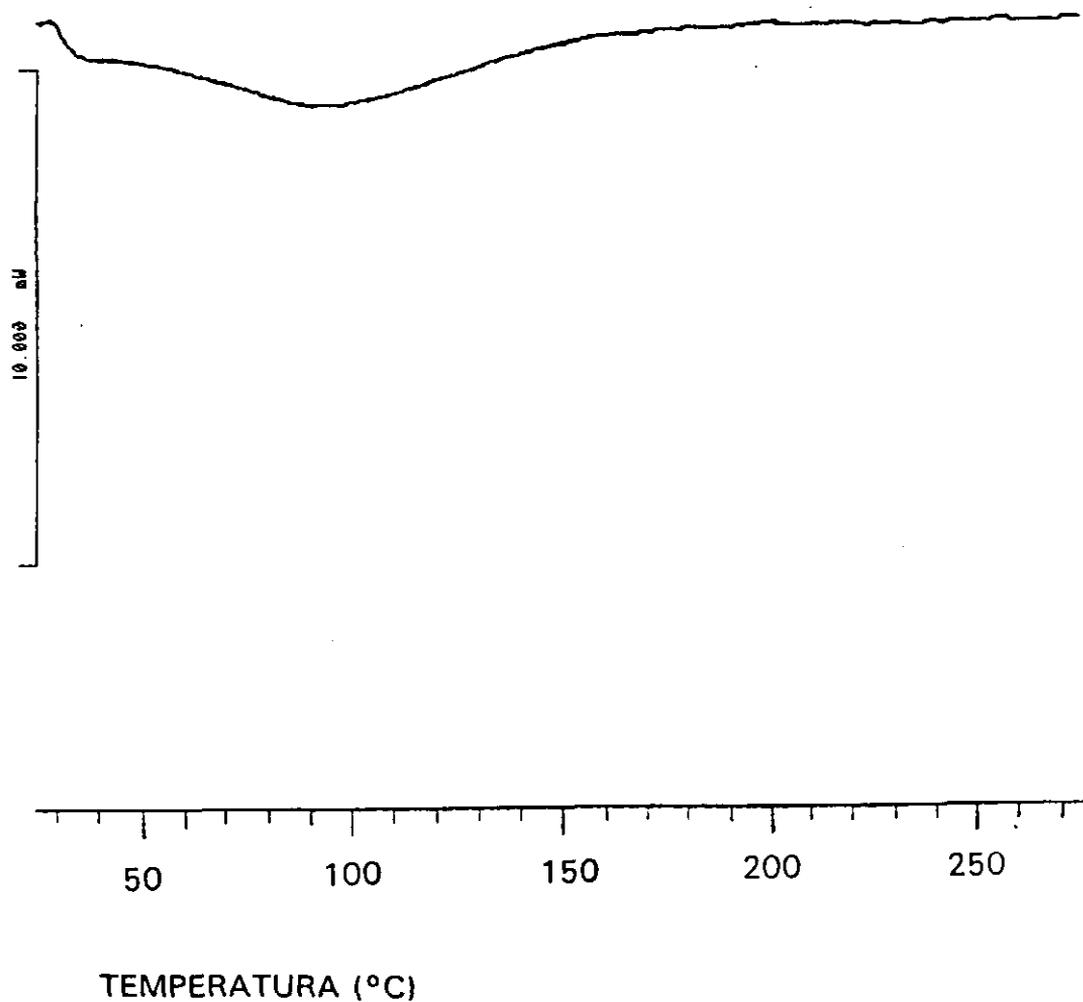


Figura 20. Termograma del albendazol genérico sometido por segunda vez a un barrido calorimétrico entre 25 y 300°C.

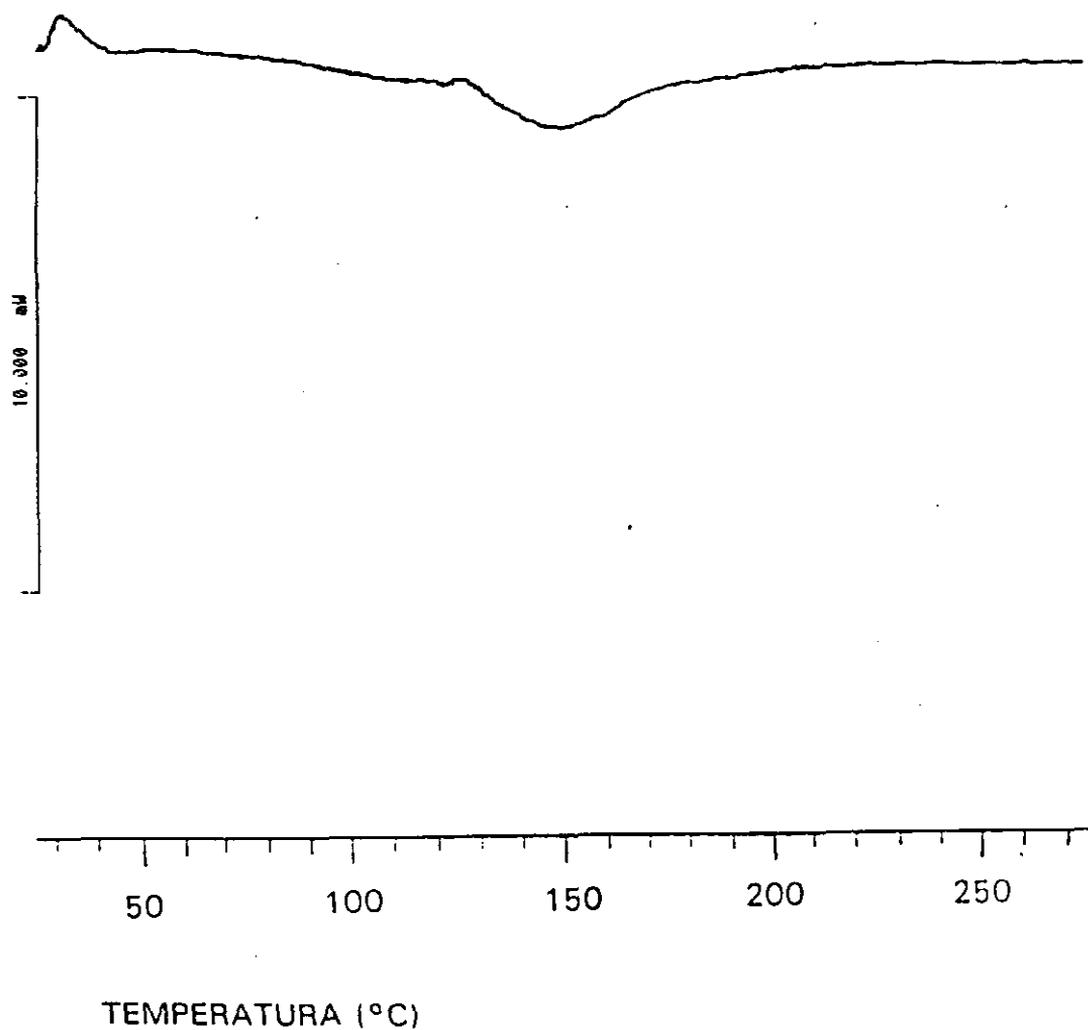


Figura 21. Termograma de la PVP (K 12 PF).

1.6. COEFICIENTE DE SOLUBILIDAD.

1.6.1. Coeficiente de solubilidad del albendazol por el método de ultrasonidos.

El valor obtenido del coeficiente de solubilidad del albendazol en solución tampón pH 1,2 y 37°C por el método de ultrasonidos es de 0,420 mg/ml ($\sigma_{n-1} = 0,021$).

1.6.2. Coeficiente de solubilidad del albendazol por el método de agitación.

El valor obtenido del coeficiente de solubilidad del albendazol en solución tampón pH 1,2 y 37°C por el método de agitación es de 0,422 mg/ml ($\sigma_{n-1} = 0,027$).

1.7. VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN.

En la figura 22, se observa el perfil de disolución del albendazol en el tampón pH 1,2 y 37°C.

Los resultados obtenidos al representar el logaritmo del

RESULTADOS.

porcentaje de medicamento no disuelto frente al tiempo definen una recta como se puede observar en la figura 23, que se ajusta a una cinética exponencial o de primer orden.

Log % medicamento no disuelto = $1,9793 - 3,194 \cdot 10^{-4} \cdot X$ ($\mu\text{g/ml}$)

$r = -0,9902$

Se calculan las eficacias de disolución del albendazol en solución tampón pH 1,2 a 37°C y a los 60; 180 y 480 minutos obteniéndose respectivamente unos valores de 4,74; 9,02 y 16,03%.

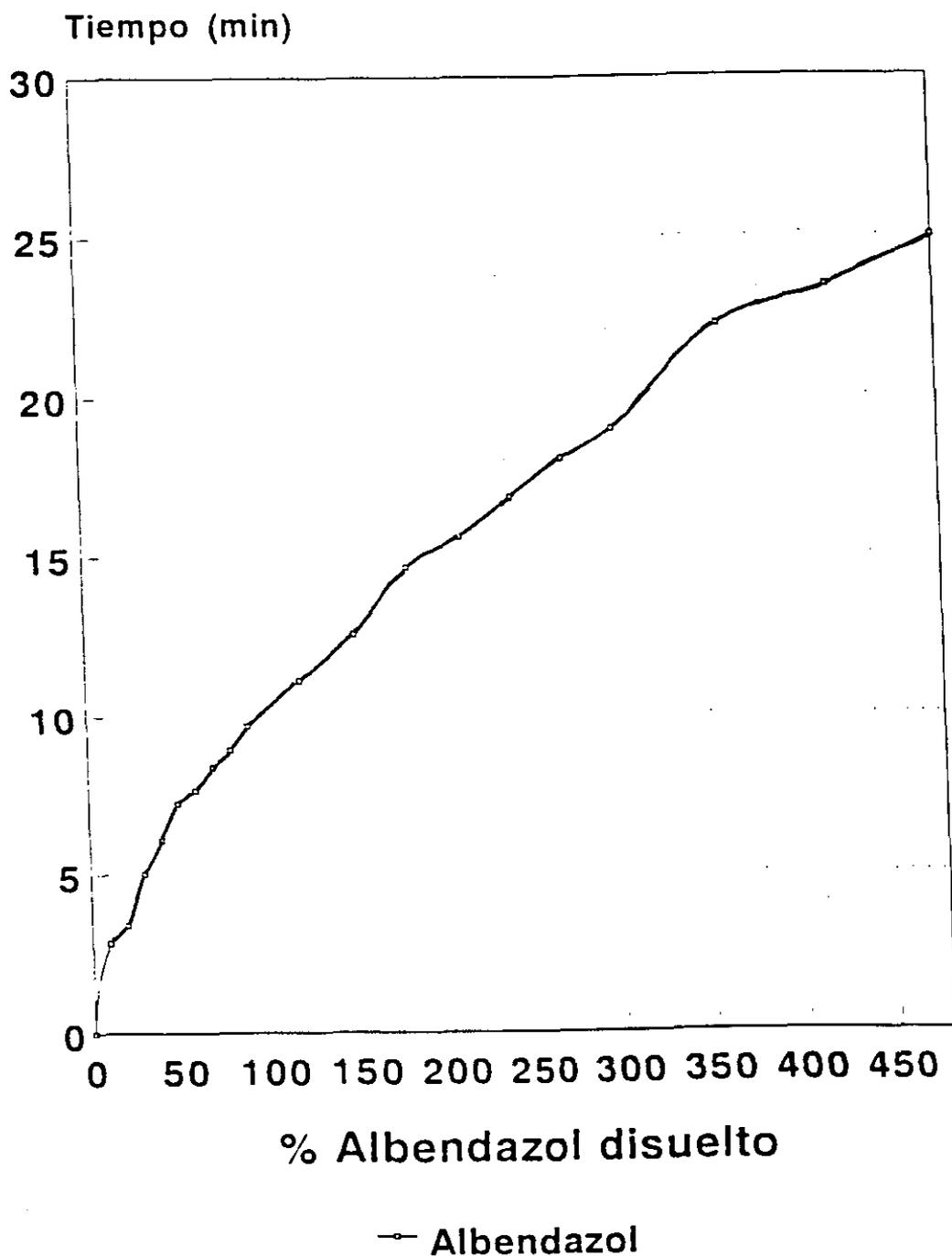


Figura 22. Perfil de disolución del albendazol en solución tampón pH 1,2.

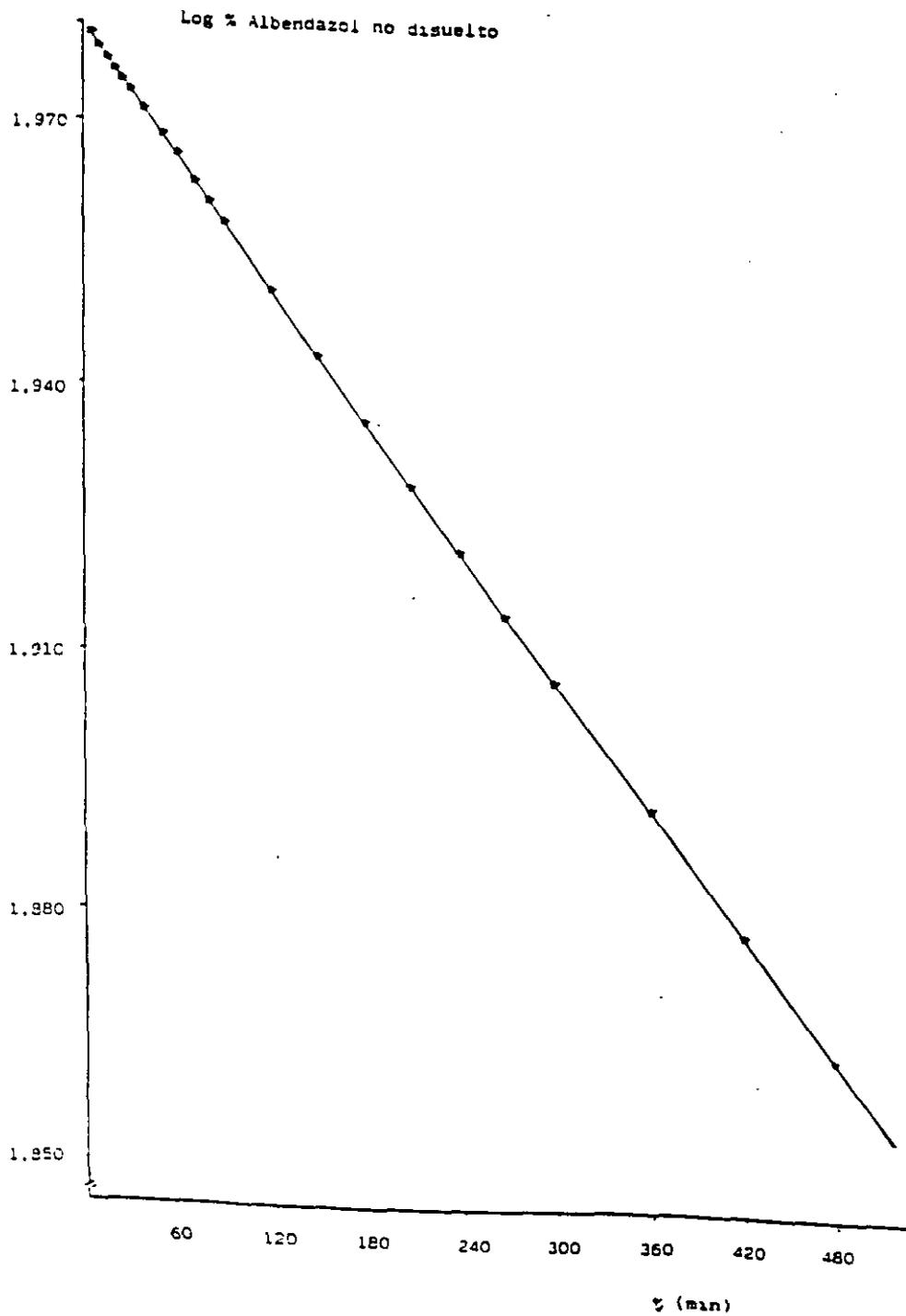


Figura 23. Log % albendazol no disuelto en solución tampón pH 1,2 frente al tiempo en min.

DISCUSIÓN PARCIAL.

Como se puede apreciar por los datos de riqueza del albendazol por HPLC, así como, por los resultados de los ensayos de difracción de RX y DSC, el albendazol genérico tiene unas características fisico-químicas ligeramente distintas a las del albendazol patrón.

Por las características de solubilidad del albendazol tanto en velocidad como en magnitud (Cs) el producto se puede considerar escasamente soluble, por lo que se intenta mejorar estas características mediante la preparación de formulaciones líquidas con distintos disolventes y tensoactivos y mediante el recurso farmacotécnico de las dispersiones sólidas.

2. FORMULACIONES.

2.1. FORMULACIONES LÍQUIDAS.

Con el fin de seleccionar el vehículo más adecuado para la preparación de las formulaciones líquidas de albendazol se compara la solubilidad del albendazol en distintas soluciones tamponadas de igual fuerza iónica y distinto valor de pH.

La fuerza iónica de todas las soluciones tamponadas es de $\mu=0,135$, y los valores de pH utilizados son 1,2; 2; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5 y 7,5.

El estudio del coeficiente de solubilidad del albendazol en cada solución tampón se realiza por triplicado y los resultados obtenidos se recogen en la tabla 11.

| Solución tampón | Cs ($\mu\text{g/ml}$) | σ_{n-1} |
|-----------------|-------------------------|----------------|
| 1,2 | 453,5 | 14,94 |
| 2 | 86,550 | 1,909 |
| 3,5 | 4,460 | 0,094 |
| 4,5 | 0,924 | 0,020 |
| 5,5 | 0,994 | 0,029 |
| 6,5 | 0,753 | 0,031 |
| 7,5 | 1,328 | 0,019 |

Tabla 11. Coeficiente de solubilidad (Cs) y desviación estandard (σ_{n-1}) del albendazol en distintas soluciones tampón a 37°C.

Como se puede apreciar la solubilidad del albendazol es claramente mayor cuando el medio es fuertemente ácido, por lo que se selecciona la solución tampón pH 1,2 como vehículo de las formulaciones líquidas.

Para exaltar la solubilidad del albendazol en la solución tampón pH 1,2 se recurre al empleo de cosolventes.

Los agentes tensoactivos y exaltadores de la solubilidad utilizados son: Cremophor^R EL, Tween^R 20, Laurilsulfato sódico y Transcutol^R. En todos los casos las concentraciones de los cosolventes fueron del 5%.

Las soluciones obtenidas fueron:

Solución A: Cremophor^R EL en solución tampón pH 1,2 al 5%.

Solución B: Tween^R 20 en solución tampón pH 1,2 al 5%.

Solución C: Laurilsulfato sódico en solución tampón pH 1,2 al 5%.

Solución D: Transcutol^R en solución tampón pH 1,2 al 5%.

Los coeficientes de solubilidad del albendazol en estas soluciones fueron estudiados con el método del baño de ultrasonidos y los resultados obtenidos se pueden observar en la tabla 12.

La solución con la que se obtuvo una mayor exaltación del Cs es la solución de Transcutol^R tampón pH 1,2. A continuación se preparan nuevas soluciones con distintas proporciones de Transcutol^R en solución tampón pH 1,2 .

| | Cs (mg/ml) | σ_{n-1} |
|------------|------------|----------------|
| Solución A | 0,982 | 0,017 |
| Solución B | 1,056 | 0,021 |
| Solución C | 0,762 | 0,018 |
| Solución D | 1,479 | 0,032 |

Tabla 12. Coeficiente de solubilidad (Cs) y desviación estandard (σ_{n-1}) del albendazol en distintas soluciones con cosolventes.

Se preparan las siguientes soluciones de Transcutol^R en tampón pH 1,2 preparadas fueron:

- Solución E: Transcutol^R en solución tampón pH 1,2 al 1%.
- Solución D: Transcutol^R en solución tampón pH 1,2 al 5%.
- Solución F: Transcutol^R en solución tampón pH 1,2 al 10%.
- Solución G: Transcutol^R en solución tampón pH 1,2 al 20%.
- Solución H: Transcutol^R en solución tampón pH 1,2 al 40%.
- Solución I: Transcutol^R en solución tampón pH 1,2 al 60%.
- Solución J: Transcutol^R en solución tampón pH 1,2 al 80%.
- Solución K: Transcutol^R al 100%.

RESULTADOS.

Los coeficientes de solubilidad del albendazol en estas soluciones, estudiados con el método del baño de ultrasonidos son los consignados en la tabla 13 y representados en la figura 24.

| | Cs (mg/ml) | σ_{n-1} |
|------------|------------|----------------|
| Solución E | 0,908 | 0,021 |
| Solución D | 1,479 | 0,032 |
| Solución F | 2,315 | 0,018 |
| Solución G | 3,496 | 0,032 |
| Solución H | 10,034 | 0,115 |
| Solución I | 10,914 | 0,167 |
| Solución J | 10,981 | 0,159 |
| Solución K | 6,730 | 0,079 |

Tabla 13. Coeficiente de solubilidad (Cs) y desviación estándar (σ_{n-1}) del albendazol en distintas soluciones con cosolventes.

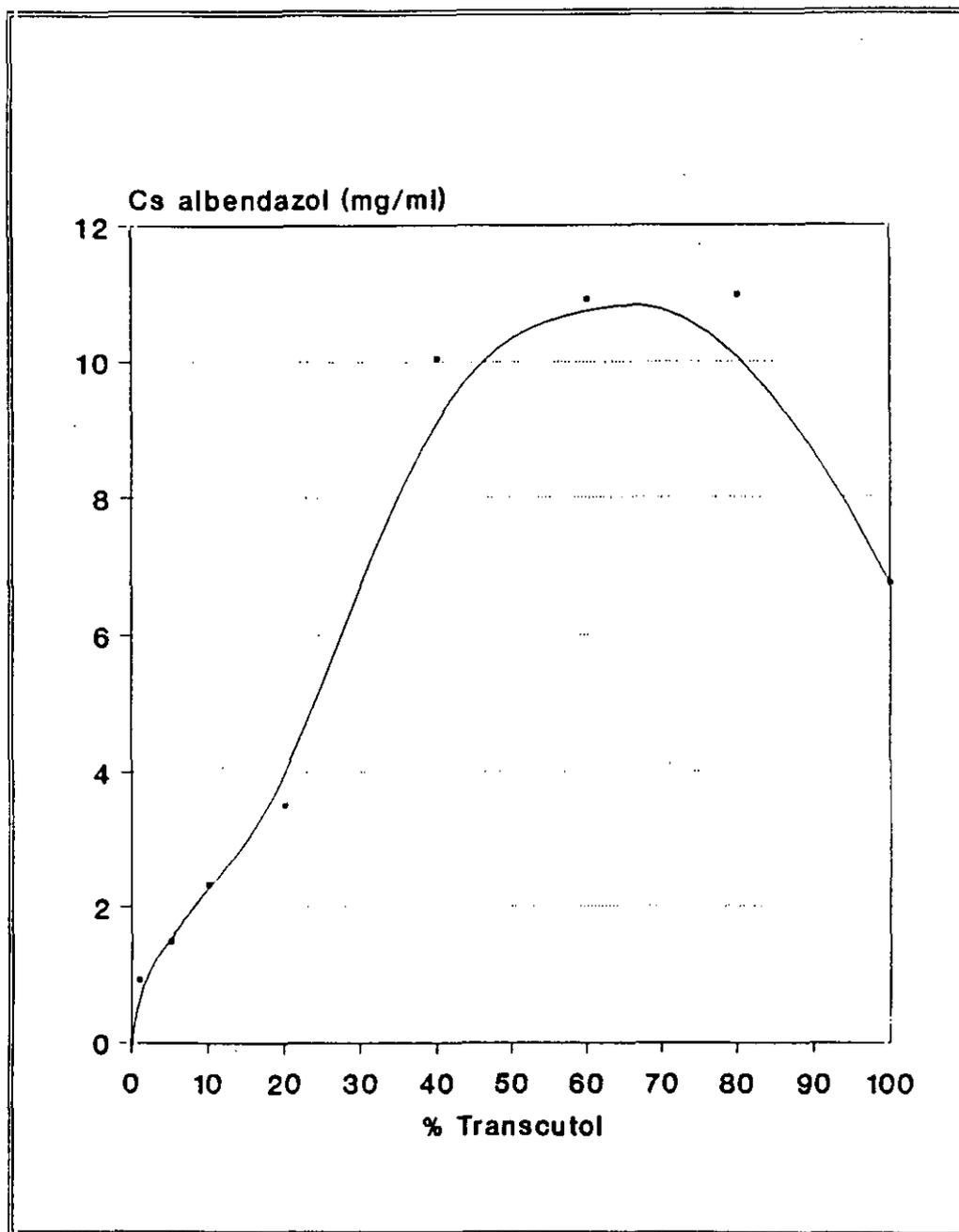


Figura 24. Coeficientes de solubilidad (Cs) del albendazol en diferentes soluciones que contienen distintas proporciones de Transcutol en solución tampón pH 1,2.

Los mejores resultados de solubilidad se obtienen utilizando mezclas de transcutool en solución tampón pH 1,2, empleando proporciones entre el 30 y el 40 %. Para los ensayos "in vivo" se selecciona una formulación líquida con un 40% de transcutool ya que mayores porcentajes de transcutool mejoran poco o nada la solubilidad del albendazol y el transcutool a dosis elevadas puede presentar problemas de toxicidad (Gattefossé, 1985).

Las formulaciones seleccionadas para los posteriores estudios "in vivo" son:

FLAG: Albendazol genérico en solución H (Transcutool^R en solución tampón pH 1,2 al 40%) al 0,5%.

FLAP: Albendazol patrón en solución H (Transcutool^R en solución tampón pH 1,2 al 40%) al 0,5%.

2.2. DISPERSIONES SÓLIDAS.

2.2.1. Coeficientes de solubilidad y velocidad de disolución.

Las dispersiones sólidas pueden o no exaltar la solubilidad de un principio activo en velocidad y magnitud o sólo en velocidad.

La exaltación de la solubilidad en velocidad la podemos estudiar en función de la eficacia de disolución que se estudia a tres tiempos distintos: 60, 180 y 480 minutos.

La exaltación de la solubilidad en magnitud se puede estudiar mediante el coeficiente de solubilidad.

Los valores medios de coeficiente de solubilidad del albendazol y de las dispersiones sólidas con distinta relación PA: vehículo, en solución tampón pH 1,2 se muestran en la tabla 14.

Como se puede apreciar el coeficiente de solubilidad aumenta 3 veces con el empleo de DS en proporción PA:Vehículo 1:10 y puede llegar a ser 13 veces mayor que el del albendazol si se aumenta la relación a 1:40.

| | Cs (mg/ml) |
|---------------------|------------|
| Albendazol genérico | 0,420 |
| AGK1210 | 1,228 |
| AGK1220 | 1,765 |
| AGK1240 | 5,484 |

Tabla 14. Coeficiente de solubilidad del albendazol y de las dispersiones sólidas AGK1210, AGK1220 Y AGK1240 en solución tampón pH 1,2.

El PM de la PVP utilizada en la obtención de las dispersiones sólidas es uno de los factores que influyen en la velocidad de disolución de las mismas. Por lo que se utilizan 3 tipos de PVP de distintos PM para la obtención de las dispersiones sólidas.

Las PVP utilizadas fueron:

Kollidón^R 12PF (PM: 3.000 daltons)

Kollidón^R 17PF (PM: 17.000 daltons)

Kollidón^R 25 (PM: 25.000 daltons)

En principio se preparan dispersiones sólidas de albendazol genérico en proporción 1:10 de los diferentes tipos de PVP y se

comparan sus cinéticas de disolución.

Las dispersiones sólidas de albendazol genérico preparadas son:

Albendazol genérico Kollidón^R 12PF 1:10 (AGK1210)

Albendazol genérico Kollidón^R 17PF 1:10 (AGK1710)

Albendazol genérico Kollidón^R 25 1:10 (AGK2510)

La figura 25 muestra los distintos perfiles de disolución obtenidos con el albendazol y las diferentes dispersiones sólidas AGK1210, AGK1710 y AGK2510.

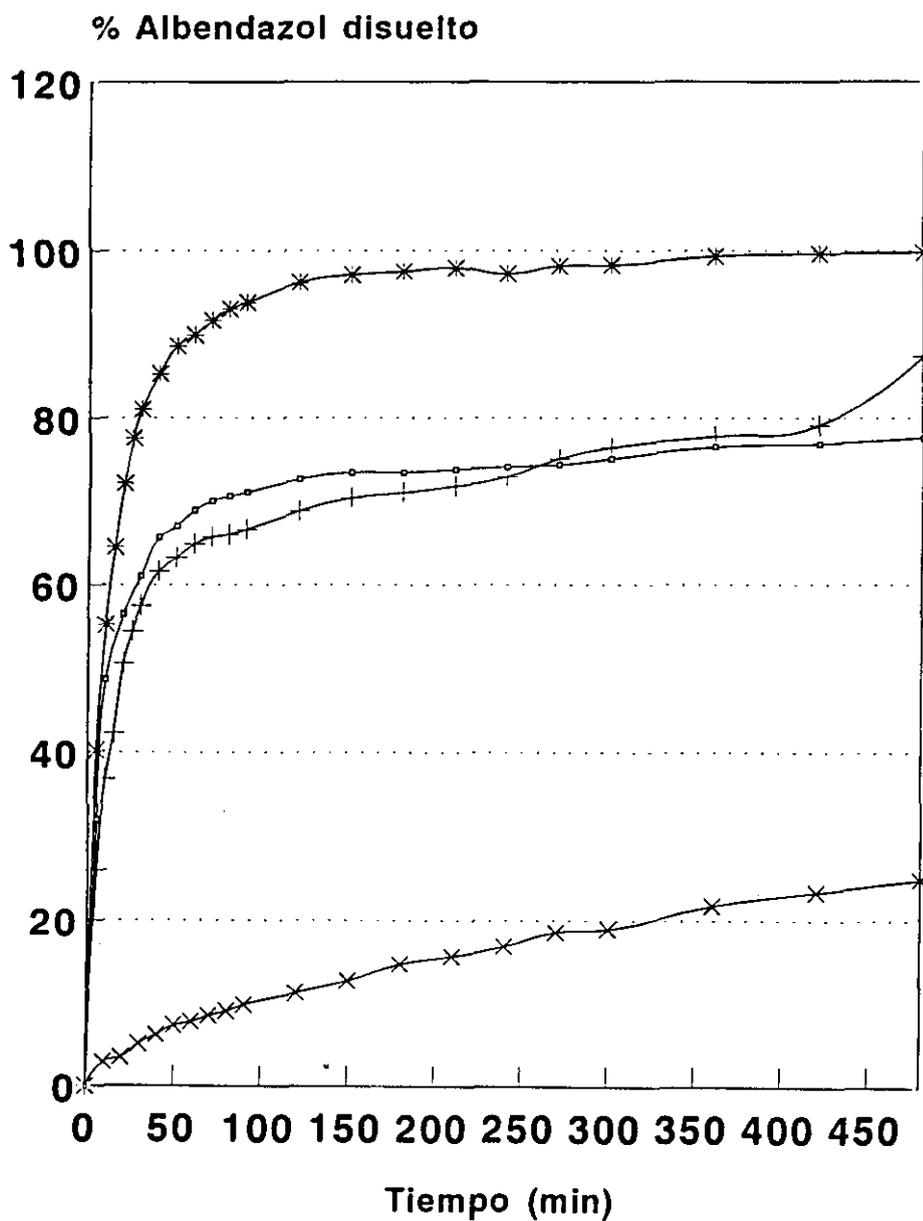


Figura 25. Perfil de disolución de la dispersión sólida AGK1210 (*), AGK2510 (+), AGK1710 (-) y el albendazol (x) en solución tampón pH 1,2.

Como criterio comparativo para estudiar la cinética de disolución se calculó el área bajo la curva a diferentes tiempos al representar los porcentajes de albendazol disueltos a distintos tiempos así como la eficacia de disolución de las diferentes formulaciones a distintos tiempos.

En la tabla 15 se encuentran recogidos los valores de eficacia de disolución a 60; 180; y 480 minutos para estas tres formulaciones AGK1710, AGK2510 Y AGK1210 y el albendazol.

| | Tiempo (min) | | |
|------------|--------------|--------------|--------------|
| | 60 | 180 | 480 |
| AGK1710 | 56,46 (0,98) | 66,97 (1,27) | 72,46 (1,22) |
| AGK2510 | 51,30 (0,84) | 62,73 (1,07) | 71,65 (1,03) |
| AGK1210 | 72,74 (4,95) | 87,83 (3,78) | 94,71 (2,03) |
| Albendazol | 4,79 (2,11) | 7,02 (3,29) | 16,03 (4,52) |

Tabla 15. Valores de eficacia de disolución (E.D.) para las formulaciones AGK1710, AGK2510 y AGK1210, y del albendazol a los 60; 180 y 480 minutos en solución tampón pH 1,2 y su desviación estándar.

Los valores de eficacia de disolución (E.D.) a cualquiera de

los tres tiempos es claramente superior para la formulación que se obtiene con la PVP de Pm más bajo (PVP Kollidón^R 12) por lo que se selecciona esta PVP para la obtención de posteriores dispersiones sólidas.

Un aumento en la concentración del vehículo de las dispersiones sólidas puede exaltar la velocidad de disolución de las mismas. Siguiendo este criterio se preparan dispersiones sólidas que contienen el doble de cantidad de vehículo pero no más ya que se considera que mayores proporciones de vehículo pueden originar problemas posológicos al encontrarse el albendazol en muy bajas proporciones.

El método de obtención empleado es el mismo que el utilizado en los anteriores casos y la formulación así preparada contiene albendazol genérico y Kollidón^R 12 en proporción 1:20 (AGK1220) y 1:40 (AGK1240).

En la figura 26 se puede observar el perfil de disolución obtenido con las dispersiones sólidas AGK1220 y AGK1240 en solución tampón pH 1,2 en comparación con los de las formulaciones AGK1210 y el albendazol genérico.

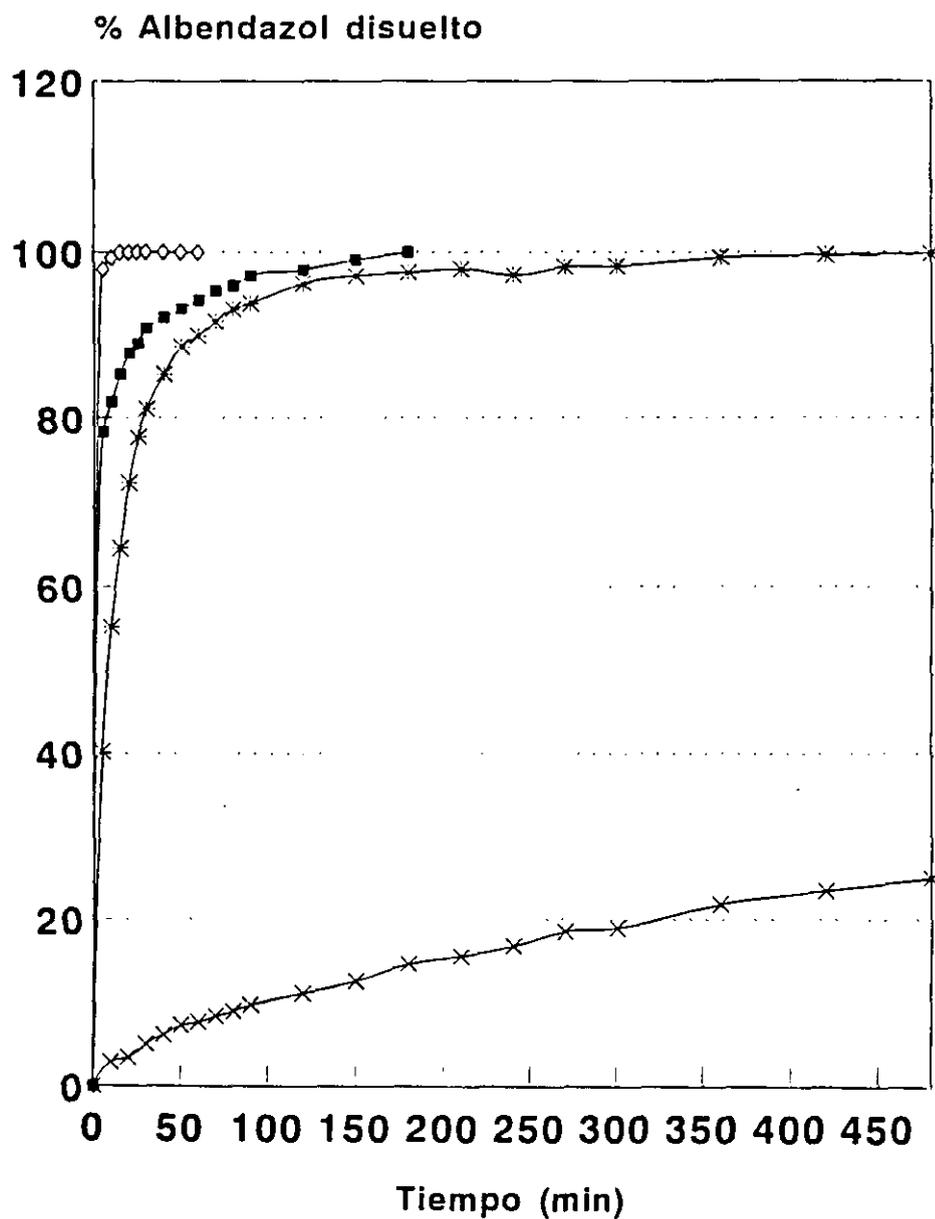


Figura 26. Perfil de disolución de las dispersiones sólidas AGK1210 (*), AGK1220 (■), AGK1240 (◊) y albendazol (—).

RESULTADOS.

En la tabla 16 se encuentran recogidos los valores de eficacia de disolución de las formulación AGK1210, AGK1220 y AGK1240 así como del albendazol genérico a los 60; 180 y 480 minutos.

| | Tiempo (min) | | |
|------------|--------------|--------------|--------------|
| | 60 | 180 | 480 |
| AGK1210 | 72,74 (4,95) | 87,83 (3,78) | 94,71 (2,03) |
| AGK1220 | 85,95 (1,61) | 94,0 (0,67) | 97,75 (0,25) |
| AGK1240 | 98,61 (2,4) | 99,67 (0,58) | 99,67 (0,58) |
| ALBENDAZOL | 4,79 (2,19) | 9,02 (3,29) | 16,03 (4,52) |

Tabla 15. Valores medios y desviación estandard de la eficacia de disolución de las formulaciones AGK1210, AGK1220, AGK1240 y albendazol a los 60; 180 y 480 minutos en solución tampón pH 1,2.

En la tabla 17 se muestran los resultados del análisis de varianza comparado de las eficacias de disolución a 480; 180 y 60 minutos para la formulación de albendazol de referencia y las distintas dispersiones sólidas estudiadas.

RESULTADOS.

| | I | II | III | IV | V | VI |
|-----|--|--|--|--|--|----|
| I | - | - | - | - | - | - |
| II | ED ₄₈₀ *** ED ₁₈₀ *** ED ₆₀ *** | - | - | - | - | - |
| III | ED ₄₈₀ *** ED ₁₈₀ *** ED ₆₀ *** | ED ₄₈₀ *** ED ₁₈₀ *** ED ₆₀ *** | - | - | - | - |
| IV | ED ₄₈₀ *** ED ₁₈₀ *** ED ₆₀ *** | ED ₄₈₀ *** ED ₁₈₀ *** ED ₆₀ *** | ED ₁₈₀ * ED ₆₀ * | - | - | - |
| V | ED ₄₈₀ *** ED ₁₈₀ *** ED ₆₀ *** | ED ₁₈₀ ** ED ₆₀ *** | ED ₄₈₀ *** ED ₁₈₀ *** ED ₆₀ *** | ED ₄₈₀ *** ED ₁₈₀ *** ED ₆₀ *** | - | - |
| VI | ED ₄₈₀ *** ED ₁₈₀ *** ED ₆₀ *** | ED ₄₈₀ * ED ₁₈₀ *** ED ₆₀ *** | ED ₄₈₀ *** ED ₁₈₀ *** ED ₆₀ *** | ED ₄₈₀ *** ED ₁₈₀ *** ED ₆₀ *** | ED ₁₈₀ ** ED ₆₀ *** | - |

Tabla 17. Resultados del estudio comparado del análisis de varianza de la eficacia de disolución a 480; 180 y 60 minutos para las 6 formulaciones estudiadas.

Clave:

Formulaciones: I .- ALBENDAZOL

II.- AGK1210

III.- AGK1710

IV.- AGK2510

V.- AGK1220

VI.- AGK1240

Diferencias Significativas: * (p<0,05), ** (p<0,01),
*** (p<0,001).

Como se observa en la tabla 17 la formulación de albendazol es significativamente diferente ($p < 0,001$) del resto de las DS. Dentro de las DS, existen diferencias en función del peso molecular de la PVP utilizada y de la relación PA:vehículo. Aunque se mejora la velocidad de disolución al disminuir la relación PA:vehículo, la utilización de formulaciones que contienen grandes proporciones de vehículo presentan problemas en su administración debido a los grandes volúmenes de formulación a utilizar. Por este motivo y aunque con la formulación AGK1240 es con la que se obtienen mejores características de solubilidad para los estudios de actividad antiparasitaria, biofarmacia y farmacocinética se selecciona la formulación AGK1220.

2.2.1. Caracterización de la dispersión sólida seleccionada.

2.2.1.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

La dispersión sólida presenta una forma y una estructura similar a la de la polivinilpirrolidona, con un tamaño de partícula comprendido entre 100 y 200 μm . (Figura 27).

2.2.1.2. Espectrofotometría de dispersión de RX (XPS).

Mediante esta técnica se estudia la distribución uniforme del albendazol en la dispersión sólida (AGK1220) por determinación cualitativa del espectro de emisión del átomo de S (solo albendazol) en distintas partes de la dispersión sólida. Se observa que existe una distribución uniforme del albendazol en la dispersión sólida. (Figura 28).

2.2.1.3. Difracción de RX.

Mediante el estudio de difracción de RX se observa que las dispersiones sólidas presentan una estructura amorfa.

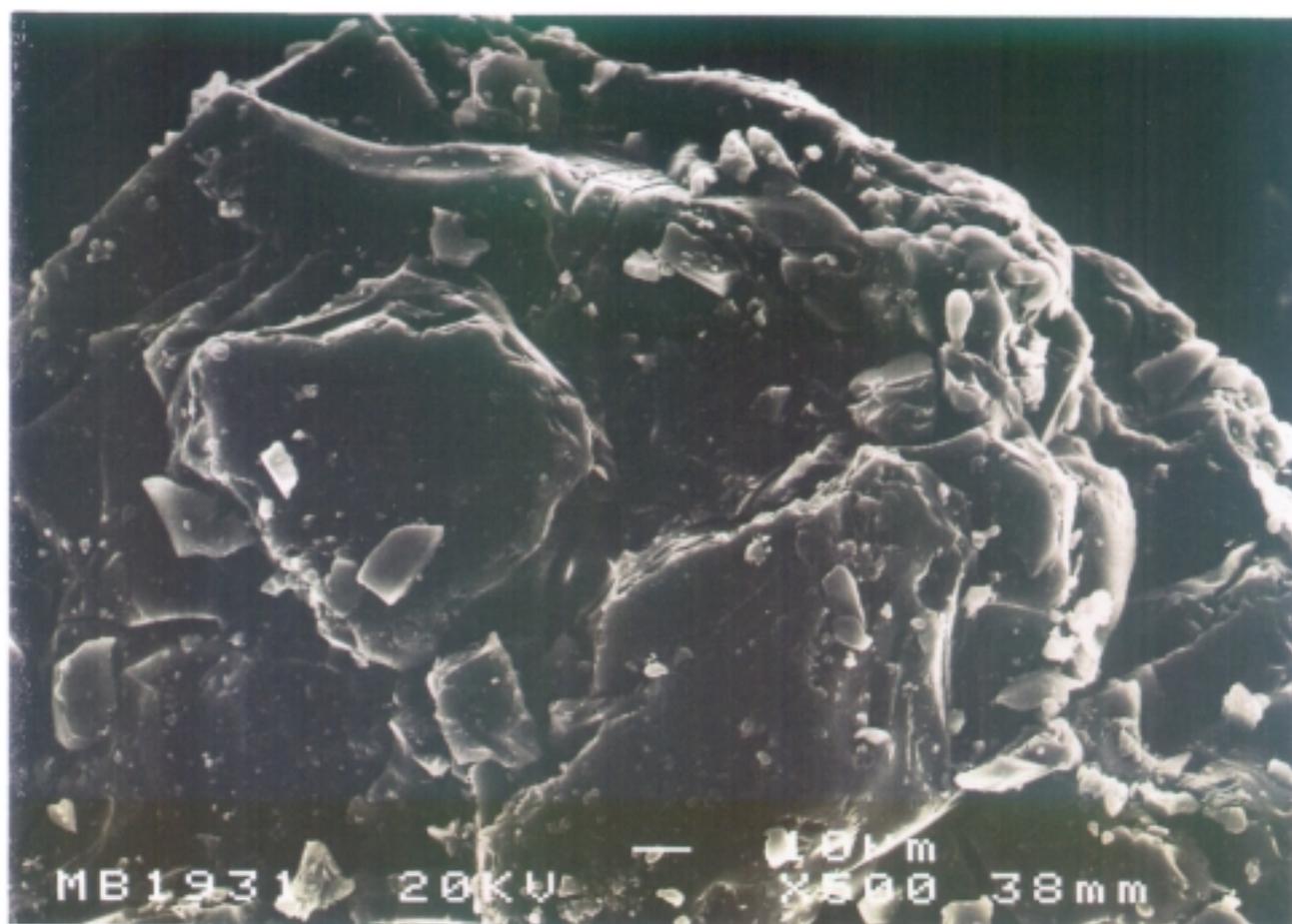


Figura 27. Morfología de la dispersión sólida AGK1220. Microfotografía obtenida con microscopio electrónico de barrido Jeol JSM 6.400.

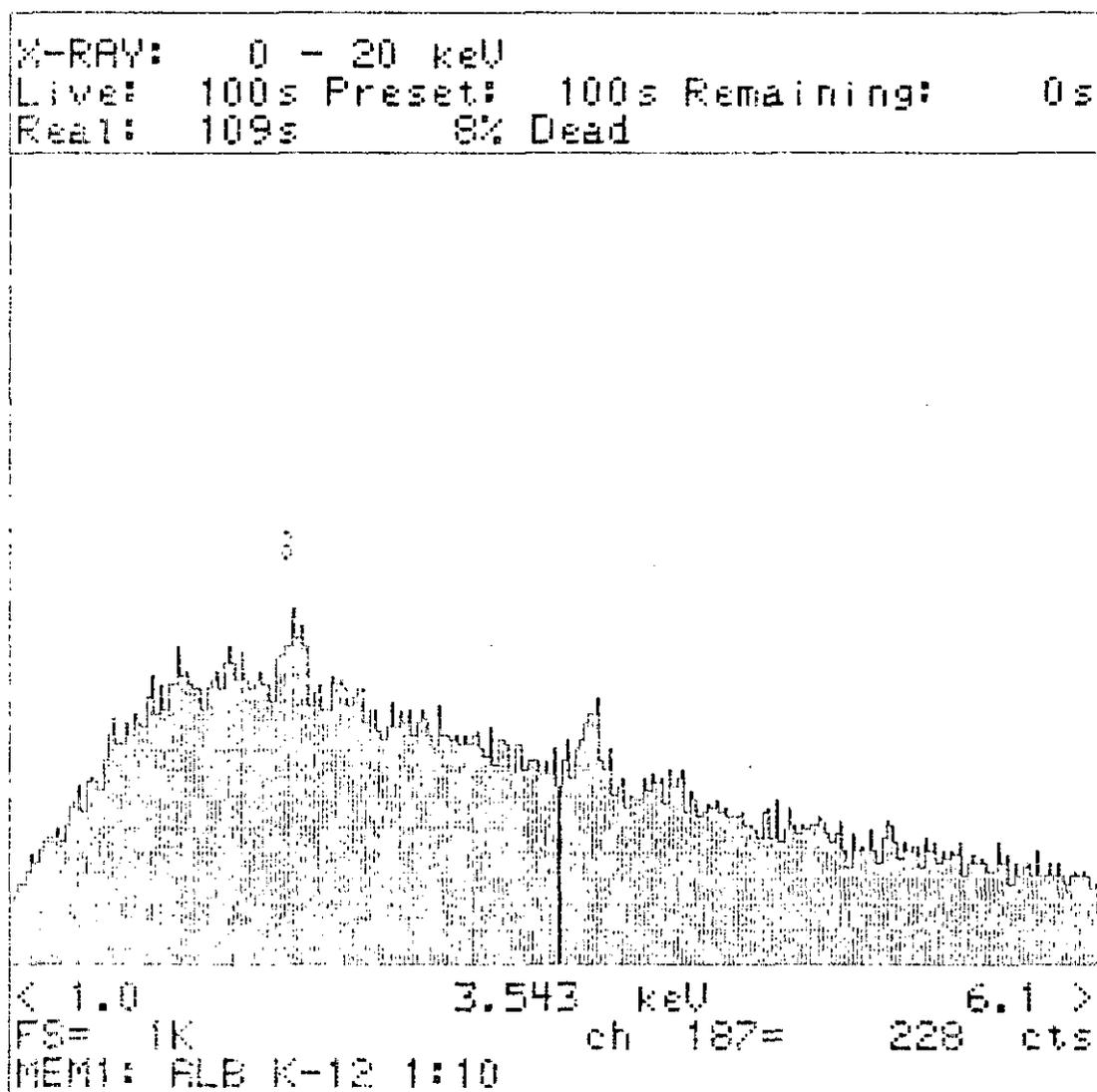


Figura 28. Espectro de RX por energías dispersivas de la dispersión sólida AGK1220.

2.2.1.4. Barrido calorimétrico diferencial (DSC).

En la figura 29 que muestra los termogramas para la dispersión sólida (AGK1220) y el albendazol como materia prima. Se observan distintos picos endotérmicos de fusión, en el caso del albendazol materia prima aparece a los 218,4°C, mientras que para la dispersión sólida aparece a 158,9°C. El desplazamiento del pico de fusión del albendazol en la dispersión sólida puede deberse a una asociación química entre el albendazol y la PVP. La menor temperatura en el pico endotérmico del albendazol en la dispersión sólida puede relacionarse con una mayor cantidad de medicamento en estado amorfo, resultado similar al que obtiene Vojnovic (Vojnovic, 1993) en un estudio de griseofulvina y que coincide con los resultados obtenidos en la técnica de difracción de rayos X, que indican la ausencia de formas cristalinas en las dispersiones sólidas.

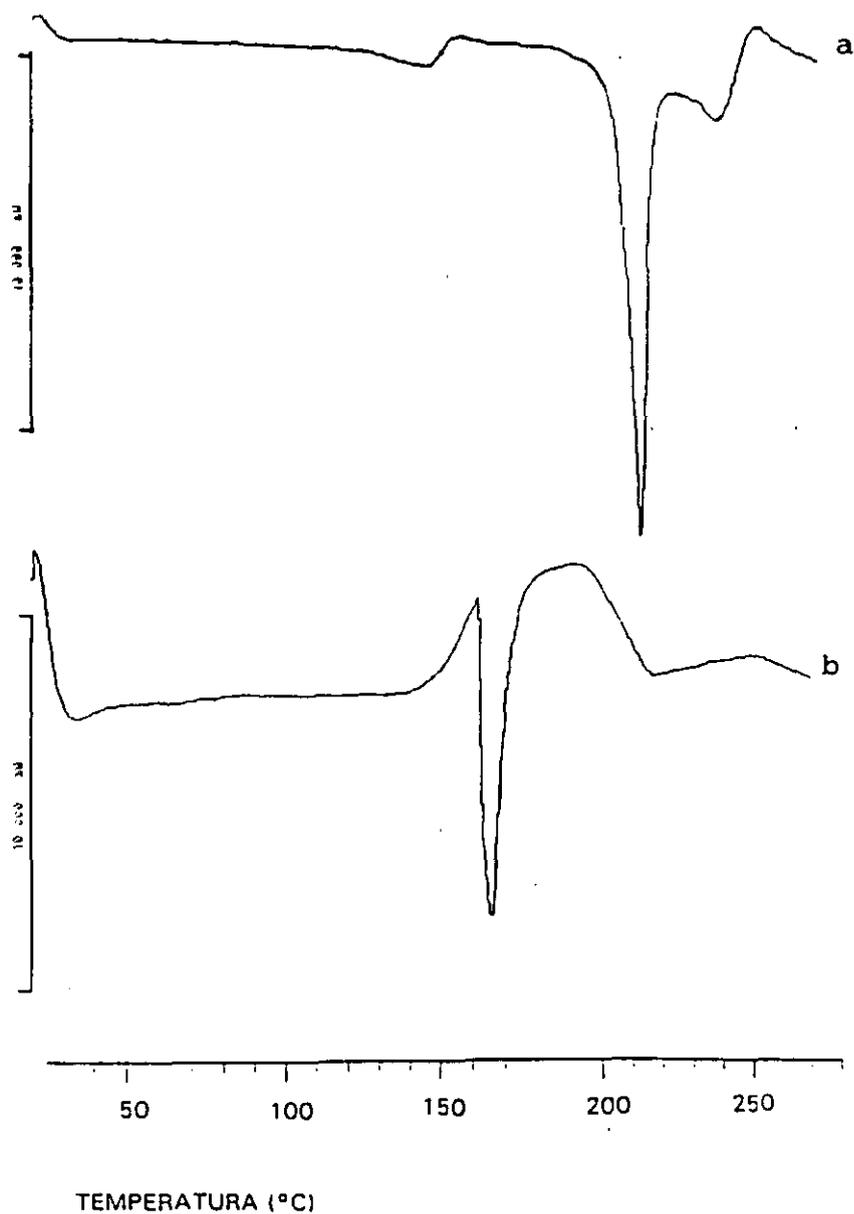


Figura 29. Termograma del albendazol como materia prima (a) y de la dispersión sólida AGK1220 (b).

2.2.1.5. Estudio de humedad en el equilibrio (H.E.)

Se estudia la humedad en el equilibrio de las formulaciones AGK1210, AGK1710 y AGK2510, así como del albendazol y de las diferentes polivinilpirrolidonas empleadas en su obtención.

Los resultados de humedades en equilibrio para las distintas muestras se recogen en la tabla 18. La determinación de la humedad para las distintas muestras se realiza en atmósfera con bajos valores de humedad ya que a humedades del 50% o superiores, la polivinilpirrolidona adquiere una estructura elástica con una gran adhesividad que dificulta la determinación de su humedad, por esta razón no se pudo determinar el contenido en humedad de la PVP y de las dispersiones sólidas en atmósfera del 50% de humedad relativa.

El albendazol presenta unos valores muy bajos de humedad en el equilibrio (1,27- 2,74%), que varían según la humedad relativa del medio.

Los valores de porcentaje de humedad de las polivinilpirrolidonas son muy parecidos no existiendo prácticamente diferencias entre sus humedades en equilibrio. Estos valores son similares a los encontrados en la bibliografía (BASF, 1992).

Los valores de porcentajes de humedad de las dispersiones

RESULTADOS.

sólidas obtenidas con PVP de distinto PM son muy similares entre ellas (8,84-9,29 %), asemejándose asimismo a los valores de humedad de las polivinilpirrolidonas.

| Muestra | Humedad relativa (%) | | |
|------------|----------------------|-------|-------|
| | 31 | 36 | 50 |
| Albendazol | 0,72 | 1,27 | 2,74 |
| PVP 12PF | 7,79 | 8,41 | ----- |
| PVP 17PF | 8,06 | 8,94 | ----- |
| PVP 25 | 10,02 | 10,92 | ----- |
| AGK1210 | 7,26 | 8,84 | ----- |
| AGK1710 | 8,00 | 8,76 | ----- |
| AGK2510 | 9,92 | 10,94 | ----- |

Tabla 18 . Resultados de humedad en el equilibrio para el albendazol, las diferentes PVP y las formulaciones AGK1210, AGK1710 Y AGK2510, en atmósferas de humedades relativas: 31; 36 y 50%.

3. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LAS FORMULACIONES.

3.1. ESTABILIDAD DE LAS FORMULACIONES LÍQUIDAS.

Los resultados del estudio de estabilidad de la formulación líquida FLAG realizados a distintas temperaturas se muestran en las tablas 19, 20, 21 y 22.

| t (días) | % L1 | % L2 | X ± SD (%) | ln X (%) |
|----------|------------|------------|------------|----------|
| 0 | 100,0±2,32 | 100,0±2,08 | 100±0,00 | 4,6052 |
| 14 | 93,12±2,12 | 90,68±1,88 | 91,90±1,72 | 4,5207 |
| 36 | 90,27±2,41 | 87,92±2,06 | 89,10±1,66 | 4,4897 |
| 51 | 85,17±2,06 | 83,88±1,92 | 84,52±0,91 | 4,4370 |
| 75 | 79,62±1,62 | 77,48±1,62 | 78,55±1,51 | 4,3637 |
| 96 | 74,46±0,92 | 72,61±0,91 | 73,53±1,31 | 4,2977 |

Tabla 19. Porcentajes medios de albendazol a distintos tiempos (min) de los lotes L1 y L2, valor medio y desviación estándar (X ± SD) y logaritmo neperiano del porcentaje medio de albendazol (ln X) para el estudio de estabilidad de la formulación FLAG a 4°C.

Para una cinética de Orden 0 (4°C).

$$C' = C_0 - K t$$

$$n = 6$$

$$r_0 = - 0,9883 \quad C_0 = 98,0040$$

$$r_0^2 = 0,9768 \quad K = - 0,2589$$

Para una cinética de orden 1 (4°C).

$$\ln C = \ln C_0 - K' t$$

$$n = 6$$

$$r_1 = - 0,9915 \quad \ln C_0 = 4,5894$$

$$r_1^2 = 0,9831 \quad K' = - 0,0030$$

$$C_0 = 98,43$$

| t (días) | % L1 | % L2 | X ± SD (%) | ln X (%) |
|----------|------------|------------|------------|----------|
| 0 | 100,0±2,68 | 100,0±2,48 | 100±0,00 | 4,6052 |
| 7 | 86,56±2,42 | 88,37±1,89 | 87,46±1,28 | 4,4712 |
| 14 | 78,86±2,06 | 81,98±2,12 | 80,42±2,21 | 4,3873 |
| 51 | 50,48±1,68 | 54,12±1,93 | 52,30±2,57 | 3,9570 |
| 70 | 45,78±1,14 | 43,73±1,68 | 44,75±1,45 | 3,8011 |
| 96 | 36,63±2,42 | 33,03±2,17 | 34,83±2,55 | 3,5505 |

Tabla 20. Porcentajes medios de albendazol a distintos tiempos (min) de los lotes L1 y L2, valor medio y desviación estándar (X ± SD) y logaritmo neperiano del porcentaje medio de albendazol (ln X) para el estudio de estabilidad de la formulación FLAG a 25°C.

Para una cinética de Orden 0 (25°C).

$$C' = C_0 - K t$$

$$n = 6$$

$$r_0 = - 0,9792$$

$$C_0 = 92,87$$

$$r_0^2 = 0,9588$$

$$K = - 0,6615$$

Para una cinética de orden 1 (25°C).

$$\ln C = \ln C_0 - K' t$$

$$n = 6$$

$$r_1 = - 0.9965 \quad \ln C_0 = 4,5568$$

$$r_1^2 = 0.9931 \quad K' = - 0,0108$$

$$C_0 = 95,27$$

| t (días) | % L1 | % L2 | X ± SD (%) | ln X (%) |
|----------|------------|------------|------------|----------|
| 0 | 100,0±2,68 | 100,0±3,12 | 100±0,00 | 4,6052 |
| 9 | 80,12±2,42 | 76,00±3,06 | 78,06±2,91 | 4,3575 |
| 18 | 63,15±2,24 | 58,98±2,06 | 61,06±2,95 | 4,1118 |
| 25 | 51,98±1,86 | 49,23±1,68 | 50,61±1,94 | 3,9241 |
| 36 | 38,86±1,42 | 36,42±1,26 | 37,64±1,72 | 3,6281 |
| 45 | 33,06±1,24 | 30,06±1,24 | 31,56±2,12 | 3,4519 |

Tabla 21. Porcentajes medios de albendazol a distintos tiempos (min) de los lotes L1 y L2, valor medio y desviación estandard (X ± SD) y logaritmo neperiano del porcentaje medio de albendazol (ln X) para el estudio de estabilidad de la formulación FLAG a 45°C.

Para una cinética de Orden 0 (45 °C).

$$C' = C_0 - K t$$

$$n = 6$$

$$r_0 = - 0,9790 \quad C_0 = 93,23$$

$$r_0^2 = 0,9585 \quad K = - 1,5071$$

Para una cinética de orden 1 (45°).

$$\ln C = \ln C_0 - K' t$$

$$n = 6$$

$$r_1 = - 0.9988 \quad \ln C_0 = 4,5893$$

$$r_1^2 = 0.9976 \quad K' = - 0,0260$$

$$C_0 = 98,42$$

| t (días) | % L1 | % L2 | X ± SD (%) | ln X (%) |
|----------|------------|------------|------------|----------|
| 0 | 100,0±2,06 | 100,0±2,17 | 100±0,00 | 4,6052 |
| 5 | 70,64±1,98 | 72,56±2,08 | 71,60±1,36 | 4,2711 |
| 11 | 50,24±1,68 | 52,89±1,78 | 51,56±1,87 | 3,9427 |
| 15 | 31,80±1,98 | 33,98±1,78 | 32,89±1,54 | 3,4932 |
| 20 | 21,47±1,78 | 23,41±1,68 | 22,44±1,37 | 3,1108 |
| 32 | 8,92±1,08 | 8,02±1,41 | 8,22±0,28 | 2,1066 |

Tabla 22. Porcentajes medios de albendazol a distintos tiempos (min) de los lotes L1 y L2, valor medio y desviación estandard (X ± SD) y logaritmo neperiano del porcentaje medio de albendazol (ln X) para el estudio de estabilidad de la formulación FLAG a 70°C.

Para una cinética de Orden 0 (70°C).

$$C' = C_0 - K t$$

$$n = 6$$

$$r_0 = - 0,9529$$

$$C_0 = 87,05$$

$$r_0^2 = 0,9081$$

$$K = - 2,8381$$

Para una cinética de orden 1 (70°C).

$$\ln C = \ln C_0 - K' t$$

$$n = 6$$

$$r_1 = - 0.9969 \quad \ln C_0 = 4,6806$$

$$r_1^2 = 0.9937 \quad K' = - 0,0789$$

$$C_0 = 107,83$$

Para la selección del orden de reacción se comparan los coeficientes de correlación (r) para un orden cero (r_0) y para un orden uno (r_1), en las cinéticas de degradación de cada formulación, observándose si existe estadísticamente una diferencia significativa. El valor de significación se determina por los valores del estadístico Z y su desviación tipo (S_z), que permite determinar el orden de reacción que más se ajusta según un test "t" de Student (Franquesa, 1985).

El valor del estadístico Z para un orden cero (Z_0), se determina según la siguiente ecuación.

$$Z_0 = 1/2 (\ln (1+r_0) - \ln (1-r_0))$$

El valor de este estadístico Z para un orden uno (Z_1) se determina según la siguiente ecuación:

$$Z_1 = 1/2 (\ln (1+r_1) - \ln (1-r_1))$$

La desviación tipo (S_z) se determinará según el número de muestras:

$$S_z = \frac{1}{n-3}$$

Por último la "t" de Student se calcula según la ecuación:

$$"t" = \frac{Z_0 - Z_1}{S_z \frac{2}{n}}$$

La determinación del orden de reacción que más se ajusta según sus cinéticas de degradación se muestra en la tabla 23.

| cinética de degradación | Temperaturas | | | |
|-------------------------|--------------|----------|----------|----------|
| | 4°C | 25°C | 45°C | 70°C |
| orden 0 | | | | |
| r ₀ | - 0,9883 | - 0,9688 | - 0,9790 | - 0,9529 |
| Z ₀ | 2,56 | 1,5950 | 1,5903 | 1,1930 |
| orden 1 | | | | |
| r ₁ | - 0,9915 | - 0,9965 | - 0,9988 | - 0,9969 |
| Z ₁ | 2,0393 | 2,4818 | 3,0164 | 2,5424 |
| Estadístico | | | | |
| S ₂ | 0,0666 | 0,0666 | 0,0666 | 0,0666 |
| "t" | 21,465 | 119,838 | 192,725 | 364,358 |
| Nivel | S | S | S | S |
| significación | (p<0,01) | (p<0,01) | (p<0,01) | (p<0,01) |

Tabla 23. Estudio estadístico y nivel de significación, según sus cinéticas de reacción de la formulación FLAG a cuatro temperaturas diferentes de 4°C, 25°C, 45°C y 70°C.

Según este estudio existen diferencias significativas a todas las temperaturas, entre los órdenes de reacción cero y uno, a la vez que se observa durante estos períodos de almacenamiento una mayor degradación del albendazol.

Las diferencias significativas (p<0.01) encontradas en este

estudio estadístico, nos permiten afirmar que la degradación se ajusta a una cinética de orden uno (Franquesa, 1985).

En la tabla 24 se pueden observar las constantes de degradación de la formulación FLAG a diferentes temperaturas.

| T (°C) | 1/T (°K) | K | ln K |
|--------|----------|----------|----------|
| 4 | 0,003610 | - 0,0030 | - 5,8091 |
| 25 | 0,003355 | - 0,0108 | - 4,5282 |
| 45 | 0,003145 | - 0,0260 | - 3,6496 |
| 70 | 0,002915 | - 0,0789 | - 2,5388 |

Tabla 24. Constantes de degradación de la formulación FLAG a 4; 25; 45 y 70°C.

Si representamos la inversa de la temperatura (°K), frente al ln K tendemos la ecuación siguiente:

$$\ln K = a + b \ 1/ \ T \ (\text{°K})$$

$$\ln K = 11,05 - 4663,09 \ 1/ \ T \ (\text{°K})$$

$$n=4$$

$$r = 0.9994$$

$$r^2 = 0.9989$$

Para una temperatura de almacenamiento de 4 °C (temperatura de almacenamiento en nevera) y de 25°C (temperatura ambiente), nos dará:

Temperatura: 4°C

$$1/ T (^{\circ}\text{K}) = 0,00361$$

$$\ln K_{4^{\circ}\text{C}} = - 5,7810$$

$$K_{4^{\circ}\text{C}} = 0,0031$$

Temperatura: 25°C

$$1/ T (^{\circ}\text{K}) = 0,003355$$

$$\ln K_{25^{\circ}\text{C}} = - 4,5919$$

$$K_{25^{\circ}\text{C}} = 0,0101$$

A 4°C para una cinética de orden uno tendremos:

$$\ln 100 = \ln 90 - 0.0031 t_{90}$$

$$\ln \frac{100}{90}$$

$$t_{90} = \frac{90}{0.0031}$$

$$\underline{t_{90} = 33,99 \text{ días}}$$

A 25°C para una cinética de orden uno tendremos:

$$\ln 100 = \ln 90 - 0.0101 t_{90}$$

$$t_{90} = \frac{\ln \frac{100}{90}}{0.0101}$$

$$\underline{t_{90} = 10,43 \text{ días}}$$

A la vista de estos resultados se recomienda la conservación de esta fórmula en nevera y su empleo en un plazo de tiempo inferior a 1 mes.

3.2. ESTABILIDAD DE DISPERSIONES SÓLIDAS.

Se estudia tanto la estabilidad física como la estabilidad química.

3.2.1. Estabilidad física.

Las dispersiones sólidas pueden presentar como ya se ha señalado una limitada estabilidad física en el tiempo. Esto es debido a que tienden a una forma más estable y por lo tanto existe una tendencia a pasar de forma amorfa (dispersión sólida) a cristal, esta evolución se puede ver reflejada en los resultados del análisis calorimétrico diferencial a distintos tiempos. La figura 30 muestra los resultados del albendazol como materia prima, una mezcla física albendazol:PVP K12 (1:20), una dispersión sólida (AGK1220) recién preparada, la misma dispersión sólida después de 3 meses y también después de 1 año. Como se aprecia en la figura 30 en la mezcla física de albendazol genérico y PVP aparecen los picos endotérmicos de albendazol (T_f , 244,2°C) y de PVP (T_f , 156,4°C) bien diferenciados, por lo que no parece existir asociación química entre ambos productos. En el análisis térmico de la dispersión sólida recién preparada y al cabo de tres meses no aparecen separados los dos picos característicos del albendazol y de la PVP, mientras que al cabo de 1 año de almacenamiento a temperatura ambiente se observa que sí se han separado estos dos picos endotérmicos lo que nos indica que se ha producido una alteración física de la dispersión sólida.

Figura 30. Termograma del albendazol genérico (a), de la mezcla física de albendazol:PVP K12 (1:20) (b), de la dispersión sólida AGK1220 recién obtenida (c) y la misma al cabo de 3 meses (d) y después de 1 año de almacenamiento a temperatura ambiente (e).

3.2.2. Estabilidad química.

Las dispersiones sólidas se muestran bastante estables químicamente cuando se conservan a temperatura ambiente y en recipientes cerrados, protegidas de la humedad. El t_{90} a 25°C es mayor de 1 año, por lo que el factor limitante de su estabilidad es la alteración física.

4. ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE LAS FORMULACIONES ESTUDIADAS.

Se estudia la actividad antiparasitaria de 4 formulaciones de albendazol en tres tipos de fases de infección por *T spiralis*.

4.1. ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA FRENTE A ESTADOS PREADULTOS DE *Trichinella spiralis*.

Los resultados del estudio de la actividad antiparasitaria (expresado como porcentaje de reducción) frente a estados preadultos de *Trichinella spiralis* de las formulaciones seleccionadas se puede observar en la tabla 25.

| Formulaciones | Dosis (mg/Kg) | | |
|---------------|---------------|-------|-------|
| | 2,5 | 5 | 10 |
| Alb patrón | 17,6 | 58,84 | 97,02 |
| Alb generico | Nd | 43,5 | 62,75 |
| FLAG | 23,3 | 23,3 | Nd |
| AGK1220 | 35,2 | 64,2 | 83,9 |

Tabla 25. Resultados de actividad antiparasitaria de las formulaciones albendazol patrón, albendazol genérico, FLAG y AGK1220, frente a estados preadultos de *Trichinella spiralis* (Nd-no determinado).

4.2. ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA FRENTE A LARVAS EMIGRANTES DE *Trichinella spiralis*.

Los resultados del estudio de la actividad antiparasitaria frente a larvas emigrantes de *Trichinella spiralis* de las formulaciones seleccionadas se puede observar en la tabla 26.

| Formulaciones | Dosis (mg/Kg) | | |
|---------------|---------------|-------|-------|
| | 25 | 50 | 100 |
| Alb patrón | Nd | 41,00 | 64,00 |
| Alb generico | Nd | 29,50 | 40,60 |
| FLAG | 31,00 | 60,00 | Nd |
| AGK1220 | Nd | 40,77 | 51,37 |

Tabla 26. Resultados de actividad antiparasitaria de las formulaciones albendazol patrón, albendazol genérico, FLAG y AGK1220, frente a larvas emigrantes de *Trichinella spiralis* (Nd-no determinado).

4.3. ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA FRENTE A LARVAS ENQUISTADAS DE *Trichinella spiralis*.

Los resultados del estudio de la actividad antiparasitaria frente a larvas enquistadas de *Trichinella spiralis* de las formulaciones seleccionadas se puede observar en la tabla 27.

| Formulaciones | Dosis (mg/Kg) | | |
|---------------|---------------|-------|-------|
| | 25 | 50 | 100 |
| Alb patrón | Nd | 33,60 | 94,79 |
| Alb generico | Nd | 2,38 | 19,52 |
| FLAG | 31,70 | 95,50 | 97,85 |
| AGK1220 | Nd | 12,17 | 28,91 |

Tabla 27. Resultados de actividad antiparasitaria de las formulaciones albendazol patrón, albendazol genérico, FLAG y AGK1220, frente a larvas enquistadas de *Trichinella spiralis* (Nd-no determinado).

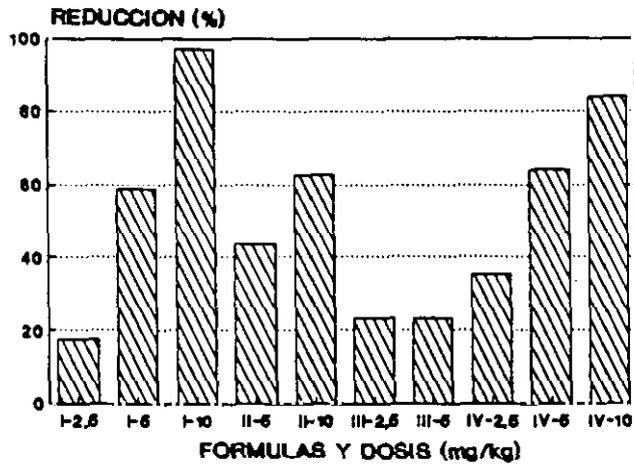
4.4. DISCUSIÓN PARCIAL.

A la vista de los resultados medios de la actividad antiparasitaria de distintas formulaciones de albendazol (Lopez-García y col, 1993) es evidente que existen grandes diferencias de actividad entre las distintas formulaciones y que a mayor

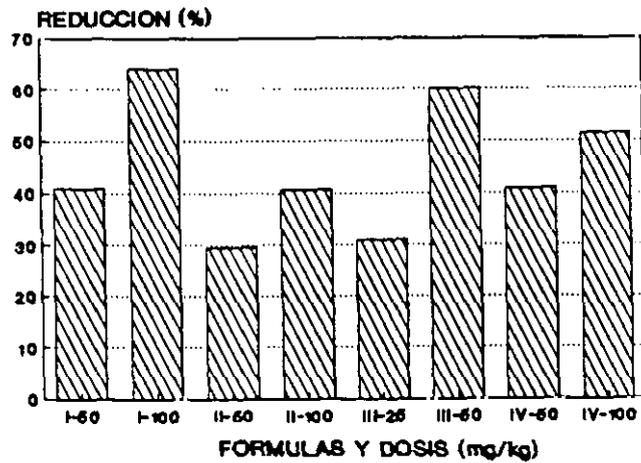
dosis mayor eficacia de reducción de parásitos (como se muestra en la figura 31).

Cuando el parásito se encuentra a nivel intestinal, las formulaciones más eficaces son las de albendazol patrón y dispersión sólida. Sin embargo cuando el parásito se encuentra en la fase emigrante la fórmula más activa es la líquida. Un resultado similar o incluso más acusado se observa cuando se tratan las larvas enquistadas.

A.- ESTADOS PREADULTOS



B.- LARVAS EMIGRANTES



C.- LARVAS ENQUISTADAS

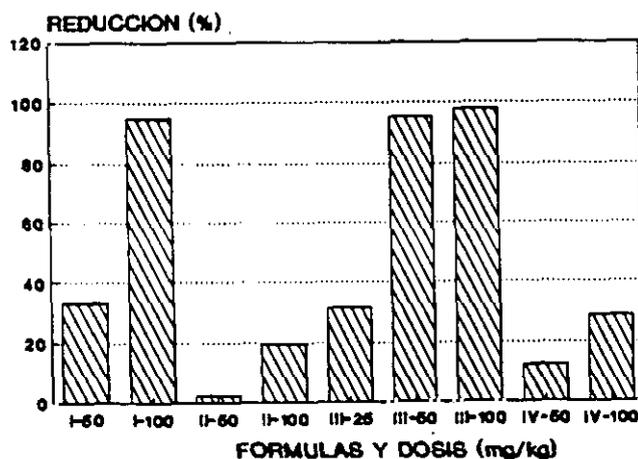


Figura 31. Actividad antiparasitaria expresada en porcentaje de reducción de *T. spiralis* en estado preadulto (A), larvas emigrantes (B) y larvas enquistadas (C) tratadas con distintas dosis de las siguientes formulaciones: I.- Albendazol patrón, II.- Albendazol genérico, III.- FLAG y IV.- AGK1220.

5. ESTUDIO BIOFARMACEUTICO Y FARMACOCINÉTICO DE LAS FORMULACIONES SELECCIONADAS.

En las tablas 28-33 se muestran los resultados del estudio farmacocinético.

En la figura 32 se observa la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas del metabolito mayoritario del albendazol, el albendazol sulfóxido (ricobendazol), tras la administración oral del albendazol patrón y del albendazol genérico en ratones Swiss CD-1 y en la figura 33 se observan los perfiles correspondientes a las formulaciones: líquida (FLAP) y de la Dispersión sólida del albendazol patrón (APK1220) comparandolas con el perfil farmacocinético del albendazol patrón en ratones Swiss CD-1.

En la figura 34 se representan los perfiles de las formulaciones: líquida (FLAG) y de la dispersión sólida del albendazol genérico (AGK1220) comparándolas con el del albendazol genérico en ratones Swiss CD-1.

| T (h) | Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | | | C ($\mu\text{g/ml}$) | σ_{n-1} |
|-------|------------------------------------|------|------|------------------------|----------------|
| 0,25 | 9,2 | 13,4 | 14,9 | 12,5 | 2,9 |
| 0,50 | 17,9 | 17,8 | 15,7 | 17,1 | 1,2 |
| 0,75 | 17,3 | 19,2 | 19,7 | 18,7 | 1,3 |
| 1,50 | 28,6 | 23,2 | 22,5 | 24,8 | 3,3 |
| 2,00 | 23,6 | 28,3 | 23,5 | 25,1 | 2,7 |
| 3,00 | 8,0 | 14,7 | 15,4 | 12,7 | 4,1 |
| 4,50 | 14,8 | 4,5 | 8,0 | 9,1 | 5,2 |
| 6,00 | 7,6 | 7,7 | 5,7 | 7,0 | 1,1 |

Tabla 28. Concentraciones plasmáticas del albendazol sulfóxido ($\mu\text{g/ml}$) para cada ratón a un tiempo dado, valor medio (C) y desviación estandard (σ_{n-1}) tras la administración de albendazol patrón (Dosis 50 mg/Kg).

| T (min) | Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | | | C ($\mu\text{g/ml}$) | σ_{n-1} |
|---------|------------------------------------|------|------|------------------------|----------------|
| 0,25 | 53,9 | 48,5 | 50,1 | 50,8 | 2,8 |
| 0,50 | 27,6 | 39,2 | 21,3 | 29,4 | 9,1 |
| 0,75 | 28,0 | 16,1 | 11,6 | 18,6 | 8,5 |
| 1,50 | 10,9 | 19,2 | 27,4 | 19,2 | 8,2 |
| 2,00 | 15,5 | 18,5 | 15,4 | 16,5 | 1,8 |
| 3,00 | 15,8 | 8,4 | 17,9 | 14,0 | 5,0 |
| 4,50 | 15,9 | 10,2 | 7,6 | 11,2 | 4,2 |
| 6,00 | 6,9 | 7,0 | 6,5 | 6,8 | 0,3 |

Tabla 29. Concentraciones plasmáticas de albendazol sulfóxido ($\mu\text{g/ml}$) para cada ratón a un tiempo dado, valor medio (C) y desviación estándar (σ_{n-1}) tras la administración de la formulación FLAP (Dosis 50 mg/Kg).

| T (min) | Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | | | C($\mu\text{g/ml}$) | σ_{n-1} |
|---------|------------------------------------|------|------|-----------------------|----------------|
| 0,25 | 31,6 | 30,1 | 27,0 | 29,6 | 2,3 |
| 0,50 | 26,7 | 20,4 | 20,2 | 22,4 | 3,7 |
| 0,75 | 21,7 | 18,2 | 22,9 | 20,9 | 2,4 |
| 1,50 | 20,1 | 22,5 | 21,5 | 21,7 | 1,2 |
| 2,00 | 19,6 | 20,3 | 21,1 | 20,3 | 0,7 |
| 3,00 | 10,8 | 7,5 | 10,8 | 9,7 | 1,9 |
| 4,50 | 14,5 | 9,4 | 11,9 | 11,9 | 2,5 |
| 6,00 | 12,2 | 14,6 | 10,1 | 12,3 | 2,2 |

Tabla 30. Concentraciones plasmáticas de albendazol sulfóxido ($\mu\text{g/ml}$) para cada ratón a un tiempo dado, valor medio (C) y desviación estándar (σ_{n-1}) tras la administración de la formulación APK1220 (Dosis 50 mg/Kg).

| T (min) | Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | | | C ($\mu\text{g/ml}$) | σ_{n-1} |
|---------|------------------------------------|------|------|------------------------|----------------|
| 0,25 | 9,5 | 11,1 | 9,8 | 10,1 | 0,8 |
| 0,50 | 11,2 | 12,1 | 9,9 | 11,1 | 1,1 |
| 0,75 | 12,8 | 11,2 | 13,5 | 12,5 | 1,2 |
| 1,50 | 7,2 | 6,3 | 6,5 | 6,7 | 0,5 |
| 2,00 | 8,0 | 6,5 | 6,2 | 6,9 | 1,0 |
| 3,00 | 5,7 | 10,9 | 8,2 | 8,3 | 2,6 |
| 4,50 | 8,6 | 6,5 | 4,7 | 6,6 | 1,9 |
| 6,00 | 5,0 | 4,7 | 6,3 | 5,3 | 0,8 |

Tabla 31. Concentraciones plasmáticas de albendazol sulfóxido ($\mu\text{g/ml}$) para cada ratón a un tiempo dado, valor medio (C) y desviación estandar (σ_{n-1}) tras la administración del albendazol genérico.

| T (min) | Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | | | C ($\mu\text{g/ml}$) | σ_{n-1} |
|---------|------------------------------------|------|------|------------------------|----------------|
| 0,25 | 38,8 | 40,6 | 41,9 | 40,4 | 1,5 |
| 0,50 | 27,1 | 53,3 | 31,3 | 37,2 | 14,1 |
| 0,75 | 17,4 | 19,2 | 25,2 | 20,6 | 4,1 |
| 1,50 | 12,8 | 14,4 | 9,3 | 12,2 | 2,6 |
| 2,00 | 10,5 | 11,4 | 9,5 | 10,5 | 0,9 |
| 3,00 | 15,5 | 11,8 | 11,5 | 12,9 | 2,2 |
| 4,50 | 12,2 | 8,4 | 10,5 | 10,4 | 1,9 |
| 6,00 | 7,2 | 8,0 | 6,4 | 7,2 | 0,8 |

Tabla 32. Concentraciones plasmáticas de albendazol sulfóxido ($\mu\text{g/ml}$) para cada ratón a un tiempo dado, valor medio (C) y desviación estándar (σ_{n-1}) tras la administración de la formulación FLAG (Dosis 50 mg/Kg).

| T (min) | Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | | | C ($\mu\text{g/ml}$) | σ_{n-1} |
|---------|------------------------------------|------|------|------------------------|----------------|
| 0,25 | 19,4 | 21,7 | 20,7 | 20,6 | 1,1 |
| 0,50 | 25,4 | 25,9 | 29,6 | 27,0 | 2,3 |
| 0,75 | 32,5 | 27,8 | 29,5 | 29,9 | 2,4 |
| 1,50 | 19,4 | 25,0 | 23,2 | 22,5 | 2,8 |
| 2,00 | 18,8 | 18,1 | 24,8 | 20,6 | 3,7 |
| 3,00 | 17,7 | 22,6 | 24,2 | 21,5 | 3,4 |
| 4,50 | 13,3 | 10,0 | 10,8 | 11,4 | 1,7 |
| 6,00 | 9,5 | 7,7 | 10,8 | 9,3 | 1,5 |

Tabla 33. Concentraciones plasmáticas de albendazol sulfóxido ($\mu\text{g/ml}$) para cada ratón a un tiempo dado, valor medio (C) y desviación estándar (σ_{n-1}) para la formulación AGK1220.

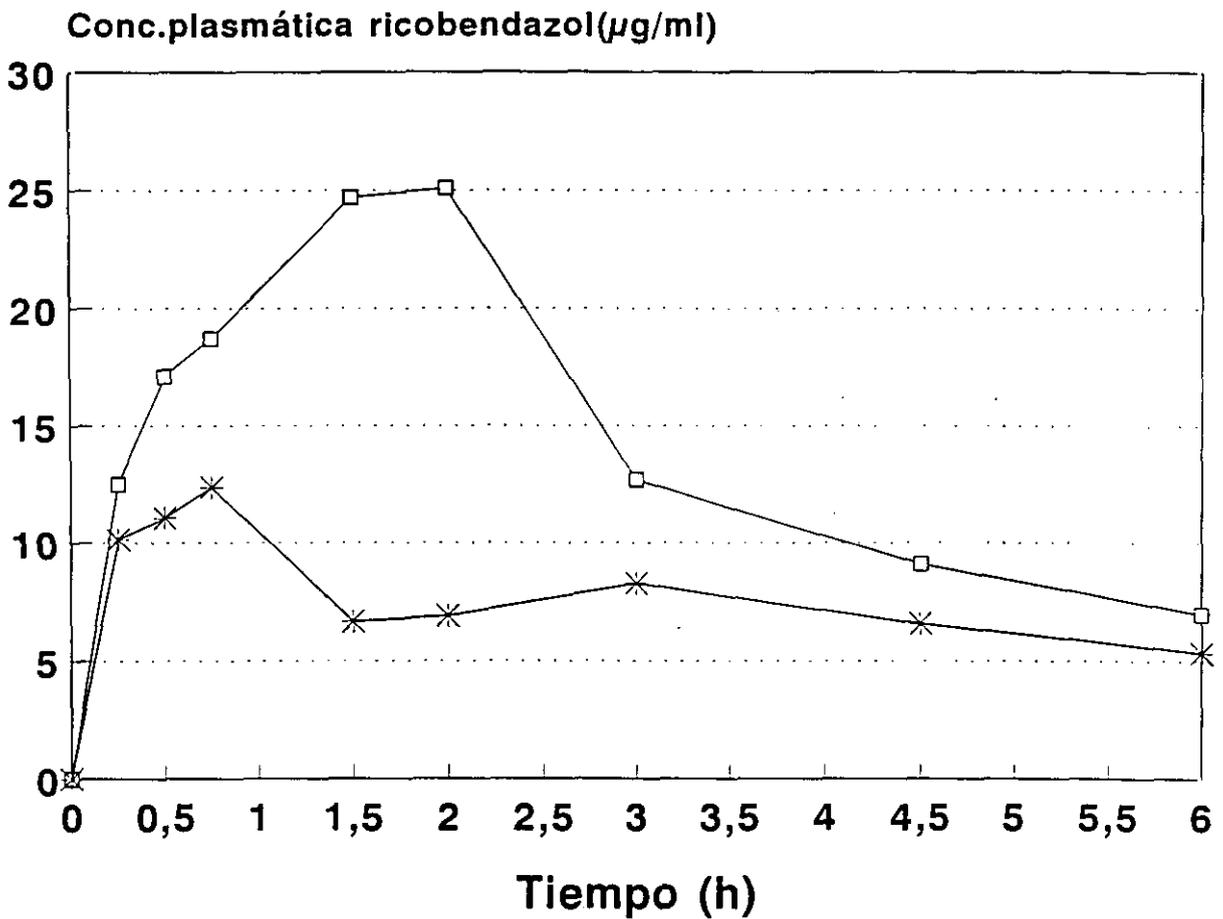


Figura 32. Concentraciones plasmáticas de albendazol sulfóxido ($\mu\text{g/ml}$) vs tiempo (h) tras la administración oral en ratones CD-1 de albendazol patrón (\square) y albendazol genérico (\ast). (Dosis 50 mg/Kg).

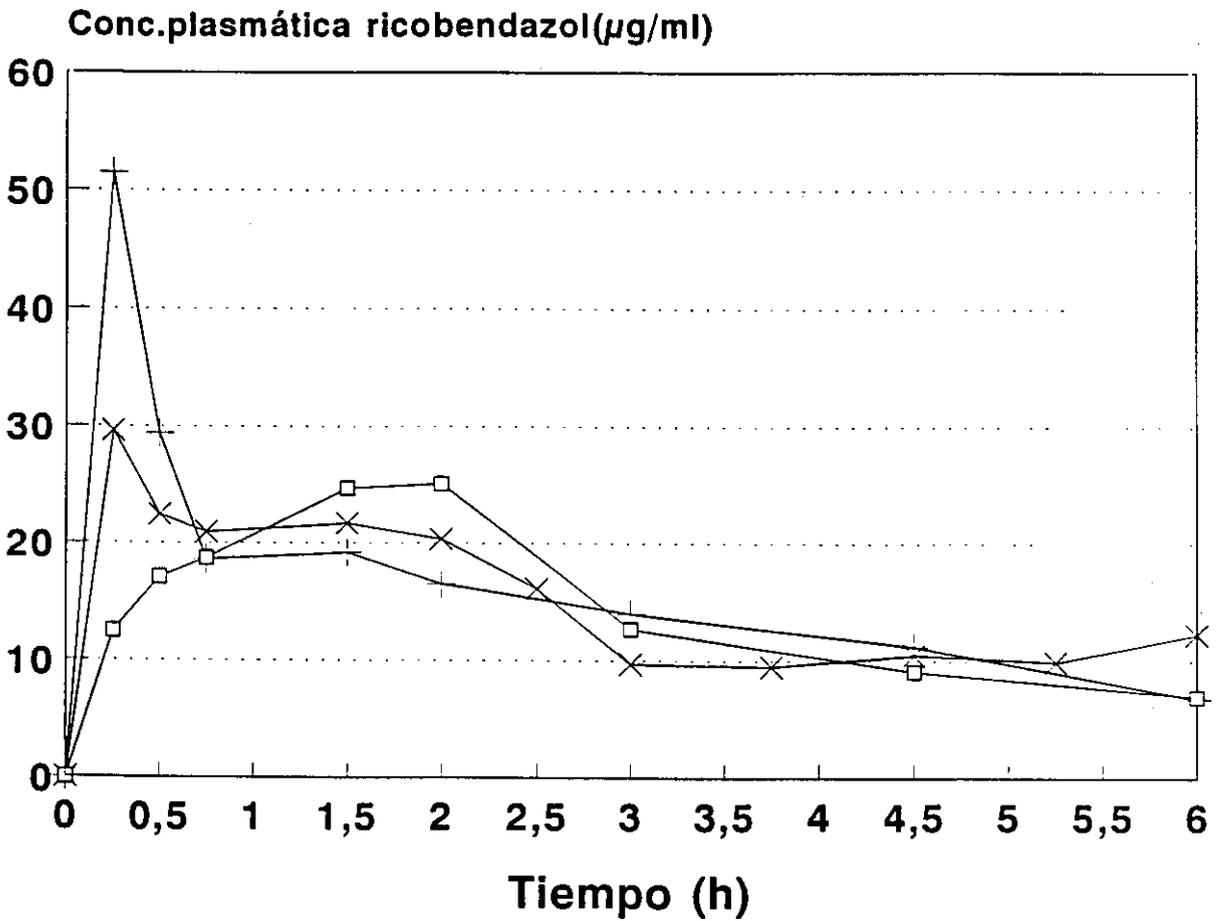


Figura 33. Concentraciones plasmáticas de albendazol sulfóxido ($\mu\text{g/ml}$) vs tiempo (h) tras la administración oral en ratones CD-1 de la formulación FLAP (+), de la dispersión sólida APK1220 (x) y del albendazol patrón (-□-). (Dosis 50 mg/Kg).

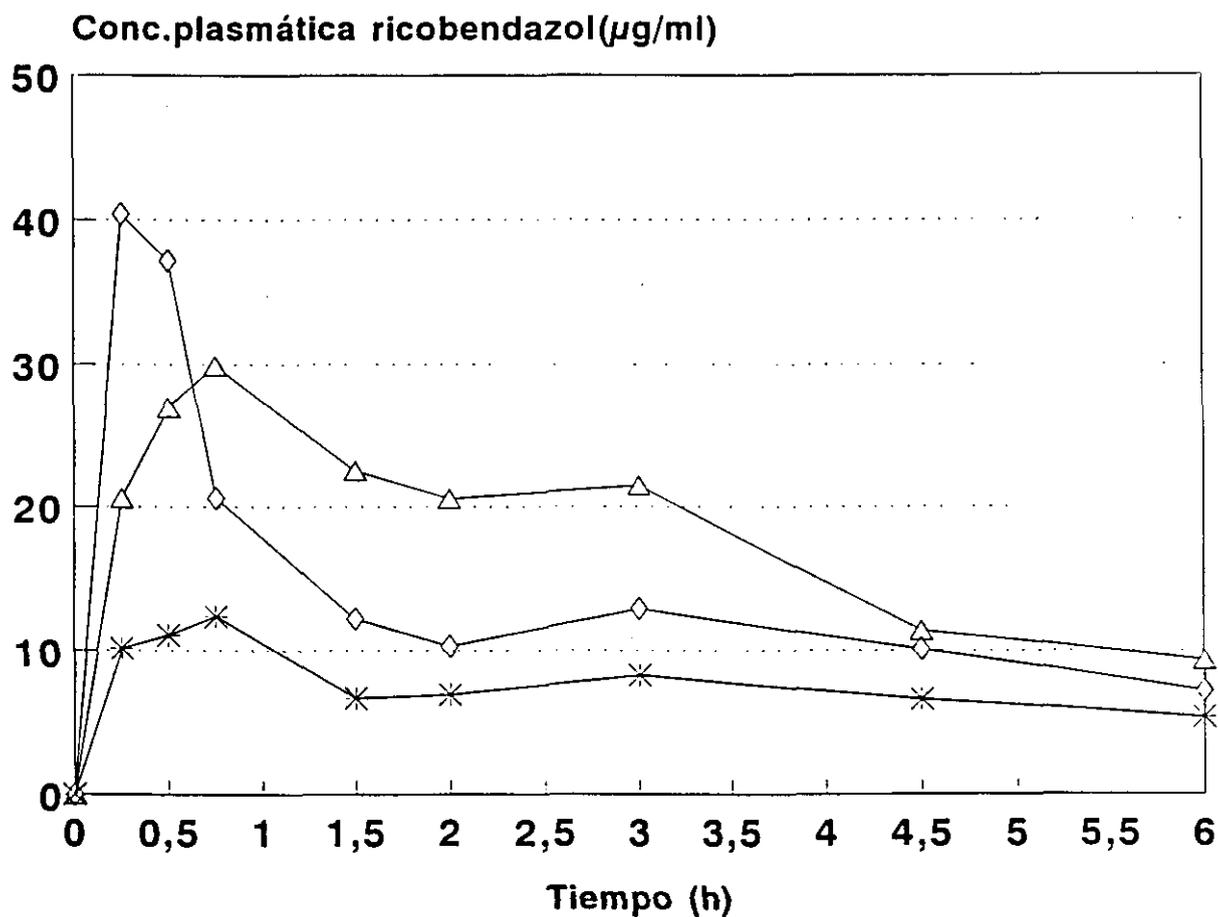


Figura 34. Concentraciones plasmáticas de albendazol sulfóxido ($\mu\text{g/ml}$) vs tiempo (h) tras la administración oral en ratones CD-1 de la formulación FLAG (\diamond), de la dispersión sólida AGK1220 (\triangle) y del albendazol genérico ($*$). (Dosis 50 mg/Kg).

RESULTADOS.

La figura 35 muestra los resultados medios de las seis formulaciones estudiadas. En ninguna de las formulaciones estudiadas fue posible detectar niveles de albendazol en plasma, posiblemente porque el paso a albendazol sulfóxido (metabolito activo) es muy rápido. Este hecho ya a sido comentado en numerosos trabajos anteriores y normalmente la farmacocinética del albendazol se estudia en función del albendazol sulfóxido (Galtier, 1991a y 1991b).

En la tabla 34 se recogen los resultados medios y desviación estándar de los siguientes parámetros biofarmacéuticos y farmacocinéticos: t_{max} , C_{max} y ABC_{0-6h} de las seis formulaciones estudiadas.

| Formulaciones | t_{max} (h) | C_{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | ABC_{0-6h} ($\mu\text{g h}/\text{ml}$) |
|---------------|---------------|---------------------------------------|---|
| Alb. Patrón | 1,83 (0,3) | 26,83 (3,2) | 84,19 (18,6) |
| FLAP | 0,25 (0) | 50,83 (3,2) | 93,15 (25,7) |
| APK1220 | 0,25 (0) | 29,57 (2,7) | 91,33 (11,5) |
| Alb. Genérico | 0,67 (0,2) | 12,8 (0,8) | 45,12 (8,8) |
| FLAG | 0,33 (0,2) | 45,27 (8,1) | 82,21 (14,1) |
| AGK1220 | 0,67 (0,2) | 30,53 (2,0) | 107,08 (13,9) |

Tabla 34. Resultados medios y desviación estándar entre paréntesis de los parámetros farmacocinéticos de las seis formulaciones estudiadas.

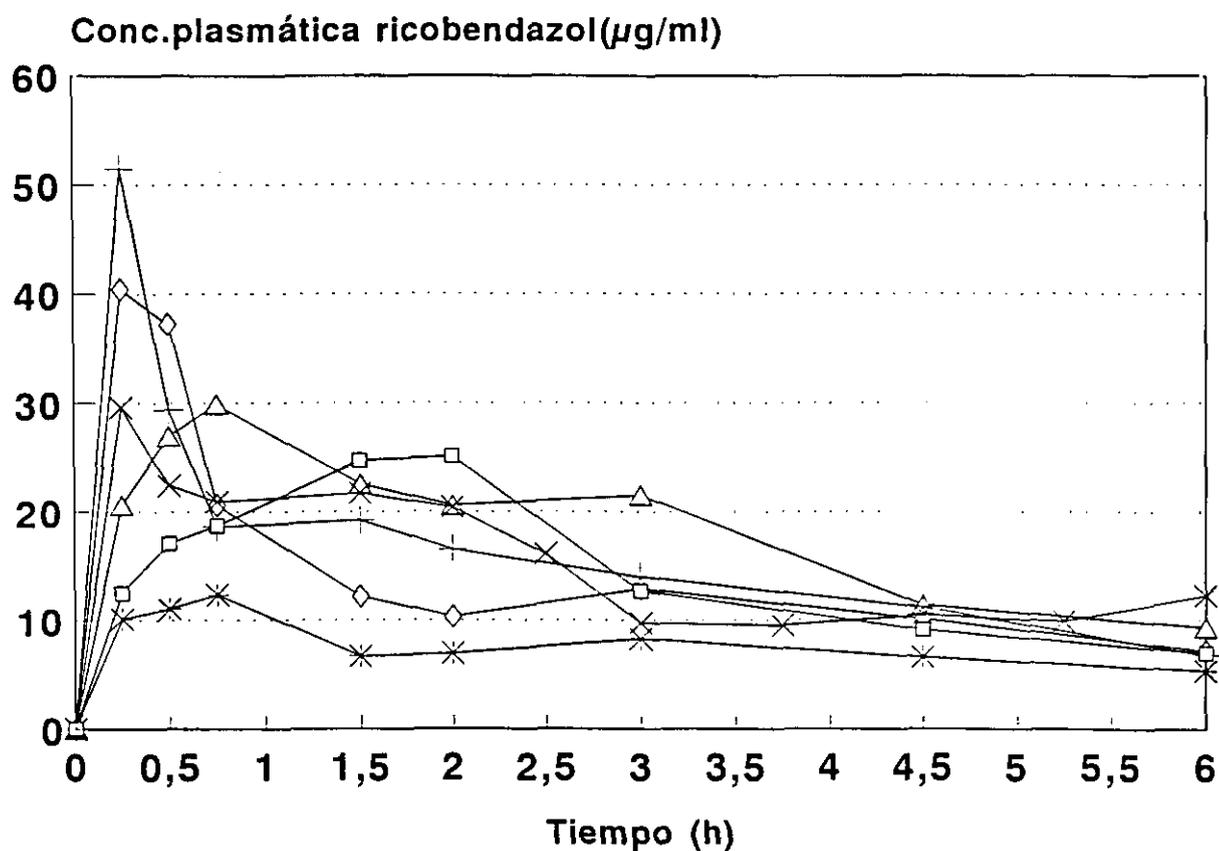


Figura 35. Concentraciones plasmáticas de albendazol sulfóxido ($\mu\text{g/ml}$) vs tiempo (h) tras la administración oral en ratones CD-1 de: Albendazol patrón (-□-), Albendazol genérico (*), Formulación líquida de alb. patrón (+), Dispersión sólida de alb. patrón (×), Formulación líquida de alb. genérico (-◇-) y Dispersión sólida de alb. genérico (-△-). (Dosis 50 mg/Kg).

Las características farmacocinéticas del albendazol varían entre especies animales (Delatour, 1991a y 1991b). Así el t_{max} para el albendazol sulfóxido es de aproximadamente 4 horas en humanos y perros, de 6-8 horas en ratas, 10 horas en ovejas, 20 horas en cabras y hasta 24 horas en terneros. En nuestros experimentos en ratones el t_{max} se alcanza a tiempos relativamente cortos (menores de 2 horas). Esta diferencia con respecto a los datos publicados por otros autores se puede deber a las variaciones propias de especies diferentes, y quizá también al posible efecto del vaciamiento gástrico (Prieto, 1991), ya que en nuestro caso las formulaciones se administran de forma independiente a las comidas. En nuestros experimentos no fue posible determinar con exactitud la constante de eliminación, ya que las concentraciones plasmáticas a tiempos mayores de 6 horas se mantienen estables, posiblemente por un efecto de ciclo enterohepático o quizá debido a fenómenos de redistribución en tejidos. Por esta razón tampoco se pudo determinar la $t_{1/2}$ de eliminación.

A continuación se realizó un análisis de varianza para estudiar las posibles diferencias entre las distintas formulaciones. La tabla 35 recoge los resultados para el análisis de t_{max} , C_{max} y ABC_{0-6h} .

| | I | II | III | IV | V | VI |
|-----|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------|----|
| I | - | - | - | - | - | - |
| II | tmax*** Cmax*** | - | - | - | - | - |
| III | tmax*** | Cmax*** | - | - | - | - |
| IV | tmax*** Cmax*** ABC* | tmax** Cmax*** ABC** | tmax** Cmax*** ABC** | - | - | - |
| V | tmax*** Cmax*** | - | Cmax*** | tmax* Cmax*** ABC* | - | - |
| VI | tmax*** | tmax** Cmax*** | tmax** | Cmax*** ABC*** | tmax* Cmax*** | - |

Tabla 35. Resultado del ANOVA comparando las distintas formulaciones estudiadas. Clave: I.- Albendazol patrón. II.- Formulaci3n l3quida patr3n (FLAP). III.- Dispersi3n s3lida APK1220. IV.- Albendazol gen3rico. V.- Formulaci3n l3quida gen3rico (FLAG) y VI.- Dispersi3n s3lida AGK1220.

Significaci3n: * (p<0,05), ** (p<0,01) y *** (p<0,001)

En las formulaciones de albendazol patr3n (I, II y III) no se apreciaron diferencias significativas (p<0,05) en el ABC_{0-6h}, aunque s3 en el valor de tmax (p<0,001) que aparece antes en las formulaciones l3quidas y en la dispersi3n s3lida. El valor de Cmax es significativamente mayor (p<0,001) para la formulaci3n l3quida que para las formulaciones patr3n y dispersi3n s3lida.

ya que la formulación de albendazol genérico tiene menores valores de ABC ($p < 0,05$) que el resto de formulaciones. En la formulación líquida de albendazol genérico se produce un desplazamiento del t_{max} (que aparece antes) ($p < 0,05$) y un mayor valor de C_{max} ($p < 0,001$) que la formulación de dispersión sólida y albendazol de referencia.

En cualquier caso se observa cierta homogeneidad de comportamiento en cada una de las variantes del protocolo experimental.

Valores de t_{max} más precoces en las formulaciones líquidas con altos valores de C_{max} ; t_{max} tardías y C_{max} bajos cuando se administra albendazol y valores intermedios en dispersiones sólidas. No obstante, y excepto en el albendazol genérico, los valores de biodisponibilidad, expresados como ABC_{0-6h} no difieren de forma tan acusada como lo hacen concentraciones y tiempos máximos.

DISCUSSION FINAL

DISCUSIÓN FINAL.

El factor limitante en la absorción de medicamentos poco solubles es la velocidad de disolución (Pla Delfina, 1982). En todos estos medicamentos cualquier recurso tecnológico de formulación que aumente o mejore la solubilidad puede facilitar la absorción y aumentar la biodisponibilidad.

El albendazol como la mayoría de los bencilimidazoles, es un agente antihelmíntico poco soluble, lo cual dificulta su absorción y acción sistémica. 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 o quistes de carácter sistémico. Por esta razón no es de extrañar que en numerosas ocasiones se hayan realizados trabajos encaminados a aumentar la solubilidad de los bencilimidazoles y su biodisponibilidad. Uno de estos recursos tecnológicos que se pueden emplear para aumentar la solubilidad es el empleo de dispersiones sólidas. Concretamente con el mebendazol, posiblemente el antihelmíntico más utilizado hasta hace unos años, se han realizado dispersiones sólidas utilizando como matriz PEG (Chiba, 1981) y posteriormente en nuestro departamento utilizando PVP (Fernandez, 1988). En ambos casos se aumentó la velocidad de disolución y se comprobó un aumento en la biodisponibilidad de los nuevos preparados.

Otra posible alternativa para facilitar la absorción de

medicamentos poco hidrosolubles es la preparación de formulaciones líquidas utilizando cosolventes y promotores de absorción como se ha descrito anteriormente por Del Estal (Del Estal, 1993).

En la presente memoria se han utilizado ambos recursos tecnológicos para elaborar varias formulaciones de albendazol y se han estudiado las características farmacotécnicas y biofarmacéuticas de estas formulaciones, cuya actividad antiparasitaria ha sido posteriormente evaluada en el departamento de Parasitología de esta facultad.

Los resultados que hasta aquí se han expuesto abarcan:

- 1). La caracterización física y química del albendazol utilizado como materia prima.
- 2). Elaboración de dispersiones sólidas y formulaciones líquidas de albendazol.
- 3). Evaluación de las características físicas, químicas y farmacotécnicas de las formulaciones desarrolladas.
- 4). Estudios "in vivo" de actividad antiparasitaria y características biofarmacéuticas y farmacocinéticas de las formulaciones ensayadas.

Para relacionar y comentar los distintos resultados obtenidos hemos dividido la discusión final en los siguientes apartados:

1. Albendazol como materia prima.
2. Dispersiones sólidas de albendazol.
3. Formulaciones líquidas de albendazol.

1. ALBENDAZOL COMO MATERIA PRIMA.

A lo largo de este trabajo se han utilizado distintos lotes de albendazol facilitados por dos proveedores. Uno de ellos es el designado "patrón" cedido por SmithKline Beecham Pharmaceuticals, firma que ostenta la patente, y el segundo que hemos llamado genérico, facilitado por otra firma comercial.

Del estudio analítico comparado de ambos albendazoles por HPLC (ver figura 36) se comprobó que, aunque ambos coinciden en el tiempo de retención del pico mayoritario, el genérico tiene menor potencia, así como restos de un posible producto de degradación o impureza (quizá consecuencia del proceso de síntesis) lo que también se manifestó en el análisis por DSC, ya que aunque se mantiene la temperatura de fusión del albendazol, el termograma muestra algunas pequeñas diferencias entre ambos tipos de albendazol (ver figura 37).

El estudio de difracción de RX muestra una menor cristalinidad del albendazol genérico en comparación con el patrón como se observa en la figura 38, en la que se señalan con una flecha las diferencias más importantes.

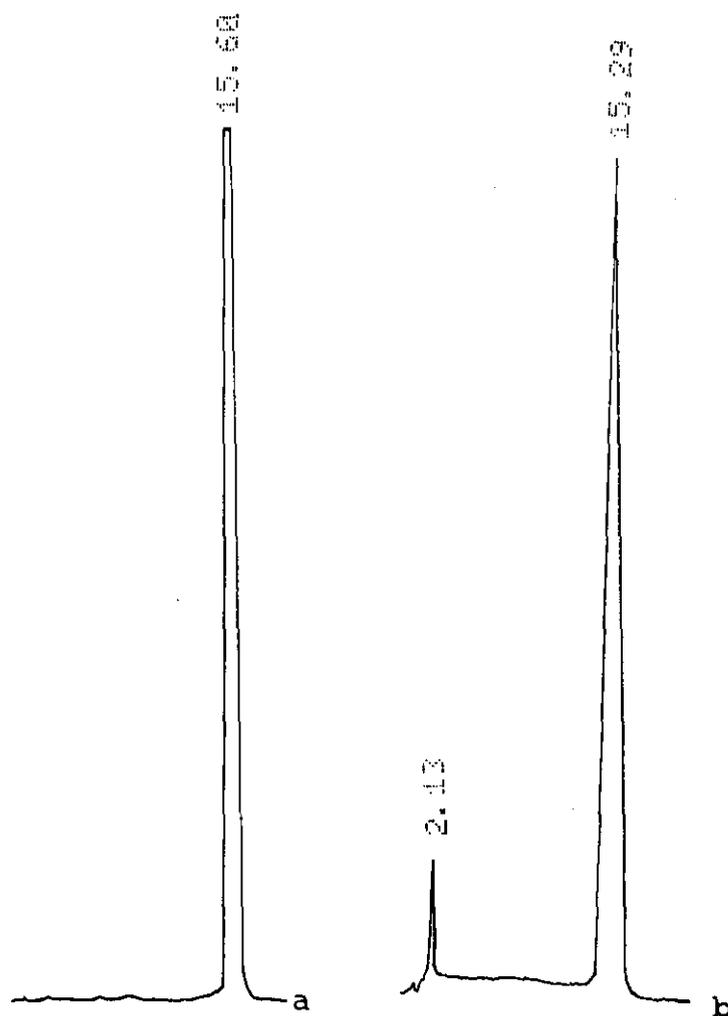


Figura 36. Cromatografía por HPLC del albendazol patrón (a) y del genérico (b).



Figura 37. Barrido calorimétrico diferencial del albendazol patrón (a) y del genérico (b).

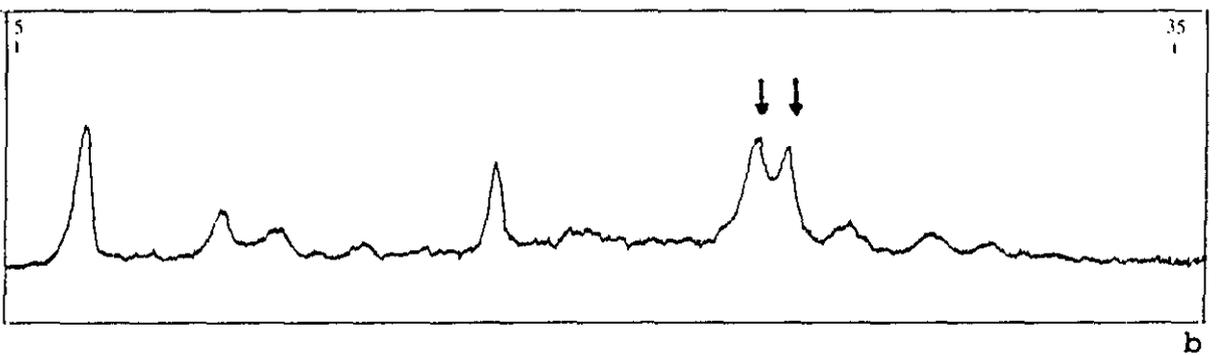
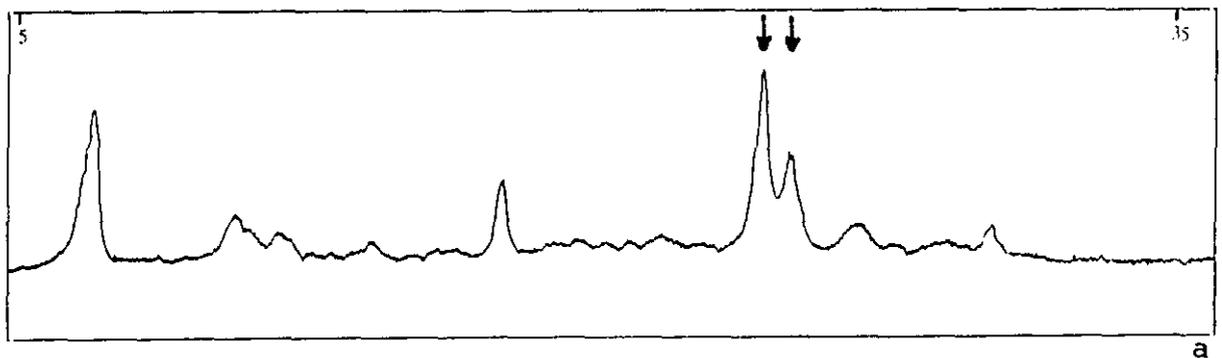


Figura 38. Difractograma de RX del albendazol patrón (a) y del genérico (b).

A la vista de los resultados comentados no es de estrañar que existan diferencias en la actividad "in vivo" de ambos tipos de albendazol.

Cuando se estudia el comportamiento biofarmacéutico de ambos albendazoles en el ratón como se muestra en la figura 32, aparecen diferencias significativas ($p < 0,05$) en los valores de t_{max} , C_{max} y ABC (ver tabla 35). Esto podría explicar las distintas actividades antiparasitarias obtenidas con ambos tipos de albendazol (ver tablas 25-27). El albendazol patrón es más potente y activo que el albendazol genérico lo que coincide con sus mejores características biofarmacéuticas.

Al trabajar con otras muestras del albendazol "genérico", de distinto lote, se modificaron sus características y se obtuvieron resultados más concordantes con los obtenidos por el albendazol patrón.

Se intentó estudiar si las diferencias entre el primer lote de albendazol genérico y el patrón se debían a una posible degradación del albendazol quizá por un deficiente almacenamiento. Para ello se hicieron estudios de inestabilidad acelerada en muestras de albendazol patrón, pero no se observaron los cambios que aparecieron en los termogramas y difractogramas del primer lote de albendazol genérico. Por todo ello pensamos que el defecto del primer lote posiblemente sea debido más a un problema de síntesis, corregido en los lotes sucesivos, que de

malas condiciones de conservación del mismo.

En cualquier caso y como es lógico es importante tipificar perfectamente el albendazol que se utiliza como materia prima, ya que, como se ha demostrado, existen importantes diferencias entre lotes y suministradores; de hecho, y debido a las diferentes características de biodisponibilidad entre los albendazoles utilizados, no deberíamos llamarlos "genérico" y patrón, puesto que si tienen diferentes características de biodisponibilidad y actividad rigurosamente hablando no es bioequivalente y no es genérico aunque se haya utilizado como tal.

2. DISPERSIONES SÓLIDAS DE ALBENDAZOL.

Entre los distintos productos que se pueden emplear como matrices para la elaboración de dispersiones sólidas nosotros hemos elegido las de PVP. Se sabe desde hace tiempo que la PVP puede retrasar o inhibir los procesos de cristalización de muchos medicamentos, lo que suele dar lugar a mejoras en la disolución (Sekikawa, 1978). Así pues, la razón por la que las dispersiones sólidas de PVP pueden mejorar la solubilidad se debe a que durante la solidificación de la DS en el proceso de formación de la misma. La PVP, si se encuentra en una proporción suficiente en relación al principio activo, no le deja cristalizar y se obtiene así una forma amorfa del mismo más soluble y con mejor biodisponibilidad.

La cristalinidad de la DS obtenida se suele estudiar por difracción de RX y mediante barrido calorimétrico diferencial (Chemtob, 1989) y (Zingone, 1992).

La figura 39 nos muestra los resultados de difracción de RX y la figura 29 los del barrido calorimétrico diferencial. Por ambos métodos se obtienen resultados concordantes ya que se observan unos cambios importantes y las dispersiones sólidas obtenidas presentan una estructura amorfa como ya ha sido descrita para las DS de PVP con otros principios activos como teofilina (Zingone, 1992), varios antiinflamatorios no esteroídicos (Ramadan, 1987), y nitrato de miconazol (Jafari, 1988).

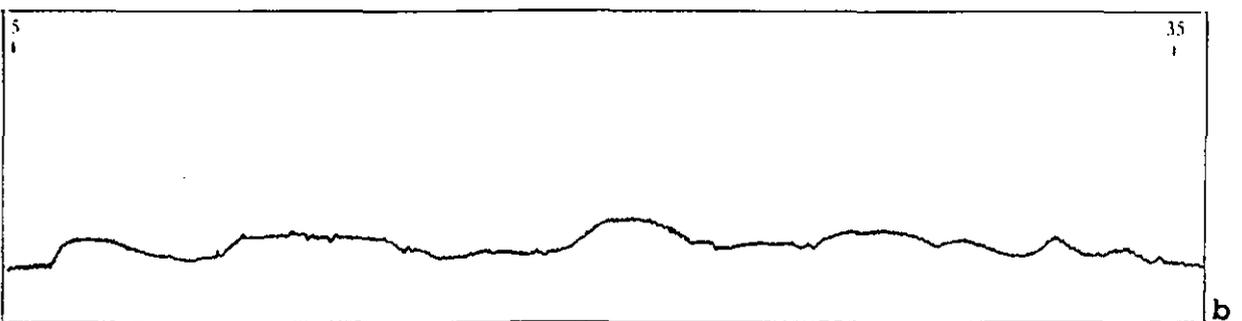
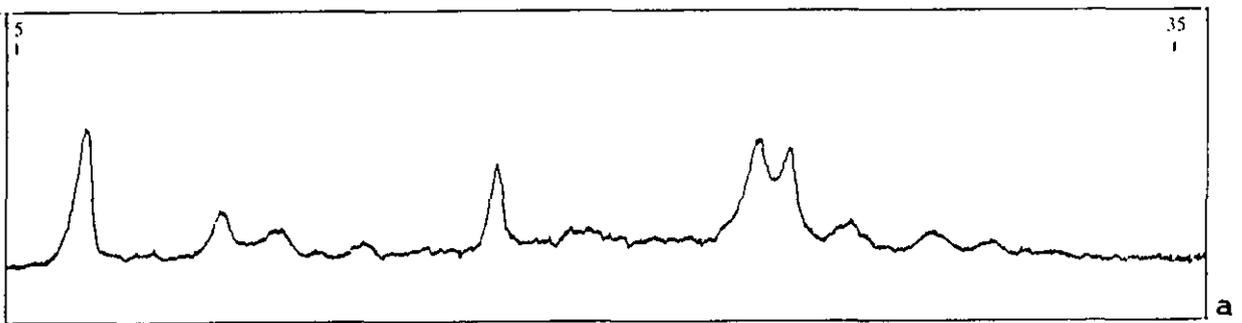


Figura 39. Difractograma del albendazol genérico (a) y de la dispersión sólida AGK1220 (b).

La característica farmacotécnica más interesante en este tipo de medicamentos poco solubles es el posible aumento en el coeficiente de solubilidad y en su velocidad de disolución. La formulación de albendazol en forma de dispersión sólida mejora notablemente la solubilidad del mismo, tanto en magnitud (más de tres veces) como en velocidad de disolución (figuras 25 y 26).

Existen varios factores que pueden afectar a la velocidad de cesión y disolución en DS pero quizá la más importante es la relación excipiente: principio activo (Gines Dorado, 1993). En el caso concreto de la PVP, pequeñas proporciones de PVP no sólo no mejoran la velocidad de disolución sino que la retrasan, quizá como consecuencia de la acción aglutinante del PVP (Calanchi, 1987), mientras que en proporciones mayores del 75% impide la cristalización (Chemtob, 1989) y mejora la disolución (Pedarsen, 1990), (Calanchi, 1987) (Aboulateb, 1988), este efecto se ha observado incluso en proporciones de aproximadamente 50%, aunque no conviene utilizar proporciones mucho mayores porque se obtiene el efecto contrario anteriormente comentado (Vojnovic, 1993) (Corrigan, 1975). En nuestro caso hemos utilizado proporciones muy elevadas (mayores del 90%) con las que se obtuvieron unas velocidades de disolución extremadamente rápidas (ver figuras 25 y 26).

Otro factor que puede influir en la velocidad de disolución es el tipo de PVP utilizado, generalmente a menor PM del polímero (PVP) mejora la disolución. Esto que también se ha visto con

otros polímeros como etilcelulosa (Yuasa, 1993), puede ser debido a que se retrase más la cristalización del medicamento incorporado en la matriz lo que aumenta su solubilidad (Simonelli, 1970); otra posible explicación es que al disminuir el PM disminuye la viscosidad y se facilita la disolución (Chemtob, 1989). Este efecto se ha comprobado en la elaboración de DS con PVP y tiouracilo (Aboutaleb, 1988) aunque también se ha descrito el caso opuesto. Así en complejos con indometacina al aumentar el PM se retrasa la velocidad de disolución (Takayama, 1980). En nuestro caso se estudió el efecto del PM de PVP, utilizando PVP K12, K17 y K25. Los resultados se muestran en la figura 25 y se puede apreciar que al aumentar el PM de PVP empeora la disolución como ha sido descrito por Aboutaleb (Aboutaleb, 1988).

Quizá el principal inconveniente de las dispersiones sólidas sea su mala estabilidad física que se debe a la higroscopicidad de la PVP (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 1986). Al captar humedad se producen reacciones de cristalización y se pierde la estructura amorfa inicial alterándose la solubilidad y las características biofarmacéuticas, ya que se forman cristales termodinámicamente más estables que las formas amorfas pero menos solubles y con peor biodisponibilidad (Sugimoto, 1980). Por esta razón se aconseja conservar las dispersiones sólidas protegidas de la humedad, evitando humedades relativas superiores al 65% (Chemtob, 1989). En nuestros estudios de captación de humedad mostrados en la tabla 18, al utilizar

humedades relativas superiores al 50% aparecieron signos visibles de cristalización y problemas de disolución lo que coincide con los datos comentados por otros autores (Chemtob, 1989).

La actividad antiparasitaria de la dispersión sólida AGK1220 es superior a la de la formulación de albendazol genérico, pero inferior a la de albendazol patrón en las tres fases de localización del parásito estudiada (tablas 25-27 y figura 31).

Las características biofarmacéuticas de las dispersiones sólidas de albendazol patrón y genérico, así como las de sus formulaciones se muestran en las figuras 33 y 34.

Como ya se ha comentado anteriormente las características biofarmacéuticas y farmacocinéticas son distintas dependiendo del tipo de albendazol. En el albendazol genérico las dispersiones sólidas aumentan la biodisponibilidad calculada en función del ABC_{0-6h} que aumenta significativamente ($p < 0,001$) en un 237,3%, así como el C_{max} que también aumenta ($p < 0,001$) en un 238,5%. Sin embargo, el t_{max} no varía ($p < 0,05$). Estos efectos no se observan (no son tan claros) con el albendazol patrón, muy posiblemente porque el albendazol patrón ya tiene "por sí" unas características biofarmacéuticas buenas en comparación con el genérico (ver figura 33) y la única diferencia se produce en el t_{max} que en la dispersión sólida aparece antes que en el albendazol ($p < 0,001$).

3. FORMULACIONES LÍQUIDAS DE ALBENDAZOL.

Además de preparar dispersiones sólidas decidimos elaborar formulaciones líquidas de albendazol, en las cuales la disolución ya no debería ser el factor limitante de la absorción oral. Con este fin se estudia el efecto de distintos factores en la solubilidad:

- pH
- Cosolventes
- Tensoactivos

La solubilidad del albendazol depende de pH y, como cabía esperar de su estructura química (son aminas terciarias), se comporta como base y por lo tanto a pH ácido predomina la forma polar que es la forma más soluble (Florence, 1988). De ahí la mayor solubilidad del albendazol a pH 1,2 que a pH menos ácido o neutro, como se muestra en la tabla 11 la curva de la solubilidad-pH pasa por un mínimo en las inmediaciones del punto neutro. Por esta razón se decidió estudiar el efecto de tensoactivos en solución tampón a pH ácido, así como la mezcla de cosolventes en dicho tampón.

En cuanto al empleo de cosolventes y tensoactivos, los resultados se muestran en la tabla 12. La figura 40 resume los valores de coeficiente de solubilidad obtenidos con la utilización de distintos recursos tecnológicos. De todos ellos

elegimos el empleo de dietilenoglicol monoetil eter (Transcutol) por ser con el que obtenemos mayor aumento del coeficiente de solubilidad. Quizá el mayor inconveniente son las malas características de estabilidad química ya que a temperatura ambiente el t_{90} es de 10,4 días.

Cuando se estudian las características biofarmacéuticas y farmacocinéticas en ratones obtenemos unos resultados que se muestran en las figuras 33 y 34. Tanto con un tipo de albendazol como con el otro, las formulaciones líquidas tienen distintos perfiles de las curvas concentración plasmática frente al tiempo. En el caso del albendazol genérico con la formulación líquida en comparación con el albendazol genérico y la dispersión sólida se produce antes el C_{max} ($p < 0,05$) ya que se absorbe antes el albendazol y se obtiene un mayor valor de C_{max} en comparación con el albendazol genérico. Es habitual que a un t_{max} más precoz corresponda un C_{max} más alto. Además se alcanzan mayores valores de ABC_{0-6h} ($p < 0,05$). Estas modificaciones pueden ser debidas a la naturaleza líquida de la formulación o a un posible efecto promotor de absorción que ya ha sido descrito en la administración transdérmica de formulaciones conteniendo Transcutol (Bovina, 1993), (Bialik, 1993) y (Sheaya, 1992). En las formulaciones de albendazol patrón las diferencias más importantes son con respecto a los valores de C_{max} que es significativamente mayor ($p < 0,001$) que en dispersiones sólidas y albendazol. Un hecho a comentar es que se observó una alteración de la actividad muscular (rigidez) después de la

administración oral de dosis elevadas de la formulación líquida. Este efecto es transitorio y ya se ha descrito en la monografía de toxicidad del transcuto1 (Gattefossé, 1985).

Estas formulaciones líquidas parecen especialmente útiles para el tratamiento de infecciones de *T. spiralis* en fases migratoria o en quistes (tablas 25-27 y figura 31). Esta mayor actividad antiparasitaria de las formulaciones líquidas puede estar relacionada con las características biofarmacéuticas y farmacocinéticas anteriormente comentadas, y en la actualidad se sigue estudiando, en colaboración con el Dpto. de Parasitología de esta Facultad, su utilidad frente a otros parásitos, así como la mejora de la actividad antiparasitaria del albendazol mediante la incorporación de otros promotores de absorción, o también sustancias que pueden inhibir su metabolismo (lo que aumentaría su eficacia).

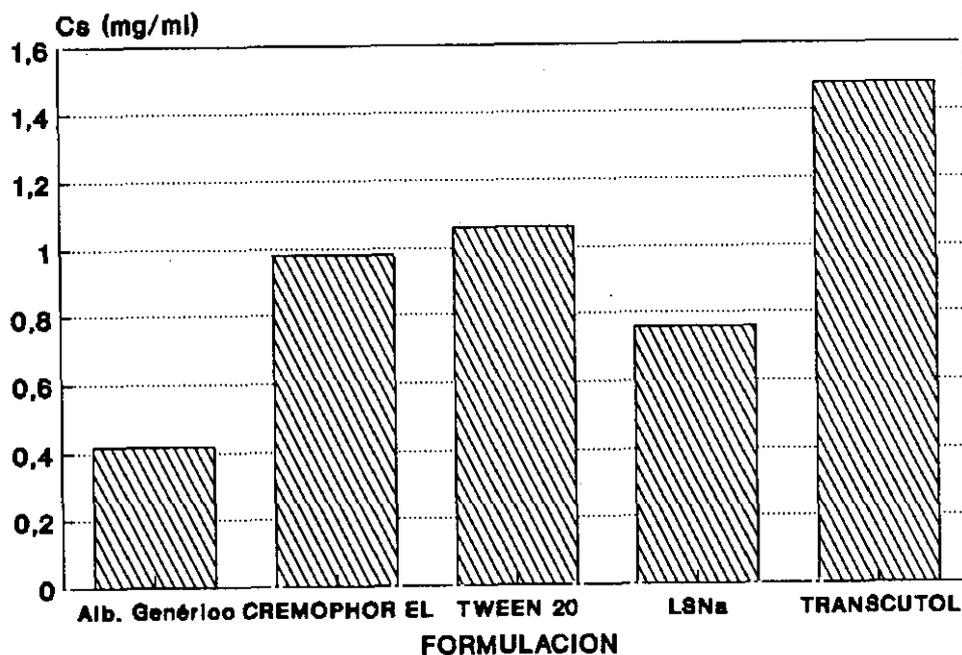
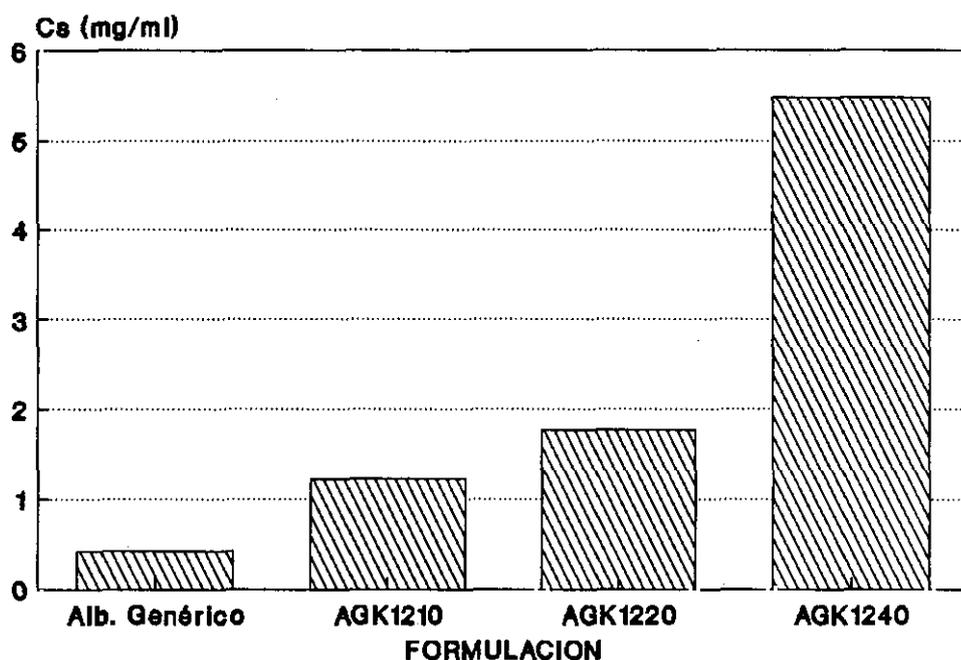


Figura 40. Coeficiente de solubilidad (mg/ml) del albendazol genérico, las dispersiones sólidas: AGK1210, AGK1220 y AGK1240, en solución tampón pH 1,2 y del albendazol genérico en soluciones tampón pH 1,2 junto con los cosolventes o tensoactivos: Cremophor EL, Tween 20, Laurilsulfato sódico y Transcutol.

○

CONCLUSIONES

- 1º Se ponen a punto distintas técnicas analíticas para evaluar las características del albendazol utilizado como materia prima y en las distintas formulaciones galénicas elaboradas. Mediante estudios de validación se comprueba que las técnicas utilizadas son correctas.

- 2º Existen diferencias fisico-químicas importantes en las características del albendazol utilizado como materia prima. Estas variaciones se producen dependiendo del suministrador y del lote y afectan al comportamiento biológico: características biofarmacéuticas, farmacocinéticas y eficacia antiparasitaria que pueden disminuir hasta aproximadamente la mitad. Por esta razón es necesario tipificar perfectamente el albendazol antes de su empleo.

- 3º Se elaboran dispersiones sólidas de albendazol con PVP aumentando de esta manera la solubilidad (en más de tres veces) y la velocidad de disolución. Este aumento en las características de solubilidad parece deberse, según los resultados de difracción de rayos X y los análisis térmicos diferenciales, a una modificación en la estructura del albendazol, que pasa de encontrarse en la materia prima en forma cristalina a una forma amorfa en la dispersión sólida. Las mejoras en la solubilidad dependen del tipo de PVP utilizado y de la relación albendazol:PVP. A menor peso molecular y menor relación albendazol:PVP mayor

solubilidad. En nuestras condiciones de trabajo se obtuvieron, utilizando PVP de bajo peso molecular (3000 daltons) y con una relación albendazol:PVP de 1:40, incrementos en la solubilidad de más de 1200% y también la velocidad de disolución. El principal inconveniente de nuestras dispersiones sólidas es su mala estabilidad física que limita la duración de uso a tres meses.

4º Se estudia la solubilidad del albendazol en distintas soluciones tampón y en presencia de cosolventes y tensoactivos. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando soluciones tampón pH ácido y mezclas de la misma con Transcutol. De esta manera se logró aumentar la solubilidad más de 20 veces y así elaborar la formulación líquida de albendazol. Como consecuencia del estudio de estabilidad química de esta formulación se recomienda la conservación en nevera y su uso antes de transcurrido un mes de su preparación.

5º En colaboración con el Dpto. de Parasitología de esta Facultad, se evalúa la actividad antiparasitaria (frente a *T. spiralis*) de las formulaciones líquida y dispersión sólida seleccionadas y se llega a la conclusión de que la eficacia depende de la fase en que se encuentra el parásito. Cuando el parásito se encuentra en fase intestinal, la formulación más eficaz es el albendazol patrón; mientras que en fases de larvas emigrantes, o

incluso enquistadas, la formulación más eficaz es la líquida, que puede llegar en algún caso a tener valores de reducción de parásitos cercanos al 100%.

- 6º Esta actividad antiparasitaria se puede relacionar con las características biofarmacéuticas y farmacocinéticas. Las dispersiones sólidas y formulaciones líquidas aumentan la biodisponibilidad, del albendazol genérico medida como ABC, y tienden a absorberse más rápidamente, y por lo tanto aparece antes el t_{max} , y se obtiene un C_{max} más alto. Esto es especialmente importante con las formulaciones líquidas en las que parece existir un efecto promotor de absorción. Estas mejores características de absorción pueden explicar la eficacia antiparasitaria de las formulaciones líquidas en infecciones sistémicas de *T. spiralis*.

BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Rahman, S.I., El-Sayed, A.M., Aboutaleb, A.E.; Bull. Pharm. Sci., 11, (2), 261-272, 1989.

Agrawal, R.L., Jain, S.K., Gupta, S.C. y col.; Indian J. Chest. Dis. Allied Sci., 35, (2), 93-6, 1993.

Ali, D.N. y Chick, B.F.; International Journal of Parasitology, 22, (4), 541-543, 1992.

Allen, L.U., Yanchik, U.A. y Maness, D.D.; J. Pharm. Sci., 66, 494-496, 1977.

Amri, H. y col.; Xenobiotica, 17, 1159-1168, 1987.

Amri, H., Mothe, H., Totis, M., Masson, C., Batt, A.M., Delatour, P. y Siest, G.; Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics. 246, 758-764, 1988.

Attia, M.A., Aboutaleb, A.E. y Habib, F.S.; Pharmazie, 37, (4), 274-277, 1982.

Babar, A. y Jarowski, C.I.; J. Pharm. Sci., 72, 708-710, 1983.

Badawan, A.A., Abu-Malooch A y col.; Eur. J. Pharm. Biopharm. 37, (3), 166-179, 1991.

Badawi, A.A., El-Sayed, A.A.; J. Pharm. Sci., 69, (5), 492-497, 1980.

Barger, I.A., Steel, J.W. y Rodden, B.R.; Australian Veterinary Journal, 70, (2), 1993.

Barker, A.C. y Foster, R.G.; German patent 2246605, 1973.

Barry, M. y Kaldjian, L.C.; Semin. Neurol., 13, (2), 131-143, 1993.

Basf. "Kollidon. Polyvinylpyrrolidone for the pharmaceutical industry." A Ktiengesellschaft. Feinchemie, Ludwigshafen, Germany, 1992.

Bauer, T.M., Bruhwiler, J., Aschwanden, M. y col.; Dtsch. Med. Wochenschr., 119, (6), 175-179, 1994.

Benoit, E., Besse, S. y Delatour, P.; Am. J. of Vet. Reseach. 53, (9), 1992.

Bochis, R.J. y col.; J. Med. Chem. 24, 1518-1521, 1981.

Bogan, A.J. y Marriner, S.E.; J. Pharm. Sci., 69, 422-433, 1980.

Bogdanova, S., Gentcheva, P., Shekedriiski, R. y col.; Labo Pharma Prob. Tech., 32, 835-837, 1984.

Bondiau, P.Y., Peyrade, F., Birswitle, I. y col.; Presse. Med., 22, (29), 1367, 1993.

Borgers, M. y De Nollin, S.; J. Parasitol. 60, 110-112, 1975.

Botero, D., Uribe, C.S., Sanchez, J.L. y col.; Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 87, (5), 576-7, 1993.

Botero, D., Tanowitz, H.B., Weiss, L.M. y Wittner, M.; Infect. Dis. Clin. North. Am., 7, (3), 683-97, 1993.

British Pramacopoeia. Her Majesty's Stationery Office. London, 1988.

Camaroni, R., Gamberini, G., Bernabei, M.T. y Facchini, M.; Il Pharmaco Ed. Practica, 28, 621-635, 1973.

Campbell, W.C. ; Parasitology Today, 6, (4), 130-133, 1990.

Caumes, E. y Gentilini, M.; Ann. Dermatol. Venereol., 120, (8), 571-573, 1993.

Caumes, E., Carriere, J., Datry, A. y col.; Am. J. Trop. Med. Hyg., 49, (5), 641-4, 1993.

Chemtob, C.; S.T.P. Pharma, 1, 531-538, 1985.

Chemtob, C.; S.T.P. Pharma, 5 (6/7) 474-480, 1989.

Chiba, Y., Kohri, N., Iseki, K. y col.; Chem. Pharm. Bull, 39, (8), 2158-2160, 1991.

Chiou, W.L. y Riegelman, S.; J. Pharm. Sci., 58, 1505-1509, 1969.

Chiou, W. L. y Riegelman, S.; J. Pharm. Sci., 59, 937-942, 1970.

Chiou W.L. y Smith, L. D.; J. Pharm. Sci., 60, 125-127, 1971a.

Chiou, W.L. y Riegelman, S.; J. Pharm. Sci., 60, 1281-1302, 1971b.

Chiou, W.L. y Niazi, S.; J. Pharm. Sci., 62, 498-501, 1973.

Chowndary, K.P.R. Murrty, A.; Indian J. Hosp. Pharm. 26 (Mayo-Junio),. 93-5, 1989.

Chotmongkol, V.; Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, 24, (2), 396-8, 1993.

Chu, P.S., Wang, R.Y., Brandt, T.A. y col.; J. Chromatogr. Biomed. Appl., 620, (1), 129-135, 1993.

Cook, C.G.; Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 80, 675-685, 1986.

Cook, G.C.; J. Infect., 26, (3), 333, 1993.

Cook, C.G.; Crr. Opinion Gastroent., 5, 126-139, 1989.

Cook, G.C.; Parasitology Today, 6, (4), 133-136, 1990.

Corrigan, O.I. y Timoney, R.F.; J. Pharm. Pharmacol., 26, 838-839, 1974.

Corrigan, O.I., Timoney, R.F. y Whelan, M.J.; J. Pharm. Pharmacol., 28, 703-706, 1976.

Corrigan, O.I., Sabra, K. y Holoham, E.M.; Drug Develop. Ind. Pharm., 9, 1-20, 1983.

Colaud, J.P y Rossignol, J.F.; Acta Trop. 41, 87-90, 1984.

Cross, J.H. y Basaca-Sevilla, V.; *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 18, 507-510, 1987.

Curry, A., Canning, E.U.; *J. Infect.*, 27, (3), 229-236, 1993.

Daabis, N.A. y Mortada, L.M.; *Sci. Pharm.*, 48, (1), 16-23, 1980.

Dawson, P.J. y col.; *Mol. Biochem. Parasitol* 7, 267-279, 1983.

Delatour, P., Cure, M.C., Benoit, E. y Garnier, F.; *Vet. Pharmacol. Ther.*, 9, 230-234, 1986a.

Delatour, P. y Parish, R. "Drug Residues in Animals."; Rico, A.G. Eds., Academic Press, 175-204, 1986b.

Delatour, P., Benoit, E., Lechenet, J y Besse, S. ; *Research in Veterinary Science*, 48, 271-275, 1990a.

Delatour, P., Benoit, E., Garnier, F. y Besse, S.; *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 13, 361-366, 1990b.

Delatour, P., Benoit, E., Caude, M y Tambute, A. ; *Chirality*, 2, 156-160, 1990c.

Delatour, P., Benoit, E., Besse, S. y Boukraa, A.; *Xenobiotica*, 21, (2), 217-221, 1991a.

Delatour, P., Garnier, F., Benoit, E. y Caude, I.; *Research in Vet. Sci.*, 50, 134-138, 1991b.

Delatour, P., Benoit, E., Lechenet, J. y Besse, S. ; *Research in Veterinary Science*, 48, 271-275, 1990c.

Del-Brutto, O.H., Sotelo, J. y Roman, G.C.; *Clin. Infect. Dis.*, 17, (4), 730-5, 1993.

Del-Estal, J.L., Alvarez, A.I., Villaverde, C. y col; *J. Pharm and Biomedical Analysis*, 9, (10-12), 1161-1164, 1991.

Del-Estal, J.L., Alvarez, A.I., Villaverde, C. y col.; *Int. J. Pharm.*, 91, (2-3), 105-109, 1993.

Deshpande, A.V. y Agrawal, D.K.; *Drug Develop. Ind. Pharm.*, 8, 883-896, 1982.

Deshpande, A.V. y Agrawal D.K.; *Parmazie*, 38, 539-541, 1983.

Dharnidharka, V.R.; *J. R. Soc. Health* 113, (1), 51, 1993.

Dieterich, D.T., Lew, E.A., Kotler, D.P. y col.; *J. infect.*

Dis., 169, (1), 178-83, 1994.

Doherty, C. y York, P.; J. Pharm. Sci., 76 (9), 731-737, 1987.

Draguet-Brughmans M., Azabi, M. y Bouche, R.; J. Pham. Belg, 34, 267-271, 1979.

Du, J. y Vasavada, R. C.; Drug Dev. Ind. Pharm., 19 (8), 903-914, 1993.

Edwic, B., Radulovic, S., Stankovic, N. y col.; Arch. Gastroenterohepatology 12, (1-2), 27-32, 1993.

El Dalsh, S.S., EL Sayed, A.A., Badair, A.A. y Fouli, A. ; Pharmazie, 37, 606-607, 1982.

El Gamal, S., Borie, N. y Hammouda, Y.; Pharm. Ind., 40, 1373-1376, 1978.

El Gindy, N.A., Shalaby, A.A. y Abd El-Khalek, M.M.; Drug Develop. Ind. Pharm., 9, 363-376, 1983.

El Mufti, M., Kamag, A., Ibraim, H. y col.; Ann. Trop. Med. Parasitol., 87, (3), 241-6, 1993.

Farmacopea Europea. Ministerio de Sanidad y Consumo, 1988.

Fernandez, C.; Tesis Doctoral Dep. Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Univ. Complutense de Madrid, 1988.

Fernandez, M., Rodriguez, I.C., Margarit, M.U. y col.; Int. J. Pharm., 84, 197-202, 1992.

Fernandez, M., Margarit, M.U., Rodriguez, I.C. y col; Int. J. Pharm., 98, 29-35, 1993.

Flego, C., Lovrecich, M. y Rubessa, F.; Drug Dev. Ind. Pharm., 14, 1185-1220, 1988.

Florence, A.D. y Attwood, D. "Physicochemical Principles of Pharmacy." Segunda Ed. MacMillan Press Limited, 26-27, London, 1988.

Ford, J. y Rubinstein, M.H.; J. Pharm. Pharmacol., 29, 688-694, 1977.

Ford, J.L.; Troisième congrès international de technologie pharmaceutique vol. V, Paris, 1983.

Ford, J.L.; Timmins, P.; "Thermal Analysis, Techniques and applications." Ellis Horwood Limited, England, 1989.

Fourestié V y col.; Parasitol. Res., 75, 36-41, 1988.

Fran, P.C. y col.; Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health., 17, 82-90, 1986.

Franquesa,

Francés, C., Veiga, M.D., Español, O.M. y Cadórniga, R.; Int. J. Pharm., 77, 193-198, 1991.

Friedman, P.A. y Plazer, E.G.; Biochim Biophys Acta, 630, 271-278, 1980.

Fujii, M., Hioki, M., Nishi, M. y col.; Chem. Pharm. Bull., 41, (7), 1275-1278, 1993.

Gattefossé S.A. Dossier Toxicologique, Informe 502214, Feb. 1985.

Geneidi, A.S. y Hamacher, R.H.; Pharm. Ind, 42, 401-404, 1980.

Gerra, L.G., Cuetter, A.C.; Am. fam. Phys., 48, (7), 1223, 1993.

Gil-Grande, L.A., Rodriguez-Caabeiro, F. y Prieto, J.G.; Lancet, 342 (8882), 1269-72, 1993.

Giron, D.; Acta Pharm. Jugosl., 40, 90-157, 1990.

Gottschall, D.W., Theodorides, V.J. y Wang, R.; *Parasitology Today*, 6, (4), 115-124, 1990.

Graf, E., Beyer, C y Abdallah, O.; *Acta Pharm. Technol.*, 28, 131-135, 1982.

Graf, E., Beyer, C. y Abdallah, O.; *Acta Phram. Technol.*, 28, 225-230, 1982.

Gu, S.J., Gao, W.W., Quiao, P.X., Wang, A.G. y Quiang, Z.Y.; *Yaoxvue Xuebao*, 24, (11), 859-64, 1989.

Gupta, R.L., Kumar, R., Singla, A.K.; *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 17, (3), 463-468, 1991.

Gyurik, R.J. y col.; *Drug Metab. Dispos.*, 9, 503-508, 1981.

Gyurik, R.J. "Drug Delivery Devices." Tyle, P. Ed., Marcel Dekker, 549-561, 1988.

Haque, A., Hollister, W.S. y Willcox, A.; *J. Invertebr. Phatol.*, 62, (2), 171-7, 1993.

Hennesy, D.R., Steel, J.W., Lacey, E., Eagleson, G.K. y Prichard, R.K.; *J. of Vet. Pharm. ad Therap.*, 12, 421-429, 1989.

Henry, S., Legengre, B., Souleauc, C. y cols.; *Pharm. Acta*

Helv., 58, 9-13, 1983.

Higuchi, W.I., Mir, N.A., Desai, S.J.; J. Pharm. Sci., 54, (1)0, 1405-1410, 1965.

Hoebeke, j y cols; Biochem. Biophys. Res. commun., 69, 319-324, 1973.

Horton, R.J.; Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 83, 97-102, 1980.

Horton, R.J.; Parasitology Today, 6, (4), 106, 19900.

Hrckova, G., Velebny, S. y Horak, J.; Helminthol., 67, (7), 24-30, 1993.

Imaizumi, H., Nambu, N. y Nagai, T.; Chem. Pharm. Bull., 31, 2510-2512, 1983.

Janssens, P.G. "Chemotherapy of Gastrointestinal Helminths."; Varden Bossche, H., Thienpont, D y Janssens, P.G. Eds. 1985.

Jafari, M. R., Danti, A.G. y Ahmed, I.; Int. J. Pharm. 48 (1-3), 207-215, 1988.

Junginger, H.; Pharm. Ind., 39, (4), 383-388, 1976.

Kapil, D. y Vohra, P.; Indian J. Pediatr., Jan-Feb, 60, (1), 131-2, 1993.

Kigasawa, K., Maruyama, K., Tanaka, M. y cols; Yakugaku Zasshi, 101, 723-732, 1981.

Khan, K.A. y Rhodes, C.T.; Pharm. Acta Helv., 47, 594-607, 1972.

Kholer, P. y Bachmann, R.; Mol. Biochem. Parasitol., 4, 325-336, 1981.

Kollaritsch, H., Jeschko, E. y Wiedermann, G.; Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 87, (6), 689, 1993.

Kumar, A., Lal, B.K. y Chattopadhyay, T.K.; J. Assoc. Physicians India, 41, (7), 437-8, 1993.

Lacey, E. y Watson, T.R.; Biochem. Pharmacol., 43, 1073-1077, 1985a.

Lacey, E. y Watson, T.R.; Biochem. Pharmacol., 34, 3063-3605, 1985b.

Lacey, E. y Prichard, R.K.; Mol. Biochem. Parasitol., 19, 171-181, 1986.

Lacey, E.; *Int. J. Parasitol.*, 18, 885-936, 1988.

Lacey, E.; *Parasitology Today*, 6, (4), 112-115, 1990.

Lanusse, C.E., Trudeau, C., Rajani, S. y Prichard, R.K.; *J. of Vet. Pharmacology and Therapeutics*, 14, 101-108, 1991.

Lanusse, C.E. y Prichard, R.K.; *Biopharmaceutics and Drug Dispositio*, 13, 95-103, 1992a.

Lanusse, C.E., Nare, B., Gasco, L.H. y Prichard, R.K.; *Xenobiotica*, 22, (4), 419-426, 1992b.

Lanusse, C.E., Gascon, L.H. y Prichard, R.K.; *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 16, 38-47, 1993a.

Lanusse, C.E., Nare, B. y Prichard, R.K.; *Xenobiotica*, 23, (3), 285-395, 1993b.

Latham, M.C. y cols.; *Trans. R. Soc. Med. Hyg.*, 77, 47-48, 1983.

Lefevre, C., Brazier, H., Robert, H. y Guyot-Hermann, A.A.; *S.T.P. Pharma*, 1, 300-322, 1985.

Liu, Y.H., Wang, Y.T. y Yao, Y.Q.; *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 87, (3), 319-321, 1993.

Liu, Y.H., Wang, X.G. y Yu, D.G.; Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 87, (4), 481, 1993.

Lubega, G. y Prichard, R.; Experimental Parasitology, 73, 203-213, 1991.

Marriner, S.E. y cols.; Eur. J. Clin. Pharmacol., 30, 705-708, 1986.

Martindale The Extra Pharmacopoeia, The Pharmaceutical Press, 1993.

Martinez-Fernandez, A.R., Martinez Grueiro, M.M., Albarran Gómez, E., Cadórniga Carro, R. y Fernandez Sánchez, C.; Rev. Iber. Parasitol., 50, 353-358, 1990.

McCracken, R.O., Stillwell, W.H. y Hudson, H.M.; Molec. Biochem. Parasit., Suppl. 726, 1982.

McGinity, J.W., Maness, D.D. y Yakatan; Drug Develop Communications, 1, 369-387, 1975.

McGinity, J.W., Manicent, P. y Sieinfink, H.; Troisième Congrès international de technologie pharmaceutique, vol 5, Paris, 1983.

Medina, M.T., Genton, P. Montoya, M.C. y col.; *Epitelsia*, 34, (6), 1024-1027, 1993.

Merkle, H.P.; *Pharm. Ind.*, 43, (2), 183-194, 1981.

Miller, R.B. y Uranderick, M.; *J. of Liquid Chromatogrphy* 16, (6), 1249-1261, 1993.

Miralles, M.J., McGinity, J.W. y Martin, A.; *J. Pharm Sci.*, 71, 302-304, 1982.

Mitchell, J.R. y cols. "Organ Directed Toxicity: Chemical Indices and Mechanisms." Brown, S.S. y Davies D.S. Eds. Pergamon Press 117-129, 1981.

Moneghini, M., Rubessa, F., Rupena, P. y col.; *STP Pharma* 6, (6), 376-379, 1990.

Morelli, B.; *Analyst*, 108, 870-973, 1983.

Moskopp, D. y Lotterer, E.; *Neurosurg. Rev.*, 16, (1), 35-37, 1993.

Mukherjee, A., Roy, T., Mukherjee, S. y col.; *J. Assoc. Physicians India*, 41, (5), 287-9, 1993.

Nozawa, Y., Mizumoto, T. y Higashide, F.; Pharm. Acta. Hlv., 60, (5-6), 175-177, 1985.

Patente Japonesa 1168619. 1989.

Prichard, R.V.; Int. J. Parasitol., 17, 473-482, 1987.

Prieto, J.G., Justel, A., Del Estal, J.L., Barrio, J.P. y Alvarez, A.I.; Biop. Biochem. Physiol., 100, (3), 397-400, 1991.

Pungpak, S. y cols.; Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health, 18, 207-210, 1987.

Rabanon, A., Anastasiadou, C., Plat, M., Duchene, M. y Puisieux, F.; Troisième congres international de technologie pharmaceutique, volume IV, Paris, 1983.

Rabinder, K., Grani, J.W. y Eaves, T.; J. Pharm. Sci., 69, 1317-1321, 1980a.

Rabinder, K., Grani, J.W. y Eaves, T.; J. Pharm. Sci., 69, 1321-1326, 1980b.

Raeymaekers, A.M.M., Van Gelder, J.L.H., Roevens, L.F.C. y Jassen, P.A.J.; Arzneim-Forsch Drug Res., 28, 587-594, 1978.

Ramadan, E.M., Abd El-Gawad, Abd El-Gawad, H.; Pharm. Ind., 49 (5), 508-513, 1987.

Ramalingam, S., Sinniah, B. y Krishnan, V.; Am. Trop. Med. Hyg., 32, 984-989, 1983.

Ravis, W.R. y Cheng, C.Y.; J. Pharm. Sci., 70, 1353-1356, 1981.

Ritche, K. y Windfield, A.J.; Intern. J. Pharm., 18, 89-97, 1984.

Roquecave-Anastasiadou, C.; Tesis doctoral Paris Sud, nº 70, 20 Sep. 1983.

Rowland, M., Yozer, T.N. "Clinical Pharmacokinetics. Concept and Application." Lea y Febiger Ltd. Segunda Ed., USA, 1989.

Said, S.A., El Fatatry, H.M. y Geneidi, A.S.; Austral. Pharm. Sci., 53, (2), 42-45, 1974.

Salama, H.A., Ammar, H.O., Kassem, M.A. y El Ridy M.S.; Pharm. Ind., 43, 1242-1245, 1981.

Salib, N.N. y Ebian, A.R.; Pharm. Ind., 40, 262-265, 1978.

Sampath, S.S. y Robinson, D.H.; J Pharm Sci., 79, (5), 1990.

Sánchez, M., Suastegui, R., Esquivel, D. y col.; Clin. Neuropharmacol., 16, (1), 7-82, 1993.

Sekiguchi, K., Obi, N. y Veda, Y.; Chem. Pharm. Bull., 9, 866-872, 1961.

Sekikawa, H., Nakano, M. y Arita, J.; Chem. Pharm. Bull., 26, 118-126, 1978.

Sekikawa, H., Fukuda, N., Takada, M., Uhtani, K., Arita, T. y Takano, M.; Chem. Pharm. Bull., 31, 1350-1356, 1983.

Simonelli, A.P., Mehta, S.C., Higuchi, W.I.; J. Pharm. Sci., 58, (5), 538-549, 1969.

Singla, A.K., Vijan, T.; Drug Dev. Ind. Pharm., 16, (5), 875-882, 1990.

Sotelo, J. y col.; Arch. Neurol., 45, 532-543, 1988.

Stavchansky, S. y Gowan, W.; Troisième congrès international de technologie pharmaceutique, volume V, Paris, 1983.

Stephenson, L.S. y col.; Am. J. Trop. Med., 41, 78-87, 1989.

Stürchler, D. y col.; Ann. Trop. Med. Parasitol., 83, 473-478, 1989.

Sugimoto, I., Kuchidi, A., Nakagawa, H. y col.; Drug. Dev. Ind. Pharm., 6, 137-160, 1980.

Summers, M.P., Enever, R.P.; J. Pharm. Sci., 65, 1613-1617, 1976.

Sumnu, M.; STP Pharma, 2, 214-220, 1986.

Suntharasamai, P., Riganti, M., Chittamas, S. y col.; Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health, 23, (4), 716-722, 1992.

Suri, W., Kalra, V.,; Med. J. Aust., 160, (4), 231-232, 1994.

Tachibana, T y Nakamura, A.; Kolloid-Z + Z Polym., 302, 103-133, 1965.

Takayama, K., Nambu, N. y Nagai, T.; Chem. Pharm. Bull., 28, 3304-3309, 1980.

Takayama, K., Nambu, N. y Nagai, T.; Chem. Pharm. Bull., 30, 3013-3016, 1982a.

BIBLIOGRAFÍA.

Takayama, K., Nambu, N. y Nagai, T.; Chem. Pharm. Bull., 30, 673-678, 1982b.

Takeda,; Patente japonesa, 2015026, 1990.

Tan, Y.Y. y Challa, G.; Polymer 17, 739-741, 1976.

Taylor y Francis.; "Strongyloidiasis: A mayor Roundworm Infection of Man." Grove, D.I. Ed., 1989.

Thakkar, A.L. y col.; J. Pharm. Pharmacol., 29, 783-784, 1977.

Theodorides, V.L., Kingsbury, W.D. y Parish, R.C.; Experientia, 32, 702, 1976.

The United States Pharmacopeia, USP XXII, NF XVII, 1990.

Todorov, T y col.; Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 82, 150-152, 1988.

Toma, S. y col.; Enferm. Infecc. Microbiol. Clin., 11, (2), 113-114, 1993.

Torrado, S., Torrado, S. y Cadórniga, R.; J of Pharm. and Biomed. Analysis, 12, (3), 383-387, 1994.

Torrado, S., Torrado, S., Torrado, J.J. y Cadóniga, R.;
Proc. Control Release Soc., 20, 372-373, 1993.

Townsend, L.B. y Wise, D.S.; Parasitology Today, 6, (4),
107, 1990.

Tynes, R.E. y Hodgson, E.; Biochem. Pharmacol., 32, 3419-
3428, 1983.

Vandelli, M.A., Forni, F. y Cameroni, R.; J.
Microencapsulation, 10, (1), 55-65, 1993.

Van-Nieuwkerk, K.M.J., Veenstra, J., Wassenaar, R.P. y col.;
Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 5, (7), 563-565, 1993.

Veiga, M.D., Escobar, C. y Bernard, M.J.; Int. J. Pharm.,
93, 215-220, 1993.

Veiga, M.D., Bernard, M.J. y Escobar, C.; Int. J. Pharm. 89,
119-124, 1993.

Vekama, K., Ikegahi, K., Wang, Z. y col.; J. Pharm.
Pharmacol., 44, 73-78, 1992.

Velebny, S., Momasovicová, O. y Stpiczynska, R.;
Helminthologia, 29, 79-81, 1992.

Vera, N. y Cadórniga, R.; STP Pharma Sciences, 1, (2), 125-129, 1991.

Verheyen, A. y col.; "Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships." Vanden Bossche, H. Ed., 605-618, North Holland, Elsevier, 1976.

Vernon, L., Snoeyink, D. y Jenkins, . "Water Chemistry." John Wiley and sons Ed., 469-508, 1980.

Vila-Jato, J., Martinez-Pacheco, R., Concheiro, A. y Blanco, J.; 3^{er} Congrès International de Technologie Pharmaceutique, Paris, mayo, 1983.

Vojnovic, D., Rubbesa, F., Bogataj, N. y Mrhar, A.; J. Microencapsulation, 10 ,(1), 89-99, 1993.

Von-Sinner, W.N., Hellstrom, M., Kagevi, I.; J. Urol., 149, (3), 577-580, 1993.

Weber, R., Sauer, B., Luthy, R. y Nadal, D.; Clin. Infect. Dis., 17, (3), 480-3, 1993.

Wilhelm, J.A., Bailey, L.C. y Shepard, T.A.; J. of Chromatography, 578, 231-238, 1992.

Wolf, P., Ochsendorf, F.R. y Milbradt, R.; *Hautarzt.*, 44, (7), 462-465, 1993.

Yasawy, M.I., Al-Karawi, M.A. y Mohamed, A.R.E.; *Trop. Med. Parasitol.*, 44, (3), 192-194, 1993.

Yuasa, H., Ozeki, T., Kanaya, Y. y Oishi, K.; *Chem. Pharm. Bull.*, 41, (5), 933-936, 1993a.

Yuasa, H., Takahashi, H., Ozeki, T. y col.; *Chem. Pharm. Bull.*, 41, (2), 397-399, 1993b.

Yuaswal, S.B., Sharma, A. y Chikhalidar, K.V.; *Indian J. Pharm. Sci.*, en-Feb, 79, 1990.

Ziegler, D.M. "S-Oxygenases, I: Chemistry and biochemistry. Sulphur-containing drugs and related organic compounds." Damani, L.A. Ed., vol 2 parte A, Chichester, Ellis Horwood, 53-66, 1989.

Zingone, G. y Rubessa, T.; *STP PHarma Sciences*, 4, (2), 122-127, 1994.

Zimmerman, G.L. y Hoberg, E.; *Parasitology Today*, 4, 55-56, 1988.