

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
DISEÑO, OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE FÁRMACOS Y BIOMOLÉCULAS

***DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE OXFENDAZOL EN PLASMA HUMANO***

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

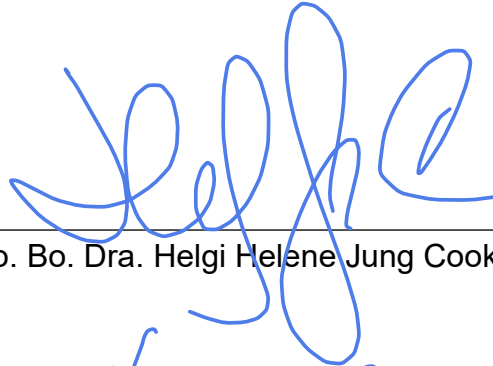
Q.F.B. EMILY RUTH AIMME JUÁREZ LÓPEZ
MATRÍCULA: 2223801743

COMITÉ TUTORIAL

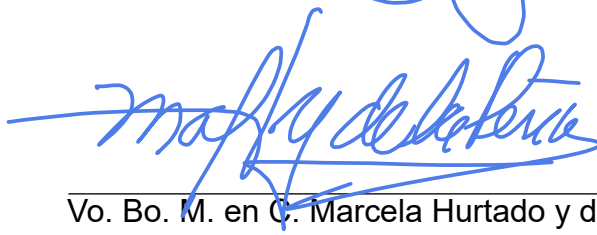
COTUTOR: DRA. HELGI HELENE JUNG COOK
COTUTOR: M. EN C. MARCELA HURTADO Y DE LA PEÑA
ASESOR: M. EN C. JOSÉ RAÚL MEDINA LÓPEZ

ABRIL, 2025

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE OXFENDAZOL EN PLASMA HUMANO**



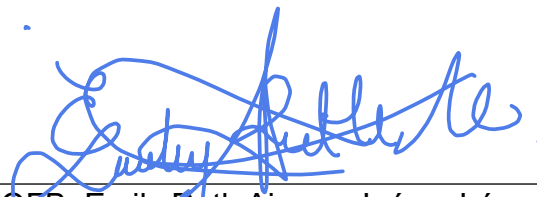
Vo. Bo. Dra. Helgi Helene Jung Cook



Vo. Bo. M. en C. Marcela Hurtado y de la Peña



Vo. Bo. M. en C. José Raúl Medina López



QFB. Emily Ruth Aimme Juárez López
2223801743

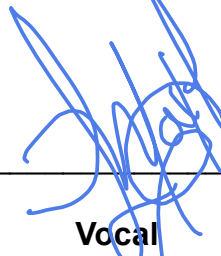
**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE OXFENDAZOL EN PLASMA HUMANO**

JURADO

Iliriana E. Goetz - Ndes.

Presidente

Dra. Iliriana Elvira González Hernández



Vocal

M. en C. María de Lourdes Beatriz Mayet Cruz



Secretario

M. en C. Marcela Hurtado y de la Peña

Resumen

La neurocisticercosis es una parasitosis humana causada por la invasión de las larvas de *Taenia solium* en el sistema nervioso central. Es una enfermedad pleomórfica debido a las variaciones en el número, tamaño y localización de los cisticercos. Sus manifestaciones clínicas pueden ser desde asintomáticas hasta la muerte súbita. A pesar de tener un decremento en el número de casos, sigue presente en regiones como América Latina y el Caribe.

El albendazol y el praziquantel son las únicas opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento de la neurocisticercosis, pero presentan limitaciones en su solubilidad y metabolismo, respectivamente. Recientemente, el oxfendazol, un antiparasitario empleado en medicina veterinaria ha demostrado en estudios de farmacocinética en voluntarios sanos tener una concentración plasmática máxima superior a la del albendazol, lo cual puede indicar su posible efecto antihelmíntico.

Para continuar con la investigación biofarmacéutica y farmacocinética en pacientes, es esencial contar con un método bioanalítico confiable para la cuantificación de oxfendazol en plasma.

En el presente trabajo se desarrolló un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detección UV-VIS. El método utilizó una extracción líquido-líquido con acetato de etilo. La separación cromatográfica se realizó empleando como fase móvil una solución amortiguadora de acetato de sodio 0.025 M pH 5.0, acetonitrilo y metanol en proporción 42:42:16 y una columna Gemini C18 (150 X 4.6 mm, 5 μ m). La validación del método analítico se realizó siguiendo los lineamientos que marca la norma oficial mexicana NOM-177-SSA1-2013.

El método desarrollado demostró ser lineal en el rango de 0.3 a 4.8 μ g/mL, selectivo, lineal, exacto y preciso en términos de repetibilidad y reproducibilidad. El porcentaje de recobro fue mayor al 85%. Las muestras se pueden almacenar durante tres meses sin que se presente degradación del fármaco.

Agradecimientos institucionales

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por otorgarme la beca que hizo posible realizar mis estudios de maestría, durante el periodo de octubre de 2022 a octubre de 2024.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, por abrirme las puertas de una institución tan innovadora, comprometida con la formación científica, crítica y humanista.

A la Maestría en Ciencias farmacéuticas y a toda su plantilla académica por su valiosas enseñanzas educativas y filosóficas.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Helgi Jung, por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto de investigación, por su enorme paciencia y vocación. Por permitirme aprender a través de mis errores.

A la M. en C. Marcela Hurtado, gracias por su incondicional apoyo y guía a lo largo de esta travesía académica. Su ayuda fue fundamental para superar desafíos muy complejos.

Agradecimientos personales

Agradezco profundamente a Dios por permitirme cumplir el anhelo de estudiar un posgrado; para Él no hay nada imposible.

A mis padres, Óscar Juárez y Emma López, por creer siempre en mi capacidad de alcanzar grandes metas y por exigirme llegar a ellas.

A mis hermanos, Ruby y Emmanuel Juárez, por su guía y por extenderme su brazo en los momentos en que me sentí perdida.

A mi esposo, Juan Noriega, por acompañarme en este nuevo viaje, por ser un equipo increíble y por crecer juntos, siempre con la mirada puesta en Dios.

A mis compañeros de la maestría, por mostrarme que el aprendizaje se construye colectivamente, con la participación y el apoyo de todos. A mi amiga Katia Gómez, por su sincera amistad y ejemplo.

A mis maestros y compañeros del laboratorio, gracias por su amabilidad, empatía, amistad y respaldo durante este proceso.

ÍNDICE

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| 2 | ANTECEDENTES..... | 11 |
| 2.1 | Características generales de los helmintos..... | 11 |
| 2.2 | <i>Taenia solium</i> | 12 |
| 2.3 | Neurocisticercosis..... | 13 |
| 2.3.1 | Epidemiología..... | 14 |
| 2.3.2 | Manifestaciones clínicas..... | 15 |
| 2.3.3 | Diagnostico..... | 15 |
| 2.3.4 | Tratamiento..... | 15 |
| 2.4 | Oxfendazol (OXZ)..... | 16 |
| 2.4.1 | Características fisicoquímicas del oxfendazol..... | 17 |
| 2.4.2 | Comparación de las principales propiedades fisicoquímicas del OXZ con otros bencimidazoles..... | 20 |
| 2.5 | Farmacodinamia..... | 20 |
| 2.6 | Farmacocinética..... | 21 |
| 2.7 | Validación de métodos bioanalíticos..... | 24 |
| 2.8 | Métodos analíticos para la cuantificación de oxfendazol en plasma por CLAR 26 | |
| 3 | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 28 |
| 4 | HIPÓTESIS..... | 28 |
| 5 | OBJETIVOS..... | 28 |
| 5.1 | Objetivo General..... | 28 |
| 5.2 | Objetivos particulares..... | 29 |
| 6 | METODOLOGÍA..... | 29 |
| 6.1 | Materiales, reactivos y equipos..... | 29 |
| 6.1.1 | Sustancias de referencia..... | 29 |

| | | |
|-------|---|----|
| 6.1.2 | Reactivos..... | 29 |
| 6.1.3 | Consumibles cromatográficos | 30 |
| 6.1.4 | Equipos e instrumentos | 30 |
| 6.2 | Preparación de soluciones..... | 30 |
| 6.2.1 | Preparación de soluciones reactivo..... | 30 |
| 6.2.2 | Preparación de soluciones estándar | 31 |
| 6.2.3 | Curva de calibración en solución..... | 32 |
| 6.2.4 | Soluciones de trabajo | 32 |
| 6.3 | Curva de calibración de OXZ en plasma..... | 32 |
| 6.4 | Muestras control..... | 33 |
| 6.5 | Desarrollo del método analítico..... | 34 |
| 6.5.1 | Detección de longitud de máxima absorción | 34 |
| 6.5.2 | Selección del estándar interno (EI)..... | 34 |
| 6.6 | Selección del método de extracción..... | 35 |
| 6.6.1 | Condiciones de extracción | 35 |
| 6.6.2 | Selección del disolvente de extracción | 35 |
| 6.6.3 | Procedimiento de extracción | 36 |
| 6.6.4 | Selección del volumen de extracción | 36 |
| 6.7 | Validación del método | 36 |
| 6.7.1 | Selectividad..... | 36 |
| 6.7.2 | Curva de calibración..... | 37 |
| 6.7.3 | Límite inferior de cuantificación | 37 |
| 6.7.4 | Precisión..... | 38 |
| 6.7.5 | Exactitud..... | 38 |
| 6.7.6 | Estabilidad en plasma | 38 |
| 6.7.7 | Estabilidad en solución..... | 39 |
| 7 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 40 |
| 7.1 | Determinación de la longitud de máxima absorción..... | 40 |
| 7.2 | Selección de la fase móvil..... | 41 |
| 7.3 | Selección del estándar interno..... | 46 |

| | | |
|-------|---|----|
| 7.4 | Condiciones de extracción | 47 |
| 7.4.1 | Selección del disolvente de extracción..... | 47 |
| 7.4.2 | Selección del volumen de extracción | 47 |
| 7.4.3 | Procedimiento de extracción | 48 |
| 7.5 | Validación del método analítico..... | 49 |
| 7.5.1 | Selectividad | 49 |
| 7.5.2 | Curva de calibración..... | 51 |
| 7.5.3 | Precisión y exactitud..... | 55 |
| 7.5.4 | Estabilidad..... | 56 |
| 8 | CONCLUSIONES | 59 |
| 9 | PERSPECTIVAS..... | 60 |
| 10 | REFERENCIAS | 61 |

1 INTRODUCCIÓN

Los antihelmínticos son medicamentos utilizados para tratar y controlar infecciones por nematodos, trematodos y cestodos, parásitos que afectan tanto a animales como a humanos (Nixon et al., 2020). Entre las helmintiasis más graves se encuentra la neurocisticercosis humana, causada por las larvas del cestodo *Taenia solium* en el sistema nervioso central.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes incluyen epilepsia, signos neurológicos focales y presión intracraneal elevada, aunque estas pueden variar según el número, localización y estadio de los cisticercos, así como de la respuesta inmunológica del huésped (Jung-Cook, 2012).

La neurocisticercosis sigue siendo un problema de salud en América Latina, afectando a millones de personas. Datos recientes indican un aumento en el número de ingresos hospitalarios en Colombia, lo que resalta la necesidad urgente de desarrollar nuevas estrategias para su manejo.

Típicamente el tratamiento farmacológico de esta enfermedad se limita al uso de albendazol y praziquantel. Sin embargo, presenta una gran variabilidad en la eficacia debido a que el albendazol presenta absorción gastrointestinal limitada y el praziquantel un extenso metabolismo (Jung-Cook, 2012). Es por lo anterior que se requiere contar con otras opciones terapéuticas.

Un tratamiento potencial recién propuesto es el oxfendazol, un fármaco de uso veterinario que ha demostrado en estudios preclínicos en cerdos, tener una actividad sustancial contra los estadios tisulares de *Taenia solium* (cisticercosis) incluso con una sola dosis oral (An et al., 2019a).

A la fecha se han reportado los resultados de los primeros estudios en seres humanos mostrando que el oxfendazol es seguro y bien tolerado en diferentes dosis crecientes. Además, se observó que la concentración máxima del oxfendazol (3010 ng/mL) es superior a la del sulfóxido de albendazol (220 ng/mL) y del mebendazol (14 ng/mL), (An et al., 2019b; Bach et al., 2020).

Considerando los resultados reportados en humanos y su potencial uso en la clínica, será necesario a futuro, caracterizar su farmacocinética en pacientes con neurocisticercosis. Para realizar este tipo de estudios se requiere contar con un método analítico confiable para la cuantificación de oxfendazol en plasma.

2 ANTECEDENTES

2.1 Características generales de los helmintos

Los helmintos son organismos multicelulares de gran tamaño que, en general, son visibles a simple vista en sus etapas adultas. Los helmintos que parasitan a los humanos pertenecen a dos categorías taxonómicas o *filos*: nematelmintos, que comprenden a los nematodos (gusanos redondos) y platelmintos, que incluyen a los cestodos (gusanos planos) y trematodos (gusanos planos en forma de hoja), (Weller, 2022).

Los nematelmintos incluyen parásitos importantes que pertenecen a los géneros ***Trichuris, Trichinella, Strongyloides, Necator, Ancylostoma, Ascaris, y Onchocerca***. Dentro de los platelmintos, la clase ***Cestoda*** abarca los géneros ***Diphyllobothrium, Taenia, Echinococcus e Hymenolepis***. La clase ***Trematoda*** agrupa parásitos importantes que pertenecen a los géneros ***Schistosoma, Fasciola, Fasciolopsis, Clonorchis y Paragonimus***(Kennet J. Ryan, 2021).

Los helmintos parásitos pueden provocar dos tipos de infecciones en el ser humano según estos se comporten, ya sea como hospedadores definitivos o como hospedadores intermedios. En el primer caso la infección es producida por las formas adultas de los helmintos que se localizan en el aparato digestivo. En el segundo caso, la infestación se produce por las formas larvianas, que se caracterizan por la producción de quistes en diferentes órganos y tejidos (Arranz Solana et al., 2014).

2.2 *Taenia solium*

Taenia solium (*T. solium*), es un helminto parásito de la clase cestoda. En su fase adulta mide de 2 a 4 m de longitud. Anatómicamente se divide en tres estructuras principales: escólex, cuello y estróbilo. El escólex tiene un diámetro cercano a 1 mm. Además, cuenta con cuatro ventosas y un rostelo formado por una doble cadena de 25 a 30 ganchos cada una. El cuello mide de 5 a 10 mm. El estróbilo es una cadena larga de numerosos segmentos, llamados proglótidos (Levinson et al., 2020).

Cada proglótido es una unidad reproductiva independiente que contiene órganos femeninos y masculinos. Los proglótidos próximos al cuello son inmaduros, y conforme se alejan maduran y producen grandes cantidades de huevos en el útero. Estos últimos son fecundados por los espermias provenientes de los testículos, produciendo embriones hexacanto (con seis ganchos) (Levinson et al., 2020). Para convertirse en larvas, los huevos deben ser ingeridos por un hospedador. En la figura 1 se muestra un imagen de *T. solium*.



Figura 1. *Taenia solium*. Escólex y varias proglótides. La flecha larga apunta a una de las cuatro ventosas del escólex. La flecha corta señala al círculo de ganchos. Es posible ver proglótides que se extienden desde el escólex hacia el lado izquierdo de la imagen (Levinson et al., 2020a).

Los huevos presentes en alimentos contaminados por personas con teniasis, puede ser ingeridos accidentalmente y alcanzar el tracto gastrointestinal, donde se liberan de sus capas gracias a la acción de la bilis y las enzimas pancreáticas, convirtiéndose así en larvas diminutas (oncosferas), que penetran la pared intestinal y entran al torrente sanguíneo. Desde allí, son transportadas a los músculos u otros tejidos del huésped, incluido el cerebro, donde las oncosferas se transforman en cisticercos y se enquistan. Allí, pueden permanecer como quistes viables durante años. El ciclo de vida del parásito se completa cuando los humanos ingieren carne de cerdo poco cocida que contiene cisticercos viables (Jung-Cook, 2012).

En resumen, *T. solium* tiene dos tipos de huéspedes: uno definitivo (el ser humano) y otro intermediario (el cerdo). En el humano causa teniasis si la fase adulta invade el intestino (después de haber ingerido cisticercos viables) y cisticercosis si la fase larvaria se encuentra en otros tejidos como músculos y ojos (después de haber ingerido huevos). Sin embargo, cuando las larvas migran al sistema nervioso central, se le conoce como neurocisticercosis.

2.3 Neurocisticercosis

La neurocisticercosis (NCC) es la principal infección helmíntica a nivel del sistema nervioso central (SNC) en el ser humano. Es causada por la presencia de larvas del cestodo de *T. solium*. Esta enfermedad es adquirida por la ingestión de los huevos de la *Taenia*, expulsados de las heces de un portador (Palomares Alonso, 2009; Steyn et al., 2023).

Una vez en el organismo, la diseminación de los huevos (oncosferas) se realiza por vía vascular y, al llegar al cerebro, los parásitos pueden alojarse a nivel de parénquima, ventrículos, meninges o una combinación de estos. Los cisticercos sufren cambios estructurales que incluyen diferentes etapas: la vesicular o quística, la coloidal, la granular nodular y la calcificada, ver figura 2, (Palomares Alonso, 2009).

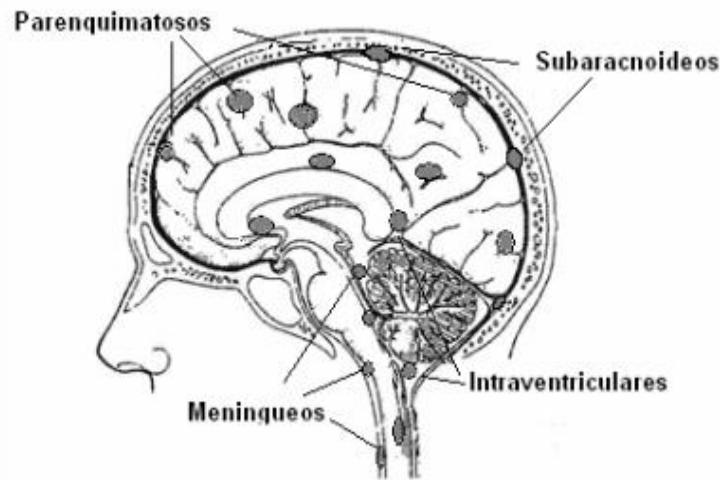


Figura 2. Diseminación de cisticercos en el SNC (Palomares Alonso, 2009).

2.3.1 Epidemiología

La prevalencia de la NCC es difícil de determinar debido a la inespecificidad de sus manifestaciones clínicas. Sin embargo, puede estimarse a través de los casos que presentan epilepsia (Fernández Rodríguez et al., 2017). Se calcula que la epilepsia afecta aproximadamente a 23.4 millones de personas en todo el mundo, y algunos estudios indican que la NCC podría ser responsable de hasta el 30% de estos casos en regiones endémicas. Así, el número total estimado de personas con NCC, ya sea en forma sintomática o asintomática, se encuentra entre 2.56 y 8.30 millones (OMS, 2022).

Un estudio reciente estimó la tasa de admisión hospitalaria por NCC en cuatro países de Latinoamérica: México, Brasil, Ecuador y Colombia. En México, la tasa más alta ocurrió en 1996 (7.8%) y la más baja en 2018 (0.21%), con una tendencia similar en Brasil y Ecuador. Sin embargo, en Colombia, la tasa podría estar aumentando, con la más baja en 2003 (0.49/100,000 habitantes) y la más alta en 2019 (2.33/100,000 habitantes). A pesar de la disminución en algunos países, la neurocisticercosis persiste y los esfuerzos por su control deben continuar (Rodríguez-Rivas et al., 2022).

2.3.2 Manifestaciones clínicas

Dependiendo del número, tamaño, estadio, localización y respuesta inmunitaria de cada paciente, la presentación clínica de la NCC puede variar desde ser asintomática hasta la muerte súbita (Butala et al., 2021a).

Atendiendo a la localización de los cisticercos, existen dos presentaciones clínicas: la NCC parenquimatosa y la extraparenquimatosa. La primera se manifiesta principalmente con convulsiones (60-90% de los casos) y también puede incluir cefaleas y síntomas cognitivos o psiquiátricos. La forma segunda se caracteriza por hipertensión intracraneal (70% de los casos), signos neurológicos focales (20%), como alteraciones motoras, sensoriales o del lenguaje (Hamamoto Filho et al., 2022).

2.3.3 Diagnostico

Los métodos para el diagnóstico de la NCC incluyen exámenes clínicos detallados, pruebas serológicas y de neuroimagen. Las pruebas serológicas, como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el ensayo de inmunoelectrotransferencia ligado a enzimas (EITB), detectan anticuerpos o antígenos de *T. solium* en sangre, orina y líquido cefalorraquídeo (Butala et al., 2021a).

Las técnicas de neuroimagen como la resonancia magnética (MRI) o la tomografía computarizada (TC), permiten el diagnóstico diferencial definitivo y se consideran el estándar de oro para evidenciar el número de quistes, la topografía de las lesiones, el estadio de evolución del quiste y la evaluación del nivel de la reacción inflamatoria del huésped (Butala et al., 2021b).

2.3.4 Tratamiento

El manejo terapéutico debe ser individualizado y se basa en uno o más de estos tres pilares: tratamiento sintomático, antiparasitario y/o quirúrgico. El tratamiento sintomático está enfocado en el control de las crisis convulsivas, con antiepilépticos y/o glucocorticoides.

Dentro de las medidas quirúrgicas se encuentran: la extirpación de quistes gigantes, la resección de quistes ventriculares y los sistemas de derivación (Fernández-Rodríguez et al., 2017).

El tratamiento farmacológico actual comprende el uso de albendazol (ABZ) y praziquantel (PQZ). La dosis de PZQ mayormente utilizada es de 50 mg/kg/día en tres dosis divididas durante un período de 2 semanas. En el caso de ABZ, la pauta posológica actual es de 15 mg/kg/ día cada 8 h durante un periodo de 8 días (Butala et al., 2021a).

A pesar de ser considerados ambos tratamientos eficaces y económicos, presentan baja absorción gastrointestinal y un extenso metabolismo, originando una gran variabilidad en la respuesta terapéutica (Jung-Cook, 2012).

2.4 Oxfendazol (OXZ)

En 1975, Averkin y colaboradores, a través de una serie de experimentos realizados en los laboratorios de Syntex Research en Palo Alto, California, descubrieron que los grupos fenilsulfinilos en la posición seis del núcleo bencimidazólico aumentaban significativamente la actividad antihelmíntica de estos compuestos, lo que llevó a la síntesis del oxfendazol (Bolas Fernández, 1984) .

Diversos estudios han reportado la eficacia del oxfendazol frente diversos parásitos tales como: ***Litomosoides sigmodontis***, ***Onchocerca volvulus***, ***Trichuris suis***, ***Trichuris muris*** , ***Haemonchus contortus***, ***Cooperia oncophora***, ***Ostertagia spp*** y ***Trichostrongylus spp*** (Bach et al., 2021; Chalmers & Chalmers, 1979; Risch et al., 2022).

Actualmente, el OXF está aprobado en los EE. UU. como medicamento de venta libre para la eliminación y el control de infecciones por parásitos en equinos y ganado vacuno. Su seguridad y eficacia ha sido probada en ratas, perros, ovejas, burros, cabras, alpacas, cerdos, caballos y vacas .

Particularmente el OXF se ha evaluado en la cisticercosis porcina mostrando una eficacia mayor a comparación de otros antihelmínticos como el albendazol o el praziquantel (Dixon et al., 2021). También se ha investigado su eficacia en otras infecciones helmínticas, como equinococosis, fasciolosis y tricuriasis (Gonzalez et al., 2019).

Recientemente, se realizó el primer estudio en seres humanos donde se evaluó la tolerabilidad y seguridad del OXZ en voluntarios sanos. En cuanto a los datos de seguridad se encontró que el OXZ era bien tolerado en dosis crecientes sin ningún evento adverso grave o muerte.

En junio de 2024, comenzó un estudio clínico que tiene como propósito comprobar, la eficacia del OXZ contra *Trichuris trichiura* en pacientes humanos (prueba de concepto), apoyado por los datos de seguridad que se obtuvieron en la fase I de investigación clínica (Bach et al., 2020).

2.4.1 Características fisicoquímicas del oxfendazol

El oxfendazol o [5-(fenilsulfinil)-1H-benzimidazol-2-il] éster metílico del ácido carbámico, es un compuesto orgánico heterocíclico de tipo benzimidazol. En la figura 3 se presenta su estructura química. En la tabla 1 se resumen sus propiedades fisicoquímicas.

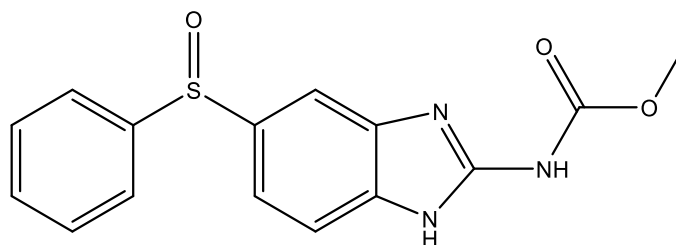


Figura 3. Estructura química del Oxfendazol.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del OXZ

| Propiedad | Valor | Fuente |
|---------------------|---|--------------------------|
| Apariencia física | Polvo blanco o casi blanco | USP 2021 |
| Fórmula molecular | C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₃ S | Experimental |
| Peso molecular | 315.347 mg/mol | |
| Punto de fusión | 253 °C | |
| pka | 3.57 y 9.26 | Chemaxon |
| Log P | 2.62 | Chemaxon |
| Solubilidad en agua | 0.387 mg/mL | ALOGPS |

2.4.1.1 Solubilidad

En un estudio realizado por Sun y colaboradores, en el año 2022, se reportaron las solubilidades de OXZ en polvo y en forma de nanocristales, en agua y en diferentes disolventes orgánicos (tabla 2). Se encontró que el OXZ es más soluble en dimetilsulfóxido (DMSO) que en otros disolventes orgánicos como metanol (MeOH) o acetonitrilo (ACN). Asimismo, se concluyó que la solubilidad del OXZ puede verse favorecida en forma de nanocristales.

Tabla 2 Solubilidades experimentales del OXF en diferentes disolventes a: $p < 0,01$ (Sun et al., 2022)

| Disolventes | Solubilidad ($\mu\text{g/mL X} \pm \text{SD}$) | | Incremento (nanocristales) |
|---------------|--|-----------------------------------|----------------------------|
| | OXZ | OXZ nanocristales | |
| Agua | 0.69 \pm 0.10 | 76.81 \pm 0.53 ^a | 110 |
| Metanol | 336.64 \pm 11.48 | 682.20 \pm 89.93 ^a | 2 |
| Etanol | 162.72 \pm 0.59 | 383.08 \pm 34.43 ^a | 2 |
| Acetonitrilo | 37.95 \pm 1.59 | 312.76 \pm 70.35 ^a | 8 |
| Ácido acético | 10519.19 \pm 265.32 | 56506.92 \pm 838.4 ^a | 5 |
| DMSO | 15012.41 \pm 41.90 | 132405.84 \pm 13.4 ^a | 9 |

Ceballos y colaboradores, en 2012, compararon la solubilidad acuosa de diferentes bencimidazoles con o sin ciclodextrinas a pH 1.2 y 7.4. En la tabla 3 se encuentran los datos obtenidos. En ella, se puede observar, que el oxfendazol sin ciclodextrinas a pH 1.2 es más soluble que el albendazol (ALB), mebendazol (MBZ) y flubendazol.

Tabla 3. Evaluación de la solubilidad acuosa ($\mu\text{g/mL}$, $n = 6$) de diferentes compuestos de bencimidazol con o sin hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) (10%) a diferentes pH (1.2 o 7.4) (Ceballos et al., 2012).

| Compuesto | pH 1.2 (HCl/KCl) | | pH 7.4 (KH ₂ PO ₄) | |
|-------------------------|---------------------|---------------------|---|-------------------|
| | Con HP β CD | Sin HP β CD | Con HP β CD | Sin HP β CD |
| Albendazol | 921.1 \pm 347.3 | 406.1 \pm 53.4* | 406.1 \pm 53.4* | 4.6 \pm 1.3* |
| Sulfóxido de albendazol | 6637.7 \pm 1370.2 | 3818.6 \pm 202.1* | 3818.6 \pm 202.1* | 83.6 \pm 7.6* |
| Mebendazol | 436.7 \pm 47.4 | 20.5 \pm 5.0* | 43.0 \pm 8.3 | 4.6 \pm 1.3* |
| Oxfendazol | 1902.5 \pm 605.8 | 419.7 \pm 29.2* | 348.1 \pm 46.8 | 5.5 \pm 1.1* |
| Flubendazol | 2251.7 \pm 551.5 | 29.6 \pm 2.8* | 163.8 \pm 119.7 | 5.8 \pm 7.0* |

*P < 0,05.

2.4.1.2 pka

Existen dos valores de pka reportados para el OXF, 3.57 y 9.26. Estos valores fueron calculados con el software ALOGPS. En la fig.4 se muestra la ionización propuesta de la molécula de OXZ.

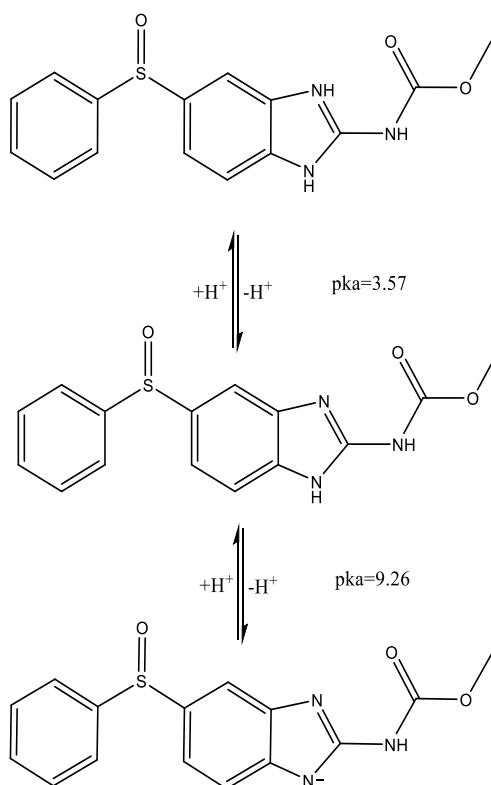


Figura 4. Ionización propuesta de la molécula oxfendazol

2.4.1.3 Log P

El coeficiente de partición octanol-agua es un indicador de la solubilidad en lípidos que tiene una molécula, y por tanto una medida de su lipófila. En el caso del OXZ, se ha reportado un log P experimental igual a 2.03 (Mottier et al., 2003). Dentro del sistema de clasificación biofarmacéutica (SCB), un fármaco con un log P mayor a 1 se considera altamente permeable.

2.4.1.4 Clasificación biofarmacéutica

Al igual que el albendazol y otros compuestos de tipo bencimidazol, el OXZ es un fármaco de clase II en el sistema de SCB (An et al., 2019a). Se clasifica así ya que es prácticamente insoluble en agua (baja solubilidad) y es altamente permeable.

2.4.2 Comparación de las principales propiedades fisicoquímicas del OXZ con otros bencimidazoles

En la tabla 4 se comparan las propiedades fisicoquímicas del OXZ y otros compuestos tipo bencimidazol con actividad antihelmíntica.

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del oxfendazol, fenbendazol y albendazol .

| Nombre | Solubilidad en agua experimental µg/mL (Sun et al., 2022b) | Log P experimental octanol/agua (Mottier et al., 2003) | pka1 y pka2 (Drugbank, 2023) |
|-------------|--|--|------------------------------|
| Oxfendazol | 44.12 | 2.03 | 3.57 y 9.26 |
| Fenbendazol | 1.60 | 3.93 | 4.06 y 9.59 |
| Albendazol | 26.58 | 3.83 | 2.80 y 10.26 * |

*(Jung et al., 1998)

2.5 Farmacodinamia

Al igual que otros benzimidazoles, el OXZ inhibe el ensamblaje de microtúbulos al unirse a la tubulina presente en el tegumento del parásito, lo que resulta en la interrupción del citoesqueleto, la migración de orgánulos subcelulares y la división celular. Al igual que el ALB y el MBZ, el OXZ, inhibe la formación de microtúbulos helmínticos, presentando una mayor potencia. (Bach et al., 2021).

2.6 Farmacocinética

En el año 2019, An y colaboradores, evaluaron la farmacocinética, tolerabilidad y seguridad del OXZ en 70 voluntarios sanos, administrando dosis de 0.5 a 60 mg/kg o placebo durante 14 días. Tras la administración oral, el OXZ fue absorbido rápidamente, alcanzando su concentración máxima en 2 horas. La concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$) aumentó de 944 ng/mL con la dosis de 0.5 mg/kg a 6,770 ng/mL con 60 mg/kg, mostrando una farmacocinética no lineal, ya que el aumento en la $C_{m\acute{a}x}$ y el área bajo la curva ($AUC_{0-\infty}$) no fue proporcional al incremento de la dosis.

También evaluaron dos metabolitos de fase I del OXZ, sulfona de oxfendazol (OXZSO) y fenbendazol (FBZ). Se encontró que la $C_{m\acute{a}x}$ de OXZSO oscila entre el 5.6% y el 7.1% de los valores de $C_{m\acute{a}x}$ de OXZ. Para FBZ fue incluso menor, con proporciones $<0.4\%$. Además de los metabolitos de fase I, también se detectaron en las muestras de orina dos metabolitos de fase II, glucurónido de oxfendazol y sulfato de oxfendazol.

Se desconocen las enzimas responsables de metabolizar el OXZ a su sulfona en mamíferos. No obstante, se sabe que el metabolismo de ABZ a ABZSO en humanos, se lleva a cabo principalmente por la flavinmonooxigenasa (FMO) y el citocromo CYP3A4. Es probable que el OXZ se metabolice por las mismas vías. (Bach et al., 2021).

En el caso del FBZ, en varios modelos animales, se demostró que este puede ser oxidado por las enzimas hepáticas a oxfendazol y que a su vez el oxfendazol puede ser reducido de nuevo a fenbendazol (Bogan & Marriner, 1983).

En el estudio en humanos de 2019 se determinó que la fracción media de oxfendazol libre excretado en la orina fue inferior al 1 % de la dosis. El aclaramiento renal calculado del oxfendazol fue bajo, con valores que oscilan entre 9.42 y 16.3 mL/h. La semivida de eliminación de la fase terminal media del oxfendazol varió de 8.5 a 10.3 h, en promedio.

En estudios de farmacocinética preclínica se encontró que el OXZ se elimina principalmente a través de la excreción biliar, y la mayoría en forma de amina libre o de oxfendazol 4'-hidroxilado conjugado con sulfato o glucurónido (Bach et al., 2021). En la figura 5 se presentan las estructuras del oxfendazol y sus metabolitos.

Bach y colaboradores en el año 2020, evaluaron la farmacocinética del OXZ con dosis ascendentes (3, 7.5 y 15 mg/kg) así como el efecto de los alimentos. Los resultados mostraron que la dosis de 3 mg/kg junto con una dieta rica en grasas alcanzó una $C_{m\acute{a}x}$ de 4500 ng/mL, mientras que la dosis de 7.5 mg/kg sin alimentos alcanzó una $C_{m\acute{a}x}$ de 4780 ng/mL. Sin embargo, ya sea que se administre después de un ayuno nocturno o después del consumo de una comida rica en grasas, la $C_{m\acute{a}x}$ del OXZ es mayor que la del ABZSO o que la del MBZ (tabla 5) .

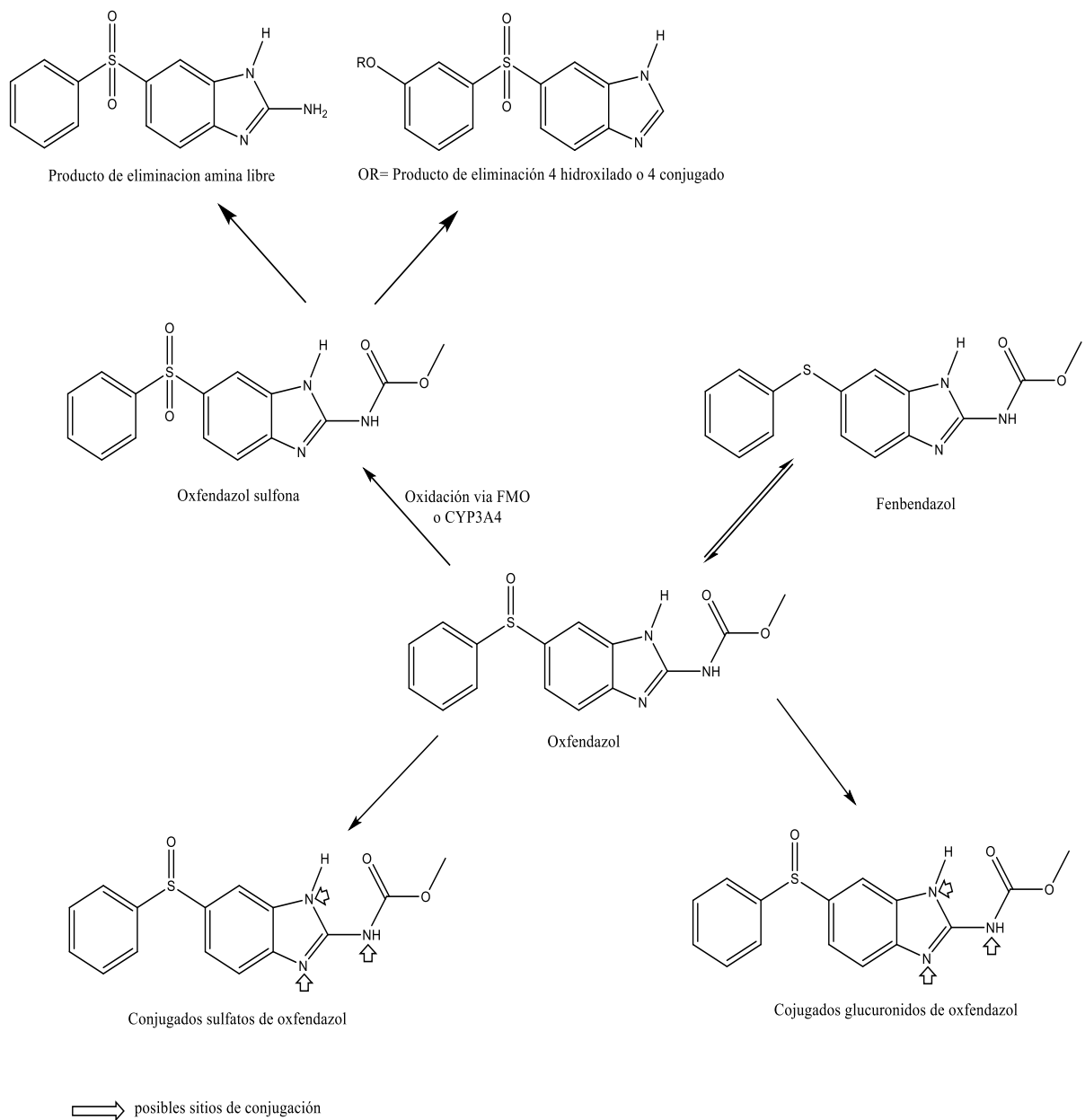


Figura 5. Estructuras del oxendazol y sus metabolitos, así como las vías de eliminación propuestas en humanos. Basado en el esquema de An et al., 2019.

Tabla 5. Comparación de los principales parámetros farmacocinéticos del OXZ, ALBSO y MBZ (Bach et al., 2020)

| Parámetro | Oxfendazol | | Sulfóxido de albendazol | | Mebendazol | |
|--------------------------|-------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|------------|----------------------|
| | Ayuno | Dieta alta en grasas | Ayuno | Dieta alta en grasas | Ayuno | Dieta alta en grasas |
| Dosis | 3 mg/kg (~200 mg) | | 400 mg | | 500 mg | |
| C _{máx} (ng/mL) | 3,010 | 4,500 | 220 | 1,310 | 14.0 | 56.2 |
| T _{máx} (h) | 1.99 | 8.90 | 2.25 | 3.75 | 1.5 | 4.0 |
| AUC (ng*h/mL) | 31,600 | 58,900 | 1,090 | 5,460 | 175 | 456 |

2.7 Validación de métodos bioanalíticos

Un método bioanalítico se define como un conjunto de procedimientos utilizados para cuantificar la concentración de analitos en muestras biológicas, como sangre, plasma, suero u orina. La validación de estos métodos es esencial para garantizar la confiabilidad de los resultados en estudios preclínicos, clínicos y biofarmacéuticos, entre ellos, estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia.

La guía ICH M10, sobre la validación de métodos analíticos, es el principal documento regulatorio a nivel internacional en el ámbito bioanalítico. Su propósito es proporcionar directrices y recomendaciones para la validación de ensayos en fluidos biológicos. En México, la NOM-177-SSA1-2013 establece los criterios y requisitos específicos para la validación de metodologías analíticas en muestras biológicas.

Las normativas incluyen diferentes elementos y parámetros necesarios para la validación de técnicas cromatográficas con fines bioanalíticos. En la tabla 6, se presenta una comparación de los criterios de validación de las guías mencionadas anteriormente.

Tabla 6. Comparación de los criterios de aceptación de las guías internacionales de validación de métodos bioanalíticos con respecto a la normativa mexicana.

| Parámetro | NOM-177-SSA1-2013 | ICH M10 |
|--|---|--|
| Selectividad | La respuesta analítica de las posibles interferencias debe ser < 20% del LIC < 5% para el EI. | Las interferentes no deben ser más del 20 % del LLOQ y no más del 5 % de la respuesta del IS en la muestra del LLOQ. |
| Especificidad | NA | Los interferentes no deben ser más del 20 % del LLOQ y no más del 5 % del IS en la muestra del LLOQ. |
| Acarreo | Se realiza para métodos por espectrometría de masas. La respuesta analítica de las posibles interferencias debe ser < 20 % del LIC < 5 % para el EI. | El arrastre en el blanco después del estándar de calibración más alto no debe ser mayor que el 20 % del LLOQ y del 5 % del IS. |
| Límite inferior de cuantificación (LIC) | Debe ser el 5 % de la C _{máx.} % CV ≤ 20 % % Desviación ≤ 20% | LLOQ, es el estándar de calibración más bajo. % CV ≤ 20% % Desviación ≤ 20 % |
| Curva de calibración | Los datos de concentración recuperada deben estar dentro del 15 % de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el LIC ≤ 20% | Cada nivel de concentración debe estar dentro del ±15 % de la concentración nominal, excepto en el LLOQ, donde debe estar dentro del ±20 %. El %CV de las concentraciones determinadas en cada nivel no debe exceder el 15%, excepto en el LLOQ, donde no debe exceder el 20%. |
| Precisión | %CV del valor promedio de cada nivel de concentración deberá ser ≤ 15 % y para el LIC ≤ 20 % | El %CV de las concentraciones determinadas en cada nivel no debe exceder el 15 %, excepto en el LLOQ, donde no debe exceder el 20 %. |
| Exactitud | % desviación ≤ 15 % y para el LIC ≤ 20 % | dentro de ±15 % de la concentración nominal, excepto en el LLOQ, donde debe estar dentro de ±20 % |
| Estabilidad | La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15 % de la concentración nominal. Las soluciones serán consideradas estables si la desviación de la respuesta analítica promedio con respecto a la obtenida con muestras recién preparadas no es mayor que 10 %. | La concentración media en cada nivel de control de calidad debe estar dentro del ±15 % de la concentración nominal. |

2.8 Métodos analíticos para la cuantificación de oxfendazol en plasma por CLAR

Se han desarrollado numerosos métodos de cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR) para medir las concentraciones de OXZ en muestras sanguíneas de animales. A la fecha solo existe un método reportado para la cuantificación en plasma humano empleando la técnica de cromatografía de líquidos acoplado a masas/masas (CLAR MS/MS) (Bach et al., 2019).

En la tabla 7, se resumen las técnicas por HPLC reportadas para cuantificar OXZ en plasma o tejidos.

Tabla 7. Métodos analíticos reportados para la cuantificación de OXZ o FBZ en muestras de modelos animales. EFS=Extracción en fase sólida, ELL= Extracción líquido-líquido, PP= precipitación de proteínas.

| Referencia | Condiciones cromatográficas | | Condiciones de extracción | | |
|---|---|--|---------------------------|------------------------------|--------------|
| | Columna | Fase móvil | Técnica | Muestra | Recobro |
| (Iosifidou & Haagsma, 1996) | Lichrosorb RP8 de 20 cm | NH ₄ H ₂ PO ₄ 0.05 M pH 5.0/ ACN/ MeOH (55/28/17) | EFS | Músculo de pescado | >80% |
| (Gokbulut et al., 2006, 2007) | Macherey-Nagel, C18, (250x4.6mm, 4µm) | Gradiente de elución ACN:CH ₃ COOH 0.5% | ELL Cloroformo | Plasma de burro y perro | >90% |
| (Moreno et al., 2012) | Kromasil, C18, (250x4.6 mm, 5 µm) | Gradiente de elución ACN: CH ₃ COONH ₄ 0.025 M, pH 6.6 | PP Acetonitrilo | Plasma de cerdo | >70% |
| (Cox et al., 2011) | Waters Sunfire C18 (150 mm 4.6 mm, 5 mm) | KH ₂ P0 ₄ 0.037 M pH 3.75/ ACN (40/60) | ELL Metanol | Artemia salina | >93% |
| (Lakritz et al., 2015) | C18 (250x4.6 mm, 5 µm) | H ₃ PO ₄ 0.01 M pH 4.0/ACN 60/40 | ELL Metiliterbutileter | Plasma de alpacas | >70% |
| (Ballent et al., 2018) | Kromasil, Eka Chemicals, Bohus, Sweden, 5 µm, 4.6 × 250 mm | Gradiente de elución ACN: CH ₃ COONH ₄ 0.025 M, pH 6.6 | PP y EFS | Plasma de bovino | - |
| (Ozdemir Kutahya et al., 2023; Sun et al., 2022b) | Ecilpse XDB-C18 (4.6x250 mm, 5 µm) | Gradiente de elución A: CH ₃ COONH ₄ 0.02 M B: ACN | PP y ELL | Plasma de oveja | >89% |
| (Ali et al., 2021) | Thermo Scientific® BDS Hypersil C8 column (5 µm, 250 × 4.60 mm) | KH ₂ P0 ₄ 0.025 M pH 3.20/ MeOH (40/60) | PP con MeOH | Fenbendazol en plasma humano | >99% |
| (Ozdemir Kutahya et al., 2023) | Inertsil ODS-3, C18 (250× 4.6 mm, 5 µm) | ACN/ CH ₃ COOH 0.5% (45:55) | ELL Metiliterbutileter | Plasma de ovejas y cabras | >90% |
| (Bach et al., 2019) | CLAR/MS/MS Phenomenex Synergi™ C18 (150 × 2 mm, 4 µm) | H ₂ O-ACN (50:50, v/v) | PP Acetonitrilo | Plasma de voluntarios sanos | 71.2 – 98.5% |

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La neurocisticercosis continúa siendo un problema severo de salud pública en los países en desarrollo, especialmente latinoamericanos. A la fecha existen 2 fármacos para su tratamiento, el ABZ y el PZQ. Ambos presentan una gran variabilidad en sus respuestas terapéuticas. Esto se debe en gran medida, a la baja solubilidad del ABZ y al extenso metabolismo de primer paso que sufre el PZQ.

El oxfendazol surge como un agente prometedor en este contexto. Estudios preclínicos realizados en modelos porcinos han demostrado que el OXZ tiene una actividad significativa contra las formas tisulares de *Taenia solium* (cisticercosis). Asimismo, el primer estudio en voluntarios sanos reportó que el OXZ, tuvo una concentración plasmática superior en comparación con ABZ y MBZ.

Debido a las propiedades antiparasitarias del oxfendazol, resulta fundamental realizar estudios de farmacocinética y de monitoreo terapéutico en pacientes que permitan comprender la disposición de este fármaco en el organismo. Para ello, es necesario contar con un método analítico confiable que permita la cuantificación precisa y exacta del oxfendazol en matrices biológicas.

4 HIPÓTESIS

Si el método analítico para cuantificar OXZ en plasma humano cumple con los criterios de desempeño, selectividad, linealidad, precisión y exactitud, será confiable y se podrá utilizar en futuros estudios de farmacocinética.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Desarrollar un método analítico para cuantificar oxfendazol en plasma humano utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución.

5.2 Objetivos particulares

1. Seleccionar las condiciones cromatográficas: fase móvil y velocidad de flujo que permitan obtener un tiempo de corrida adecuado y una buena resolución entre el OXZ y los componentes del plasma humano.
2. Evaluar diferentes moléculas con propiedades fisicoquímicas similares al OXZ para determinar la más adecuada para su uso como estándar interno en la cuantificación de OXZ.
3. Establecer las condiciones de extracción que permitan obtener el mayor recobro de OXZ del plasma humano.
4. Validar el método analítico utilizando los lineamientos que marca la norma oficial mexicana: NOM-177-SSA1-2013.

6 METODOLOGÍA

6.1 Materiales, reactivos y equipos

6.1.1 Sustancias de referencia

- Oxfendazol, estándar de referencia. Pureza 98.5%, Supelco Merck.
- Fenbendazol, estándar de referencia. Pureza 98.6%, Supelco Merck.

6.1.2 Reactivos

- Agua grado HPLC
- Metanol grado HPLC, J.T. Baker®
- Acetonitrilo HPLC, J.T. Baker®
- Acetato de sodio trihidratado, J.T. Baker®
- Ácido acético glacial, J.T. Baker®
- Dimetilsulfóxido, J.T. Baker®
- Acetato de etilo, J.T. Baker®
- Éter etílico, J.T. Baker®
- Hidróxido de sodio, Macron fine chemicals

6.1.3 Consumibles cromatográficos

- Membranas de filtración: Millipore nylon 0.45 μm .
- Sistema de filtración para disolventes HPLC.
- Columna cromatográfica: Phenomenex Gemini C18 150 x 4.6 mm, 5 μm .

6.1.4 Equipos e instrumentos

- Balanza analítica Sartorius, modelo: ENTR16224I-15
- Parilla de calentamiento y agitación Thomas Scientific
- Potenciómetro, HANNA Instruments, HI2211
- Baño sonicador, Fisher Scientific FS160
- Vortex, Science MED MX-S
- Centrífuga, Hettich Universal 32 R
- Evaporador con corriente de nitrógeno y baño maría
- Cromatógrafo de líquidos Shimadzu LC 10A, detector SPD-10A UV/vis
- Refrigerador, Nieto REB-450

6.2 Preparación de soluciones

6.2.1 Preparación de soluciones reactivo

Solución amortiguadora de acetato de sodio 0.025 M pH 5.0. Para 500 mL de la solución, se pesó 1.0 g de acetato de sodio trihidratado y se disolvió con agua. Antes de llegar al aforo, se midió el pH inicial y se ajustó con ácido acético 0.01 M, hasta un pH de 5.0. Se completó el aforo con agua y se agitó manualmente.

Ácido acético 0.01 M. Se tomaron 0.6 mL del ácido acético glacial y se diluyeron con agua en un matraz aforado de 10 mL. De esta solución se tomaron 0.1 mL y se colocaron en un matraz aforado de 10 mL.

Hidróxido de sodio 0.1 N. Se pesaron 0.1 g de hidróxido de sodio y se disolvieron con agua en un matraz aforado de 25 mL.

Fase móvil. Para 500 mL de fase móvil, se midieron con probeta 210 mL de acetato de sodio trihidratado 0.025 M pH 5.0, 210 mL de acetonitrilo y 80 mL de metanol grado HPLC. La mezcla se agitó vigorosamente y se sónico por 30 min antes de conectar al sistema cromatográfico.

6.2.2 Preparación de soluciones estándar

Solución stock de OXZ 1000 µg/mL. Se pesaron 10 mg de OXZ, se transfirieron cuidadosamente a un matraz volumétrico de 10 mL. Se disolvieron con 0.5 mL de DMSO. La solución se sónico por 5 min. Se aforó con metanol.

Solución estándar de OXZ 300 µg/mL. Se tomaron 6 mL de la solución stock de OXZ y aforó a 20 mL con fase móvil.

Solución stock de CBZ 500 µg/mL. Se pesaron 10 mg del estándar, se transfirieron cuidadosamente a un matraz volumétrico de 20 mL. Se disolvieron con 1 mL de metanol. La solución se sonicó por 5 min y se aforó con metanol.

Solución estándar interno de carbamazepina CBZ 13 µg/mL. De la solución stock de CBZ 500 µg/mL se tomaron 1.3 mL y se colocaron en un matraz de 50 mL, posteriormente se aforó con fase móvil.

Solución de adecuabilidad del sistema OXZ 12 µg/mL y CBZ 13 µg/mL. Se tomaron 0.4 mL de la solución estándar de OXZ 300 µg/mL y se colocaron en un matraz volumétrico de 10 mL. En el mismo matraz se colocaron 0.26 mL de la solución estándar de CBZ 500 µg/mL.

6.2.3 Curva de calibración en solución

El rango de la curva en solución se estableció de 3 a 48 µg/mL. En la tabla 8, se muestran los volúmenes empleados para preparar la curva de calibración en solución.

Tabla 8. Curva de calibración en solución

| Solución | | | |
|-------------------|---------------|--------------------|-----------------------|
| Solución estándar | Alícuota (mL) | Volumen final (mL) | Concentración (µg/mL) |
| OXZ 300 µg/mL | 0.1 | 10 | 3 |
| | 0.2 | 10 | 6 |
| | 0.4 | 10 | 12 |
| | 0.8 | 10 | 24 |
| | 1.0 | 10 | 30 |
| | 1.2 | 10 | 36 |
| | 1.6 | 10 | 48 |

6.2.4 Soluciones de trabajo

A partir de la solución estándar de OXZ 300 µg/mL, se prepararon las soluciones de trabajo como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Preparación de soluciones de trabajo de OXZ en solución

| Solución | | | |
|-------------------|---------------|--------------------|-----------------------------|
| Solución estándar | Alícuota (mL) | Volumen final (mL) | Concentración final (µg/mL) |
| OXZ 300 µg/mL | 0.2 | 10 | 6 |
| | 0.4 | 10 | 12 |
| | 0.8 | 10 | 24 |
| | 1.6 | 10 | 48 |
| | 2.0 | 10 | 60 |
| | 2.4 | 10 | 72 |
| | 3.2 | 10 | 96 |

6.3 Curva de calibración de OXZ en plasma

De las soluciones de trabajo, se prepararon los puntos de la curva de calibración en plasma como se muestra en la tabla 10. El aforo a 1 mL se realizó con plasma humano previamente centrifugado.

Tabla 10 . Preparación de curva de calibración en plasma

| Solución | | Plasma | | |
|-----------------------|---------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| Concentración (µg/mL) | Alícuota (mL) | Volumen plasma (mL) | Volumen final (mL) | Concentración (µg/mL) |
| 6 | 0.05 | 0.95 | 1 | 0.3 |
| 12 | 0.05 | 0.95 | 1 | 0.6 |
| 24 | 0.05 | 0.95 | 1 | 1.2 |
| 48 | 0.05 | 0.95 | 1 | 2.4 |
| 60 | 0.05 | 0.95 | 1 | 3.0 |
| 72 | 0.05 | 0.95 | 1 | 3.6 |
| 96 | 0.05 | 0.95 | 1 | 4.8 |

6.4 Muestras control

De acuerdo con la NOM-177-SSA1-2013, para validar y monitorear el desempeño de un método analítico, se deben preparar las siguientes muestras control (MC): muestra control baja (MCB) correspondiente hasta 3 veces el límite inferior de cuantificación (LIC), muestra control media (MCM), que deberá encontrarse entre la MCB y la muestra control alta (MCA).

Esta última, deberá tener una concentración entre el 75-85% de la concentración del límite superior de cuantificación. Así, las MC seleccionadas para el presente trabajo fueron: LIC 0.3 µg/mL, MCB 0.9 µg/mL, MCM 1.8 µg/mL y MCA 3.9 µg/mL. En la tabla 11, se describe la preparación de estas

Tabla 11. Preparación de muestras control

| Solución | | Plasma | | | |
|-----------------------|---------------|---------------------|--------------------|-----------------------|-----------------|
| Concentración (µg/mL) | Alícuota (mL) | Volumen plasma (mL) | Volumen final (mL) | Concentración (µg/mL) | Muestra control |
| 6 | 0.05 | 0.95 | 1 | 0.3 | LIC |
| 18 | 0.05 | 0.95 | 1 | 0.9 | MCB |
| 36 | 0.05 | 0.95 | 1 | 1.8 | MCM |
| 78 | 0.05 | 0.95 | 1 | 3.9 | MCA |

6.5 Desarrollo del método analítico

6.5.1 Detección de longitud de máxima absorción

Como primer paso del desarrollo, se estableció la longitud de máxima absorción del OXZ. Para ello se preparó una solución de OXZ 10 µg/mL en fase móvil CH₃COONa 0.025 M pH 5.0/ ACN/ MeOH (42:42:16). La solución se sometió a un barrido espectrofotométrico de 200 a 400 nm.

6.5.2 Selección de la fase móvil y la columna cromatográfica

Con el fin de encontrar las condiciones cromatográficas que permitieran obtener la separación del oxfendazol de los componentes del plasma humano, se evaluaron las siguientes fases móviles:

- KH₂P0₄ 0.025 M pH 3.20/ MeOH (40/60)
- NH₄H₂PO₄ 0.05 M pH 5.0/ ACN/ MeOH (55/28/17)
- H₃PO₄ 0.01 M pH 4.0/ACN 60/40
- KH₂P0₄ 0.037 M pH 3.75/ ACN (40/60)

Las columnas seleccionadas fueron:

- Ultisil XB-C18, 4.6×250mm 5µm
- Agilent Zorbax 300SB0-C8, 250 x 4.6 mm, 5 µm
- Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6 mm, 5 µm

6.5.2 Selección del estándar interno (EI)

En el presente proyecto se evaluaron tres candidatos como posibles estándares internos: carbamazepina, albendazol y mebendazol.

Para el estándar de MBZ, se pesaron 15 mg del estándar, se disolvieron con un 1 mL de ácido fórmico y se aforó con metanol a 100 mL. De esta solución se tomaron 1.2 mL y se aforó con fase móvil a 10 mL para tener una concentración final de 18 µg/mL.

Para el estándar de ABZ, se pesaron 10 mg del estándar y se disolvieron con 2.5 mL de DMSO, se sonicó por 10 min y se aforó a un volumen de 100 mL con metanol. Luego se tomó 1.0 mL y se aforó a 10 mL con fase móvil. La concentración final fue de 10 µg/mL.

Por último, para el estándar de CBZ, se pesaron 10 mg del estándar y se disolvieron con 1.0 mL de metanol. Se sonicó por 5 minutos. Se aforó un volumen de 20 mL con metanol. Luego se tomó 1.3 mL y se aforó a 50 mL con fase móvil. La concentración final fue de 13 µg/mL.

6.6 Selección del método de extracción

Una de las técnicas más útiles para separar los analitos de interés de matrices biológicas, es la extracción líquido-líquido (ELL). Es un procedimiento sencillo, rápido, de bajo costo, y con una buena tasa de rendimiento.

6.6.1 Condiciones de extracción

En la tabla 12 se muestran las variables evaluadas, que fueron el disolvente de extracción y el volumen del disolvente para la extracción.

Tabla 12. Condiciones evaluadas para la extracción del OXZ del plasma

| Condición | Variable a evaluar | |
|-----------------------|--------------------|--------------------|
| Disolvente | Acetato de etilo | Metiliterbutileter |
| Volumen de extracción | 3 mL | 5 mL |

6.6.2 Selección del disolvente de extracción

Se probaron dos disolventes de extracción, acetato de etilo y metiliterbutileter. Se eligió aquel disolvente que permitiera obtener recobros superiores al 70%.

6.6.3 Procedimiento de extracción

El procedimiento de extracción consistió en tomar 1 mL de plasma enriquecido con las diferentes concentraciones de analito, agitar en vortex 30 s para homogeneizar la muestra de plasma, añadir 100 µL del estándar interno seleccionado y agitar por 30 s, añadir 200 µL de hidróxido de sodio 0.1 N y agitar por 30 s, añadir 5 mL del disolvente de extracción seleccionado y agitar por 1 min, centrifugar a 4000 rpm por 10 min, separar la fase orgánica con pipeta Pasteur, evaporar la fase orgánica en baño de agua a 40°C bajo corriente de nitrógeno, y reconstituir con fase móvil para su inyección al cromatógrafo.

6.6.4 Selección del volumen de extracción

Se probaron dos volúmenes de extracción diferentes, 3 y 5 mL. Para ello se preparó una curva de calibración en solución y dos curvas de calibración en plasma una con cada uno de los volúmenes de extracción y se calculó el porcentaje de extracción. Se eligió aquel volumen que permitiera un mayor recobro con un menor coeficiente de variación.

6.7 Validación del método

La Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, establece que los métodos analíticos en fluidos biológicos deben cumplir con parámetros como, selectividad, límite inferior de cuantificación, curva de calibración (linealidad), precisión como repetibilidad y reproducibilidad, exactitud y estabilidad de la muestra. La metodología fue la siguiente:

6.7.1 Selectividad.

Se evaluó la capacidad del método para identificar y cuantificar el analito de interés en presencia de otros compuestos de la muestra. Para ello, se analizaron de forma individual, seis muestras de plasma blanco provenientes de seis voluntarios sanos, una muestra de plasma proveniente de la mezcla de las muestras individuales (pool) y cinco muestras de plasma humano adicionado con fármacos de uso concomitante: dexametasona, metilprednisolona, paracetamol, ketorolaco y tramadol.

Criterio de aceptación: La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20% para el LIC del analito y del 5% para el EI.

6.7.2 Curva de calibración

El diseño de la curva de calibración se realizó en función de las concentraciones esperadas de OXZ en plasma humano. Dado que el $C_{m\acute{a}x}$ reportado de OXZ a una dosis de 3 mg/kg es de $3 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$, el rango propuesto para la curva de calibración fue de 0.3 a 4.8 $\mu\text{g/mL}$, con 7 puntos de concentración: 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 3.0, 3.6 y 4.8 $\mu\text{g/mL}$.

Posteriormente, se prepararon y analizaron tres curvas de calibración en plasma. Cada curva incluyó una muestra blanco y una muestra 0 (muestra blanco con adición del EI). Se construyó un diagrama de dispersión de los datos y se seleccionó el mejor modelo matemático que relacionara las variables razón de áreas (OXZ/EI) y concentración de OXZ. A partir de este, se calculó la pendiente(m), la ordenada al origen (b) y los coeficientes de correlación y determinación (r , r^2).

Criterio de aceptación: los datos de concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación, ya que puede ser menor o igual que el 20%. Al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración con un mínimo de 6 puntos deben cumplir con este criterio.

6.7.3 Límite inferior de cuantificación

El LIC se definió como la mínima concentración cuantificable con precisión y exactitud. Para validar el LIC, se prepararon y analizaron por quintuplicado muestras de plasma 0.3 $\mu\text{g/mL}$. Se calculó la concentración recuperada interpolando las respuestas de cada muestra en una curva de calibración preparada el mismo día y se determinó el CV%.

Criterio de aceptación: el CV% debe ser $\leq 20 \%$

6.7.4 Precisión

Para evaluar la repetibilidad, en un mismo día, se analizaron 5 réplicas del LIC, MCB, MCM y MCA. Se calculó la concentración recuperada interpolando la respuesta de cada muestra en una curva de calibración preparada el mismo día y se determinó el CV%.

Criterio de aceptación: El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15 %, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20 %.

Para evaluar la reproducibilidad, se analizaron por quintuplicado las muestras LIC, MCB, MCM y MCA, en tres días diferentes y en tres corridas analíticas diferentes.

Criterio de aceptación: el CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15 %, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que el 20 %.

6.7.5 Exactitud

De los datos de repetibilidad se calculó la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación) mediante la expresión:

$$\% \text{ desviación} = \frac{\text{concentración nominal} - \text{concentración obtenida}}{\text{concentración nominal}} \times 100$$

Criterio de aceptación: el valor promedio del porcentaje de desviación no debe ser mayor que el 15 %, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20 %.

6.7.6 Estabilidad en plasma

Se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo en las que el OXZ permanece estable en plasma. Para ello, se prepararon por triplicado las muestras MCB (0.9 µg/mL), MCA (3.9 µg/mL) y se realizaron las siguientes pruebas:

6.7.6.1 Estabilidad a corto plazo

Se prepararon por triplicado dos series de muestras control alto y bajo. Una de las series se mantuvo en la mesa de trabajo durante 5 horas. La otra serie se sometió a condiciones de refrigeración (2 a 8°C) por 24 horas. Después de cumplir el tiempo de prueba, las muestras fueron procesadas y analizadas junto con una curva de calibración recién preparada.

6.7.6.2 Estabilidad de la muestra procesada y estabilidad en el automuestrador

Se prepararon y procesaron por triplicado dos series de muestras control alto y bajo. Una de las series se mantuvo en el automuestrador por 24 horas (estabilidad en el automuestrador). La otra serie se almacenó en refrigeración (2 a 8°C) por 24 horas. Posteriormente las muestras se analizaron junto con una curva de calibración recién preparada.

6.7.6.3 Estabilidad a largo plazo y ciclos congelación – descongelación

Se prepararon dos series de tres muestras control MCA y MCB cada una y se almacenaron en congelación (-20°C) por tres meses. Transcurrido el tiempo de almacenamiento, la primer serie fue descongelada y analizada junto con una curva de calibración preparada el mismo día del análisis. Ese mismo día, la segunda serie fue descongelada a temperatura ambiente (1 ciclo). Inmediatamente después fue congelada a -20°C y descongelada nuevamente (2 ciclo). Después del tercer ciclo, las muestras fueron procesadas y analizadas.

Criterio de aceptación. La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal

6.7.7 Estabilidad en solución

Se evaluó la estabilidad de las soluciones de trabajo OXZ y CBZ. Para ello, se preparó una solución de OXZ 48 µg/mL como se describe en la tabla 1. De esta solución, se preparó por triplicado una dilución 1 a 10 con fase móvil. Las diluciones fueron almacenadas en refrigeración a un temperatura de 2 a 8°C.

Para el estándar de carbamazepina, se preparó por triplicado una solución de CBZ 13 $\mu\text{g/mL}$, siguiendo el procedimiento descrito en la sección preparación de soluciones (Solución estándar interno carbamazepina CBZ 13 $\mu\text{g/mL}$). Las soluciones se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 2 a 8°C.

La respuesta analítica de las soluciones se determinó espectrofotométricamente hasta por 30 días.

Criterio de aceptación: las soluciones serán consideradas estables si la desviación de la respuesta analítica promedio con respecto a la obtenida con muestras recién preparadas no es mayor que 10%.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Determinación de la longitud de máxima absorción

En la figura 6, se muestra el espectro de absorción de una solución de oxfendazol 10 $\mu\text{g/mL}$ disuelto en fase móvil. Se observa que la longitud de onda de máxima de absorción fue 296 nm.

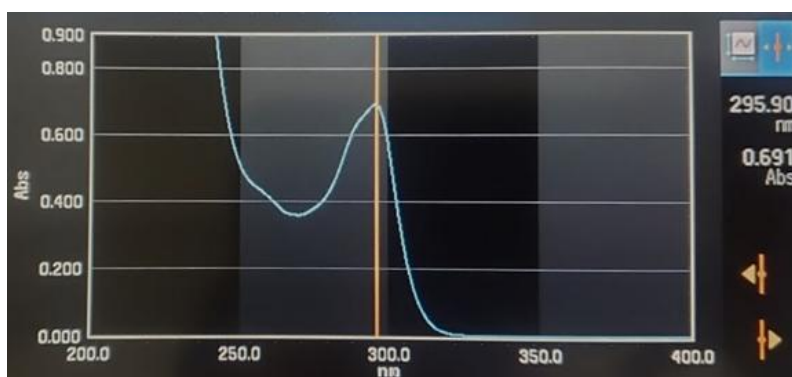


Figura 6 Espectro de absorción del OXZ

7.2 Selección de la fase móvil

En el desarrollo del método analítico para cuantificar oxfendazol, se contempló que el tiempo retención de OXZ y FBZ fuera corto, y que el perfil de los picos fuera simétrico.

Considerando que el FBZ puede eluir en la misma corrida, fue necesario determinar que no hubiera interferencia en la cuantificación de OXZ. Asimismo, se consideró importante garantizar que el tiempo de corrida fuera el adecuado, para evitar que el FBZ se quedara retenido en la columna.

En las figuras 7 a 14, se presentan los cromatogramas obtenidos al utilizar distintas fases móviles y columnas.

Al emplear la fase móvil KH_2PO_4 0.025 M pH 3.20/MeOH (40/60) en una columna Ultisil XB-C18 (4.6×250mm, 5 μm) y flujo de 1.2 mL/min, los tiempos de retención obtenidos fueron 8.1 min para OXZ y 37 min para FBZ (ver figuras 7 y 8). Por el tiempo de retención prolongado para el FBZ, el método no fue eficiente.

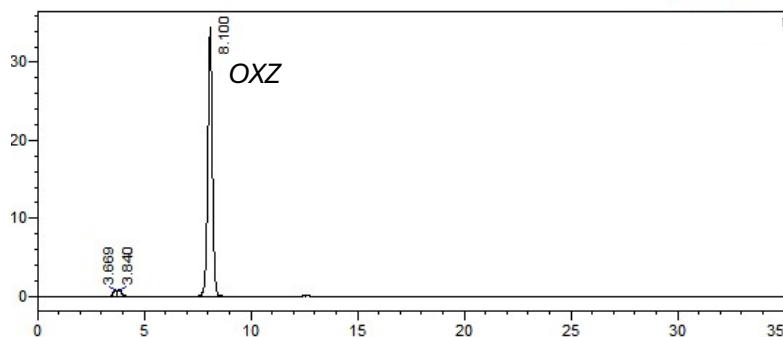


Figura 7. Cromatograma del estándar de OXZ en KH_2PO_4 0.025M pH 3.20/MeOH (40/60) y columna Ultisil XB-C18 (4.6×250mm, 5 μm).

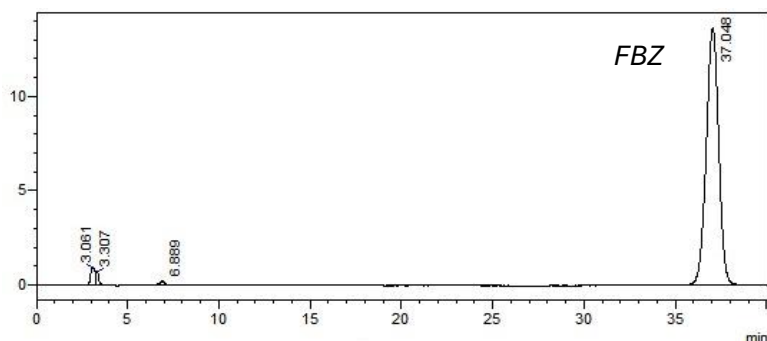


Figura 8. Cromatograma del estándar de FBZ en KH_2PO_4 0.025M pH 3.20 /MeOH (40/60) y columna Ultisil XB-C18 (4.6×250mm, 5 μm).

Posteriormente se probó la fase móvil $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.05M pH 5.0/ACN/MeOH (55/28/17), flujo 0.6 mL/min y una columna Ultisil XB-C18 (4.6×250mm, 5 μm). Con estas condiciones se obtuvieron tiempos de retención muy prolongados y se observaron picos anchos (figura 9). Se realizó una prueba más empleando una columna Agilent Zorbax 300SB-C8 (250 x 4.6 mm, 5 μm), a un flujo de 0.6 mL/min. Se obtuvieron mejores tiempos de retención (OXZ=6.2min y FBZ=16.9 min). Sin embargo, se observaron picos fronteados (figura 10).

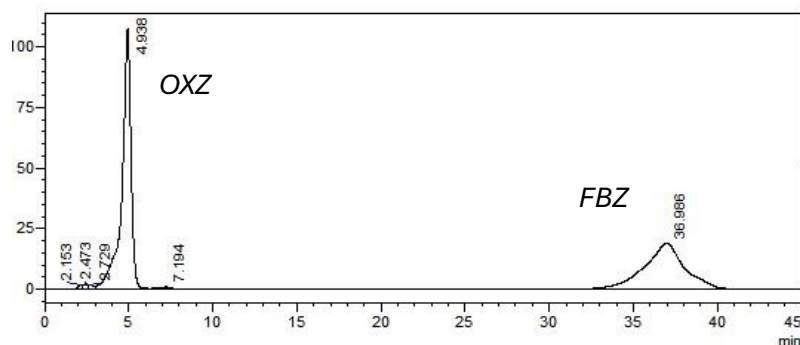


Figura 9. Cromatograma de los estándares OXZ+FBZ en $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.05M pH 5.0/ACN/MeOH (55/28/17), y columna Ultisil XB-C18 (4.6×250mm, 5 μm).

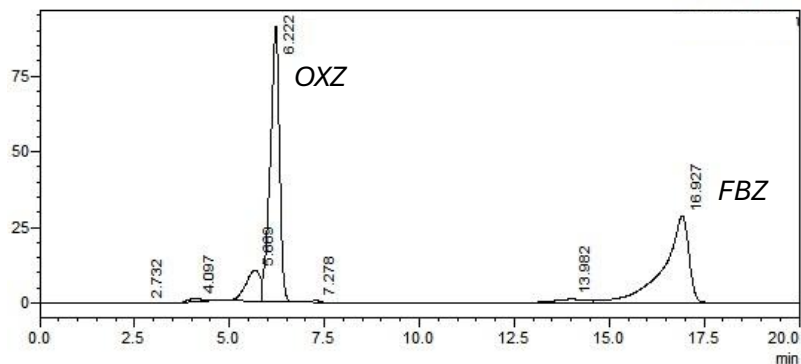


Figura 10. Cromatograma de los estándares OXZ+FBZ en $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.05 M pH 5.0/ACN/MeOH (55/28/17), Agilent Zorbax 300SB-C8 (250 x 4.6 mm, 5 μm).

La figura 11 muestra el cromatograma obtenido al utilizar la FM H_3PO_4 0.01 M pH 4.0/ACN (60/40), flujo 1.0 mL/min y una columna Ultisil XB-C18 (4.6x250mm, 5 μm). Se puede observar una señal distorsionada en el tiempo de retención cercano a 2.6 min, correspondiente al área de OXZ. Para el FBZ, se obtuvo un pico bien definido y simétrico en un tiempo de retención de 5.5 min.

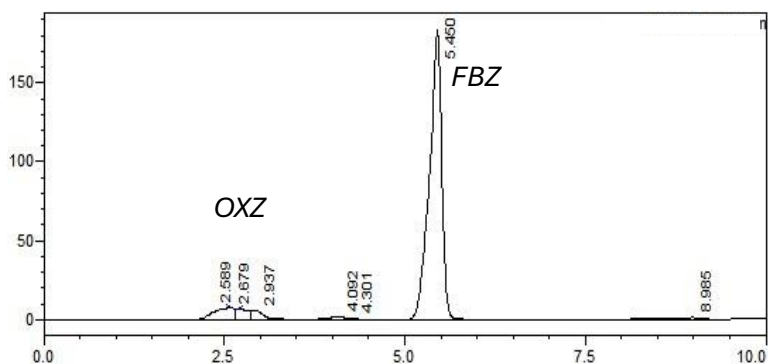


Figura 11. OXZ+FBZ en FM H_3PO_4 0.01 M pH 4.0/ACN 60/40 y columna Ultisil XB-C18 (4.6x250mm, 5 μm).

En la figura 12 se presenta el cromatograma obtenido al emplear la fase móvil KH_2PO_4 0.037M pH 3.75/ACN, 40/60, flujo 0.9 mL/min y una columna Gemini C18 (150x4.6mm, 5 μm). Se obtuvieron tiempos de retención muy cortos, para el OXZ 1.79 min y FBZ 3.3 min En la señal correspondiente al OXZ se observa un doble pico, mientras que para el FBZ el pico es simétrico y afilado.

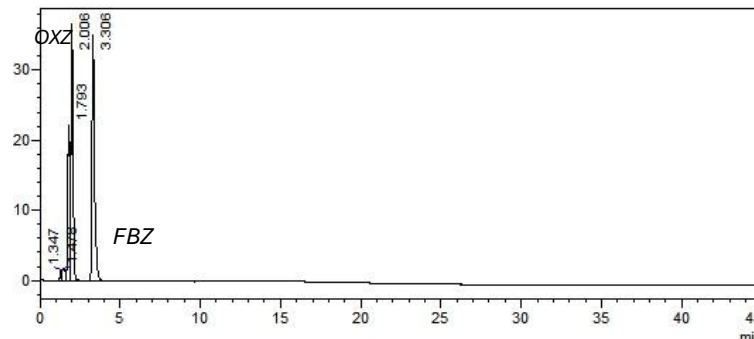


Figura 12. OXZ+FBZ en FM KH_2PO_4 0.037 M pH 3.75/ACN, 40/60, en una columna Gemini C18 (150x4.6mm, 5 μm).

El doble pico o en forma de M del cromatograma anterior (figura 12), podría deberse a que pH de la fase móvil (4.0) era cercano al pKa del analito (3.57). De acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbalch, la proporción ionizada y no ionizada sería semejante. Cuando hay concentraciones significativas tanto de formas ionizadas como neutras de un analito, la forma ionizada tendrá menos interacción hidrofóbica mientras que la neutra tendrá más interacción hidrofóbica, lo cual da lugar a picos asimétricos (Phenomenex SCIENCE UNFILTERED, 2020).

Finalmente, se optó por modificar la fase móvil que presentó los tiempos de retención más cortos con la columna que permitió la corrida analítica más rápida. Así se cambió la proporción de FM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.05 M pH 5.0/ ACN/ MeOH de 55/28/17 a 50/30/10 y se probó en una columna C18 de 15 cm. Se obtuvo un mejor perfil cromatográfico (figura 13). Posteriormente, se cambió el fosfato de amonio por acetato de sodio.

Se cambió la solución de fosfatos a acetatos, en base a la capacidad amortiguadora de una solución tampón es más efectiva cuando se utiliza en un rango cercano a su pka, típicamente a ± 1 unidad de pH.

La proporción final utilizada fue CH_3COONa 0.025 M pH 5.0/ACN/MeOH 42/42/16. Con estas condiciones se obtuvieron tiempos de retención más cortos, así como perfiles simétricos para ambos analitos (figura 14), por lo cual fue la fase móvil seleccionada para el estudio.

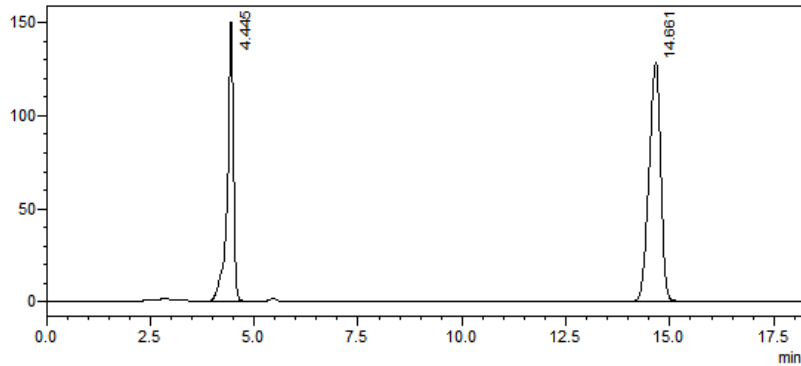


Figura 13. OXZ+FBZ en FM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.05 M pH 5.0/ ACN/ MeOH 50/30/10, columna Gemini C18 (150x4.6mm, 5 μm).

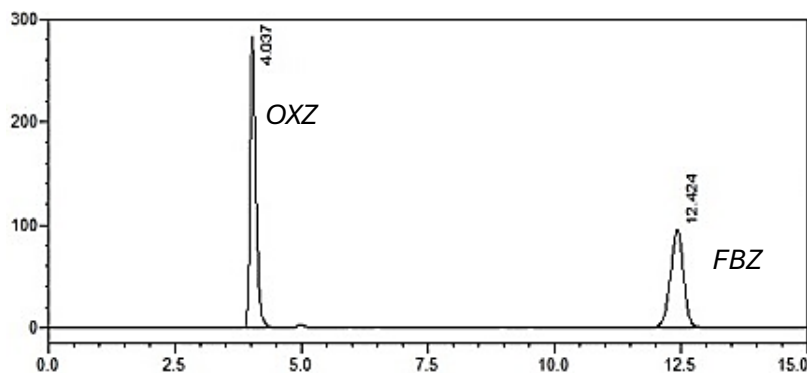


Figura 14. Cromatograma OXZ (6 $\mu\text{g/mL}$) + FBZ (10 $\mu\text{g/mL}$) en condiciones finales de fase móvil $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{ACN}/\text{MeOH}$ 42/42/16, columna Gemini C18 (150x4.6mm, 5 μm).

El pH de la solución buffer y la composición orgánica de la fase móvil son parámetros clave que influyen en la selectividad cromatográfica. La selectividad cromatográfica (α), es una medida de la retención diferencial de dos analitos (Ahuja & Dong, 2005).

El ACN y el MeOH pueden tener efectos diferentes sobre la selectividad. El metanol, al ser un disolvente más polar, puede ofrecer una mejor separación de algunos compuestos polares. El ACN, que es menos polar que el MeOH, podría modificar la selectividad, favoreciendo la elución de los analitos no polares (“The Role of Methanol and Acetonitrile as Organic in Reversed-Phase Chromatography,” 2019).

Por otra parte, cuando se mezcla ACN y MeOH con agua en la misma proporción, la solución con acetonitrilo tiene mayor fuerza de elución, lo que resulta en tiempos de retención más cortos en cromatografía de fase inversa (Shimadzu, 2024).

Esto se debe a que el ACN es menos polar que el agua, lo que reduce la polaridad general de la fase móvil. A medida que la proporción de ACN aumenta, la fuerza de elución para los compuestos no polares también aumenta, permitiendo que estos se eluyan más rápidamente. Por ello, se eligió una fase móvil con mayor proporción de acetonitrilo para reducir los tiempos de retención.

7.3 Selección del estándar interno

En la figura 15, se muestra un cromatograma de los estándares de OXZ, MBZ, ABZ y FBZ. En la figura 16 se muestra un cromatograma de los estándares de OXZ y CBZ en una muestra plasmática.

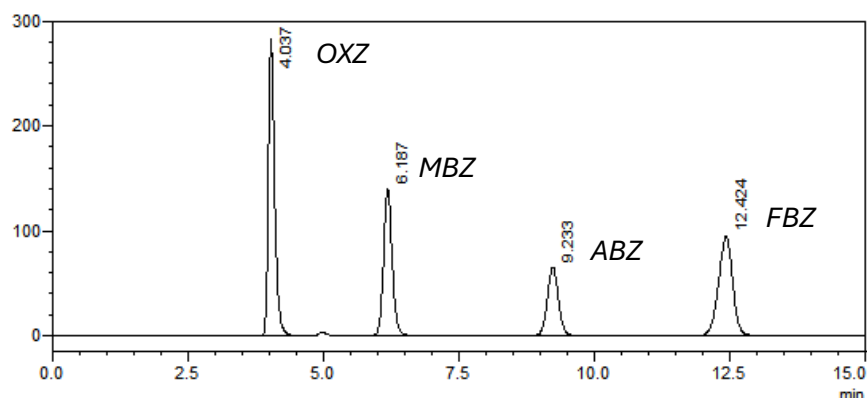


Figura 15. Cromatograma con posibles estándares internos en fase móvil CH_3COONa 0.025 M pH 5.0/ACN/MeOH 42/42/16 y columna Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6 mm, 5 μm .

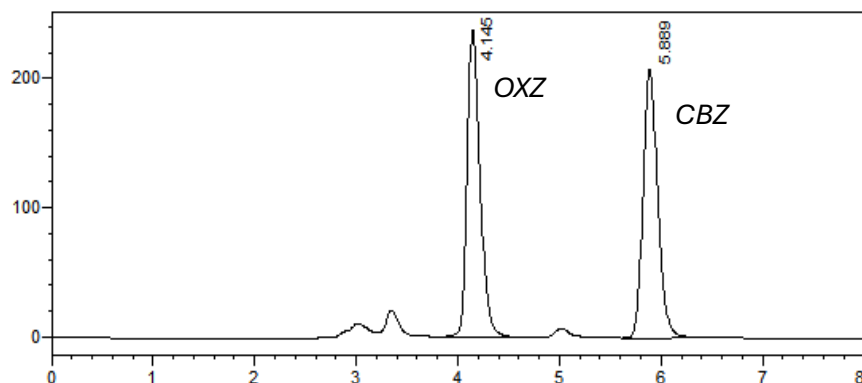


Figura 16 Muestra plasmática de oxfendazol (1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y carbamazepina (13 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en CH_3COONa 0.025 M pH 5.0/ACN/MeOH 42/42/16 en columna Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6 mm, 5 μm .

Para la selección de estándar interno se consideraron las siguientes características: el porcentaje de recobro, la simetría de pico y un tiempo de retención cercano al del OXZ. Además, debe poder agregarse en una concentración que produzca una respuesta, en área y/o en altura semejante al del compuesto principal (*Shantappa Birajdar & Birajdar, 2020*). De los 3 candidatos probados, la CBZ mostró tener un tiempo de retención más cercano al OXZ y un recobro uniforme.

7.4 Condiciones de extracción

7.4.1 Selección del disolvente de extracción

En la tabla 13, se muestra que después de la alcalización de la muestra, el mejor disolvente de extracción para el OXZ fue el acetato de etilo, con el cual, el porcentaje de recobro fue mayor al 85%, mientras que con metiliterbutieter se obtuvo un recobro menor al 50%.

Tabla 13. Recobro de OXZ diferentes solvente de extracción.

| Solvente | % Recobro | %CV |
|--------------------------|-----------|-----|
| Acetato de etilo (5 mL) | 90.31 | 5.9 |
| | 83.05 | |
| Metiliterbutieter (5 mL) | 49.41 | 9.1 |
| | 43.44 | |

7.4.2 Selección del volumen de extracción

En la tabla 14, se muestran los recobros obtenidos al realizar la extracción empleando 3 o 5 mL de acetato de etilo. Se encontró que al utilizar un volumen de 5 mL el recobro fue constante en el rango de concentración de OXZ seleccionado.

Tabla 14. Recobro de OXZ con acetato de etilo en diferentes volúmenes.

| Concentración ($\mu\text{g/mL}$) | Recobro | |
|---------------------------------------|---------|-------|
| | 5 mL | 3 mL |
| 0.3 | 92.81 | 84.50 |
| 0.6 | 88.35 | 61.22 |
| 1.2 | 93.56 | 96.68 |
| 2.4 | 99.09 | 75.92 |
| 3.6 | 102.35 | 75.21 |
| 4.8 | 88.60 | 77.65 |
| CV% | 6.0 | 14.9 |

7.4.3 Procedimiento de extracción

El procedimiento final de extracción se muestra en la figura 17. Las condiciones cromatográficas finales se describen en la tabla 15.

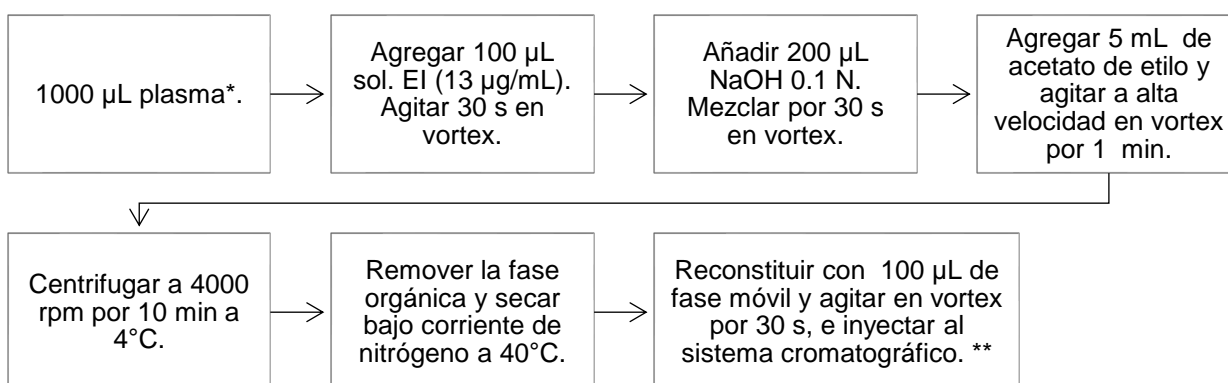


Figura 17 . Procedimiento de análisis de OXZ en plasma humano. *Muestra sin procesar. **Muestra procesada.

Tabla 15. Condiciones cromatográficas finales.

| Parámetro | Condición |
|--------------------------------|--|
| Cromatógrafo | Shimadzu LC 10 A |
| Detector | SPD-10A UV/vis |
| Columna | Gemini C18 (4.6 X 150 mm, 5 µm) |
| Temperatura de la columna | Ambiente |
| Fase móvil | CH ₃ COONa 0.025 M pH 5.0/ACN/MeOH (42/42/16) |
| Flujo | 0.6 mL/min |
| Volumen de inyección | 30 µL |
| Temperatura del automuestrador | Ambiente |

7.5 Validación del método analítico

Los parámetros utilizados para validar el método en plasma fueron: selectividad, límite inferior de cuantificación, curva de calibración (linealidad), precisión como repetibilidad y reproducibilidad, exactitud, estabilidad de la muestra y de la solución. A continuación, se presentan los resultados obtenidos.

7.5.1 Selectividad

Para la selectividad, se evaluaron las respuestas cercanas al OXZ y CBZ. En la figura 18, se muestra un cromatograma de la muestra blanco y en la figura 19 se encuentra un cromatograma de una muestra enriquecida con OXZ y CBZ.

Se encontró que las respuestas-cercanas fueron inferiores al 20% de área del pico de OXZ y menores al 5% para el EI. Por lo tanto, el método es selectivo.

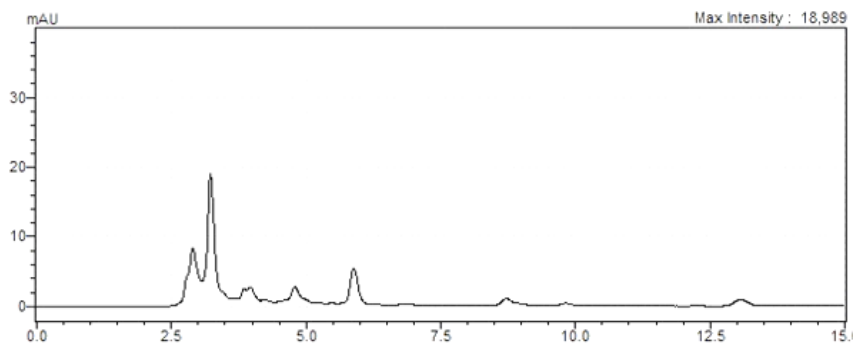


Figura 18. Cromatograma de la muestra blanco.

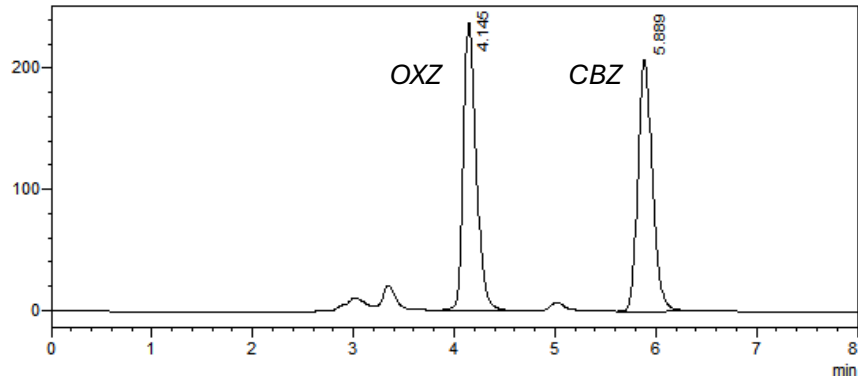


Figura 19. Cromatograma de una muestra típica. Oxfendazol ($1.2 \mu\text{g/mL}$) y Carbamazepina ($13 \mu\text{g/mL}$).

Asimismo, dentro de las pruebas de selectividad se consideraron posibles interferencias de fármacos de uso común para los pacientes con neurocisticercosis. En la figura 20, se muestra un cromatograma de una muestra blanco de plasma humano adicionado con dexametasona y en la figura 21 con metilprednisolona. Como se observa, no existe interferencia de estos dos analitos con las señales de interés.

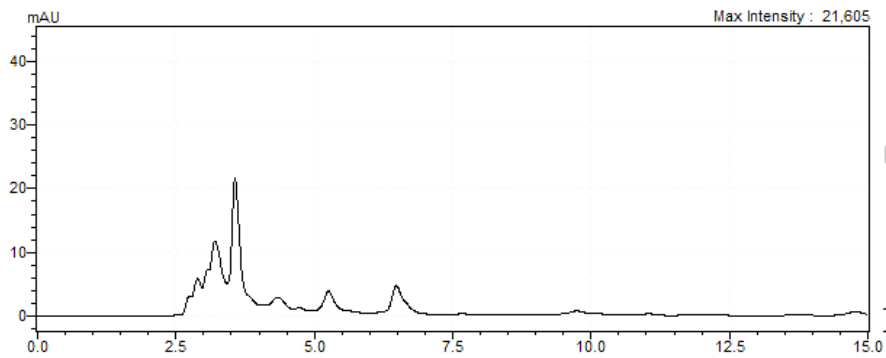


Figura 20. Muestra blanco añadida con Dexametasona.

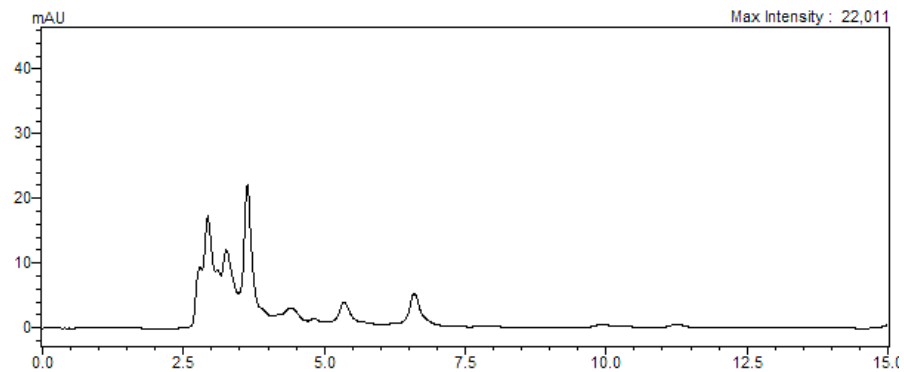


Figura 21. Muestra enriquecida con Metilprednisolona.

Además, se probaron fármacos analgésicos como paracetamol, ketorolaco y tramadol. En la figura 22 se presenta un cromatograma de una muestra de plasma enriquecida con paracetamol y oxfendazol. Se encontró que el paracetamol tiene una señal en un tiempo de retención de 3.2 min, por lo que no interfiere con el pico de OXZ. Por otra parte, no se encontraron señales, provenientes de los fármacos ketorolaco o tramadol (figura 23).

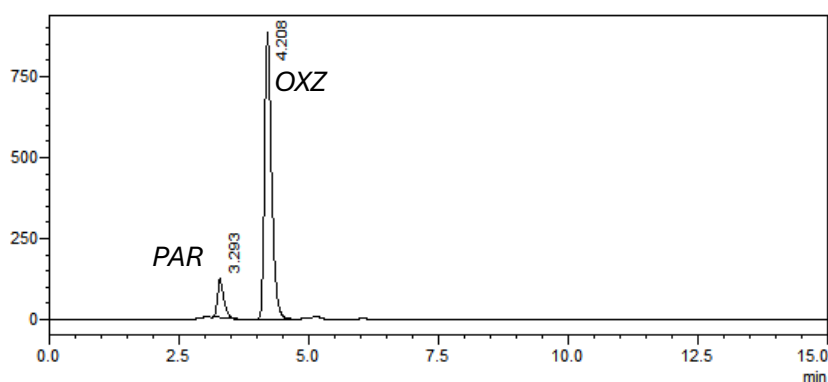


Figura 22. Muestra plasmática adicionada con Paracetamol (PAR) y Oxfendazol (OXZ).

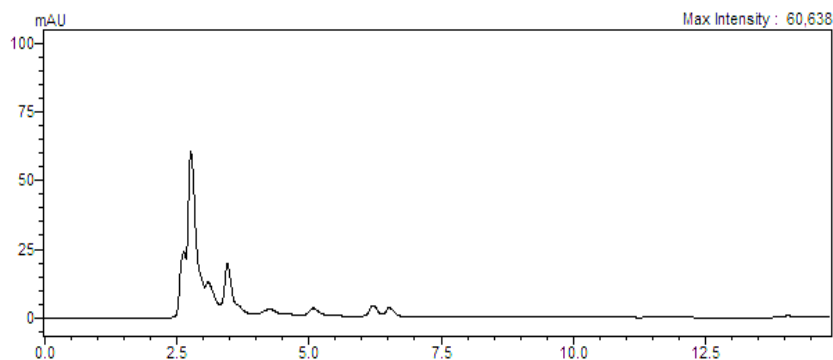


Figura 23. Muestra plasmática añadida con Tramadol y ketorolaco.

7.5.2 Curva de calibración.

En la figura 24, se muestra un ejemplo de una curva de calibración en plasma obtenida con el método desarrollado (curva 1). El rango de la curva fue 0.3 a 4.8 $\mu\text{g/mL}$. El modelo que se ajustó mejor a los datos fue el lineal con un coeficiente de correlación mayor a 0.99.

En la tabla 16 se muestran los datos relacionados con el modelo estadístico, pendientes e intercepto de las 3 curvas evaluadas. En la tabla 17, se muestran los valores de porcentaje de desviación de las concentraciones recuperadas de las tres curvas evaluadas. En todos los casos el porcentaje de desviación fue menor al 15%, por lo cual se demuestra que el método es lineal. En las figuras 25-29 se muestran los cromatogramas correspondientes a una curva de calibración.

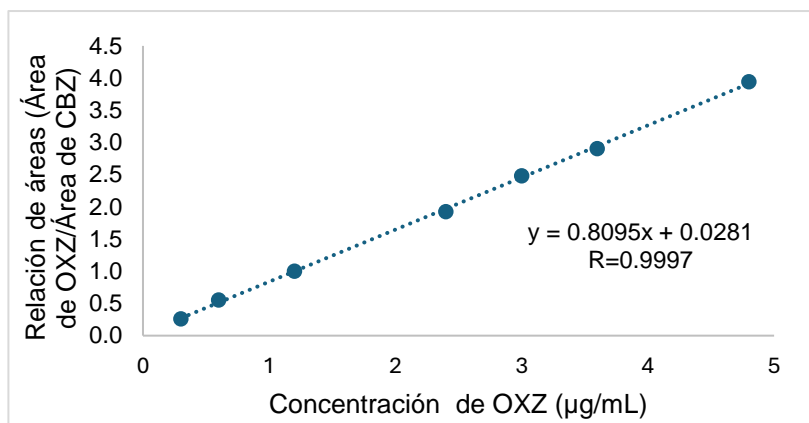


Figura 24. Curva de calibración de OXZ en plasma humano.

Tabla 16. Resultados de linealidad de las curvas de calibración

| Datos | Curva 1 | Curva 2 | Curva 3 |
|----------------|---------|---------|---------|
| r | 0.9997 | 0.9992 | 0.9990 |
| r ² | 0.9994 | 0.9983 | 0.9979 |
| m | 0.8095 | 0.7902 | 0.7755 |
| b | 0.0281 | 0.0093 | 0.0242 |

Tabla 17. Valores de % Desviación de 3 curvas de calibración de OXZ en plasma

| Concentración (µg/mL) | %Desviación | | |
|-----------------------|-------------|---------|---------|
| | Curva 1 | Curva 2 | Curva 3 |
| 0.3 | 5.1 | 2.6 | 2.5 |
| 0.6 | 8.1 | 2.9 | 2.2 |
| 1.2 | 0.1 | 3.0 | 5.4 |
| 2.4 | 2.3 | 1.5 | 0.7 |
| 3.0 | 1.0 | 0.3 | 5.2 |
| 3.6 | 1.2 | 3.7 | 1.5 |
| 4.8 | 0.8 | 1.7 | 1.0 |

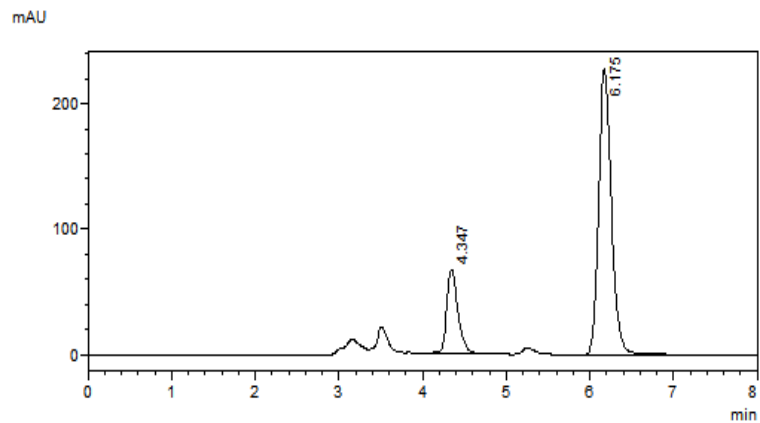


Figura 25. Cromatograma de OXZ (0.3 $\mu\text{g/mL}$) y CBZ (13 $\mu\text{g/mL}$).

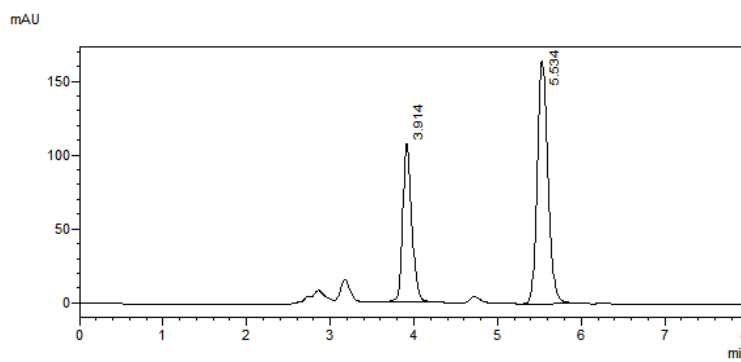


Figura 26. Cromatograma de OXZ (0.6 $\mu\text{g/mL}$) y CBZ (13 $\mu\text{g/mL}$).

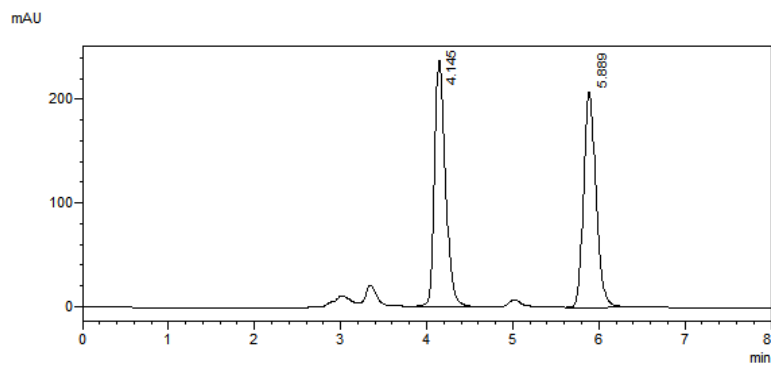


Figura 27. Cromatograma de OXZ (1.2 $\mu\text{g/mL}$) y CBZ (13 $\mu\text{g/mL}$).

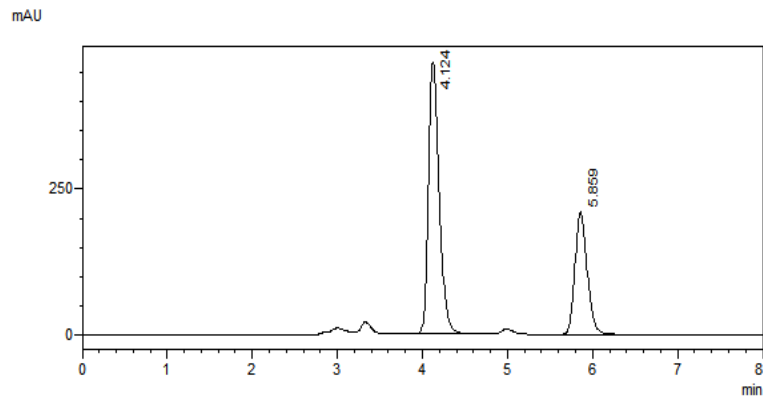


Figura 28. Cromatograma de OXZ (2.4 µg/mL) y CBZ (13 µg/mL).

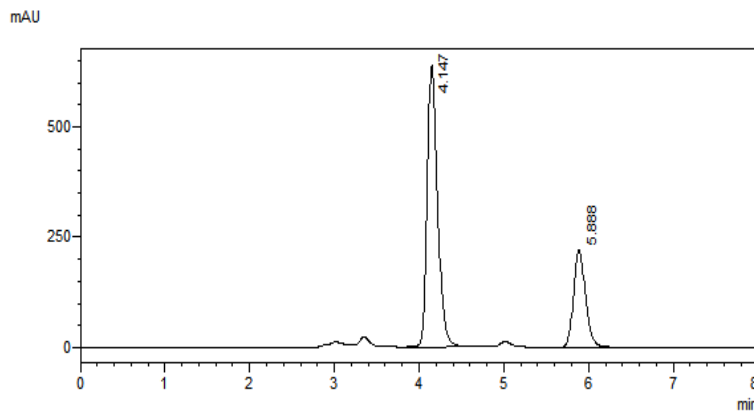


Figura 29. Cromatograma de OXZ (3.0 µg/mL) y CBZ (13 µg/mL).

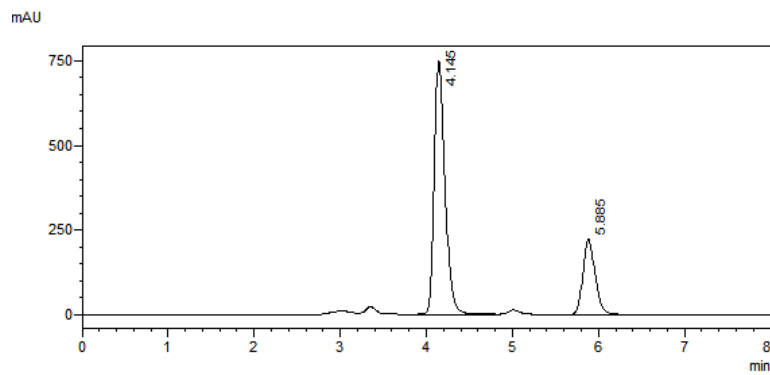


Figura 30. Cromatograma de OXZ (3.6 µg/mL) y CBZ (13 µg/mL).

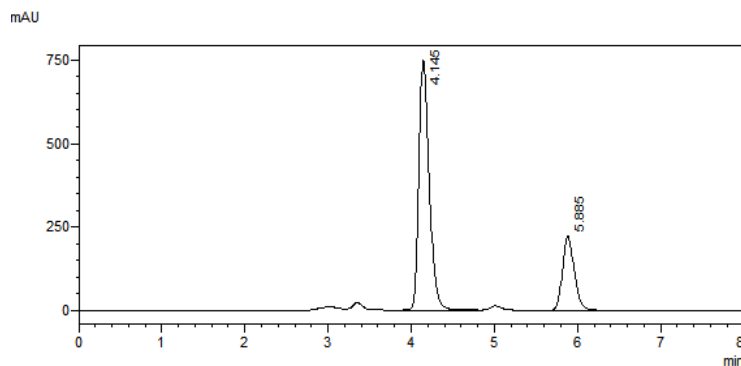


Figura 31. Cromatograma de OXZ (4.8 µg/mL) y CBZ (13 µg/mL).

7.5.3 Precisión y exactitud

En la tabla 18 se presentan los resultados de repetibilidad y exactitud del método, (las concentraciones recuperadas para evaluar precisión y exactitud se obtuvieron utilizando curvas de calibración preparadas el mismo día del análisis, tabla 16 y 17). En la misma, se observa que el CV% y el porcentaje de desviación de las muestras control, fueron menores al 15%. Así, el método cumplió con los criterios de precisión y exactitud. Asimismo, se obtuvieron valores menores al 20% para el límite inferior de cuantificación, por lo cual el LIC cumple con los criterios de precisión y exactitud.

En la tabla 19 se muestran los resultados de reproducibilidad y exactitud del método. Debido a que el coeficiente de variación de tres corridas analíticas en tres días diferentes es menor al 15% en cada muestra control, el método muestra ser reproducible.

Tabla 18 Repetibilidad y exactitud del método para cuantificar OXZ.

| Corrida | Réplica | Concentración recuperada (µg/mL) | | | |
|--------------------------------------|---------|----------------------------------|-------|-------|-------|
| | | LIC | MCB | MCM | MCA |
| 1 | 1 | 0.328 | 0.929 | 1.736 | 3.816 |
| | 2 | 0.356 | 0.891 | 1.791 | 4.001 |
| | 3 | 0.346 | 0.936 | 1.757 | 3.986 |
| | 4 | 0.297 | 0.940 | 1.853 | 3.877 |
| | 5 | 0.329 | 0.907 | 1.798 | 4.027 |
| Promedio | | 0.33 | 0.92 | 1.79 | 3.94 |
| DE | | 0.02 | 0.02 | 0.04 | 0.08 |
| CV% | | 6.14 | 2.01 | 2.23 | 2.06 |
| Concentración nominal (µg/mL) | | 0.30 | 0.90 | 1.80 | 3.90 |
| Desviación% | | 9.47 | 2.26 | 0.72 | 1.05 |

Tabla 19. Reproducibilidad y exactitud del método

| Corrida | Réplica | Concentración recuperada (µg/mL) | | | |
|--------------------------------------|---------|----------------------------------|-------|-------|-------|
| | | LIC | MCB | MCM | MCA |
| 1 | 1 | 0.328 | 0.929 | 1.736 | 3.816 |
| | 2 | 0.356 | 0.891 | 1.791 | 4.001 |
| | 3 | 0.346 | 0.936 | 1.757 | 3.986 |
| | 4 | 0.297 | 0.940 | 1.853 | 3.877 |
| | 5 | 0.329 | 0.907 | 1.798 | 4.027 |
| 2 | 1 | 0.293 | 0.936 | 1.865 | 4.041 |
| | 2 | 0.307 | 0.978 | 1.846 | 4.033 |
| | 3 | 0.310 | 0.934 | 1.793 | 4.114 |
| | 4 | 0.310 | 0.948 | 1.848 | 4.109 |
| | 5 | 0.314 | 0.930 | 1.876 | 4.172 |
| 3 | 1 | 0.251 | 0.852 | 1.720 | 3.961 |
| | 2 | 0.252 | 0.835 | 1.699 | 3.910 |
| | 3 | 0.241 | 0.835 | 1.705 | 3.841 |
| | 4 | 0.249 | 0.831 | 1.670 | 3.939 |
| | 5 | 0.251 | 0.852 | 1.820 | 3.847 |
| Promedio | | 0.30 | 0.90 | 1.79 | 3.98 |
| DE | | 0.04 | 0.05 | 0.07 | 0.11 |
| CV% | | 12.92 | 5.40 | 3.75 | 2.71 |
| Concentración nominal (µg/mL) | | 0.30 | 0.90 | 1.80 | 3.90 |
| Desviación% | | 1.47 | 0.25 | 0.83 | 1.97 |

LIC = Límite inferior de cuantificación (0.3 µg/mL); MCB = Muestra control baja (0.9 µg/mL); MCM = Muestra control media (1.8 µg/mL); MCA = Muestra control alta (3.9 µg/mL).

7.5.4 Estabilidad

Los resultados de las diferentes pruebas de estabilidad: corto plazo, muestra procesada, largo plazo, y ciclos congelación-descongelación se muestran en la tabla 20. En esta se puede observar que las muestras se encuentran dentro del 15% de la concentración nominal, por lo que se concluye que el OXZ es estable bajo estas condiciones.

En la tabla 21, se muestran los resultados de estabilidad en solución para OXZ y CBZ. A partir de estos resultados, se logró documentar que las soluciones son estables en refrigeración (2-8°C) por lo menos 30 días.

Tabla 20. Resultados individuales de las muestras de estabilidad, tres ensayos por cada muestra control.

| Estabilidad | Condiciones | MCB (0.9 µg/mL) | | MCA (3.9 µg/mL) | |
|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|
| | | Concentración (µg/mL) | %Desviación | Concentración (µg/mL) | %Desviación |
| Corto plazo | 5 h a temperatura ambiente | 0.85 | 5.33 | 4.10 | 5.10 |
| | | 0.91 | 1.60 | 4.16 | 6.57 |
| | | 0.90 | 0.07 | 4.17 | 7.00 |
| | 24 h refrigeración | 0.85 | 5.07 | 4.17 | 6.89 |
| | | 0.86 | 3.93 | 4.14 | 6.05 |
| | | 0.85 | 5.79 | 4.15 | 6.40 |
| Procesada | Automuestrador 24 h | 0.85 | 5.95 | 4.18 | 7.20 |
| | | 0.87 | 3.52 | 4.18 | 7.15 |
| | | 0.94 | 4.84 | 4.12 | 5.68 |
| | 24 h refrigeración | 0.80 | 10.60 | 3.9 | 0.3 |
| | | 0.82 | 9.10 | 3.9 | 1.1 |
| | | 0.83 | 7.53 | 3.7 | 5.9 |
| Largo plazo | 3 meses -20°C | 0.93 | 3.89 | 3.90 | 0.05 |
| | | 0.94 | 4.65 | 3.81 | 2.20 |
| | | 0.97 | 8.05 | 3.83 | 1.82 |
| Ciclos congelación descongelación | 3 meses -20°C | 0.94 | 4.03 | 3.4 | 12.6 |
| | | 0.91 | 1.55 | 3.6 | 7.7 |
| | | 0.95 | 5.10 | 3.9 | 0.1 |

Tabla 21 Estabilidad de soluciones de trabajo OXZ [48 µg/mL] y CBZ [13 µg/mL]

| Solución | Tiempo (días) | % desviación | CV% |
|--|---------------|--------------|------|
| Dilución de la concentración más alta de oxfendazol [48 µg/mL] | 30 | 2.69 | 3.62 |
| Carbamazepina [13 µg/mL] | 30 | 2.19 | 1.12 |

Existen diferentes metodologías por HPLC-UV que cuantifican oxfendazol y fenbendazol en plasma de diferentes modelos animales (Ballent et al., 2018; Ceballos et al., 2012; Gokbulut et al., 2006, 2007; Lakritz et al., 2015; Sun et al., 2022b) . La mayoría de ellos emplea una elución en gradiente, la cual permite mejorar la resolución de los analitos. No obstante, requiere mayores volúmenes de solvente, lo cual aumenta los costos operativos y la generación de residuos.

Los métodos analíticos para la detección cuantitativa de oxfendazol en la matriz humana son limitados. El único estudio en seres humanos (Bach et al., 2019) utilizó cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas en tándem (CLAR/MS/MS) .

El HPLC-UV es significativamente menos costoso que la espectrometría de masas, tanto en términos de equipo como de mantenimiento. Esto lo convierte en una opción más accesible para muchos laboratorios, aun cuando es menos sensible.

El método desarrollado permite la cuantificación de oxfendazol en plasma humano por HPLC-UV por elución isocrática. De acuerdo con los resultados de validación, es un método confiable en términos de linealidad, precisión y exactitud. Se requeriría mejorar la sensibilidad del método para su uso en estudios de bioequivalencia.

8 CONCLUSIONES

1. Las condiciones cromatográficas seleccionadas permitieron la separación del oxfendazol de los componentes endógenos del plasma humano.
2. El estándar de interno carbamazepina presentó un recobro alto y una respuesta reproducible.
3. El procedimiento de extracción líquido-líquido propuesto es eficiente para la recuperación de OXZ del plasma humano, ya que presentó un recobro mayor al 85%.
4. El método analítico demostró ser lineal en el rango de trabajo de 0.3 a 4.8 µg/mL. Es confiable ya que es preciso y exacto de acuerdo con los criterios de validación de la NOM-177-SSA1-2013.
5. El oxfendazol es estable en plasma por 3 meses a una temperatura de -20°C.

9 PERSPECTIVAS

Utilizar el método analítico en estudios preclínicos de interacción farmacocinética de oxfendazol con fármacos que se pretenden administrar en conjunto para potenciar el efecto antihelmíntico.

Dado que el oxfendazol es un inhibidor de la proteína de eflujo BCRP, sería importante evaluar la potencial interacción de oxfendazol con glibenclamida o pantoprazol, que son sustratos de esta enzima.

Determinar si el método analítico desarrollado puede ser utilizado para la cuantificación simultánea de oxfendazol y su metabolito activo fenbendazol.

10 REFERENCIAS

Ahuja, S., & Dong, M. (2005). *HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL ANALYSIS BY HPLC* (First edition, Vol. 6).

An, G., Murry, D. J., Gajurel, K., Bach, T., Deye, G., Stebounova, L. V., Codd, E. E., Horton, J., Gonzalez, A. E., Garcia, H. H., Ince, D., Hodgson-Zingman, D., Nomicos, E. Y. H., Conrad, T., Kennedy, J., Jones, W., Gilman, R. H., & Winokur, P. (2019a). Pharmacokinetics, safety, and tolerability of oxfendazole in healthy volunteers: A randomized, placebo-controlled first-inhuman single-dose escalation study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *63*(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.02255-18>

An, G., Murry, D. J., Gajurel, K., Bach, T., Deye, G., Stebounova, L. V., Codd, E. E., Horton, J., Gonzalez, A. E., Garcia, H. H., Ince, D., Hodgson-Zingman, D., Nomicos, E. Y. H., Conrad, T., Kennedy, J., Jones, W., Gilman, R. H., & Winokur, P. (2019b). Pharmacokinetics, safety, and tolerability of oxfendazole in healthy volunteers: A randomized, placebo-controlled first-inhuman single-dose escalation study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *63*(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.02255-18>

Arranz Solana, C., García Del Valle, M. I., Sáez Méndez, L., & Solís García Del Pozo, J. (2014). Infecciones por cestodos. *Medicine (Spain)*, *11*(53), 3099–3114. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(14\)70747-4](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(14)70747-4)

Bach, T., Bae, S. H., D’Cunha, R., Winokur, P., & An, G. (2019). Development and validation of a simple, fast, and sensitive LC/MS/MS method for the quantification of oxfendazole in human plasma and its application to clinical pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *171*, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.03.048>

Bach, T., Galbiati, S., Kennedy, J. K., Deye, G., Nomicos, E. Y. H., Codd, E. E., Garcia, H. H., Horton, J., Gilman, R. H., Gonzalez, A. E., Winokur, P., & An, G. (2020). *Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of Oxfendazole in Healthy*

Adults in an Open-Label Phase 1 Multiple Ascending Dose and Food Effect Study. <https://doi.org/10.1128/AAC>

Bach, T., Murry, D. J., Stebounova, L. V, Deye, G., Winokur, P., & An, G. (2021). *Population Pharmacokinetic Model of Oxfendazole and Metabolites in Healthy Adults following Single Ascending Doses.* <https://journals.asm.org/journal/aac>

Ballent, M., Viviani, P., Imperiale, F., Dominguez, P., Halwachs, S., Mahnke, H., Honscha, W., Lanusse, C., Virkel, G., & Lifschitz, A. (2018). Pharmacokinetic assessment of the monepantel plus oxfendazole combined administration in dairy cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 41(2), 292–300. <https://doi.org/10.1111/jvp.12466>

Bogan, J. A., & Marriner, S. E. (1983). *Pharmacokinetics of albendazole, fenbendazole and oxfendazole.*

Bolas Fernández, F. (1984). *Tesis Doctoral Estudios sobre la eficacia antihelmíntica de oxfendazol: tioxidazol y mebendazol en la trquinosis experimental.*

Butala, C., Brook, T. M., Majekodunmi, A. O., & Welburn, S. C. (2021a). Neurocysticercosis: Current Perspectives on Diagnosis and Management. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.615703>

Butala, C., Brook, T. M., Majekodunmi, A. O., & Welburn, S. C. (2021b). Neurocysticercosis: Current Perspectives on Diagnosis and Management. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.615703>

Ceballos, L., Moreno, L., Torrado, J. J., Lanusse, C., & Alvarez, L. (2012). Exploring flubendazole formulations for use in sheep. Pharmacokinetic evaluation of a cyclodextrin-based solution. *BMC Veterinary Research*, 8. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-71>

Chalmers, K., & Chalmers, K. (1979). Evaluation of the efficacy of the anthelmintic oxfendazole against artificial infections of gastrointestinal nematodes in sheep and cattle. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 7(2), 111–114. <https://doi.org/10.1080/03015521.1979.10426174>

Cox, S., Allender, M. C., & Yarbrough, J. (2011). Determination of fenbendazole in adult *Artemia* using reverse-phase liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 34(15), 1536–1545. <https://doi.org/10.1080/10826076.2011.575977>

Dixon, M. A., Winskill, P., Harrison, W. E., & Basáñez, M. G. (2021). *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: From parasite biology and immunology to diagnosis and control. In *Advances in Parasitology* (Vol. 112, pp. 133–217). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2021.03.003>

Fernández Rodríguez, R., González Fernández, C., & Guitián Deltell, J. (2017). Neurocysticercosis: una enfermedad que no debemos olvidar. *Galicia Clin*, 78, 116–122.

Fernández-Rodríguez, R., González-Fernández, C., & Guitián Deltell, J. (2017). Neurocysticercosis: a disease that we must not forget. *Galicia Clin*, 78(3), 116–122.

Gokbulut, C., Akar, F., & McKellar, Q. A. (2006). Plasma disposition and faecal excretion of oxfendazole, fenbendazole and albendazole following oral administration to donkeys. *Veterinary Journal*, 172(1), 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.02.022>

Gokbulut, C., Bilgili, A., Hanedan, B., & McKellar, Q. A. (2007). Comparative plasma disposition of fenbendazole, oxfendazole and albendazole in dogs. *Veterinary Parasitology*, 148(3–4), 279–287. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.06.028>

Gonzalez, A. E., Codd, E. E., Horton, J., Garcia, H. H., & Gilman, R. H. (2019). Oxfendazole: a promising agent for the treatment and control of helminth infections in humans. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Vol. 17, Issue

1, pp. 51–56). Taylor and Francis Ltd.
<https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1555241>

Hamamoto Filho, P. T., Rodríguez-Rivas, R., & Fleury, A. (2022). Neurocysticercosis: A Review into Treatment Options, Indications, and Their Efficacy. *Research and Reports in Tropical Medicine, Volume 13*, 67–79.
<https://doi.org/10.2147/rrtm.s375650>

Iosifidou, E. G., & Haagsma, N. (1996). High-performance liquid chromatographic determination of fenbendazole and its metabolites, sulphoxide and sulphone, in fish muscle tissue. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 19(11), 1819–1830.
<https://doi.org/10.1080/10826079608014008>

Jung, H., Medinat, L., Garcia, L., Fuentes, I., & Moreno-Esparzat, R. (1998). Absorption Studies of Albendazole and Some Physicochemical Properties of the Drug and Its Metabolite Albendazole Sulphoxide. In *J. Pharm. Pharmacol* (Vol. 50). <https://academic.oup.com/jpp/article/50/1/43/6152777>

Jung-Cook, H. (2012). Pharmacokinetic variability of anthelmintics: Implications for the treatment of neurocysticercosis. In *Expert Review of Clinical Pharmacology* (Vol. 5, Issue 1, pp. 21–30). <https://doi.org/10.1586/ecp.11.72>

Kennet J. Ryan. (2021). IMPORTANCIA DE LAS INFECCIONES PARASITARIAS DE HUMANOS. In *Sherris & Ryan. Microbiología médica* (8.^a edición, pp. 1–11).

Lakritz, J., Linden, D., Anderson, D., & Specht, T. (2015). Plasma concentrations of fenbendazole (FBZ) and oxfendazole in alpacas (*Lama pacos*) after single intravenous and oral dosing of FBZ. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 71. <https://doi.org/10.2147/vmrr.s77255>

Levinson, W., Chin-Hong, P., Joyce, E. A., Nussbaum, J., & Schwartz, B. (2020). PARTE VI_ PARASITOLOGÍA. In *Review of Medical Microbiology & Immunology: A Guide to Clinical Infectious Diseases* (16e ed.).

Moreno, L., Lopez-Urbina, M. T., Farias, C., Domingue, G., Donadeu, M., Dungu, B., García, H. H., Gomez-Puerta, L. A., Lanusse, C., & González, A. E. (2012). A high oxfendazole dose to control porcine cysticercosis: Pharmacokinetics and tissue residue profiles. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(10), 3819–3825. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.023>

Mottier, M. L., Alvarez, L. I., Pis, M. A., & Lanusse, C. E. (2003). Transtegumental diffusion of benzimidazole anthelmintics into *Moniezia benedeni*: Correlation with their octanol-water partition coefficients. *Experimental Parasitology*, *103*(1–2), 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0014-4894\(03\)00060-2](https://doi.org/10.1016/S0014-4894(03)00060-2)

OMS. (2022). Directrices sobre el manejo clínico de la neurocisticercosis por “*Taenia solium*.” In *Directrices de la OMS sobre el manejo clínico de la neurocisticercosis por “Taenia solium.”* Pan American Health Organization. <https://doi.org/10.37774/9789275325247>

Ozdemir Kutahya, Z., Kandir, S., Eser Faki, H., Uney, K., Tras, B., Celik, M., & Torun, O. (2023). Pharmacokinetics and pharmacokinetic interactions of orally administered oxfendazole and oxyclozanide tablet formulation to sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, *46*(1), 34–41. <https://doi.org/10.1111/jvp.13096>

Palomares Alonso, F. (2009). *Evaluación farmacodinámica y farmacocinética de nuevas formulaciones y análogos de Albendazol con posible actividad cisticida*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Phenomenex SCIENCE UNFILTERED. (2020, September 8). *¿Por qué es crítico para su desarrollo del método de la fase móvil?* <https://phenomenex.blog/2020/09/08/ph-2/>

Risch, F., Koschel, M., Lenz, B., Specht, S., Hoerauf, A., Hübner, M. P., & Scandale, I. (2022). Comparison of the macrofilaricidal efficacy of oxfendazole and its isomers against the rodent filaria *Litomosoides sigmodontis*. *Frontiers in Tropical Diseases*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fitd.2022.982421>

Rodríguez-Rivas, R., Flisser, A., Norcia, L. F., Filho, P. T. H., Bonilla-Aldana, D. K., Rodríguez-Morales, A. J., Carpio, A., Romo, M. L., & Fleury, A. (2022). Neurocysticercosis in Latin America: Current epidemiological situation based on official statistics from four countries. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *16*(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0010652>

Shimadzu. (2024). *Differences Between Using Acetonitrile and Methanol for Reverse Phase Chromatography*. <https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/lib/lctalk/35/35lab.html>

Steyn, T. J. S., Awala, A. N., de Lange, A., & Raimondo, J. V. (2023). What Causes Seizures in Neurocysticercosis? In *Epilepsy Currents* (Vol. 23, Issue 2, pp. 105–112). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/15357597221137418>

Sun, Y., Chen, D., Zhao, Y., Zhou, K., Zhang, B., Wang, H., & Xie, S. (2022a). Exploitation of nanocrystal suspension as an effective oral formulation for oxfendazole. *Drug Delivery and Translational Research*, *12*(5), 1219–1229. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-01012-6>

Sun, Y., Chen, D., Zhao, Y., Zhou, K., Zhang, B., Wang, H., & Xie, S. (2022b). Exploitation of nanocrystal suspension as an effective oral formulation for oxfendazole. *Drug Delivery and Translational Research*, *12*(5), 1219–1229. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-01012-6>

The Role of Methanol and Acetonitrile as Organic Modifiers in Reversed-phase Liquid Chromatography. (2019). *CHROMATOGRAPHY TODAY*, 24–26. www.chromatographytoday.com

Weller, P. F. (2022). Introducción a las infecciones helmínticas. In *Introducción a las infecciones helmínticas* (p. 21).