



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Postgrado

**FARMACOCINÉTICA PLASMÁTICA COMPARATIVA
DE TRES DIFERENTES FORMULACIONES DE
ALBENDAZOLE PARA ADMINISTRACIÓN ORAL EN
CANINOS**

DRA. ALICIA RAQUEL DIB BRUSALES

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2010



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Postgrado

**FARMACOCINÉTICA PLASMÁTICA COMPARATIVA
DE TRES DIFERENTES FORMULACIONES DE
ALBENDAZOLE PARA ADMINISTRACIÓN ORAL EN
CANINOS.**

DRA. ALICIA RAQUEL DIB BRUSALES

**DRA. PERLA A. CABRERA STÁBILE, DV
DIRECTORA DE TESIS.**

**DR. SERGIO F. SÁNCHEZ BRUNI, DV, PhD, POST-PhD
CO-DIRECTOR DE TESIS.**

2010

INTEGRACION DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

DR. ALVARO FREYRE Mc. CALL, DV

Profesor Agregado del Departamento de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Facultad de Veterinaria. UdelaR

DR. LUIS IGNACIO ALVAREZ, DV, PhD.

Profesor Adjunto del Área Farmacología, Dpto. Fisiopatología, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, República Argentina.

DRA. MARCELA REBUERTO, DV, PhD.

Profesora Asociada Regular, Departamento de Fisiopatología y Etiopatogenia, Área de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, República Argentina.

AGRADECIMIENTOS

A mi muy querida Profesora, amiga y directora de Tesis, Dra. Perla Cabrera, mi más profundo agradecimiento por aguantarme, guiarme y darme tantas veces una mano.

A mi Profesor, y co-director de Tesis, Dr. Sergio Sánchez Bruni, que siempre estuvo ahí para enseñarme y guiarme.

A la Profesora Dra. Laura Moreno de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Tandil, República Argentina, por su gran apoyo durante mi pasantía en esa Facultad.

A mi amiga Lic. Cristina Farías de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Tandil, República Argentina, por su paciencia, simpatía y empeño para enseñarme y ayudarme a trabajar en un laboratorio.

Al Profesor Dr. Carlos Lanusse, Director del Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Tandil, República Argentina, por su apoyo.

Al Profesor Dr. Santiago Palma, del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Córdoba, República Argentina, por el diseño de las formulaciones farmacológicas utilizadas en el ensayo experimental.

A mis compañeros y amigos de nuestra Facultad de Veterinaria, Dra. Gimena Feijóo, Br. Natalia Lezama, Br. Bibiana Freire, Dr. Gonzalo Suárez y Dra. Virginia Mosca, gracias, porque siempre me apoyaron y supieron comprenderme.

A mis amigas, Lic. Ruth Santesteban y Lic. Rosina Vilaró de Biblioteca de la Facultad de Veterinaria, por su paciencia y apoyo en mis largas búsquedas bibliográficas.

A mis compañeros de Generación 2007 de Maestría en Salud Animal, porque todos volvimos a ser y seguiremos siempre siendo estudiantes.

Este trabajo fue parcialmente financiado con los fondos de la Comisión Sectorial de Investigación Científica y de la Comisión de Investigación y Desarrollo Científico.

ÍNDICE

	Página
1. Introducción y Antecedentes	1
2. Materiales y Métodos	8
2.1. Animales	8
2.2. Drogas utilizadas en el estudio	8
2.3. Diseño Experimental	9
2.4. Muestras sanguíneas	9
2.5. Procedimientos analíticos	10
2.6. Análisis de los metabolitos de ABZ	10
2.6.1. Proceso de extracción sólida	10
2.7. Análisis por HPLC	11
2.7.1. Preparación de la fase móvil para Cromatógrafo	11
2.7.2. Procedimiento de Resuspensión y Recuperación	11
2.8. Análisis Farmacocinético	11
2.9. Análisis Estadístico	12
3. Resultados	12
4. Discusión	16
5. Conclusiones	20
6. Referencias Bibliográficas	20
Anexo: Fotos de 1 a 6	28
Fotos de 7 a 11	29

Lista de Tablas y Figuras

	Página
Tabla I	15

Figura I	3
Figura II	13
Figura III	14

RESUMEN

Las enfermedades parasitarias internas en pequeños animales son relevantes en la práctica clínica. Muchas de ellas son comunes y consideradas zoonosis. El tratamiento y control de dichas enfermedades requiere un conocimiento epidemiológico de los parásitos y un entendimiento de las características farmacológicas y terapéuticas de las drogas antihelmínticas disponibles en el mercado. Su eficacia puede depender de la dosis, el/los patógeno/s blanco, el/los huésped/es, y el/los sitio/s de infección. El objetivo de este trabajo fue evaluar nuevas estrategias terapéuticas basadas en la búsqueda de formulaciones alternativas de Albendazole (ABZ) y Albendazole Sulfóxido (ABZSO), para optimizar de esta manera la eficacia antiparasitaria y posológica en caninos. Nueve perros fueron divididos en tres grupos (n=6) en forma aleatoria siguiendo un diseño en bloque incompleto. Los tratamientos de las formulaciones antiparasitarias a evaluar, se administraron en dos fases de la siguiente manera: Fase I: Animales del *grupo I* (tratamiento A): recibieron 25 mg / kg de ABZ en un formulación convencional (cápsulas). Animales del *grupo II* (tratamiento B), recibieron 25 mg / kg de una formulación de ABZ modificada con Poloxamer. Los perros del *grupo III* (tratamiento C) recibieron ABZSO en una dosis equimolar a las de ABZ. Luego de 21 días de periodo de espera, el ensayo se repitió como Fase II. En dicha fase los animales fueron reagrupados en tres (3) grupos al igual que para la fase I, teniendo en cuenta que cada perro recibiría tratamientos diferentes a los de la Fase anterior. Se recolectaron muestras sanguíneas durante 24 horas para luego ser analizadas por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC). Los analitos estudiados en plasma fueron ABZSO y ABZSO₂. Se obtuvieron valores significativos ($P > 0.001$) de Área Bajo la Curva concentración versus tiempo (AUC) (500%) y Concentración máxima plasmática (C_{max}) (487%) para el metabolito activo ABZSO en el tratamiento C cuando se le comparó con los tratamientos A y B. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros farmacocinéticos (PK) entre los tratamientos A y B. Se concluyó que la mayor disponibilidad plasmática obtenida en la formulación utilizada en el tratamiento C, se debe a una mayor disolución de la molécula ABZSO en el pH gástrico, lo cual se ha traducido en una mayor eficacia antihelmíntica. Este estudio puede contribuir a profundizar el entendimiento del comportamiento PK de ciertas moléculas antihelmínticas de la familia de los BZDs y a optimizar el control antiparasitario en caninos.

SUMMARY

Internal parasitic diseases in small animals are relevant in clinical practice. Many are common and some are considered zoonotic. The treatment and control of parasitic disease requires epidemiological knowledge of the parasite involved and an understanding of pharmacological and therapeutic characteristics of the anthelmintic drugs available on the market. Their efficacy may depend on dosage, the target pathogen(s), the host species and /or the site of infection. The aim of this work was to evaluate new therapeutic strategies based on the search of alternative formulations of Albendazole (ABZ) and Albendazole Sulfoxide (ABZSO) in order to optimise posology and antiparasite efficacy in dogs. In an incomplete block design nine dogs (n=6) were randomly divided into three

groups. Anthelmintic formulations to be evaluated were administered in two phases as follows. Phase I: Group I (treatment A): animals received ABZ at 25 mg/kg of conventional formulation (capsules). Group II (treatment B), dogs received 25mg/kg of a modified poloxamer-ABZ formulation. Group III (treatment C) animals were treated with ABZSO in equimolar amount to ABZ doses. After 21 days of wash-out period the experiment was repeated (Phase II). On phase II, animals were regrouped in three (3) groups as on phase I, taking into account that each dog would receive different treatments. Blood samples were collected over 24h and subsequently analyzed by High Performance Liquid Chromatography. ABZSO and ABZSO₂ were the analytes recovered in plasma. Significant higher value ($P < 0.001$) for area under curve vs time value (AUC) (+500%), and maximum drug concentration (C_{max}) (+487%) value for active metabolite ABZSO, were obtained on treatment C when compared with treatments A and B. It was concluded that the enhanced plasma concentration profile obtained for the ABZSO formulation used in treatment C, was due to a higher dissolution of ABZSO molecule in gastric pH, by which it is considered to have higher anthelmintic efficacy. This experimental trial may thoroughly contribute to understand the pharmacokinetics behaviour of some anthelmintic molecules of BZDs family to enhance and optimise the anthelmintic control in canines.

1. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Las enfermedades causadas por parásitos internos en caninos domésticos son de alta relevancia en la salud animal y pública debido a que muchas de ellas pueden enmarcarse dentro del término “zoonosis”; parásitos como *Toxocara canis* y *Ancylostoma caninum* son los causantes en el hombre de los síndromes de larva migrans visceral y cutánea respectivamente (Soulsby, 1982; Díez *et al.*, 1999). La típica situación epidemiológica se da en el suelo de parques públicos de las ciudades que acostumbran a estar intensamente contaminados por huevos infectantes, (Bowman, 2004).

Se considera que los géneros parasitarios más importantes que se encuentran en caninos y provocan enfermedad parasitaria y zoonosis son: *Echinococcus granulosus*, *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum*, *Dipylidium caninum*, y *Spirometra* spp, (Jacob *et al.*, 1994). La diversificación del medio donde se desarrollan las distintas actividades de los caninos urbanos, suburbanos y rurales, lo que permite una variación en la prevalencia de los distintos géneros. Los relevamientos de la fauna parasitaria gastrointestinal de los caninos domésticos en Uruguay datan de muchos años, llevando a cabo el estudio de fecas de animales que permanecían en el Instituto Antirrábico de Montevideo (Carballo Pou *et al.*, 1937). Dichos relevamientos, se han realizado por medio de métodos coprológicos (Saumell, 2003; Esteves *et al.*, 1960-1961; Valledor, 2002) o por medio de bromhidrato de arecolina (Cabrera *et al.*, 1990; Cabrera *et al.*, 1996; Rodríguez & Tramontano 1957). Otros relevamientos del Laboratorio del Departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de Montevideo, (1761 muestras), encontraron *Toxocara canis* (48.30 %), *Ancylostoma caninum* (30.0 %), *Trichuris vulpis* (17.3 %) y *Dipylidium caninum* (19.9%). Últimamente se concluyó que *Ancylostoma caninum*, presentó una gran incidencia (53.7%), (Valledor *et al.*, 2006).

En un relevamiento parasitario de la población canina de un refugio en la zona nordeste peri urbana de la ciudad de Montevideo, se muestrearon ochenta (80) animales (durante un período de 2 meses) que habitaban casillas (42.5 %) colocadas sobre tierra (suelos arenosos, húmedos) ó caniles (57.5 %), con pisos lavables y otros de tierra. Los géneros parasitarios encontrados fueron *Toxocara spp.* (2.5 %) con 21.25 huevos por gramo de materia fecal (h.p.g.) promedio, *Ancylostoma* (70 %), con un h.p.g. promedio de 1401.25, *Trichuris spp.* (43.5 %) con h.p.g. promedio de 43.75. En esta investigación se concluyó que no existía diferencia de parasitación entre caninos con diferente habitat (Valledor, 2002).

Además, se realizaron otros estudios basados en necropsias de caninos, procedentes exclusivamente de la ciudad de Montevideo: treinta (30) caninos (Holcman-Spector *et al.*, 1985), cincuenta y un (51) caninos (Cabrera *et al.*, (1987), y sesenta (60) caninos (Valledor *et al.*, 2002); se examinaron tractos intestinales de treinta (30) caninos urbanos de Montevideo, nueve (9) de la ciudad de Florida y cincuenta y seis (56) rurales. De esta manera se pudieron confirmar los hallazgos parasitarios de los estudios antes mencionados.

El tratamiento y control de las parasitosis internas de los pequeños animales requiere conocimiento epidemiológico del parásito involucrado y entendimiento

de las características de las drogas antihelmínticas disponibles en el mercado. Los antihelmínticos benzimidazoles (BZD) y sus metabolitos derivados, debido a su amplio espectro, baja toxicidad y costo, comprenden una familia de drogas antihelmínticas ampliamente utilizada en la terapia antiparasitaria en medicina veterinaria y medicina humana (Sánchez Bruni *et al.*, 2006; Scarpelli *et al.*, 1999). El interés básico para estudiar el núcleo químico BZD como desarrollo potencial de nuevos agentes quimioterápicos, surgió en 1950, cuando se determinó que 5,6 dimetil-1-benzimidazol, conformaba una parte integral de la estructura molecular de la vitamina B₁₂. Estos resultados fueron de gran interés y dieron origen a estudios que aportaron beneficios al tratamiento de las enfermedades parasitarias. La primera droga BZD sintetizada fue el Tiabendazole en la década de 1960, luego por diversas sustituciones químicas se obtuvieron los BZD metilcarbamatos, caracterizados por poseer un grupo metilcarbamato en el anillo tiazol. El núcleo químico BZD comprende un sistema de 2 anillos (bicíclicos), en los cuales un grupo benceno se fusiona en las posiciones 4 y 5 del anillo imidazol (heterocíclico). Se produce un rápido intercambio de protones en el grupo amino (NH₂) y el átomo de nitrógeno (N) del anillo imidazol, dando origen a los tautómeros I y II, que son químicamente equivalentes. Esta equivalencia química refleja la trascendental importancia que tienen los átomos de N ubicados en posición 1 y 3 del anillo imidazol, debido a que son los que confieren las características ácidas y básicas a la molécula (Lanusse *et al.*, 1993; Rew & McKenzie, 2002). Si estos átomos se sustituyen por otros grupos químicos, se originan dos isómeros no equivalentes con diferentes características químicas. Por esta razón, sólo las posiciones 2 y 5, respectivamente (imidazólico y bencénico), fueron el objetivo para la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antihelmíntica; las sustituciones en posiciones 2 y 5 han generado los compuestos más potentes del grupo. Los derivados que contienen un átomo de azufre en tales posiciones, poseen alta eficacia contra nematodos gastrointestinales, broncopulmonares adultos y estadios inmaduros, incluyendo también larvas inhibidas de la mayoría de los nematodos gastrointestinales (Mc Kellar & Scout, 1990).

Los compuestos benzimidazólicos más importantes responden a la siguiente clasificación farmacológica: **BZD Tiazoles:** Tiabendazole (TBZ) y Cambendazole (CBZ). **BZD Metilcarbamatos:** Mebendazole (MBZ), Oxibendazole (OBZ), Albendazole (ABZ), Albendazole Sulfóxido (ABZSO) ó Ricobendazole (RBZ), Fenbendazole (FBZ) y Fenbendazole Sulfóxido u Oxfendazole (OXZ). **BZD Tioles Halogenados:** Triclabendazole (TCBZ) exclusivamente fasciolicida; por último los **Probenzoimidazoles** (probZD): el Febantel (FBT) y el Netobimin (NTB) (Lanusse & Pritchard, 1993); Boggio, 2008; Sumano & Ocampo, 2006). El ABZ es un compuesto antihelmíntico BZD Metilcarbamato efectivo contra nematodos gastrointestinales y pulmonares, cestodes y trematodes (Campbell, 1990; McKellar & Scott, 1990). El RBZ ó ABZSO es el metabolito activo del ABZ, siendo la única molécula detectada en plasma, presenta un amplio espectro de actividad frente a nematodos pulmonares y gastrointestinales en diversas especies domésticas (Mc Kellar & Scout, 1990; Sánchez Bruni *et al.*, 2000). Otros estudios reflejaron además la eficacia del ABZ y sus metabolitos frente al protozoo *Giardia duodenalis* en humanos, (Oxberry *et al.* 2000), además el ABZSO ó RBZ, poseen acción ovicida contra *Ascaris suum* (Belo *et al.*, 1999). La molécula madre ABZ se metaboliza oxidándose a su metabolito activo sulfóxido para luego oxidarse nuevamente en forma irreversible a su metabolito sulfona (ABZSO₂) básicamente inactivo (Lanusse *et al.*, 1993)

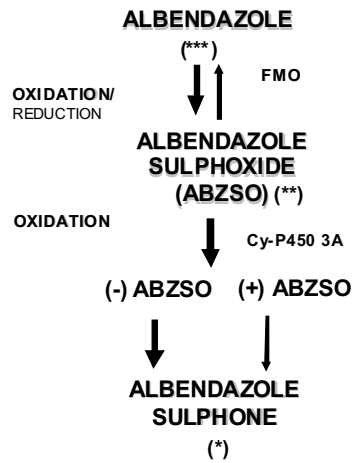
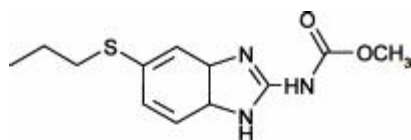


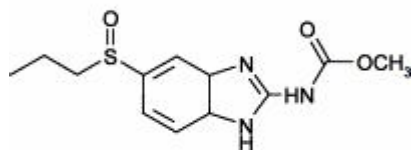
Figura 1:

Pasos metabólicos propuestos para el ABZ y sus metabolitos. Los procesos de oxidación son mediados por la enzima flavin-monoxigenasa (FMO) y citocromo-P450 (CY-P450 3A). Paso enantiomérico de ABZSO: los enantiómeros (-) y (+) en perros fueron demostrados por Delatour *et al.*, 1990. La potencia antihelmíntica de la droga madre y metabolitos están representados como: (*) muy pobre o sin actividad, (**) buena actividad y (***) muy buena actividad.

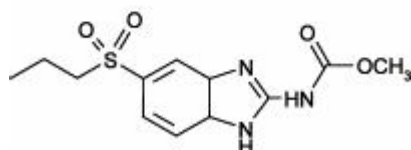
Adaptado de Sánchez Bruni et al., 2006.



Albendazole (ABZ)



Albendazole sulphoxide (ASOX)



Albendazole sulphone (ASON)

Fuente: Mc Kellar & Scott, 1990

Estas drogas son sustancias cristalinas estables y con alto punto de fusión (223-304°C); además son relativamente insolubles en agua, benceno y éter, pero muy solubles en alcohol y disolventes no polares (Towsend & Wise, 1990). Son bases débiles (pK 6,8 y 7,8), por lo que se encuentran principalmente en su forma no ionizada a pH plasmático, lo que favorece su distribución desde plasma hacia diferentes tejidos, especialmente importante para el intercambio reversible entre plasma y fluidos digestivos (Lanusse *et al.*, 1993). El pasaje o distribución de droga / metabolito desde el plasma al tracto digestivo está impulsado por el gradiente de pH entre el plasma y los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal. Ha sido demostrado que este mecanismo tiende a concentrar los metabolitos de ABZ (sulfóxido y sulfonas) en el tracto gastrointestinal, lo cual es particularmente importante en el caso del estómago, donde el pH más ácido que a nivel intestinal, favorece la “trampa iónica” de la droga (Lanusse *et al.*, 1993; Sánchez Bruni *et al.*, 2002). Es necesaria la disolución de las partículas en suspensión de la formulación farmacéutica de un fármaco BZD en los fluidos gastrointestinal, para facilitar la absorción de los mismos a través de la mucosa gastrointestinal y lograr una adecuada biodisponibilidad plasmática. La solubilidad de ABZ es de 0,01 mg / ml en agua (Galia, 1999).

En rumiantes cuando una suspensión antihelmíntica es depositada en el rumen, las partículas del fármaco se mezclan y se distribuyen en el contenido ruminal; dicha distribución probablemente se vea influida por la estratificación de éste. El gran volumen del rumen y la extensa permanencia del material alimenticio en el mismo aumentan el tiempo de permanencia de diversas sustancias (García Sacristán, 1995), especialmente de los fármacos y, como consecuencia, hay exceso de paso de los compuestos BZD al tracto gastrointestinal posterior. Por lo tanto, se puede decir que el rumen actúa como reservorio y prolonga la

duración del período de absorción de los compuestos BZD (Baggot & McKellar 1994; Lanusse *et al.*, 1993).

En caninos se ha demostrado que el tiempo de tránsito gastrointestinal es muy corto (García Sacristán *et al.*, 1995), comparado con el de los humanos (Ganong, 1995). Una vez que el antihelmíntico se absorbe en el tracto gastrointestinal, se distribuye rápidamente por el sistema circulatorio, comenzando simultáneamente el proceso de biotransformación necesario para facilitar la eliminación de estos compuestos y sus metabolitos. Una absorción lenta y sostenida desde el tracto gastrointestinal y un prolongado reciclado entre el plasma y el tracto digestivo son factores relevantes para optimizar la eficacia antihelmíntica de los BZD. En los animales no rumiantes, no se produce el efecto reservorio de las drogas, pasando los BZD directamente al estómago donde se produce la “trampa iónica” antes mencionada (Sánchez Bruni *et al.*, 2006). Este es el motivo por el cual los compuestos BZD deben administrarse en 4 ó 5 dosis consecutivas para lograr su máxima eficacia. Cuando a los antihelmínticos BZD se les formula para administración oral, el bajo grado de solubilidad impacta directamente en la absorción y consecuentemente en el porcentaje de eficacia. Esta baja solubilidad en agua es una importante limitación para la formulación de los más potentes antihelmínticos BZD metilcarbamatos, los cuales presentan una formulación clásica para su administración vía oral o intrarruminal según la especie a tratar (Lanusse *et al.*, 1998; Sánchez Bruni *et al.*, 2002).

Estudios *in vivo* han demostrado que la absorción oral de los BZD depende de su dilución a pH bajo, lo cual está estrechamente relacionado a la tasa de vaciado gástrico y tránsito intestinal (Lanusse *et al.*, 1993; Sánchez Bruni *et al.*, 1999). Una dieta rica en grasas mejora la absorción del ABZ en humanos (Edwards *et al.*, 1988), aunque esto no ha sido observado en perros. Los BZD metilcarbamatos como el ABZ, son catalizados extensamente por un sistema de oxidasas microsomales en todas las especies estudiadas (Álvarez *et al.*, 1999); las reacciones de biotransformación más importantes son la sulfoxidación y la hidroxilación. El metabolismo de los BZD depende fundamentalmente de las sustituciones presentes en la posición 5 del anillo BZD. Dicha posición es la diana de las reacciones metabólicas de primera fase. El grupo químico a sustituir en la posición 5 del anillo BZD es particularmente importante porque determina la velocidad de la biotransformación y extiende la permanencia del fármaco activo, lo que mejora la eficacia antihelmíntica (Sánchez Bruni *et al.*, 2006; Lanusse *et al.*, 2007). Existe una estrecha relación entre la formulación farmacéutica, la vía de administración, la biodisponibilidad sistémica y el efecto antiparasitario, de modo que a mayor biodisponibilidad del fármaco activo, mayor eficacia antihelmíntica (Lanusse *et al.*, 1993). Por otra parte, el amplio espectro de acción de los compuestos BZD queda determinado por la presencia durante el tiempo suficiente de concentraciones tóxicas de la droga en el sitio de localización de los parásitos (Álvarez *et al.*, 2000). Un requisito para la penetración de una barrera biológica para cualquier droga es su capacidad de solubilizarse en un medio acuoso. Los compuestos BZD, como el ABZ y el FBZ, formulados como tabletas o suspensiones para administración oral, deben disolverse en el pH ácido del estómago, y ha sido demostrado que la tasa de disolución puede ser alterada según el tamaño de la partícula formulada (Sánchez Bruni *et al.*, 2006).

El mecanismo de acción intrínseco de estas drogas se basa en la interrupción progresiva de las funciones celulares básicas y en el bloqueo de la polimerización de la tubulina de las células intestinales y tegumentales, interrumpiendo las divisiones celulares del parásito (Martin, 1997; Lacey, 1990). Esto ocurre debido a la presencia de un grupo carbamato en la posición 2 del núcleo BZD, lo cual es esencial para la actividad antimicrotubular (Lacey *et al.*, 1987). En todos los organismos eucariotas, la unidad estructural de los microtúbulos, es un dímero formado por subunidades de tubulina α y β . Los microtúbulos, además de formar parte de la estructura del citoesqueleto, participan en diversas funciones celulares, particularmente en la división celular, el transporte de nutrientes y la excreción de desechos metabólicos (García Sacristán *et al.*, 1995). Diferentes estudios de interacción entre moléculas de BZD y tubulina, indican que estos compuestos se unen al monómero de la subunidad β no dejando incorporar el mismo al polímero de tubulina. De esta manera, las moléculas de BZD provocan una interrupción en el equilibrio microtúbulo / tubulina, desencadenando su despolimerización. El RBZ es la única molécula desarrollada cuya formulación permite, en forma de solución, la administración parenteral en rumiantes (Sánchez Bruni *et al.*, 1996) y que tiene altos niveles de eficacia contra los nematodos thichostrongylideos de mayor importancia económica de los bovinos, incluyendo estadios inmaduros o hipobióticos de algunos géneros parasitarios en particular y además, conservando la actividad ovicida a partir de las 10-12 horas de su aplicación (Steffan *et al.*, 2000).

Se han estudiado diversas estrategias farmacológicas para incrementar la eficacia de los antihelmínticos BZDs. Actualmente el metabolito RBZ está comercialmente disponible en Argentina, formulación desarrollada por laboratorios AFFORD, como solución dentro de una cápsula blanda para administración oral en caninos (Saumell *et al.*, 2007). Esta molécula es bien tolerada por esta especie, y se caracteriza por no presentar efectos colaterales adversos, ni aún en animales jóvenes, enfermos o debilitados. Sin embargo, estas drogas pueden resultar embriotóxicas o teratogénicas, dependiendo de la posología, la especie animal tratada y la etapa del desarrollo embrionario en la que se encuentre; un estudio indicó el efecto teratogénico en ovejas luego de una administración oral durante la segunda y tercera semana de gestación (Piscopo & Smoak, 1997). No se han encontrado estudios que corroboren plenamente este efecto en caninos. La solubilidad de RBZ es de 0,062 mg / mL en agua (Wu *et al.*, 2005). El alto margen de seguridad, particularmente de aquellos compuestos sustituidos que conforman los antihelmínticos más potentes del grupo, se relaciona con la baja solubilidad de los mismos en el fluido gastrointestinal y consecuentemente con la baja absorción que les impide alcanzar elevadas concentraciones en el plasma para provocar signos de toxicidad. En caninos algunas moléculas BZDs pueden ser asociadas con Praziquantel, para reforzar la actividad contra cestodos, especialmente frente a *Dipylidium caninum* (Castagnolli *et al.*, 1999).

Entre las principales estrategias para aumentar la velocidad de disolución, se encuentran la posibilidad de incrementar la superficie específica disponible para la disolución (disminuir el tamaño de partícula); modificar las propiedades hidrodinámicas del medio (disminuir el espesor de la capa de difusión y asegurar las condiciones de estanco o "sink") y aumentar la solubilidad aparente del compuesto en las condiciones fisiológicas más relevantes.

Las dispersiones sólidas (DS) están siendo ampliamente utilizadas en el diseño de nuevas formas farmacéuticas donde es necesario aumentar la velocidad de disolución del fármaco. Estos sistemas han sido definidos como “dispersiones moleculares de uno o más principios activos de baja solubilidad acuosa en una matriz inerte (soporte), generalmente constituida por polímeros hidrofílicos donde la liberación del fármaco es gobernada por las propiedades fisicoquímicas del portador” (Chiou & Riegelman, 1971).

Si bien existe gran cantidad de datos publicados sobre dispersiones sólidas, los mecanismos por los cuales estos sistemas aumentan la velocidad de disolución continúan siendo objeto de estudio y no son del todo claros o determinantes. La razón para esto parece estar ligada a la complejidad de los procesos de liberación desde las dispersiones y la variedad de factores que pueden afectar este último fenómeno, incluyendo las propiedades del fármaco (solubilidad, estado físico, tamaño de partícula) y las propiedades del portador utilizado para las dispersiones (solubilidad, hidrofiliidad, peso molecular y potenciales interacciones droga – portador) (Georgarakis *et al.*, 2007).

Diferentes materiales han sido evaluados como transportadores o *carriers*. La primera generación de DS involucraban el uso de *carriers* cristalinos (Sekiguchi & Obi, 1964; Levy, 1963) y azúcares (Kanig, 1964), mientras que la segunda generación incluye diferentes tipos de polímeros hidrofílicos como polietilenglicoles (Janssens *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2004), polivinilpirrolidona (Konno *et al.*, 2008; Marín *et al.*, 2002), entre otros.

En los últimos años, se ha comenzado a explorar el uso de agentes surfactantes. Este tipo de dispersiones pueden ser binarias, fármaco – tensioactivo (como portador) o ternarias, donde a la dispersión tradicional fármaco – polímero hidrosoluble se le agrega un agente surfactante. En este caso, el incremento de la velocidad de disolución estaría relacionado con un aumento de la humectación de las partículas favoreciendo el contacto entre éstas y el medio, y también con un posible efecto de solubilización micelar. Estas dispersiones se pueden clasificar como de tercera generación (Vasconcelos *et al.*, 2007).

En el presente trabajo de tesis se evaluó el uso de Poloxamer 188 (P 188) como *carrier* en dispersiones sólidas conteniendo ABZ. Se prepararon y evaluaron dispersiones de ABZ con este transportador en diferentes proporciones. Se desarrolló una matriz con este transportador (Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Republica Argentina), para ser utilizada como base de una de las formulaciones de ABZ. El Poloxamer pertenece al grupo químico de surfactantes no iónicos de copolímeros de polioxietileno-polipropileno, los cuales han sido usados ampliamente como excipientes en la humectación, favorecedores de la superficie de adsorción y solubilización de diversos agentes. El segmento de polioxietileno es hidrofílico, mientras que el segmento polioxipropileno es hidrofóbico. Todos los Poloxamers son químicamente similares en su composición, difiriendo solamente en la cantidad relativa de óxidos de propileno y etileno que son adicionados durante su preparación. No son metabolizados en el organismo (Collet & Popli, 2000) y se utilizan en formulaciones farmacéuticas de administración oral, parenteral y tópica; generalmente se admite que carecen de toxicidad y que no son irritantes. Este agente transportador presenta un bajo punto de disolución (52 – 57°), propiedades

surfactantes y una amplia seguridad para ser utilizado por vía oral (Collet & Popli, 2000; Vilhelmsen *et al.*, 2005; Zhai *et al.*, 2008).

Hipótesis:

1. El metabolito ABZSO administrado por vía oral en caninos posee un comportamiento farmacocinético (PK) similar al logrado por la administración de su droga madre (ABZ).
2. El PK del ABZ sería favorecido por la incorporación del Poloxamer P188 a la formulación.

Objetivo:

El objetivo de este trabajo fue estudiar la cinética plasmática de una formulación antiparasitaria basada en ABZSO como principio activo y compararla con 2 formulaciones a base de ABZ, con el propósito de investigar nuevas estrategias terapéuticas antihelmínticas en la utilización de estas moléculas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Animales:

Para el estudio PK se utilizaron tres (3) grupos de perros sanos libres de endoparásitos, raza labrador de pelo corto ($n = 9^*$), un (1) macho y ocho (8) hembras no gestadas con edades comprendidas entre 2 y 4 años, ($41 \pm 1,87$ kgs), procedentes del plantel de perros, división narcóticos, de la Armada Nacional Uruguaya. Los animales presentaban un estado nutricional de acuerdo a los estándares morfológicos, se tomaron parámetros fisiológicos al comienzo del experimento y antes de la administración de las drogas en ensayo. Todos los animales estaban libres de parásitos gastrointestinales, para lo cual fueron evaluados desde el punto de vista parasitológico mediante tests de coprología parasitaria (Thienpont *et al.*, 1979), los días -21, -14, -7 y -1. Durante el período experimental cada animal estuvo alojado en caniles con suelo impermeable y buen drenaje, recibieron una alimentación basada en alimento balanceado y agua *ad libitum*. Los protocolos y manejo de los animales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Veterinaria (UdelaR), Montevideo Uruguay. ([http:// www.fvet.edu.uy](http://www.fvet.edu.uy)).

* *La muestra fue acotada siguiendo las tendencias mundiales de bioética*

2.2 Drogas utilizadas en el estudio

Para el estudio farmacocinético se utilizaron estándares internos de Albendazole (ABZ), ABZ-sulfóxido (ABZSO), ABZ-sulfona (ABZSO₂) y Oxibendazole (OBZ).

Los animales recibieron aleatoriamente tres formulaciones a base de ABZ: formulación A: tradicional de ABZ en tabletas, formulación B: ABZ en tabletas modificada con Poloxamer P188 (1:1) y formulación C de ABZSO en tabletas proporcionada por el Laboratorio AFFORD, Argentina. La formulación B fue

preparada a partir de 200 mg de droga pura (ABZ), la cual fue sometida a diferentes procesos químicos llevados a cabo en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Córdoba, República Argentina.

2.3 Diseño experimental

2.1.3 Organización de los grupos de animales y administración de las drogas.

Los animales utilizados en el ensayo se agruparon al azar en tres grupos (n=3) (Grupo I: animales #1, #2, #3; Grupo II: animales #4, #5, #6; Grupo III: animales #7, #8, #9), los cuales recibieron tres diferentes tratamientos siguiendo un diseño en bloque incompleto.

Cada tratamiento experimental (formulaciones B y C) fue administrado en dos (2) fases, a seis animales (n=6) del total de los nueve perros participantes en el ensayo. En la **Fase I**: los animales asignados al Grupo I recibieron una formulación convencional, no experimental, de ABZ en tabletas a la dosis de 25 mg/kg (Tratamiento A), los animales del Grupo II recibieron una formulación experimental de ABZ modificado con Poloxamer P188 (1:1) (Tratamiento B) en tabletas a la dosis de 25 mg/kg, los animales correspondientes al Grupo III fueron tratados con ABZSO (Tratamiento C) a una dosis equimolar a la del ABZ convencional.

Luego de un periodo de espera equivalente a 21 días, el ensayo se repitió como **Fase II**. En dicha fase los animales fueron reagrupados en tres (3) Grupos al igual que para la Fase I, teniendo en cuenta que cada perro recibiría tratamientos diferentes a los de la Fase anterior.

2.4 Muestras sanguíneas

En ambas fases se extrajeron muestras sanguíneas de la vena safena de los animales antes (hora 0) y después de las administraciones de las drogas (0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 18; y 24 hrs.), mediante la utilización de un catéter 18G; las mismas fueron transferidas a tubos heparinizados inmediatamente luego de su extracción.

Se obtuvieron los plasmas respectivos mediante centrifugación a 3000 g durante 15 minutos, luego los mismos fueron transferidos a tubos plásticos debidamente rotulados, los cuales fueron congelados a una temperatura de -20°C en el Laboratorio de Farmacología, Facultad de Veterinaria, UdelaR. A parte de las muestras de los animales del ensayo, se obtuvieron muestras sanguíneas de diferentes perros (no utilizados en el experimento), que no habían recibido BZD durante los sesenta (60) días anteriores a las extracciones, dichas muestras fueron sometidas al mismo tratamiento de centrifugación y congelado antes mencionado, siendo rotuladas como plasmas blanco.

Todas las muestras congeladas fueron analizadas mediante Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) en el Laboratorio de Farmacología de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, (UNCPBA), Tandil, República Argentina.

2.5 Procedimientos analíticos

Las muestras de plasma blanco procedentes de perros libres de drogas de tipo BZD fueron analizadas para comprobar la inexistencia de sustancias extrañas, para esto se realizaron extracciones con acetonitrilo liposoluble, metanol HPLC y agua HPLC libre de impurezas (Mallinckrodt Chemicals).

A partir de diluciones de estándares de ABZ, ABZSO y ABZSO₂: 1/1000 – 1/100 – 1/10, se obtuvieron soluciones madre de (10 µg/mL). Dichas soluciones fueron mezcladas tomando 1 mL de la dilución de 100 µg/mL de cada una utilizando pipetas automáticas. Luego se adicionaron 7 mL de Metanol.

2.6 Análisis de los metabolitos de ABZ

2.6.1 Proceso de extracción sólida *.

Los metabolitos ABZSO y ABZSO₂ así como el OBZ utilizado como estándar interno, fueron extraídos de los plasmas (Sánchez Bruni *et al.*, 2002; Lanusse *et al.*, 1991), utilizando columnas C18 (carbono 18), (Strata Phenomenex) descartables.

En este proceso se utilizó un sistema generador de vacío con capacidad para 24 columnas de C18 (dichas columnas fueron acondicionadas siguiendo los siguientes pasos:

- a. Agregado de 1 mL de metanol HPLC (Mallinckrodt Chemicals), aplicación de presión de vacío hasta cinco minutos.
- b. Agregado de 1 mL de H₂O HPLC, aplicación de presión de vacío
- c. Agregado de 0,5 mL de la muestra mediante pipeta Pasteur, aplicación de presión de vacío hasta su vaciado.
- d. Extensión de tiempo de vacío durante cinco (5) minutos para lograr un buen secado y la retención de la muestra en el C18 de cada columna.
- e. Elusión con 1,5 mL de metanol HPLC y recolección de la muestra en tubos de vidrio, debidamente rotulados colocados debajo de cada una de las columnas.

Las muestras fueron sometidas a evaporación con N₂ durante veinte (20) minutos a una temperatura de 45°C, para posterior reconstitución con 200 µL de fase móvil.

* Anexo: Fotos 3, 4 y 5.

2.7 Análisis por HPLC:

2.7.1. Preparación de la fase móvil para Cromatógrafo **

Composición de la fase móvil: acetato de amonio (buffer) y acetonitrilo (solvente). Equipos necesarios: balanza de precisión, pHómetro, cuba con electrodo y agitador electrónico.

En la balanza de precisión se pesaron 1,93 g de acetato de amonio y 0,1 g de azida sódica (antifúngico); se agregó un litro de agua desionizada y se sometió a un agitador electrónico durante unos segundos. Luego se ajustó el pH de la solución utilizando HCl al 37% o NaOH al 5%, hasta lograr un valor adecuado de 6,6.

Se filtró la solución final mediante filtro de nylon para partículas de 0,45 μ . El buffer así obtenido se almacenó en frasco color caramelo para su protección contra la luz.

2.7.2. Procedimiento de Resuspensión y Recuperación

Los tubos de vidrio conteniendo la muestra sometida a evaporación con N_2 , se resuspendieron con el agregado de 200 μ L de acetonitrilo, mediante pipeta automática graduada en μ L.

Las muestras experimentales (plasmas blancos y plasmas con BDZ), fueron analizadas por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) con detector ultravioleta. Para ello se inyectaron cincuenta (50) μ L de cada muestra previamente extraída y los analitos eluidos (flujo 1,2 mL/min) de la columna analítica (5 μ m, 250 mm x 4,6 mm, columna C18), usando un método lineal de gradiente (Sánchez Bruni, 1995).

Los compuestos (ABZ, ABZSO, ABZSO₂ y OBZ) fueron identificados mediante los tiempos de retención según los estándares puros de referencia. Las muestras blanco indicaron el pico de retención correspondiente con el agregado de estándar OBZ, mientras que las muestras experimentales detectaron picos de ABZ y sus analitos en los tiempos de retención estudiados en la validación del método experimental.

Las curvas de calibración para cada analito fueron construidas mediante análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados, lo cual estimó un coeficiente de correlación (r) entre 0.9987 y 0.9995. Los límites de cuantificación (QL) fueron 0.01 μ g/mL (ABZ y ABZSO) y 0.03 μ g/mL (ABZSO₂).

** Anexo. Fotos 6 a 11

2.8 Análisis Farmacocinético

Las curvas de concentración vs tiempo para los metabolitos ABZSO y ABZSO₂ en los plasmas de cada animal, fueron calculadas utilizando un software PK Solution 2.0 (Summit Research Services, OH, USA). La descripción de las

curvas bioexponenciales de la concentración vs tiempo para los analitos ABZSO y ABZSO₂ luego del tratamiento vía oral, fueron calculadas mediante la siguiente ecuación (Notari, 1987).

$$C_p = Be^{-\lambda_2 t} - Be^{-\lambda_1 t}$$

Donde: C_p es la concentración en plasma en el tiempo t luego de la administración ($\mu\text{g/mL}$); B es la concentración en tiempo cero extrapolada desde la fase de eliminación ($\mu\text{g/mL}$); e es la base del logaritmo natural; λ_2 es el gradiente terminal (h^{-1}) y λ_1 es el gradiente obtenido por el ajuste el cual representa ya sea la constante de absorción de primer orden (λ_1) o la tasa constante de primer orden de formación del metabolito (λ_{for}) (h^{-1}). La vida media de eliminación ($t_{1/2\lambda_2}$) y absorción ($t_{1/2\lambda_1}$) o las vidas medias de formación de los metabolitos ($t_{1/2\lambda_{for}}$) fueron calculados como $\ln 2/\lambda_2$ y $\ln 2/\lambda_1$, respectivamente.

El pico de concentración C_{max} y T_{max} fue demostrado mediante el ploteo de las curvas de concentración vs tiempo para cada analito. El área bajo la curva (AUC) y el área bajo la curva primer momento (AUMC), fueron calculadas mediante la regla linear trapezoidal (Gibaldi & Perrier, 1982).

$$AUMC_{(0-t)} = \sum_{i=0}^{n-1} \frac{t_{i+1} - t_i}{2} (C_i t_i + C_{i+1} t_{i+1}) + \frac{C_{last} \cdot t_{last}}{\lambda_z} + \frac{C_{last}}{\lambda_z^2}$$

El tiempo medio de residencia (TMR) fue determinado como $AUMC/AUC$.

2.9 Análisis estadístico

Los diferentes parámetros farmacocinéticos obtenidos de área bajo la curva (AUC), T_{max} y C_{max} para los analitos ABZSO y ABZSO₂, fueron comparados mediante test de ANOVA. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

3. RESULTADOS

La droga madre ABZ no fue detectada en plasma luego de los tres tratamientos ensayados. El ABZSO fue detectado en plasma durante 12 horas (formulación A) y 24 horas (formulaciones B y C). Las curvas farmacocinéticas plasmáticas comparativas luego de la administración oral de las tres formulaciones diferentes de ABZSO se muestran en la Fig. II.

La Tabla I resume los parámetros PK de las tres diferentes formulaciones de ABZSO y ABZSO₂ obtenidos luego de la administración oral. El comportamiento PK del ABZSO, medido en términos de AUC, luego de su administración (formulación C) fue significativamente mayor ($P < 0.01$), cuando se le comparó con los obtenidos de las formulaciones A y B. La disposición farmacocinética de ABZSO₂ (metabolito inactivo) luego de la administración de las tres formulaciones ensayadas se muestran en la Fig. III.

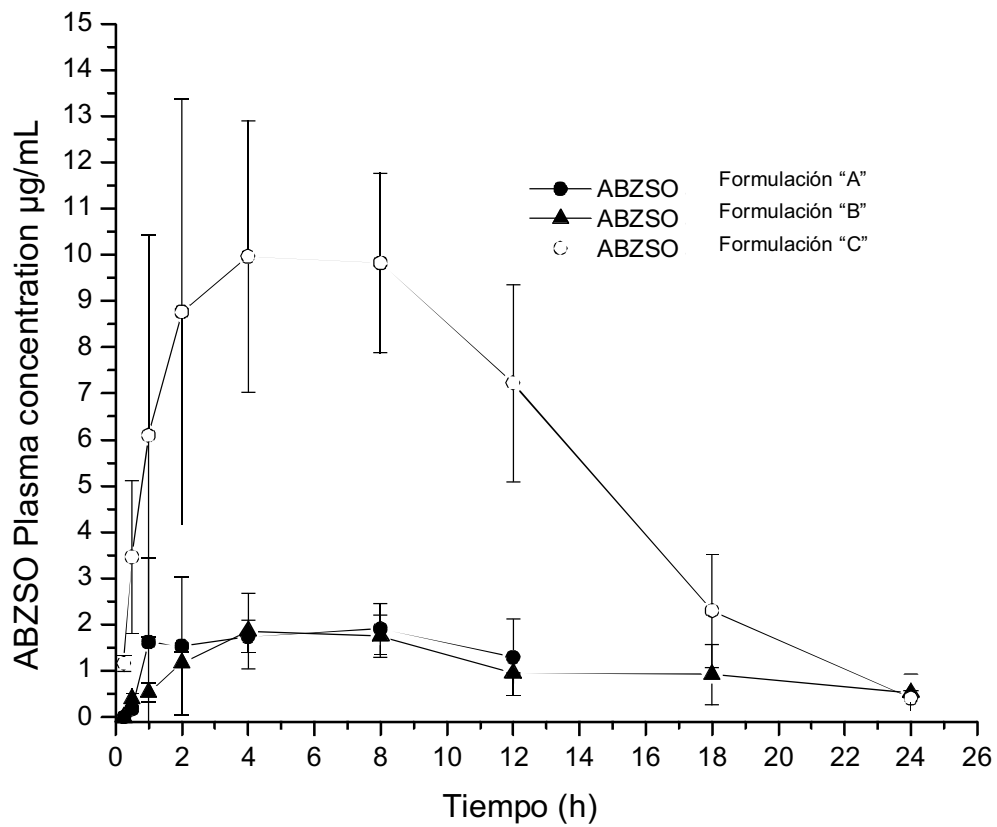


Figura II: Perfiles plasmáticos comparativos (media \pm DS) (n = 6) para el ABZSO luego de la administración oral de dos diferentes formulaciones derivadas de ABZ.

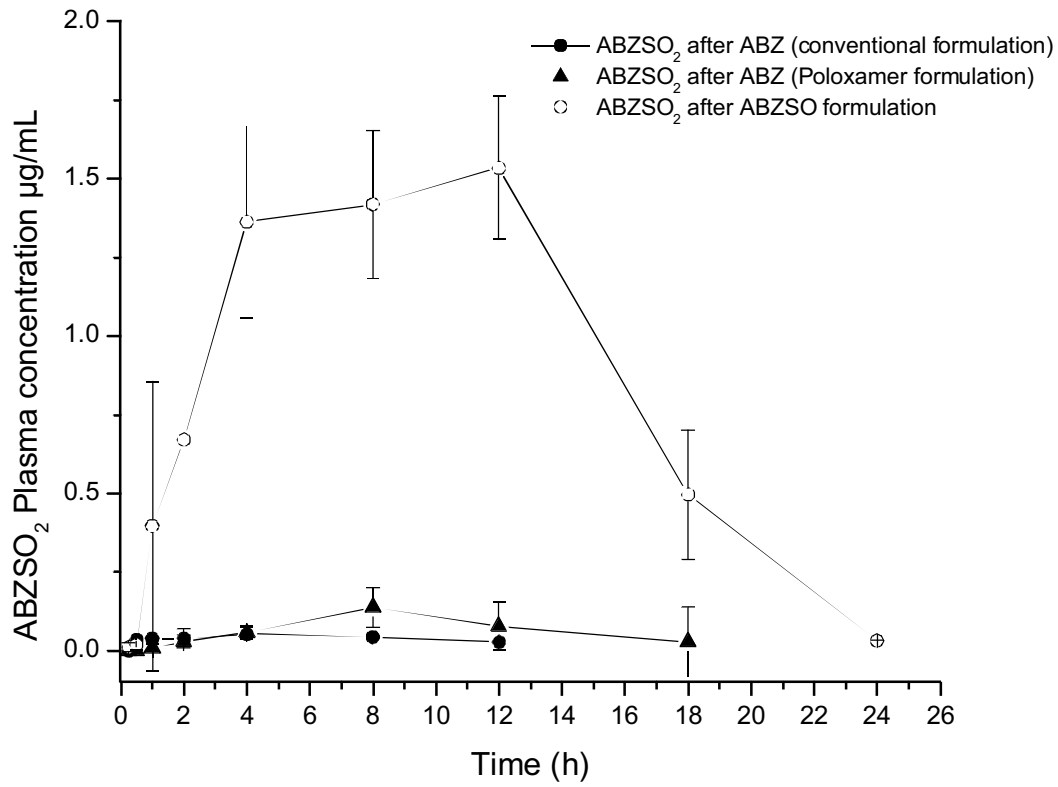


Figura III: Perfiles plasmáticos comparativos (media \pm DS) ($n = 6$) de ABZSO₂ obtenidos luego de la administración oral de dos diferentes formulaciones derivadas de ABZ.

Tabla I: Variables cinéticas plasmáticas comparativas para Albendazole sulfóxido (ABZSO) y Albendazole sulfona (ABZSO₂) luego de la administración oral de tres diferentes formulaciones.

Parámetros PK	GRUPO I ABZ tradicional (Cápsulas)		GRUPO II ABZ / Poloxamer (Cápsulas)		GRUPO III ABZSO (Tabletas)	
	ABZSO	ABZSO ₂	ABZSO	ABZSO ₂	ABZSO	ABZSO ₂
C _{max} (µg/mL)	2.42 ± 1.26 ^a	0.42 ± 0.32 ^a	1.92 ± 1.44 ^a	0.31 ± 0.26 ^a	11.7 ± 3.13 ^b	1.74 ± 0.22 ^b
T _{max} (h)	5.34 ± 2.54 ^a	10.3 ± 3.47 ^a	3.12 ± 2.76 ^a	15.2 ± 8.44 ^a	7.26 ± 3.53 ^a	11.4 ± 4.76 ^a
T _{½ λ₁} (h)	2.15 ± 1.32 ^a	2.74 ± 1.98 ^a	1.52 ± 1.12 ^a	3.12 ± 2.46 ^a	1.73 ± 0.75 ^a	1.54 ± 0.50 ^a
AUC _(0-t) µg.h/mL)	18.1 ± 7.26 ^{a ‡}	2.93 ± 1.53 ^a	16.9 ± 9.85 ^{a ‡}	3.11 ± 2.61 ^a	136 ± 27.0 ^{b ‡}	23.5 ± 4.83 ^b
AUMC total (µg. h ² /mL)	184 ± 92.0 ^a	56.7 ± 27.6 ^a	394 ± 167 ^a	39.4 ± 20.2 ^a	1237 ± 390 ^b	469 ± 140 ^b
T _{½ λ₂} (h)	2.14 ± 1.38 ^a	2.83 ± 2.05 ^a	5.93 ± 2.93 ^a	2.34 ± 0.54 ^a	3.14 ± 1.52 ^a	2.92 ± 1.17 ^a
MRT (hr)	8.24 ± 3.46 ^a	11.7 ± 7.23 ^a	16.2 ± 6.28 ^a	20.6 ± 7.50 ^a	8.73 ± 1.29 ^a	15.2 ± 5.29 ^a
PDP	0.25 - 18	1.0 - 18	0.5 - 18	2.0 - 12	0.25 - 24	0.25 - 24

Diferentes letras superinscriptas indican diferencias estadísticas entre los grupos = $p < 0,05$

T_{½ λ₁}: vida media formación metabolito; C_{max}: pico de concentración; T_{max}: tiempo para C_{max}; AUC: área bajo la curva vs tiempo extrapolado a un tiempo t; AUMC: área bajo la curva en el primer momento de concentración vs tiempo extrapolado al infinito; T_{½ λ₂}: vida media de eliminación; MRT: tiempo medio de residencia. PDP: periodo de detección plasmático; NA: no aplicable.

‡ AUC: valores normalizados según dosis.

4. DISCUSION

Cuando un fármaco o molécula biológicamente activa, se administra en una forma farmacéutica convencional (tableta, inyectable, etc.), el fármaco es liberado rápidamente y sin restricciones en el organismo. Las propiedades fisicoquímicas del mismo (solubilidad, ionización etc.), condicionan su eventual absorción a través de las membranas biológicas y por lo tanto su biodisponibilidad. Esto puede traer aparejado una disminución de la efectividad de la farmacoterapia y en numerosas ocasiones la aparición de efectos adversos. Los efectos farmacológicos de una droga se pueden observar generalmente luego de un corto periodo de tiempo luego de su administración. Sin embargo, entre la administración y el efecto farmacológico, la droga debe cruzar barreras biológicas, lo cual se realizará en forma rápida o más lentamente, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la molécula administrada y de la naturaleza de la barrera biológica (Sánchez Bruni, 2006).

La baja hidrosolubilidad de los BZD puede limitar la absorción durante el tránsito gastrointestinal (McKellar & Scott, 1990; McKellar *et al.*, 1990) lo cual puede corresponder al menor tiempo de dicho tránsito en el perro cuando se lo compara con otras especies domésticas, como por ejemplo el rumiante (McKellar *et al.*, 1993). Se piensa que la tasa de disolución de los BZD en el estómago de diferentes especies animales es extremadamente importante para alcanzar una adecuada absorción y por consiguiente buena disponibilidad, secreción gastrointestinal retrógrada y elevada eficacia clínica. La baja absorción GI y la falta de solubilidad en agua son importantes limitantes para la formulación, biodisponibilidad y eficacia de los antihelmínticos BZD. Se han desarrollado pro-drogas (pro-BZD), para sortear algunos de los mencionados inconvenientes lo cual conforma los avances más novedosos en la búsqueda de moléculas BZD alternativas.

Si se tiene en cuenta que los compuestos BZD (por ejemplo ABZ ó FBZ) se formulan mayoritariamente en forma de suspensión o tabletas, entonces el primer paso será la disolución de la formulación (fase farmacéutica); la tasa de disolución puede verse alterada de acuerdo al tamaño de la partícula en dicha formulación. La droga disuelta es absorbida y simultáneamente, se ponen en juego los procesos de distribución, metabolismo y eliminación (fase farmacocinética). Los compuestos BZD llegarán al sitio donde se ubica el parásito blanco en concentraciones variables, de acuerdo al tejido de localización del mismo. Aún llegando al sitio (tejido / fluido) donde habita el parásito, todavía el fármaco tiene que penetrar al interior del mismo y reconocer su receptor. Una vez que el antihelmíntico fue absorbido en el tracto GI, es rápidamente distribuido por el sistema circulatorio comenzando simultáneamente el proceso de biotransformación necesario para facilitar la eliminación de estas drogas y/o sus metabolitos. En consecuencia, estas drogas tienen un mayor tiempo para intercambio (distribución reversible) entre plasma y tracto GI, lo cual es muy importante para alcanzar concentraciones adecuadas en el tracto digestivo y prolongar la exposición de los parásitos localizados en el mismo, a niveles de droga que les son tóxicos. A diferencia de los ruminantes en donde el rumen actúa como reservorio de droga y explica el porqué de una sola administración, los monogástricos necesitan tratamientos multidosis. Si se compara la permanencia en plasma del metabolito activo

ABZSO entre un rumiante y un canino luego de la administración de ABZ, se puede observar que en el primero las concentraciones del metabolito activo pueden permanecer entre 36 y 72 hs post-tratamiento, alcanzando el pico máximo plasmático (C_{max}) entre 10 y 12h post tratamiento. Sin embargo periodos de detección significativamente mas cortos fueron observados en el canino en donde el metabolito ABZSO fue detectado en plasma solamente por 16 h luego de la administración de ABZ a la dosis recomendada de 25 mg/kg. Esto reafirma el concepto que para tener una eficacia cercana al 100% sobre parásitos maduros e inmaduros de caninos y felinos, son necesarias concentraciones sostenidas de droga en el sitio de infección parasitaria, lo cual se logra solamente administrando estas moléculas durante 3 a 5 días consecutivos.

En la última década se han caracterizado diversos factores que afectan los procesos farmacocinéticos de diversas drogas antihelmínticas en diferentes especies. Es así que la caracterización de factores como la dosis, la vía de administración, la formulación farmacéutica, el tipo de dieta, la edad, el ayuno, el sexo y la raza, demostraron alterar notablemente la cinética de disposición y como consecuencia la eficacia clínica de la mayoría de las moléculas antiparasitarias. Aumentar la biodisponibilidad de droga activa es una estrategia farmacológica que coopera en la optimización del tratamiento. Cualquiera sea el sistema seleccionado el objetivo perseguido es el de mantener concentraciones plasmáticas y tisulares sostenidas en función del tiempo, buscando la practicidad de la administración en forma de monodosis en detrimento de las múltiples dosis requeridas para el tratamiento de monogástricos, incluido el ser humano.

En este trabajo de tesis el ABZSO formulado en tabletas, fue absorbido en mayor medida cuando fue comparado con las absorciones de las formulaciones del ABZ tradicional y ABZ con Poloxamer P188 (Figura I). Los compuestos Benzimidazoles como el ABZ formulado en tabletas deben disolverse en un pH bajo gástrico, ha sido demostrado que la tasa de disolución puede alterarse de acuerdo al tamaño de la partícula (Hennessy, 1993). En caninos la combinación de ABZ con Poloxamer (formulación B) debería haber podido atravesar la porción del intestino delgado con mayor capacidad de absorción, para lograr una disolución completa y liberación del principio activo, para luego ser absorbido y distribuido a través del organismo, metabolizado y eliminado (Zerrouk *et al.* 2001).

Los estudios farmacocinéticos comparativos realizados indicaron en este ensayo, valores significativos de área bajo la curva (AUC) ($P > 0.001$) (+500%) y una C_{max} (+487%) para el ABZSO de la formulación C, cuando fueron comparados en forma estadística con las formulaciones A y B, luego de una única administración oral.

Cuando el ABZSO fue administrado en forma de tabletas en una única dosis, el metabolito activo (ABZSO) y el metabolito inactivo (ABZSO₂), fueron los principales metabolitos detectados en el plasma hasta 24 horas post administración de la formulación C (Tabla I).

Luego de la administración de la formulación C, se midieron en la circulación sanguínea sistémica niveles de concentración y picos más altos correspondientes al ABZSO, cuando se le comparó con aquellos correspondientes a la administración de las formulaciones A (ABZ convencional) y B (ABZ con Poloxamer). Este aumento se relaciona con las características físicas y químicas del metabolito activo ABZSO, cuando se le compara con su droga madre ABZ (formulaciones A y B).

Se ha descrito que la solubilidad acuosa de ABZ es alrededor de 0,01 mg/mL (Reppas *et al.*, 1999), mientras que para el ABZSO es aproximadamente seis veces mayor (Zimei *et al.*, 2005). Esto muestra claramente una correlación más alta entre la solubilidad de los compuestos y el área bajo la curva (AUC) obtenida. Es por esta razón, que los resultados obtenidos en este ensayo son muy importantes para posteriores diseños de formulaciones orales de ABZ y ABZSO de liberación modificada.

Por otra parte los resultados obtenidos para el ABZ con Poloxamer 188 (formulación B) fueron inesperados. En dispersiones sólidas es común observar un aumento de la velocidad de disolución de fármaco conforme aumenta la proporción del transportador o *carrier* en el sistema. Con referencia a la formulación B, se esperaba una mejora importante en las propiedades de disolución del preparado farmacéutico con el agregado de Poloxamer P188 como transportador en una dispersión sólida conteniendo ABZ, lo cual fue demostrado *in vitro*, con un considerable aumento de la liberación del ABZ en la etapa inicial (5 minutos) de la disolución de la droga. Esto se atribuye al aumento de la superficie de disolución del área, en combinación con la mejor humedad y solubilización del ABZ como consecuencia de la disolución del transportador.

Se han realizado varios estudios referidos al mecanismo de gelificación de soluciones con Poloxamer, los cuales han demostrado que cuando las dispersiones sólidas se colocan en agua a 37°C, forman un gel (Peppas, 1989; Ritger, 1987).

Por tanto una explicación posible para los resultados obtenidos en este ensayo estaría enmarcada en las propiedades físico-químicas del Poloxamer P188. En este sentido las concentraciones acuosas de P188 pueden formar geles termoreversibles. El mecanismo de gelificación de las soluciones con Poloxamer ha sido extensamente investigado, aunque aun se encuentra bajo discusión (Nanjawade *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando las dispersiones sólidas se mantienen en agua a 37°, se espera la formación del gel en el microambiente de la superficie de la partícula. La relativa influencia de la difusión-disolución de la droga y la ruptura de la cadena polimérica en la capa de gel, define la tasa de disolución, de acuerdo a la teoría clásica de la liberación de la droga desde los sistemas matriciales (Peppas & Sahlin, 1989; Ritger & Peppas, 1987). Usualmente en experimentos *in vitro* las dispersiones se colocan sobre la superficie del medio en el cual se van a disolver. Sin embargo en este estudio dichas dispersiones fueron colocadas en cápsulas de consistencia dura, por lo cual en el ensayo *in vivo* se esperaba hubiera una disminución del mecanismo de gelificación, acompañado por el rápido pasaje a través del tubo gastrointestinal, característico de la especie canina.

En este ensayo no se pudo verificar que la formulación B tuviera variación significativa en los parámetros PK, cuando fue comparada estadísticamente con la droga madre (formulación A). Esto fue atribuido a que el ensayo se realizó *in vivo*, donde los perros tienen una temperatura corporal normal de 39°C, la conducta exhibida por el Poloxamer P188 *in vitro* (37 C°), no se correspondió al estudio *in vivo*, con lo cual se concluyó que la diferencia de temperatura fue un parámetro importante en los resultados esperados. El gel formado por el Poloxamer es termodependiente, resultando más viscoso a medida que aumenta la temperatura, impidiendo de esta manera la liberación y consecuente disolución de la molécula activa.

Entonces, y teniendo en cuenta los resultados de este ensayo con respecto a la formulación B, los efectos de compactación y desintegración deberán ser estudiados nuevamente desarrollando nuevos ensayos cuyo objetivo sea evaluar la factibilidad en el uso de tabletas o capsulas de desintegración rápida (Chandrasekhar *et al.*, 2009; Srinarong *et al.*, 2009).

Cuando el ABZSO formulado en tabletas fue administrado en una única dosis oral, el metabolito activo ABZSO y el metabolito inactivo ABZSO₂, fueron los principales metabolitos detectados en plasma hasta 24 horas post-tratamiento en la formulación C (Tabla I). El pico pronunciado de ABZSO (formulación C) mostró una presencia sostenida de la droga en la circulación, comparada con el perfil obtenido después de la administración del ABZ tradicional (formulación A) y del ABZ con Poloxamer (formulación B).

El incremento de la exposición plasmática del metabolito activo ABZSO esta relacionado con sus características físicas y químicas, cuando es comparado con la droga madre ABZ (formulación A). Ésta elevada exposición plasmática del ABZSO (formulación C) fue 751%, lo cual es consistente con los resultados obtenidos después de la administración oral de las otras dos formulaciones en tabletas (formulaciones A y B). La influencia del status alimenticio en las concentraciones plasmáticas de ABZSO ha sido reportada previamente por McKellar *et al.*, (1993).

5. CONCLUSIONES

La formulación experimental utilizada en el Grupo III evaluó una elevada eficacia antiparasitaria (estadios adultos y larvarios), en perros cuando fue administrada durante tres y cinco días (Saumell *et al.*, 2003). Los perfiles plasmáticos de la formulación C se correlacionaron en gran medida con su alta eficacia en una única dosis (>90%) contra los nematodos mas patógenos en sus estadios larvales y adultos (Saumell *et al.*, 2006).

Los datos del perfil farmacocinético del ABZSO formulado en tabletas orales presentado en este trabajo, contribuyeron a evaluar su alto potencial como droga antihelmíntica para parásitos gastrointestinales en perros. Sin embargo, la elevada exposición plasmática y una solubilidad seis (6) veces más alta que el ABZ demostrada por el ABZSO, sugieren una posible disminución del

margen terapéutico de esta droga, si es administrada a una dosis superior a la especificada.

Este trabajo contribuyó en la investigación y desarrollo de nuevas formulaciones antihelmínticas con patrones de absorción y biodisponibilidad mejorados para administración en animales de compañía.

La adecuada comprensión del comportamiento PK de una droga activa es fundamental para optimizar su eficacia.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Álvarez L, Sanchez Bruni S, Lanusse C. (1997). Fasting-induced changes to the pharmacokinetic behaviour of albendazole and its metabolites in calves. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 20: 38-47.
2. Álvarez L, Sanchez Bruni S, Lanusse C. (1999). *In vivo* and *ex vivo* uptake of albendazole and its sulphoxide metabolite by cestode parasites: relationship with their kinetic behaviour in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 22: 77-86.
3. Álvarez L, Sanchez Bruni S, Lanusse C, Sallovitz J. (2000). Enhanced plasma and target tissue availabilities of albendazole and albendazole sulphoxide in fasted calves: evaluation of different fasting intervals. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 23:193-201.
4. Baggot J, McKellar Q. (1994). The absorption, distribution and elimination of anthelmintic drugs: the role of pharmacokinetics. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 17: 409-419.
5. Belo M, Castagnolli K, Gomes R, Costa A, Nascimento A, Morais, D. (1999). Assay on the efficacy of an albendazole sulphoxide, praziquantel and pyrantel pamoate association for helminth parasite control in cats. *ARS Vet. Sup:* 45-49.
6. Boggio J. (2008). Fármacos que actúan contra nematodos. En: Rubio M, Boggio J. *Farmacología Veterinaria*. Ed. Universidad Católica de Córdoba. 2ª ed. Córdoba. Cap. 55, pp. 579-600.
7. Bowman D, Lynn R, Eberhard M. (2004). Helmintos. En: Bowman D, Lynn R, Eberhard M. *Parasitología para Veterinarios de Georgis*. Ed. Elsevier. 8ª ed. Madrid. Cap. 3, pp. 121-254.
8. Cabrera P, Sampaio I, Parietti S, Lavarello L, Correa O, Bossi M, Rossi D. (1987). Relevamiento de parásitos con significación zoonótica en *Canis familiaris*. IV Congreso Nacional de Veterinaria, 11 a 14 de noviembre de 1987, Montevideo.
9. Cabrera P, Sallua S, Lavarello L, Parietti S, De Torres E, Vilaró L, Clivio S, Molinari C. (1990). Echinococcosis/Hidatidosis en dos comunidades del Depto. de San José. Jornadas Técnicas de Salud Animal, Facultad de Veterinaria, Instituto de Clínicas, 20 de julio de 1990, pp. 9-11.
10. Cabrera P, Parietti S, Harán G, Benavidez U, Lloyd S, Perera G, Valledor S, Gemmell M, Botto T. (1996). Rates on reinfection with *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis* and other cestodes in rural dog populations in Uruguay. *Int. J. Parasitol.* 26: 79-83.
11. Campbell, W. (1990). Benzimidazoles: veterinary uses. *Parasitol. Today.* 6: 130-133.
12. Carballo Pou M, Viera O, Calzada V, Lujambio L. (1937). La Ancilostomiasis del Perro en el Uruguay. En: Anales. Fac. Vet. Uruguay. 3ª época, (2 y 3): 241-249.

13. Castagnolli K, Costa G, Nascimento A, Rocha U, Costa A, Neto G. (1999). Anthelmintic efficacy of albendazole sulphoxide associated to pyrantel pamoate and praziquantel in dogs. *ARS Vet. Sup*: 34-39.
14. Collett J, Popli H. (2000). Poloxamer. En: Kibbe, A. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Ed. Pharmaceutical Press, London. Cap 13, pp. 385–388.
15. Chandrasekhar R, Hassan Z, AlHusban F, Smith A, Mohammed A. (2009). The role of formulation excipients in the development of lyophilised fast-disintegrating tablets. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72: 119–129.
16. Chiou W, Riegelman S. (1971). Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. *J. Pharm Sci.* 60: 1281-1302.
17. Delatour P, E Benoit, F. Garnier, S. Besse. (1990). Chirality of the sulphoxide of fenbendazole and albendazole in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 13: 361–366.
18. Díez P, Díez N, Morondo M. (1999). Nematodosis: Toxocariosis, Toxascariosis, Ancilostomatidosis, Tricuriosis, Estrongiloidosis, Espirocercosis y Ollulanosis. En: Cordero del Campillo M, Rojo F. *Parasitología Veterinaria*. Ed. Mc Graw Hill. Interamericana. Madrid. Cap. 35, pp. 615-651.
19. Edwards G, Breckenridge A. (1988). Clinical pharmacokinetics of anthelmintic drugs. *Clin. Pharmacokinet.* 15: 67-93.
20. Estévez L, Levratto R, Sobrero T. (1960-1961). Estudio estadístico de la incidencia parasitaria en animales domésticos. *Anales Fac. Vet. Uruguay*, 10: 75-78.
21. Ganong, W (1995). Digestión y Absorción En: Ganong, W. *Fisiología Médica*. Ed. Manual Moderno. 20ª ed. México. Cap. 8, pp. 535-568.
22. García Sacristán A, Castejón F, de la Cruz L, González J, Murillo M, Salido G. (1995). Fisiología Digestiva de los rumiantes. En: García Sacristán A. *Fisiología Veterinaria*. Ed. Mc Graw Hill, Madrid. Cap. 46, pp. 599–648.
23. Galia E, Horton J, Dressman J. (1999). Albendazole Generics – a comparative in vitro study. *Pharmaceut. Res.* 16: 1871-1875.
24. Georgarakis E, Sigalas M, Avgoustakis K, Bikiaris D, Karava E. (2007). Investigation of the release mechanism of a sparingly water-soluble drug from solid dispersions in hydrophilic carriers based on physical state of drug, particle size distribution and drug–polymer interactions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66: 334–347.
25. Gibaldi, M, Perrier, D. (1982). *Pharmacokinetics*. Ed. Marcel Dekker Inc. 2ª ed. New York.
26. Hennessy, D. (1993). Pharmacokinetic disposition of benzimidazole drugs in the ruminant gastrointestinal tract. *Parasitol. Today.* 9: 329-333.

27. Hernández, S. (2000). Prevalencia de huevos de *Toxocara* sp. en plazas de la ciudad de Montevideo. Tesis de MSc en Epidemiología. Facultad de Veterinaria, UdelaR.
28. Holcman-Spector B, Olagüe G, Couto A. (1985). Helminthiasis del perro vagabundo (*Canis familiaris*) en la ciudad de Montevideo. Rev. Urug. Patol. Clin. 21: 67-73.
29. Jacob D, Arakawa A, Courtney C, Gemmell M, MxCall J, Myers G, Vanoarujs O. (1994). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics for dogs and cats. Vet. Parasitol. 52: 179-202.
30. Janssens S, Novoa de Armas H, Roberts C, Van den Mooter G, (2008). Characterization of ternary solid dispersions of Itraconazole in polyethylene glycol 6000/polyvidone-vinylacetate 64 blends Eur. J. Pharm. Biopharm. 69: 1114-1120.
31. Kanig L. (1964). Properties of Fused Mannitol in Compressed Tablets. J. Pharm. Sci. 53: 188-192.
32. Konno H, Handa T, Alonzo D, Taylor L. (2008). Effect of polymer type on the dissolution profile of amorphous solid dispersions containing felodipine. Eur. J. Pharm. Biopharm. 70: 493-499.
33. Lacey E, Brady R, Prichard R, Watson T. (1987). Comparison of inhibition of polymerisation of mammalian tubulin and helminth ovicidal activity by benzimidazole carbamates. Vet. Parasitol. 23: 105-119.
34. Lacey, E. (1990). Mode of action of Benzimidazoles. Parasitol. Today. 6: 112-115.
35. Lanusse C, Trudeau C, Ranjan S, Prichard R. (1991). Pharmacokinetic profile of netobimin metabolites after oral administration of zwitterion and trisamine formulations of netobimin to cattle. J. Vet. Pharmacol. Therap. 14: 101-108.
36. Lanusse C, Prichard R. (1993). Cinical Pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants. Drug Metabol. Rev. 25: 235-279.
37. Lanusse C, Gascon L, Prichard R. (1993). Gastrointestinal distribution of albendazole metabolites following netobimin administration to cattle: relationship with plasma disposition kinetics. J. Vet. Pharmacol. Therap. 16: 38-47.
38. Lanusse C, Virkel G, Sanchez Bruni S, Alvarez L, Lifschitz F, Imperiale F. (1998). Ricobendazole kinetics and availability following subcutaneous administration of a novel injectable formulation in calves. Res.Vet. Sci. 65: 5-10.
39. Lanusse C, Alvarez L, Sallovitz J, Mottier L, Sanchez Bruni, S (2007). Antinematodal Drugs, En: Riviere P, Papich M. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Ed. Wiley Blackwell, St. Press Univ. 9ª ed. Cap 40, pp.1053-1094.

40. Levy G. (1963). Effect of particle size on dissolution and gastrointestinal absorption rates of pharmaceuticals. *Am. J. Pharm. Sci. Support Public Health* 135: 78–92.
41. Marín M, Margarit M, Salcedo, G. (2002). Characterization and solubility study of solid dispersions of flunarizine and polyvinylpyrrolidone II. *J. Pharmacol.* 57: 723-727.
42. Martin R. (1997). Modes of action of anthelmintic drugs: a review. *Vet. J.* 154: 11-34.
43. Martínez A, Muiro A, Simón M. (1999) Diagnóstico de las Parasitosis. En: Cordero del Campillo M, Rojo F. *Parasitología Veterinaria* Ed. Mc Graw Hill. Interamericana. Madrid. Cap 14, pp.158-177.
44. McKellar Q, Scott E. (1990). The benzimidazole anthelmintic agents: a review. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 14: 101-108.
45. McKellar Q, Harrison P, Galbraith E, Inglis I. (1990). Pharmacokinetics of fenbendazole in dogs. *J. Vet Pharmacol. Therap.* 13: 386-392.
46. McKellar, Q. Galbraith, E. & Baxter, P. (1993). Oral absorption and bioavailability of fenbendazole in the dog and the effects of concurrent ingestion on food. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 13: 223-227.
47. Nanjawade B, Manvi V, Manjappa A, (2007). In situ-forming hydrogels for sustained ophthalmic drug delivery. *J. Contr. Release.* 122: 119-134.
48. Notari R. (1987). Pharmacokinetics. En: Notari R. *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics.* Ed. Marcel Dekker Inc. 4^a ed. Cap 2. pp. 45-128. New York.
49. Núñez J. (1987). Helminthiasis de los carnívoros domésticos. En: Núñez J. *Fundamentos de Parasitología Veterinaria.* Ed. Hemisferio Sur. Argentina. Cap. 6, pp. 85–100.
50. Oxberry M, Reynoldson J, Thompson R. (2000). The binding and distribution of albendazole and its principal metabolites in *Giardia duodenalis*. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 23: 113-120.
51. Peppas N, Sahlin J. (1989). A simple equation for description of solute release III. Coupling of diffusion and relaxation. *Int. J. Pharm.* 57: 169–172.
52. Piscopo S, Smoak I. (1997). Comparison of effects of albendazole sulphoxide on *in vitro* produced bovine embryos and rat embryos. *AJVR*, 58: 1038-1042.
53. Reppas C, Greenwood D, Dressman J. (1999). Albendazole generics, a comparative in vitro study. *Pharm. Res.* 16: 1871-1875.

54. Rew R, McKenzie E. (2002). Quimioterapia antihelmíntica. En: Prescott J, Baggott J, Walker R. *Terapéutica Antimicrobiana*. Ed. Inter-Médica 3ª ed. Buenos Aires. Cap. 20, pp. 431–447.
55. Ritger P, Peppas N. (1987). A simple equation for description of solute release (II). Fickian and anomalous release from swellable devices. *J. Control. Rel.* 5: 37–42.
56. Rodríguez M, Tramontano R. (1957). *Echinococcus granulosus* en perros campesinos. Bases para la estadística de infestación echinococócica de los perros campesinos en el Uruguay. 2da comunicación. II Congreso Nacional de Veterinaria, 6-10 de mayo de 1957, Montevideo, Uruguay, Tomo II, pp.283-286.
57. Sánchez Bruni S, Alvarez L, Virkel G, Lifschitz A, Monfrinotti A, Lanusse C. (1996). Perfil farmacocinético de ricobendazole administrado por vía parenteral en bovinos. *Rev. Med. Vet.* 77: 145-150.
58. Sánchez Bruni S, Sallovitz J, Savio E, McKellar Q, Lanusse C. (2000) Comparative Availability of two oral dosage forms of albendazole in dogs. *Vet J.* 160: 153-156.
59. Sánchez Bruni S, Sallovitz J, Alvarez L, Lanusse C. (2002). Antiparasitarios internos - Fármacos antihelmínticos: benzimidazoles y otros nematocidas. En: Botana, Landoni, Martín-Jiménez. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Ed. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España. Cap. 40, pp. 517-544.
60. Sánchez Bruni S, Jones D, McKellar Q. (2006). Pharmacological approaches towards rationalizing the use of endoparasitic drugs in small animals. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 29: 443-457.
61. Saumell C, Fusé L, Lutzelschwab C, Steffan P, Fiel C. (2003). Evaluación de antihelmínticos mediante un método cuantitativo para conteo de huevos en materia fecal de perro y gatos. X Jornadas Latinoamericanas y XV Nacionales de Fármaco-Toxicología Veterinaria. Universidad de La Plata. 25 a 28 de Setiembre 2003. Ciudad de la Plata. República Argentina, pp. 31-37.
62. Saumell C, Fuse L, Monfrinotti A, Iglesias L, Steffan P, Fiel C. (2006). Evaluación de Ricobendazole vía oral en caninos. *Rev. Med. Vet.* 87: 160-165.
63. Saumell C, Fusé L, Fiel C. (2007). www.ecvet.org: Texto completo del ensayo de Ricobendazole (Laboratorios AFFORD S.A.).
64. Savio E, Dominguez L, Malanga A, Quevedo D, Saldaña J, Camarote C, Ochoa A, Fagliolino P. (1998). Lipidic matrix of albendazole: an alternative for systemic infections. *Boll. Chim. Farm.* 137: 345-349.
65. Scarpelli L, Belo M, Souza L, Sabatini G, Costa A, Moraes F. (1999). Hematology and biochemical parameters of bovine treated with different doses of ivermectin, abamectin and albendazole sulphoxide. *ARS Vet.Sup.* 57-62.
66. Sekiguchi K, Obi N. (1964). Studies on Absorption of Eutectic Mixture. II. Absorption of Fused Conglomerates of Chloramphenicol and Urea in Rabbits. *Chem. Pharm. Bull.* 12: 134–144.

67. Soulsby E. (1987). *Parasitología y Enfermedades Parasitarias*, Ed. Nueva Editorial Interamericana 7ª ed. México.
68. Srinarong P, Faber J, Visser M, Hinrichs W, Frijlink H. (2009). Strongly enhanced dissolution rate of fenofibrate solid dispersion tablets by incorporation of superdisintegrants. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73: 154–161.
69. Steffan P, Fiel C, Ferreyra D. (2000). Eficacia del Ricobendazole en tratamientos repetidos contra nematodos gastrointestinales del bovino. *Rev. Med. Vet.* 81: 95-99.
70. Sumano H, Ocampo L. (1997). Antiparasitarios. En: Sumano H, Ocampo L. *Farmacología Veterinaria*. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 3ª ed México. Cap. 23, pp. 451–526.
71. Thienpont D, Rochette F, Vanparijs O. (1979). Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico. Ed. Janssen Research Foundation, Beerse, Bélgica.
72. Townsend L, Wise D. (1990). The synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles. *Parasitol. Today.* 6: 107-112.
73. Valledor M. (2002). Nematodosis más importantes en carnívoros en un refugio canino. *Jornadas de Parasitología Veterinaria*, Depto. de Parasitología, Facultad de Veterinaria, UdelaR, 19 y 20 de setiembre de 2002, Montevideo, Uruguay, pp. 26-28.
74. Valledor S, Castro O, Decia L, Eguren J, Perez V, Haran G, Cabrera P. (2006). Relevamiento de helmintos intestinales en caninos urbanos de Montevideo y Florida, y perros rurales del departamento de Florida, con el registro de un nuevo género de nematodo parasitando al canino en nuestro país. *Veterinaria (Montevideo)* 41: 43-49.
75. Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P. (2007). Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discov. Today.* 12: 1068-1075.
76. Vilhelmsen T, Eliassen H, Schaefer T. (2005). Effect of a melt agglomeration process on agglomerates containing solid dispersions. *Int. J. Pharm. Sci.* 303: 132-142.
77. Wang X, Michael A, Van den Mooter G. (2004). Study of the phase behaviour of polyethylene glycol 6000–itraconazole solid dispersions using DSC. *Int. J. Pharm. Sci.* 272: 181-187.
78. Wu Z, Razzak M, Tucker I, Medlicott N. (2005). Physicochemical Characterization of Ricobendazole: Solubility, Lipophilicity, and ionization characteristics. *Int. J. Pharm. Sci.* 94: 983-993.
79. Zerrouk N, Chemtob C, Arnaud S, Toscani S, Dugue P. (2001). In vitro and in vivo evaluation of carbamazepine-PEG 6000 solid dispersions. *Int. J. Pharm. Sci.* 225: 49–62.

80. Zimei W, Razzak M, Tucker I, Medicott N. (2005). Physicochemical characterization of ricobendazole. Solubility, lipophilicity, and Ionization characteristics. Int. J. Pharm. Sci. 94: 983-993.

81. Zhai H, Li S, Andrews G, Jones D, Bella S, Walker G. 2009. Nucleation and growth in fluidised hot melt granulation. Powder Tech.189: 230-237.

ANEXO

FOTOS EQUIPAMIENTO UTILIZADO

Laboratorio de Farmacología. Facultad de Veterinaria (UdelaR)

Laboratorio de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Tandil. Republica Argentina.



Foto 1 Centrífuga



Foto 2
Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC)

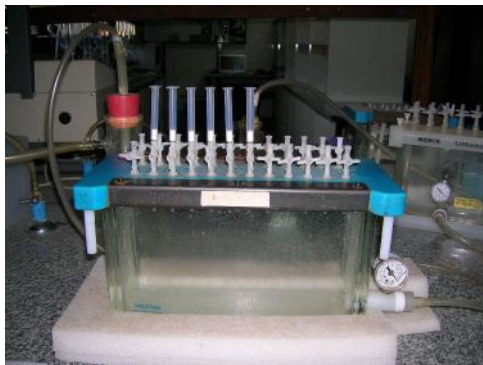


Foto 3
Sistema generador de vacío (24 columnas de C18)



Foto 4



Foto 5. Evaporador de N2



Foto 6. Agua desionizada



Foto 7. Agitador electrónico



Foto 8. pHachímetro



Foto 9. Balanza de precisión



Foto 10. Almacenamiento de Buffer



Foto 11. Columna HPLC