



Solubilidad de un compuesto con actividad fasciolicida: evaluación de eficacia *in vitro* y en ovinos experimentalmente infectados con *Fasciola hepatica*

Solubility of a compound with fasciolicidal activity: evaluation of efficacy *in vitro* and experimentally on infected sheep with *Fasciola hepatica*

Javier Arturo Munguía Xóchihua* Froylán Ibarra Velarde** Yolanda Vera Montenegro**
René Rosiles M.*** Antonio Romo Mancillas† Jorge Cantó Alarcón‡
Adriana Ducoing Watty°

Abstract

Compound alpha (Ca) is a benzimidazolic derivate which has shown a high fasciolicidal efficacy when it is given by oral via. Solubilization of Ca would be a suitable alternative to obtain an injectable formulation. The objectives of the present study were to evaluate the solubility of Ca in order to determine the *in vitro* fasciolicidal efficacy and experimentally on infected ovinos. The assays of solubility quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC), showed that beta-cyclodextrin (β -CD) and hydroxi-propyl-beta-cyclodextrin (HP- β -CD) solubilized in 0.015% and 1.018% respectively. The solubilization for HP- β -CD was calculated as 3.95% for 5.8 mg; 10.76% for HP- β -CD with methanol, 39.048% for proylene-glycol (PG), 100% for glycerol formal (GF), and 100% for combined PG and GF and water in proportions of 3:2:5 and 3:2:4. *In vitro* evaluation using immature *F. hepatica* showed that Ca induced 100% efficacy 24 hours after solubilization with either GF or GF combined with PG and water. The efficacy in sheep was 56.4 and 68.4% at 1 and 2 mg/kg respectively; whereas 1 mg/kg of sulphoxide metabolite induced an efficacy of 73.9%. The HPLC assays performed showed no evidence of the sulphoxide and sulphone metabolites. It is concluded that besides solubility and high *in vitro* fasciolicidal efficacy, the *in vivo* results in sheep showed only a moderate efficacy.

Key words: COMPOUND ALPHA, HPLC, CICLODEXTRINS, VEHICLES, COSOLVENCE.

Resumen

El compuesto alfa es un derivado bencimidazólico de gran eficacia fasciolicida, que se ingiere vía oral, su solubilización constituye una alternativa para obtener una formulación inyectable. Los objetivos de este estudio fueron: evaluar la solubilidad del compuesto alfa, determinar la eficacia fasciolicida *in vitro* y en ovinos experimentalmente infectados. Los ensayos de solubilidad que fueron cuantificados mediante cromatografía de líquidos de alta resolución, mostraron que la betaciclodextrina e hidroxipropil-betaciclodextrina solubilizaron en 0.051% y 1.018%. Esta última se evaluó con cinco concentraciones, mostró que a 5.8 mg la solubilidad fue 3.95%; hidroxipropil-betaciclodextrina y metanol, 10.76%; propilén-glicol, 39.048%; glicerol formal, 100%; y glicerol formal con propilén-glicol y agua en proporciones 3:2:5 y 3:2:4, 100%. La evaluación *in vitro* con fasciolas inmaduras mostró que el compuesto con glicerol formal y la combinación de vehículos a las 24 horas fueron eficaces en 100%. La eficacia *in vivo* en ovinos mostró que el compuesto alfa a dosis de 1 mg/kg fue de 56.46%, a 2 mg/kg de 68.4% y con sulfóxido del compuesto alfa a 1 mg/kg de 73.9%. No se encontró el compuesto alfa ni sus metabolitos sulfóxido y sulfona en el suero determinado por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución. Se concluye que a pesar de obtener solubilidad del compuesto alfa y alta eficacia fasciolicida *in vitro*, los resultados *in vivo* en ovinos revelaron eficacia moderada.

Palabras clave: COMPUESTO ALFA, CLAR, CICLODEXTRINAS, VEHÍCULOS, COSOLVENCIA.

Recibido el 28 de enero de 2009 y aceptado el 5 de octubre de 2009.

*Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero núm. 818 sur, Colonia Centro, 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México, Correo electrónico: jmunguia@itson.mx

**Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

***Departamento de Nutrición, Laboratorio de Toxicología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

†Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

‡Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Av. de las Ciencias s/n, Querétaro, Querétaro, México.

°Departamento de Genética y Estadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Nota: este trabajo forma parte de la tesis doctoral del primer autor.

Introduction

Fasciolosis caused by *Fasciola hepatica* affects several animal species, particularly ruminants, generating great direct economical losses when the young animals die and indirectly because of the low production of meat and milk, deficient feed conversion that causes a decrease of the growth, poor fertility and seizure of livers in partial or total mode in slaughterhouses.¹⁻³

In order to decrease or avoid these detrimental effects the best control is the chemical one, available in different commercial compounds. One of these is triclabendazole, which has shown greater efficacy in eliminating young and adult forms of the trematode.⁴ However, the excessive use has generated bacterial resistance in Ireland and Australia, reason why it requires new compounds with similar or better fasciolicidal activity. In the research of these alternatives, the compound alpha (Ca) or 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole⁵ was synthesized, showing high *in vitro* and *in vivo* fasciolicidal efficacy by oral via in sheep⁶⁻⁸ and cattle.⁹⁻¹¹ Nevertheless, the Ca does not dissolve completely in water, so it is important its solubilization with the purpose to obtain an injectable formulation.

The use of vehicles as cyclodextrins (CD), propylene-glycol (PG) and glycerol formal (GF) could increase the solubility, chemical stability and bioavailability, and modify the absorption and concentration of several compounds in blood.¹²⁻¹³

The Ca solubilized and injected by intramuscular via will have major effects compared with oral administration.

The objectives of the present study were to evaluate the solubility and *in vitro* efficacy of the compound alpha, as well as efficacy in experimentally infected sheep.

Material and methods

Solubility of the compound alpha

Compound alpha

The compound alpha was synthesized in the Departamento de Farmacia de la Facultad de Química of the Universidad Nacional Autónoma de México.⁵

Vehicles

Cyclodextrins* (CD), alpha-cyclodextrins (α -CD), hydroxypropyl-alpha-cyclodextrins (HP- β -CD), hydroxy-propyl-beta-cyclodextrin (HP- β -CD) and the cosolvents propylene-glycol* (PG) and glycerol formal** (GF) that come from a commercial source.***

Introducción

La fasciolosis producida por *Fasciola hepatica* afecta a varias especies animales, en particular a los rumiantes, en los que ocasiona cuantiosas pérdidas económicas en forma directa cuando mueren jóvenes e indirectas por ocasionar baja de producción de carne y leche, deficiente conversión alimentaria que causa disminución del crecimiento, baja fertilidad y decomiso de hígados en forma parcial o total en los rastros o mataderos.¹⁻³

Para disminuir o evitar estos efectos detrimentales el mejor control es el químico, con ese propósito existen en el mercado diferentes compuestos; de ellos el triclabendazol ha mostrado mayor eficacia en virtud de que elimina tanto a formas juveniles como adultos del trematodo.⁴ Sin embargo, la sobreutilización de este compuesto ha generado resistencia de las bacterias en Irlanda y Australia, por lo que se requiere disponer de nuevos compuestos con igual o mayor actividad fasciolicida. En la búsqueda de estas alternativas se sintetizó el compuesto alfa (Ca) o 5-cloro-2-metilthio-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol,⁵ que ha mostrado alta eficacia fasciolicida *in vitro* e *in vivo* por vía oral en ovinos⁶⁻⁸ y en bovinos.⁹⁻¹¹ Sin embargo, su solubilidad es mala en agua por lo que es importante realizar esfuerzos para solubilizarlo con el fin de obtener una formulación inyectable.

El uso de vehículos como ciclodextrinas (CD), propilén-glicol (PG) y glicerol formal (GF) pueden aumentar la solubilidad, estabilidad química y biodisponibilidad, modificar la absorción y la concentración del compuesto en sangre de diferentes compuestos.¹²⁻¹³

El compuesto alfa solubilizado e inyectado por vía intramuscular tendrá mayor efecto que cuando se administra vía oral.

Los objetivos de este estudio fueron evaluar la solubilidad y eficacia *in vitro* del compuesto alfa, así como su eficacia en ovinos experimentalmente infectados.

Material y métodos

Solubilidad del compuesto alfa

Compuesto alfa

El compuesto alfa se sintetizó en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México.⁵

Vehículos

Ciclodextrinas* (CD): alfaciclodextrina (α -CD),

*Sigma-aldrich, Estados Unidos de América.

Solubility

The formation of Ca adducts with the CD was carried out using the following procedure: the Ca (2 mg) was added to an aqueous solution (2 mL/H₂O) with each cyclodextrins (3 mg) for triplicated,¹⁴ it was shaken during seven days under environmental temperature conditions. The CD with the best hydrosolubility properties was evaluated in the concentrations 5.8, 2.9, 1.45, 0.725, 0.0362 mg with 2 mg of Ca. Other assays were done using HP-β-CD and methanol (MeOH), it was evaporated at room temperature and resuspended in water, Ca with PG, CPα with GF and the combination of cosolvents GF with PG and H₂O at a proportion of 3:2:5 and 3:2:4. A 3.0 mg concentration of HP-β-CD and 2.0 mg of Ca was used in each assay by triplicated; each sample was filtered through an acetate of cellulose membrane, to be injected in the high-performance liquid chromatography (HPLC) system. The solubility was determined in the physical form by the vehicles' transparency with the compound and by the use of HPLC.¹⁵⁻¹⁷

Chromatographic conditions

A chromatographic system with binary pump, autosampler and detector of diodes arrangement (304 nm of wavelength) was used. The movable phase consisted in methanol (40), water (40) and acetonitrile (20) in HPLC† degree, degasificator in line with helium. The stationary phase consisted of a C18 column of 80 mm in length. The suspension for evaluation was filtered with membrane 0.45-μm,‡ 25 μL of sample and the detection limit of the equipment was 50 ng/mL.

For the calculation of the compound concentration, an external standard was used; with the addition method, the percentage of recovery of the analytical technique was determined in order to establish the percentage of recovery of the compound during the extraction.¹⁸

In vitro evaluation

Preparation of compounds for chemotherapeutic evaluation

Ten and 50 mg/L of solubilized Ca with GF, PG, GF combined with PG and H₂O (3:2:5 and 3:2:4) and 0.5 mg/L with HP-β-CD were used. They were deposited in vials of 30 mL of capacity. Later, the corresponding dilutions were prepared to obtain the required concentrations for the biological evaluation anti-*Fasciola hepatica*.

hidroxipropil-alfaciclodextrina (HP-α-CD), betaciclodextrina (β-CD), hidroxipropil-betaciclodextrina (HP-β-CD) y los cosolventes propilén-glicol* (PG) y glicerol formal** (GF), que provinieron de fuente comercial.***

Solubilidad

Se realizó la formación de aductos del Ca con las CD con el siguiente procedimiento: el Ca (2 mg) se suspendió en una solución acuosa (2 mL/H₂O) con cada ciclodextrina (3 mg) por triplicado,¹⁴ se agitó durante siete días a temperatura ambiente. La CD que proporcionó mayor hidrosolubilidad se evaluó en las concentraciones 5.8, 2.9, 1.45, 0.725, 0.0362 mg con 2 mg de Ca. Se realizaron otros ensayos utilizando HP-β-CD y metanol (MeOH), se evaporó al medio ambiente y se resuspendió en agua, Ca con PG, CPα con GF y la combinación de cosolventes GF con PG y H₂O en proporción 3:2:5 y 3:2:4. Se utilizó una concentración de HP-β-CD 3.0 mg y de Ca 2.0 mg en cada ensayo por triplicado; cada muestra se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa, para ser inyectado en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR). Se determinó la solubilidad en forma física mediante transparencia de los vehículos con el compuesto y con el uso del CLAR.¹⁵⁻¹⁷

Condiciones cromatográficas

Se utilizó un sistema cromatográfico con bomba binaria, automuestreador y detector de arreglo de diodos, con 304 nm de longitud de onda. La fase móvil consistió en metanol (40), agua (40) y acetonitrilo (20) en grado CLAR,† degasificador en línea con helio. La fase estacionaria consistió en una columna C18 de 80 mm de longitud. La suspensión a evaluar se filtró con membrana 0.45 μm,‡ se inyectaron 25 μL de muestra y el límite de detección del equipo fue de 50 ng/mL.

Para el cálculo de la concentración del compuesto se empleó un estándar externo, con el método de adición se determinó el porcentaje de recuperación de la técnica analítica para establecer el porcentaje de recuperación del compuesto durante la extracción.¹⁸

Evaluación in vitro

Preparación de compuestos para evaluación quimioterapéutica

Se utilizaron 10 y 50 mg/L de Ca solubilizado con

*Sigma-aldrich, Estados Unidos de América.

**Sigma-aldrich, Estados Unidos de América.

***Sigma-aldrich, Estados Unidos de América.

†Sigma-aldrich, Estados Unidos de América.

‡Millex, Estados Unidos de América.

Metacercariae

Fasciola hepatica metacercariae were produced in *Lymnaea humilis* snails experimentally infected with bovine origin miracidia obtained from a local slaughterhouse.

Artificial Excystment of metacercariae

The technique of artificial excystment was carried out as it was described previously.¹⁹

Operation of the screening assay

Twenty four well culture plates, solubilized compound and 0.2 mL with ten Fasciolas per well were used. The compounds were tested in concentrations reduced to a third part of 10 and 50 mg/L. Each compound was tested at least in duplicate and in each test run 8 control wells containing flukes complete medium. Each assay was run over a period of four days in a saturated atmosphere at 37°C under 5% CO₂. This procedure was carried out in agreement with that described by Ibarra and Jenkins²⁰ and modified by Rivera *et al.*²¹

Interpretation of the test

Flukes were examined on days zero, one and four with an inverted microscope at 40X. The activity of compounds was assessed by comparison of the fluke's survival under treatment with respect to the non-treated flukes (control). All procedures were carried out in a laminar flow cabinet under aseptic conditions.

Statistic analysis

The obtained data was submitted to an analysis of variance (ANOVA) to determine the differences in efficacy between concentrations and groups of the evaluated compounds. The data was analyzed by the Nemenyi test using the SAS statistical package.²²

In vivo evaluation in sheep

Animals

A population of 24 male, ten-month old Pelibuey sheep, free of fluke, were used. They were allocated under conventional confinement, fed on balanced food and water *ad libitum*, at the Universidad Autonoma de Queretaro, Mexico.

Infection

On day zero, the animals were infected with 250

GF, PG, GF combinado con PG y H₂O (3:2:5 y 3:2:4) y 0.5 mg/L con con HP-β-CD que se depositaron en viales de 30 mL de capacidad. Posteriormente se prepararon las diluciones correspondientes con la finalidad de obtener las concentraciones requeridas para la evaluación biológica anti-*Fasciola hepatica*.

Metacercarias

Las metacercarias de *Fasciola hepatica* fueron producidas en caracoles *Lymnaea humilis* a partir de la infección con miracidios de origen bovino obtenidos de un rastro local.

Técnica de desenquistamiento

Se realizó la técnica de desenquistamiento artificial tal y como fue descrita previamente.¹⁹

Operación de ensayo para escrutinio

Se utilizaron cajas de cultivo de 24 pozos, compuesto solubilizado y 0.2 mL con diez Fasciolas por pozo. Los compuestos se probaron a concentraciones terciadas de 10 y 50 mg/L. Cada compuesto se evaluó por duplicado y se contó, como testigo, por lo menos con ocho pozos que contenían sólo Fasciolas. Cada ensayo se mantuvo en incubación durante cuatro días a 37°C bajo una atmósfera de CO₂ al 5%. Este procedimiento fue realizado de acuerdo con lo descrito por Ibarra y Jenkins²⁰ y modificado por Rivera *et al.*²¹

Interpretación de la prueba

Las Fasciolas fueron examinadas los días cero, uno y cuatro con un microscopio invertido a 40X. La actividad de los compuestos se midió por comparación de la sobrevivencia de las fasciolas bajo tratamiento respecto de las fasciolas testigo no tratadas. Los procedimientos se realizaron en condiciones asépticas con una campana de flujo laminar.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza para determinar diferencias de eficacia entre concentraciones y grupos de los compuestos evaluados. Se utilizó la prueba de Nemenyi apoyado con el uso del paquete estadístico SAS.²²

Evaluación in vivo en ovinos

Animales

Se utilizaron 24 ovinos Pelibuey machos de diez meses

metacercariae of *Fasciola hepatica*. The 15 day cysts were kept at 5°C prior to infection.

Fecal analysis

On days -8, 70 and 90, fecal samples were collected and they were analyzed in the search of the trematode eggs using the sedimentation test.

Blood samples

The blood samples were collected, conserved and processed for serum extraction and further injection in the HPLC.^{18,22}

Conduction of the experiment

Four groups of six animal each were selected, each one based on the *Fasciola* egg counts from samples taken on day -8.²³

Treatments

Group 1 received a dose of 1 mg/kg/IM of the compound alpha solubilized with GF + PG and H₂O (3:2:4), with a concentration of 10.86 mg/mL.

Group 2 received 2 mg/kg/IM of the compound alpha solubilized with GF+PG and H₂O (3:2:4), with a concentration of 10.86 mg/mL.

Group 3 received 1 mg/kg/IM of the sulfoxide metabolite of the compound alpha solubilized with GF+PG and H₂O (3:2:4), with 8.9 mg/mL of concentration.

Group 4 was used as infected control without treatment.

Euthanasia was practiced 15 days after the administration of the solubilized compound alpha; each liver was collected to count and measure trematodes.

Evaluation

The efficacy was determined considering the presence of eggs or *Fasciolas* in the treated group with respect to the control group.²⁴

$$E = \frac{XC - XT}{XC} \times 100$$

where

E= Efficacy percentage

XC= Average number of *Fasciolas* in the control group

XT= Average number of *Fasciolas* in the treated group

de edad, libres de fasciolosis, alojados en corrales de encierro convencional, alimento balanceado y agua a libre acceso en la Universidad Autónoma de Querétaro.

Infección

Prevía semana de adaptación, el día cero los animales se infectaron con 250 metacercarias de *Fasciola hepatica*, que tenían 15 días de enquistadas y conservadas en refrigeración a 5°C.

Análisis fecal

Se recolectaron muestras fecales los días -8, 70 y 90 para la búsqueda de huevos del trematodo por medio de la técnica de sedimentación.

Muestras de sangre

Las muestras de sangre se recolectaron, conservaron y se procesaron para la extracción del suero y posterior inyección en el CLAR.^{18,22}

Conducción del experimento

Se seleccionaron cuatro grupos de seis animales cada uno con base en los conteos de huevos de *Fasciola* de las muestras de heces tomadas el día -8.²³

Tratamientos

El Grupo 1 recibió dosis de 1 mg/kg/IM del compuesto alfa solubilizado con GF con PG y H₂O (3:2:4), con concentración de 10.86 mg/mL.

El Grupo 2 recibió dosis de 2 mg/kg/IM del compuesto alfa solubilizado con GF con PG y H₂O (3:2:4), con concentración de 10.86 mg/mL.

Al Grupo 3 se le administró 1 mg/kg/IM de sulfóxido del compuesto alfa solubilizado con GF con PG y H₂O (3:2:4), con concentración de 8.9 mg/mL.

El Grupo 4 se utilizó como testigo infectado sin tratamiento.

El sacrificio de los animales se realizó 15 días después de la administración del compuesto alfa solubilizado; se tomó cada hígado para revisión, recolección, conteo y medición de los trematodos.

Evaluación

La eficacia se determinó con base en la presencia de huevos o *Fasciolas* presentes en el grupo tratado con respecto al grupo testigo:²⁴

$$E = \frac{XC - XT}{XC} \times 100$$

Statistical analysis

An analysis of variance of the obtained data was used to determine possible significant differences between groups and treatments.

The comparison of Fasciolas' means, of the treated and control groups, was carried out by the Kruskal Wallis test, which determined the difference in the reduction of adult Fasciolas.²⁵ The analysis was achieved with the use of the statistical package SAS 1990.

In order to analyze the results and comply with the normality supposed and variance homogeneity, the transformation of Box and Cox of the number of eggs after treatment was carried out, using the transformation of $[(\text{final eggs})^{-0.2}-1]/-0.008615735$.

Results

Solubility of the compound alpha

Table 1 shows that HP- β -CD and β -CD did not solubilize CA, the β -CD solubilized in 0.051%, HP- β -CD in 1.018%; HP- β -CD with 5.8 mg in 3.95%, HP- β -CD and methanol in 10.76%, PG in 39.048%, GF in 100%, the combinations GF+ PG and H₂O in proportions 3:2:5 and 3:2:4 en 100%. The limit of detection of the chromatographic equipment was 50 ng/mL, demonstrating that the technique used was validated to detect the solubilized Ca.

In vitro evaluation

Table 2 shows that the solubilized CA with HP- β -CD, PG in 96 hours did not eliminate the flukes, with GF 100% and the combination of GF+PG and H₂O in both concentrations had fasciolicidal efficacy of 100% at 24 hours. Likewise, all the controls kept alive during 96 hours.

In vivo evaluation in sheep

The reduction of eggs is perceptible in Table 3; the average reduction of eggs of *F. hepatica* after and before the treatment was: Group 1, 89.16 and 14.66 epg; Group 2, 30.33 and 16.66 epg; Group 3, 24.83 and 23.16 epg; Group 4, 125 and 133.5 eggs per gram (epg), respectively.

The amount of epg after treatment was not significantly different ($P > 0.05$) between treatments.

The reduction average of the amount of adult Fasciolas per group was: Group 1, 36.29; Group 2, 37.79; Group 3, 33.96 and Group 4, 74.96; however, there was no significant difference in the number of

donde

E = Porcentaje de efectividad,

XC = Promedio de Fasciolas en el grupo testigo,

XT = Cantidad promedio de Fasciolas en el grupo tratado.

Análisis estadístico

La información obtenida se sometió a análisis de varianza con la finalidad de determinar posibles diferencias significativas entre grupos y tratamientos.

La comparación de medias del número de Fasciolas recolectadas del grupo tratado y testigo se realizó por medio de la prueba de Kruskal-Wallis, que determinó la diferencia de la reducción de Fasciolas adultas.²⁵ El análisis se realizó con el paquete estadístico SAS 1990.

Para el análisis de los resultados y cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, se realizó la transformación de Box y Cox del número de huevos después del tratamiento, utilizando la transformación de $[(\text{huevos finales})^{-0.2}-1]/-0.008615735$.

Resultados

Solubilidad del compuesto alfa

El Cuadro 1 muestra que las HP- α -CD y β -CD no solubilizaron al compuesto alfa, las β -CD solubilizaron en 0.051%, HP- β -CD en 1.018%; HP- β -CD con 5.8 mg en 3.95%, HP- β -CD y metanol en 10.76%, PG en 39.048.5%, GF en 100%, la combinación GF con PG y H₂O en proporciones 3:2:5 y 3:2:4 en 100%. El límite de detección del equipo cromatográfico fue de 50 ng/mL, lo cual demuestra que la técnica fue validada para detectar el compuesto alfa solubilizado.

Evaluación in vitro

En el Cuadro 2 se observa que el Ca solubilizado con HP- β -CD, PG en 96 horas no eliminó las Fasciolas, con GF 100% y la combinación GF con PG y H₂O en ambas concentraciones tuvo eficacia Fasciolicida de 100% a las 24 horas. Asimismo, todos los testigos se mantuvieron vivos durante 96 horas.

Evaluación in vivo en ovinos

En el Cuadro 3 se aprecia la reducción de huevos: el promedio de huevos de *Fasciola hepatica* eliminados antes y después del tratamiento fue: Grupo 1, 89.16 y 14.66 h/g/h; Grupo 2, 30.33 y 16.66 h/g/h; Grupo 3, 24.83 y 23.16 h/g/h; Grupo 4, 125 y 133.5 h/g/h, respectivamente.

La cantidad de huevos por gramo de heces después

Cuadro 1

PORCENTAJE DE SOLUBILIDAD DEL COMPUESTO ALFA UTILIZANDO
DIFERENTES VEHÍCULOS
SOLUBILITY PERCENTAGE OF THE COMPOUND ALPHA USING
DIFFERENT VEHICLES

<i>Compound alpha/mg</i>	<i>Vehicle</i>	<i>Solubility percentage*</i>
2	Water	LDD
2	Alpha cyclodextrin with water	0
2	Hydroxy propyl alpha cyclodextrin with water	0
2	Beta cyclodextrin with water	0.051
2	Hydroxy propyl alpha cyclodextrin with water	1.018
2	Hydroxy propyl alpha cyclodextrin with water	3.95
2	Hydroxy propyl alpha cyclodextrin with methanol plus water	10.76
2	propylene glycol with water	39.048
2	Glycerol formal with water	100
2	Glycerol formal with propylene glycol and water/3:2:5 ml	100
2	Glycerol formal with propylene glycol and water/3:2:4 ml	100

*Mean determined by high-performance liquid chromatography

LOD = Limit of detection. A concentration below 50 ng/mL is not detected

Cuadro 2

EFICACIA FASCIOLICIDA *in vitro* DEL COMPUESTO ALFA SOLUBILIZADO
CON DIFERENTES COSOLVENTES
In vitro FASCIOLICIDAL EFFICACY OF THE COMPOUND ALPHA SOLUBILIZED
WITH DIFFERENTS COSOLVENTS

<i>Compound/vehicle</i>	<i>Dose mg/L</i>			
	<i>10 Efficacy %</i>		<i>50 Efficacy %</i>	
	<i>24 hours</i>	<i>96 hours</i>	<i>24 hours</i>	<i>96 hours</i>
Ca with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin / 0.5 mg/L	60	60	60	60
Ca with PG	50	60	50	60
Ca with PG	30	40	30	40
Ca with GF	100	100	100	100
Ca with GF	100	100	100	100
Ca with GF combined PG and H2O /3:2:5	100	100	100	100
Ca with GF combined PG and H2O /3:2:5	100	100	100	100
Ca with GF combined PG and H2O /3:2:4	100	100	100	100
Ca with GF combined PG and H2O /3:2:4	100	100	100	100
Triclabendazole with GF	100	100	100	100
GF with H2O / 2 ml	0	0	0	0
PG with H2O / 2 ml	0	0	0	0
Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin/ 5.6 mg/L with H2O/ 2 ml	0	0	0	0
RPMI medium / 1.6 ml	0	0	0	0

Ca = Compound alpha PG= Propylene glycol RPMI= Culture medium

GF = Glycerol formal H2O = Water

Cuadro 3

COMPUESTO ALFA: EFICACIA FASCIOLICIDA CON TRES DIFERENTES FORMULACIONES
 INYECTABLES EN OVINOS
 FASCIOLICIDAL EFFICACY OF COMPOUND ALPHA ADMINISTERED IN THREE DIFFERENT
 INJECTABLE FORMULATIONS IN SHEEP

Group	Formulation	Dose	mean epg*		Efficacy (%)	Adult fasciolas collected	Efficacy (%)	Length of fasciola (mm)
(n=6)		mg/kg IM	Before Treatment	After Treatment	Egg reduction	(mean $\pm$ SD)**	Reduction of Fasciolas	(mean $\pm$ SD)*
1	***Ca	1	89.16	14.66	89	36.29a $\pm$ 4.74	51.48	35.94a $\pm$ 5.28
2	Ca	2	30.33	16.66	87.52	37.79a $\pm$ 5.33	49.58	37.56a $\pm$ 5.94
3	****SO ₂	1	24.83	23.16	82.65	33.96a $\pm$ 5.51	54.6	35.49a $\pm$ 6.14
4	Control		125.5	133.5	'----	74.96b $\pm$ 7.5	'-----	73.50b $\pm$ 8.36

*epg = eggs per gram of feces

**Different literals in rows indicate significant difference between treatments (P < 0.05)

***Ca = Compound alpha

****SO₂ = sulphoxide metabolite of compound alpha

Fasciolas per ovine between treatments but it was with respect to the control group (P < 0.05).

Even when the mean size (length) of the Fasciolas from the groups varied, the difference was only numeric. The efficacy percentage was: Group 1, 51.48%; Group 2, 49.58%; Group 3, 54.6%. The analysis of the mean length of the Fasciolas shows no significant difference, so there are differences between the treatments and the control group (P < 0.05).

The Ca kinetic determined by HPLC showed that in all serum samples no Ca was detected or its sulphoxide and sulphone metabolites, the limit of detection of the equipment was 2ng/mL.

Discussion

Solubility of Ca

The technique to determine the solubility of Ca was validated in the HPLC, demonstrating that it is a suitable method to separate components in a mixture and is very specific for the recognition of one or several analites of interest; in addition, it allows an excellent separation of the individual components to recognize them easily.^{14,26,27}

The hidrosolubility of HP- β -CD detected by the HPLC is due, in general, to the stochiometry of the majority of the complexes formed with CD is in relation 1:1,²⁸ the increase of solubility joined to the increase of HP- β -CD concentration is the result of a greater amount of HP- β -CD molecules than that of Ca, which favors the formation of aducts between both compounds.

del tratamiento no fue estadísticamente significativa entre tratamientos (P > 0.05).

En la reducción de Fasciolas adultas se halló que el número promedio de Fasciolas por grupo fue: Grupo 1, 36.29; Grupo 2, 37.79; Grupo 3, 33.96; Grupo 4, 74.96. El análisis del número de fasciolas por ovino muestra que no hay diferencia significativa, por lo cual no hay diferencias entre los tratamientos pero sí entre éstos y el testigo (P < 0.05).

En el tamaño promedio (longitud) de las Fasciolas de los grupos, aunque varió, sólo hubo diferencia numérica. El porcentaje de eficacia fue: Grupo 1, 51.48%; Grupo 2, 49.58%; Grupo 3, 54.6%. El análisis de la longitud total promedio de las Fasciolas muestra que no hay diferencia significativa, por lo cual hay diferencias entre los tratamientos y con el testigo (P < 0.05).

La cinética del Ca determinado por el CLAR mostró que en todas las muestras de suero no se encontró el Ca ni sus metabolitos sulfóxido y sulfona, el límite de detección del equipo fue de 2 ng/mL.

Discusión

Solubilidad del compuesto alfa

La técnica para determinar la solubilidad del compuesto alfa fue validada en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución, por lo cual se demuestra que se trata de un método adecuado para separar componentes en una mezcla y es muy específico para el reconocimiento de uno o varios analitos de interés; además, permite una excelente separación de los componentes individuales para reconocerlos fácilmente.^{14,26,27}

The HP- β -CD with methanol improved the solubility of the compound alpha in 10.95%, the obtained solubility was low due to the size of the cyclodextrin cavity,²⁹ its low solubility in water of 18.5 g/L at 25°C¹⁷ for pharmaceutical compounds with molecular weights between 200 and 800 g/mol³⁰ and aqueous solubility of 60% (w/v),²⁷ joined to the molecular weight of Ca and the stoichiometry of the majority of the complexes formed with CD, that is in relation 1:1, which decreases the formation of adducts. This result contrasts with the previous observations where HP- β -CD increased the water solubility of albendazole.^{14,26}

The PG did not show a suitable solubility due to the vehicle density, but its use with HP- β -CD increases the solubility of compounds.³¹

With GF and the combinations of vehicles a 100% of concentration was obtained; because it is a binary solvent that solubilizes a great variety of hydrophobic and hydrophilic compounds, uses cosolvency to increase the compounds solubility to an acceptable concentration for intramuscular formulations and improves the bioavailability of the little polar active principles and also can be used in high doses of more than 4 000 mg/kg in rats.³¹⁻³³

The suitable solubility obtained by the vehicles' cosolvent has been used successfully in the formulation of ivermectins and rifampicin.^{34,35}

In vitro evaluation

Previous studies show that the compound alpha has high efficacy *in vitro* against *F. hepatica*,⁶⁻⁸ thus solubility with the used vehicles does not affect the efficacy of the compound when obtaining 100% of efficacy against the trematode.

In vivo evaluation in sheep

The low efficacy obtained with the solubilized Ca is because by oral route there is a ruminal preactivation of the sulfoxide and sulphone metabolites. The Ca passes to the plasma in suitable concentration to exert certain efficacy in sheep and goats.^{6,7,11} It is probable that Ca remains in the tissue compartment when is injected intramuscularly, little compound passes to the sanguineous torrent and arrives in low concentration to the liver to be metabolized in sulfoxide and sulphone; this behavior is associated with its physico-chemical characteristics that favors a low volume of distribution, thus at greater dose the concentration and the fasciolicidal efficacy increases.

It should be considered that in the site of injection the disposition of the deposited compound depends on the balance between variables, such as: compound affinity with the formulated vehicle, injected volume,

La hidrosolubilidad de la HP- β -CD detectada por el CLAR se debe a que, en general, la estequiometría de la mayoría de los complejos formados con CD es en relación 1:1,²⁸ el aumento de solubilidad aunado a incremento de la concentración HP- β -CD es resultado de mayor cantidad de moléculas de HP- β -CD que de Ca, lo que favorece la formación de aductos entre los dos compuestos.

La HP- β -CD con metanol mejoró la solubilidad del compuesto alfa en 10.95%, la solubilidad obtenida fue baja debido al tamaño de la cavidad de la ciclodextrina,²⁹ su solubilidad baja en agua de 18.5 g/L a 25°C¹⁷ para compuestos farmacéuticos con pesos moleculares entre 200 y 800 g/mol³⁰ y una solubilidad acuosa del 60% (w/v),²⁷ aunado al peso molecular del Ca y la estequiometría de la mayoría de los complejos formados con CD, que es en relación 1:1, lo cual disminuye la formación de aductos. Este resultado contrasta con las observaciones previas en donde la HP- β -CD aumentó la solubilidad en agua del albendazol.^{14,26}

El PG no mostró una adecuada solubilidad debido quizá a la densidad del vehículo, pero su uso con HP- β -CD aumenta la solubilidad de compuestos.³¹

Con el GF y las combinaciones de vehículos se obtuvo 100% de concentración; pues es un solvente binario que solubiliza gran variedad de compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos, utiliza cosolventes para incrementar la solubilidad de compuestos en concentración aceptable para formulaciones intramusculares y mejora la biodisponibilidad de los principios activos poco polares, puede ser usado a altas dosis de más de 4 000 mg/kg en ratas.³¹⁻³³

La adecuada solubilidad obtenida por la cosolventes de los vehículos ha sido utilizada con éxito en la formulación de ivermectinas y rimfampicina.^{34,35}

Evaluación in vitro

Estudios previos muestran que el compuesto alfa tiene alta eficacia *in vitro* contra *F. hepatica*,⁶⁻⁸ por lo cual la solubilidad con los vehículos utilizados no afecta la eficacia del compuesto al obtenerse 100% de eficacia contra el trematodo.

Evaluación in vivo en ovinos

La baja eficacia del Ca solubilizado se debe a que por vía oral tiene una preactivación en rumen en sus metabolitos sulfoxido y sulfona, el primero, pasa a plasma en concentración adecuada para tener alta eficacia en ovinos y caprinos.^{6,7,11} Es probable que el Ca al ser inyectado vía intramuscular quede en el compartimiento tisular, poco compuesto pasa al torrente sanguíneo y llega baja concentración al hígado para ser metabolizado en sulfoxido y sulfona;

depth of the application site, perfusion in the injected muscle, vehicle absorption, as well as certain reaction in the application site, liposolubility of the compound, distribution of the compound associated with the used vehicle, physico-chemical forces of the tissue in movement and muscular contraction, so that the compound be released from the vehicle, crosses the capillaries and spreads in the blood in order to be absorbed.³⁶⁻⁴⁰

The used vehicles, as GF and PG, can reduce the particle size, thus favor the solubility and stability of the emulsions w/w,⁴¹ but they did not improve the distribution of the compound in the vascular compartment to arrive at the liver to be metabolized in sulphoxide and sulphonyl, which were present in plasma and had an effect against the adults of *Fasciola hepatica*, but in plasmatic concentrations below the detection limit of HPLC, that was 2 ng/mL.

The differences of the fasciolocidal efficacy between oral and intramuscular route is due to the ruminal preactivation exerted on its sulphonyl and sulphoxide metabolites when CA is given by oral via and, this last passes to plasma in suitable concentration exerting high efficacy, as it has been reported when it is administered in sheep and cattle.^{6,7,11}

The combination of GF+PG and water solubilizes Ca in 100% showing high *in vitro* fasciolocidal efficacy, but it was not consistent under *in vivo* conditions in sheep. Further studies should be conducted to obtain a suitable injectable formulation aimed to improve the efficacy of Ca against *Fasciola hepatica*.

Referencias

1. ENCINAS GR, QUIROZ RH, GUERRERO MC, OCHOA GP. Frecuencia de fasciolosis hepática e impacto económico en bovinos sacrificados en Ferrería México, D.F. Vet Méx 1989; 20:423-426.
2. CASTELLANOS HAA, ESCUTIA SI, QUIROZ RH. Frecuencia de fasciolosis hepática en bovinos sacrificados en las plantas tipo inspección federal en México de los años 1979-1987. Vet Méx 1992;23:339-342.
3. RANGEL RLJ, MARTÍNEZ DE. Pérdidas económicas por decomiso de hígados y distribución geográfica de la fasciolosis bovina en el estado de Tabasco, México. Vet Méx 1994;25:327-331.
4. FAIRWEATHER I, BORAY JC. Fasciolocides: Efficacy, Actions, Resistance and its Management. Vet J 1999; 158: 81-112.
5. HERNANDEZ CA, IBARRA VF, VERA MY, RIVERA FN, CASTILLO BR. Synthesis and Fasciolocidal Activity of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthylthio)-1H-benzimidazole. Chem Pharm Bull 2002; 50: 649-652.
6. IBARRA VF, VERA MY, HERNÁNDEZ CA, CASTILLO BR. Eficacia de un compuesto experimental contra *Fasciola hepatica* juvenil y adulta en ganado ovino. Vet Méx 1996; 27:119-122.

este comportamiento está asociado a sus características fisicoquímicas que favorecen un volumen de distribución bajo, por lo cual a mayor dosis aumenta la concentración y la eficacia fasciolocida.

Se debe considerar que en el sitio de inyección la disposición del compuesto depositado depende del balance entre variables, como afinidad del compuesto con el vehículo formulado, volumen inyectado, profundidad del sitio de aplicación, perfusión del músculo inyectado, absorción de vehículo, así como reacción en el sitio de aplicación, liposolubilidad del compuesto, distribución del compuesto asociado con el vehículo utilizado, fuerzas fisicoquímicas del tejido en movimiento y contracción muscular, para que el compuesto se libere del vehículo, atraviese los capilares y se difunda en la sangre para ser absorbido.³⁶⁻⁴⁰

Los vehículos utilizados, como el GF y PG, pueden reducir el tamaño de la partícula, por lo cual favorecen la solubilidad y estabilidad de las emulsiones w/w,⁴¹ pero no mejoraron la distribución del compuesto en el compartimiento vascular para llegar al hígado y ser metabolizado en sulfóxido y sulfona, los cuales estuvieron presentes en el plasma al tener efecto contra adultos de *Fasciola hepatica*, pero en concentraciones plasmáticas por debajo del límite de detección del CLAR, que fue de 2 ng/mL.

Las diferencias de la eficacia fasciolocida entre las vías oral e intramuscular se deben a que por vía oral se realiza una preactivación en rumen en sus metabolitos sulfona y sulfóxido, este último pasa a plasma en concentración adecuada para tener alta eficacia, como se ha notificado en ovinos y bovinos cuando se administra.^{6,7,11}

La combinación de GF con PG y agua, solubiliza en 100% al Ca, con alta eficacia fasciolocida *in vitro*, pero no fue consistente bajo condiciones *in vivo* en ovinos. Se requiere adecuar la formulación para mejorar la eficacia contra *Fasciola hepatica*.

7. IBARRA VF, VERA MY, HERNÁNDEZ CA, CASTILLO BR. Eficacia fasciolocida del compuesto "alfa" contra estadios juveniles y adultos en ovinos. Vet Méx 1997b;28: 297- 301.
8. RIVERA FN, IBARRA VF, OLAZARÁN JS, VERA MY, CASTILLO BR, HERNÁNDEZ CA. Eficacia del 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthylthio) benzimidazole contra diversas edades de *Fasciola hepatica* en ovinos. Vet Méx 2002; 33: 55 – 61.
9. IBARRA VF, MONTENEGRO CN, FLORES CJ, HERNÁNDEZ CA, CASTILLO BR. Evaluación de 4 vehículos para formular un fasciolocida experimental. Vet Méx 2000b;31: 47 - 51.
10. IBARRA VF, CRISTINO MN, VERA MY, CASTILLO BR, HERNÁNDEZ CA, OCHOA GP. Eficacia comparativa de un fasciolocida experimental, triclabendazol y closantel en bovinos infectados en forma natural con *Fasciola hepatica*. Vet Méx 2002; 33: 237-245.

11. IBARRA FV, VERA MY, QUIROZ RH, CANTO J, CASTILLO BR, HERNANDEZ A *et al.* Determination of the effective dose of an experimental fasciolicide in naturally and experimentally infected cattle. *Vet Parasit* 2004;120: 65-74.
12. LO P, FINK D, WILLIAMS J, BLODINGER J. Pharmacokinetics studies of ivermectin effect of formulation. *Vet Res Com* 1985;9: 251-268.
13. WICKS S, KAYE B, WEATHERLEY A, LEWIS D, DAVISON E, GIBSON S *et al.* Effect formulation the pharmacokinetics and efficacy of doramectin. *Vet Parasitol* 1993;49: 17-26.
14. EVARD A, CHIAP P, TULLIO PD, GHALMI F, PIEL G, VAN HESS T *et al.* Oral bioavailability in sheep of albendazole from a suspension and from solution containing hydroxypropyl beta cyclodextrin. *J Control Release* 2002; 85: 45-50.
15. ATHANASSIOU G. Antimicrobial activity of beta-lactam antibiotics against clinical pathogens after molecular inclusion in several cyclodextrins. A novel approach to bacterial resistance *J Pharm Pharmacol* 2003; 55:291-300.
16. NAKAMURA K. Potential use of cyclodextrins to enhance the solubility of YM466 in aqueous solution. *Drug Dev Ind Pharm* 2003;29: 903-908.
17. ZINGONE G, RUBESSA F. Preformulation study of the inclusion complex warfarin-beta-cyclodextrin. *Int J Pharm* 2005; 291: 3-10.
18. RIVERO LM, JUNG H, CASTILLO R, HERNANDEZ CA. High-performance liquid chromatographic assay for a new fasciolicide agent, α BIOF10, in biological fluids. *J Chromatogr B: Biom Sci Applic* 1998; 72:237-241.
19. RIVERA N, IBARRA F, ZEPEDA A, FORTOUL T, CANTO G, HERNANDEZ A *et al.* The effect of the 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthylloxy)-1*H*-benzimidazole called compound alpha on the tegument of immature *Fasciola hepatica* in its natural host. *Parasitol Res* 2005; 95:379-382.
20. IBARRA QF, JENKINS DC. An *in vitro* screen for new fasciolicidal agents. *Z Parasitenkd* 1984; 70:655-661.
21. RIVERA N, IBARRA F, ZEPEDA A, FORTOUL T, HERNANDEZ A, CASTILLO R. Tegumental surface changes in adult *Fasciola hepatica* following treatment *in vitro* and *in vivo* with an experimental fasciolicide. *Parasitol Res* 2004; 93:283-286.
22. LINARES G. Análisis de Datos. La Habana: Universidad de la Habana, 1990.
23. MERCOLINI L, COLLIVA C, AMORE M, FANALI S, AUGUSTA RM. HPLC analysis of the antidepressant trazodone and its main metabolite m-CPP in human plasma. *J Pharm biomed Anal* 2008;47:882-887.
24. MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD MANUAL OF VETERINARY PARASITOLOGICAL LABORATORY TECHNIQUES. Technical Bulletin No. 18. Her Majesty's Stationery Office. London, Great Britain: MAFF, 1988.
25. WOOD IB, AMARAL NK, BAIRDEN K, DUNCAN JL, KASSAI J, MALONE JB *et al.* World association for the advancement of veterinary parasitology (WAAVP), second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants. *Vet Parasitol* 1995;58:181-213.
26. ZAR JH. Biostatistical Analysis. NJ: Ed. Prentice-Hall, 1996.
27. GARCIA JJ, BOLAS F, TORRADO JJ. Bioavailability and efficacy characteristics of two different oral liquid formulation of albendazole. *Int J Pharm* 2003; 250:351-358.
28. RAGHAVAN R, JOSEPH JC. Chromatographic methods of analysis-High-Performance Liquid Chromatography. 2nd ed. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. New York: Informa Health Care., 2002:414-425.
29. BREWSTER ME, LOFTSSON T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;59:645-666.
30. PITHA J, MILECKI J, FALES H, PANNELL, UEKAMA K. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin: preparation and characterization; effects on solubility of drugs. *Int J Pharm* 1986;29:73-82.
31. WALECZEK KJ, CABRAL MHM, HEMPEL B, SCHMIDT PC. Phase solubility studies of pure (-) alga-bisabolol and chamomile essential oil beta-cyclodextrin. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; 55: 247-251.
32. RONG-KUN CH, AMIR HS. Effect of Hydroxypropyl B-cyclodextrin on drug solubility in water-propylene glycol mixtures. *Drug Dev Ind Pharm* 2004;30:297-302.
33. SANDERSON DM. A note on glycerol formal as a solvent in toxicity testing. *J Pharm Pharmacol* 1959;11:150-156.
34. KYU-BONG K, SATHANANDAM SA, SRINIVASA M, HYO JK, JAMES VB. Formulation-dependent toxicokinetics explains differences in the GI absorption, bioavailability and acute neurotoxicity of deltamethrin in rats. *Toxicology* 2007;234:194-202.
35. SIMAMORA P, ALVAREZ JM, YALKOWSKY SH. Solubilization of rapamycin. *Int J Pharm* 2001;213: 25-29.
36. LIFSCHITZ A, VIRKEL G, BALLENT M, SALLOVITZ J, IMPERIALE F, PIS A *et al.* Ivermectin (3.15%) long acting formulations in cattle: absorption pattern and pharmacokinetic considerations. *Vet Parasitol* 2007;147: 303-310.
37. BJERREGAARD S, PEDERSEN H, VEDSTESSEN H, VERMEHREN C, SODERBERG I, FROKJAER S. Parenteral water/oil emulsions containing hydrophilic compound with enhanced *in vivo* retention: formulation, rheological characterization and study of *in vivo* fate using whole body gamma-scintigraphy. *Int J Pharm* 2001;215:13-27.
38. ZUIDEMA J, PIETERS FAJM, DUCHATEAU GSMJE. Release and absorption rate aspects of intramuscular injected pharmaceuticals. *Int J Pharm* 1988;47:1-2.
39. ZUIDEMA J, KADIR F, TILULAER HAC, OUSSOREN C. Release and absorption rate aspects of intramuscular injected pharmaceuticals. II. *Int J Pharm* 1994;105:189-207.
40. FERRE PJ, LAROUTE V, BRAUN JP, CAZAUX J, TOUTAIN PL, LEFEBVRE HP. Simultaneous and minimally invasive assessment of muscle tolerance and bioavailability of different volumes of an intramuscular formulation in the same animals. *J Anim Sci* 2006; 84:1295-1301.
41. FLOYD AG. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. *Pharm Sci & Tech Today* 1999; 2:134-143.