UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

“Evaluación de la actividad antiparasitaria y citotóxica de nuevas sales de albendazol y mebendazol”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN FARMACIA

Presenta

M. F. MIRIAM GUADALUPE BARON PICHARDO

Director de tesis

Dr. Jesús Rivera Islas

Codirectora de tesis

Dra. Blanca Estela Duque Montaño

Facultad de Farmacia

CUERNAVACA, MORELOS JUNIO 2025

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio 9 de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia, perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

La autora de este trabajo recibió apoyo de la “Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)”, México, a través del financiamiento otorgado para la realización de este posgrado, mediante la beca No. 745283.

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por haber estado a mi lado y guiado mis pasos a lo largo de mi carrera. Su fortaleza ha sido mi sostén en los momentos de dificultad, y su gracia me ha permitido vivir una vida llena de aprendizajes, experiencias y, sobre todo, felicidad.

A mi mamá, Irene Pichardo, por su amor incondicional, su sabiduría y su fortaleza. Has estado a mi lado en cada etapa de mi vida, guiándome con tu ejemplo y tus palabras llenas de cariño. Eres, sin duda, un pilar fundamental en mi vida, una fuente inagotable de inspiración y la mejor madre que podría haber deseado. Te amo infinitamente y valoro cada sacrificio, cada esfuerzo que has hecho para que yo pueda alcanzar mis sueños. Me siento profundamente orgullosa de ser tu hija y agradecida con Dios por haberme bendecido con tu presencia, tu amor y tu enseñanza.

A mi papá, Francisco Barón, por ser mi guía, mi fortaleza y mi inspiración. Sin tu apoyo incondicional, tu sabiduría y todo tu amor, ninguno de mis sueños habría sido posible. Eres el mejor padre que alguien podría desear, siempre presente, cuidándonos, alentándonos y demostrando con cada acción el profundo amor que nos tienes. Agradezco a Dios por la dicha de ser tu hija y por permitirme caminar de tu mano en cada etapa de mi vida.

A mi hermana Rebe y a Fátima, por ser pilares fundamentales en mi vida. Con ustedes he compartido risas, desafíos y sueños, y no hay palabras suficientes para expresar cuánto valoro su presencia en mi camino. Gracias por ser parte esencial de mi historia y por brindarme siempre su cariño sincero.

A Lalo y a mis hijas Regina y Elisa, gracias por caminar a mi lado, por compartir conmigo risas, retos y sueños, y por brindarme un hogar lleno de amor y esperanza. Cada logro que alcanzo es también suyo, porque sin ustedes, este viaje no tendría el mismo significado. Los amo con todo mi corazón y agradezco a Dios por la dicha de tenerlos en mi vida.

Al Dr. Jesús Rivera, expreso mi más sincero agradecimiento por su invaluable guía, dedicación y compromiso a lo largo de esta investigación. Su acompañamiento no solo ha enriquecido mi formación académica, sino que también ha sido un pilar fundamental en los momentos de incertidumbre. Sus enseñanzas han dejado una huella imborrable en mi desarrollo profesional, y su apoyo constante me ha brindado claridad cuando parecía no haber salida. Valoro profundamente su confianza y, sobre todo, su amistad, que ha sido un aliento en este camino.

Al Dr. Oscar y a la Dra. Blanca, por su invaluable guía, paciencia y dedicación a lo largo de este proceso. Su orientación no solo ha enriquecido mi trabajo académico, sino que también ha sido una fuente de

aprendizaje y crecimiento profesional. Gracias por todo el cariño y amistad que siempre me han demostrado.

A la Dra. Jazmín Flores Monroy por su amabilidad y disponibilidad para formar parte del comité tutoral. Gracias por todas las observaciones realizadas para enriquecer este trabajo.

A mis sinodales, expreso mi más profundo agradecimiento por su tiempo, dedicación y valiosas observaciones durante la evaluación de este trabajo. Su experiencia y criterio han sido fundamentales para enriquecer esta investigación, y sus aportes han contribuido significativamente a mi crecimiento académico y profesional. Aprecio enormemente su disposición y compromiso, así como el rigor con el que han guiado este proceso. Gracias por su confianza y por el honor de contar con su evaluación en esta etapa tan importante de mi formación.

I. CONTENIDO

Contenido		I
Índice de tablas		III
Índice de figuras		IV
índice de graficas		IV
Lista de abreviaturas		V
1.0	**Introducción**	1
1.1	Amebiasis	1
1.1.1	Clasificación taxonómica de *E. histolytica*	1
1.1.2	Epidemiologia de la amebiasis	2
1.1.3	Morfología y biología de *E. histolytica*	4
1.1.3.1	Ciclo de vida de *E. histolytica*	4
1.1.3.2	Trofozoíto de *E. histolytica*	5
1.1.3.3	Quiste de *E. histolytica*	6
1.2	Giardiasis	7
1.2.1	Clasificación taxonómica de *G. lamblia*	7
1.2.2	Epidemiologia de la giardiasis	8
1.2.3	Morfología y biología de *G. lamblia*	9
1.2.3.1	Ciclo de vida de *G. lamblia*	9
1.2.3.2	Trofozoíto de *G. lamblia*	10
1.2.3.3	Quiste de *G. lamblia*	12
1.3	Tricomoniasis	12
1.3.1	Clasificación taxonómica de *T. vaginalis*	13
1.3.2	Epidemiologia de la tricomoniasis	13
1.3.3	Morfología y biología de *T. vaginalis*	14
1.3.4	Ciclo de vida de *T. vaginalis*	14
1.3.5	Trofozoíto de *T. vaginalis*	15
1.4	Tratamiento	17
1.4.1	Fracasos terapéuticos: reportes clínicos	17
1.4.2	Mecanismo de acción de Abz y Mbz en protozoarios	18
1.4.3	Mecanismo de acción de nitroimidazoles en protozoarios	19
2.0	**Antecedentes**	21
2.1	Albendazol	26
2.1.1	Propiedades fisicoquímicas	26
2.1.2	Farmacocinética de Abz	27
2.1.3	Posología de Abz	28
2.1.4	Estrategias para mejorar la solubilidad de Abz	28
2.2	Mebendazol	30

2.2.1	Propiedades fisicoquímicas de Mbz	30
2.2.2	Farmacocinética de Mbz	31
2.2.3	Posología de Mbz	31
2.2.4	Estrategias para mejorar la solubilidad de Mbz	32
2.3	Sales farmacéuticas	33
2.3.1	Sales de albendazol y mebendazol	36
3.0	**Justificación**	42
4.0	**Hipótesis**	42
5.0	**Objetivo general.**	43
6.0	**Objetivos particulares**	43
7.0	**Metodología**	44
7.1	Sales de Abz y Mbz	45
7.1.1	Soluciones stock	46
7.2	Material biológico	46
7.3	Aislamiento y axenización de *T. vaginalis*	46
7.4	Condiciones de cultivo	47
7.4.1	*T. vaginalis*	47
7.4.2	*G. lamblia*	48
7.4.3	*E. histolytica*	48
7.5	Cinética de crecimiento	49
7.6	Pruebas de susceptibilidad *in vitro*	50
7.7	Evaluación *in vitro* del efecto citotóxico	50
7.7.1	Condiciones de cultivo de células VERO	50
7.7.2	Ensayo de citotoxicidad en células VERO	50
7.7.3	Análisis estadístico	51
8.0	**8.0 Resultados**	52
8.1	*T. vaginalis*	52
8.1.1	Aislamiento y axenización de *T. vaginalis*	52
8.1.2	Cinética de crecimiento de *T. vaginalis*	53
8.1.3	Pruebas de susceptibilidad *in vitro* contra *T. vaginalis*	54
8.2	*G. lamblia.*	55
8.2.1	Cinética de crecimiento de *G. lamblia*	55
8.2.2	Pruebas de susceptibilidad *in vitro* contra *G. lamblia*	56
8.3	*E. histolytica*	57
8.3.1	Cinética de crecimiento de *E. histolytica*	58
8.3.1	Pruebas de susceptibilidad *in vitro* contra *E. histolytica*	58
8.4	Calculó potencia relativa	60
8.5	Evaluación *in vitro* del efecto citotóxico en células VERO	61
8.5.1	Perfil de citotoxicidad	62
9.0	**Discusión**	64
10.0	**Conclusiones**	71
11.0	**Perspectivas**	72
11.0	**Referencias**	73

12.0 Anexo 1 **90**

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Clasificación taxonómica de *E. histolytica*	2
2.	Casos de amebiasis en México, por entidad federativa en 2022	3
3.	Clasificación taxonómica de *G. lamblia*	8
4.	Casos de Giardiasis en México, por entidad federativa en 2022	9
5.	Clasificación taxonómica de *T. vaginalis*	13
6.	Casos de tricomoniasis en México, por entidad federativa en 2022	14
7.	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica y su descripción	25
8.	Estrategias utilizadas para mejorar la biodisponibilidad de IFA	25
9.	Posología de Abz contra diferentes parásitos.	28
10.	Posología de Mbz contra diferentes parásitos.	32
11.	Contraiones utilizados para la formación de sales farmacéuticas	36
12.	Sales de Abz y Mbz	45
13.	Medio de Diamond	47
14.	Medio TYI-S-33	48
15.	Medio BI-S-33	49
16.	Valores de CMI, CI_{90} y CI_{50} de sales sobre trofozoítos de *T. vaginalis*	55
17.	Valores de CMI, CI_{90} y CI_{50} de sales sobre trofozoítos de *G. lamblia*	57
18.	Valores de CMI, CI_{90} y CI_{50} de sales sobre trofozoítos de *E. histolytica*	59
19.	Potencia relativa	60
20.	Valores de CC_{50} de sales de Abz y Mbz sobre línea celular VERO	63
21.	índice de selectividad	

III. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Ciclo de vida de *E. histolytica*	4
2.	Estadios de *E. histolytica*.	6
3.	Ciclo de vida de *G. lamblia*	10
4.	Estadios de *G. lamblia*	12
5.	Ciclo de vida de *T. vaginalis*	15
6.	Trofozoíto de *T. vaginalis.*	16
7.	Sitio de acción de bencimidazoles en protozoarios	18
8.	Mecanismo de acción de Mtz en protozoarios	20
9.	Estructura química de benzimidazol y clasificación dependiente de los sustituyentes.	21
10.	Estructura química de benzimidazol y algunos de sus derivados con efecto farmacológico.	22
11.	Estructura química de Abz	27
12.	Estructura química y propiedades fisicoquímicas de Mbz	31
13.	Diagrama general de trabajo.	44
14.	Trofozoítos de *T. vaginalis* presentes en muestra de orina	52
15.	Trofozoítos de *T. vaginalis* en tubo de vidrio con medio de cultivo de Diamond modificado tras 4 días de incubación (37°C)	53
16.	Cultivo axénico de T. vaginalis MB:FF09	53

IV. ÍNDICE DE GRAFICAS.

Grafica		Página
1.	Cinética de crecimiento de *T. vaginalis* MB: FF09	54
2.	Cinética de crecimiento de *G. lamblia* J10	56
3.	Cinética de crecimiento de E. *histolytica*	58
4.	Efecto de las sales de Abz sobre la viabilidad de las células epiteliales de riñón (VERO).	61
5.	Efecto de las sales de Mbz sobre la viabilidad de las células epiteliales de riñón (VERO).	62

V. LISTA DE ABREVIATURAS.

Abs	*Absorbancia*
Abz	*Abz*
A1	*Abz con ácido bencensulfónico*
A2	*Abz con ácido metansulfónico*
A3	*Abz con ácido p-toluensulfónico*
°C	*Grados Celsius*
%	*Porcentaje*
CC_{50}	*Concentración citotóxica media*
CI_{50}	*Concentración Inhibitoria Media*
CONACyT	*Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología*
CMI	*Concentración Mínima Inhibitoria*
DMSO	*Dimetilsulfóxido*
h	*Hora*
IFA	*Ingrediente farmacéutico activo*
IS	*índice de selectividad*
µg	*Microgramo*
µM	*Micromolar*
Mbz	*Mbz*
M1	*Mbz con ácido bencensulfónico*
M2	*Mbz con ácido metansulfónico*
M3	*Mbz con ácido p-toluensulfónico*
mL	*Mililitro*
MEB	*Microscopía Electrónica de Barrido*
MET	*Microscopía Electrónica de Transmisión*
Mtz	*Mtz*
OMS	*Organización Mundial de la Salud*
PBS	*Buffer fosfato salino (PBS por sus siglas en Ingles)*
pH	*Potencial de Hidrogeno*
SINAVE	*Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiologica*
UAEM	*Universidad Autónoma del Estado de Morelos*

RESUMEN

Las infecciones causadas por los protozoarios *E. histolytica*, *G. lamblia* y *Tricomonas vaginalis*, son un problema de salud pública a nivel mundial, se estima que más de mil millones de personas en todo el mundo han sido infectadas por alguno de estos protozoarios. *E. histolytica* y *G. lamblia,* son agentes causantes de enfermedades en el tracto gastrointestinal, mientras que *T. vaginalis* causa infección en el tracto genitourinario. Abz y Mbz son compuestos utilizados para el tratamiento de las parasitosis causadas por estos protozoarios, no obstante, la baja solubilidad acuosa que presentan estos compuestos ha favorecido la búsqueda de nuevas estrategias para mejorar la solubilidad, siendo la formación de sales una estrategia empleada comúnmente. Por lo tanto, el propósito de este proyecto doctoral está encaminado a evaluar el efecto antiparasitario y citotóxico *in vitro* de los sulfonatos de Abz y Mbz, sobre los parásitos mencionados y la línea celular *VERO,* para la determinación preliminar de la eficacia y la seguridad de las sales. Suponiendo que los sulfonatos de Abz y Mbz conservarán o incrementarán su actividad antiparasitaria *in vitro* en función del tamaño del anión sulfonato, y que la citotoxicidad de las sales debe ser comparable a la de los fármacos de referencia. Las sales de estudio se prepararon a partir de Abz y Mbz con los ácidos bencensulfónico, metansulfónico y *p*-toluensulfónico, obtenido las sales A1-A3 y M1-M3, respectivamente. La actividad antiparasitaria *in vitro* se determinó bajo la técnica de microdilución en tubo. Las pruebas de citotoxicidad se realizaron sobre la línea celular VERO bajo la técnica de microdilución en microplaca de 96 pozos, empleando el reactivo WST-1 para determinar la viabilidad celular. El índice de selectividad se calculó con el cociente de la CI_{50} y la CC_{50}. Como resultado se obtuvieron valores de IC_{50} para *T. vaginalis* en el rango de 25.85 - 252.18 µM para las sales de Abz y Mbz. Respecto a los controles Abz, Mbz y Mtz los valores de IC_{50} se encontraron entre 17.57 - 484.03 µM. Respecto a *G. lamblia* se obtuvieron valores de CI_{50} de las sales en el rango de 52.58 - 205.25 µM. Los valores de los controles estuvieron en el rango 107.95 - 320.07 µM. Para *E. histolytica* se obtuvieron valores de IC_{50} en el rango de 37.95 - 128.05 µM de las sales de Abz y Mbz, mientras que los controles Abz, Mbz y Mtz presentaron valores de CI_{50} en el rango 16.08 - 73.51 µM. Se determinó que las sales A1, A3, M2 y M3 no producen efectos citotóxicos a la concentración de 500 µM sobre la línea celular VERO. Mientras que las sales A2 y M1 son citotóxicas. Finalmente, estos hallazgos indican que las sales favorecen el efecto antiparasitario *in vitro*, particularmente los mesilatos y tosilatos de Abz y Mbz sobre *E. histolytica* y *G. lamblia*, además de no ser citotóxicos sobre las células VERO, aspecto relevante ante la necesidad actual de agentes antiparasitarios mejorados, seguros y efectivos.

ABSTRACT

Infections caused by the protozoa *E. histolytica*, *G. lamblia* and *T. vaginalis* pose a worldwide public health problem, with estimates indicating that more than one billion people globally have been infected by one of these protozoa. *E. histolytica* and *G. lamblia* are disease-causing agents of the gastrointestinal tract, while *T. vaginalis* causes infections of the genitourinary tract. Abz and Mbz are compounds used for treating parasitosis caused by these protozoa; however, the low aqueous solubility of these compounds has prompted the search for new strategies to enhance solubility, with the formation of salts a commonly employed approach. Therefore, the aim of this doctoral project is to evaluate the *in vitro* antiparasitic and cytotoxic effects of Abz and Mbz sulfonates on the aforementioned parasites and the VERO cell line, for the preliminary determination of the efficacy and safety of the salts. We hypothesize that Abz and Mbz sulfonates will retain or increase their *in vitro* antiparasitic activity as a function of the size of the sulfonate anion, and that the cytotoxicity of the salts will be comparable to that of the reference drugs. The study salts were prepared from Abz and Mbz with benzenesulfonic, methanesulfonic and *p*-toluensulfonic acids, yielding A1-A3 and M1-M3 salts, respectively. The *in vitro* antiparasitic activity was determined using the tube microdilution technique. Cytotoxicity tests were performed on the VERO cell line under the microdilution technique in a 96-well microplate, with the WST-1 employed to evaluate cell viability. The selectivity index was calculated as the ratio of IC_{50} and CC_{50}. This resulted in IC_{50} values for *T. vaginalis* in the range of 25.85 - 252.18 µM for Abz and Mbz salts. For the controls Abz, Mbz and Mtz the IC_{50} values were ranged from 17.57 to 484.03 µM. For *G. lamblia*, IC_{50} values were achieved for the salts in the range of 52.58 - 205.25 µM, while the values of the controls fell within 107.95 - 320.07 µM. For *E. histolytica*, IC_{50} values for the Abz and Mbz salts were in the range of 37.95 - 128.05 µM, whiereas the Abz, Mbz and Mtz controls had IC_{50} values in the range 16.08 - 73.51 µM. It was determined that A1, A3, M2 and M3 salts do not produce cytotoxic effects at the 500 µM concentration on the VERO cell line, while A2 and M1 salts are cytotoxic. Finally, these findings suggest that the salts enhance the *in vitro* antiparasitic effect, particularly the mesylates and tosylates of Abz and Mbz on *E. histolytica* and *G. lamblia*, in addition to exhibiting low cytotoxic on VERO cells, an important aspect given the current need for improved, safe, and effective antiparasitic agents.

1.0. INTRODUCCION

Las infecciones parasitarias causadas por protozoarios microaerofílicos tales como: *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), *Giardia. lamblia* (*G. lamblia*) y *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*), se encuentran entre uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. Se estima que más de mil millones de personas en todo el mundo han sido infectadas por alguno de estos protozoarios (Gómez García y cols., 2015). *E. histolytica* y *G. lamblia,* son agentes causantes de enfermedades en el tracto gastrointestinal, mientras que *T. vaginalis* causa infección en el tracto genitourinario (Gómez García y cols., 2015; Bouchemal y cols., 2017). Estos tres parásitos comparten características biológicas y bioquímicas, incluidas el metabolismo anaeróbico de carbohidratos y la falta de mitocondrias típicas (microrganismos amitocondriados). A pesar de que estos protozoarios tienen una distribución mundial, existe una mayor prevalencia en países en vías de desarrollo, particularmente en el segmento pobre de la población, además de estar relacionados con bajos ingresos familiares, falta de saneamiento personal y ambiental, así como al acceso limitado a los servicios sanitarios (Pearson, 2017; Getacher y cols., 2019).

1.1. Amebiasis

E. histolytica, es un parásito protozoario patógeno causante de la amebiasis, una enfermedad diarreica potencialmente mortal. Esté protozoario se alberga en el intestino grueso de su hospedero y tiene la capacidad de invadir la mucosa intestinal donde los trofozoítos penetran la capa de moco intestinal causando así lesiones y diseminándose a diferentes órganos (hígado, corazón y cerebro) dando pie a una amibiasis extraintestinal (Trejos y Castaño, 2009). Sin el tratamiento adecuado, esta enfermedad da lugar a complicaciones potencialmente fatales, como absceso hepático amebiano, absceso cerebral, peritonitis, amebiasis mediastino-pericárdica y amebiasis pleuropulmonar, lo cual representa un problema de salud pública (Showler y Boggild, 2013).

1.1.1. Clasificación taxonómica de *E. histolytica*

La primera descripción de amibas fue descrita por Rosel Van Rosenhob en 1755, que se refería a microorganismos que tenían la capacidad de cambiar de forma (Romero, 2016). En México, los primeros relatos sobre la amibiasis se remontan hacia 1611, cuando Fray García Guerra, arzobispo y Virrey de la Nueva España, falleció al poco tiempo de su arribo a México debido a las complicaciones en el cuadro caracterizado por fiebre y dolor en la zona hepática, muy probablemente debido a la formación de absceso hepático amebiano (AHA) (Pinilla y cols., 2008). En 1875 el médico ruso Fedor Aleksandrovich Lösch descubrió y publicó la presencia de un protozoo que emitía pseudópodos en la materia fecal de un joven paciente agricultor de San Petersburgo, Rusia, el cual presentaba un cuadro de disentería crónica. Tras analizar a detalle la materia fecal encontró una gran cantidad de amibas en

las heces y realizó una descripción microscópica de este microorganismo, el cual consideró que era causante de la enfermedad, llamándole en primera instancia Amiba coli (Fotedar y cols., 2007; Krestchmer, 1994; Tanyuksel y Petri Jr., 2003). A través del tiempo este parásito ha recibió diversos nombres, con base a sus características morfológicas y fisiológicas, siendo el término más adecuado el que propuso el zoólogo Alemán Fritz Schaudinn, quien decidió llamar a la amiba *E. histolytica* debido a su capacidad de producir lisis tisular (Rascón, 2011).

E. histolytica es un protozoario que pertenece al filo Sarcomastigophora, sub-phylum Sarcodina cuyos integrantes generalmente no poseen una forma definida, el cuerpo o citoplasma fluye en cualquier dirección, la principal característica es la locomoción a través de pseudópodos que se forman en cualquier parte del contorno del cuerpo en el estadio de trofozoíto (Ximénez y cols., 2007; Duque-Montaño, 2010; López, 2021). La clasificación taxonómica de *E. histolytica* se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *E. histolytica*.

Reino	*Protista*
Subreino	*Protozoa*
Phylum	*Sarcomastigophora*
Subphylum	*Sarcodina*
Clase	*Lobosea*
Orden	*Amoebida*
Familia	*Entamoebidae*
Genero	*Entamoeba*
Especie	*histolytica*
Nombre binomial	*Entamoeba histolytica*

1.1.2. Epidemiologia de la amebiasis

E. histolytica tiene una distribución mundial y afecta predominantemente a individuos de nivel socioeconómico bajo, así como aquellos que viven en países en vías de desarrollo como África, India, México, centro y sur América (Jackson- Akers, 2020; Trejos y Castaño, 2009). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), 50 millones de personas podrían estar infectadas con *E. histolytica* (Carrero y cols., 2020). La amebiasis sigue siendo una causa importante de mortalidad en todo el mundo por infecciones parasitarias después de la malaria, tripanosomiasis y leishmaniasis (Rascon, 2011), se estima que las infecciones por *E. histolytica* matan a más de 55,000 personas cada año (Ghosh y cols., 2019). La amebiasis es considerada como la tercera causa de morbilidad después de la malaria y tricomoniasis (Rascon, 2011). *E. histolytica* puede afectar a los viajeros que visitan países en desarrollo donde la amebiasis es endémica (Carrero y cols., 2020).

En México el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) en 2022 reporto 116012 casos de amebiasis intestinal; siendo los estados de Chiapas (17941), Guerrero (8148), México (8311), Oaxaca (13374), Puebla (8182), Tabasco (6463) y Veracruz (11305) los que presentan mayor

incidencia. Del 100% de casos de amebiasis intestinal el 44.76 % de infecciones se presentó en hombres y el 55.24% en mujeres. Con respecto a la incidencia de absceso hepático amebiano el SINAVE reporto 528 casos en 2022; siendo el estado con mayor incidencia Veracruz seguido de Sinaloa, Jalisco y México (Tabla 2) (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2022).

Tabla 2. Casos de amebiasis en México, por entidad federativa en 2022 (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2022).

Entidad federativa	Amebiasis Intestinal		Absceso Hepático Amebiano	
	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
Aguascalientes	292	369	9	7
Baja California	328	463	5	10
Baja California Sur	519	557	8	4
Campeche	713	874	-	1
Coahuila	654	842	5	1
Colima	312	326	-	1
Chiapas	7 859	10 082	9	18
Chihuahua	598	602	25	11
Ciudad de México	1 276	1 563	14	10
Durango	477	522	11	-
Guanajuato	521	646	8	2
Guerrero	3 526	4 622	3	11
Hidalgo	1 329	1 796	3	6
Jalisco	1 707	1 993	36	7
México	3 717	4 549	18	24
Michoacán	690	880	15	9
Morelos	816	1 165	1	3
Nayarit	1 592	1 956	4	3
Nuevo León	499	586	5	2
Oaxaca	5 732	7 642	10	11
Puebla	3 746	4 436	2	4
Querétaro	128	224	3	1
Quintana Roo	1 113	1 174	-	-
San Luis Potosí	1 002	1 201	4	9
Sinaloa	1 206	1 375	29	18
Sonora	488	543	13	2
Tabasco	3 070	3 393	7	7
Tamaulipas	740	975	5	6
Tlaxcala	259	309	1	-
Veracruz	5 149	6 156	23	33
Yucatán	1 199	1 445	10	18
Zacatecas	681	808	2	1
TOTAL	51 938	64 074	288	240

1.1.3. Morfología y biología de *E. histolytica*

1.1.3.1. Ciclo de vida de *E. histolytica*

E. histolytica pasa por dos formas bien establecidas en su ciclo vital: trofozoíto y quiste (Gómez y cols., 2007; Chacín-Bonilla, 2013). La vía de transmisión de este protozoario es fecal-oral. La infección inicia con la ingesta de alimentos y agua contaminados con quistes. El quiste desciende a través del tracto digestivo hasta llegar al intestino, donde previo al contacto con jugos digestivos, se inicia el proceso de desenquistamiento; en el cual la pared del quiste se reblandece, liberando a los trofozoítos en el intestino grueso, lugar donde se multiplican por fisión binaria. En algunos pacientes los trofozoítos invaden la mucosa intestinal a tal grado que originan amebomas, los cuales se caracterizan por ser esencialmente una respuesta granulomatosa y proliferativa que forma una lesión pseudotumoral de aspecto granular, la cual favorece el paso de los protozoarios al flujo sanguíneo mediante la vena porta, haciendo que los trofozoítos se desplacen a través del flujo sanguíneo a sitios extraintestinales como el hígado, cerebro y pulmones (Figura 1) (Gómez y cols., 2007; Villegas-Betanzo y cols., 2015; Syazwan y cols., 2018).

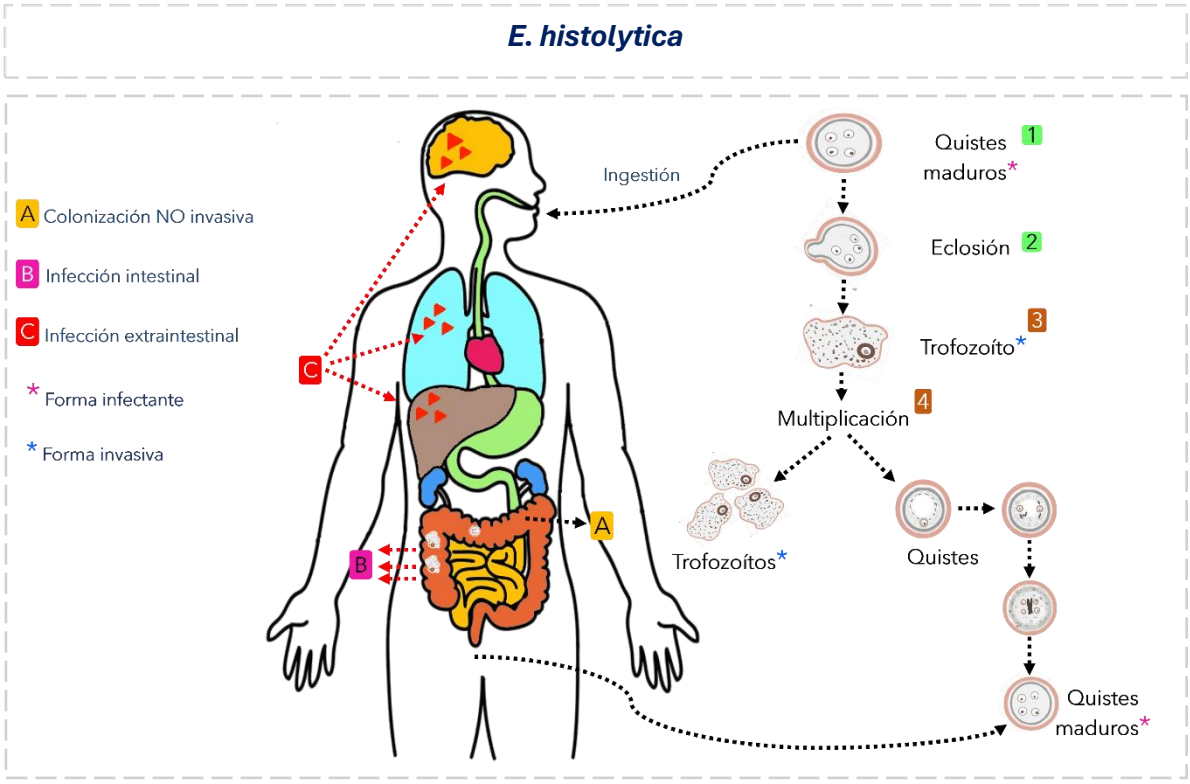


Figura 1. Ciclo de vida de *E. histolytica.*

1.1.3.2. Trofozoíto de *E. histolytica*

El trofozoíto, es la forma invasiva del parasito, presenta un diámetro que varía entre 12 y 60 µm y se caracteriza por su morfología pleomórfica y diversas estructuras especializadas que le permiten invadir y dañar los tejidos del huésped.

El citoesqueleto de los trofozoítos de *E. histolytica* desempeña un papel fundamental en su motilidad, cambios morfológicos e interacción con el entorno del huésped. Está compuesto por:

- Filamentos de actina: La actina es un componente principal del citoesqueleto y participa en la formación de las placas de adhesión, estructuras ricas en actina que facilitan la unión a componentes de la matriz extracelular (Vázquez y cols., 1995).
- Microtúbulos: Los microtúbulos se distribuyen por todo el citoplasma y desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la forma del trofozoíto y la organización de los orgánulos intracelulares. También están involucrados en la secreción de gránulos de alta densidad electrónica (EDGs) (Muñoz y cols.,2001; Michel y Schupp, 1975).
- Filamentos intermedios: Se ha identificado vimentina, una proteína de filamentos intermedios, en *E. histolytica*, y se considera que contribuye a mantener la integridad del citoesqueleto durante la secreción de EDGs (Muñoz y cols., 2001).

La reorganización dinámica del citoesqueleto permite que *E. histolytica* se adapte a diferentes entornos y lleve a cabo funciones críticas para su patogenicidad, como la invasión tisular y la fagocitosis.

Los gránulos de alta densidad electrónica (EDGs) son orgánulos especializados de forma esférica o cilíndrica, con un núcleo denso y una membrana circundante. Se localizan cerca de la membrana plasmática, donde liberan colagenasa y gelatinasa, enzimas encargadas de degradar los componentes de la matriz extracelular, facilitando así la invasión tisular de *E. histolytica* (Chávez-Munguía y cols., 2012; Feria-Velazco y cols., 1972).

La membrana citoplasmática de los trofozoítos de *E. histolytica* es una estructura altamente dinámica y especializada que desempeña un papel central en la patogenicidad del parásito, el transporte de nutrientes y su interacción con el huésped. Es una estructura de bicapa lipídica compuesta por diversas proteínas: receptores, moléculas de adhesión y transportadores transmembranales que mantienen la integridad celular y facilitan el transporte de moléculas hacia el interior y el exterior de la célula. Estos transportadores se clasifican en aquellos de paso único y de paso múltiple, siendo estos los más abundantes y esenciales para el transporte de iones y la captación de nutrientes (Anwar y Samudrala, 2018).

Además, los trofozoítos de *E. histolytica* presentan en su superficie una estructura denominada glucocálix, una capa difusa compuesta por mucopolisacáridos ácidos, glucoproteínas y glicolípidos

(Lushbaugh y Miller, 1974). Esta estructura es rica en moléculas con carga negativa, lo que permite al parásito evadir la respuesta inmune del huésped. Así mismo, desempeña un papel fundamental en la adhesión celular y la interacción con los tejidos del huésped (Lushbaugh y Miller, 1974).

El citoplasma de *E. histolytica* contiene numerosas vesículas y vacuolas, algunas de las cuales participan en la fagocitosis y la digestión de células del huésped. Estas estructuras suelen fusionarse entre sí o con la membrana plasmática (Henley y cols., 1976). Además, poseen lisosomas con actividad en la superficie celular, implicados en la liberación de sustancias citotóxicas y en la lisis de células del huésped (Lushbaugh y Pittman, 1979).

El núcleo de los trofozoítos de *E. histolytica* contiene la cromatina distribuida en la periferia y un nucléolo ubicado en el centro. La envoltura nuclear es una membrana de doble capa con numerosos poros nucleares. Además del ADN nuclear, se presentan redes de ADN citoplasmático, organizadas en estructuras denominadas EhkO (Orozco y cols., 1997).

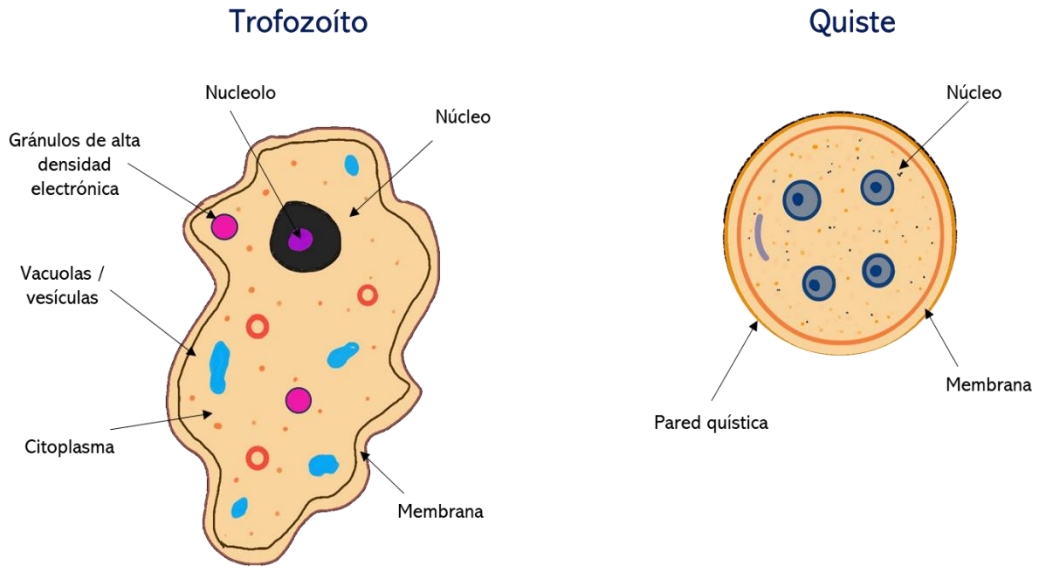


Figura 2. Estadios de *E. histolytica.*

1.1.3.3. Quiste de *E. histolytica*

El quiste se origina a partir de la evolución de la forma prequística, durante la cual comienza a formarse una pared quística que da lugar a un quiste tetranucleado. Los quistes jóvenes presentan entre uno y dos núcleos, algunos cuerpos cromáticos y vacuolas de glucógeno. La maduración del quiste ocurre mediante dos divisiones mitóticas consecutivas del núcleo, resultando en cuatro núcleos, cada uno de los cuales es una réplica en miniatura del núcleo original al inicio del enquistamiento. El quiste tiene una forma redonda u ovalada, con un tamaño que varía entre 10 y 25 µm de diámetro. Dentro de la

membrana nuclear, la cromatina periférica se distribuye uniformemente, mientras que el cariosoma es pequeño y suele localizarse en el centro de los núcleos. La pared del quiste es de 0.6 µm de grosor y es resistente al jugo gástrico, así como a condiciones ambientales adversas, solo los quistes maduros son infecciosos (León Coria, 2012) (Figura 2).

1.2 Giardiasis

La giardiasis es una enfermedad infecciosa causada por el parásito *G. lamblia* (también conocido como *G. duodenalis o G. intestinalis*), el cual es uno de los protozoarios intestinales flagelados más frecuentes que afecta al ser humano y que se encuentra presente en todo el mundo. (Ordoñez–Mena y cols., 2018; Hossein y cols., 2019). *G. lamblia* es considerado un parásito ya que su replicación y crecimiento requieren la colonización del tracto intestinal humano o de mamíferos. Sin embargo, *G. lamblia* no es un patógeno intracelular, se adhiere a las superficies y se replican activamente a través de la fisión binaria asexual si las condiciones son óptimas (Fink y cols., 2020). Prácticamente todos los mamíferos pueden infectarse con *G. lamblia*, y los datos epidemiológicos apuntan a la giardiasis como una zoonosis (Ragam- Odon, 2018). Con la ayuda de técnicas moleculares hasta la fecha, se han identificado 8 ensamblajes (A a H) de *G. lamblia* de diferentes huéspedes. Entre estos ensamblajes, los ensamblajes A y B son considerados zoonóticos ya que se han identificado en ganado y humanos, mientras que otros ensamblajes son en su mayoría específicos del huésped. Asimismo, el ensamblaje E es el genotipo dominante de *G. lamblia* que prevalece en el ganado, sin embargo, hay algunos estudios que indican la presencia del ensamblaje E en infecciones humanas (Li y cols., 2020).

El cuadro clínico que ocasiona este protozoario generalmente produce diarrea y síntomas asociados tales como: nauseas, vómito, dolor epigástrico postprandial, distensión abdominal entre otros. Por otro lado, es importante destacar que la incidencia en niños es muy alta y está relacionada con la desnutrición, retraso del crecimiento lineal y mala función cognitiva (Pérez- Villanueva y cols., 2013).

1.2.1 Clasificación taxonómica de *G. lamblia*

El primer informe de *G. lamblia* se atribuye al pionero de la microscopia Anton van Leeuwenhoek en 1681, mientras examinaba sus heces en diarreicas en busca de microorganismos y de esta manera logro describir con precisión algunas de las características de esté parásito (Fink y cols., 2020). El microorganismo fue descrito con mayor detalle por Lambl en 1859, quien pensó que pertenecía al género Cercomonas y lo denominó Cercomonas intestinalis, gracias a sus hallazgos a partir de entonces han nombrado a la especie que parasita a los seres humanos en su honor, es decir *G. lamblia* (Adam, 2001). Actualmente término *G. lamblia*, ha sido ampliamente aceptado en la literatura médica y científica. La clasificación taxonómica de este protozoario se describe en la tabla 3. *G. lamblia* pertenece al Phylum Sarcomatigophora y Subphylum Mastigophora debido a la presencia de flagelos

que emplea para su desplazamiento, pertenece al orden *Diplomonadida* que se caracteriza por la ausencia de mitocondrias, peroxisomas y aparato de Golgi (Arce Jaimes, 2016; Plutzer y cols., 2010).

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *G. lamblia* (Arce Jaimes, 2016).

Reino	*Protista*
Subreino	*Protozoa*
Phylum	*Sarcomastigophora*
Subphylum	*Mastigophora*
Clase	*Zoomastigophorea*
Orden	*Diplomonadida*
Familia	*Hexamitidae*
Genero	*G.*
Especie	*Lamblia*
Nombre binomial	*Giardia lamblia*

1.2.2. Epidemiologia de la giardiasis

La giardiasis permanece como la infección enteropatógena más común en humanos razón por la cual es considerada un problema de salud pública. La giardiasis tiene una distribución mundial y es común tanto en niños como en adultos, sin embargo, los niños menores de 10 años, las personas mayores y los grupos inmunocomprometidos son los más afectados por esta enfermedad (Auriostigue-Bautista y cols., 2022). Hossein y cols., en 2019 reportaron que más de 200 millones de casos de giardiasis se diagnostican anualmente en todo el mundo, la prevalencia de la infección causada por *G. lamblia* es mayor en los países en vías de desarrollo como Sudáfrica, India, Colombia, Chile y México.

En México el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), reporto en 2022, 6830 casos de giardiasis (Tabla 4); siendo los estados de Chiapas (501), Guerrero (512), Oaxaca (409), Tamaulipas (322) y Veracruz (1889) los que mayor incidencia presentan. Cabe destacar, que del 100% de los casos de giardiasis reportados, el 44.35 % de infecciones se presentó en hombres y un 55.64 % en mujeres (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2021). En 2022, el SINAVE reportó hasta la semana 46 un total de 6269 casos de giardiasis (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2022). Bajo este contexto, la giardiasis es una enfermedad endémica en México, por lo que es considerada como un problema de salud pública.

Tabla 4. Casos de giardiasis en México, por entidad federativa en 2022 (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2022).

Giardiasis		
Entidad federativa	**Hombres**	**Mujeres**
Aguascalientes	6	3
Baja California	21	8
Baja California Sur	27	18
Campeche	58	42
Coahuila	28	17
Colima	68	34
Chiapas	159	253
Chihuahua	17	38
Ciudad de México	100	121
Durango	10	7
Guanajuato	33	44
Guerrero	147	190
Hidalgo	35	44
Jalisco	98	133
México	90	138
Michoacán	78	78
Morelos	11	15
Nayarit	25	24
Nuevo León	51	45
Oaxaca	170	216
Puebla	65	85
Querétaro	13	27
Quintana Roo	41	97
San Luis Potosí	73	118
Sinaloa	118	159
Sonora	153	172
Tabasco	73	100
Tamaulipas	145	143
Tlaxcala	9	11
Veracruz	508	661
Yucatán	88	115
Zacatecas	65	84
TOTAL	2 583	3 240

1.2.3. Morfología y biología de *G. lamblia*

1.2.3.1. Ciclo de vida de *G. lamblia*

Las especies de *G.* tienen dos etapas principales en el ciclo de vida: la forma vegetativa móvil, que parasita el intestino delgado (trofozoíto) y la forma infectante (quiste). La transmisión de este parásito es por vía fecal-oral a través de la ingestión de alimentos o agua contaminados con quistes. El quiste es relativamente inerte, lo que permite una supervivencia prolongada en una variedad de condiciones ambientales (Adam, 2001). El período de incubación del agente etiológico en promedio varia de 9 a 15 días después de la ingestión de los quistes. Cuando son ingeridos por el huésped, la acidez del estómago desencadena la descomposición de la pared de los quistes, en el intestino delgado

particularmente en la porción del duodeno cada quiste libera dos excitoítos, que después de la división celular (fisión binaria asexual) generan cuatro trofozoítos, estos proceden a colonizar el duodeno donde la bilis está disponible para favorecer el crecimiento y replicación de los trofozoítos. Después de la exposición al líquido biliar, algunos de los trofozoítos forman quistes en el yeyuno y migran hacia la parte inferior del intestino donde pasan a las heces fecales, lo que permite completar el ciclo de transmisión al infectar a un nuevo huésped (Figura 2) (Adam, 2001; Yaoyu y Lihua, 2011).

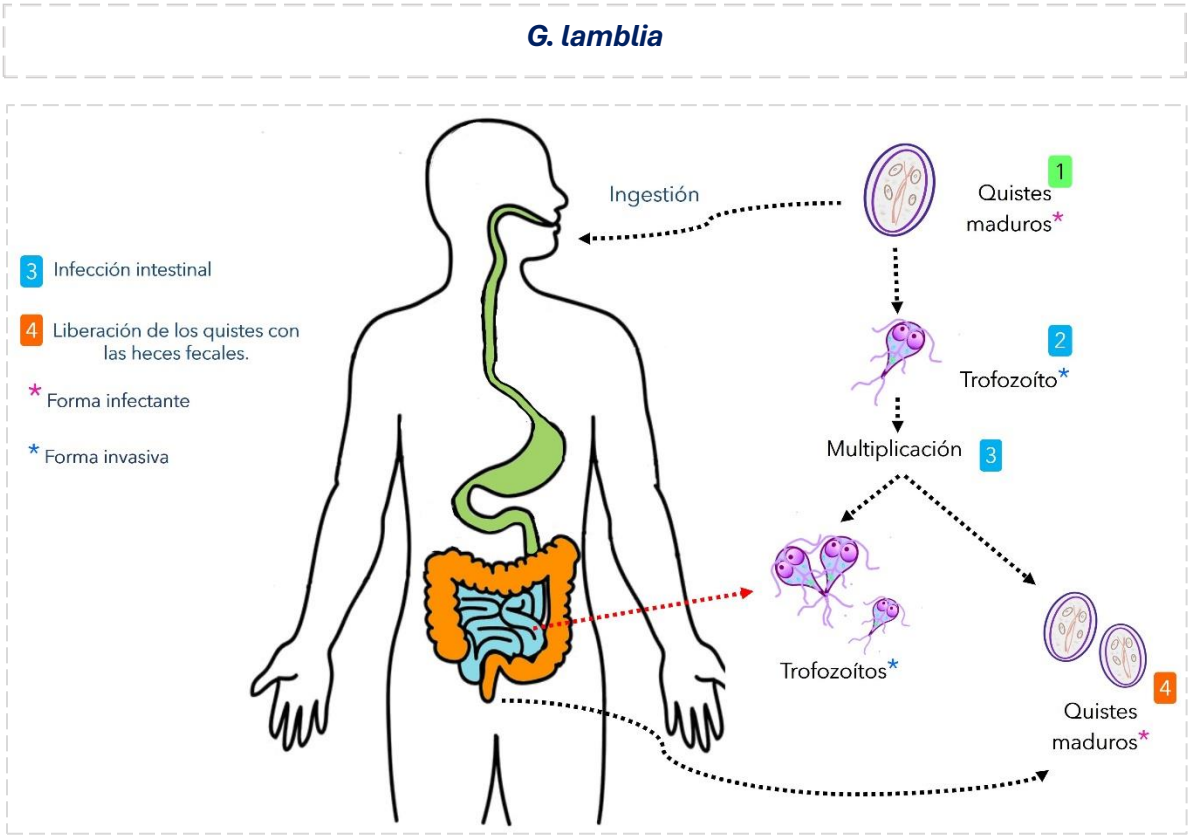


Figura 3. Ciclo de vida de *G. lamblia.*

1.1.3.2. Trofozoíto de *G. lamblia*

El trofozoíto de *G. lamblia* tiene un tamaño de 12-15 µm de largo, 5-9 µm de ancho la estructura del trofozoíto es única ya que posee un cuerpo con forma de pera, es la forma replicativa y móvil del parasito, esta etapa es crucial para la motilidad y adhesión del parásito, lo que le permite colonizar eficazmente el huésped (Figura 4) (Benchimol y cols., 2004; Gadelha y cols., 2020).

El citoesqueleto de *G. lamblia* presenta características estructurales y composicionales únicas que son fundamentales para su morfología celular distintiva y su patogenicidad. Está compuesto por estructuras ricas en microtúbulos; polímeros citoesqueléticos altamente conservados compuestos de heterodímeros de α- y β-tubulina que presentan dos extremos distintos: los extremos negativos y

positivos, son altamente dinámicos y existen ya sea en fases de crecimiento (polimerización) o contracción (despolimerización). Los orgánulos citoesqueléticos primarios son: flagelos y cuerpos basales, el disco ventral, el cuerpo medio y el complejo funis y caudal (Benchimol y cols., 2004; Gadelha y cols., 2020).

El disco ventral es un orgánulo definitorio en *G.*, es una estructura microtubular que se constituye de tubulina (isoformas α y β) y proteínas denominadas giardinas (α, β, γ y δ). Posee una forma de ventosa, que facilita la adhesión del parásito a la superficie, dicha adhesión es reversible y dinámica, lo que permite que el parásito resista el flujo peristáltico en el tracto gastrointestinal del huésped Hagen y cols., 2020).

El cuerpo medio también conocido como la “sonrisa torcida” de *G. lamblia*, es un haz de microtúbulos semiorganizados, ubicado en el lado dorsal de los trofozoítos, aproximadamente perpendicular a los axonemas caudales y posterior al disco ventral, sirve como reservorio de subunidades de tubulina para duplicar las estructuras de los microtúbulos, lo que permite el ensamblaje rápido del disco ventral para que los trofozoítos se unan rápidamente a las vellosidades intestinales (Hagen y cols., 2020).

G. lamblia se caracteriza por la presencia de ocho flagelos móviles organizados en cuatro pares con simetría bilateral (el anterior, el caudal, el posterolateral y el ventral), cada uno asociado a cuerpos basales únicos. Esta disposición permite los patrones de motilidad distintivos del organismo, esenciales para su supervivencia y patogenicidad (McInally y Dawson, 2016). Los cuerpos basales que nuclean todos los flagelos se encuentran en la parte anterior de la célula entre los dos núcleos. Estas estructuras son ricas en microtúbulos y el análisis proteómico reveló que los flagelos contienen modificaciones postraduccionales específicas de la tubulina, como la monoglicilación, las cuales son esenciales para la regulación de la motilidad (Sudhakar y cols., 2021).

G. lamblia posee dos núcleos ubicados en la parte anterior del trofozoíto, los cuales son equivalentes en tamaño, cantidad de DNA y activos a nivel transcripcional, ambos núcleos carecen de envoltura nuclear continua. En cada núcleo, el cariosoma (masa de material cromatínico) es prominente y está ubicado en el centro, sin nucleolo definido. (Birky y cols., 2002).

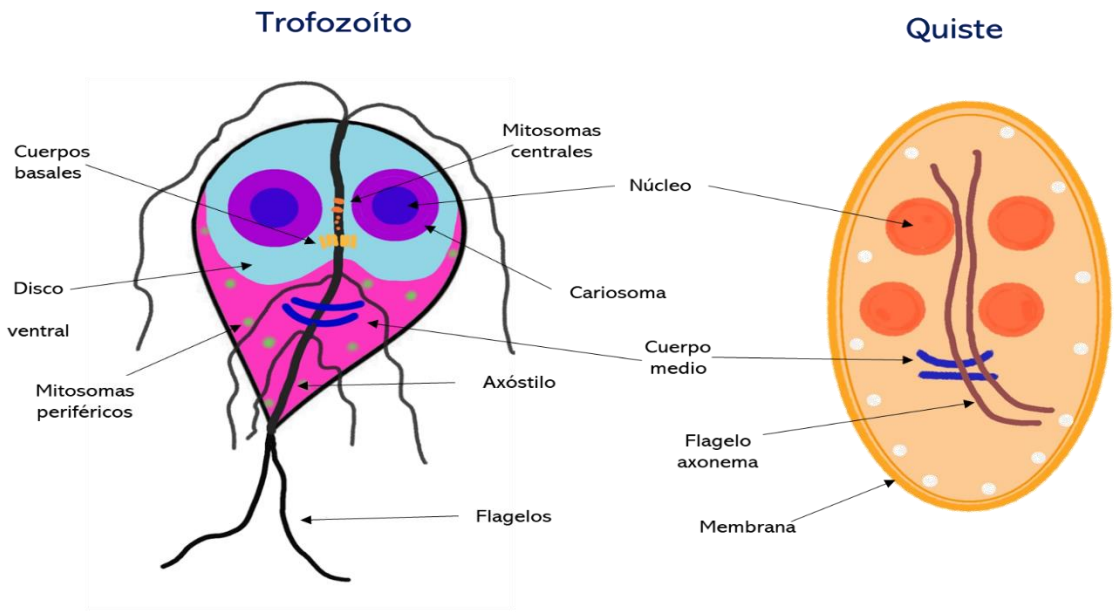


Figura 4. Estadios de *G. lamblia.*

1.1.3.3. Quiste de *G. lamblia*

El quiste de *G. lamblia* es la forma latente- infectiva del parásito, posee un tamaño de 10-15 µm de largo, 8-10 µm de ancho, su morfología es ovoide. La pared del quiste tiene un grosor de 0.3-0.5 µm y está compuesta en un 60% carbohidratos siendo el más abundante el β-(1,3-N-acetil-D-Galactosamina, y el 40% restante de proteínas denominadas CWP´s (del inglés cyst wall proteins), ricas en repetidos de leucina, de las cuales se han descrito 3 tipos, cuya función es proteger al parásito de la lisis hipotónica (Figura 4) (Ordoñez, 2015).

1.3 Tricomoniasis

La tricomoniasis es una enfermedad de transmisión sexual causada por el protozoario anaerobio *T. vaginalis*, capaz de infectar el tracto genitourinario de los seres humanos. La enfermedad puede ser asintomática (en casi el 50% de los portadores) o causar uretritis, vaginitis, cistitis, epididimitis o prostatitis. Los síntomas en las mujeres incluyen flujo vaginal amarillo-verdoso espumoso y abundante con dolor en la vulva y el periné, dispareunia y disuria (Bouchemal, 2017; Morris 2019). La tricomoniasis puede llegar a provocar consecuencias graves en las mujeres tales como infertilidad, ruptura prematura de las membranas placentarias, parto prematuro, bebés con bajo peso al nacer y muerte neonatal. En hombres la tricomoniasis tiende a ser una infección asintomática no obstante pueden actuar como reservorios de *T. vaginalis.* Sin embargo, cuando la infección se hace evidente, se puede presentar secreción uretral serosa o purulenta, prurito en el glande, erección dolorosa,

eyaculación precoz y disuria. En cuanto a las complicaciones incluyen: uretritis, balanopostitis, prostatitis, cistitis, epididimitis y esterilidad (Santos Diéguez, 2014; Bouchemal y cols., 2017).

1.3.1 Clasificación taxonómica de *T. vaginalis*

La familia *Trichomonadidae*, presenta tres especies que parasitan a los seres humanos: *T. vaginalis*, descubierta en 1836 por Donné (Collard, 1985) quien crea en este mismo año el género taxonómico y se descubre que este parasito únicamente es capaz de colonizar el tracto urogenital de los seres humanos; Dobell en 1939 clasifica a *T. tenax* encontrándolo solo en la cavidad bucal y finalmente *T. hominis* descubierta por Davaine en 1854 y exclusivamente coloniza el intestino grueso. De estas especies la más importante por ser la única patógena para los seres humanos es *T. vaginalis* (Rodríguez, 2014).

T. vaginalis pertenece al orden *Trichomonadida* que se caracteriza por presentar entre 3 y 6 flagelos de los cuales, uno de ellos, se dirige hacia atrás y se denomina flagelo de arrastre y puede formar una membrana ondulante. Otra estructura que los caracteriza es la presencia de un axóstilo que recorre todo el cuerpo y que suele proyectarse al exterior de éste (Rodríguez, 2014). La clasificación taxonómica de *T. vaginalis* se describe en la tabla 5.

Tabla 5. Clasificación taxonómica de *T. vaginalis* (Rodríguez, 2014).

Reino	*Protista*
Subreino	*Protozoa*
Phylum	*Zoomastigina*
Clase	*Parabasalia*
Orden	*Trichomonadida*
Familia	*Trichomonadidae*
Genero	*T.*
Especie	*vaginalis*
Nombre binomial	*T. vaginalis*

1.3.2. Epidemiología de la tricomoniasis

T. vaginalis es el parasito de transmisión sexual más común en humanos, infecta a 180 millones de personas cada año en todo el mundo, teniendo una mayor prevalencia e incidencia en países de África y América. (Gómez García y cols., 2015; Bouchemal, 2017; Alves y cols., 2020). Se estima que ocurren entre dos y tres millones de infecciones sintomáticas por año entre mujeres sexualmente activas en los Estados Unidos (Riu y Min, 2006).

En México el SINAVE reporto en 2022, 21198 casos de tricomoniasis urogenital; siendo Chiapas (1415), Oaxaca (1145), Puebla (2289) y Veracruz (3276) los estados con mayor incidencia. (Tabla 6) (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2022).

Tabla 6. Casos de tricomoniasis en México, por entidad federativa en 2022 (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2022).

Tricomoniasis urogenital		
Entidad federativa	**Hombres**	**Mujeres**
Aguascalientes	10	102
Baja California	20	313
Baja California Sur	18	123
Campeche	9	95
Coahuila	16	759
Colima	48	208
Chiapas	90	1 325
Chihuahua	39	662
Ciudad de México	32	240
Durango	14	434
Guanajuato	81	597
Guerrero	24	614
Hidalgo	19	522
Jalisco	33	667
México	34	877
Michoacán	33	890
Morelos	10	446
Nayarit	23	402
Nuevo León	39	790
Oaxaca	23	1 122
Puebla	34	2 255
Querétaro	2	61
Quintana Roo	11	225
San Luis Potosí	17	661
Sinaloa	17	367
Sonora	9	281
Tabasco	19	236
Tamaulipas	79	945
Tlaxcala	12	226
Veracruz	168	3 108
Yucatán	15	143
Zacatecas	45	459
TOTAL	1 043	20 155

1.3.3. Morfología y biología de *T. vaginalis*

1.3.3.1. Ciclo de vida de *T. vaginalis*

T. vaginalis es capaz de vivir exclusivamente en el tracto genitourinario de los seres humanos. Presenta una sola forma durante su ciclo de vida, el trofozoíto. La infección tiene como mecanismo de transmisión principal el contacto sexual, en donde se presenta el transporte de los trofozoítos mediante las secreciones de quienes participan en él, como el flujo vaginal, el líquido preseminal y el semen. Una vez que el parásito invade la mucosa genital, se aloja en la vagina y uretra de las mujeres, mientras

que en los hombres se encuentra en la próstata, uretra y epidídimo, donde comienzan a dividirse mediante procesos de fisión binaria (Santos Diéguez, 2014; Ibáñez, 2016).

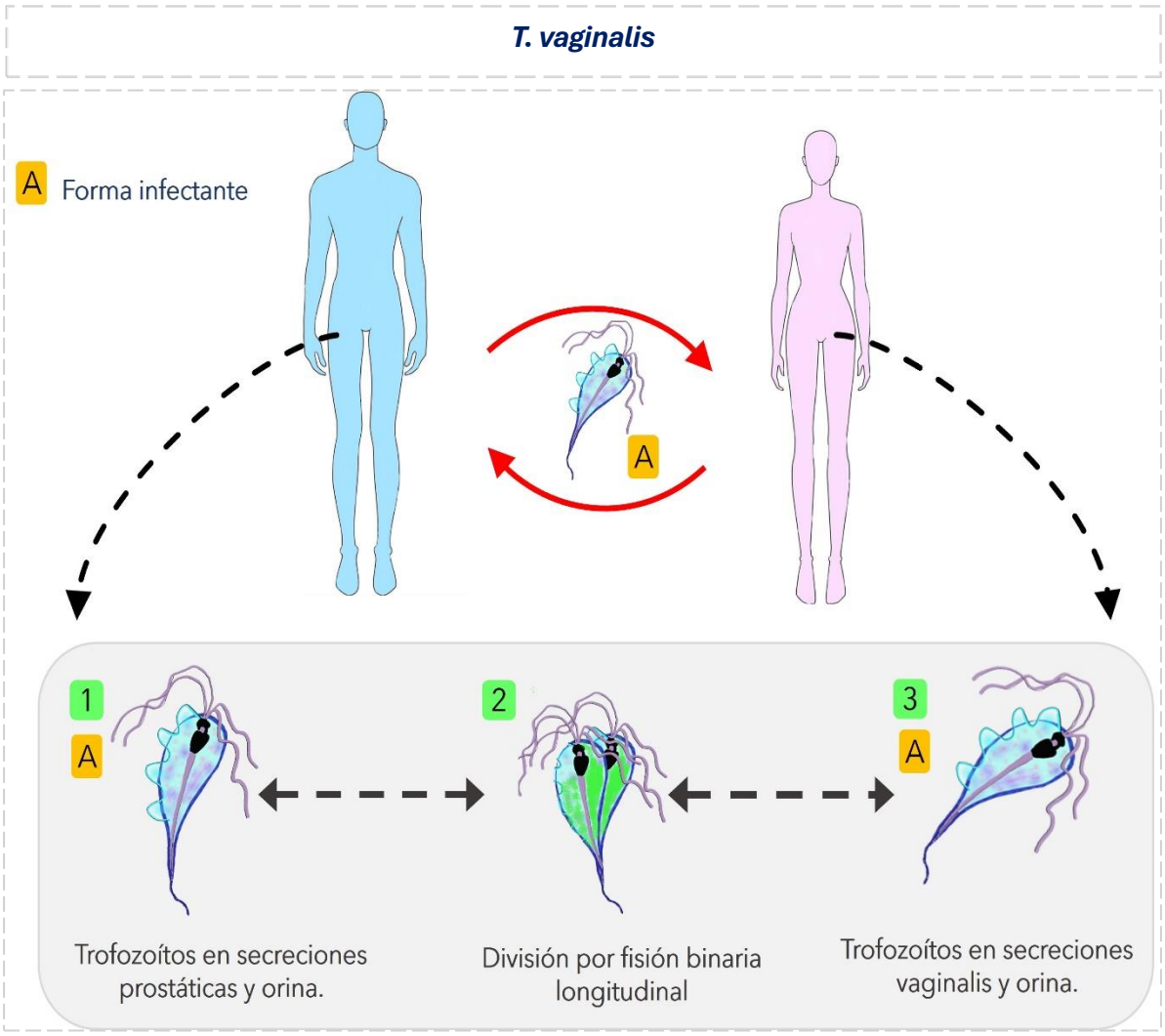


Figura 5. Ciclo de vida de *T. vaginalis*.

1.3.5 Trofozoíto de *T. vaginalis*

El trofozoíto de *T. vaginalis* mide entre 7 a 32 µm por 5 a 12 µm, presenta diferentes morfologías al visualizarlo bajo el microscopio óptico, piriformes, semilunares, esferoidales, forma ameboide (Figura 6). El movimiento activo lo da un aparato locomotor con cinco flagelos, de los cuales cuatro se denominan flagelos anteriores y emergen de un complejo blefaroplástico, ubicado cerca del núcleo. El quinto flagelo o flagelo recurrente, se dirige a la parte posterior y se ubica sobre el borde libre de una expansión protoplasmática que ocupa los dos tercios anteriores del parásito, denominada membrana

ondulante, cuya designación hace mención del movimiento típico que posee el parasito, que le permite desplazarse con facilidad y realizar movimientos de rotación y traslación (Archelli, 2021). Estas estructuras son ricas en microtúbulos al igual que el axostilo, conjunto de microtubulos que se extiende a lo largo del trofozoíto proporcionándole rigidez y soporte. *T. vaginalis* presenta un núcleo grande, ovalado, excéntrico y localizado en el extremo anterior, tiene uno de los genomas de mayor tamaño y complejidad jamás secuenciados en un organismo unicelular. El citoplasma contiene gránulos siderófilos, numerosas vacuolas digestivas y vesículas relacionadas con procesos de endocitosis, digestión y transporte, así como ribosomas e hidrogenosomas estrechamente unidos a gránulos de glucógeno y al retículo endoplasmático rugoso. Se alimentan mediante procesos de pinocitosis y fagocitosis. (Rodríguez, 2014; Núñez-Troconis, 2020).

.

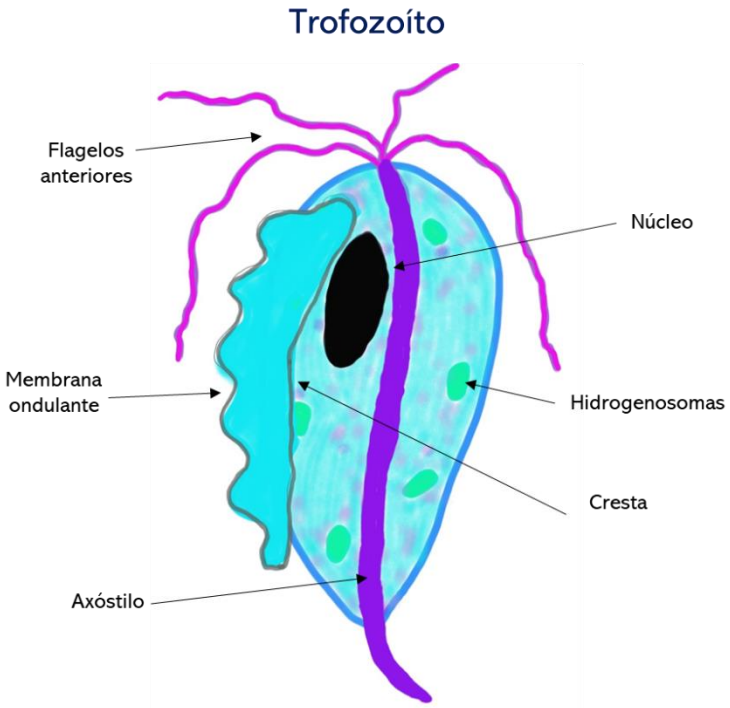


Figura 6. Trofozoíto de *T. vaginalis.*

1.4. Tratamiento

Para el tratamiento de la amebiasis, giardiasis y tricomoniasis se emplean varios fármacos, dentro de los cuales destacan los derivados de nitroimidazoles tales como tinidazol y Mtz, siendo este último el fármaco de primera elección para el tratamiento de estas parasitosis (Ordoñez- Mena y cols., 2018; Ehrenkaufer y cols., 2018). En México el Cuadro Básico de Medicamentos recomienda para el tratamiento de la giardiasis los siguientes fármacos: metronidazol (Mtz), mebendazol (Mbz), nitazoxanida y tinidazol. Respecto a la amebiasis los fármacos empleados para su tratamiento dependen principalmente de la localización de la infección, para el tratamiento de la amebiasis luminal recomienda Mtz, quinfamida, nitazoxanida y diyodohidroxiquinoleína, mientras que para la amebiasis extraintestinal se recomienda exclusivamente Mtz (CSG, 2019; Chacín-Bonilla, 2013).

Por otro lado, para el tratamiento de la tricomoniasis recomienda exclusivamente el uso de Mtz, sin embargo, en la literatura se ha reportado también el uso tinidazol (Vázquez y cols., 2001; CSG, 2017, Santos Diéguez, 2014).

1.4.1. Fracasos terapéuticos: reportes clínicos

En la literatura se reporta un número creciente de fracasos en el tratamiento terapéutico contra *G. lamblia*, razón por la cual se ha optado por la combinación de dos fármacos anti- giardia, e inclusive utilizar otros compuestos como alternativa al tratamiento; un ejemplo de ello son benzimidazoles como el albendazol (Abz) y Mbz (Ordoñez- Mena y cols., 2018). De manera similar ocurre con el tratamiento para la amebiasis, recientemente se han reportado fracasos terapéuticos en el tratamiento contra *E. histolytica* (Chacín-Bonilla,, 2012; 2013).Asimismo se ha reportado una alta cantidad de reacciones adversas tras el uso de Mtz como agente antiparasitario las más frecuentes son: náuseas, diarrea, vómito, estomatitis, parestesia, y a dosis elevadas o tratamientos de larga duración se presenta leucopenia, neutropenia, neuropatía periférica y toxicidad al sistema nervioso central. Adicionalmente, el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer de la Organización Mundial de la Salud ha incluido a Mtz como un potencial carcinógeno para el humano (Adil y cols., 2018).

Al igual que lo reportado para la amebiasis y la giardiasis, en el tratamiento de la tricomoniasis se han presentado infecciones persistentes o recurrentes que pueden atribuirse a un tratamiento inadecuado, a la reinfección por parte del paciente o a la resistencia a fármacos empleados. La resistencia al Mtz de aislados clínicos de *T. vaginalis* es preocupante ya que representa del 2.5 al 9.6% de los casos clínicos reportados, incluso puede superar el 15% en ciertas poblaciones (Gómez García y cols., 2015; Alves y cols., 2020).

1.4.2. Mecanismo de acción de Abz y Mbz en protozoarios.

Los benzimidazoles son fármacos utilizados principalmente para el tratamiento de infecciones causadas por helmintos, actualmente se conoce que su amplio espectro incluye también a ciertos protozoarios. La información disponible sobre el mecanismo mediante el cual Abz y Mbz inhiben el crecimiento de los protozoarios es limitada. No obstante, se ha descrito un mecanismo similar al que ocurre en los helmintos, asociado a la inhibición de los microtúbulos. Abz y Mbz se unen selectivamente a la β-tubulina en tres de sus regiones (TYR167, ALA198 y TYR200) evitando así la polimerización y la estabilidad de los microtúbulos (Martínez, 2015), lo que se transfiere en una desestabilización del citoesqueleto impidiendo la movilidad, así como el transporte de moléculas vitales para el parásito (Figura 7). Recientemente se ha reportado que el Abz también induce estrés oxidativo, lo cual sugiere que puede ser un posible mecanismo alternativo de toxicidad (Pech, 2028).

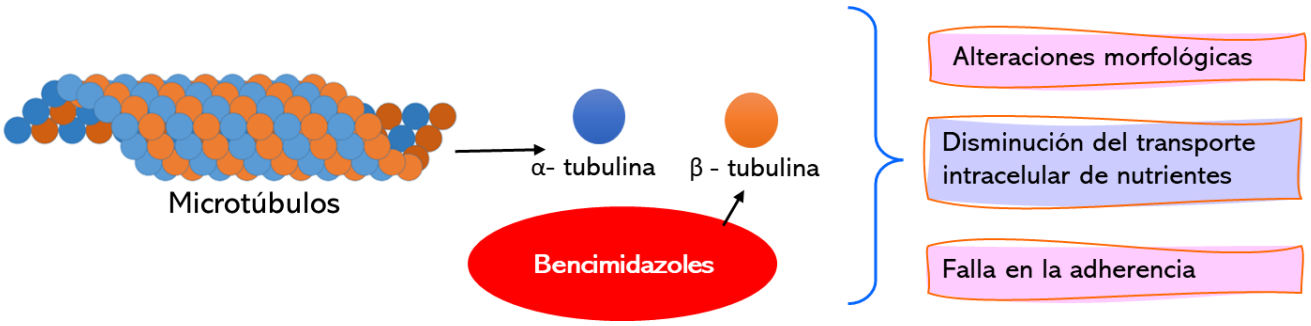


Figura 7. Sitio de acción de bencimidazoles en protozoarios.

En *G. lamblia* no se ha demostrado contundentemente el mecanismo de acción mediante el cual se produce la muerte de este protozoario, sin embargo, posee un citoesqueleto formado por varias estructuras microtúbulares: disco ventral o disco adhesivo, cuatro pares de flagelos, cuerpo basal, cuerpo mediano y funis (Benchimol y cols., 2004; Gadelha y cols., 2020). Algunas de estas estructuras no se encuentran en otros protozoarios y son exclusivas de este parasito, por lo que en *G.* predominan los microtúbulos, así como varias proteínas asociadas a ellos. Los derivados de benzimidazol en *G. lamblia* se unen a los dímeros de tubulina y dañan los elementos del citoesqueleto que contienen estas estructuras siendo el disco ventral (matriz de microtúbulos en forma de espiral altamente ordenados) (Nosala y cols., 2018; Gadelha y cols., 2020) el más afectado; como consecuencia de esta unión, *G.* pierde la capacidad para adherirse a las microvellosidades intestinales siendo incapaz de obtener nutrientes (Chávez y cols., 1992; Mariante y cols., 2005; Carter y cols., 2018; Oxberry y cols., 1994; Matadamas-Martínez y cols., 2020; Emery-Corbin y cols., 2021). Por otro lado, se determinó que Abz induce la formación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ERO) en *G. lamblia,* lo que provoca

un estado de estrés oxidativo donde la principal biomolécula afectada es el ADN. Este daño implica la formación de aductos de 8OHdG y la ruptura de la doble cadena del ADN, lo que conduce a la desregulación del ciclo celular y, finalmente, a la muerte celular (Locatelli y cols., 2004; Bártíková y cols., 2010; Martínez- Espinosa, 2015).

En el caso de *E*. *histolytica* y *T. vaginalis*, los derivados de benzimidazol se emplean como segunda opción terapéutica cuando el tratamiento ha fallado (Chacín-Bonilla, 2013; Adil et al., 2018). Sin embargo, la literatura científica contiene pocos reportes que determinen con precisión el posible mecanismo de acción del Abz y el Mbz sobre *E. histolytica* y *T. vaginalis*.

Se asume que su mecanismo de acción es similar al observado en *G. lamblia*; inhibición de la polimerización de los microtúbulos, sin embargo, estos protozoarios poseen menos estructuras microtubulares, por lo que se sugiere que el efecto de estos compuestos sobre estos parásitos es menor. Además, no se descarta la posibilidad de que participen alteraciones en el estado redox del parásito, lo que podría influir en su viabilidad y respuesta al tratamiento (Upcroft y Upcroft, 2001; Martínez- Espinosa, 2015).

1.4.3. Mecanismo de acción de nitroimidazoles en protozoarios.

Los nitroimidazoles (Mtz, nimorazol, tinidazol, ornidazol y secnidazol), especialmente el Mtz, son los fármacos de elección contra la amebiasis, giardiasis y tricomoniasis. El Mtz ejerce su acción contra los protozoos mediante un mecanismo multifacético que implica principalmente la reducción de su grupo nitro, lo que conduce a la formación de intermediarios reactivos capaces de dañar el ADN. Este proceso es particularmente eficaz en protozoos anaerobios, donde el Mtz presenta toxicidad selectiva.

Mtz penetra la célula mediante difusión pasiva y es activado por proteínas de transporte intracelular. Estos parásitos derivan su energía de la fermentación oxidativa de cetoácidos (piruvato), la descarboxilación del piruvato es catalizada por la enzima piruvato ferredoxin- oxidorreductasa (PFOR), la reducción del PFOR crea gradientes de concentración que permite la acumulación del medicamento dentro del trofozoíto, este tiene un potencial redox más bajo (-460 mV) que la ferredoxina (-320 mV), por lo que actúa como un sumidero de electrones, extrayendo electrones de ferredoxina para convertirlos en aniones de radicales nitro o nitroso; lo cual causa daño de biomoléculas funcionalmente importantes, como la rotura de la hebra y el entrecruzamiento del ADN inhibiendo la segregación de ADN o bien modifica los genes implicados en el proceso final de la mitosis, deteniendo el ciclo celular en la fase G2+M (Hoyne et al., 1989). Además, el Mtz inhibe el consumo de oxígeno del trofozoíto, actuando como un aceptor de electrones alternativo (Figura 8) (Raether & Hänel, 2003; Paget et al., 1989).

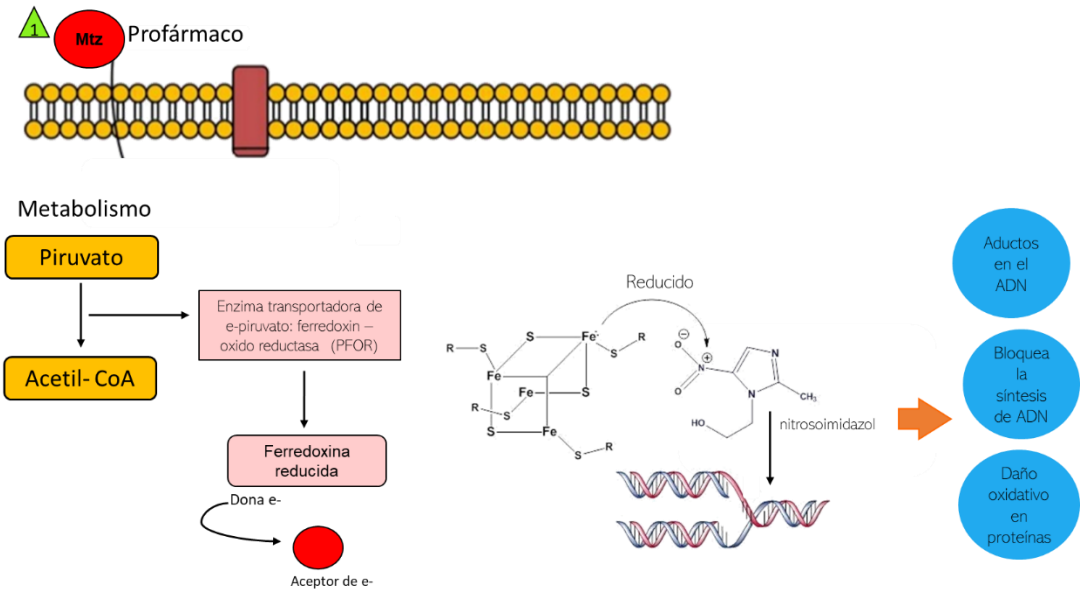


Figura 8. Mecanismo de acción de Mtz en protozoarios.

Por lo anteriormente expuesto, se están investigando diferentes alternativas para el tratamiento de estas parasitosis, dentro de las cuales destacan la búsqueda de nuevos fármacos obtenidos a partir de productos naturales, el diseño y evaluación de nuevos fármacos asistido por métodos computacionales, así como el uso de fármacos que fueron diseñados con fines terapéuticos diferentes lo cual se conoce como reposicionamiento de fármacos (Ashburn y Thor; 2004; Hernández-Núñez y cols., 2017).

2.0 Antecedentes

El benzimidazol es un grupo farmacóforo análogo de purina presente en una gran cantidad de compuestos bioactivos (Marinescu, 2023). El benzimidazol (Figura 9) presenta una estructura bicíclica compuesta por un anillo de benceno, que se fusiona con un anillo imidazólico. Dependiendo de los sustituyentes que presenten se pueden clasificar en (Bettencourt, 2001):

1. **Metilcarbamatos:** Abz, ricobendazol, parbendazol, Mbz, oxibendazol, flubendazol, ciclobendazol y oxfendazol.
2. **Tiazólicos:** tiabendazol y cambendazol.
3. **Tiol halogenados**: triclabendazol.

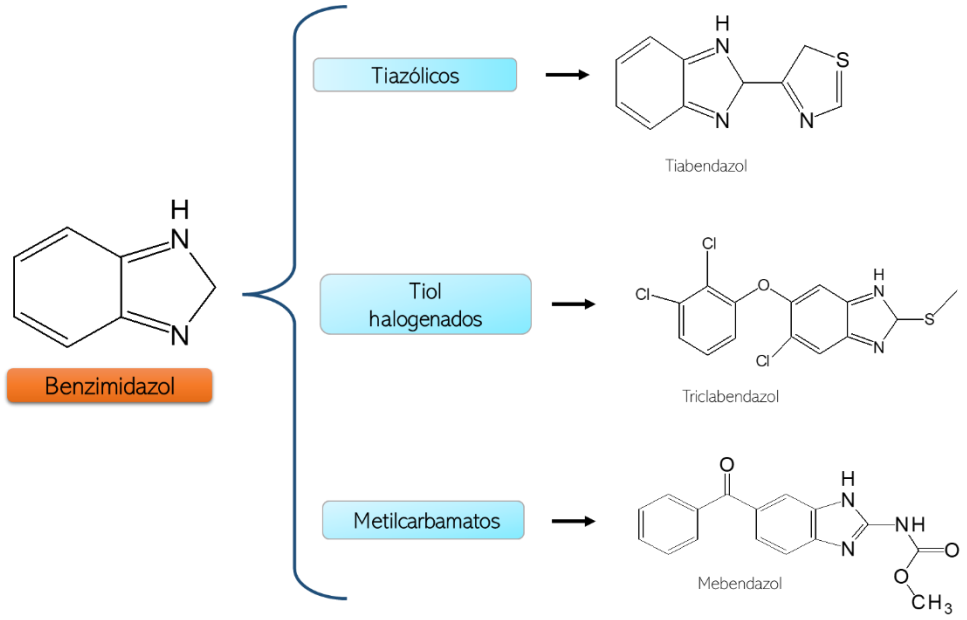


Figura 9. Estructura química de benzimidazol y clasificación dependiente de los sustituyentes.

En 1944, Woolley señaló que el benzimidazol podía generar respuestas biológicas similares a las purinas, lo que llevó a la primera identificación de su potencial terapéutico. Posteriormente, en 1949, Brink caracterizó e identificó el 5,6-dimetilbenzimidazol como un producto de la degradación de la vitamina B12 y, más tarde, reportó que algunos de sus derivados presentaban actividad biológica similar.

Estos hallazgos impulsaron una intensa investigación sobre los derivados del benzimidazol, lo que llevó a su posicionamiento como un sistema heterocíclico de gran relevancia en la química farmacéutica. La optimización de sus sustituyentes alrededor de este núcleo ha dado origen a diversos fármacos con aplicaciones terapéuticas, entre ellos:

- Antiparasitarios: Abz, Mbz, tiabendazol.

- Inhibidores de la bomba de protones: Omeprazol, lansoprazol, pantoprazol.
- Antihistamínicos: Astemizol.
- Antivirales: Enviradina.
- Antihipertensivos: Candesartán, cilexetil, telmisartán.
- Antinflamatorio: Benoxaprofeno.

Estos compuestos destacan por su versatilidad y eficacia en distintas áreas terapéuticas, lo que refuerza el valor del benzimidazol en el desarrollo de nuevos medicamentos (Figura10) (Marinescu, 2023; Chavez- Rios, 2025).

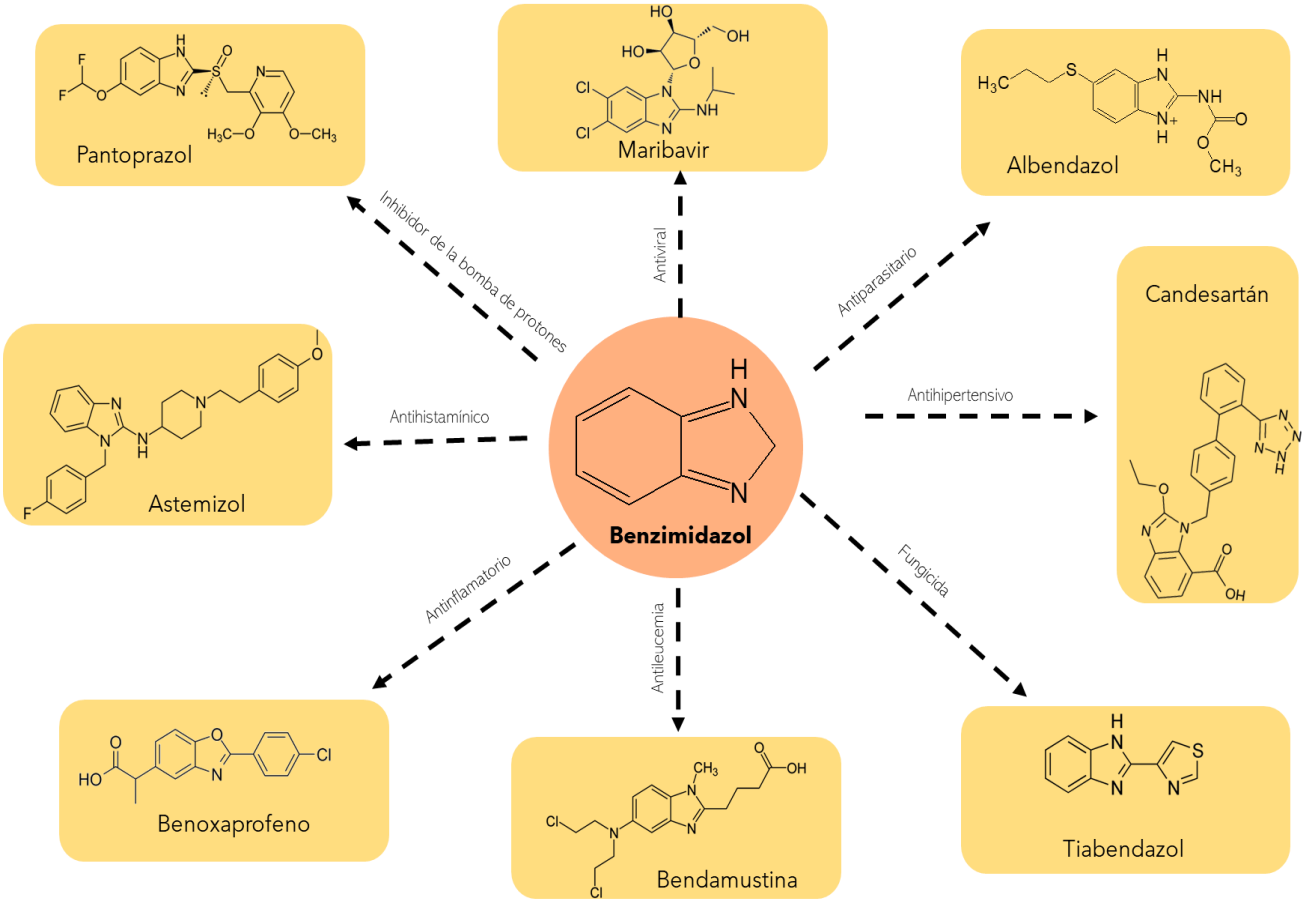


Figura 10. Estructura química de benzimidazol y algunos de sus derivados con efecto farmacológico.

El Abz y Mbz son fármacos derivados de bencimidazol antiparasitarios utilizados desde hace muchos años para el tratamiento de helmintiasis intestinales y tisulares humanas (Anichina y cols., 2023), además, son empleados actualmente como el tratamiento de ciertos tipos de infecciones causadas por protozoarios, principalmente para el tratamiento de la giardiasis de acuerdo con el Cuadro Básico de

Medicamentos y a las Guías de Práctica Clínica en México (Bettencourt, 2001; Salahuddin y Avijit, 2017; Hernández-Núñez, 2017; GPC,2018; CSG,2019).

En los últimos años, diversas investigaciones han reportado el reposicionamiento del Abz y el Mbz como posibles agentes terapéuticos contra el cáncer. El reposicionamiento de fármacos es una estrategia creciente que busca identificar nuevas aplicaciones de medicamentos ya existentes o en investigación más allá de su indicación original. Este enfoque ofrece ventajas significativas, como la posibilidad de desarrollar formulaciones innovadoras con beneficios clínicos superiores a los de fármacos más antiguos. Además, el riesgo de fracaso es menor en comparación con nuevas moléculas, ya que los fármacos reposicionados han demostrado seguridad en modelos preclínicos. Si los ensayos tempranos han sido completados, es menos probable que presenten problemas de seguridad en fases posteriores de evaluación de eficacia. Otro beneficio clave es la reducción del tiempo de desarrollo, dado que muchas pruebas preclínicas, estudios de seguridad e incluso aspectos relacionados con la formulación ya han sido realizados, acelerando su posible aplicación clínica (Schcolnik-Cabrera y cols., 2021; Meco y cols., 2023).

Se han realizado investigaciones donde Abz y Mbz son efectivos contra leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, linfoma, leucemia linfoblástica aguda, mieloma multiple (Golla y cols., 2024), cáncer de mama, cáncer de colon, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, entre otros (Houpt y Chaudhry, 2009). Los derivados basados en bencimidazol ejercen actividad anticancerígena a través de la regulación de varias vías de señalización oncogénicas importantes y procesos celulares tales como ciclo celular, autofagia, diferenciación, metástasis y angiogénesis (Meco y cols., 2023). Las nuevas dianas terapéuticas, además del efecto antiparasitario, posicionan a los derivados del bencimidazol como compuestos de gran interés farmacológico en los próximos años.

Sin embargo, uno de los principales problemas relacionados con estos fármacos, es su baja solubilidad en disolventes acuosos, lo que condiciona su absorción y por ende su biodisponibilidad.

La baja solubilidad acuosa de los Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFA) es un problema de gran importancia en la industria farmacéutica. La solubilidad y la velocidad de disolución son los parámetros clave para que el efecto terapéutico de un fármaco se lleve a cabo. La solubilidad, es uno de los parámetros más importantes para alcanzar la concentración deseada del fármaco en la circulación sistémica y se logre la respuesta farmacológica deseada; sin embargo, más de 92% de los fármacos enumerados en la Farmacopea de los Estados Unidos presentan baja solubilidad acuosa (Alvarado, 2015). Así mismo, se ha reportado que el 40% de los IFA descubiertos son solubles en agua (Merisko-Liversidge y cols. 2003; Prasanna y cols., 2012). Por lo tanto, uno de los principales objetivos en el desarrollo farmacéutico es aumentar la solubilidad y velocidad de disolución de los IFA mientras se mantiene una estructura química estable (Alvarado, 2015).

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB), permite catalogar a un IFA considerando su solubilidad acuosa (en función de la dosis) y la permeabilidad; siendo estos los factores más importantes que modulan la velocidad y cantidad absorbida de un IFA, a partir de formas farmacéuticas sólidas orales de liberación inmediata. El SCB tiene como objetivo, la posibilidad de establecer correlaciones *in vitro-in vivo* que pueden sustituir los ensayos realizados en humanos por ensayos de disolución *in vitro*, de acuerdo con la clasificación obtenida para el IFA (Bahena y Ponce, 2008). El SCB se ha convertido en una herramienta cada vez más importante en la regulación de productos farmacéuticos en todo el mundo y ha sido adoptado por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE. UU. (FDA), la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) para establecer estándares de biodisponibilidad/bioequivalencia para medicamentos orales de liberación inmediata (Dahan y cols., 2009). De acuerdo con el SCB, los IFA se clasifican según sus características de solubilidad y permeabilidad como Clase I a Clase IV (Tabla 7) (Herrera-Ruiz, 2005; Ferrer, 2015). Se considera que un IFA es altamente soluble si su dosis de concentración más alta es soluble en menos de 250 mL de agua, de acuerdo con pruebas realizadas en un rango de pH de 1.2 a 7,5. Por otro lado, un IFA es considerado altamente permeable si la absorción oral se compara favorablemente (es decir, más del 90%) con una inyección intravenosa del IFA (Simonazzi, 2019).

Tabla 7. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica y su descripción (FDA Guidance for industry, 2017).

Clase I	Clase II
ALTAMENTE SOLUBLE Disuelve en volumen ≤ 250mL (pH 1.2-7.5 FDA; 1.2-6.8 OMS) Rango de pH en función del fármaco ALTAMENTE PERMEABLE (>90% FDA; >85%OMS) El producto farmacéutico de prueba y referencia se disuelven rápidamente, y el producto no contiene ningún excipiente que afecte la velocidad o el grado de absorción del medicamento.	POCO SOLUBLE Disuelve en volumen > 250mL (pH 1.2-7.5 FDA; 1.2-6.8 OMS) Rango de pH en función del fármaco ALTAMENTE PERMEABLE (>90% FDA; >85%OMS) El producto farmacéutico debe ser de disolución rápida y los perfiles de disolución entre el comparador y el comparado, muy similares en el rango de pH establecido.
Clase III	**Clase IV**
ALTAMENTE SOLUBLE Disuelve en volumen ≤ 250ml (pH 1.2-7.5 FDA; 1.2-6.8 OMS) BAJA PERMEABILIDAD (< 90% FDA; <85%OMS) El medicamento de prueba y de referencia son rápidamente disueltos (85% o más en 15 min o menos a pH 1.2, 4.5 y 6.8) si aseguran determinados criterios de disolución.	POCO SOLUBLE Disuelve en volumen > 250mL (pH 1.2-7.5 FDA; 1.2-6.8 OMS) Rango de pH en función del fármaco BAJA PERMEABILIDAD (< 90% FDA; <85%OMS) No se encuentran exceptuadas de la realización de estudios de equivalencia *in-vivo.*

Para superar estos problemas, se han desarrollado diversas estrategias con la finalidad de mejorar las propiedades fisicoquímicas de estos IFA, que incluyen las descritas en la Tabla 8.

Tabla 8. Estrategias utilizadas para mejorar la biodisponibilidad de IFA. (Simonazzi, 2019).

Estrategia	Ejemplo
A. Modificación física o química	-Ultra-micronización o nanometrización. -Nanopartículas.
B. Preparación y caracterización de cristales	-Formación de sales.
C. Enfoques de formulación	-Composición de disolvente: *Co-disolventes y solubilización por surfactantes. *Modificación de pH.
	-Dispersiones sólidas amorfas.
	-Complejos de inclusión.
	-Sistemas coloidales: *Micelas. *Sistemas de liberación de fármacos auto-emulsionantes.
	-Liposomas.

2.1. Albendazol

El Abz es un antiparasitario que posee acción local y sistémica, que pertenece al grupo de los benzimidazoles metilcarbamatos, es ampliamente utilizado tanto en medicina veterinaria, como en medicina humana (Paredes, 2016). Fue introducido por primera vez en 1975 para el tratamiento de trematodos hepáticos, tenías, nematodos pulmonares y gastrointestinales en ovejas y ganado (Chai y cols., 2021). Posteriormente fue aprobado para uso humano en 1982 bajo el nombre comercial de Zentel (Chai y cols., 2021; Dayan, 2003). Desde que Abz fue aprobado para su uso en humanos se han realizado estudios sobre su eficacia antiparasitaria contra una variedad de nematodos, trematodos, cestodos e incluso protozoarios (Chai y cols., 2021). En México el cuadro básico de medicamentos y las guías de práctica clínica recomiendan a Abz como el fármaco de primera elección para el tratamiento de ascariasis (*Ascaris lumbricoides)*, enterobiasis (*Enterobius vermicularis)*, uncinariasis (*Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus)*, tricocefalosis (*Trichuris trichiura)*, teniasis (*Taenia saginata, Taenia solium)*, estronguiloidosis (*Strongyloides stercoralis)*, himenolepiasis (*Hymenolepis nana)*, así como para el tratamiento de la neurocisticercosis (quistes larvales de *Taenia solium*) y la giardiasis (*G. lamblia*)(CSG, 2017; GPC, 2018).

2.1.1 Propiedades fisicoquímicas

El Abz tiene por nombre IUPAC metil 5-(propiltio)-2benzimidazolcarbamato (Figura 11), es un sólido de color blanco a amarillo claro, con un punto de fusión de 206 °C – 210 °C, con un peso molecular de 265.34 g/mol, su fórmula molecular es $C_{12}H_{15}N_3O_2S$. Pertenece a la clase II en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica debido que presenta escasa solubilidad en agua (0.2 mg/L a 25°C) y alta permeabilidad (log P 2.54) (Ding y cols., 2023). El Abz presenta valores de pKa de 2.68 y 11.83 además de ser un compuesto lipofílico básico (logD pH 7 es 3.47) (Eriksen y cols., 2022).

El Abz tiene una absorción intestinal muy baja asociada a su escasa solubilidad acuosa (SCB: II), además sufre un extenso metabolismo de primer paso en los enterocitos y las células hepáticas; estas propiedades desfavorables dan como resultado una baja biodisponibilidad, lo que limita el uso de Abz como agente antiparasitario (Racoviceanu y cols., 2020).



Características:

- Formula molecular: $C_{12}H_{15}N_3O_2S$
- PM: 265.34 g/mol
- Solubilidad en agua: 0.2 µg/mL
- pKa: 11.83 y 2.68
- SCB: II
- Forma farmacéutica: suspensión y tabletas

Figura 11. Estructura química de Abz (Sawatdee y cols., 2019).

2.1.2. Farmacocinética de Abz

La farmacocinética del Abz, se caracteriza por una variabilidad significativa influenciada por diversos factores, que afectan su biodisponibilidad, metabolismo y distribución en diferentes poblaciones. Comprender estas propiedades farmacocinéticas es fundamental para optimizar su eficacia terapéutica.

Tras su administración por vía oral el Abz es pobremente absorbido (< 5%) en el tracto gastrointestinal, mientras que en ratones y ratas es aproximadamente del 20-30% y en bovinos alcanza alrededor del 50%. La administración simultánea con alimentos grasos incrementa hasta 5 veces su biodisponibilidad (Dayan, 2003). Debido a su baja tasa de absorción intestinal, su baja concentración sanguínea y su baja biodisponibilidad, se requieren tratamientos prolongados y dosis altas para alcanzar concentraciones plasmáticas óptimas para el tratamiento de infecciones sistémicas (Ding y cols., 2023; Koradia y cols., 2017; Mayed y cols., 2008), la tasa de curación clínica actual de enfermedades parasitarias no intestinales tratadas con Abz es sólo del 30% (Ding y cols., 2023).

El Abz experimenta un metabolismo de primer paso en el hígado, dando lugar a dos principales metabolitos detectados en plasma: el sulfóxido de Abz (ricobendazol), considerado el metabolito activo responsable de su efecto terapéutico, y la sulfona de Abz. El sulfóxido de Abz se distribuye ampliamente por el organismo y presenta una alta afinidad por las proteínas plasmáticas, con una unión aproximada del 70%. Una fracción de este metabolito sufre una oxidación adicional, transformándose en la sulfona de Abz. El metabolismo del albendazol involucra rutas oxidativas independientes que afectan tanto la cadena lateral del alquilo como el anillo aromático, proceso que depende de la acción de las oxidasas y del citocromo P450 (Dayan, 2003).

La eliminación del Abz es rápida tanto en humanos como en animales. Su principal metabolito, el sulfóxido de Abz, presenta una vida media de 8 – 12 h. La excreción ocurre principalmente en forma de metabolitos a través de la bilis y solo una pequeña porción por la orina.

2.1.3. Posología de Abz.

La dosis de Abz y la duración del tratamiento dependen de diversos factores, como la especie parasitaria, la carga infecciosa y la respuesta del huésped (Tabla 9). Estos elementos influyen en la estrategia terapéutica, dando lugar a variaciones en el esquema de administración. Se recomienda su uso a partir de los 2 años (Instituto nacional de higiene: Rafael Rangel, s.f).

Tabla 9. Posología de Abz contra diferentes parásitos.

Enfermedad	Parasito	Tratamiento
Ascariasis	*Ascaris lumbricoides*	Dosis única de 400 mg de Abz.
Anquilostomiasis	*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*	Dosis única de 400 mg de Abz.
Himenolepiasis	*Hymenolepis nana*	400 mg/día por 3 días continuos.
Enterobiasis	*Enterobius vermicularis*	Dosis inicial de 400 mg, seguida de una dosis adicional de 400 mg después de 2 semanas.
Tricocefalosis	*Trichuris trichiura*	400 mg/día por 3 días continuos.
Teniasis	*Taenia solium* y *Taenia saginata*	400 mg/día por 3 días continuos.
Estrongiloidiasis	*Strongyloides stercoralis*	400 mg una vez al día por 3 días continuos.
Giardiasis	*Giardia lamblia*	400 mg/día por 5 días continuos.

Dosis en pacientes especiales (Instituto nacional de higiene: Rafael Rangel, s.f):

- Insuficiencia renal: No se ha descrito la necesidad de ajustar la dosis.
- Insuficiencia hepática: No se ha descrito la necesidad de ajustar la dosis.
- Ancianos: No se ha descrito la necesidad de ajustar la dosificación.

Actualmente Abz está disponible como comprimidos o suspensiones con dosis altas de IFA y su eficacia terapéutica se ve comprometida debido a su baja solubilidad en agua. Para superar estos inconvenientes, es importante aumentar la solubilidad acuosa y la velocidad de disolución del Abz (Ghanbarzadeh y cols., 2016). Por lo tanto, el desafío para este IFA se centra en el desarrollo de nuevas formas sólidas con solubilidad acuosa mejorada en medio ácido.

2.1.4. Estrategias para mejorar la solubilidad de Abz.

Es importante contar con nuevas metodologías que permitan mejorar la solubilidad acuosa Abz, además se ser reproducibles, económicas y escalables (Simonazzi, 2019). Desde 1991, se han desarrollado diferentes estrategias para mejorar la biodisponibilidad de Abz, dentro de las que destacan la formulación de dispersiones sólidas (Torrado,1996; Castro, y cols., 2010; Fabbri y cols., 2020), la

formación de complejos con ciclodextrina (Palomares y cols., 2009; García y cols., 2016) la síntesis de nuevos análogos con mayor solubilidad (Rivera, y cols., 2007; Mavrova, y cols., 2010), formación de nanocristales (Paredes, y cols., 2016), formación de nano y micro emulsiones (Sawatdee y cols., 2019), así como varias formulaciones basadas en nanopartículas (Liang y cols., 2022, Naseri y cols., 2016; Jelowdar, y cols., 2017) no obstante, ninguna de estas estrategias ha entrado en la etapa de investigación clínica.

La mayoría de los estudios relacionados se enfocan en determinar la solubilidad y el perfil farmacocinético *in vitro e in vivo,* con la finalidad de observar el comportamiento de estas nuevas formas sólidas. Como lo reportó Ding y colaboradores en 2023, formaron complejos con metil-β-ciclodextrina y Abz, aumentando 150 veces la solubilidad del fármaco; así mismo realizaron estudios farmacocinéticos *in vivo* que apoyan el uso de estos complejos para el tratamiento de las parasitosis.

Sawatdee y colaboradores (2019) desarrollaron una tableta masticable que contiene un sistema de administración de fármacos automicroemulsionante con Abz. En estudios de liberación *in vitro* determinaron una liberación del 100% del fármaco en 30 minutos, mientras que las concentraciones plasmáticas *in vivo*, en un modelo murino, indicaron que el área bajo la curva (AUC) es mayor que aquellas a las que se les administraron tabletas o polvo comerciales, resultando en una biodisponibilidad de Abz 1.3 veces mayor.

Gaona Bonfil (2020) reporto la obtención y caracterización de nuevas fases sólidas cristalinas del Abz usando como formadores de cocristal compuestos derivados de ácidos carboxílicos aromáticos como el ácido 2,5- dihidroxibenzoico (25DHBA) y ácido 2,6-dihidroxibenzoico (26DHBA). Adicionalmente, reporto la formación de preformulaciones conteniendo estas fases solidas de Abz con el polímero metilcelulosa. Las preformulaciones con el polímero prolongaron el estado supersaturado alcanzado hasta los 90 minutos y aumentó la solubilización de albendazol a partir de la fase sólida ABZ-25DHBA.

Por otro lado, existen estudios que determinan la actividad biológica de estas estrategias, realizados de manera *in vitro* e *in vivo* en una gran variedad de parásitos. Fabbri y colaboradores (2020) determinaron la eficacia *in vivo* de dispersiones sólidas de Abz con poloxámero 407 (SD ABZ:P407) en un modelo murino de equinococosis alveolar secundaria causada por la infección intraperitoneal de *Echinococcus multilocularis*, como resultado del estudio de la eficacia clínica, se observó una disminución estadísticamente significativa en el peso de los quistes (eficacia del 86%) en los animales que recibieron el tratamiento con SD ABZ:P407; en contaste con los que únicamente recibieron Abz. La mayor eficacia obtenida después de la administración oral de SD ABZ: P407 podría explicarse por un aumento de la solubilidad, que incrementa la velocidad de disolución de Abz resultando en una mayor biodisponibilidad y eficacia de Abz.

Pensel y colaboradores (2014) determinaron la eficacia quimioprofiláctica y clínica de una formulación de dispersión sólida de Abz con poloxámero 188, en ratones infectados con metacestodos de *Echinococcus granulosus*, observaron que el Abz formulado como dispersión sólida presenta una mayor eficacia quimioprofiláctica y clínica que el Abz solo; la mejora en la eficacia terapéutica podría ser consecuencia del aumento de la biodisponibilidad sistémica del Abz.

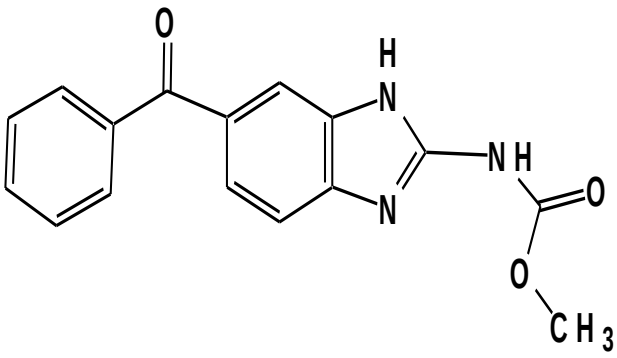
Martínez-Conde y colaboradores (2023) utilizaron una estrategia de diseño racional para sintetizar retroAbz (RetroABZ), y determinaron su actividad *in vitro* contra trofozoítos de *G. lamblia*, obteniendo como resultado un valor de CI_{50} = 83 nM, superando al Abz (CI_{50} =189 nM). Además, evaluaron la actividad antiG.l en un modelo murino, donde RetroABZ exhibió una actividad *in vivo* notablemente mayor y potente contra *G. lambia* ya que demostró una actividad giardicida 11 veces mayor que el fármaco de referencia Abz, con valores de dosis efectiva media de 5 µg/kg y 55 µg/kg, respectivamente.

2.2 Mebendazol

El Mbz es un bencimidazol metilcarbamato antiparasitario de amplio espectro que apareció en 1968 como un agente activo contra una amplia gama de helmintos en medicina veterinaria; posteriormente, fue aprobado por la administración de medicamentos y alimentos de los EE. UU (FDA) para su uso en humanos en 1971(Meco y cols., 2023). El Mbz ha sido utilizado durante más de 20 años en medicina humana y veterinaria para tratar una variedad de infecciones parasitarias ya que tambien posee actividad larvicida y ovicida. Es activo frente a parásitos intestinales y tisulares, dentro de los cuales destacan dentro de las cuales destacan aquellas causadas por: *Ascaris lumbricoides, Enterobius vermiculares, Trichuris trichiuria, Ancylostoma duodenale, Necator americanus, Taenia solium, Taenia saginata* y *G. lamblia* (Dayan, 2003; CSG, 2017).

2.2.1 Propiedades fisicoquímicas de Mbz

El Mbz tiene por nombre IUPAC 5-benzoil-1H -bencimidazol-2-il-carbamato de metilo (Figura 12), se caracteriza por ser un polvo de coloración blanca o amarilla clara, inoloro, de sabor agradable y que presenta baja solubilidad en agua (0.07 mg/ mL) (Kogien y Teixeira, 2011). El Mbz tiene un peso molecular de 295.29 g/mol, presenta un punto de fusión de 288.5 °C y su fórmula molecular es $C_{16}H_{13}N_3O_3$. Pertenece a la clase II del SCB. Es altamente lipofílico (log P 2.83), presenta valores de pKa de 10.52 y 4.7.



Características:

- Formula molecular: $C_{16}H_{13}N_3O_3$
- PM: 259.29 g/mol
- Solubilidad en agua: 0.07 mg/ mL
- pKa: 10.52 y 4.7
- SCB: II

Figura 12. Estructura química y propiedades fisicoquímicas del Mbz.

2.2.2. Farmacocinética de Mbz

El Mbz se administra por vía oral, se absorbe de manera limitada en el tracto gastrointestinal entre el 5 y el 10 %. La absorción se ve aumentada si se administra junto con alimentos grasos, sin embargo, la mayoría del Mbz administrado permanece en el tracto gastrointestinal. El Mbz absorbido produce concentraciones séricas máximas en 2 - 4 horas, tiene un volumen de distribución de 1 - 2 L/kg y una unión a proteínas plasmáticas del 95%. Se metaboliza en el hígado, siendo el principal metabolito el 2-amino-5-benzoilbenzimidazol, pero también se metaboliza a derivados inactivos hidroxilados e hidroxiaminados; sin embargo, ninguno de sus metabolitos presenta acción antiparasitaria. Se excreta un 2% en orina y el resto de la dosis oral se excreta en las heces. Su tiempo de eliminación es de aproximadamente 3 a 6 h en pacientes con función hepática normal. (Brookie, 2017).

2.2.3. Posología de Mbz

El Mbz se presenta en tabletas, comprimidos y comprimidos masticables con 100 mg, 200 mg, 250 mg y 500 mg de Mbz y en suspensión oral con 20 mg por mL, 100 mg por cada 5 mL y 500 mg por 15 mL. Puede administrarse de forma segura a niños mayores a 2 años y adultos. Las dosis de Mbz recomendadas se presentan en la tabla 9 (Instituto nacional de higiene: Rafael Rangel, s.f).

Tabla 10. Posología de Mbz contra diferentes parásitos.

Enfermedad	Parasito	Tratamiento
Ascariasis	*Ascaris lumbricoides*	100 mg dos veces al día, en la mañana y en la noche, por tres días consecutivos. O bien dosis única de 500 mg.
Angiostrongiliasis	*Angiostrongylus cantonensis y Angiostrongylus costaricensis*	100 mg cada 12 horas durante 5 días.
Himenolepiasis	*Hymenolepis nana*	100 mg dos veces al día, en la mañana y en la noche, por tres días consecutivos.
Anquilostomiasis	*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*	100 mg dos veces al día por 3 días consecutivos.
Enterobiasis	*Enterobius vermicularis*	100 mg una sola vez; repetir el tratamiento después de 30 días.
Tricocefalosis	*Trichuris trichiura*	400 mg/día por 3 días continuos.
Teniasis	*Taenia solium* y *Taenia saginata*	200 mg dos veces al día, por tres días consecutivos.
Estrongiloidiasis	*Strongyloides stercoralis*	200 mg dos veces al día, por tres días consecutivos.
Giardiasis	Giardia lamblia	500 mg cada 12 h por la mañana y por la noche, durante 3 días consecutivos.

Dosis en pacientes especiales (Instituto nacional de higiene: Rafael Rangel, s.f):

- Insuficiencia renal: No se ha descrito la necesidad de ajustar la dosis.
- Insuficiencia hepática: No se ha descrito la necesidad de ajustar la dosis.
- Ancianos (> 65 años): No se ha descrito la necesidad de ajustar la dosificación.

2.2.4. Estrategias para mejorar la solubilidad de Mbz.

Al igual que para Abz, se han buscado estrategias que permitan mejorar las propiedades fisicoquímicas de Mbz como son la síntesis de nuevos análogos con mayor solubilidad (Xu y cols., 2019), la formulación de nanopartículas (Graves y cols., 2015; Buchter y cols., 2020), la formación de nano y micro emulsiones (Sumimoto y cols., 2022), la formación de complejos de inclusión de β-ciclodextrina (Buchter y cols., 2020), la formación de microcristales (Buchter y cols., 2020); la preparación de suspensiones con aceites (Mingjie y cols., 2002; Xiao y cols., 2002; Liu y cols., 2012; Liu y cols., 2014), la preparación de dispersiones sólidas con polietilenglicol (Chiba y cols., 1991). Sin embargo, estas investigaciones para formulaciones de Mbz no se han traducido en aplicaciones clínicas.

Xu y colaboradores (2019) sintetizaron derivados de Mbz, en los cuales se incluyó un grupo epoxi con la finalidad de modificar su solubilidad, y determinaron los efectos *in vitro* de los derivados de Mbz a diferentes concentraciones sobre los protoescólices y metacestodos de *Echinococcus multilocularis,* resultando que la solubilidad de los dos derivados mejoró en comparación con el Mbz. La mortalidad de protoescólices *in vitro* alcanzó el 70-80%, y mostró mayor actividad antiparasitaria que Mbz. Sus

resultados demuestran que la introducción de un grupo epoxi no solo mejoró la solubilidad del Mbz, sino que también aumentó su efecto antiparasitario sobre *Echinococcus multilocularis.*

Del mismo modo Navarrete y colaboradores (2003) sintetizaron una serie de análogos de Mbz y evaluaron su actividad antiprotozoaria *in vitro* contra *G. lamblia* y *T. vaginalis*, así como en los helmintos *Trichinella espiralis* y *Caenorhabditis elegans.* Los resultados que obtuvieron indican que al menos dos análogos de Mbz son tan activos como agentes antiprotozoarios como el Mtz contra *G. lamblia*; sin embargo, ninguno de los análogos de Mbz mostró actividad contra *T. vaginalis*, mientras que la actividad antihelmíntica presentada por estos compuestos fue pobre.

Sumimoto y colaboradores en 2022, prepararon sistemas de administración de fármacos autonanoemulsionante (SNEDDS) con sales de ácidos sulfónicos de Mbz (ácido etanosulfónico (ESA), ácido *p*-toluenosulfónico (TSA), ácido 2-naftalenosulfónico (NSA) y ácido (+)-10-canforsulfónico (CSA)) y evaluaron su aplicabilidad para determinar si la absorción oral del fármaco mejora con la formulación SNEDDS, determinando que el CSA, el NSA y el TSA mejoran en gran medida la solubilidad de Mbz en el vehículo SNEDDS; así mismo, en el estudio de administración oral *in vivo* en un modelo murino, las preparaciones de SNEDDS para las tres sales de Mbz mejoraron significativamente la absorción de Mbz en comparación con el polvo cristalino de Mbz.

Buchter y colaboradores (2020), desarrollaron diferentes formulaciones con Mbz: complejos de inclusión de β-ciclodextrina, microcristales (CH) a base de quitosano y nanopartículas a base de alcohol polivinílico y polisorbato 80 ([P80]), y determinaron que su perfil de solubilidad *in vitro* fue mejorado; además, todas las formulaciones probadas mostraron un nivel de disolución más alto y rápido. Se probó la actividad *in vitro* e *in vivo* contra el anquilostoma *Heligmosomoides polygyrus,* las formulaciones mejoradas de Mbz tuvieron un mejor desempeño que el Mbz solo. MBZ-CH mostró una actividad *in vivo* significativamente mayor con una Dosis Efectiva 50 (DE_{50}) de 8.02 mg/kg frente a una DE_{50} de 203 mg/kg para Mbz.

Liu y colaboradores (2014) prepararon una suspensión oleosa de Mbz (MBZ- OS: Mbz con ácido oleico, aceite de soja y trioleato de glicerol) y se administró por vía oral a ratones infectados con quistes de *Echinococcus gruanulosus;* la administración de MBZ-OS dio como resultado que el peso de los quistes se reduce hasta un 80%, siendo significativamente mejores que los grupos con Mbz solo. La mejor eficacia del tratamiento con MBZ-OS se relacionó con la mayor concentración del fármaco en el plasma, los tejidos y los parásitos. Así mismo, el examen histopatológico demostró que no se presentaron modificaciones en el hígado tras la administración de MBZ-OS en comparación con el control no tratado.

2.3 Sales farmacéuticas

La formación de sales de fármacos es una estrategia que se ha empleado para modificar algunas propiedades biofarmacéuticas de los fármacos, y ha sido la primera opción para mejorar la solubilidad / disolución acuosa, la estabilidad, la calidad o pureza física, o simplemente para optimizar el proceso

de producción, reducir la toxicidad, alterar la absorción en el tracto gastrointestinal, o mejorar las propiedades organolépticas.

Para la formación de sales farmacéuticas es un requisito la presencia de grupos funcionales ácidos o básicos (Gupta y cols., 2018). Banerjee y cols., (2015) definen a una sal, como un sistema multicomponente donde los protones son transferidos de un ácido a una base en un estado iónico. El compendio de terminología química (IUPAC Gold Book, 2006) define a una sal como un compuesto químico formado por un conjunto de cationes y aniones. Básicamente las sales farmacéuticas están compuestas por el ingrediente farmacéutico activo (IFA) y un contraión.

La selección de sales comienza con la caracterización de grupos funcionales ácidos o básicos en los IFA, dependiendo de la presencia de estos grupos y de las necesidades farmacéuticas, se puede seleccionar un contraión potencial (Gupta y cols., 2018).

La mayoría de los IFA descubiertos son candidatos adecuados para la formación de sales debido a que son de naturaleza débilmente ácida o básica. Las sales farmacéuticas tienen una trayectoria de crecimiento continuo desde que se aprobó de la primera forma de sal en 1939 (Bharate, 2021). En la actualidad aproximadamente el 43% de los fármacos que son comercializados se presentan en forma de sal, lo cual indica la importancia de esta forma sólida (Serajuddin 2007; Ortiz y Balderrabano, 2017; Pindelska y cols., 2017; He y cols., 2018).

Existen diversas razones por las cuales las sales farmacéuticas tienen un lugar privilegiado dentro de las distintas formas sólidas, por ejemplo (Ortiz y Balderrabano, 2017):

- La estructura química del IFA no es alterada
- El efecto terapéutico es el mismo que el fármaco neutro
- Relativa facilidad para formar las sales
- Mayor solubilidad en soluciones acuosas en comparación con sus respectivas especies neutras
- Las interacciones iónicas en la red cristalina incrementan la afinidad por el agua teniendo repercusión en la humectabilidad

Como se mencionó con anterioridad para que un IFA sea un candidato para formar sales orgánicas debe presentar grupos funcionales de carácter ácido o base débil que puedan ser ionizados. Respecto a los grupos funcionales ácidos encontramos a los ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, sulfonamidas y fenoles. Por otra parte, los grupos básicos pueden ser aminas (alifáticas, cíclicas), aminopiridinas, aminas aromáticas, etcétera (Ortiz y Balderrabano, 2017).

Actualmente, se encuentra disponible una amplia gama de contraiones validados (ácidos inorgánicos, ácidos sulfónicos, ácidos carboxílicos, aminoácidos, hidroxiácidos, ácidos grasos, aminas orgánicas, sales insolubles, cationes metálicos y aminoácidos catiónicos) para preparar las sales de IFA (Tabla 11); sin embargo, en el pasado el contraión cloro era el más común para resolver todas las

problemáticas relacionadas con los IFA´s (Ortiz y Balderrabano, 2017; Gupta y cols., 2018). Un criterio importante en la selección de contraiones es emplear agentes que se hayan utilizado previamente en medicamentos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) y, por lo tanto, generalmente se reconozcan como seguros (GRAS). A pesar de que se pueden hacer predicciones con cierto grado de precisión, no existe una forma confiable de investigar las propiedades de la sal en función del contraión utilizado (Gupta y cols., 2018).

Un punto importante para considerar es la toxicidad del contraión seleccionado en este sentido, Pfankuch y colaboradores en 2002 clasificaron a los contraiones en tres categorías según su toxicidad (Pfankuch y cols., 2002; Saal y Becker, 2013; Ortiz y Balderrabano, 2017):

- Primera clase: Son aquellos que se encuentran en el organismo humano como metabolitos en los procesos bioquímicos incluyendo clorhidratos y sales sódicas. Su uso no tiene restricciones.
- Segunda clase: Son aquellos contraiones que no se encuentran naturalmente, pero tienen baja toxicidad y no exponen problemas de tolerabilidad. Por ejemplo, las sales de los ácidos sulfónicos.
- Tercera clase: Esta clase de formadores de sales son utilizados en circunstancias especiales para resolver un problema en particular. Por ejemplo, en el uso de cloroteofilina.

Tabla 11. Contraiones utilizados para la formación de sales farmacéuticas (Gupta y cols., 2018).

Tipo de ion	Ejemplos de contraiones	
Cationes	Aluminio	Lisina
	Arginina	Magnesio
	Benzatina	Histidina
	Calcio	Litio
	Cloroprocaína	Meglumina
	Colina	Potasio
	Dietanolamina	Procaína
	Etanolamina	Trietilamina
	Etilendiamina	Zinc
Aniones	Acetato	Hexanoato
	Aspartato	Hidroxinaftoato
	Bencenosulfonato	Yoduro
	Benzoato	Lactato
	Besilato	Lactobionato
	Bicarbonato	Malato
	Bitartrato	Maleato
	Bromuro	Mandelato
	Camsilato	Mesilato
	Carbonato	Metilsulfato
	Cloruro	Mucato
	Citrato	Napsilato
	Decanoato	Nitrato
	Edetato	Octanoato
	Esilato	Oleato
	Fumarato	Pamoato
	Gluceptato	Pantotenato
	Gluconato	Poligalacturonato
	Glutamato	Salicilato
	Glicolato	Succionato

2.3.1. Sales de albendazol y mebendazol

Como se mencionó previamente Abz y Mbz pertenecen al SCB II y IV respectivamente (Ding y cols., 2023). Debido a que presentan grupos ionizables de tipo base débil en el anillo de imidazol, son buenos candidatos para la formación de sales farmacéuticas; en este contexto en la literatura se han reportado

la formación de sales de Abz y Mbz, utilizando una gran variedad de contraiones; ácido bencensulfónico, ácido metansulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido oxálico (Bolla y Nangia, 2018; De Paula y cols., 2013), ácido clorhídrico (Bongioanni y cols., 2019), ácido bromhídrico, ácido nítrico (Paulo de S y cols., 2021), ácido succínico, ácido tartárico, ácido benzoico y ácido cítrico (Patel y cols., 2022).

Dentro de los reportes sobre la formación de sales de Abz y Mbz, destacan aquellos que han evaluado su impacto en las propiedades fisicoquímicas y, en algunos casos, en la actividad biológica de los compuestos originales.

Yan y colaboradores (2024) reportaron la preparación caracterización de sales de Abz con ácido fumárico, ácido D- tartárico y ácido clorhídrico, adicionalmente se evaluó la solubilidad, la velocidad de disolución intrínseca bajo diferentes condiciones de pH y realizaron estudios de estabilidad. Además, evaluaron el rendimiento farmacocinético *in vivo* de las sales de Abz. Como resultado obtuvieron que las tres sales mejoraron significativamente la solubilidad y la velocidad de disolución de Abz, siendo la sal de Abz-HCl quien obtuvo un rendimiento óptimo. Las sales mostraron estabilidad física (irradiación de luz intensa, alta humedad, temperaturas elevadas y condiciones de prueba aceleradas). Respecto a el análisis farmacocinético *in vivo* se demostró que la sal de Abz condujo a un aumento sustancial en el AUC (0-24) y Cmax en comparación con ABZ. Este aumento en la solubilidad en solventes acuosos significa que la sal de ABZ exhibe características que pueden mejorar la biodisponibilidad oral y la farmacocinética. Estos hallazgos ofrecen soluciones potenciales para el desarrollo de formulaciones de fármacos más efectivas e innovadoras.

Recientemente se ha reportado la formación y posterior formulación de una sal de Abz con ácido clorhídrico e hidroxipropil metilcelulosa, con la finalidad de determinar si la disolución y biodisponibilidad mejoraba tras la formación de esta nueva formulación, como resultado determinaron que la nueva formulación mostró una biodisponibilidad oral aproximadamente 3 veces mayor en comparación con la de Abz comercial (Hu y cols., 2019). Bongioanni y colaboradores (2019), obtuvieron una sal farmacéutica soluble; clorhidrato de Abz, que caracterizaron mediante diferentes técnicas espectroscópicas, sus estudios revelaron que el hábito cristalino del clorhidrato de Abz es diferente del de las formas sólidas de Abz reportadas anteriormente. Patel y colaboradores (2022) prepararon y caracterizaron sales de Abz utilizando diversos ácidos orgánicos débiles ácido succínico, ácido tartárico, ácido benzoico y ácido cítrico como contraiones y determinaron que las sales preparadas mejoraron con éxito la solubilidad de saturación y las propiedades de disolución del Abz.

Brusau y colaboradores (2008) reportaron la obtención de una sal estable de Mbz con HCl (clorhidrato de Mbz), realizaron la caracterización fisicoquímica.

Wu y colaboradores (2018) prepararon sales de diversos IFA (furosemida, nitrofurantoína, cimetidina y Mbz), eligieron como contra iones aminoácidos (L-arginina y L-citrulina), con la finalidad de determinar la estabilidad de la fase amorfa y la solubilidad de las sales, resultando mayor solubilidad, mayor velocidad de disolución y mayor estabilidad física comparada con las mezclas físicas.

Las sales de Abz y Mbz con ácidos sulfónicos han sido objeto de interés debido a su impacto en la solubilidad y biodisponibilidad de estos fármacos. Entre los reportes más relevantes destacan:

Paulekuhn y colaboradores (2013) quienes informaron sobre la obtención y el análisis fisicoquímico de cuatro sales de Abz: sulfato, clorhidrato, mesilato (ácido metansulfónico) y tosilato (con ácido *p*-toluensulfónico). Realizaron pruebas de disolución para cada una de las sales preparadas en diferentes medios; agua pura, donde todas las formas analizadas mostraron una baja solubilidad, destacando la base libre de Abz, que presentó la menor solubilidad, con una disolución de menos del 0.5% de la dosis (200 mg) utilizada en el experimento. Respecto a las sales, los porcentajes de disolución fueron: 2.2% para el tosilato, 3.0% para el mesilato, 2.7% para el sulfato y 6.1% para el hidrocloruro. En la disolución en tampón de acetato a pH 4,5, todas las ventas muestran una disolución notablemente superior a la base libre, logrando el mejor resultado con el mesilato (3,4%). Finalmente, se analizó la disolución en un medio ácido (HCl pH 1,2), en este análisis las sales mostraron sus mejores características de disolución; el mesilato tuvo una disolución rápida, logrando un 93% disuelto en tan solo 5 minutos y una disolución total en 2 horas. La segunda sal más efectiva fue la de sulfato, que mostró una rápida liberación inicial del 66% en los primeros 5 minutos y alcanzó una disolución casi total del 96% después de 2 horas. En comparación con las sales de mesilato y sulfato, la sal de tosilato presentó una liberación inicial más pausada, pero alcanzó un 91% de disolución en 2 horas. En resumen, reconocieron al mesilato de Abz como una clase de sal con características fisicoquímicas superiores.

Por otro lado, Bolla y Nangia (2018) reportaron la preparación y caracterización fisicoquímica de nuevas sales farmacéuticas de Abz con ácidos sulfónicos (ácido bencensulfónico y ácido *p*-toluensulfónico) y ácidos carboxílicos (ácido oxálico, ácido 2,6-dihidroxibenzoico, ácido 4,6-trihidroxibenzoico, ácido maleico y ácido l-tartárico).

De Paula y colaboradores (2013) sintetizaron y llevaron a cabo la caracterizaron fisicoquímica de la sal mesilato (ácido metansulfónico) de Mbz. Determinaron que el uso de ácido metansulfónico como coformador conduce a una nueva sal de Mbz, capaz de mejorar significativamente la baja solubilidad de Mbz. La estructura cristalina de esta nueva sal, mostro un arreglo bidimensional compuesto por moléculas de Mbz e iones de mesilato, con un desarrollo adicional del empaquetamiento tridimensional mediante enlaces de hidrógeno intermoleculares que involucran moléculas de agua, así como otras interacciones débiles también contribuyen a la estabilización de la fase sólida. A diferencia de otras formas sólidas de Mbz, la sal de mesilato presenta un patrón rico en interacciones intramoleculares, los

estudios térmicos indican que la sal se deshidrata a 50°C y continúa su evolución térmica sin convertirse en ninguna otra forma sólida de MBZ, debido a la alta estabilidad del grupo mesilato ante el calentamiento. Finalmente, los experimentos de solubilidad a pH 1 demostraron que la sal presenta un desempeño significativamente mejor que los polimorfos A y C de Mbz.

En general la formación de sales de Abz o Mbz con ácidos sulfónicos ha demostrado aumentar significativamente la solubilidad de Abz y Mbz en comparación con sus formas polimórficas originales, lo que puede influir en su eficacia terapéutica (De Paula y cols.,2013). Así mismo, presentan estructuras cristalinas únicas, y características fisicoquímicas particulares. En comparación con otras sales se ha observado que los sulfonatos de Abz y Mbz superan en solubilidad a otras sales previamente reportadas, lo que podría abrir nuevas posibilidades en formulaciones farmacéuticas destinadas a mejorar la absorción de estos compuestos.

En la literatura científica, la información sobre la evaluación biológica y el perfil farmacocinético tras la formación de sales farmacéuticas es limitada, especialmente en el caso de aquellas obtenidas a partir de Abz y Mbz. La mayoría de los estudios se centran en la caracterización y el análisis de sus propiedades fisicoquímicas, lo que podría deberse a que la salificación no altera la estructura química del ingrediente farmacéutico activo (IFA) ni su actividad biológica (Ortiz y Balderrabano, 2017); en consecuencia, el efecto terapéutico no se vería modificado.

Sin embargo, algunos estudios han reportado modificaciones en la actividad biológica de ciertas sales farmacéuticas, particularmente en su actividad antimicrobiana, cuando se obtienen a partir de antibióticos. Estas diferencias han sido comparadas con los fármacos originales (Mesallati et al., 2019; Santos et al., 2020; Ferraz et al., 2020).

Santos y colaboradores (2020) prepararon doce sales orgánicas de ciprofloxacina y norfloxacina utilizando como contraiones colina, 1-etil-3-metilimidazolio, 1-hidroxi-etil-3-metilimidazolio, 1-(2-hidroxietil)-2,3-dimetilimidazolio, 1-(2-metoxietil)-3-metilimidazolio y cetilpiridinio, determinaron que se mejoró la solubilidad y la biodisponibilidad. Estas ventajas se suman a la posibilidad de modular su espectro antimicrobiano *in vitro* sobre *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* ya que obtuvieron valores de CI_{50} más bajos a los obtenidos por los fármacos originales, además de mantener una baja toxicidad hacia las células sanas (fibroblastos de ratón 3T3).

Ferraz y colaboradores (2020) prepararon y caracterizaron sales orgánicas de penicilina G y amoxicilina con -etil-3-metilimidazolio, 1-hidroxi-etil-3-metilimidazolio, (2-hidroxietil) trimetilamonio, tetraetilamonio, cetilpiridinio y trihexiltetradecilfosfonio como contraiones, y evaluaron su actividad antibacteriana *in vitro* contra cepas sensibles y resistentes de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Como resultado se observó una disminución en los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las sales

preparadas en comparación con los fármacos neutros. Los resultados *in vitro* mostraron que una simple transformación de antibióticos estándar en sales orgánicas hidrolizadas puede cambiar drásticamente la actividad farmacéutica de un fármaco, incluida la creación de potentes formulaciones de antibióticos contra cepas de bacterias resistentes a los antibacterianos actuales.

Flores-Pacheco y colaboradores (2018) prepararon, caracterizaron y evaluaron el efecto antibacteriano de la sal tosilato (ácido *p*-toluensulfónico) de dapsona, empleando como modelo biológico *Mycobacterium fortuitum*, determinaron el efecto antibacteriano y como resultado tosilato de dapsona presento un efecto antibacteriano superior con una concentración inhibitoria media (CI_{50}) de 3.34 µM, en comparación del fármaco control empleado dapsona con una CI_{50} de 23 µM.

Hibbard y colaboradores (2023) prepararon y caracterizaron cuatro sales de ciprofloxacino con ácidos carboxílicos (ácido succínico, ácido glutárico, ácido adípico y ácido pimélico) y determinaron su actividad antibacteriana *in vitro* contra una cepa de *Escherichia coli*, sus resultados arrojaron que los valores de CMI de las sales fueron equivalentes a los de ciprofloxacino solo, lo que confirmó que en este caso, el cambio de propiedades fisicoquímicas y la selección de los contraiones no alteró la actividad antimicrobiana.

Hamdan y colaboradores (2020) prepararon siete nuevas sales orgánicas binarias y ternarias de ciprofloxacina (CP-HCl) con ácido benzoico (BA), ácido acetilsalicílico (ASA), ácido *p*-cumárico (PCMA) y ácido *p*-aminosalicílico (PASA). Se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas y calorimetría diferencial de barrido, se midieron los valores de solubilidad y coeficientes de partición y se determinó la actividad antimicrobiana de las sales orgánicas contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* dando como resultado que la mayoría de las nuevas sales tenían mayor actividad antimicrobiana que CP contra ambas cepas. Los compuestos más activos contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* fueron CP-PASA y CP-PCMA, respectivamente, que es hasta catorce veces más potentes que el CP-HCl original.

Respecto al efecto biológico de las sales de antiparasitarios se encuentra lo descrito por Vural y colaboradores (2020) quienes reportaron la eficacia, expresada como una disminución del peso de la masa del quiste equinocócico, en un modelo murino de infección por *Echinococcus granulosus*. Como resultado determinaron que las sales presentaban una mayor solubilidad en agua, una biodisponibilidad plasmática mejorada y, por consiguiente, una mayor actividad antihelmíntica. Además, esta biodisponibilidad mejorada ayudaria a disminuir las reacciones adversas de los fármacos bencimidazolicos (en concreto, hepatotoxicidad, alopecia, trastornos gastrointestinales, trombocitopenia y leucopenia grave), al reducir la dosis de las formulaciones.

Por consiguiente, este proyecto de investigación tiene como objetivo realizar la evaluación *in vitro* del efecto antiparasitario de nuevas sales de Abz y Mbz empleando como modelo de evaluación protozoarios de interés clínico.

3.0 Justificación.

Abz y Mbz son fármacos empleados como segunda elección para el tratamiento de infecciones causadas por protozoarios; sin embargo, debido al aumento en los fracasos terapéuticos con los medicamentos de primera elección, el uso de estos benzimidazoles para el tratamiento de diversas parasitosis va en aumento. No obstante, ambos fármacos presentan una baja solubilidad acuosa, por lo que se han buscado alternativas para solucionar este problema. En este contexto la formación de sales es una estrategia que ha sido empleada para mejorar la solubilidad acuosa de diversos IFAs. Recientemente se han comenzado a utilizar diferentes contraiones para la formación de sales farmacéuticas, cada una de ellas con características particulares en función de su baja toxicidad y su mejora en la solubilidad acuosa, existiendo una diversidad de ácidos y bases orgánicas como formadores salinos. En la literatura se presentan reportes del efecto antimicrobiano *in vitro* de nuevas sales farmacéuticas, en los cuales el efecto farmacológico de la sal es mayor al del fármaco neutro. El propósito de este proyecto es la determinación del efecto biológico de los sulfonatos de Abz y Mbz sobre protozoarios de interés clínico como *G. lamblia*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*, así como su citotoxicidad *in vitro* sobre células sanas de riñón, con la finalidad de determinar si el efecto biológico se ve modificado tras la exposición a estos sulfonatos, contribuyendo en la búsqueda de mejores candidatos para el tratamiento de las infecciones parasitarias mencionadas.

4.0 Hipótesis

Los sulfonatos de Abz y Mbz conservarán o incrementarán su actividad antiparasitaria *in vitro* contra protozoarios de interés clínico como son *G. lamblia*, *E. histolytica y T. vaginalis,* en función del tamaño del anión sulfonato, utilizando los ácidos bencensulfónico, metansulfónico y *p*- toluensulfónico como formadores de sales. Y la citotoxicidad de los sulfonatos de Abz y Mbz debe ser comparable a la de los fármacos neutros para garantizar que las sales son una buena elección para el potencial tratamiento de las infecciones parasitarias.

5.0 Objetivo general

Evaluar los efectos antiparasitarios y citotóxicos *in vitro* de los sulfonatos de Abz y Mbz, sobre los modelos biológicos: trofozoítos de *G. lamblia*, *E. histolytica* y *T. vaginalis,* así como la línea celular *VERO;* para la determinación preliminar de la eficacia y la seguridad de las sales.

6.0 Objetivos específicos

1. Aislar y obtener un cultivo axénico de *T. vaginalis* a partir de una muestra clínica de orina.

2. Acondicionar el cultivo de los trofozoítos provenientes aislados clínicos de *E. histolytica* y *G. lamblia.*

3. Obtener la cinética de crecimiento de trofozoítos de *E. histolytica*, *G. lamblia* y *Tricomonas vaginalis* en condiciones axénicas, y determinar la fase de crecimiento logarítmico y el tiempo adecuado para subcultivos.

4. Evaluar la actividad antiparasitaria de los seis sulfonatos de Abz y Mbz sobre trofozoítos de *G. lamblia*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*, utilizando los fármacos neutros Abz y Mbz, como referencias y Mtz como estándar de actividad antiparasitaria.

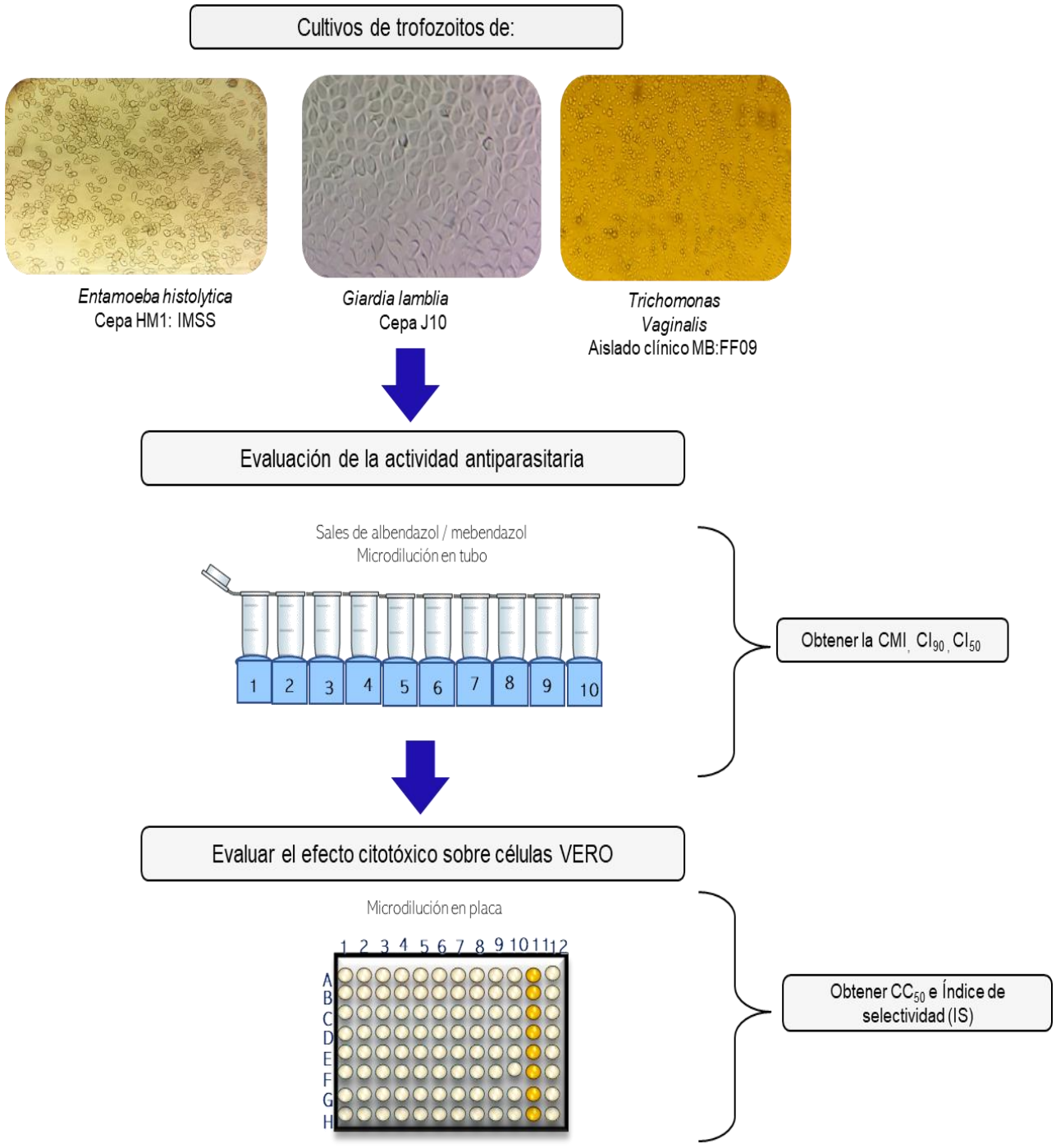
5. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la Concentración Inhibitoria Noventa (CI_{90}) y la Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) de los seis sulfonatos de Abz y Mbz sobre trofozoítos de *G. lamblia*, *E. histolytica* y *T. vaginalis* mediante curvas concentración-respuesta.

6. Evaluar el efecto citotóxico de las sales de Abz y Mbz en la línea celular VERO para establecer la Concentración Citotóxica Media (CC_{50}) y el Índice de Selectividad (IS) para determinar afinidad de las sales por los protozoarios.

7. Comparar y discutir el efecto antiparasitario de los sulfonatos de Abz y Mbz con respecto a el fármaco de referencia (Abz, Mbz y Mtz), para establecer la potencia relativa en función de los sulfonatos de bencimidazol.

7.0 Metodología

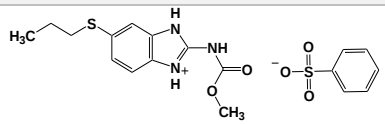
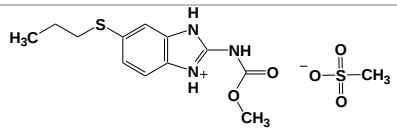
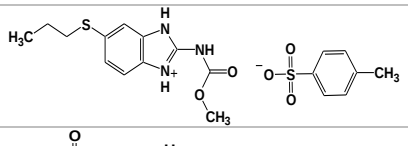
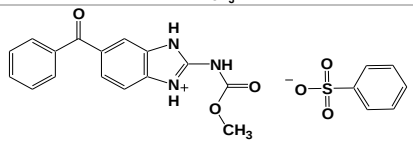
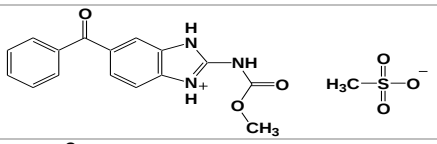
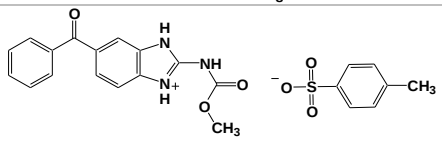
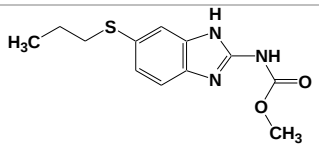
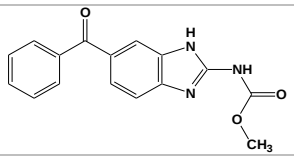
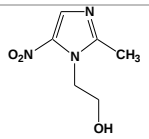
Figura 13. Diagrama general de trabajo.



7.1 Sales de Abz y Mbz

Las sales de sulfonato de Abz y Mbz evaluadas en el presente proyecto fueron obtenidas y caracterizadas por la estudiante Ma. Del Carmen Gonzalez Gonzaga como parte de sus cursos de laboratorio integrativo del ciclo de especialización II del ciclo escolar 2019- 2020, bajo la supervisión del Dr. Jesús Rivera Islas, en el laboratorio número 4 de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (Tabla 12) (Anexo 1).

Tabla 12. Sales de Abz y Mbz.

Fármaco y ácido	Estructura de la sal	Peso molecular (g/mol)
Abz + ácido bencensulfónico **(A1).**		423.51
Abz + ácido metansulfónico **(A2).**		361.44
Abz + ácido p-toluensulfónico **(A3).**		437.54
Mbz + ácido bencensulfónico **(M1).**		453.47
Mbz + ácido metansulfónico **(M2).**		391.40
Mbz + ácido p-toluensulfónico **(M3).**		467.50
Abendazol (Abz)		265.33
Mebendazol **(Mbz)**		295.26
Metronidazol **(Mtz)**		171.06

7.1.1 Soluciones stock

Se prepararon soluciones stock de las sales A1, A2, A3, M1, M2, M3, Abz, Mbz y Mtz de 2 mg/mL, disueltos en Dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.1% y medio de cultivo fresco. Las soluciones se almacenaron a -20 °C para su uso posterior.

7.2 Material biológico

Los protozoarios que serán utilizados como modelo de evaluación en este proyecto son:

- *E. histolytica* cepa HMI: IMSS*:* Donada por la Dra. María Esther Ramírez Moreno, de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional.
- *G. lamblia* cepa J10: Donada por la Dra. Martha Ponce Macotela, del Laboratorio de Parasitología Experimental, del Instituto Nacional de Pediatría.
- *T. vaginalis* MB: FF09, aislado clínico obtenido en el presente proyecto.
- Células VERO: donada por el Dr. Moisés León Juárez, del Instituto Nacional de Perinatología Unidad 1.

7.3 Aislamiento y axenización *T. vaginalis*

El aislamiento de *T. vaginalis* se realizó a partir de una muestra de orina de una paciente femenina. Al inicio, se determinó la presencia de *T. vaginalis* en la muestra, mediante un examen en fresco para el cual se tomó una gota de orina y fue colocada en un portaobjetos para ser visualizada en un microscopio óptico con un objetivo de 40X. Posteriormente se centrifugo la muestra de orina a 2 000 rpm durante 5 min, el precipitado obtenido se depositó en dos tubos de vidrio que contenían medio de Diamond (Tabla 13) modificado con un pH 7.0 suplementado con suero de bovino adulto al 15%, con la finalidad de eliminar la microbiota acompañante se adicionaron 1000 µL de ciprofloxacino (1 000 µg/mL) y 1000 µL de fluconazol (500 µg/mL). Los tubos fueron incubados a 37 ºC durante 8 h, y por segunda ocasión se adicionaron a cada tubo 1000 µL de ciprofloxacino y 1000 µL de fluconazol y nuevamente se incubaron a 37 °C durante 18 h. Transcurrido el tiempo de incubación se observaron los tubos en el microscopio invertido (VELAB MICROSCOPES VE 403) para determinar por microscopia óptica la presencia de trofozoítos de *T. vaginalis*. Para determinar la ausencia o presencia de bacterias y hongos, se tomaron muestras de 100 µL de cada tubo y colocadas en cajas de agar soya tripticaseina y agar Dextrosa Sabouraud, estas se incubaron a 37 °C por 24 h. Una vez identificados los trofozoítos, se centrifugó el medio de los tubos a 2000 rpm durante 5 min y el sedimento obtenido fue dividido en 4 tubos que contenían medio de cultivo y antimicrobianos; ciprofloxacino (1 000 µg/mL) y 1000 µL de fluconazol (500 µg/mL), y nuevamente incubados. Cada 24 h se repitió este procedimiento, hasta obtener un cultivo axénico. Una vez obtenido el cultivo axénico, se realizó la prueba de hidróxido de potasio (KOH) para *T. vaginalis*, la cual consistió en tomar una muestra del

cultivo que contenía los trofozoítos con un hisopo estéril, que fue sumergido en 1 ml de KOH al 10%; con esto se alcaliniza el medio, resultando en la liberación de aminas y ácidos grasos, potenciando la reacción fétida, valorado como prueba positiva para la presencia de este protozoario (Zaki y cols., 2010). Finalmente se nombró a la cepa de aislado clínico como *T. vaginalis* MB: FF09.

7.4 Condiciones de cultivo

7.4.1 *T. vaginalis*

Se utilizaron cultivos de trofozoítos de *T. vaginalis* MB: FF09, y se cultivaron axénicamente en tubos de taparrosca de baquelita con medio de Diamond modificado (Tabla 11), ajustado a un pH de 7.0 y suplementado con suero de bovino adulto (Microlab, S.A. de C.V) al 5% (v/v) (Rodríguez García, 2014). Se determinó la densidad celular (número de trofozoítos por mililitro) y el porcentaje de viabilidad de los cultivos empleando el colorante de exclusión azul de tripano (In Vitro, S.A.), mediante el uso de cámara de Neubauer (MARIENFELD GERMANY) (Domínguez, 2015), empleando las siguientes ecuaciones:

$$\%\ \text{viabilidad} = \frac{\text{No. total de células vivas}}{(\text{No. total de células vivas} + \text{No. total de células muertas})} \times 100$$

$$\frac{\text{Trofozoítos}}{\text{mL}} = \frac{\text{No. total de trofozoítos}}{4} \times 2 \times 10\,000$$

Este método se basa en que las células viables (vivas) no captan el colorante azul de tripano, mientras que las células no viables (muertas) si lo hacen. Se cuentan como muertas las células teñidas de azul y como vivas las células refringentes (Freshney, 2000).

Tabla 13. Medio Diamond

Compuesto	Cantidad
Peptona biotriptasa	30 g
Dextrosa anhidra	10 g
NaCl	2.0 g
K_2HPO_4	1.0 g
KH_2PO_4	0.6 g
L-Cisteína	1.0 g
H_2O Desionizada	1000 mL

7.4.2 *G. lamblia*

Se utilizaron cultivos de trofozoítos de *G. lamblia* cepa WB, y se cultivaron axénicamente en tubos de vidrio de taparrosca de baquelita de 13 x 100 mm con 12 mL de medio TYI-S-33 (Tabla 14), ajustado a un pH de 6.8 y suplementado con suero fetal bovino al 10%(v/v) (Microlab, S.A. de C.V), previamente descomplementado (30 min a 56 °C) (Liu y cols., 2018). Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C. Se determinó la densidad celular (número de trofozoítos por mililitro) y el porcentaje de viabilidad de los cultivos empleando el colorante de exclusión azul de tripano (In Vitro, S.A.), mediante el uso de cámara de Neubauer (MARIENFELD GERMANY) (Domínguez, 2015), con las ecuaciones descritas anteriormente.

Tabla 14. Medio TYI-S-33

Compuesto	Cantidad
Peptona biotriptasa	30 g
Dextrosa anhidra	10 g
NaCl	2.0 g
K_2HPO_4	1.0 g
KH_2PO_4	0.6 g
L-Cisteína	1.0 g
Ácido ascórbico	0.2 g
Citrato Férrico amoniacal	0.028 g
Bilis de buey	0.76 g
H_2O Desionizada	1000 mL

7.4.3. *E. histolytica*

Se utilizaron cultivos de trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1: IMSS, y se cultivaron axénicamente en tubos de vidrio de 13 x 100 mm con tapón de rosca de baquelita con 12 mL de medio BI-S-33 (Tabla 15) a un de pH 6.90 suplementado con suero de bovino adulto al 15% (Microlab, S.A. de C.V) previamente descomplementado durante 30 min a 56 °C. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37 °C. Se determinó la densidad celular (número de trofozoítos por mililitro) y el porcentaje de viabilidad de los cultivos empleando el colorante de exclusión azul de tripano (In Vitro, S.A.), mediante el uso de cámara de Neubauer (MARIENFELD GERMANY) (Domínguez, 2015), con las ecuaciones descritas anteriormente.

Tabla 15. Medio BI-S-33	
Compuesto	**Cantidad**
Peptona biotriptasa	30 g
Dextrosa anhidra	10 g
NaCl	2.0 g
K_2HPO_4	1.0 g
KH_2PO_4	0.6 g
L-Cisteína	2.0 g
Ácido ascórbico	0.2 g
Citrato Férrico amoniacal	0.028 g
H_2O Desionizada	1000 mL

7.5 Cinética de crecimiento

Para la cinética de crecimiento se emplearon cultivos que contenían trofozoítos de: *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis,* móviles, refringentes y que presentaran una confluencia mayor al 80%. Se retiró el medio de cultivo de los tubos y se adicionaron 500 µL de Tripsina Verseno (In Vitro, S.A.) y se incubaron durante 10 minutos a 37 °C, con la finalidad de despegar los trofozoítos de las paredes del tubo, posteriormente se determinó la densidad celular y el porcentaje de viabilidad de los cultivos, en cámara de Neubauer con azul de tripano. Se ajustó un inoculo aproximado de $1x10^4$ trofozoítos/mL que se adicionaron a una serie de 14 tubos tipo Eppendorf™ de 1.5 mL de capacidad que contenían 100 µL de medio de Diamond fresco suplementado con suero de bovino adulto al 5%. Posteriormente, se incubaron los tubos a 37°C durante 144 h (7 días) y cada 24 h se escogieron dos tubos de forma aleatoria para determinar la cantidad de trofozoítos/mL y el porcentaje de viabilidad con ayuda del colorante de exclusión azul de tripano (Barrón y cols., 2012; Cuellar Guevara, 2015). A partir de esta información es posible graficar la cinética de crecimiento representativa del cultivo y determinar el tiempo de duplicación y generación bajo las siguientes ecuaciones:

$$K = \frac{\ln A}{Ao} \times T_h$$

$$t_{generación} = \frac{1}{K}$$

$$T_{duplicación} = \ln 2 \times t_{generación}$$

Dónde:

- K es la constante de la velocidad de crecimiento
- A es el número de trofozoítos/mL al tiempo que se alcanzó el máximo rendimiento en la fase logarítmica.
- A_o es el número de trofozoítos/mL al tiempo cero.
- T_h es el tiempo en horas, al cual se alcanzó el máximo de la fase logarítmica.

7.6 Pruebas de susceptibilidad *in vitro*

La evaluación de la actividad antiparasitaria de las sales de Abz y Mbz se realizó mediante la técnica de microdilución en tubo. Se empleo una serie de tubos tipo Eppendorf™ de 1.5 mL de capacidad, en ellos se adicionaron inóculos de: $1x10^4$ trofozoítos de *E. histolytica,* $2x10^4$ trofozoítos de *G. lamblia* y $1x10^4$ trofozoítos de *T. vaginalis* con una viabilidad igual o superior al 90 % y que se encuentren en la mitad de la fase logarítmica. Estos cultivos fueron expuestos durante 48 h con diferentes concentraciones (500 µg/mL- 0.97 µg/mL) de las sales a evaluar a 37 °C. En cada ensayo se incluyó un grupo de referencia utilizando los fármacos Abz y Mbz, un grupo con el estandar Mtz, un grupo control de crecimiento (trofozoítos sin tratamiento), un grupo control con el disolvente empleado (DMSO 0.1%) y un blanco con medio de cultivo. Posterior a la incubación se determinó la actividad antiparasitaria con ayuda del colorante de exclusión azul de tripano y se obtuvo el porcentaje de viabilidad para cada una de las concentraciones evaluadas. Finalmente se determinó mediante curvas concentración-respuesta, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) que es la concentración que inhibió el 100% del crecimiento de los trofozoítos, la Concentración Inhibitoria noventa (CI_{90}) que es la concentración que inhibió el crecimiento del 90 % de los trofozoítos y la Concentración Inhibitoria cincuenta (CI_{50}) que es la concentración que inhibió el crecimiento del 50% de los trofozoítos) (Leitsch, 2017; Rangel- Castañeda y cols., 2018).

7.7 Evaluación *in vitro* del efecto citotóxico

7.7.1 Condiciones de cultivo de células VERO

Para determinar el efecto citotóxico de las sales de Abz y Mbz, se utilizó como modelo de evaluación cultivos de células VERO; las cuales son células epiteliales normales provenientes de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) (Gil y cols.,2008; Ávalos-Soto y cols., 2014).

Las células VERO se cultivaron a 37 °C en medio RPMI 1640 (1X) sin glutamina, sin bicarbonato de sodio (In vitro, S.A de C.V), suplementado con 10% de suero fetal bovino (MICROLAB, S.A de C.V) previamente descomplementado durante 30 min a 56 °C. La viabilidad y el número de células por mililitro se determinó mediante el uso del colorante azul de tripano (In vitro, S.A de C.V) en cámara de Neubauer (Perini y cols., 2020).

7.7.2 Ensayo de citotoxicidad en células VERO

En una placa de 96 pozos, se sembraron $1x10^4$ células/pozo y se incubaron por 24 horas a 37°C, posteriormente las células se trataron con diferentes concentraciones de las sales de Abz y Mbz a evaluar (500 µM - 0.97 µM), incluyendo en cada ensayo un grupo sin tratamiento, un control de disolvente (DMSO 0.1%), un blanco con medio de cultivo y un grupo con cada uno de los fármacos de referencia empleados (Abz, Mbz y Mtz). Las células se incubaron por 48 h a 37 °C. El efecto citotóxico

de las sales evaluadas en las células VERO se determinó empleando la técnica colorimétrica con el reactivo WST–1 (Sigma-Aldrich®) para la cual se determinó la densidad óptica de cada uno de los pozos con un lector de placas (ELx808 BioTek) a 490 nm. El porcentaje de viabilidad de cada una de las concentraciones de evaluadas se determinó en función de las densidades ópticas obtenidas empleando la siguiente formula:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \left[\frac{DO_{problema} - DO_{blanco}}{DO_{control} - DO_{blanco}}\right] \times 100$$

Con la información obtenida se determinó la Concentración Citotóxica Media (CC_{50}) la cual se define como la concentración que disminuye al 50% la viabilidad de la población celular y se determina mediante regresión lineal con el porcentaje de inhibición y el logaritmo de la concentración. Para determinar la especificidad de la actividad antiprotozoaria, se determinó el perfil de citotoxicidad de las sales evaluadas, mediante el cálculo del Índice de Selectividad (IS) empleando la siguiente formula (Duque-Montaño y cols., 2013; Díaz y Ramírez, 2016; Mosquera y cols., 2020).

$$IS = \frac{CC_{50}}{CI_{50}}$$

CC_{50}: Concentración citotóxica media en células VERO

CI_{50}: Concentración inhibitoria media en trofozoítos de *E. histolytica, G. lamblia* y *T. vaginalis*.

7.7.3 Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como media ± desviación estándar (DE). La concentración inhibitoria (CI_{50}, CI_{90} y CMI) de cada sal o compuesto se determinó mediante regresión lineal, y también se calcularon los intervalos de confianza del 95%. La concentración media citotóxica (CC_{50}) se calculó igualmente mediante regresión lineal.

Para la comparación entre múltiples grupos, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba post hoc de Dunnett, considerando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. El análisis se llevó a cabo utilizando el software GraphPad Prism, versión 8.0.2.

8.0 Resultados

En esta sección se presentan los hallazgos obtenidos de las evaluaciones del efecto antiparasitario de las sales de Abz y Mbz sobre trofozoítos de *E. histolytica, G. lamblia y T. vaginalis* bajo la técnica de microdilución en tubo. Así también lo hallazgos obtenidos de las pruebas de citotoxicidad de las sales sobre la línea celular VERO que nos permiten obtener el índice de selectividad, parámetro relevante para estudios en perspectiva de la actividad biológica *in vivo*.

8.1 *T. vaginalis*

8.1.1 Aislamiento y axenización de *T. vaginalis*

Se determinó la presencia de este protozoario en la muestra mediante un examen microscópico, este procedimiento forma parte de una serie de metodologías empleadas para la identificación *T. vaginalis,* en esta técnica se determina la forma y motilidad característica de este protozoario; en la figura 5 se observan los trofozoítos con una forma de tipo periforme y con movimientos ágiles de un lado al otro. Una vez identificados los trofozoítos, se procedió a realizar el cultivo en medio de Diamond modificado, la lectura de los medios se realizó cada 24 h para determinar la presencia de trofozoítos en los tubos (Figura 14), con forme pasaron los días, la cantidad de trofozoítos presentes fue aumentando considerablemente, hasta que se obtuvo un cultivo confluente y libre de bacterias y hongos (Cultivo axénico) (Figura 15 y 16).



Figura 14. Trofozoítos de *T. vaginalis* presentes en muestra de orina.

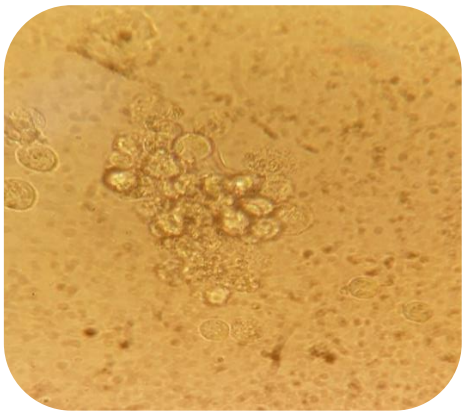


Figura 15. Trofozoítos de *T. vaginalis* en tubo de vidrio con medio de cultivo de Diamond modificado tras 4 días de incubación (37°C).

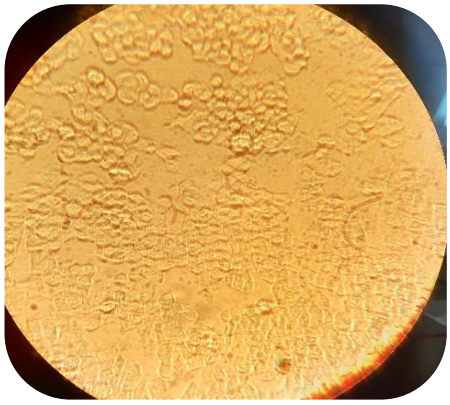
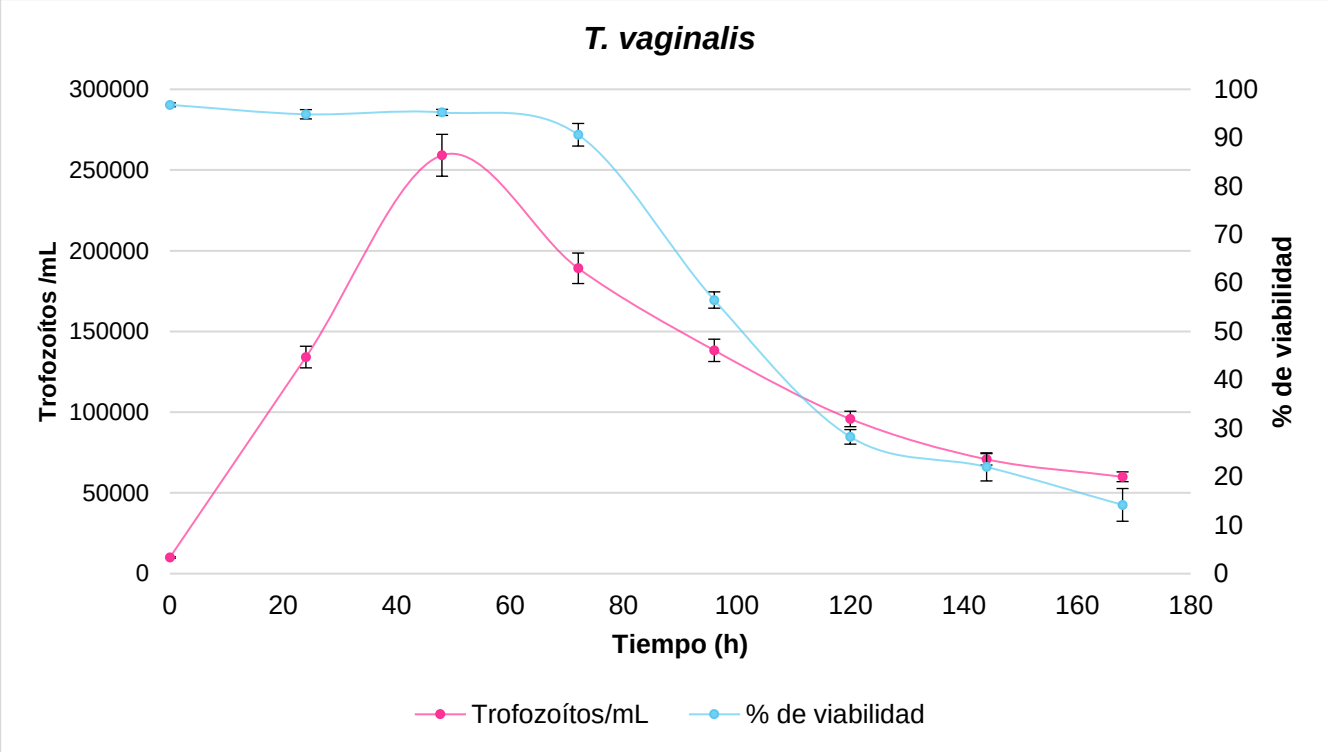


Figura 16 Cultivo axénico de *T. vaginalis* MB:FF09.

8.1.2 Cinética de crecimiento de *T. vaginalis*

Se realizó la cinética de crecimiento de *T. vaginalis* para determinar los días de incubación necesarios para obtener a la cepa en buenas condiciones fisiológicas (Gráfica 1), en ella podemos observar una fase de crecimiento logarítmico desde el inicio, alcanzando un crecimiento máximo a las 48 h con un número total de 259,166 trofozoítos/mL y una viabilidad del 95.2%. A partir de esta cinética se determinó que el tiempo de generación fue de 16 h, mientras que el tiempo de duplicación fue de 11 h y finalmente se determinó la mitad de la fase logarítmica a las 24 h de incubación con un porcentaje de viabilidad del 94.8%. La determinación de estos parámetros sirvió para definir el tamaño de inoculo, así como los días de cultivo necesarios para obtener trofozoítos en la mitad de la fase exponencial y en buenas condiciones fisiológicas para los ensayos posteriores (Grafica 1). Después de 5 días de incubación (120 h) se puede apreciar un porcentaje de viabilidad por debajo del 30 % lo que fue corroborado con corroborado por la tinción azul de las células muertas al emplear el azul de tripano.



Grafica 1. Cinética de crecimiento de *T. vaginalis* MB: FF09 (los resultados son el promedio de 3 ensayos independientes por duplicado, n=6).

8.1.3 Pruebas de susceptibilidad *in vitro* contra *T. vaginalis*

Respecto a las pruebas de susceptibilidad *in vitro* contra *T. vaginalis* MB: FF09, de las sales de Abz y Mbz, así como de los controles positivos de inhibición, los resultados se presentan en la tabla 12 como valores de CMI, CI_{90} y CI_{50}. Las sales A1 y A3 no mostraron inhibición en el crecimiento de *T. vaginalis* a la concentración más alta evaluada; sin embargo, A1 inhibió el crecimiento del 100% de los trofozoítos a una concentración de 1383.35 µM, mientras que el fármaco Abz presentó el mismo efecto sobre los trofozoítos a una concentración de 1884.44 µM, por otro lado, la CI_{50} de la sal A2 fue de 252.18 µM mientras que la de Abz fue de 484.03 µM. Mientras que las sales de Mbz todas ellas mostraron actividad antiprotozoaria contra *T. vaginalis*; sin embargo, la sal M2 fue la que mostró mejor efecto antiparasitario con una CMI de 68.91 µM y una CI_{50} de 25.85 µM, en comparación con el fármaco Mbz quien mostró una CMI y CI_{50} mayores a la de esta sal (Tabla 16).

Tabla 16. Valores de CMI, CI_{90} y CI_{50} de sales sobre trofozoítos de *T. vaginalis.*

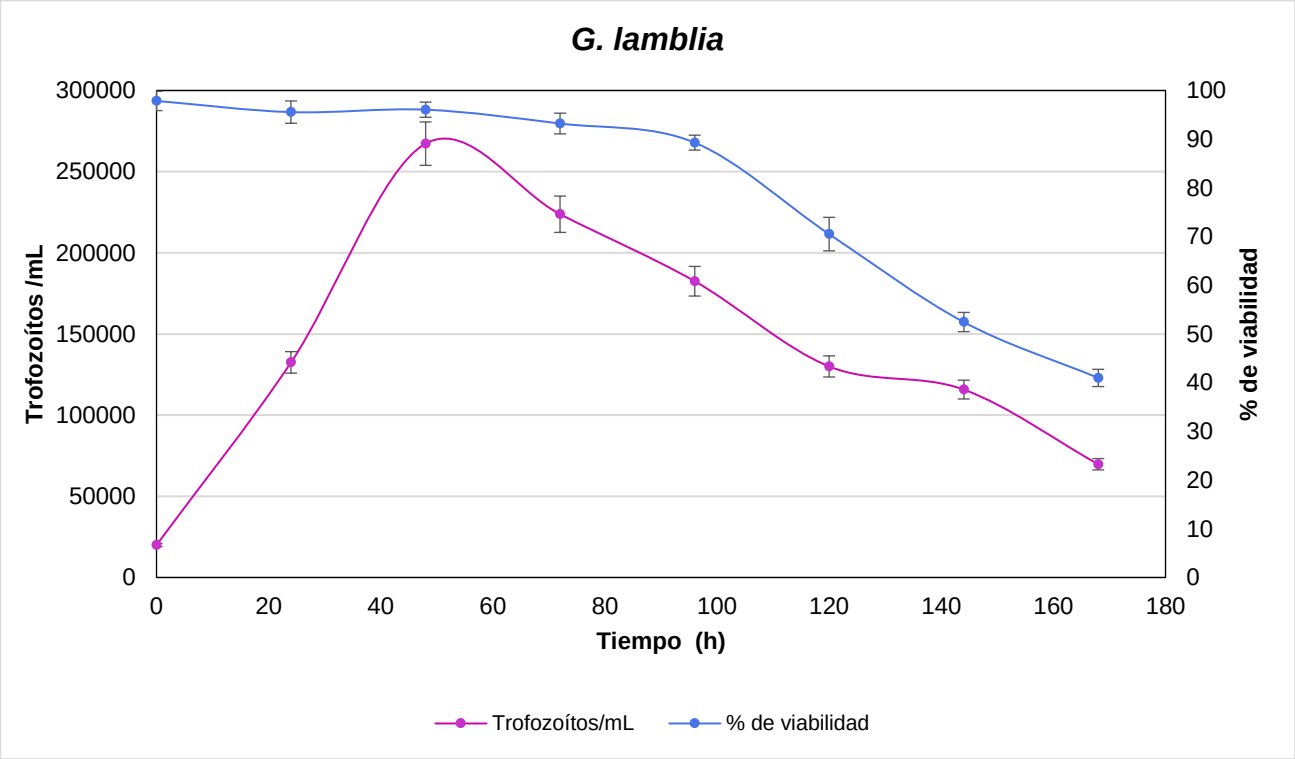
Sal	CMI (µM)	CI_{90} (µM)	CI_{50} (µM)
A1	NE	NE	NE
A2	**1383.35** ± 1.89 [b, d] *(1381.50 - 1385.20)* [a]	**726.46** ± 1.60 [b, d] (724.89 - 728.03) [a]	**125.53** ± 1.80 [b, d] (123.76 - 127.30) [a]
A3	NE	NE	NE
M1	**68.91** ± 1.98 [c, d] *(66.97 -70.85)* [a]	**54.20** ± 0.96 [c, d] (53.25 - 55.15) [a]	**25.85** ± 0.42 [c, d] (24.01 - 24.33) [a]
M2	**159.68** ± 2.17 [c, d] *(157.55 - 161.80)* [a]	**135.80** ± 1.53 [c, d] (134.29 - 137.30) [a]	**49.86** ± 0.80 [c, d] (49.07 - 50.64) [a]
M3	**534.75** ± 1.26 [c, d] *(533.52 - 535.99)* [a]	**416.41** ± 0.78 [c, d] (415.35 - 416.88) [a]	**62.59** ± 1.44 [c, d] (61.18 - 64.01) [a]
Abz	**1884.44** ± 1.76 (1882.72 - 1886.17) [a]	**1247.04** ± 1.65 (1244.93 - 1248.18) [a]	211.71 ± 2.18 (209.57 - 213.85) [a]
Mbz	**211.67** ± 1.28 (210.42 - 212.93) [a]	**172.41** ± 1.86 (170.58 - 174.23) [a]	**36.59** ± 0.69 (35.91- 37.28) [a]
Mtz	**91.31** ± 2.32 (89.03 - 93.58) [a]	**68.10** ± 1.51 (66.62 - 69.59) [a]	**16.16** ± 0.66 (15.50 - 16.81) [a]

Los valores corresponden a la media ± D.E de 4 ensayos independientes por duplicado, NE: no efecto antiparasitario a las concentraciones evaluadas; [a] intervalos de confianza al 95%, *α 0.05*; [b] diferencia estadísticamente significativa entre las sales y el control positivo (Abz) a $p < 0.05$; [c] diferencia estadísticamente significativa entre las sales y el control positivo (Mbz) a $p < 0.05$; [d] diferencia estadísticamente significativa entre las sales y el control positivo (Mtz) a $p < 0.05$; Abz: albendazol; Mbz; mebendazol; Mtz: metronidazol.

8.2 *G. lamblia*

8.2.1 Cinética de crecimiento de *G. lamblia*

En la gráfica 2 se presenta la cinética de crecimiento de *G. lamblia*, en ella se observa un crecimiento máximo a las 48 h con un número total de 267, 250 trofozoítos/mL y una viabilidad del 96%. A partir de esta cinética se determinó el tiempo de generación de la cepa en 33 h, mientras que el tiempo de duplicación fue de 23 h y finalmente se determinó la mitad de la fase logarítmica a las 24 h de incubación con un porcentaje de viabilidad del 95%.



Grafica 2. Cinética de crecimiento de *G. lamblia* J10 (los resultados son el promedio de 3 ensayos independientes por duplicado, n=6).

8.2.2 Pruebas de susceptibilidad *in vitro* contra *G. lamblia*

Se realizaron las pruebas de susceptibilidad *in vitro* contra *G. lamblia* de las sales de Abz y Mbz, así como de los controles de inhibición Abz, Mbz y Mtz. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 15, donde puede observarse que la sal A3 fue la que presentó un mejor efecto antiparasitario *in vitro* con una CI_{50} de 52.58 µM, mientras que la sal M1 no presentó efecto antiparasitario contra *G. lamblia*, mientras que los valores de CI_{50} de M2 y M3 son más bajos a los obtenidos por el control positivo Mbz. Los controles positivos de inhibición Abz, Mbz y Mtz presentaron una CI_{50} de 222.68, 320.07 y 107.95 µM, respectivamente (Tabla17).

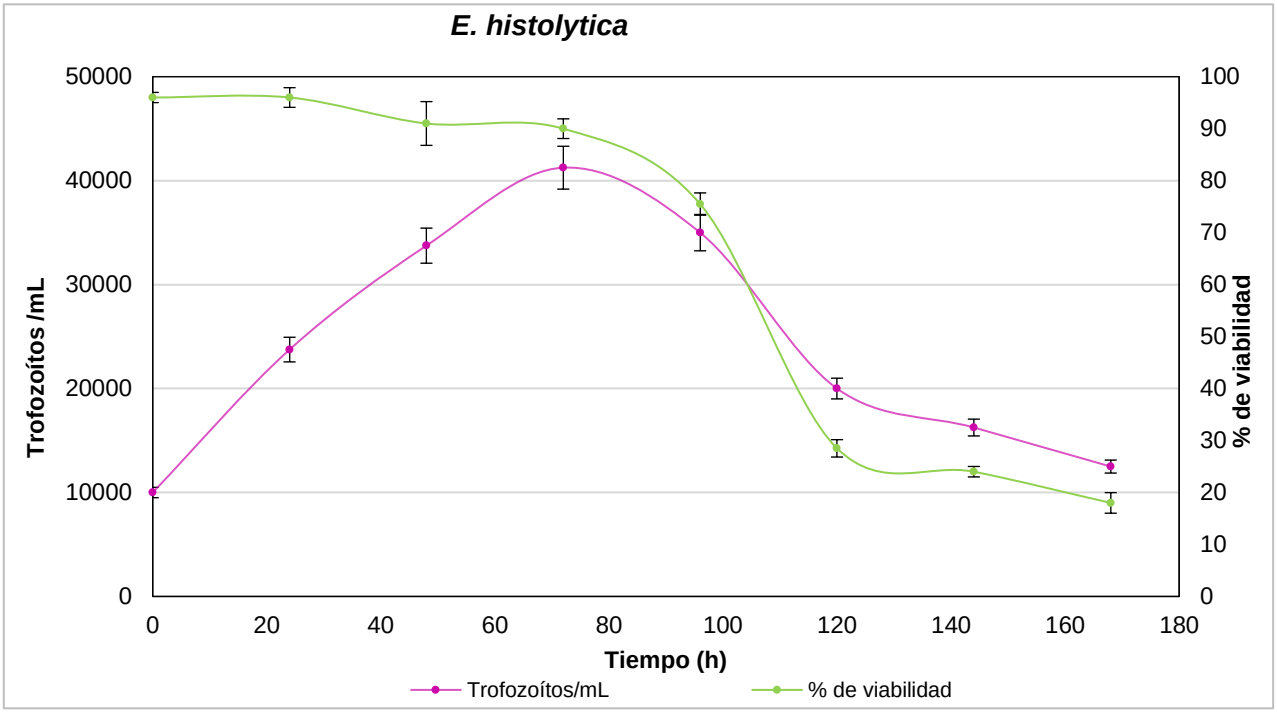
Tabla 17. Valores de CMI, CI_{90} y CI_{50} de sales sobre trofozoítos de *G. lamblia*			
Sal	**CMI (µM)**	**CI_{90} (µM)**	**CI_{50} (µM)**
A1	**1180.61** ± 0.57 [b, d] *(1180.05 - 1181.16)* [a]	**534.33** ± 0.50 [b, d] *(533.84 - 534.82)* [a]	**138.02** ± 1.41 [b, d] *(136.64 – 139.41)* [a]
A2	**691.67** ± 0.95 [b, d] *(690.74 692.60)* [a]	**673.78** ± 5.25 [b, d] *(668.88 - 678.67)* [a]	**78.05** ± 0.43 [b, d] *(77.62 – 78.05)* [a]
A3	**571.37** ± 0.94 [b, d] *(570.45 - 572.29)* [a]	**376.47** ± 0.42 [b, d] *(374.40 - 376.81)* [a]	**51.31** ± 1.23 [b, d] *(50.09 – 52.52)* [a]
M1	NE	NE	NE
M2	**319.36** ± 1.41 [c, d] *(317.98 - 320.74)* [a]	**270.38** ± 1.94 [c, d] *(268.48- 272.28)* [a]	**79.62** ± 0.99 [c, d] *(78.64 – 80.59)* [a]
M3	**534.75** ± 1.82 [c, d] *(532.97 - 536.54)* [a]	**396.11** ± 1.53 [c, d] *(395.34 396.87)* [a]	**77.98** ± 0.70 [c, d] *(77.28 – 78.67)* [a]
Abz	**1884.44** ± 1.18 *(1883.28 - 1885.60)* [a]	**1565.80** ± 1.64 *(1564.20 - 1567.41)* [a]	**270.66** ± 1.89 *(263.89 – 277.44)* [a]
Mbz	**1693.42** ± 0.81 *(1692.62 - 1694.21)* [a]	**1403.12** ± 1.69 *(1401.62 - 1404.94)* [a]	**262.74** ± 2.49 *(260.29 – 265.19)* [a]
Mtz	**365.36** ± 1.29 *(364.10 - 366.63)* [a]	**312.25** ± 1.86 *(310.43 - 314.07)* [a]	**97.63** ± 1.43 *(96.22 – 99.04)* [a]

Los valores corresponden a la media ± D.E de 4 ensayos independientes por duplicado, NE: no efecto antiparasitario a las concentraciones evaluadas; [a] intervalos de confianza al 95%, α 0.05; [b] diferencia estadísticamente significativa entre las sales y el control positivo (Abz) a $p < 0.05$; [c] diferencia estadísticamente significativa entre las sales y el control positivo (Mbz) a $p < 0.05$; [d] diferencia estadísticamente significativa entre las sales y el control positivo (Mtz) a $p < 0.05$; Abz: albendazol; Mbz; mebendazol; Mtz: metronidazol.

8.3 E. histolytica

8.3.1 Cinética de crecimiento de *E. histolytica*

Se realizó la cinética de crecimiento de *E. histolytica* en la cual se observó una fase de crecimiento logarítmico desde su inicio, alcanzando un rendimiento máximo a las 72 h con un número total de 41, 250 trofozoítos/mL y un porcentaje de viabilidad del 84%. A partir de esta cinética se determinó el tiempo de generación de la cepa HM1: IMSS en 3 h; mientras que el tiempo de duplicación fue de 9 h y finalmente se determinó la mitad de la fase logarítmica a las 48 h con un porcentaje de viabilidad del 91 % (Grafica 3).



Grafica 3. Cinética de crecimiento de *E. histolytica* HM1: IMSS (los resultados son el promedio de 3 ensayos independientes por duplicado, n=6).

8.3.2 Pruebas de susceptibilidad *in vitro* contra *E. histolytica*

Se realizaron las pruebas de susceptibilidad *in vitro* contra *E. histolytica* de las sales de Abz y Mbz, así como de los controles de inhibición Abz, Mbz y Mtz. Con los resultados obtenidos se logró determinar que la sal A2 fue la que presentó un mejor efecto inhibitorio sobre *E. histolytica* con una CI_{50} de 35.13 µM, mientras que M3 fue la que presentó un mejor efecto inhibitorio con una CI_{50} de 59.79 µM. Respecto al resultado de los controles positivos de inhibición Abz, Mbz y Mtz se determinó la CI_{50} en 89.37, 111.25 y 21.84 µM, respectivamente (Tabla 18).

Tabla 18. Valores de CMI, CI_{90} y CI_{50} de sales sobre trofozoítos de *E. histolytica.*

Sal	CMI (µM)	CI_{90} (µM)	CI_{50} (µM)
A1	NE	NE	NE
A2	**172.91**±1.54 [b, d] (171.40 - 174.41) [a]	**116.67**±1.89 [b, d] (114.87 - 118.58) [a]	**37.95**±0.25 [b, d] (37.24 - 38.66) [a]
A3	**142.84** ± 2.36 [b, d] (140.52 - 145.15) [a]	**126.96** ± 0.04 [b, d] (126.95 - 127.02) [a]	**39.93** ± 0.81 [b, d] (39.14 – 40.73) [a]
M1	**551.30** ± 2.61 [c, d] (548.74 - 553.85) [a]	**450.35** ± 0.14 [c, d] (450.91 - 451.18) [a]	**128.05** ± 2.69 [c, d] (125.41 - 130.69) [a]
M2	**319.36** ± 1.63 [c, d] (317.76 - 320.95) [a]	**211.11** ± 1.68 [c, d] (211.02 - 214.32) [a]	**57.72** ± 0.70 [d] (57.03 – 58.41) [a]
M3	**267.37** ± 1.98 [c, d] (265.42 - 269.31) [a]	**177.97** ± 0.31 [c, d] (177.91 - 178.53) [a]	**44.34** ± 0.45 [c, d] (43.89 – 44.79) [a]
Abz	**235.55** ± 1.87 (233.71 - 237.38) [a]	**184.87** ± 1.23 (183.49 - 185.90) [a]	**73.51** ± 1.09 (72.44 – 74.59) [a]
Mbz	**211.67** ± 2.19 (209.52 - 213.81) [a]	**187.99** ± 0.21 (187.36 - 188.53) [a]	**59.81** ± 1.18 (58.65 – 60.98) [a]
Mtz	**91.31** ± 1.48 (89.85 - 92.76) [a]	**42.24** ± 0.09 (42.06 - 42.48) [a]	**16.08** ± 0.69 (15.40 - 16.77) [a]

Los valores corresponden a la media ± D.E de 4 ensayos independientes por duplicado, NE: no efecto antiparasitario a las concentraciones evaluadas; [a] intervalos de confianza al 95%, *α 0.05*; [b] diferencia estadísticamente significativa entre las sales y el control positivo (Abz) a $p < 0.05$; [c] diferencia estadísticamente significativa entre las sales y el control positivo (Mbz) a $p < 0.05$; [d] diferencia estadísticamente significativa entre las sales y el control positivo (Mtz) a $p < 0.05$; Abz: albendazol; Mbz; mebendazol; Mtz: metronidazol.

8.4 Calculó potencia relativa

Se comparó la potencia de las sales de Abz y Mbz que presentaron actividad antiparasitaria sobre *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis* con respecto a los compuestos empleados como control positivo de inhibición, mediante la obtención del coeficiente de potencia relativa que emplea como criterios los valores obtenidos de CI_{50} en para cada uno de los modelos biológicos empleados, mediante la siguiente ecuación (Duque- Montaño, 2014):

$$\text{Potencia relativa} = \frac{CI_{50} \text{ del fármaco de referencia}}{CI_{50} \text{ de la sal de prueba}}$$

De las sales evaluadas sobre *T. vaginalis*, la sal A2 fue 1.91 veces más potente que Abz, mientras que la sal M1 fue 1.57 veces más potente que Mbz; por otro lado, la sal M1 tiene una potencia relativa de 0.67, siendo menos potente que Mtz (Tabla 17).

En cuanto a las sales evaluadas sobre *E. histolytica*, la sal A2 fue 2.53 veces más potente que Abz, mientras que M3 fue 1.86 veces más potente que Mbz mientras que A2 tiene una potencia relativa de 0.62, siendo menos potente que Mtz (Tabla 17).

Para *G. lamblia,* la sal de A3 fue 4.2 veces más potente que Abz, mientras que M3 fue 3.2 veces más potente que Mbz, por otro lado, la sal A1 fue 2 veces más potente que Mbz (Tabla 19).

Tabla 19. Potencia relativa

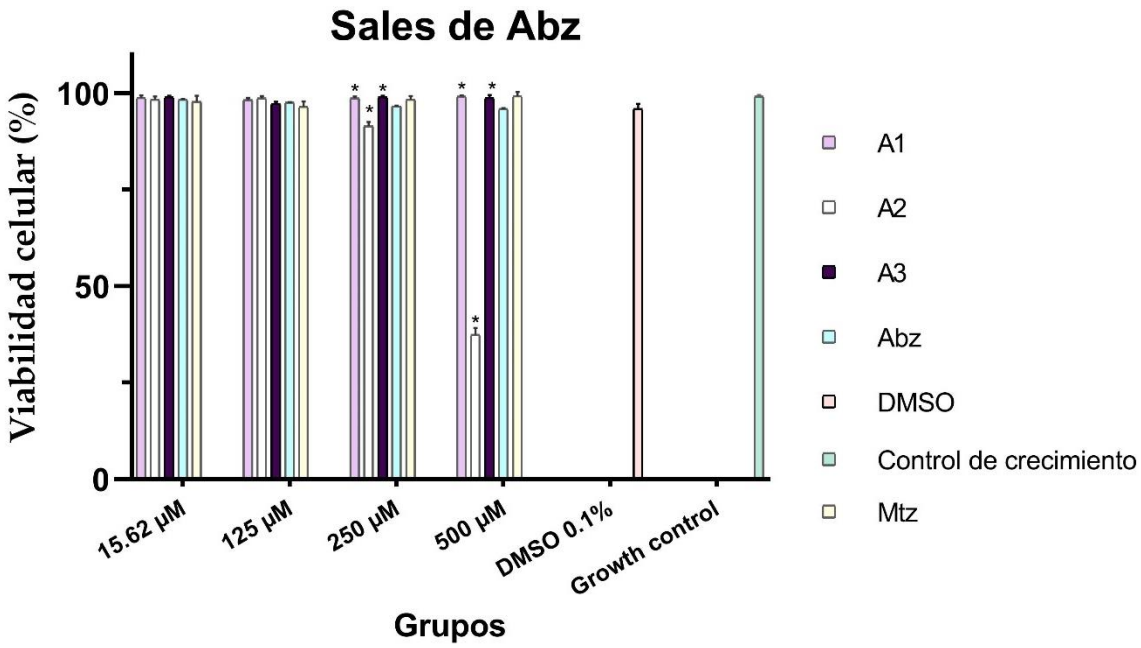
Sal	*E. histolytica*			*G. lamblia*			*T. vaginalis*		
	Abz	**Mbz**	**Mtz**	***Abz***	**Mbz**	**Mtz**	**Abz**	**Mbz**	**Mtz**
A1	NE	---	NE	1.08	---	0.52	NE	---	NE
A2	2.54	---	0.62	2.95	---	1.43	1.91	---	0.06
A3	1.14	---	0.27	4.23	---	2.05	NE	---	NE
M1	---	0.53	0.10	---	NE	NE	---	1.57	0.67
M2	---	1.48	0.29	---	2.64	0.89	---	0.46	0.19
M3	---	1.86	0.36	---	3.21	0.68	---	1.46	0.20

Potencia relativa. Potencia relativa= CI_{50} (Abz, Mbz, Mtz) / CI_{50} (Sal).

8.5 Evaluación *in vitro* del efecto citotóxico en células VERO

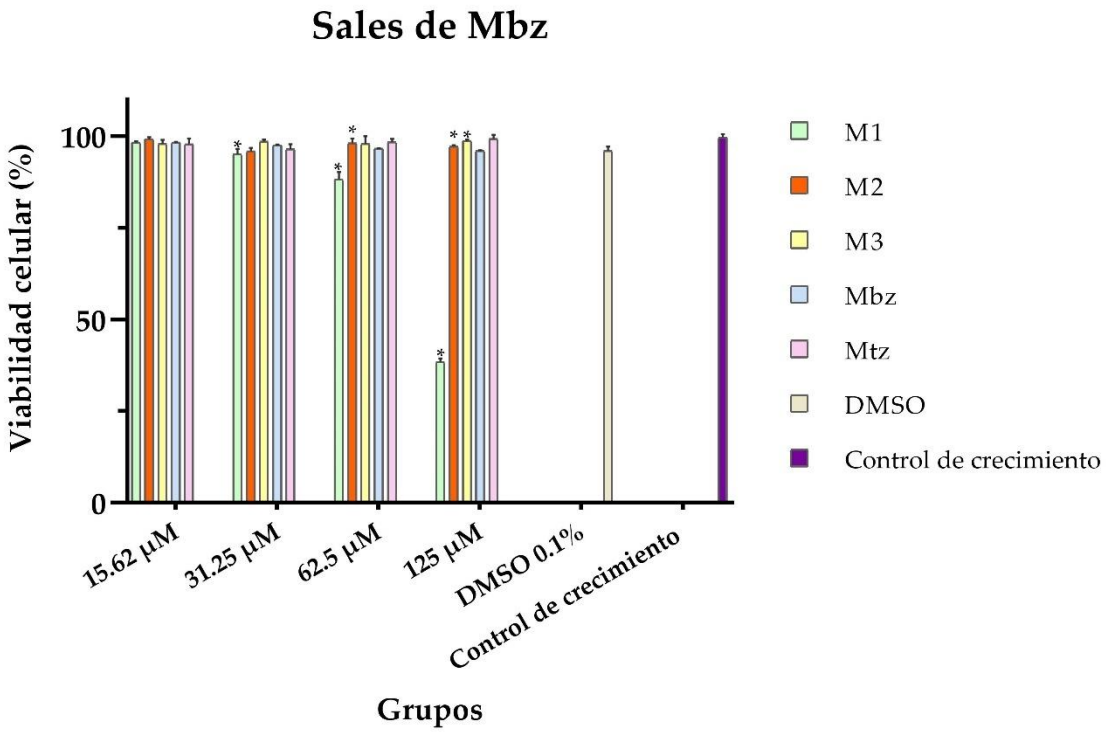
Se realizaron ensayos biológicos en la línea celular VERO (células epiteliales de riñón de mono verde africano) para comprender mejor los efectos citotóxicos de estas sales en las células humanas, en comparación con los efectos observados en los protozoarios. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo colorimétrico con el reactivo WST-1 (2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenilo).)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio). Los resultados se expresan en las gráficas 4 y 5 como porcentaje de viabilidad celular.

Se observa que no se afectó la viabilidad de las células VERO tras ser expuestas a las sales A1, A3, M2 y M3 a la concentración más alta evaluada (500 µM) ya que se mantuvo un porcentaje de viabilidad superior al 98 %. En la gráfica 4 se presentan los resultados de las sales de Abz; se observa que no se afectó la viabilidad de las células VERO tras ser expuestas a las sales A1 y A3, a la concentración más alta evaluada (500 µM) ya que se mantuvo un porcentaje de viabilidad superior al 98%; no obstante, la sal A2 empezó a reducir la viabilidad celular a partir de 250 µM alcanzando una reducción del 37% a la concentración más alta evaluada 500 µM. Respecto a los controles Abz y Mtz la viabilidad celular a 500 µM fue de 95.95% y de 99.25% respectivamente. El control con disolvente DMSO 0.1% presentó una viabilidad celular del 99%.



Grafica 4. Efecto de las sales de Abz sobre la viabilidad de las células epiteliales de riñón (VERO). Las barras representan los valores de la media ± D.E. de 3 ensayos independientes por duplicado (n=6). C.C.: control de crecimiento; C.D.: control de disolvente (DMSO 0.1%). El asterisco sobre la barra representa la significación estadística entre las sales y el control positivo (Abz) con un valor de $p < 0,05$.

Respecto a las sales de Mbz, tras la exposición de las células a M2 y M3 la viabilidad celular se mantuvo por encima del 96%. Sin embargo, con la sal M1 se observa que conforme aumenta la concentración de la sal, la viabilidad celular se ve disminuida; en la gráfica 5 podemos observar que a partir de los 62.5 µM existe una disminución en la viabilidad (88%), disminuyendo hasta 38% en la concentración de 125 µM. Como era de esperarse 0.1% de DMSO no alteró el crecimiento celular, de manera similar ocurrió con los controles Mbz y Mtz que presentaron porcentajes de viabilidad superiores al 95% (Gráfica 5).



Grafica 5. Efecto de las sales de Mbz sobre la viabilidad de las células epiteliales de riñón (VERO). Las barras representan los valores de la media ± D.E. de 3 ensayos independientes por duplicado (n=6). C.C.: control de crecimiento; C.D.: control de disolvente (DMSO 0.1%). El asterisco sobre la barra representa la significación estadística entre las sales y el control positivo (Mbz) con un valor de $p < 0,05$.

8.5.1 Perfil de citotoxicidad

Una vez determinado el porcentaje de viabilidad de las células renales (VERO) se procedió a determinar la Concentración Citotóxica media (CC_{50}).

La sal de M1 presentó los valores más altos de citotoxicidad con una CC_{50} de 104 µM. La sal A1 presento una CC_{50} de 435 µM (Tabla 20). La concentración más alta probada para el resto de las sales y controles positivos de inhibición Abz y Mbz (500 µM) no disminuyó la viabilidad celular, manteniéndose por encima del 90% a 500 µM; evidenciando que estos compuestos no ejercen efecto

tóxico sobre la línea celular VERO (Gráficas 4 y 5). El control de disolvente DMSO al 0.1% no alteró el crecimiento celular, ya que la viabilidad se mantuvo por encima del 95%.

Tabla 20. Valores de CC_{50} de sales de Abz y Mbz sobre línea celular VERO

Sal	CC_{50} (µM)	± D.E.
A1	> 500	0.29
A2	435.46 *(433.33 – 437. 59)* [a]	2.17
A3	> 500	0.68
M1	104.04 *(100.26 - 107.82)* [a]	3.85
M2	> 500	1.31
M3	> 500	0.89
Abz	> 500	0.98
Mbz	> 500	1.57
Mtz	> 500	1.07

Los valores de la CC_{50} corresponden a la media ± D.E a partir de 3 ensayos independientes por duplicado (n=6). [a] intervalos de confianza al 95%, α 0.05; Abz: albendazol; Mbz; mebendazol; Mtz: metronidazol.

El Índice de selectividad (IS) es un parámetro que analiza la eficacia antiparasitaria en comparación con el efecto citotóxico. Normalmente un IS > 1 es considerado implica que la actividad biológica preferida es la antiparasitaria, mientras que un índice < 1 indica una selectividad hacia las células de mamífero (Quispe et al., 2006; Domínguez, 2015). Los IS para las sales son superiores a 1, resultando en una mayor selectividad por los protozoarios (Tabla 21).

Tabla 21. Índice de selectividad

Sal	*E. histolytica*	*G. lamblia*	*T. vaginalis*
A1	ND	2.43	ND
A2	12.39	5.77	1.72
A3	6.39	9.5	ND
M1	2.08	ND	16.84
M2	6.68	4.12	5.68
M3	8.36	5.01	5.69
Abz	5.59	2.24	1.03
Mbz	4.49	1.56	12.31
Mtz	22.89	4.63	28.45

Tabla 19. índice de selectividad en *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis*; ND: no determinado.

9.0 Discusión

Las infecciones parasitarias causadas por *E. histolytica*, *G. lamblia y T. vaginalis*, son un problema importante de salud pública a nivel mundial (Rodríguez-Villar y cols., 2021). La búsqueda de nuevas moléculas candidatas para el tratamiento de las infecciones parasitarias causadas por estos tres protozoarios ha sido una prioridad en los últimos años, debido a la aparición de cepas resistentes a los fármacos empleados como tratamiento de primera elección, particularmente el Mtz. Así mismo se reporta el abandono del tratamiento farmacológico debido a los efectos adversos de estos medicamentos, favoreciendo la propagación de cepas resistentes a los medicamentos (Kulakova y cols., 2014). En este sentido una amplia cantidad de moléculas han sido exploradas como futuros antiparasitarios, con mayor eficacia y menor cantidad de efectos secundarios, dentro de los que destacan aquellos que incluyen el heterociclo benzimidazol (Hernández y cols., 2020), debido a que posee una gran cantidad de efectos farmacológicos: actividad antimicrobiana, antihistamínica, analgésica, anticonvulsiva, antihelmíntica y antiprotozoaria (Salahuddin y cols., 2017). Por lo que en la literatura se encuentran una gran cantidad de artículos relacionados con la síntesis de nuevas moléculas empleando el núcleo benzimidazol tal es el caso de Torres-Gomez y colaboradores (2008) quienes reportaron una serie de híbridos de benzimidazol con pentamidina los cuales fueron más potentes que los fármacos de referencia contra T. *vaginalis, E. histolytica* y *G. lamblia*. Matadamas y colaboradores (2020) prepararon una serie de híbridos de nitaxozanida y benzimidazol y determinaron su efecto antiparasitario sobre cepas sensibles y resistentes a Abz y nitaxozanida en *G. lamblia* siendo el compuesto CMC-20 28 veces más potente que nitaxozanida y 3.9 veces más potente que Abz.

Actualmente, Abz y Mbz son fármacos empleados en la práctica clínica para el tratamiento de diversas parasitosis incluidas las causadas por los tres protozoarios estudiados en este proyecto. Sin embargo, su eficacia antiparasitaria sistémica y local está restringida, debido que presentan una baja biodisponibilidad asociada a la baja solubilidad acuosa que presentan (Patel et al., 2022; Racoviceanu et al., 2020). Ante esta problemática se han desarrollado sales farmacéuticas de Abz y Mbz con propiedades físicas y fisicoquímicas mejoradas (Bolla and Nagia, 2018; Liang et al., 2022; Paulekuhn et al., 2013; Paulo de S et al., 2021; Patel et al., 2022). En el presente trabajo se realizó la determinación antiparasitaria de sales de Abz y Mbz con ácidos sulfónicos.

En primera instancia realizó la identificación y aislamiento de *T. vaginalis* a partir de una muestra de orina positiva, mediante un examen de microscopia óptica y el cultivo en medio de Diamond modificado, ambas técnicas son utilizadas para el diagnóstico de la tricomoniasis (Núñez Troconis, 2020), además de ser la orina una de las muestras más confiables para el diagnóstico de tricomoniasis femenina junto con hisopados endocervicales y vaginales (Ibáñez-Escribano y cols., 2024). El cultivo de *T. vaginalis*

se realiza en medios que promueven el crecimiento y la multiplicación de los trofozoítos siendo el medio de Diamond el más empleado. No obstante, en la literatura se reportan diversas variaciones en la metodología (diferente concentración de los componentes del medio, diferente concentración de suero, diferente pH, etc.). En este proyecto utilizar el medio de Diamond modificado pH 7.0 con 5% de suero de bovino adulto resultó favorable para la axenización y cultivo de *T. vaginalis,* ya que después de 4 días de incubación se aumentó la confluencia de los cultivos y en la cinética de crecimiento el mayor rendimiento fue a las 48 h con una cantidad de 259, 166 trofozoítos/mL. Nuestros resultados con el medio de Diamond son similares a los reportados por autores como Neira y colaboradores (2006), quienes evaluaron cuatro medios de cultivo para el aislamiento primario de *T. vaginalis*, siendo el medio de Diamond con un pH 6.5 y complementado con suero equino al 10%, con el que se obtuvo un mejor rendimiento y viabilidad. Rojas y colaboradores (2004) aislaron con éxito trofozoítos de *T. vaginalis* a partir de muestras de exudado vaginal empleando el medio de Diamond suplementado con suero de ternera al 10%. Mientras que Gonzalez y colaboradores (2019) realizaron el aislamiento y cultivo de *T. vaginalis* a partir de una muestra de orina clínica positiva en el medio Pavlova modificado pH 7.4 con 5% de suero equino y obtuvieron que el medio resulta poco favorable para el cultivo de este protozoario, ya que el crecimiento y multiplicación es más lenta (mayor concentración de trofozoítos tras 96 h de incubación). El medio Pavlova modificado tiene una concentración de sales y azúcares menor a la del medio de Diamond, así mismo en su composición no se agregan peptonas y aminoácidos, componentes que son vitales para la multiplicación de este parásito, factores que pueden interferir en la multiplicación (Gonzalez y cols., 2019). Respecto a la cinética de crecimiento de *T. vaginalis* nuestros resultados son similares a los reportados por Rodríguez García (2014), quien reportó el rendimiento máximo a las 48 h y la mitad de la fase de crecimiento logarítmico a las 24 h, mientras que el tiempo de duplicación fue de 3.75 h y el tiempo de generación fue de 5.2 h.

Una vez obtenido el cultivo axénico, se realizó la evaluación antiparasitaria *in vitro* de las sales de Abz y Mbz sobre los trofozoítos de *T. vaginalis,* donde observamos que las sales A1 y A3 perdieron actividad contra *T. vaginalis*. Por otro lado, A2 tuvo efecto sobre la viabilidad de los trofozoítos incluso su valor de IC_{50} fue más bajo que el obtenido por el control de referencia Abz (CI_{50} 484.03 μM). En la literatura se reporta que la CI_{50} de Abz contra *T. vaginalis* es de 4.08 μM (Palos y cols., 2020), cien veces menor a la obtenida en este trabajo. Respecto a las sales de Mbz todas ellas inhibieron el crecimiento de *T. vaginalis*; sin embargo, fue la sal M1 quien tiene la mayor actividad en comparación con el control de referencia Mbz; mientras que M2 y M3 tuvieron menor actividad. A pesar de en algunos casos las sales fueron activas contra *T. vaginalis* ninguna de ellas, incluso ningún control de referencia presentó mejor efecto antiparasitario que el estándar Mtz (CI_{50} 17.57 μM) con este análisis podemos resumir que la tendencia en el efecto antiparasitario fue (IC_{50}) Mtz > M1 > Mbz > M2 > M3 > A2 > Abz. Por lo que Mtz es el más efectivo para inhibir el crecimiento de *T. vaginalis MB: FF09*. Nuestros resultados con Mtz

nos permiten determinar que este aislado clínico es susceptible a Mtz ya que en la literatura el número de cepas resistentes a Mtz es alarmante (Ngobese y cols., 2022; Ertabaklar y cols., 2016). Mtz es utilizado actualmente como el tratamiento de primera elección para la tricomoniasis (Mabaso, N., y Abbai, 2021), pero ante el aumento de cepas resistentes a los nitroimidazoles el besilato de Mbz (M1) puede ser una alternativa para el tratamiento de la tricomoniasis, debido a que aumento su actividad inclusive más que Mbz, mientras que el mesilato y tosilato de Mbz (M2 y M3) no son una alterativa para la tricomoniasis ya que disminuyen su actividad, al igual que las sales de Abz.

Respecto a *G. lamblia*, con la cinética de crecimiento determinamos el tiempo de duplicación de la cepa en 23 h mientras que el tiempo de generación fue de 33 h, por otro lado la mitad de la fase logarítmica se determinó a las 24 h, lo cual difiere con lo reportado por Ramírez (2019), quien determinó el tiempo de generación de *G. lamblia* en 62.39 h; asimismo Domínguez (2015) reportó los parámetros de crecimiento de *G. lamblia* el tiempo de duplicación 4.65 h, el tiempo de generación fue de 6.71 h y la mitad de la fase logarítmica a las 24 h, lo cual se asemeja a lo reportado por Barrón- Gonzalez (2010) quien reportó la mitad del crecimiento logarítmico a las 24 h.

En el efecto antiparasitario sobre *G. lamblia*, los tosilatos (A3 y M3) fueron los que mejor efecto presentaron en comparación con los controles Abz y Mbz, A3 fue 4 veces más potente que Abz, mientras que M3 fue 3 veces más potente que Mbz, seguidos en actividad se encuentran los mesilatos (A2 y M2) quienes fueron 2 veces más potentes que Abz y Mbz, inclusive A2, A3 y M2 son más activas incluso que Mtz el compuesto de primera elección para el tratamiento de la giardiasis. Respecto a los besilatos; A1 disminuye su actividad drásticamente, mientras que M1 pierde la actividad contra *G. lamblia*. Podemos resumir que la tendencia en efecto antiparasitario (IC_{50}) es A3 > M3 > A2 > M2 > Mtz > A1 > Mbz > Abz > M1, las diferencias entre las sales y los controles de referencia es notoria sobre todo en aquellos casos donde la actividad fue superior o totalmente nula, lo que sugiere que el contraión desempeña un papel en la modulación del efecto antiparasitario, siendo el tosilato el contraión que incrementa la potencia de los fármacos seguido del mesilato.

Para *E. histolytica* se determinó la mitad de la fase logarítmica a las 48 h con una viabilidad celular del 91%, lo cual es similar a lo reportado por Barrón y colaboradores (2012) quienes reportaron la cinética de crecimiento de *E. histolytica* HMI: IMSS y determinaron la mitad de la fase logarítmica a las 48 h. En la evaluación del efecto antiparasitario contra *E. histolytica*, los mesilatos (A2 y M2) y los tosilatos (A3 y M3) fueron los que mejoraron su actividad en comparación con los controles de referencia Abz y Mbz; sin embargo, no mejoraron su actividad en comparación con el estándar Mtz, y se observa la siguiente tendencia en el efecto antiparasitario (IC_{50}) Mtz > A2 >A3 > M3 > M2 > ABZ > MBZ > M1; destacando que los mesilatos A2, M2 y los tosilatos A3, M3 incrementan la actividad antiparasitaria. Mientras que M1 disminuyó la actividad antiparasitaria y finalmente A1 perdió totalmente la actividad.

Las diferencias en el efecto antiparasitario son notorias entre los tres protozoarios, las sales presentaron poca o nula actividad contra *T. vaginalis* no obstante, observamos que los mesilatos y tosilatos de Abz y Mbz mejoran su actividad sobre *E. histolytica* y *G. lamblia*; a pesar que en la literatura se reporta que *"la formación de sales farmacéuticas no modifica el efecto biológico del ingrediente farmacéutico activo (API)"* (Ortiz y Balderrabano, 2017), nuestros resultados *in vitro* no respaldan esta afirmación.

Nuestros resultados no pueden atribuirse completamente al mecanismo de acción de Abz y Mbz, cuyo efecto principal es la inhibición de la polimerización de los microtúbulos, lo que compromete la estructura del citoplasma y detiene el transporte de nutrientes dentro del parásito. Dado que los controles de referencia con Abz y Mbz mostraron actividad antiparasitaria contra los tres protozoarios evaluados, es importante considerar que las interacciones entre el contraión y el compuesto activo podrían influir significativamente en la actividad antiparasitaria observada. Los contraiones pueden afectar la solubilidad, del fármaco, lo que a su vez impacta en su capacidad para penetrar en el parásito y alcanzar su sitio de acción.

En *G. lamblia*, los benzimidazoles presentan una mayor actividad debido a la compleja organización de su citoesqueleto, el cual incluye diversas estructuras microtubulares: el disco ventral o adhesivo, cuatro pares de flagelos, el cuerpo basal, el cuerpo mediano y el funis (Benchimol y cols., 2004; Gadelha y cols., 2020). Algunas de estas estructuras no están presentes en *E. histolytica* y *T. vaginalis*, pues son exclusivas de *Giardia*. En consecuencia, en *G. lamblia* predominan los microtúbulos y varias proteínas asociadas a ellos, lo que podría explicar la mayor susceptibilidad de este protozoario a los benzimidazoles.

Respecto a las sales, se observó que los besilatos de Abz y Mbz presentaron una baja actividad antiparasitaria o incluso perdieron su efecto, mientras que los iones mesilato y tosilato incrementaron dicha actividad. Este resultado refuerza la idea de que el efecto biológico de estos compuestos se encuentra modulado por el contraión empleado en la formación de la sal. Sin embargo, este fenómeno parece estar más relacionado con la interacción de las sales y la membrana celular de los parásitos, donde la permeabilidad y el transporte a través de la membrana están regulados por canales iónicos y proteínas transmembranales. Estas estructuras facilitan el flujo de iones y moléculas desde el espacio extracelular hacia el interior del parásito, permitiendo su absorción y potencial actividad terapéutica, Además, la permeabilidad celular del parásito y los mecanismos de absorción también juegan un papel clave en la eficacia del compuesto. Factores como el pH del medio, la presencia de transportadores o bombas de eflujo, y la afinidad del compuesto por las membranas parasitarias pueden determinar cuánto del fármaco logra ingresar y ejercer su efecto (Jiménez y Mesones, 2022).

En este sentido, las propiedades fisicoquímicas de las sales farmacéuticas, como la solubilidad en agua, la permeabilidad a través de la membrana, el punto de fusión y la estabilidad térmica, están directamente relacionadas con la naturaleza del contraión empleado en su formación. Se ha propuesto que los contraiones de carácter lipofílico como el mesilato y tosilato favorecen una mayor permeación a través de las membranas biológicas, lo que podría influir en la absorción y distribución del fármaco dentro del organismo (Ferraz y cols., 2020). Como consecuencia, la selección del contraión no solo afecta la solubilidad, sino que también puede impactar significativamente en su eficacia terapéutica y toxicidad. Estos factores deben considerarse cuidadosamente en el diseño y optimización de formulaciones farmacéuticas para garantizar un perfil farmacocinético adecuado (Berry y Steed, 2017; Guerrieri y cols., 2010).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se suman a otras investigaciones que evalúan el efecto antimicrobiano de nuevas sales. Aunque el número de estudios disponibles en la literatura es limitado, diversos autores han asociado la mejora en las propiedades fisicoquímicas con el efecto biológico que presentan las sales tras su formación, particularmente en el caso de compuestos antimicrobianos. Silva y colaboradores (2022) han desarrollado una serie de sales de mefloquina con ácidos sulfónicos y determinaron su efecto antibacteriano sobre la cepa de *Mycobacterium tuberculosis*, las sales presentaron una biodisponibilidad *in vitro* mejorada en comparación con el clorhidrato de mefloquina (sal comercial del fármaco); destacando el mesilato y el tosilato de mefloquina por el aumento en el coeficiente de partición, la difusión y la permeabilidad a través de la membrana sintética, además de presentar una concentración mínima inhibitoria (CMI) menor a la del clorhidrato sobre *Mycobacterium tuberculosis*. Además el tosilato de mefloquina no fue citotóxico para las células Raw 264.7 a la concentración de 30 µM, mientras que mesilato fue citotóxico a esta misma concentración, por lo que asociaron que la actividad antibacteriana y citotóxica son moduladas por las especies iónicas de la sal de mefloquina, sobre todo porque evaluaron la citotoxicidad de las sales sódicas no presentaron efecto citotóxico a 30 µM.

Madeira y colaboradores (2021), desarrollaron sales orgánicas de ciprofloxacino y norfloxacino y evaluaron su actividad antibacteriana sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Klebsiella pneumoniae*. El mesilato de ciprofloxacino y norfloxacino mejoraron la solubilidad comparada con los fármacos base. La sal de ciprofloxacino favorece el efecto antibacteriano sobre las tres cepas evaluadas mejorando el valor de IC_{50}. Mientras que la sal de norfloxacino aumenta el efecto antibacteriano únicamente sobre *Klebsiella pneumoniae*.

Nuestros resultados del efecto antiparasitario son similares a los reportados por estos autores, particularmente por el efecto que presentaron las sales de mesilato y el tosilato de Abz y Mbz sobre *E. histolytica* y *G. lamblia*, lo que nos lleva a considerar que las interacciones entre las especies iónicas

condujeron a una mejora en la actividad antiparasitaria, lo que puede estar asociado con las propiedades fisicoquímicas mejoradas de los mesilatos y tosilatos de Abz y Mbz (De Paula y cols., 2013; Paulekuhn y cols., 2013; Fernández y Trejo, 2019).

Por otro lado, es importante tener en cuenta las propiedades toxicológicas que posee cada contraión y que deben ser consideradas al momento de seleccionar una sal farmacéutica (Saal and Becker y cols., 2013). De acuerdo con la clasificación de Pfannkuch y colaboradores (2011), los contraiones se pueden agrupar en 3 diferentes clases dependiendo el grado de toxicidad que presentan: Clase 1(inocuo), Clase 2 (moderadamente tóxico) y clase 3 (muy tóxico). Las sales de ácidos sulfónicos son clase 2 ya que su uso ha demostrado baja toxicidad y buena tolerabilidad (Saal y Becker, 2013; Pfannkuch y cols., 2011). De acuerdo con Silva y colaboradores (2022), la citotoxicidad de las sales puede ser clasificada como no citotóxicas si el porcentaje de viabilidad celular (%VC) es mayor al 95%, como moderadamente citotóxicos si el %VC está entre 70 – 94% y como citotóxicos si el %VC es menor a 50%. Para evaluar la citotoxicidad de las sales de Abz y Mbz se utilizó la línea celular VERO, proveniente de células renales epiteliales de mono verde africano que es ampliamente utilizada para extrapolar la citotoxicidad en humanos (Domínguez, 2015). Nuestros resultados mostraron que A1, A3, M2 y M3 no fueron citotóxicas para las células VERO ya que su %VC fue superior al 95%, mientras que A2 y M1 disminuyeron la viabilidad celular conforme aumentaba la concentración, por lo que fueron citotóxicas para las células renales a 500 y 125 µM, respectivamente. Los controles Abz, Mbz y Mtz no fueron citotóxicos para las células renales a pesar de que en la literatura se encuentran reportes que indican que Abz es citotóxico para las células sanas (Elmaaty y cols., 2022); no obstante, Pourgholami y colaboradores (2008) y Radko y colaboradores (2017) reportaron que Abz no es citotóxico en células hepáticas humanas y de rata. Nuestros resultados muestran que Abz no es citotóxico a 500 µM en células renales.

Finalmente se determinó el IS, el cual es considerado como bueno si es mayor a 1 ya que la actividad antiparasitaria *in vitro* es más selectiva hacia el parásito, mientras que un índice menor a 1 es considerado más selectivo hacia las células de mamífero (Quispe et al., 2006; Domínguez, 2015). La tendencia en IS para *T. vaginalis* es Mtz > Mbz > M2 > M3 > M1 > A2 > Abz, los resultados resaltan que los controles Mtz y Mbz fueron los que presentaron mayor IS mientras que M2 y M3 conservan la selectividad y a pesar de que M1 fue la sal con menor IC_{50}, su toxicidad aumentó considerablemente. Con estos resultados podemos decir que las sales de Abz y Mbz no son una buena alternativa contra *Tricomonas vaginalis*.

La tendencia observada en IS para *G. lamblia* es A3 > M3 > M2 > A2 > Mtz > A1 > Mbz > Abz > 1, la tendencia fue similar a la observada con los valores de IC_{50}; los mesilatos y tosilatos mostraron mayor IS que los fármacos de referencia Abz y Mbz, inclusive presentaron un IS mayor al obtenido por el

estándar Mtz, lo que sugiere que estas sales pueden ser una buena alternativa para el tratamiento de la G.sis, ya que presentan buena actividad y selectividad antiparasitaria.

Para *E. histolytica* la tendencia es Mtz > A3 > A2 > M3 > M2 > MBZ > ABZ > 1> M1, si bien el estándar Mtz presento el valor de IS más alto, los mesilatos y tosilatos de Abz y Mbz mejoraron su selectividad con respecto a los fármacos de referencia Abz y Mbz, y la tendencia de IC_{50} e IS es muy similar en este parásito; además de que los valores de IS son mayores a 1. No obstante M1 es más selectiva hacia las células de mamífero, por lo que nuestros resultados destacan que los besilatos de Abz y Mbz (A1 y M1) no son una buena alternativa para el tratamiento de la amebiasis; sin embargo, los mesilatos y tosilatos al tener una buena actividad antiparasitaria y al no mostrar selectividad por las células renales pueden ser buenas alternativas como potencial tratamiento farmacológico.

10.0 Conclusiones

- La cepa de *T. vaginalis* MB: FF09 es sensible a Mtz. Las sales de Abz no presentaron efecto antiparasitario. El mesilato M2 y el tosilato M3 disminuyeron su actividad, mientras que el besilato M1 aumento su actividad sobre este protozoario, sin embargo, es citotóxico para las células VERO, por lo que se concluye que ninguna de las sales es viable para inhibir el crecimiento de *T. vaginalis in vitro*.
- Para *G. lamblia* los besilatos de Abz y Mbz no mostraron efecto antiparasitario, mientras que los mesilatos A2 y M2 son efectivos para inhibir del parasito; no obstante, A2 es citotóxico para las células renales por lo que no es una buena alternativa para la G.sis. Mientras que los tosilatos A3 y M3 son efectivos para inhibir el crecimiento de *G. lamblia* incluso presentan una mayor actividad que las controles Abz, Mbz y Mtz y no son citotóxicos para las células VERO; además de presentar un efecto selectivo sobre los parásitos, por lo que el uso de las sales es viable para continuar con estudios que respalden que la elección del contraión tosilato modula positivamente el efecto antiparasitario.
- Para *E. histolytica*, el besilato A1 no mostró efecto antiparasitario, mientras que el besilato M1 disminuyo su actividad antiparasitaria en comparación con Mbz. Los mesilatos A2 y M2 son efectivos para inhibir el crecimiento de *E. histolytica*; sin embargo, A2 es citotóxico para las células renales. Los Tosilatos A3 y M2 mostraron un efecto antiamebiano superior a los controles de referencia Abz y Mbz, además de no ser citotóxicos para las células renales por lo que es importante resaltar que los tosilatos son compuestos prometedores contra este parásito.
- Nuestra propuesta de hipótesis es parcialmente cierta porque los mesilatos y tosilatos incrementan su actividad antiparasitaria (*G. lamblia* y *E. histolytica*), mientras que los besilatos disminuyeron su actividad. Mientras que el mesilato A2 y el besilato M1 resultaron ser citotóxicos.
- Finalmente, nuestra investigación se suma a otras que abordan como el uso de mesilatos y tosilatos como contraiones influye positivamente en el efecto antimicrobiano de los fármacos originales, pero también depende del modelo biológico sobre el cual se realice el estudio.

11.0 Perspectivas

Es necesario realizar una exploración más exhaustiva sobre los cambios morfológicos y ultraestructurales de los trofozoítos de *G. lamblia*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*, tras ser expuestos a las sales de Abz y Mbz, mediante técnicas de microscopia electrónica de barrido y de transmisión, con el propósito de elucidar el posible mecanismo de acción de estás sales y comparar si el daño que producen es igual al del fármaco libre.

Así mismo, los resultados obtenidos demostraron que el efecto antiparasitario se ve influenciado por la elección del contraión por lo que es importante realizar estudios *in vitro,* que incluyan la permeabilidad celular, la lipofilicidad y las cinéticas de disolución con el propósito de comprender si el contraión seleccionado para la formación de sal modula el ingreso del fármaco al interior de la célula.

Por otro lado, es importante evaluar la actividad antiparasitaria de las sales de Abz y Mbz en otros modelos biológicos *in vitro*, como lo son los helmintos (parásitos multicelulares) (*Echinococcus spp, Schistosoma spp, Fasciola hepática,* etc.), con el propósito de determinar la modificación de la actividad en parásitos superiores.

12.0 Referencias

- Adam, R. D. (2001). Biology of G. lamblia. *Clin Microbiol Rev*, 14(3), 447–475. https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.447-475.2001
- Adil, M., Iqbal, W., Adnan, F., Wazir, S., Khan, I., Khayam, M.U., Kamal, M., Ahmad, A.J., Khan, I.N. (2018). Association of Mtze with Cancer: A Potential Risk Factor or Inconsistent Deductions. *Drug Metabolism, 19(11), 902-909*. http://10.2174/1389200219666180329124130
- Alves, M., Das Neves, R. N., Sena-Lopes, Â., Domingues, M., Casaril, A. M., Segatto, N. V., Nogueira, T., de Souza, M., Savegnago, L., Seixas, F. K., Collares, T. y Borsuk, S. (2020). Antiparasitic activity of furanyl N-acylhydrazone derivatives against *T. vaginalis: in vitro* and *in silico* analyses. *Parasites and vectors, 13(1), 59*. https://doi.org/10.1186/s13071-020-3923-8
- Andrew, J., Van Alst, Rhiannon, M., LeVeque, N. y DiRita, V. (2024). Growth Curves: Generating Growth Curves Using Colony Forming Units and Optical Density Measurements. *JoVE Science Education Database*. https://www.jove.com/es/v/10511/growth-curves-cfu-and-optical-density-measurements?list=o486Wiij&language=Spanish
- Anichina, K., Mavrova, A., Vuchev, D., Popova-Daskalova, G., Bassi, G., Rossi, A., Montesi, M., Panseri, S., Fratev, F., Naydenova, E. (2023). Benzimidazoles Containing Piperazine Skeleton at C-2 Position as Promising Tubulin Modulators with Anthelmintic and Antineoplastic Activity. *Pharmaceuticals*, 16, 1518. https://doi.org/10.3390/ph16111518
- Anwar, T. y Samudrala, G. (2018). Bioinformatics Analysis and Functional Prediction of Transmembrane Proteins in E. histolytica. *Genes,* 9(10), 499. https://doi.org/10.3390/GENES9100499
- Ashburn, T. T. y Thor, K.B. (2004). Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, *3, 673–683*. http://101038/nrd1468
- Auriostigue-Bautista, J. C., Hernández-Vázquez, E., González-Calderón, D., Figueroa-Romero, J. L., Castillo-Villanueva, A., Torres-Arroyo, A., Ponce-Macotela, M., Rufino-González, Y., Martínez-Gordillo, M., Miranda, L. D., Oria-Hernández, J., & Reyes-Vivas, H. (2022). Discovery of Benzopyrrolizidines as Promising AntiG.sic Agents. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 828100. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.828100
- Aza Tenganán, Y. M. (2014). *Estudio de la solubilidad de la sal naproxeno-cobre en medios acuosos.* (Trabajo de grado para optar por el título de químico farmacéutico. Universidad ICESI facultad de ciencias naturales departamento de ciencias químicas programa de química farmacéutica Santiago de Cali).
- Banerjee, R., Bhatt, P.M., Ravindra, N.V. y Desiraju, G.M. (2005). Saccharin salts of active pharmaceutical ingredients, their crystal structures, and increased water solubilities. *Cryst Growth and Design, 5(6), 2301.*

- Barrón, G., Mata, C., Villarreal, T., Morales, R. y Morales, V. (2012). Inhibition on encystation of *E. histolytica* by *Lactoccocuslactis. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 43(4), 31-37.*
- Barrón, G., Rodríguez, R., Quiñonez, Y. (2010). G. lamblia growth inhibition by action of the aqueous and methanolic extract of cucurbita pepo seed. *Rev iberoamericana para la investigación y el Desarrollo educativo*,1(1),7467.
- Belfares, L., Perrier, M., Ramsay, B.A., Ramsay, J.A., Jolicoeur, M., Chavarie, C. (1995). Multi-inhibition kinetic model for the growth of Alcaligenes eutrophus. *Can J Microbiol*., 41(13):249-256. Doi:10.1139/m95-193
- Benchimol, M., Piva, B., Campanati, L., y de Souza, W. (2004). Visualization of the funis of G. lamblia by high-resolution field emission scanning electron microscopy--new insights. *Journal of structural biology*, 147(2), 102–115. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2004.01.017
- Bettencourt, S. (2001). Caracterización farmacológica del Abz sulfóxido y de sus enantiómeros en ovejas y ratas. Análisis del metabolismo ruminal. (Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona). http://hdl.handle.net/10803/5370
- Bharate, S. S. (2021). Recent developments in pharmaceutical salts: FDA approvals from 2015 to 2019. Drug discovery today, 26(2), 384–398. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.11.016
- Bolla, G. y Nangia, A. (2018). Novel pharmaceutical salts of Abze. *CrystEngComm, 20, 6394-6405*. https://doi.org/10.1039/C8CE01311J
- Bouchemal, K., Bories, C. y Loiseau, P. M. (2017). Strategies for Prevention and Treatment of *T. vaginalis* Infections. *Clinical Microbiology Reviews, 30(3), 811-825*. http://10.1128/ CMR.00109-16
- Brahmankar, D.M. y Jaiswal, S.B. (2009). Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. A Treatise (2 Ed.). New Delhi, India: Vallabh Prakashan. 399-401.
- Brusau, E. V., Camí, G.E., Narda, G.E., Cuffini, S., Ayala, A.P. y Ellena, J. (2008). Synthesis and Characterization of a New Mbze Salt: Mbze Hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 97(1), 542-552*. https://doi.org/10.1002/jps.21164
- Buchter, V., Priotti, J., Leonardi, D., Lamas, M. C., y Keiser, J. (2020). Preparation, Physicochemical Characterization and In Vitro and In Vivo Activity Against Heligmosomoides polygyrus of Novel Oral Formulations of Abze and Mbze. *Journal of pharmaceutical sciences*, 109(5), 1819–1826. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.02.002
- Carrero, J. C., Reyes-López, M., Serrano-Luna, J., Shibayama, M., Unzueta, J., León-Sicairos, N., & de la Garza, M. (2020). Intestinal amoebiasis: 160 years of its first detection and still remains as a health problem in developing countries. *International journal of medical microbiology* : IJMM, 310(1), 151358. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.151358

- Carter,R., Nabarro, L.E., Hedley, L., Chiodini, P.L. (2018). Nitroimidazole-refractory G.sis: a growing problem requiring rational solutions. *Clinical Microbiology and Infection*, 24, (1), 37-42. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.05.028.
- Chacín-Bonilla L. (2012). Farmacoterapia actual de la amibiasis, avances en nuevas drogas y diseño de una vacuna. *Investigación clínica, 53(3), 301 – 314.*
- Chacín-Bonilla, L. (2013). Amebiasis: aspectos clínicos, terapéuticos y de diagnóstico de la infección. *Revista Médica de Chile*, *141(5), 609-615*. http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872013000500009
- Chai, J. Y., Jung, B. K., y Hong, S. J. (2021). Abze and Mbze as Anti-Parasitic and Anti-Cancer Agents: an Update. *The Korean journal of parasitology,* 59(3), 189–225. https://doi.org/10.3347/kjp.2021.59.3.189
- Chávez-Munguía, B., Castañón, G., Hernández-Ramírez, V. I., González-Lázaro, M., Talamás-Rohana, P., y Martínez-Palomo, A. (2012). E. histolytica electrondense granules secretion *in vitro* and *in vivo*: Ultrastructural study. *Microscopy Research and Technique*, *75*(2), 189–196. https://doi.org/10.1002/JEMT.21042
- Chávez- Ríos, K. Y. (2025). Síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de las sales metálicas de Cu (II), Zn (II) y Co (II) con un ligante de importancia biológica; Albendazol. Tesis licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de química.
- Chiba, Y., Kohri, N., Iseki, K., Miyazaki, K. (1991). Improvement of dissolution and bioavailability for Mbze, an agent for human echinococcosis, by preparing solid dispersion with polyethylene glycol. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 39:2158–2160. doi: 10.1248/cpb.39.2158.
- Brookie M. Best. (2017). Infectious diseases: Chapter: 13: Clinical Pharmacology of Anti-Infectives During Pregnancy. 173-199.
- Cortés, N., Nuñez, I., Elgueta, C., Parraguez, J., Sagua, H. (2006). Evaluation of four media the primary isolation of T. vaginalis. *Rev. cienc. Salud,* 10(1): 28-33. https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-490401
- Cowan, N., Meier, C., Neodo, A. y Keizer, J. (2017). Exposure of Heligmosomoides polygyrus and Trichuris muris to Abze, Abze sulfoxide, Mbze and oxantel pamoate in vitro and in vivo to elucidate the pathway of drug entry into these gastrointestinal nematodes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, 7(2): 159-173.*
- CSG: Consejo de Salubridad General. (2017). *Cuadro básico y catálogos de medicamentos*. http://www.csg.gob.mx/contenidos/priorizacion/cuadro-basico/med/catalogos.html
- Cuellar Guevara, F. (2015). Actividad biológica de bacteriocinas sobre el enquistamiento de *E. histolytica* hm1-imss y características nanomecánicas de la superficie celular al microscopio de

fuerza atómica. (Tesis maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de ciencias biológicas). https://core.ac.uk/download/pdf/76599389.pdf

- Cuellar Guevara, F., Barrón González, M.P. y Menchaca Arredondo, M.P. (2019). Effect of Lactobacillus Postbiotics on *E. Histolytica* Trophozoites. *Revista de investigación clínica*, 71(6).
- Dahan, A., Miller, J. M., & Amidon, G. L. (2009). Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs. *The AAPS journal*, 11(4), 740–746. https://doi.org/10.1208/s12248-009-9144-x
- Dayan A. D. (2003). Abze, Mbze and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta tropica,* 86(2-3), 141–159. https://doi.org/10.1016/s0001-706x(03)00031-7
- Dayan, A. D. (2003). Abze, Mbze and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta tropica*, 86(2-3), 141–159. https://doi.org/10.1016/s0001-706x(03)00031-7
- De Paula, K., Camí, G. E., Brusau, E. V. y Narda, G. E. (2013). Mbze Mesylate Monohydrate: A New Route to Improve the Solubility of Mbze Polymorphs. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 102(10), 3528-3538*. https://doi.org/10.1002/jps.23658
- Díaz, R., y Ramírez, P. (2016). Cytotoxicity evaluation of polyethylcyanoacrylate nanoparticles in vitro and in vivo. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 47(1), 43- 54.
- Ding, Yili, Zhiyuan Zhang, Charles Ding, Shufeng Xu, and Zhe Xu. 2023. "The Use of Cyclodextrin Inclusion Complexes to Increase the Solubility and Pharmacokinetic Profile of Abze" *Molecules*, 28, 21: 7295. https://doi.org/10.3390/molecules28217295
- Dogra, N.; Kumar, A.; Mukhopadhyay, T. (2018). Fenbendazol actúa como un agente desestabilizador de microtúbulos moderado y provoca la muerte de células cancerosas mediante la modulación de múltiples vías celulares. *Ciencia Rep*. 8, 11926.
- Domínguez, V. I. G. (2015). Actividad anti-G. in vitro de los compuestos de Foeniculum vulgare y Citrus aurantifolia. (Tesis Maestría, Universidad autónoma de Nuevo León). http: http://eprints.uanl.mx/9404/1/1080214901.pdf
- Duque-Montaño, B. E. (2014). Evaluación de la actividad antiparasitaria de nuevos compuestos derivados de quinoxalinas- Di- N-Óxidos e Iminas aromáticas sobre trofozoítos de *E. histolytica.* (Tesis Doctorado, Universidad Autónoma del Estado de Morelos).
- Duque-Montaño, B. E., Gómez-Caro, L. C., Sanchez-Sanchez, M., Monge, A., Hernández-Baltazar, E., Rivera, G. y Torres-Angeles, O. (2013). Synthesis and *in vitro* evaluation of new ethyl and methyl quinoxaline-7-carboxylate 1,4-di-N-oxide against *E. histolytica*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry, 4550-4558*. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.05.036

- Ehrenkaufer, G. M., Suresh, S., Solow-Cordero, D. y Upinder, Singh. (2018). High-Throughput Screening of E. Identifies Compounds Which Target Both Life Cycle Stages and Which Are Effective Against Mtze Resistant Parasites. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiolgy, 8 (276)*. http://10.3389/fcimb.2018.00276
- Elayapillai, S., Ramraj, S., Benbrook, DM, Bieniasz, M., Wang, L., Pathuri, G., Isingizwe, ZR, Kennedy, AL, Zhao, YD, Lightfoot, S., Hunsucker, LA, y Gunderson, CC (2021). Potencial y mecanismo del Mbz para el tratamiento y mantenimiento del cáncer de ovario. *Oncología ginecológica*, *160* (1), 302–311. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2020.10.010
- Elmaaty, AA, Darwish, KM, Chrouda, A., Boseila, AA, Tantawy, MA, Elhady, SS, Shaik, AB, Mustafa, M. y Al-Karmalawy, AA (2021). Estudios in silico e in vitro para la reutilización de antihelmínticos de bencimidazol como antagonistas de VEGFR-2: nuevas micelas mixtas cargadas con Mbz con disolución mejorada y actividad anticancerígena. *ACS omega*, 7 (1), 875–899. https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05519
- Emery-Corbin, S. J., Su, Q., Tichkule, S., Baker, L., Lacey, E., & Jex, A. R. (2021). In vitro selection of G. duodenalis for Abze resistance identifies a β-tubulin mutation at amino acid E198K. International journal for parasitology. *Drugs and drug resistance*, 16, 162–173. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.05.003
- Eriksen, J. B., Christensen, S. B., Bauer-Brandl, A., y Brandl, M. (2022). Dissolution/Permeation of Albendazole in the Presence of Cyclodextrin and Bile Salts: A Mechanistic In Vitro Study into Factors Governing Oral Bioavailability. *Journal of pharmaceutical sciences*, *111*(6), 1667–1673. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.11.010
- Ertabaklar, H., Yaman Karadam, S., Malatyalı, E., y Ertuğ, S. (2016). T. vaginalis klinik izolatlarında in vitro Mtz direncinin araştırılması [Investigation of in vitro Mtze resistance in the clinical isolates of T. vaginalis]. *Mikrobiyoloji bulteni*, 50(4), 552–558. https://doi.org/10.5578/mb.30140

  European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 38,15–38.
- Fabbri, J., Pensel, P. E., Albani, C. M., Lopez, L. M., Simonazzi, A., Bermudez, J. M., Palma, S. D., y Elissondo, M. C. (2020). Abze solid dispersions against alveolar echinococcosis: a pharmacotechnical strategy to improve the efficacy of the drug. *Parasitology*, 147(9), 1026–1031. https://doi.org/10.1017/S0031182020000670
- Feria-Velasco, A., y Treviño, N. (1972). The ultrastructure of trophozoites of E. histolytica with particular reference to spherical arrangements of osmiophilic cylindrical bodies. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *19*(1), 200–211. https://doi.org/10.1111/J.1550-7408.1972.TB03436.X
- Ferraz, R., Silva, D., Días, A.R., Dias, V., Santos, M.M., Pinheiro, L., Prudêncio, C., Noronha, J.P., Petrovski, Z., Branco, L.C. (2020). Synthesis and Antibacterial Activity of Ionic Liquids and

Organic Salts Based on Penicillin G and Amoxicillin hydrolysate Derivatives against Resistant Bacteria. *Pharmaceutics,12,221*. http:10.3390/pharmaceutics12030221.

- Ferri, M., Ranucci E., Romagnoli, P. y Giaccone, V. (2017). Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57(13),2857-2876.*
- Fink, M., Shapiro, D., Singer, M. (2020). G. lamblia: Laboratory Maintenance, Lifecycle Induction, and Infection of Murine Models. *Curr Protoc Microbiol*. 57(1): e102. doi: 10.1002/cpmc.102
- Flores-Pacheco, D., Mondragón-Vásquez, K., Domínguez-Chávez, J.G., Duque-Montaño, B.E., Torres-Ángeles, O., Rivera-Islas. (2018). Preparation, characterization, intrinsic dissolution studies and microbiological assessment of dapsone tosylate polymorphs. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 17, 2321- 2327.*
- Gadelha, A. P. R., Benchimol, M., y de Souza, W. (2020). The structural organization of G. intestinalis cytoskeleton. *Advances in parasitology*, 107, 1–23. https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.08.003
- Gaona Bonfil, J. M. (2020). Tesis de licenciatura. “Desarrollo de preformulaciones conteniendo nuevas fases sólidas de albendazol”. Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. https://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/3287/GABJNN00.pdf?sequence=1
- Ghanbarzadeh, S., Khalili, A., Jouyban, A., Emami, S., Javadzadeh, Y., Solhi, M., y Hamishehkar, H. (2016). Dramatic improvement in dissolution rate of albendazole by a simple, one-step, industrially scalable technique. *Research in pharmaceutical sciences*, 11(6), 435–444. https://doi.org/10.4103/1735-5362.194868
- Getacher, F.D., Edosa K. W., Tigist, G. y Alemu, G. (2019). Intestinal parasitic infections and associated factors among street dwellers’ in Dessie town, North-East Ethiopia: a cross sectional study. BMC Research Notes,12, 262.https://doi.org/10.1186/s13104-019-4302-4
- Ghosh, S., Padalia, J. y Shannon, M. (2019). Tissue Destruction Caused by *E. histolytica* Parasite: Cell Death, Inflammation, Invasion, and the Gut Microbiome. *Current Clinical Microbiology Reports*, *6(1), 51–57*. http://10.1007/s40588-019-0113-6
- Golla, U., Patel, S., Shah, N., Talamo, S., Bhalodia, R., Claxton, D., Dovat, S., y Sharma, A. (2024). From Deworming to Cancer Therapy: Benzimidazoles in Hematological Malignancies. Cancers, 16(20), 3454. https://doi.org/10.3390/cancers16203454
- Gómez -García, C., Marchat, L., López-Cánovas, L., Pérez, G., Rodríguez, M. y Orozco,E. (2015). Drug Resistance Mechanisms in *E. histolytica, G. lamblia, T. vaginalis*, and Opportunistic Anaerobic Protozoa. Douglas, L., Mayers, J. D., Sobel, M. O., Keith, S. K. y Dror, M. (Eds.), *Antimicrobial Drug Resistance*, 2(1), 613- 628. http://10.1007/978-3-319-46718-4_40.

- González, Z., Montezuma, R., y Tasón de Camargo, M. (2018). Aislamiento y cultivo de T. vaginalis. Plus (+) Economía, 7, 1.
- GPC (2018). *Guía de práctica clínica: Prevención, diagnóstico y tratamiento de la G.sis, en niños y adolescentes en el primer y segundo nivel de atención*. http://sgm.issste.gob.mx/medica/medicadocumentacion/guiasautorizadas/Pediatria/ISSSTE-252-12-G.sis/G.sis270812.pdf
- Graves, R. A., Ledet, G. A., Nation, C. A., Pramar, Y. V., Bostanian, L. A., y Mandal, T. K. (2015). Effect of squalane on Mbze-loaded Compritol® nanoparticles. *Journal of biomaterials science*. Polymer edition, 26(13), 868–880. https://doi.org/10.1080/09205063.2015.1061351
- Gupta, D., Bhatia, D., Dave, V., Sutariya, V., Varghese Gupta, S. (2018). Salts of Therapeutic Agents: Chemical, Physicochemical, and Biological Considerations. *Molecules*, 23, 1719. https://doi.org/10.3390/molecules23071719
- Hagen, K. D., McInally, S. G., Hilton, N. D., y Dawson, S. C. (2020). Microtubule organelles in G.. In *Adv Parasitol* (Vol. 107, pp. 25–96). https://doi.org/10.1016/BS.APAR.2019.11.001
- Hamdan, I. I., El-Sabawi, D., Darwish, R., y Dahabiyeh, L. A. (2020). Preparation, characterization and antimicrobial assessment of selected ciprofloxacin salts. *Acta pharmaceutica*, 71(3), 365–382. https://doi.org/10.2478/acph-2021-0028
- He, Y., Orton, E. y Yang, D. (2018). The Selection of a Pharmaceutical Salt the Effect of the Acidity of the Counterion on Its Solubility and Potential Biopharmaceutical Performance. *Journal of pharmaceutical Science, 107: 419- 425*. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.10.032
  Hernandez, B., Gomez, S., Sanchez, A., Marcial, J., Rocha, M., Santos, A., Ramirez, E., Arreguin, R., Cuevas, M., Mendez, A., Calderon E. (2020). Enhanced AntiG.l Effect of Omeprazole Analog Benzimidazole Compounds. *Molecules,* 25(17): 3979.
- Hernández-Nava, E., Cuellar, P., Nava, P., Chávez-Munguía, B., Schnoor, M., Orozco, E. y Betanzos, A. (2017). Adherens junctions and desmosomes are damaged by E. histolytica: Participation of EhCPADH complex and EhCP112 protease. *Cellular microbiology*, 19(11). https://doi.org/10.1111/cmi.12761
- Hernández-Núñez, E. l., Tlahuext, H., Moo-Puc, R., Moreno, D., González-Díaz, M. O. y Navarrete Vázquez, G. (2017). Design, Synthesis and Biological Evaluation of 2-(2-Amino-5(6)-nitro-1H-benzimidazol-1-yl)-N-arylacetamides as Antiprotozoal Agents. *Molecules, 22(4), 579.* http://10.3390/molecules22040579
- Henley, G. L., Henley, G. L., Lee, C. M., y Takeuchi, A. (1976). Freeze-etching observations of trophozoites of pathogenic E. histolytica. *Parasitology Research*, *48*(3), 181–190. https://doi.org/10.1007/BF00380391

- Hibbard, T., Nyambura, B., Scholes, P., Totolici, M., Shankland, K., y Al-Obaidi, H. (2023). Preparation and Physiochemical Analysis of Novel Ciprofloxacin / Dicarboxylic Acid Salts. *Journal of pharmaceutical sciences,* 112(1), 195–203. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.08.008
- Himmelreich M., Rawson BJ., Watson TR. (1977). “Polymorphic forms of Mbze”. Aust J *Pharmaceutical Sciences, 6, 123 – 125.*
- Houpt, E., Chaudhry, O. (2009). CHAPTER 83 - PROTOZOAN AND HELMINTHIC INFECTIONS. Editor(s): Scott A. Waldman, Andre Terzic, Laurence J. Egan, Jean-Luc Elghozi, Arshad Jahangir, Garvan C. Kane, Walter K. Kraft, Lionel D. Lewis, Jason D. Morrow, Leonid V. Zingman, Darrell R. Abernethy, Arthur J. Atkinson, Neal L. Benowitz, D. Craig Brater, Jean Gray, Peter K. Honig, Gregory L. Kearns, Barbara A. Levey, Stephen P. Spielberg, Richard Weinshilboum, Raymond L. Woosley. Pharmacology and Therapeutics, 1171-1186, https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3291-5.50087-1.
- Hossein, H., Parvin, R., Mohsen, A. y Mahdi D. (2019). G. lamblia infection: review of current diagnostic strategies. *Gastroenterololy and Hepatology from Bed to Bench*,*12(1), 3–12.*
- Hu, C., Zhengsheng, L., Chengyu, L., Jianhua, L., Zhixin, W., Liuting, X., Cen, C., Haining, F. y Feng, Q. (2019). Enhanced Oral Bioavailability and Anti-Echinococcosis Efficacy of Abze Achieved by Optimizing the "Spring" and "Parachute". *Molecular Pharmaceutics, 16(12), 4978-4986.* http://10.1021/acs.molpharmaceut.9b00851.
- Ibáñez, E. A. (2016). T. vaginalis: corroboración experimental de modelos virtuales de cribado farmacológico y caracterización biomolecular de aislados [Tesis Doctoral, Universidad complutense de Madrid]. https://eprints.ucm.es/id/eprint/35124/1/T36743.pdf
- Ibáñez-Escribano, A. y Gómez-Barrio, A. (2017). T. vaginalis: The versatility of a tenacious parasite. *Real Academia Nacional de Farmacia, 83(1), 10- 47.* https://analesranf.com/wp-content/uploads/2017/83_01/8301_03.pdf
- Ibáñez-Escribano, A., Nogal-Ruiz, J.J. (2024). The Past, Present, and Future in the Diagnosis of a Neglected Sexually Transmitted Infection: Trichomoniasis. *Pathogens*, 13(2):126. https://doi.org/10.3390/pathogens13020126
- Instituto nacional de higiene: Rafael Rangel, s.f. Ciudad Universitaria UCV, Los Chaguaramos. Caracas - República Bolivariana de Venezuela.
  https://inhrr.gob.ve/fichasfarma/archivos/20170120112310_8331.pdf
  https://inhrr.gob.ve/fichasfarma/archivos/20250113104745_1652.pdf
- IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (2006) salt' in Compendium of Chemical Terminology, 3rd ed. International Union of Pure and Applied Chemistry. Online version 3.0.1, 2019. https://doi.org/10.1351/goldbook.S05447

- Jackson- Akers, J. Y., Prakash, V. y Oliver, T. I. (Septiembre 2020). *Amebic Liver Abscess*.
- Khattab, M., & Al-Karmalawy, A. A. (2021). Computational repurposing of benzimidazole anthelmintic drugs as potential colchicine binding site inhibitors. *Future medicinal chemistry*, 13(19), 1623–1638. https://doi.org/10.4155/fmc-2020-0273
- Koradia, K., Parikh, R., Koradia, H. (2017). Nanocristales de Abz: optimización, estudios espectroscópicos, térmicos y antihelmínticos. *J. Entrega de drogas*. *Ciencia. Tecnología*, 43.
- Kulakova, L., Galkin, A., Chen, C., Southall, N., Marugan, J., Zheng, W., Herzberg, O. (2014). Discovery of Novel AntiG.sis Drug Candidates. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(12): 7303–7311.
- Leitsch, D. (2017). Drug susceptibility testing in microaerophilic parasites: Cysteine strongly affects the effectivities of Mtze and auranofin, a novel and promising antimicrobial. *The International Journal for Parasitology – Drugs and Drug Resistance,* 7(3): 321–327. http: 10.1016/j.ijpddr.2017.09.001
- León Coria A. (2012). Morfogénesis de la pared celular y propiedades biofísicas de E. histolytica durante su diferenciación. Tesis maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León facultad de ciencias biológicas.
- Li, S., Zou, Y., Zhang, X. L., Wang, P., Chen, X. Q., & Zhu, X. Q. (2020). Prevalence and Multilocus Genotyping of G. lamblia in Cattle in Jiangxi Province, China: Novel Assemblage E Subtypes Identified. *The Korean journal of parasitology*, 58(6), 681–687. https://doi.org/10.3347/kjp.2020.58.6.681
- Liang, Z., Chen, M., Yan, Y., Chen, D., Xie, S. (2022). Nanocrystal Suspensions for Enhancing the Oral Absorption of Abze. *Nanomaterials*, 12, 3032. https://doi.org/10.3390/nano12173032
- Liu, C. S., Zhang, H. B., Jiang, B., Yao, J. M., Tao, Y., Xue, J., y Wen, A. D. (2012). Enhanced bioavailability and cysticidal effect of three Mbze-oil preparations in mice infected with secondary cysts of Echinococcus granulosus. *Parasitology research*, 111(3), 1205–1211. https://doi.org/10.1007/s00436-012-2954-2
- Liu, C. S., Zhang, H. B., Lei, W., Zhang, C. W., Jiang, B., Zheng, Q., Yin, J. H., y Han, X. M. (2014). An alternative Mbze formulation for cystic echinococcosis: the treatment efficacy, pharmacokinetics and safety in mice. *Parasites & vectors*, 7, 589. https://doi.org/10.1186/s13071-014-0589-0
- Liu, J., Ma'ayeh, S., Peirasmaki, D., Lundström-Stadelmann, B., Hellman, L., y Svärd, S.G. (2018). Secreted G. intestinalis cysteine proteases disrupt intestinal epithelial cell junctional complexes and degrade chemokines*. Virulence*, 9(1), 879–894. http//: 10.1080/21505594.2018.1451284

- López, E. (2021). SARCODINA GENERALIDADES Y SISTEMATICA. Disponible en: http://www.ciencias.ula.ve/biolprot/protozoo/sarcodin.htm#:~:text=Los%20Sarcodinas%20incluyen%20a%20todas,par%C3%A1sita%20ha%20mantenido%20esta%20estructura
- Lushbaugh, W. B., y Pittman, F. E. (1979). Microscopic Observations on the Filopodia of E. histolytica. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *26*(2), 186–195. https://doi.org/10.1111/J.1550-7408.1979.TB02759.X
- Lushbaugh, W. B. y Miller, J. H. (1974). Fine structural topochemistry of E. histolytica Schaudinn, 1903. *Journal of Parasitology*, 60(3), 421–433. https://doi.org/10.2307/3278355
- Mabaso, N., y Abbai, N. (2021). Distribution of genotypes in relation to Mtze susceptibility patterns in T. vaginalis isolated from South African pregnant women. *Parasitology research*, 120(6), 2233–2241. https://doi.org/10.1007/s00436-021-07177-w
- Marinescu, M. (2023). Benzimidazole-Triazole Hybrids as Antimicrobial and Antiviral Agents: A Systematic Review*. Antibiotics*, 12, 1220. https://doi.org/10.3390/antibiotics12071220
- Martínez – Espinosa R. (2015). Análisis del efecto citotóxico oxidante del Abz y el papel del metabolismo antioxidante en la resistencia a este fármaco en G. duodenalis. (Tesis Doctorado, Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional).
- Martínez, G. y Gómez, M.A. (2007). Ciclodextrinas: complejos de inclusión con polímeros. *Revista Iberoamericana de Polímeros,8(4).*
- Martínez, M.A. (2009). Microbiological diagnosis of sexually transmitted infections (STI). *Rev Chil Infect*, 26 (6): 529-539.
- Martínez-Conde, C., Colín-Lozano, B., Gutiérrez-Hernández, A., Hernández-Núñez, E., Yépez-Mulia, L., Colorado-Pablo, L.F., Aguayo-Ortiz, R., Escalante, J., Rivera-Leyva, J.C., Sánchez-Carranza, J.N. (2023). Enhancing Giardicidal Activity and Aqueous Solubility through the Development of “RetroABZ”, a Regioisomer of Abze: In Vitro, In Vivo, and In Silico Studies. *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 14949. https://doi.org/10.3390/ijms241914949
- Matadamas-Martínez, F., Nogueda-Torres, B., Castillo, R., Hernández-Campos, A., Barrera-Valdes, M. L., León-Ávila, G., Hernández, J. M., & Yépez-Mulia, L. (2020). Characterisation of the in vitro activity of a Nitazoxanide-N-methyl-1H-benzimidazole hybrid molecule against Abze and nitazoxanide susceptible and resistant strains of G. intestinalis and it’s in vivo giardicidal activity. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 115, e190348. https://doi.org/10.1590/0074-02760190348
- McEwen, S. y Collignon, P. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology Spectrum, 6(2).* http:// 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017
- McInally, S. G., y Dawson, S. C. (2016). Eight unique basal bodies in the multi-flagellated diplomonad G. lamblia. Cilia, 5(1), 21. https://doi.org/10.1186/S13630-016-0042-4

- Meco, D., Attinà, G., Mastrangelo, S., Navarra, P., Ruggiero, A. (2023). Emerging Perspectives on the Antiparasitic Mebendazole as a Repurposed Drug for the Treatment of Brain Cancers. *Int. J. Mol. Sci*. 24, 1334. https://doi.org/10.3390/ijms24021334
- Mesallati, H., Umerska, A. y Tajber, L. Fluoroquinolone Amorphous Polymeric Salts and Dispersions for Veterinary Uses. *Pharmaceutics*., 2019,11,268. DOI: 10.3390/pharmaceutics11060268.
- Michel, R. y Schupp, E. (1975). Fibrilläre und tubuläre Feinstrukturen im Cytoplasma von E. histolytica [Fibrillar and tubular fine structures in the cytoplasm of E. histolytica (author's transl)]. *Zeitschrift fur Parasitenkunde (Berlin, Germany)*, *47*(1), 11–21. https://doi.org/10.1007/BF00418061
- Mingjie, W., Shuhua, X., Junjie, C., Bin, L., Cheng, F., Weixia, S., Hotez, P. (2002). Abze-soybean oil emulsion for the treatment of human cystic echinococcosis: evaluation of bioavailability and bioequivalence. *Acta Tropica*, 83:177–181. doi: 10.1016/S0001-706X(02)00096-7.
- Mora, C., Tello, M. y Martínez, F. (2006). Validación de una Metodología Analítica para la Cuantificación de Naproxeno en Estudios de Reparto Líquido/Líquido mediante espectrofotometría ultravioleta. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmaceuticas,1, 81-105.*
- Morris, S. R. (2019). *Tricomoniasis*. Manual MSD versión para profesionales. https://www.msdmanuals.com/es-cl/professional/enfermedades-infecciosas/enfermedades-de-transmisi%C3%B3n-sexual/tricomoniasis
- Mosquera, G.W., Criado, L.Y. y Guerra, B.E. (2020). Actividad antimicrobiana de hongos endófitos de las plantas medicinales Mammea americana (Callophyllaceae) y Moringa oleífera (Moringaceae). *Biomédica*, 40(1), 55–71. http:// 10.7705/biomedica.4644
- Muñoz, M.L., y Tovar, R. (2001). E. histolytica trophozoites activated by collagen type I and Ca(2+) have a structured cytoskeleton during collagenase secretion. *Cell motility and the cytoskeleton*, *50*(1), 45–54. https://doi.org/10.1002/cm.1040
- Navarrete-Vázquez, G., Yépez, L., Hernández-Campos, A., Tapia, A., Hernández-Luis, F., Cedillo, R., González, J., Martínez-Fernández, A., Martínez-Grueiro, M., y Castillo, R. (2003). Synthesis and antiparasitic activity of Abze and Mbze analogues*. Bioorganic & medicinal chemistry*, 11(21), 4615–4622. https://doi.org/10.1016/s0968-0896(03)00497-8
  NCBI. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430832/
- Ngobese, B., Singh, R., Han, K. S. S., Tinarwo, P., Mabaso, N., y Abbai, N. S. (2022). Detection of Mtze resistance in T. vaginalis using uncultured vaginal swabs. *Parasitology research,* 121(8), 2421–2432. https://doi.org/10.1007/s00436-022-07548-x

- Nosala, C., Hagen, K. D., y Dawson, S. C. (2018). 'Disc-o-Fever': Getting Down with G.'s Groovy Microtubule Organelle. *Trends in cell biology*, 28(2), 99–112. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.10.007
- Olivos-García, A., Saavedrab, E., Nequiz Avendañoa, M., y Pérez-Tamayo, R. (2011). Amebiasis: Molecular mechanisms of E. histolytica pathogenicity. *Revista de la Facultad de Medicina (México),* 54(2). http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422011000200003
- Ordóñez-Mena, J.N., McCarthy, N. D. y Fanshawe, T. R. (2018). Comparative efficacy of drugs for treating G.sis: a systematic update of the literature and network meta-analysis of randomized clinical trials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 73(3), 596–606*.
- Ordoñez Quiroz, A. (2015). Determinación del daño al dna de G. duodenalis por Mtz y evaluación de la participación de la vía de reparación por recombinación homóloga. Tesis maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Orozco, E., Gharaibeh, R., Riverón, A. M., Delgadillo, D. M., Mercado, M., Sánchez, T., Gómez Conde, E., Vargas, M. A., y López-Revilla, R. (1997). A novel cytoplasmic structure containing DNA networks in E. histolytica trophozoites. *Molecular Genetics and Genomics*, *254*(3), 250–257. https://doi.org/10.1007/S004380050413
- Ortiz, L. J.C. y Balderrabano, L. A. (2017). Importancia de las sales orgánicas en la industria farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias farmacéuticas, 48(1), 18- 42.*
- Oxberry, M.E, Thompson, R.C.A, Reynoldson, J.A. (1994). Evaluation of the effects of Abze and Mtze on the ultrastructure of G. duodenalis, T. vaginalis and Spironucleus muris using transmission electron microscopy. *Int J Parasitol*, 24, 695–703. doi: 10.1016/0020-7519(94)90123-6.
- Palos, I., Moo-Puc, R., Vique-Sánchez, J. L., Benítez-Cardoza, C. G., Monge, A., Villalobos-Rocha, J. C., Paz-Gonzalez, A. D., y Rivera, G. (2020). Esters of quinoxaline-7-carboxylate-1,4-di-N-oxide as T. vaginalis triosephosphate isomerase inhibitors. *Acta pharmaceutica*, 71(3), 485–495. https://doi.org/10.2478/acph-2021-0032
- Paulekuhn, G.S., Dressman, J.B. y Saal, C. (2013). Salt screening and characterization for poorly soluble, weak basic compounds: case study Abze. *Pharmazie, 68(7),555-64*.
- Pearson, R.D. (2017). *Revisión sobre las infecciones por protozoos intestinales y microsporidios*. https://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/enfermedades-infecciosas/protozoos-intestinales-y-microsporidias/revisi%C3%B3n-sobre-las-infecciones-por-protozoos-intestinales-y-microsporidios

- Pech Santiago, E. O. (2018). “Identificación de proteínas asociadas a la biotransformación del Abz y su posible relación con la resistencia en G. duodenalis a este fármaco”. Tesis maestría Centro De Investigación Y De Estudios Avanzados Del Instituto Politécnico Nacional, México.
- Pensel, P. E., Castro, S., Allemandi, D., Bruni, S. S., Palma, S. D., y Elissondo, M. C. (2014). Enhanced chemoprophylactic and clinical efficacy of Abze formulated as solid dispersions in experimental cystic echinococcosis. *Veterinary parasitology*, 203(1-2), 80–86. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.027
- Perazzi, B., Menghi, C., Coppolillo, E., Gatta, C., Cora, E., Vay, C., Méndez, O., Malamud de Rudavega, H., De torres, R. y Famiglietti, A. (2007). Investigación de *T. vaginalis* durante el embarazo mediante diferentes metodologías Investigación de *T. vaginalis* durante el embarazo mediante diferentes metodologías. *Revista Argentina de Microbiología, 39, 99-104.*
- Pérez-Villanueva, J., Hernández-Campos, A., Yépez-Mulia, L., Méndez-Cuesta, C., Méndez-Lucio, O., Hernández, F., Castillo, R. (2013). Synthesis and antiprotozoal activity of novel 2-{[2-(1H-imidazol-1-yl) ethyl]sulfanyl}-1H-benzimidazole derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 23, 4221-4224*. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.05.012
- Perini, V., Schacke, M., Liddle, P., Vilchez-Larrea, S., Keszenman, D. J., y Lafon-Hughes, L. (2020). PARP Inhibitor Olaparib Causes No Potentiation of the Bleomycin Effect in VERO Cells, Even in the Presence of Pooled ATM, DNA-PK, and LigIV Inhibitors. *International Journal of Molecular Science,* 21(21), 8288. http:10.3390/ijms21218288
- Pfankuch, F., Rettig, H., Stahl, P.H. (2002). Biological effect of the drug salt form. In: Handbook of pharmaceutical salts. Properties, selection and use. Stahl PH, Wermuth C. editores. Germany:Verlag Helvetica Chimica Acta – Wiley- VCH; 2002. p. 126.
- Pindelska, E., Sokal, A. y Kolodziejski, W. (2017). Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques. *Advanced Drug Delivery Reviews, 117, 111-146*. https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.014
- Pinilla, R., González, I., Quintana. D.J. y Pinilla, P.M. (2015). Enfermedad hidatídica: resultados de trabajo en una colaboración internacionalista. *Revista cubana de cirugía, 54(1).*
- Pourgholami, M. H., Wangoo, K. T., & Morris, D. L. (2008). Abze-cyclodextrin complex: enhanced cytotoxicity in ovarian cancer cells. Anticancer research, 28(5A), 2775–2779.
- Racoviceanu, R., Trandafirescu, C., Voicu, M., Ghiulai, R., Borcan, F., Dehelean, C.; Watz, C., Aigner, Z., Ambrus, R., Coricovac, D.E. (2020). Solid Polymeric Nanoparticles of Abze: Synthesis, Physico-Chemical Characterization and Biological Activity. *Molecules*, 25, 5130. https://doi.org/10.3390/molecules25215130

- Radko, L., Minta, M., Jedziniak, P. y Stypuła-Tręba, S. (2017). Comparación de la citotoxicidad del Abz en términos de formación de metabolitos en cuatro sistemas modelo. *Revista de investigación veterinaria,* 61 (3), 313–319. https://doi.org/10.1515/jvetres-2017-0042
- Ragan, O., (2018). Five facts about G. lamblia. PLoS pathogens, 14(9),1007250. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007250
- Ralston K. S. (2015). Taking a bite: Amoebic trogocytosis in E. histolytica and beyond. *Current opinion in microbiology*, 28, 26–35. https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.07.009
- Rangel-Castañeda, I.A., Hernández-Hernández, J. M., Pérez-Rangel, A.,González-Pozos, S., Carranza-Rosales, P., Charles-Niño C.L., Tapia-Pastrana, G., Ramírez-Herrera, G., y Castillo-Romero, A. (2018). Amoebicidal activity of curcumin on *E. histolytica* trophozoites. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70 (3), 426–433. https://doi.org/10.1111/jphp.12867
- Rascon Castelo E. (2011). Polimorfismo de Loci Intergénicos del tRNA de E. histolytica en muestras de Aspirado de Absceso Hepático Amebiano de Pacientes en el Estado de Sonora y la Ciudad de México. (Tesis maestría, Universidad de Sonora, división de ciencias bilógicas y de la salud). http://148.225.114.121/bitstream/unison/2237/1/rasconcasteloedgaradolfom.pdf
- Rincón, A., Cuéllar, J.A., Valencia, L.F., Sánchez, O.J. (2019). Kinetics of Gluconacetobacter diazotrophicus growth using cane molasses and sucrose: Assessment of kinetic models. *Acta Biol. Colomb.,* 24, 38–57
- Rodríguez García, J. L. (2014). *Comparación de la actividad hemolítica y fosfolipásica A2 de T. vaginalis cultivada en presencia y ausencia de vitaminas 107 Diamond.* (Tesis maestría, Universidad Autónoma De Nuevo León, Facultad De Ciencias Biológicas). http://eprints.uanl.mx/4110/1/1080253715.pdf
- Rodríguez-Villar, K., Yépez-Mulia, L., Cortés-Gines, M., Aguilera-Perdomo, J. D., Quintana-Salazar, E. A., Olascoaga Del Angel, K. S., Cortés-Benítez, F., Palacios-Espinosa, J. F., Soria-Arteche, O., & Pérez-Villanueva, J. (2021). Synthesis, Antiprotozoal Activity, and Cheminformatic Analysis of 2-Phenyl-2H-Indazole Derivatives. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(8), 2145. https://doi.org/10.3390/molecules26082145
- Rojas. L., Sariego, I., Sarrial, C., y Fraga Jorge. Comportamiento “in vivo” de aislamientos de T. vaginalis, utilizando ratones NMRI como modelo experimental. *Rev Chil Infect* 2004; 21 (3): 179-185.
- Romero Cabello Raúl. (2016). Microbiologia y parasitología humana. Editorial medica panamericana,tercera edición. Página 747-760.
- Ryu, J. S., y Min, D. Y. (2006). T. vaginalis and trichomoniasis in the Republic of Korea. The Korean journal of parasitology, 44(2), 101–116. https://doi.org/10.3347/kjp.2006.44.2.101

- Saal, C. y Becker, A. (2013). Pharmaceutical salts: A summary on doses of salt formers from the Orange Book. *European Journal of Pharmaceutical Sciences 49(4):614-623.*
- Salahuddin, M. S. y Avijit, M. (2017). Benzimidazoles: A biologically active compounds". *Arabian Journal of Chemistry, 10(1), 157-173*. Doi: https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.07.017
- Santos Diéguez, I. (2014). Tricomoniasis: una visión amplia. *IATREIA; Revista médica de la universidad de Antioquia, 27(2), 198-205.*
- Santos, M.M., Alves, C., Silva, J., Florindo, C., Costa, A., Petrovski, Z., Marrucho, I.M., Pedrosa, R., Branco, L.C. (2020). Antimicrobial Activities of Highly Bioavailable Organic Salts and Ionic Liquids from Fluoroquinolones. *Pharmaceutics, 12, 694*. http://10.3390/pharmaceutics12080694.
- Sawatdee, S., Atipairin, A., Sae Yoon, A., Srichana, T., Changsan, N., Suwandecha, T. (2019). Formulation Development of Abze-Loaded Self-Microemulsifying Chewable Tablets to Enhance Dissolution and Bioavailability. *Pharmaceutics*, 11, 134. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030134
- Schcolnik-Cabrera, A.; Juárez-López, D.; Duenas-Gonzalez, A. Perspectives on Drug Repurposing. Curr. Med. Chem. 2021, 28, 2085–2099.
- Showler, A. J. y Boggild, A. K. (2013). E. histolytica. *Canadian Medical Association or its licensors,*185(12), 1064. https://doi.org/10.1503/cmaj.121576
- Silva, D., Lopes, M.V.C., Petrovski, Ž., Santos, M.M., Santos, J.P., Yamada-Ogatta, S.F., Bispo, M.L.F., de Souza, M.V.N., Duarte, A.R.C., Lourenço, M.C.S. (2022). Novel Organic Salts Based on Mefloquine: Synthesis, Solubility, Permeability, and In Vitro Activity against Mycobacterium tuberculosis. Molecules., 27, 5167. https://doi.org/10.3390/molecules27165167

- Simonazzi, A. (2019). Disperciones solidas como estrategia para mejorar la eficacia de fármacos antiparasitarios. (Tesis Doctorado, Universidad Nacional de Salta, Facultad de Ciencias químicas) https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/84554/CONICET_Digital_Nro.e1893339-9cf0-46f8-a53b-783f4f4c6191_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Simonazzi, A., Cid, A. G., Paredes, A. J., Schofs, L., Gonzo, E. E., Palma, S. D., y Bermúdez, J. M. (2018). Development and in vitro evaluation of solid dispersions as strategy to improve Abze biopharmaceutical behavior. *Therapeutic delivery*, 9(9), 623–638. https://doi.org/10.4155/tde-2018-0037
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2020). *Boletín epidemiológico número 53*. https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico

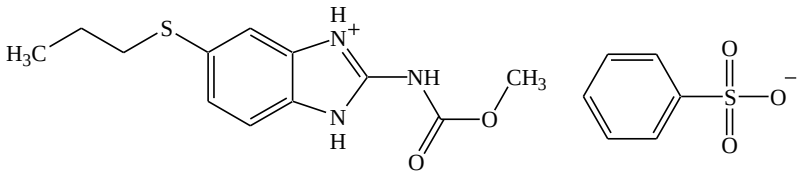
- Studenovský, M., Rumlerová, A., Kostka, L. y Etrych, T. (2021). Conjugados de polímeros a base de HPMA para el fármaco reutilizado Mbz y otros productos terapéuticos a base de imidazol. Polímeros, 13 (15), 2530. MDPI AG. Obtenido de http://dx.doi.org/10.3390/polym13152530
- Sudhakar, A., Kamanna, S., Bojja, M., & Tatu, U. (2021). Proteomic analysis of G. lamblia and T. vaginalis flagella reveal unique post-translational modifications in tubulin that provide clues to regulation of their motilities. *Proteomics*, *21*(20), 2100004. https://doi.org/10.1002/PMIC.202100004
- Sumimoto, Y., Okawa, S., Inoue, T., Masuda, K., Maruyama, M., y Higaki, K. (2022). Extensive improvement of oral bioavailability of Mbze, a brick dust, by polymer-containing SNEDDS preparation: Disruption of high crystallinity by utilizing its counter ion. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V, 172, 213–227. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.02.002
- Swanepoel, E., Liebenberg, W., Devarakonda, B. y De Villiers, M.M. (2003). Developing a discriminating dissolution test for three Mbze polymorphs based on solubility differences. *Pharmazie, 58,117-121.*
- Syazwan, S., Nurulhasanah, O. y Rahmah, N. 2018. Update on laboratory diagnosis of amoebiasis.
- Tortora, G., Funke, B. y Case, C., (2007). *Introducción a la microbiología*. (9° ed.) Buenos Aires, Argentina, Editorial Médica panamericana.
- Trejos- Suárez, J. y Castaño- Osorio J. C. (2009). Factores de virulencia del pátogeno intestinal *E. histolytica*. *Asociación Colombiana de infectología, 13,100-110*.
- U. S. Department of Health and Human Services, “FDA Guidance for industry. Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system”. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, U.S.A. [Consultado el 28 Dic 2023]. Disponible en: https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/UCM070246.pdf
- Upcroft, P., y Upcroft, J. A. (2001). Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical microbiology reviews*, 14(1), 150–164. https://doi.org/10.1128/CMR.14.1.150-164.2001
- Vázquez, F., García, J., Pérez, F. y Palacio, V. (2001). *T. vaginalis*: tratamiento y resistencia a nitroimidazoles. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica,* 19, 114-124.

- Váazquez, J., Franco, E., Reyes, G., y Meza, I. (1995). Characterization of adhesion plates induced by the interaction of E. histolytica trophozoites with fibronectin. *Cytoskeleton,* 32(1), 37–45. https://doi.org/10.1002/CM.970320105
- Villegas-Betanzo, P., Martínez-Jiménez, M.A., Guevara-Torresa, L., Quintero-Mezab, K., Sánchez-Aguilar, M. y Arriaga-Caballero, J.M. (2015). Ameboma: posibles decisiones terapéuticas en región endémica de amibiasis. *Gastroenterología Hepatología, 38(1),7-11.*
- Viovy, A., Isabel, N.H., Zamorano, P., Blanco, A.M., Revello, D. P., Vojkovic, M.L. y Cerva, J.L. (2003). Hidatidosis en la infancia: Abz en su tratamiento médico y quirúrgico. *Revista chilena de infectología, 20(4), 229- 234.*
- Vural, G., Yardimci, M., Kocak, M., Yasar, T. Ö., Kurt, A., Harem, I. S., Carradori, S., Sciamanna, I., Siles-Lucas, M., Fabiani, M., Hemphill, A., Lundström-Stadelmann, B., Cirilli, R., y Casulli, A. (2020). Efficacy of novel albendazole salt formulations against secondary cystic echinococcosis in experimentally infected mice. *Parasitology*, *147*(13), 1425–1432. https://doi.org/10.1017/S0031182020001225
- Wu, W., Löbmann, K., Rades, T. y Grohganz, H. (2018). On the role of salt formation and structural similarity of co-formers in co-amorphous drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics, 535(1-2), 86-94.* http://10.1016/j.ijpharm.2017.10.057
- Xiao, S.H., Yang, J.Q., Wang, M.J., Jiao, P.Y., Guo, F.H., Chai, J.J., Jiao, W., Hotez, P. (2002). Augmented bioavailability and cysticidal activity of Abze reformulated in soybean emulsion in mice infected with Echinococcus granulosus or Echinococcus multilocularis. *Acta Tropica*, 82:77–84. doi: 10.1016/S0001-706X(02)00027-X.
- Ximénez, C., Morán, P., Ramos, F., Ramiro, M. (2007). Amibiais intestinal: estado actual del conocimiento. Med Int Mex 2007;23(5):398-407.
- Xu, S., Duan, L., Zhang, H., Xu, B., Chen, J., Hu, W., Gui, W., Huang, F., Wang, X., Dang, Z., y Zhao, Y. (2019). In vitro efficacies of solubility-improved Mbze derivatives against Echinococcus multilocularis. *Parasitology*, 146(10), 1256–1262. https://doi.org/10.1017/S0031182019000386
- Yaoyu, F. y Lihua, X. (2011). Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of G. Species and G.sis. *Clinical microbiology reviews, 24(1),110–140.*
- Zaki, M., Raafat, D., Emshaty, WE., Azab, M.S., Goda, H. (2010). Correlation of T. vaginalis to bacterial vaginosis: a laboratory-based study. *The Journal of Infection in Developing Countries, 4, 156-163.*

Preparación de las sales

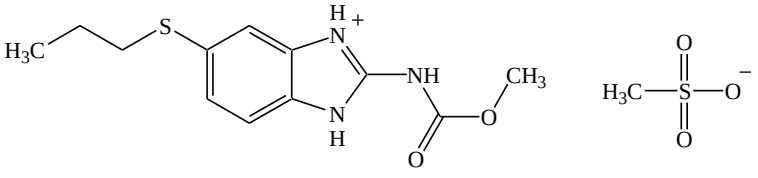
Todas las sales se prepararon utilizando una suspensión del fármaco y el ácido sulfónico en proporción equimolar, empleando acetona o metanol como fase líquida. Se colocó una mezcla del fármaco (Abz o Mbz) y el ácido sulfónico (ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico o ácido *p*-toluenosulfónico) en un vial de vidrio de 10 mL con agitador magnético y se añadió suficiente disolvente para formar una suspensión sólida. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 24 h. El disolvente se evaporó y el sólido se enjuagó con acetona o metanol para eliminar el material de partida. El rendimiento se situó entre el 60 % y el 75 %.

Caracterización de A1



Espectro de RMN ^{1}H (Bruker, 400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 7.61(d, 2H), 7.45(d, 1H), 7.37(dd, 1H), 7.31(m, 2H) 7.15(d, 2H), 3.78(s, 3H), 2.87(t, 2H), 1.53(sextet, 2H), 0.95(t, 3H). Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 154.33, 146.97, 135.3, 133.8, 128.3, 128.0, 127.6, 125.5, 124.1, 115.2, 114.0, 52.8, 36.3, 22.0, 13.1. XRPD (D2 PHASER Bruker, step 0.02, 2Θ 5-45°): 7.0°, 7.5°, 11.0°, 11.4°, 18.0°, 18.7°, 19.5°, 20.8°, 24.9°, 25.8°, 27.3°, 29.4°. FT-IR (Thermo Nicolet iS10): ν (cm^{-1}) 3321, 2958, 1711, 1615, 1585, 1441, 1263, 1092. M.p. 182-184°C

Caracterización de A2

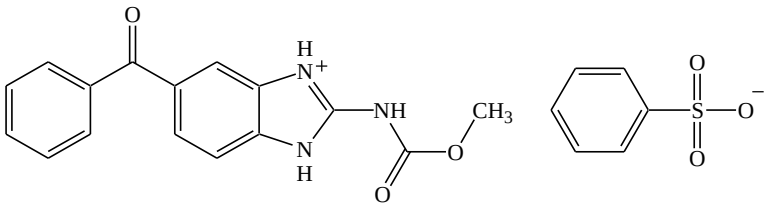


Espectro de RMN ^{1}H (Bruker, 500 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 7.54(m, 2H) 7.36(dd, 1H), 3.88(s, 3H), 2.95(t, 2H), 2.43(s, 3H)1.57(sextet, 2H), 0.97(t, 3H). Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 152.6, 144.2, 132.3, 130.0, 127.8, 125.6, 113.7, 112.9, 52.8, 36.3, 22.0, 13.1. XRPD (D2 PHASER Bruker, step 0.02, 2Θ 5-45°): 7.0°, 11.9°, 13.0°, 13.7°, 16.3°, 16.9°, 19.0°, 19.6°, 20.7°, 21.3°, 22.9°, 23.6°, 25.4°, 26.1°, 27.4°, 29.1°, 30.3°. FT-IR (Thermo Nicolet iS10): ν (cm^{-1}) 3213, 1755, 1638, 1435, 1231, 1151, 1089. M.p. 154-155°C

Caracterización de A3

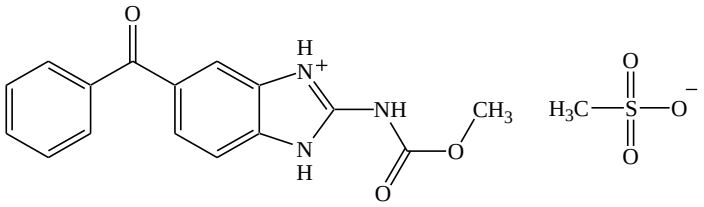
Espectro de RMN ^{1}H (Bruker, 400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 7.55-7.47(m, 4H), 7.36(dd, 1H), 7.12(d, 2H), 3.88(s, 3H), 2.95(t, 2H), 2.28(s, 3H), 1.57(sextet, 2H), 0.97(t, 3H). Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 157.3, 153.1, 144.6, 138.3, 132.7, 130.6, 126.1, 125, 114.2, 113.5, 54.2, 35.7, 22.3, 21.2, 13.6. XRPD (D2 PHASER Bruker, step 0.02, 2Θ 5-45°): 6.7°, 18.6°, 18.9°, 19.7°, 21.6°, 22.7°, 25.3°, 29.7°. FT-IR (Thermo Nicolet iS10): ν (cm^{-1}) 3063, 2927, 1758, 1644, 1601, 1442, 1237, 1155, 1096. M.p. 188-189°C.

Caracterización de M1



Espectro de RMN ^{1}H (Bruker, 500 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 7.88(s, 1H), 7.72(d, 2H), 7.68-7.55(m, 6H), 7.34-7.27(m, 1H), 3.81(s, 3H). Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 195.35, 153.95, 148.44, 138.11, 132.03, 130.60, 129.37, 128.41, 128.32, 127.59, 125.47, 124.37, 115.75, 113.81, 52.97. XRPD (D2 PHASER Bruker, step 0.02, 2Θ 5-45°): 6.4°, 7.0°, 7.5°, 11.0°, 11.4°, 18.1°, 18.8°, 20.7°, 22.4°, 23.6°, 24.8°, 25.7°, 27.1°. FT-IR (Thermo Nicolet iS10): ν (cm^{-1}) 3368, 2947, 1755, 1731, 1635, 1593, 1456, 1257, 1227, 1179, 1090. M.p. La descomposición ocurre antes de la fusión de la muestra.

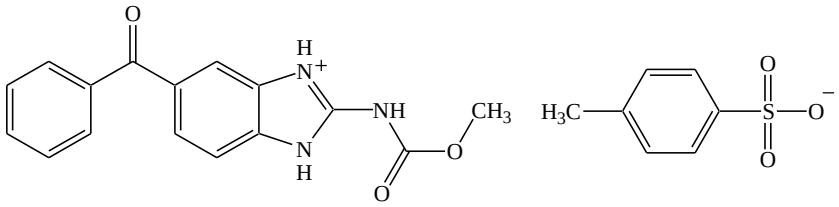
Caracterización de M2



Espectro de RMN ^{1}H (Bruker, 400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 7.96(d, 1H), 7.73(m, 5H), 7.59(t, 2H), 3.89(s, 3H), 2.44(s, 6H). Espectro de RMN ^{13}C (120 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 194.94, 152.75, 146.06, 137.36, 133.15, 132.95, 132.70, 129.63, 128.68, 126.32, 115.34, 113.37, 53.95. XRPD (D2 PHASER Bruker, step 0.02, 2Θ 5-45°): 6.7°, 10.3°, 12.8°, 17.0°, 18.0°, 18.5°, 19.3°, 19.8°, 20.5°, 21.8°, 22.8°, 23.4°,

25.3°, 26.3°, 28.5°, 29.3°. FT-IR (Thermo Nicolet iS10): ν (cm^{-1}) 3570, 3055, 1769, 1662, 1639, 1598, 1439, 1235, 1009. M.p. 207-208°C.

Caracterización de M3



Espectro de RMN ^{1}H (Bruker, 500 MHz, DMSO-d_6): δ 7.95(d, 1H), 7.78-7.68(m, 5H), 7.58(t, 2H), 7.50(d, 2H), 7.12(d, 2H), 3.88(s, 3H), 2.28(s, 3H). Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 194.91, 152.89, 146.30, 145.34, 137.91, 137.43, 133.97, 133.97, 132.53, 130.19, 129.54, 128.58, 128.16, 125.98, 125.53, 115.35, 113.40, 53.75, 20.88. XRPD (D2 PHASER Bruker, step 0.02, 2Θ 5-45°): 6.9°, 11.3°, 12.4°, 14.0°, 16.2°, 18.6°, 19.8°, 21.6°, 22.7°, 23.7°, 25.4°, 26.2°, 29.7°. FT-IR (Thermo Nicolet iS10): ν (cm^{-1}) 3567, 3063, 2804, 1764, 1654, 1641, 1602, 1441, 1231, 1200, 1009. M.p. 180-181°C.

microbiology research

an Open Access Journal by MDPI

IMPACT FACTOR 2.1

CITESCORE 1.9

CERTIFICATE OF ACCEPTANCE

The certificate of acceptance for the manuscript (**microbiolres-3536926**) titled:

Antiprotozoal activity and selectivity index of organics salts of albendazole and mebendazole

Authored by:

Miriam Guadalupe Barón-Pichardo; Janeth Gomez-García; David Durán-Martínez; Oscar Torres-Angeles; Blanca Estela Duque-Montaño; Jesús Rivera-Islas

was accepted in *Microbiol. Res.* (ISSN 2036-7481) on 25 March 2025

MDPI

Basel, March 2025

Beniamino Cenci Goga

Prof. Dr. Beniamino T. Cenci-Goga
Editor-in-Chief

microbiology research

MDPI

Article

Antiprotozoal Activity and Selectivity Index of Organic Salts of Albendazole and Mebendazole

Miriam Guadalupe Barón-Pichardo, Janeth Gómez-García, David Durán-Martínez, Oscar Torres-Angeles, Jesús Rivera-Islas * and Blanca Estela Duque-Montaño *

Faculty of Pharmacy, Autonomous University of the State of Morelos, Av. Universidad 1001, Cuernavaca 62209, Morelos, Mexico; dpmg_ff@uaem.mx (M.G.B.-P.); janeth.gomezgar@uaem.edu.mx (J.G.-G.); david.duranm@uaem.edu.mx (D.D.-M.); tao_ff@uaem.mx (O.T.-A.)

* Correspondence: rij@uaem.mx (J.R.-I.); dmbe_ff@uaem.mx (B.E.D.-M.)

Abstract: Infections from the protozoa *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), *Giardia lamblia* (*G. lamblia*), and *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*) pose a public health issue, with albendazole and mebendazole serving as the second-line medications for treating these parasitic infections. However, the low aqueous solubility of these compounds has led to the exploration of new strategies to enhance their solubility, with the formation of salts being a commonly employed strategy. The sulfonates **A1**, **A2**, and **A3** of albendazole, along with **M1**, **M2**, and **M3** of mebendazole, were synthesized. The antiparasitic activity in vitro was assessed against the trophozoites of *E. histolytica*, *G. lamblia*, and *T. vaginalis*. The salts **A2**, **A3**, **M2**, and **M3** demonstrated a greater antiparasitic effect (IC_{50} 37.95–125.53 μM) compared to the positive controls albendazole and mebendazole. The salts **A1**, **A3**, **M2**, and **M3** do not exhibit cytotoxic effects at concentrations of 500 μM on the Vero cell line. Taken together, these findings indicate that the formation of these new solid saline phases enhances the antiparasitic effects in vitro, which is crucial in the current search for improved, safe, and effective antiparasitic agents.

Keywords: benzimidazole; antiparasitic activity; toxicity; selective index; sulfonate salts

check for updates

Academic Editor: Gadi Borkow

Received: 3 March 2025
Revised: 21 March 2025
Accepted: 25 March 2025
Published: 27 March 2025

Citation: Barón-Pichardo, M.G.; Gómez-García, J.; Durán-Martínez, D.; Torres-Angeles, O.; Rivera-Islas, J.; Duque-Montaño, B.E. Antiprotozoal Activity and Selectivity Index of Organic Salts of Albendazole and Mebendazole. *Microbiol. Res.* **2025**, *16*, 77. https://doi.org/10.3390/microbiolres16040077

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Parasitic infections caused by microaerophilic protozoa are a major problem affecting around 3 billion people globally. Among the main protozoa are *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) and *Giardia lamblia* (*G. lamblia*), which are human pathogens of the gastrointestinal tract, and *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*), a pathogen of the human genitourinary tract [1]. *E. histolytica* colonizes the large intestine, leading to an infection called amoebiasis, which can present as either asymptomatic or invasive, potentially invading the liver, heart, lungs, and brain [2,3]. *G. lamblia* ranks as the second most common cause of infectious diarrhea in humans. Giardiasis may occur as an asymptomatic infection or can be linked to diarrhea, stomach pain, nausea, bloating, gas, malabsorption, weight loss, and growth delays in children [4,5]. *T. vaginalis* is responsible for the sexually transmitted infection known as trichomoniasis, resulting in 248 million cases reported globally each year [6]. In men, it can present as either an asymptomatic or mild condition, whereas in women, it might be asymptomatic or lead to intense vaginitis (characterized by vaginal discharge with a foul smell and yellow–green hue, dysuria, itching, and abdominal pain) [7].

Metronidazole (α-hydroxyethyl-2-methyl-5-nitroimidazole, **Mtz**) is the first choice for treating amoebiasis, giardiasis, and trichomoniasis [8]. However, overuse, indiscriminate over-the-counter (OTC) sales, and inadequate treatment regimens have resulted in the

emergence of nitroimidazole-resistant strains with increased inhibitory concentrations of the drug, leading to treatment failures [9]. Resistance to **Mtz** in clinical isolates has been reported in *G. lamblia* [10], *E. histolytica* [11], and *T. vaginalis* [12].

Therefore, when treatment with **Mtz** is ineffective, it is recommended to use albendazole (methyl [5-(propylthio)-1H-benzimidazole-2-yl] carbamate, **Abz**) and mebendazole (methyl 5-benzoyl-1H-benzimidazole-2-yl-carbamate, **Mbz**) alone or in combination with **Mtz** [13,14]. The main mechanism of action of **Abz** and **Mbz** in protozoa is through their selective binding to β-tubulin dimers in the parasite, which prevents the polymerization of microtubules. Consequently, essential biological processes such as adhesion, motility, and cell division are directly affected [15].

Although the resistance related to **Abz** and **Mbz** has been documented, it occurs less frequently than has been observed for **Mtz** [10]. Conversely, unlike the significant water solubility of Mtz, the main limitation for the use of Abz and Mbz is their poor water solubility, impacting the total amount of drug absorbed [16,17].

To improve water solubility, various methodologies have been described, such as the formation of nanocapsules [18], solid dispersions [19], nanocrystals [20], liposomes [21], cyclodextrins [22], inclusion complexes [23], self-emulsifying drug delivery systems [24], and pharmaceutical salts [25]. These methodologies do not involve chemical structure modification but rather the combination with other molecules through mixtures or acid–base reactions.

The formation of salts with pharmaceutically acceptable counterions is useful for modifying physicochemical, biopharmaceutical, or therapeutic properties. These salts are considered chemical entities with improved pharmacokinetic, toxicological, and potency characteristics [26,27]. The use of sulfonic acids for salt formation has increased over time because they substantially improve the physicochemical properties of active pharmaceutical ingredients (APIs) and, in some cases, are safer than alternative salts [28].

It has also been reported that the counterion used for the formation of drug salts impacts the values of inhibitory concentration in vitro antibacterial studies [29,30]. Therefore, the aim of the present study is to evaluate the in vitro amebicidal, trichomonicidal, and giardicidal activity of albendazole (**A**) and mebendazole (**M**) salts with benzenesulfonic acid (**A1**, **M1**), methanesulfonic acid (**A2**, **M2**), and *p*-toluenesulfonic acid (**A3**, **M3**) (Figure 1). This will determine whether the modulation of activity occurs for antiparasitic drug salts by analyzing their IC_{50} values, their cytotoxic concentration (CC_{50}) on the Vero cell line, and their selectivity index. Finally, the goal is to select those with the best biological properties for subsequent in vivo pharmaceutical studies, which may serve as candidates for the treatment of parasitic infections.

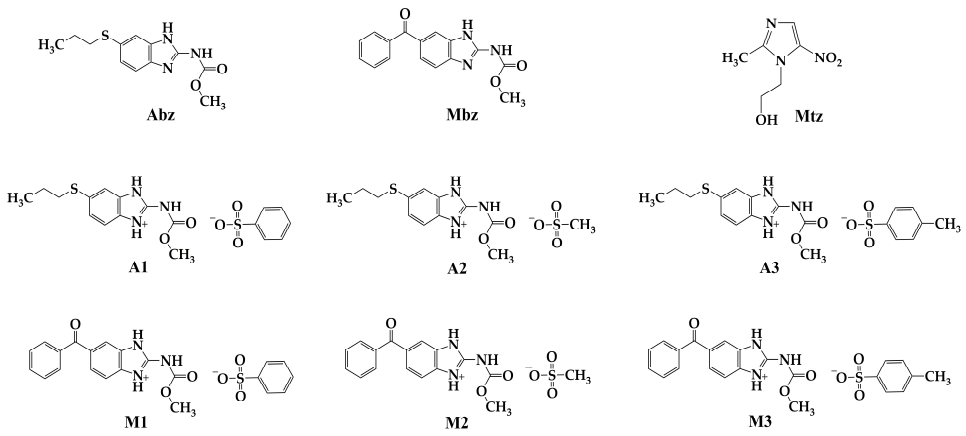


Figure 1. Chemical structure of **Abz** and **Mbz** salts, as well as reference controls. **A1**: albendazole with benzenesulfonic acid; **A2**: albendazole with methanesulfonic acid; **A3**: albendazole with *p*-

toluenesulfonic acid; **M1**: mebendazole with benzenesulfonic acid; **M2**: mebendazole with methanesulfonic acid; **M3**: mebendazole with *p*-toluenesulfonic acid; **Abz**: albendazole; **Mbz**: mebendazole; and **Mtz**: metronidazole.

2. Materials and Methods

2.1. General Procedure to Prepare Abz and Mbz Sulfonic Salts

2.1.1. Reagents and Solvents

Albendazole (≥98%, CAS 54965-21-8), mebendazole (≥98%, CAS 31431-39-7), *p*-toluensulfonic acid monohydrate (≥98.5% CAS 6192-52-5), benzenesulfonic acid monohydrate (97%, CAS 26158-00-9), and methanesulfonic acid (≥99%, CAS 75-75-2) were purchased from Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA) and used without prior purification. Methanol (≥99.9%, CAS 67-56-1) and acetone (99.8%, CAS 67-64-1) were reagent-grade and purchased from J.T. Baker (Monterrey, NL, México).

2.1.2. Equipment and Conditions for Chemical Characterization

Powder X-ray diffraction (PXRD) was performed on a Bruker D2-Phaser (Karlsruhe, Germany). The data were collected in the interval 5–50° of 2θ angle with a stepsize of 0.02°. FT-IR spectra were recorded using Thermo Scientific Spectrophotometer Nicolet iS10 (Waltham, MA, USA) and measured in the range of 4000–500 cm^{-1} with a diamond ATR accessory. NMR spectra were obtained on a Bruker AVANCE III HD 500 MHz (Bruker, Coventry, UK) (^{1}H) and 125 MHz (^{13}C) spectrometer at room temperature, with samples of 30 mg, and DMSO-d_6 as the solvent for all samples. The melting point was determined by using a Fisher–Johns Melting Point Apparatus 12-144 from Fisher Scientific® (Dubuque, IA, USA) in the range of 20–300 °C.

2.1.3. General Method for Salts Preparation

An equimolar mixture of the benzimidazole drug (**Abz**, 265 mg; or **Mbz**, 295 mg) and the sulfonic acid (methane sulfonic acid, 97 mg; benzenesulfonic acid, 159 mg; or *p*-toluenesulfonic acid, 158 mg) was placed into a 10 mL glass vial provided with a magnetic stirrer. Then, enough solvent (acetone or methanol, ca. 3 mL) was poured to form a solid suspension. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. At the terminus, the suspension was filtered, and the solid was rinsed with an aliquot of fresh solvent to remove the starting material. Finally, the solid was dried under vacuum for 2 h. The yield of solid salt was 60–75%.

2.1.4. Chemical Characterization of Salt **A1** (Albendazole Besylate)

^{1}H NMR spectrum (DMSO-d_6): δ (ppm) 7.61 (d, 2H), 7.45 (d, 1H), 7.37 (dd, 1H), 7.31 (m, 2H) 7.15 (d, 2H), 3.78 (s, 3H), 2.87 (t, 2H), 1.53 (sextet, 2H), 0.95 (t, 3H). ^{13}C NMR spectrum (DMSO-d_6): δ (ppm) 154.33, 146.97, 135.3, 133.8, 128.3, 128.0, 127.6, 125.5, 124.1, 115.2, 114.0, 52.8, 36.3, 22.0, 13.1. XRPD (2θ angle): 7.0°, 7.5°, 11.0°, 11.4°, 18.0°, 18.7°, 19.5°, 20.8°, 24.9°, 25.8°, 27.3°, 29.4°. FT-IR: ν (cm^{-1}) 3321, 2958, 1711, 1615, 1585, 1441, 1263, 1092. M.p. 182–184 °C. Yield 65%.

2.1.5. Chemical Characterization of Salt **A2** (Albendazole Mesylate)

^{1}H NMR spectrum (DMSO-d_6): δ (ppm) 7.54 (m, 2H) 7.36 (dd, 1H), 3.88 (s, 3H), 2.95 (t, 2H), 2.43 (s, 3H), 1.57 (sextet, 2H), 0.97 (t, 3H). ^{13}C NMR spectrum (DMSO-d_6): δ (ppm) 152.6, 144.2, 132.3, 130.0, 127.8, 125.6, 113.7, 112.9, 52.8, 36.3, 22.0, 13.1. XRPD (2θ angle): 7.0°, 11.9°, 13.0°, 13.7°, 16.3°, 16.9°, 19.0°, 19.6°, 20.7°, 21.3°, 22.9°, 23.6°, 25.4°, 26.1°, 27.4°,

29.1°, 30.3°. FT-IR: ν (cm^{-1}) 3213, 1755, 1638, 1435, 1231, 1151, 1089. M.p. 154–155 °C. Yield 71%.

2.1.6. Chemical Characterization of Salt **A3** (Albendazole Tosylate)

^{1}H NMR spectrum (DMSO-d_6): δ (ppm) 7.55–7.47 (m, 4H), 7.36 (dd, 1H), 7.12 (d, 2H), 3.88 (s, 3H), 2.95 (t, 2H), 2.28 (s, 3H), 1.57 (sextet, 2H), 0.97 (t, 3H). ^{13}C NMR spectrum (DMSO-d_6): δ (ppm) 157.3, 153.1, 144.6, 138.3, 132.7, 130.6, 126.1, 125, 114.2, 113.5, 54.2, 35.7, 22.3, 21.2, 13.6. XRPD (2θ angle): 6.7°, 18.6°, 18.9°, 19.7°, 21.6°, 22.7°, 25.3°, 29.7°. FT-IR: ν (cm^{-1}) 3063, 2927, 1758, 1644, 1601, 1442, 1237, 1155, 1096. M.p. 188–189 °C. Yield 68%.

2.1.7. Chemical Characterization of Salt **M1** (Mebendazole Besylate)

^{1}H NMR spectrum (DMSO-d_6): δ (ppm) 7.88 (s, 1H), 7.72 (d, 2H), 7.68–7.55 (m, 6H), 7.34–7.27 (m, 1H), 3.81 (s, 3H). ^{13}C NMR spectrum (DMSO-d_6): δ (ppm) 195.35, 153.95, 148.44, 138.11, 132.03, 130.60, 129.37, 128.41, 128.32, 127.59, 125.47, 124.37, 115.75, 113.81, 52.97. XRPD (2θ angle): 6.4°, 7.0°, 7.5°, 11.0°, 11.4°, 18.1°, 18.8°, 20.7°, 22.4°, 23.6°, 24.8°, 25.7°, 27.1°. FT-IR: ν (cm^{-1}) 3368, 2947, 1755, 1731, 1635, 1593, 1456, 1257, 1227, 1179, 1090. M.p. decomposition occurred prior to the melting of the sample. Yield 70%.

2.1.8. Chemical Characterization of Salt **M2** (Mebendazole Mesylate)

^{1}H NMR spectrum (DMSO-d_6): δ (ppm) 7.96 (d, 1H), 7.73 (m, 5H), 7.59 (t, 2H), 3.89 (s, 3H), 2.44 (s, 6H). ^{13}C NMR spectrum (120 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 194.94, 152.75, 146.06, 137.36, 133.15, 132.95, 132.70, 129.63, 128.68, 126.32, 115.34, 113.37, 53.95. XRPD (2θ angle): 6.7°, 10.3°, 12.8°, 17.0°, 18.0°, 18.5°, 19.3°, 19.8°, 20.5°, 21.8°, 22.8°, 23.4°, 25.3°, 26.3°, 28.5°, 29.3°. FT-IR: ν (cm^{-1}) 3570, 3055, 1769, 1662, 1639, 1598, 1439, 1235, 1009. M.p. 207–208 °C. Yield 65%.

2.1.9. Chemical Characterization of Salt **M3** (Mebendazole Tosylate)

^{1}H NMR spectrum (DMSO-d_6): δ 7.95 (d, 1H), 7.78–7.68 (m, 5H), 7.58 (t, 2H), 7.50 (d, 2H), 7.12 (d, 2H), 3.88 (s, 3H), 2.28 (s, 3H). ^{13}C NMR spectrum (DMSO-d_6): δ (ppm) 194.91, 152.89, 146.30, 145.34, 137.91, 137.43, 133.97, 133.97, 132.53, 130.19, 129.54, 128.58, 128.16, 125.98, 125.53, 115.35, 113.40, 53.75, 20.88. XRPD (2θ angle): 6.9°, 11.3°, 12.4°, 14.0°, 16.2°, 18.6°, 19.8°, 21.6°, 22.7°, 23.7°, 25.4°, 26.2°, 29.7°. FT-IR: ν (cm^{-1}) 3567, 3063, 2804, 1764, 1654, 1641, 1602, 1441, 1231, 1200, 1009. M.p. 180–181 °C. Yield 60%.

2.2. In Vitro Antiprotozoal Activity Assays

2.2.1. Stock Solutions

Stock solutions of **Abz** salts, **Mbz** salts, **Abz**, **Mbz**, and **Mtz** were prepared by dissolving in 0.1% (*v*/*v*) dimethyl sulfoxide (DMSO, AppliChem, Ottoweg, Darmstadt, Germany) at the level at which no inhibition of trophozoites occurs [31]. The solutions were further diluted to 1 mL by adding freshly prepared culture medium to reach a concentration of 2 mg/mL. Two-fold serial dilutions were made in Eppendorf tubes in 100 µL of culture medium. Each test included **Mtz**, **Abz**, and **Mbz** as reference antiparasitic drugs, grow culture tubes (culture medium with trophozoites only), and blank tubes (culture medium only).

2.2.2. Trophozoite Culture Conditions

Antiprotozoal activity was evaluated against trophozoites of *E. histolytica* (strain HM1: IMSS), *G. lamblia* (isolate J10), and *T. vaginalis* (isolate MB: FF09). *E. histolytica* trophozoites were maintained axenically in BI-S-33 pH 6.5 medium supplemented with 10% calf serum (previously inactivated at 56 °C for 30 min (Microlab Laboratories, Mexico City, Mexico)). *G. lamblia* trophozoites were maintained axenically in TYI-S-33 medium, pH 6.8, supplemented

with bovine bile and 10% fetal bovine serum previously inactivated (Microlab Laboratories, Mexico City, Mexico). *T. vaginalis* trophozoites were maintained axenically in modified Diamond's medium pH 7.0 supplemented with 10% calf serum previously inactivated (Microlab Laboratories, Mexico City, Mexico). To determine the viability of the cultures and the number of trophozoites per milliliter, 0.4% trypan blue dye (In Vitro, Mexico City, Mexico) was used in a Neubauer chamber to guarantee viable cultures.

2.2.3. In Vitro Antiparasitic Activity Tests

To evaluate the antiparasitic effect of **Abz** and **Mbz** salts, the tube microdilution technique modified from Hernández-Ochoa [32] was used. A total of 2×10^4 trophozoites of *G. lamblia* and 1×10^4 trophozoites of *E. histolytica* or *T. vaginalis* were used. The trophozoites were exposed for 48 h at 37 °C with different concentrations of **Abz** and **Mbz** salts (2922–2.85 μM). As positive inhibition controls, the drugs **Abz**, **Mbz**, and **Mtz** were included under the same evaluation concentrations (2922 -2.85 μM), and as negative controls, trophozoite cultures without treatment and trophozoites with 0.1% DMSO (AppliChem, Ottoweg, Darmstadt, Germany) were used. After the exposure time, the percentage of cell viability and the percentage (%) of inhibition of trophozoite growth (% inhibition = 100 − % viability) were determined by microscopic counting, using 0.4% trypan blue staining (1:1, *v*/*v*) (In Vitro, Mexico City, Mexico) in a Neubauer chamber. Finally, the mean inhibitory concentration (IC_{50}) was determined by linear regression using the concentration of compounds and the % inhibition. Three independent assays were performed in triplicate.

2.3. In Vitro Cytotoxicity Assays

2.3.1. Cell Line Culture Conditions

The cytotoxic activity was carried out on the Vero cell line (green monkey kidney cells: *Cercopithecus aethiops*) [31,33]). The cells were cultured in RPMI-1640 medium (In Vitro, Mexico City, Mexico), supplemented with 10% fetal bovine serum previously inactivated (Microlab Laboratories, Mexico City, Mexico), L-glutamine 2 mM, and 1% penicillin/streptomycin/amphotericin B (In Vitro, Mexico City, Mexico) at 37 °C with a 5% CO_2 atmosphere. Cells were allowed to grow to a density of 85% and were subsequently harvested using a 0.05% trypsin–versene solution (In Vitro, Mexico City, Mexico) prior to each experiment. The viability and number of cells per milliliter were determined using 0.4% trypan blue dye (1:1, *v*/*v*) (In Vitro, Mexico City, Mexico) and a Neubauer chamber.

2.3.2. Cytotoxicity Assays

For the assay, cells were seeded in 96-well plates at concentrations of 1×10^4 cells/well and incubated for 24 h at 37 °C. After incubation, cells were treated with different concentrations (500 μM–0.97 μM) of **Abz** and **Mbz** salts; in each assay, the following were included as controls: cells with culture medium, cells with 0.1% DMSO (AppliChem, Ottoweg, Darmstadt, Germany), as well as the positive controls with the drugs **Abz**, **Mbz**, and **Mtz**. Cells were incubated for 48 h at 37 °C. The cytotoxic effect of the salts evaluated on Vero cells was determined using the colorimetric technique with the WST-1 reagent (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphenyl)-2H-tetrazolium)(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), which allows for measuring cell proliferation and viability by reducing the tetrazolium salt WST-1 to formazan by cellular dehydrogenases—the amount of formazan formed is directly correlated with the number of metabolically active cells in the culture. In this way, the viability of the cells was measured with the optical density of the formazan products. With the results obtained, the average cytotoxic concentration (CC_{50}) was determined by linear regression with the percentage of inhibition and logarithm of the concentration. Three independent assays were performed in duplicate.

2.3.3. Selectivity Index (SI)

To determine the selectivity of the antiprotozoal activity, the cytotoxicity profile of the evaluated compounds was used, calculating the SI, which is the quantitative relationship that exists between the cytotoxic activity against a mammalian cell line and the antiprotozoal activity of a certain compound (CC_{50} of the compounds evaluated on the Vero cell line / IC_{50} of the compounds evaluated on trophozoites) [31,33,34]. Normally, an index greater than 1 is considered good since the in vitro antiparasitic activity is more selective toward the parasite, while an index lower than 1 is considered more selective toward mammalian cells according to what was reported [34,35].

2.4. Statistical Analysis

All data are shown as mean ± standard deviation (SD). The mean inhibitory concentration (IC_{50}) of each salt or compound was determined through linear regression, and 95% confidence intervals were also calculated. The mean cytotoxic concentration (CC_{50}) was also calculated using linear regression. For the comparison of multiple groups, a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by Dunnett's post hoc test, considering a p value < 0.05 to be statistically significant. The analysis was performed using GraphPad Prism software version 8.0.2 (San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. In Vitro Antiparasitic Activity

The antiparasitic activity of the **Abz** and **Mbz** salts was evaluated in vitro against *E. histolytica*, *G. lamblia*, and *T. vaginalis*. The results are shown in Table 1 as IC_{50} values. **Abz**, **Mbz**, and **Mtz** were used as reference drugs.

The salts **A2** and **A3** exhibited activity against *E. histolytica* that was 1.9 and 1.8 times greater than **Abz**, with IC_{50} values of 37.95 and 39.93 µM, respectively, whereas salt **A1** displayed no antiparasitic activity. All **Mbz** salts inhibited the growth of *E. histolytica*, with salt **M3** showing the lowest IC_{50} (44.34 µM), rendering it 1.3 times more effective than **Mbz**. All three **Abz** salts were active against *G. lamblia*, with IC_{50} values ranging between 51.31 and 38.02 µM. Salt **A3** increased its potency by 5.2 times compared to **Abz**. The salts **M2** and **M3** were 3.2- and 3.3-times more active than **Mbz**, whereas **M1** showed no effect on *G. lamblia*. Regarding *T. vaginalis*, only salt **A2** demonstrated an antiparasitic effect, enhancing its potency by 1.68 times in relation to **Abz**. Conversely, all **Mbz** salts exhibited antiparasitic effects against *T. vaginalis*, with salt **M1** demonstrating the lowest IC_{50} value (24.17 µM). Finally, the **Mtz** control presented IC_{50} values of 16.08 and 16.16 µM for *E. histolytica* and *T. vaginalis*, respectively, values that were lower than those obtained for the **Abz** and **Mbz** salts (Table 1). However, the IC_{50} value for *G. lamblia* was 97.63 µM, while the IC_{50} value obtained for salts **A2**, **A3**, **M2**, and **M3** ranged from 51.31 to 79.62 µM.

Table 1. Antiparasitic activity of **Abz** and **Mbz** salts.

Antiparasitic Activity		
E. histolytica	***G. lamblia***	***T. vaginalis***
	Salt/Compound IC50 [µM] *Confidence interval*	
Mtz [1] 16.08 ± 0.69 *(15.40–16.77)* [a]	**A3** [b] 51.31 ± 1.23 *(50.09–52.52)* [a]	**Mtz** [3] 16.16 ± 0.66 *(15.50–16.81)* [a]

Table 1. *Cont.*

Antiparasitic Activity		
E. histolytica	***G. lamblia***	***T. vaginalis***
A2 [b] 37.95 ± 0.72 *(37.24–38.66)* [a]	**M3** [c] 77.98 ± 0.70 *(77.28–78.67)* [a]	**M1** [c] 24.17 ± 0.15 *(24.01–24.33)* [a]
A3 [b] 39.93 ± 0.81 *(39.14–40.73)* [a]	**A2** [b] 78.05 ± 0.43 *(77.62–78.05)* [a]	**Mbz** [2] 36.59 ± 0.69 *(35.91– 37.28)* [a]
M3 [c] 44.34 ± 0.45 *(43.89–44.79)* [a]	**M2** [c] 79.62 ± 0.99 *(78.64–80.59)* [a]	**M2** [c] 49.86 ± 0.80 *(49.07–50.64)* [a]
M2 57.72 ± 0.70 *(57.03–58.41)* [a]	**Mtz** [3] 97.63 ± 1.43 *(96.22–99.04)* [a]	**M3** [c] 62.59 ± 1.44 *(61.18–64.01)* [a]
Mbz [2] 59.81 ± 1.18 *(58.65–60.98)* [a]	**A1** [b] 138.02 ± 1.41 *(136.64–139.41)* [a]	**A2** [b] 125.53 ± 1.80 *(123.76–127.30)* [a]
Abz [3] 73.51 ± 1.09 *(72.44–74.59)* [a]	**Mbz** [2] 262.74 ± 2.49 *(260.29–265.19)* [a]	**Abz** [1] 211.71 ± 2.18 *(209.57–213.85)* [a]
M1 [c] 128.05 ± 2.69 *(125.41–130.69)* [a]	**Abz** [3] 270.66 ± 1.89 *(263.89–277.44)* [a]	**A1** N. E. [4]
A1 N. E. [4]	**M1** N. E. [4]	**A3** N. E. [4]

[1] Metronidazole; [2] mebendazole; [3] albendazole; [4] no effect at the evaluated concentrations; [a] 95% confidence intervals, α: 0.05; [b] statistical significance between the salts and the positive control (**Abz**) at $p < 0.05$; [c] statistical significance between the salts and the positive control (**Mbz**) at $p < 0.05$. Results are represented as the mean ± standard deviation of three independent assays performed in duplicate.

Even though **Abz** and **Mbz** salts have good antiprotozoal activity, **A1** does not inhibit the growth of *E. histolytica* and *T. vaginalis*. Nonetheless, the rest of the salts evaluated behaved as potent antiprotozoal agents, in almost all cases performing even better than the reference controls **Abz** and **Mbz**.

3.2. In Vitro Cytotoxicity

Biological assays were performed on the Vero cell line to better understand the cytotoxic effects of these salts on human cells compared to the effects observed with protozoans. Cell viability was evaluated by colorimetric assay with the WST-1 reagent. The results are expressed in Figures 2 and 3 as the percentage of cell viability (%CV). It is observed that the viability of Vero cells was not affected after being exposed to salts **A1**, **A2**, **M2**, and **M3** at the highest concentration evaluated (500 μM) since a viability percentage greater than 98% was maintained. However, with salt **A2**, a decrease in cell viability was observed from the concentration of 250 μM (91%), and at the highest concentration evaluated, the viability was reduced to 37%.

On the other hand, with salt **M1**, a behavior similar to that of **A2** is observed—as the concentration of the salt increases, cell viability decreases. Starting at 31.25 μM, a decrease (95%) in viability is observed, reaching 38% at the concentration of 125 μM. As expected, 0.1% of DMSO did not alter cell growth; similarly, this occurred with the controls **Abz**, **Mbz**, and **Mtz**, which presented viability percentages greater than 95%.

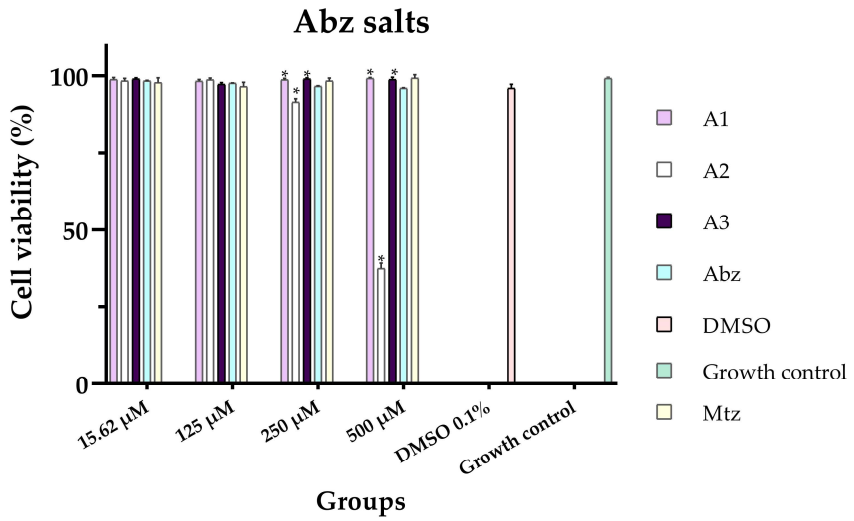


Figure 2. Effects on cell viability of **Abz** salts on Vero cell line after 48 h of exposure. Cells without treatment: 0.1% DMSO solvent control. Results are presented as the mean ± standard deviation of three independent assays performed in duplicate. The asterisk above the bar represents statistical significance between the salts and the positive control (**Abz**) at $p < 0.05$.

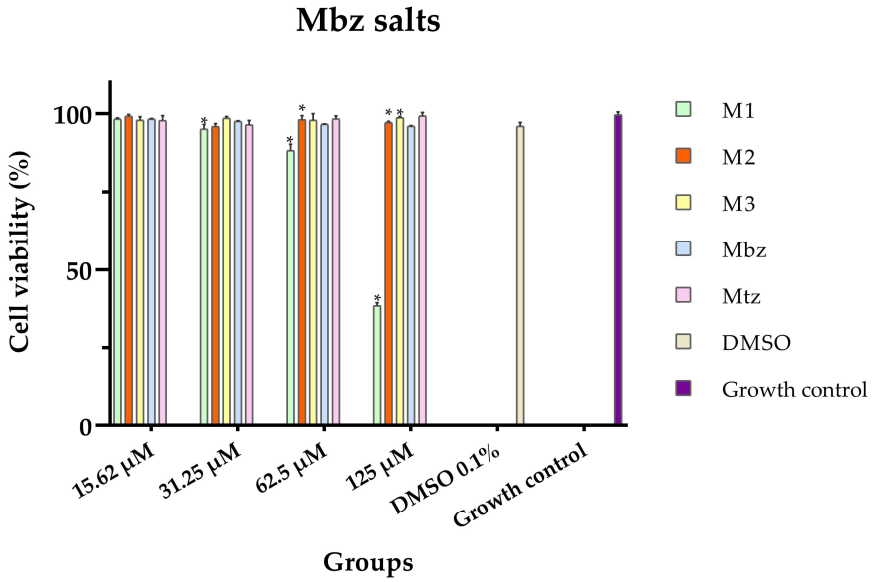


Figure 3. Effect on cell viability of **Mbz** salts on Vero cell line after 48 h of exposure. Cells without treatment: 0.1% DMSO solvent control. Results are presented as the mean ± standard deviation of three independent assays performed in duplicate. The asterisk above the bar represents statistical significance between the salts and the positive control (**Mbz**) at $p < 0.05$.

The CC_{50} was calculated using linear regression, determining the values to be 435.46 µM for salt **A2** and 104.04 µM for salt **M1** (Table 2). For the rest of the **Abz** and **Mbz** salts, as well as the controls, it was not possible to calculate the specific CC_{50} because they were not cytotoxic to Vero cells at the concentrations tested; therefore, it was assumed to be greater than 500 µM (Figures 1 and 2).

The selectivity index (SI) results for the three evaluated protozoans are presented in Table 3. For the salts that exhibited no cytotoxic effect at the tested concentrations on the Vero cell line, a CC_{50} of 500 µM was used as the basis for the SI calculation. The SI exceeded 1 [34,35], indicating that the **Abz** and **Mbz** salts preferentially target protozoans.

Table 2. In vitro cytotoxicity values of **Abz** and **Mbz** salts in Vero cell line.

Cytotoxic Activity	
Salt/Compound	**CC_{50} (μM)** *Confidence Interval*
A1	>500
A2	**435.46** ± 2.17 *(433.33–437.59)* [a]
A3	>500
M1	**104.04** ± 3.85 *(100.26–107.82)* [a]
M2	>500
M3	>500
Abz	>500
Mbz	>500
Mtz	>500

[a] 95% confidence intervals, α: 0.05. The results are represented as the means of three independent tests performed in duplicate, ± SD: standard deviation.

Table 3. Selectivity index of **Abz** and **Mbz** salts.

Selectivity Index			
Salt/Compound	***E. histolytica***	***G. lamblia***	***T. vaginalis***
A1	N. E.	3.62	N. E.
A2	11.47	5.57	3.46
A3	12.52	9.74	N. E.
M1	0.81	N. E.	4.30
M2	8.66	6.27	10.02
M3	11.27	6.41	7.98
Abz	6.80	1.84	2.36
Mbz	8.35	1.90	13.66
Mtz	31.09	5.12	30.94

N.E. No effect on the evaluated concentrations.

4. Discussion

Our findings indicate that the selection of the chosen counterion for forming **Abz** and **Mbz** salts influences the antiparasitic activity against the tested parasites. Although the literature states that forming pharmaceutical salts does not alter the biological activity of the active pharmaceutical ingredient (API) [36], our in vitro findings contradict this assertion. We observed that *G. lamblia* **A3** and **M3** displayed the strongest antiparasitic effects—with **A2** and **M2** following—when compared to our references **Mtz**, **Mbz**, and **Abz**, indicating that a lower dosage is needed to achieve the equivalent antiparasitic effect (Table 1). A comparable behavior was noted with *E. histolytica*, as **A2**, **M2**, **A3**, and **M3** demonstrated the most effective antiparasitic action in relation to **Abz** and **Mbz**; nevertheless, **Mtz** is the compound that showed the highest antiparasitic effect (Table 1). In conclusion, for *T. vaginalis*, the salt that exhibited the most effective antiparasitic properties was **M1**, which enhanced its effect compared to **Mbz**, whereas the other salts showed reduced or no activity against *T. vaginalis*.

In a similar way, Silva et al. [37] prepared mefloquine salts combined with sulfonic acids and assessed their antibacterial properties against *Mycobacterium tuberculosis*, emphasizing mesylate and tosylate for having lower minimum inhibitory concentration (MIC) values (26.3 and 22.7 μM, respectively) compared to the commercial salt mefloquine hydrochloride (MIC: 30.1 μM). Similarly, Madeira et al. [38] prepared organic salts of ciprofloxacin and norfloxacin and assessed their antibacterial effect on *Staphylococcus*

aureus, *Bacillus subtilis*, and *Klebsiella pneumoniae*. The mesylate enhanced the antibacterial efficacy of ciprofloxacin against the three tested strains, leading to a better IC_{50} value (14.38–55.07 μM) in comparison to the reference drug (IC_{50} = 196.50 μM). Meanwhile, norfloxacin mesylate enhanced the antibacterial activity solely against *Klebsiella pneumoniae* (IC_{50} = 203.8 μM) when compared to norfloxacin (IC_{50} = 255.2 μM). These writers ascribe these impacts to enhancements in the physicochemical characteristics, enabling a higher quantity of the drug to penetrate the microbe's interior to exert its action or even to influence the drug's buildup within the microorganism.

Conversely, the entry of salt moiety into the protozoan should be the rate-limiting step since the cell membrane is selectively permeable, and the flow through it is mediated by ion channels and transmembrane proteins that move molecules across the lipid barrier, facilitating the exchange of ions and other molecules from the extracellular environment to the interior [39]. Therefore, it is possible that the salts present unique discrete interactions with the cell membrane due to interactions with lipids, carbohydrates, and membrane proteins, depending on the characteristics of the counterion, as outlined by Ferraz et al. [30,40].

In this instance, *E. histolytica*, *G. lamblia*, and *T. vaginalis* possess a plasma membrane with distinct composition, fluidity, and permeability, indicating that the interaction of our sulfonates with the cell surface varies for each salt. Nonetheless, suitable permeability investigations are necessary to clarify the combined effect of the counterion, the drug, and the membrane.

Moreover, it is crucial to consider the toxicity of counterions when formulating a pharmaceutical salt [41]. Our findings indicated that the salts do not exhibit cytotoxicity toward Vero cells, except for **A2** and **M1** (Figures 2 and 3). This phenomenon has been noted before, indicating that antibiotic sulfonate salts do not influence cell viability [37,42]. Nonetheless, it is essential to compare these values according to their antiparasitic effects; hence, we calculated the selectivity index (SI) to reflect the preference between parasites and host cells, with an SI > 1 considered the minimum threshold to demonstrate a preference for the parasites [34,35,43].

5. Conclusions

In conclusion, our findings showed that tosylate salts effectively inhibit the growth of *E. histolytica* and *G. lamblia*, outperforming the control drugs **Abz**, **Mbz,** and **Mtz**, all while preserving selectivity for parasites. Mesylate salts also effectively hinder the growth of *E. histolytica* and *G. lamblia*; however, **A2** exhibited cytotoxic effects on kidney cells. Moreover, besylate salts reduce their effectiveness against *G. lamblia* and *E. histolytica* and are not an appropriate substitute for curtailing the proliferation of *T. vaginalis*. Therefore, it is crucial to emphasize that **A3** and **M3** are potential drug salts effective against protozoan parasitic infections. Ultimately, our study is consistent with others that examine how the use of sulfonates as counterions influences the antimicrobial efficacy of the parent compound, either positively or negatively.

Author Contributions: Conceptualization, M.G.B.-P. and O.T.-A.; methodology, M.G.B.-P. and J.G.-G.; software, J.R.-I.; validation, B.E.D.-M. and O.T.-A.; formal analysis, J.R.-I.; investigation, M.G.B.-P.; data curation, M.G.B.-P. and B.E.D.-M.; writing—original draft preparation, J.G.-G., D.D.-M. and M.G.B.-P.; writing—review and editing, M.G.B.-P., D.D.-M. and J.R.-I.; visualization, B.E.D.-M.; supervision, O.T.-A.; project administration; O.T.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the "Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), México" with grant number 745283 (CVU: 741821).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All relevant data can be found in the article. Taken in part from the experimental work of Ph.D. student Miriam Guadalupe Barón Pichardo.

Acknowledgments: The Authors are grateful to María Esther Ramírez Moreno from the National School of Medicine and Homeopathy of the National Polytechnic Institute; to Martha Ponce Macotela from the Laboratory of Experimental Parasitology at the National Institute of Pediatrics for the donation of clinical isolates of G. lamblia J10; to Moisés León Juárez of the National Institute of Perinatology Unit 1 for the donation of the Vero cell line; to the Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihti, México) for the scholarship with grant number 745283 (CVU 741821); and to the Faculty of Pharmacy at the Autonomous University of the State of Morelos for the facilities provided to carry out the project.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

ABZ	Albendazole
API	Active pharmaceutical ingredient
CC_{50}	Cytotoxic concentration 50%
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
IC_{50}	Inhibitory concentration 50%
MBZ	Mebendazole
MTZ	Metronidazole
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OTC	Over the counter
PXRD	Powder X-ray diffraction
SI	Selectivity index
%CV	Cell viability percentage

References

1. Flores-Carrillo, P.; Velázquez-López, J.M.; Aguayo-Ortiz, R.; Hernández-Campos, A.; Trejo-Soto, P.J.; Yépez-Mulia, L.; Castillo, R. Synthesis, antiprotozoal activity, and chemoinformatic analysis of 2-(methylthio)-1H-benzimidazole-5-carboxamide derivatives: Identification of new selective giardicidal and trichomonicidal compounds. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *137*, 211–220. [CrossRef] [PubMed]
2. Carrero, J.C.; Reyes-López, M.; Serrano-Luna, J.; Shibayama, M.; Unzueta, J.; León-Sicairos, N.; De la Garza, M. Intestinal amoebiasis: 160 years of its first detection and still remains as a health problem in developing countries. *Int. J. Med. Microbiol.* **2020**, *310*, 151358. [CrossRef] [PubMed]
3. Kantor, M.; Abrantes, A.; Estevez, A.; Schiller, A.; Torrent, J.; Gascon, J.; Hernandez, R.; Ochner, C. *Entamoeba Histolytica*: Updates in Clinical Manifestation, Pathogenesis, and Vaccine Development. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *2018*, 4601420. [CrossRef] [PubMed]
4. Adam, R.D. Giardia duodenalis: Biology and Pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2021**, *34*, 4. [CrossRef]
5. El-Kady, A.M.; Abdel-Rahman, I.A.M.; Fouad, S.S.; Allemailem, K.S.; Istivan, T.; Ahmed, S.F.M.; Hasan, A.S.; Osman, H.A.; Elshabrawy, H.A. Pomegranate Peel Extract Is a Potential Alternative Therapeutic for Giardiasis. *Antibiotics* **2021**, *10*, 705. [CrossRef]
6. Kirkcaldy, R.D.; Augostini, P.; Asbel, L.E.; Bernstein, K.T.; Kerani, R.P.; Mettenbrink, C.J.; Pathela, P.; Schwebke, J.R.; Secor, W.E.; Workowski, K.A.; et al. Trichomonas vaginalis antimicrobial drug resistance in 6 US cities, STD Surveillance Network, 2009–2010. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 939–943. [CrossRef]
7. Hashemi, N.; Ommi, D.; Kheyri, P.; Khamesipour, F.; Setzer, W.N.; Benchimol, M. A review study on the anti-trichomonas activities of medicinal plants. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2021**, *15*, 92–104. [CrossRef]
8. Daneman, N.; Cheng, Y.; Gomes, T.; Guan, J.; Mamdani, M.M.; Saxena, F.E.; Juurlink, D.N. Metronidazole-associated Neurologic Events: A Nested Case-control Study. *Clin. Infect. Dis.* **2021**, *72*, 2095–2100.

9. Wongstitwilairoong, B.; Anothaisintawee, T.; Ruamsap, N.; Lertsethtakarn, P.; Kietsiri, P.; Oransathid, W.; Oransathid, W.; Gonwong, S.; Silapong, S.; Suksawad, U.; et al. Prevalence of Intestinal Parasitic Infections, Genotypes, and Drug Susceptibility of *Giardia lamblia* among Preschool and School-Aged Children: A Cross-Sectional Study in Thailand. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2023**, *8*, 394. [CrossRef]
10. Argüello-García, R.; Leitsch, D.; Skinner-Adams, T.; Ortega-Pierres, M.G. Drug resistance in Giardia: Mechanisms and alternative treatments for Giardiasis. *Adv. Parasitol.* **2020**, *107*, 201–282. [CrossRef]
11. Singh, A.; Banerjee, T.; Shukla, S.K.; Upadhyay, S.; Verma, A. Creep in nitroimidazole inhibitory concentration among the Entamoeba histolytic isolates causing amoebic liver abscess and screening of andrographolide as a repurposing drug. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 12192. [CrossRef]
12. Mabaso, N.; Abbai, N. Distribution of genotypes in relation to metronidazole susceptibility patterns in Trichomonas vaginalis isolated from South African pregnant women. *Parasitol. Res.* **2021**, *120*, 2233–2241. [CrossRef] [PubMed]
13. Mørch, K.; Hanevik, K.; Robertson, L.J.; Strand, E.A.; Langeland, N. Treatment-ladder and genetic characterisation of parasites in refractory giardiasis after an outbreak in Norway. *J. Infect.* **2008**, *56*, 268–273. [CrossRef] [PubMed]
14. Anichina, K.; Mavrova, A.; Vuchev, D. Benzimidazoles Containing Piperazine Skeleton at C-2 Position as Promising Tubulin Modulators with Anthelmintic and Antineoplastic Activity. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 1518. [CrossRef]
15. Benchimol, M.; Gadelha, A.P.; De Souza, W. Ultrastructural Alterations of the Human Pathogen Giardia intestinalis after Drug Treatment. *Pathogens* **2023**, *12*, 810. [CrossRef]
16. Liang, Z.; Chen, M.; Yan, Y.; Chen, D.; Xie, S. Nanocrystal Suspensions for Enhancing the Oral Absorption of Albendazole. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 3032. [CrossRef]
17. Ding, Y.; Zhiyuan, Z.; Ding, C.; Shufeng, X.; Zhe, X. The Use of Cyclodextrin Inclusion Complexes to Increase the Solubility and Pharmacokinetic Profile of Albendazole. *Molecules* **2023**, *28*, 7295. [CrossRef]
18. Soleymani, N.; Sadr, S.; Santucciu, C.; Rahdar, A.; Masala, G.; Borji, H. Evaluation of the In-Vitro Effects of Albendazole, Mebendazole, and Praziquantel Nanocapsules against Protoscolices of Hydatid Cyst. *Pathogens* **2024**, *13*, 790. [CrossRef]
19. Suzuki, K.; Kawakami, K.; Fukiage, M.; Oikawa, M.; Nishida, Y.; Matsuda, M.; Fujita, T. Relevance of Liquid-Liquid Phase Separation of Supersaturated Solution in Oral Absorption of Albendazole from Amorphous Solid Dispersions. *Pharmaceutics* **2020**, *13*, 220. [CrossRef]
20. Fateh, R.; Norouzi, R.; Mirzaei, E.; Nissapatron, V.; Nawaz, M.; Khalifeh-Gholi, M.; Hamta, A.; Adnani Sadati, S.J.; Siyadatpanah, A.; Fattahi Bafghi, A. In vitro evaluation of albendazole nanocrystals against *Echinococcus granulosus* protoscolices. *Ann. Parasitol.* **2021**, *67*, 203–212. [CrossRef]
21. Castro Alpízar, J.A.; Vargas Monge, R.; Madrigal Redondo, G.; Pacheco Molina, J.A. Development of novel microstructured lipid carriers for dissolution rate enhancement of albendazole. *Int. J. Appl. Pharm.* **2020**, *12*, 173–178.
22. Eriksen, J.B.; Christensen, S.B.; Bauer-Brandl, A.; Brandl, M. Dissolution/permeation of albendazole in the presence of cyclodextrin and bile salts: A mechanistic in-vitro study into factors governing oral bioavailability. *J. Pharm. Sci.* **2021**, *111*, 1667–1673. [PubMed]
23. Pacheco, P.A.; Rodrigues, L.N.C.; Ferreira, J.F.S.; Gomes, A.C.P.; Veríssimo, C.J.; Louvandini, H.; Costa, R.L.D.; Katiki, L.M. Inclusion complex and nanoclusters of cyclodextrin to increase the solubility and efficacy of albendazole. *Parasitol. Res.* **2018**, *117*, 705–712.
24. Meena, A.K.; Sharma, K.; Kandaswamy, M.; Rajagopal, S.; Mullangi, R. Formulation development of an albendazole self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) with enhanced systemic exposure. *Acta Pharm.* **2012**, *62*, 563–580. [PubMed]
25. Bolla, G.; Nangia, A. Novel pharmaceutical salts of albendazole. *CrystEngComm* **2018**, *20*, 6394–6405.
26. Elder, D.P.; Delaney, E.; Teasdale, A.; Eyley, S.; Reif, V.D.; Jacq, K.; Facchine, K.L.; Oestrich, R.S.; Sandra, P.; David, F. The utility of sulfonate salts in drug development. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 2948–2961. [CrossRef]
27. Thackaberry, E.A. Non-clinical toxicological considerations for pharmaceutical salt selection. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2012**, *8*, 1419–1433. [CrossRef]
28. Verbeek, R.K.; Kanfer, I.; Walker, R.B. Generic substitution: The use of medicinal products containing different salts and implications for safety and efficacy. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *28*, 1–6.
29. Mesallati, H.; Umerska, A.; Tajber, L. Fluoroquinolone Amorphous Polymeric Salts and Dispersions for Veterinary Uses. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 268. [CrossRef]
30. Ferraz, R.; Silva, D.; Dias, A.R.; Dias, V.; Santos, M.M.; Pinheiro, L.; Prudêncio, C.; Noronha, J.P.; Petrovski, Ž.; Branco, L.C. Synthesis and Antibacterial Activity of Ionic Liquids and Organic Salts Based on Penicillin G and Amoxicillin hydrolysate Derivatives against Resistant Bacteria. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 221. [CrossRef]
31. Duque-Montaño, B.E.; Gómez-Caro, L.C.; Sanchez-Sanchez, M.; Monge, A.; Hernández-Baltazar, E.; Rivera, G.; Torres-Angeles, O. Synthesis and in vitro evaluation of new ethyl and methyl quinoxaline-7-carboxylate 1,4-di-N-oxide against Entamoeba histolytic. *Bioorganic Med. Chem.* **2013**, *21*, 4550–4558. [CrossRef] [PubMed]

32. Hernández-Ochoa, B.; Martínez-Rosas, V.; Morales-Luna, L.; Calderón-Jaimes, E.; Rocha-Ramírez, L.M.; Ortega-Cuellar, D.; Rufino-González, Y.; González-Valdez, A.; Arreguin-Espinosa, R.; Enríquez-Flores, S.; et al. Pyridyl Methylsulfinyl Benzimidazole Derivatives as Promising Agents against Giardia lamblia and Trichomonas vaginalis. *Molecules* **2022**, *27*, 8902. [CrossRef] [PubMed]
33. Carapina da Silva, C.; Silveira, P.R.; Nascimento das Neves, R.; Dié Alves, M.S.; Sena-Lopes, A.; Moura, S.; Borsuk, S.; Pereira de Pereira, C.M. Antiparasitic activity of synthetic curcumin monocarbonyl analogues against Trichomonas vaginalis. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *111*, 367–377. [CrossRef] [PubMed]
34. Domínguez, V.I.G. Actividad Anti-Giardia In Vitro de los Compuestos de Foeniculum Vulgare y Citrus Aurantifolia. Master's Thesis, Autonomous University of Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Mexico, 2015.
35. Quispe, A.; Zavala, D.; Rojas, J.; Posso, M.; Vaisberg, A. Efecto citotóxico selectivo in vitro de Muricin H (Acetogenina de Annona muricata) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. *Rev. Peru. Med. Exp. Y Salud Pública* **2006**, *23*, 265–269.
36. Ortiz, L.J.C.; Balderrabano, L.A. Importancia de las sales orgánicas en la industria farmacéutica. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* **2017**, *48*, 18–42.
37. Silva, D.; Lopes, M.V.C.; Petrovski, Ž.; Santos, M.M.; Santos, J.P.; Yamada-Ogatta, S.F.; Bispo, M.L.F.; de Souza, M.V.N.; Duarte, A.R.C.; Lourenço, M.C.S.; et al. Novel Organic Salts Based on Mefloquine: Synthesis, Solubility, Permeability, and In Vitro Activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecules* **2022**, *27*, 5167. [CrossRef]
38. Madeira, D.; Alves, C.; Silva, J.; Florindo, C.; Costa, A.; Petrovski, Ž.; Marrucho, I.M.; Pedrosa, R.; Santos, M.M.; Branco, L.C. Fluoroquinolone-Based Organic Salts and Ionic Liquids as Highly Bioavailable Broad-Spectrum Antimicrobials. *Proceedings* **2021**, *78*, 3. [CrossRef]
39. Jimenez, V.; Mesones, S. Down the membrane hole: Ion channels in protozoan parasites. *PLoS Pathog.* **2022**, *18*, e1011004. [CrossRef]
40. Ferraz, R.; Santarém, N.; Santos, A.F.M.; Jacinto, M.L.; Cordeiro-da-Silva, A.; Prudêncio, C.; Noronha, J.P.; Branco, L.C.; Petrovski, Ž. Synthesis and Biological Evaluation of Amphotericin B Formulations Based on Organic Salts and Ionic Liquids against *Leishmania infantum*. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1841. [CrossRef]
41. Saal, C.; Becker, A. Pharmaceutical salts: A summary on doses of salt formers from the Orange Book. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *49*, 614–623. [CrossRef]
42. Florindo, C.; Costa, A.; Matos, C.; Nunes, S.L.; Matias, A.N.; Duarte, C.M.M.; Rebelo, L.P.N.; Branco, L.C.; Marrucho, I.M. Novel organic salts based on fluoroquinolone drugs: Synthesis, bioavailability and toxicological profiles. *Int. J. Pharm.* **2014**, *469*, 179–189. [CrossRef] [PubMed]
43. Camacho, M.D.R.; Phillipson, J.D.; Croft, S.L.; Solis, P.N.; Marshall, S.J.; Ghazanfar, S. Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *89*, 185–191. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., a 9 de abril de 2025
Folio: FF/CAD/OF/009/2025

Asunto: asignación de jurado

M. en F. MIRIAM GUADALUPE BARÓN PICHARDO
ALUMNA DEL DOCTORADO EN FARMACIA

PRESENTE

Por este medio le informo que la Comisión Académica de Doctorado (CADoc), en la reunión del 9 de abril de 2025, **ratificó** a los siguientes sinodales como integrantes de la Comisión Revisora y Jurado para la revisión y evaluación de la tesis titulada **"Evaluación de la actividad antiparasitaria y citotóxica de nuevas sales de albendazol y mebendazol"**,

Sinodal		**Adscripción**
Presidente	Dra. Verónica Rodríguez López	Facultad de Farmacia-UAEM
Secretario	Dra. Dea Herrera Ruiz	Facultad de Farmacia-UAEM
Vocal 1	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	FES-Cuautitlán UNAM
Vocal 2	Dr. Luis Arias Durán	UAM-Iztapalapa
Vocal 3	Dra. Jazmín Flores Monroy	FES-Cuautitlán UNAM
Suplente 1	Dra. Judith González Christen	Facultad de Farmacia-UAEM
Suplente 2	Dra. Blanca Estela Duque Montaño	Facultad de Farmacia-UAEM

Se le solicita entregar el presente oficio y manuscrito borrador de tesis a esta comisión, así como dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos. Además de dar seguimiento a la respuesta de los sinodales asignados, quienes tendrán que resolver de su aceptación o rechazo para formar parte de esta comisión y jurado dentro de un plazo de 5 días hábiles después de la entrega del presente oficio.

Nota (Art. 74 RGEP-UAEM): Los sinodales tendrán un plazo máximo de 20 días hábiles contados a partir de la recepción del documento de tesis para entregar los comentarios de la revisión y para emitir un voto aprobatorio o negatorio. En caso de condicionar el voto a la entrega de un documento en el que el tesista deberá solventar lo revisado, este contará con un plazo no mayor a 20 días hábiles, contados a partir de la notificación del primer dictamen emitido, para integrar las correcciones señaladas, una vez fenecido dicho plazo el sinodal emitirá el voto aprobatorio o negatorio que corresponda.

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta

e-firma-UAEM
Dr. Germán Bernal Fernández
Jefe de Posgrado
Facultad de Farmacia

c.c.p Dra. Verónica Rodríguez López, Dra. Dea Herrera Ruiz, Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira, Dr. Luis Arias Durán, Dra. Jazmín Flores Monroy, Dra. Judith González Christen, Dra. Blanca Estela Duque Montaño.
c.c.p. Archivo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

GERMAN BERNAL FERNANDEZ | Fecha:2025-04-11 16:38:56 | FIRMANTE

ow/8z2HM/arMV/zEHJkMWsp+MescpLokYIrZLHUG3Ho4rn4vQZnqf63YL6JPnAED3cLgq0K6K0zbyK068tgpUWbb2m+b3sHhtHM6gS+b4ZqgtbzNaRQulnZ5L/z297TbfZo/e5B0L98T/lMjzZdYzVmauUOlYEzzhzPdSBD5wGt5fetBymMA/+UDbS3uD+7eBjgObirKHtIHizKRPIuy8H2ubY6zygh4wSmYhSyP6sO041a+iNPu0zScp8fqFpQwJDUHwmkGclgXKA8FTcBPWE9v+4J/csoH7tGT165Kp9BS61nlFJVIbJFmEjFc7v6tPfHpfpa5m8jQE0FfBJcxkw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

yvEfiN8A4

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Il2UcWPRo6qyokLKfESlRZ5xTNIKeBfd

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Barón Pichardo Miriam Guadalupe

Título de la tesis: "Evaluación de la actividad antiparasitaria y citotóxica de nuevas sales de albendazol y mebendazol"

Grado a obtener:

____ Maestría en Farmacia
X Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dra. Verónica Rodríguez López**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

X Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-Firma UAEM
Dra. Verónica Rodríguez López

11 de abril de 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

VERONICA RODRIGUEZ LOPEZ | Fecha:2025-04-11 14:15:26 | FIRMANTE

kPrDjf0lqKaz4cFCFJBidDylVrnXyqJpvLG3zpHt9KQD4+Ayw9xgoYN4ZpPwqqFGFYe0+oofUUi9zEqHEiSlWxqovb3LdUEWueFgxuVVNAM4clDtQgWr+PC8hrHBjzTWw3jSGy9B5
JFztXGBsXdSD10211Am7zOQ1wkJj1l/GSvoztdVQkRhSCTARsfpCO0IVefOxNLCcPpVIA1gSTNOXnRg7k+hqIg7dAMzfDC9SY9zBnAu93IB/HJcPgthGa774jtsl4kYe6oD3G9M6n
ppyukHt2/lrOkvbtcaeY9GdzyRuEGN1yCHxFLceGc1dUmumSUr6L6RWI+rPBBMyo2Q0Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

1aKWvbQxi

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/NyDUfNLdN0YmUeWQT7sq262s3jNF7K9w

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Barón Pichardo Miriam Guadalupe

Título de la tesis: "Evaluación de la actividad antiparasitaria y citotóxica de nuevas sales de albendazol y mebendazol"

Grado a obtener:

____ Maestría en Farmacia
X Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dra. Dea Herrera Ruiz**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

X Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dra. Dea Herrera Ruiz

23 de mayo de 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

DEA HERRERA RUIZ | Fecha:2025-05-23 18:44:17 | FIRMANTE

NaLk7smFdpvOLgdl+YjVomAQtAETNALpkfTkIG9GTxBVNAT4qyOfoTc24GKn2XP47meZ4E62PbCx+LyxjVZwGAEGx+p3zv6Mx49OzuoYWLDuY+Nlp5GCApFa2+w+2mYTIN/mF0644dRqaqsDzCcKph4dZ3GNcOXoKPf6K+WA5n4guewWTX+iCR8qsecPQCxUknc6glWft+JlpkbFCZxTBmL2dVtxbSMbWW25tojgQ4qoR4iXZaFg2YmHDoBhpKQvroYsez/iK/y7sN/ayvLA8xbaEBtVw6YFVUPafYOwdUnq4d1VIwZamPZXdchvnefVpb0F58ZPCTIBYtTBeqc9jg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

37IdYzgP4

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/pc4qgSnEol5Fi7kJ00TXEoj8ikuQZly1

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Barón Pichardo Miriam Guadalupe

Título de la tesis: "Evaluación de la actividad antiparasitaria y citotóxica de nuevas sales de albendazol y mebendazol"

Grado a obtener:

____ Maestría en Farmacia
X Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

X Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

11 de abril de 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA | Fecha:2025-04-14 14:37:55 | FIRMANTE

NO4ZIVh/7EBIdb1CKhPoMq5SfN4MzDRS55Bf1YI3cR4gUb/yrysEU7YTCpx5ZP3D94UIoIDhk2rV1eCGX02UIjAaRJHQCNtLdEGjQF6ahXq5d2ZWCNG3DQ3VSMMVpq39DQCico1ei6tkuOTOLMl7trb1SWZLUXI6JASBPj4EfPnAaucUDIFbGJtQbGGYnZtnqvUTYM7gIdsdi6f4qtULwV4EJjw8yq2tkcbtr/RRtkHnDkqB42WH2cp+i/Yv6wXxMyaPoc+hBuS62sq0ox413grkhHncXZYsSO2nOTxlB69HMe5imw9AeqGtOUdGVyZJoxgaeZltioCxPp9pJLqI/A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

Mw3Uu50Kv

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/GeP5HACS77mJ2e2FSQVUSZdvXseeo5Q2

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Barón Pichardo Miriam Guadalupe

Título de la tesis: "Evaluación de la actividad antiparasitaria y citotóxica de nuevas sales de albendazol y mebendazol"

Grado a obtener:

____ Maestría en Farmacia
X Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dr. Luis Arias Durán**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

X Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dr. Luis Arias Durán

11 de abril de 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

LUIS ARIAS DURAN | Fecha:2025-04-12 10:10:42 | FIRMANTE

DuaIjODnvQL/S8poKvi7qfnmL88sKiMXnyVk5wfXkHipL46qU05ys6vancSvkGsrJjQllku9NgZXl/ZqWASxwpdQZS44zrymSMEcOSzwIR3Yvsd7XF1TvZl0sqEmpLLQRMTlmjsUCQ+9wnu3uhiKj5TY7/2vzF2JW/AkG1tF2Fj9mEKDlXL37aE5Pqfl6iFdqqL3bVbfn1ulrZbrWQbrEAN1HpVAdiTBOwCS4xCl0yLX0J951gkzrqlTvSHIuhmf6XXV+bwdvq4RJF77tXH5NbqOUMt1sB3R9spUhBFnq9las4OMRxBLJxWjdW3+rOaYfFTSPMa3VvLYJnqAlcSY9A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

NG1W3HJdr

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/1gC2HL4sGkBaXuJ2bssCkaBzPwaZThP4

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Barón Pichardo Miriam Guadalupe

Título de la tesis: "Evaluación de la actividad antiparasitaria y citotóxica de nuevas sales de albendazol y mebendazol"

Grado a obtener:

____ Maestría en Farmacia
X Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dra. Jazmín Flores Monroy**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

X Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dra. Jazmín Flores Monroy

11 de abril de 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

JAZMÍN FLORES MONROY | Fecha:2025-04-12 06:15:27 | FIRMANTE

qFsyKAJTPG9zEXAeEXBIfbZiGTaJNunHG/r5WxCoalvYXGQVwCnAa0HGZGLwcI4xGLpe+CkL89yfIlujEln6xpiJV1tpt3g3t3CU0jiJO2ub1l/6D66IZma+4HOrX51PCg5dZo5Zt9tUs
FbjsZVwxluJiIsiD1CkZEg5V1Vc4Qx7p2tJl0pldi5A3wYT99qZ9g/ljXy5YsT/Kaieq8nWuDudsgm4sUht3BDjC82cBQUSXCmGWYyeU80Nc5CXTEg7NJ3WB9uV39kJdzMuRvS4zQ+
bDeHO3JyEqxeYN2iV+/VHulzh/8EAt4/j4uvNTNcGTjD91NA6iTbAgiEcFAeG4g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

fRICdnyQe

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/L9QtZukGEvdNAMecc3JduHGzsaeVndPA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Barón Pichardo Miriam Guadalupe

Título de la tesis: "Evaluación de la actividad antiparasitaria y citotóxica de nuevas sales de albendazol y mebendazol"

Grado a obtener:

____ Maestría en Farmacia
X Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dra. Judith González Christen**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

X Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Firma electrónica
Dra. Judith González Christen

01 de mayo de 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

JUDITH GONZALEZ CHRISTEN | Fecha:2025-05-01 21:38:01 | FIRMANTE

f23AyaCmzrNsJHevfXPmGyyqTRo2H/0IX5APVmBU9NRyjvJjfFFRbYEzzSFo8K9CgBJLm9PGoC0AX1+CvaVIcR9YV356oub72+yihNz/x9ouRzpdi6ELn+1OrLs2/7WYlWZEUh/2V4QfGdqMGIE/PILzeOFeuuFRqb3t7tvcRS2Uh+7ca5HltdmU25tsxhYKGCu4nQHvHFk6UypC0nACyLw7DUfA2sOfVlWlf5lojknnuzhdbKxULShPao7x5i7WQxFF+O+jJcMXgaKgArQ34LCyLdyhH7UPewzW7bTXNujrPvexvUoqoC1IGytBEjWyipSjgKFRD4BEfVHnxjZkoA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

oT5rElVnB

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/hC1RteMnAAyF7SADFtbXHI2U9sSHiOMK

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Barón Pichardo Miriam Guadalupe

Título de la tesis: "Evaluación de la actividad antiparasitaria y citotóxica de nuevas sales de albendazol y mebendazol"

Grado a obtener:

____ Maestría en Farmacia
X Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dra. Blanca Estela Duque Montaño**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

X Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dra. Blanca Estela Duque Montaño

11 de abril de 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

BLANCA ESTELA DUQUE MONTAÑO | Fecha:2025-04-11 19:24:53 | FIRMANTE

P6OZ6Rl/4wJ7/Sl9yDyCNZVCSrdTY/a/ZnsGWrtkO2SdcMo2/sHf4jZAJrqx+f5U/HDPaL6srQYppragpGi8nf3WGG3EpYy5nMh5EkN/4s4VAjHdJ3iHMVjarJobRTc+9WR/vXeMdypgqyiAHTvDDf6oa47opmOZjyNUJddRCFtDj6PIfTK0maXQ6Kr1rpEGx7VIEP29pCxzmwKmeZKaxu1/qRXZDPAuJERP7tOIdHCBJHHxFyczRjO11w1vsGeufmwvF9Nly4gDAyYW3CQ/QCnDhAOtLVW/KzYQcDX40kNjlgBsjslksD4Eap4YIleMp9vyktHijmYGniXdu6Pn2g==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

TgwH2ceJ5

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/X9owKM0iODsn9hVDse40PUiaKTvcPkJm