

SINTESIS DE UN COMPUESTO FASCIOLICIDA EXPERIMENTAL Y SU EVALUACION *in vitro* E *in vivo* en CONEJOS ^a

Froylán Ibarra-Velarde ^b

Yolanda Vera-Montenegro ^b

Alicia Hernández-Campos ^c

Rafael Castillo-Bocanegra ^c

RESUMEN

Se sintetizó el 2-amino-5 (6)-cloro-1-metoxicarbonilbencimidazol denominado compuesto "A" por reacción del 2-amino-5-clorobencimidazol y cloroformiato de metilo en piridina y se evaluó su eficacia contra *Fasciola hepatica in vitro* e *in vivo* en conejos. El compuesto "A" se evaluó *in vitro* en metacercarias desenquistadas a concentraciones de 50, 40, 30, 20, 10, 5.0, 1.0, 0.5 y 0.1 mg/L. La eficacia se determinó con base en la sobrevivencia de éstos cuatro días posexposición, resultando esta en 100, 100, 77.5, 60.0, y 55.0% para las dosis de 50, 40, 30, 20 y 10 mg/L de compuesto, respectivamente. Para la evaluación *in vivo*, se utilizaron 60 conejos distribuidos en 7 grupos, los primeros 5 de 10 animales cada uno y los dos últimos, de 5 animales. En el día 0, los primeros 5 grupos fueron infectados por vía oral con 60 metacercarias de *F. hepatica* por animal. Dos meses después, siendo los conejos positivos a eliminación de huevos del parásito, los grupos 1 al 4 se trataron con el compuesto "A" por vía oral con 5, 10, 15 y 20 mg/kg de peso respectivamente. El grupo 5 fue testigo sin tratamiento; el grupo 6 fue testigo de vehículo, dosificado con una suspensión de dimetilsulfoxido al 5% en agua destilada y el 7 fue testigo, sin infección ni tratamiento. A los quince días postratamiento, los conejos se sacrificaron y se cuantificaron las fasciolas en hígado. La eficacia se determinó con base en el porcentaje de reducción de fasciolas, siendo de 70.3, 85.2, 90.4, y 100.0% para las dosis de 5, 10, 15 y 20 mg/kg de peso, respectivamente.

PALABRAS CLAVE: Fasciolicida, Síntesis química, Evaluación, Conejos.

Tec. Pecu. Mex. Vol.33 No.1, (1995)

INTRODUCCION

El desarrollo de nuevos fármacos es costoso, requiriendo de una interacción disciplinaria entre investigadores para contar con nuevas moléculas con potencial acción farmacológica a las cuales se les practiquen pruebas que determinen su eficacia, biodisponibilidad, farmacocinética, toxicidad, seguridad y mecanismo de acción, entre otras.

La literatura relacionada con la síntesis de antihelmínticos de amplio espectro, se ha incrementado considerablemente en la

última década; siendo los carbamatos bencimidazólicos los que han probado ser altamente eficaces en animales (1); algunos están siendo utilizados en medicina humana (2). Los bencimidazoles han mostrado ser capaces de eliminar nemátodos adultos, céstodos y fasciolas; sin embargo, no todos estos compuestos son eficaces contra los diversos estadios de los parásitos (3).

Los fasciolicidas disponibles en el mercado son relativamente pocos. Algunos tienen uso limitado en virtud de su reducido espectro de acción, escasa seguridad, alto costo e impráctico sistema de dosificación (1).

En los últimos años, uno de los fasciolicidas más relevantes en el mercado de México ha sido el triclabendazol, 6-cloro-5 (2-3-diclorofenoxi)-2-metiltilio-1H-bencimidazol, compuesto bencimidazólico que ha

- a Recibido para su publicación el 3 de marzo de 1994.
- b Proyecto Fasciolosis, CENID-Parasitología/INIFAP/SAGDR. Km. 11.5 Carretera Cuernavaca-Cuautla, Edo de Morelos, 62500. México
- c Depto. de Farmacia. Facultad de Química, U.N.A.M. Cd. Universitaria, 04510 México, D.F.

demostrado alta eficacia contra todos los estadios de los parásitos (4, 5). Sin embargo, al igual que otros fasciolicidas no relacionados estructuralmente, tales como closantel, rafoxanide, clorsulon, nitroxinil, netobimin, y albendazol (6), son todos de importación, alto costo y difícil preparación, razón por lo cual, la fuga de divisas son considerablemente elevadas.

Tomando en cuenta lo anterior, resulta importante contar con nuevas moléculas con potencial antihelmíntico, de estructura sencilla, fáciles de preparar y de bajo costo. Como parte de las investigaciones realizadas por el INIFAP-SAGDR y la Facultad de Ciencias Químicas de la UNAM, encaminadas a encontrar nuevos fasciolicidas, se han preparado 17 nuevos bencimidazoles en una primera etapa (7), mismos que han sido sometidos a evaluación preliminar como trematodocidas contra fasciolas inmaduras tempranas, utilizando un modelo *in vitro* descrito por Ibarra Velarde (8). Los datos de esta evaluación preliminar no han sido publicados.

El presente trabajo tuvo como objetivos realizar la síntesis del 2-amino-5(6)-cloro-1-metoxicarbonilbencimidazol, compuesto "A", uno de los preliminarmente probados y que resultó de interés, así como su evaluación *in vitro* e *in vivo* en conejos contra *Fasciola hepatica*.

MATERIALES Y METODOS

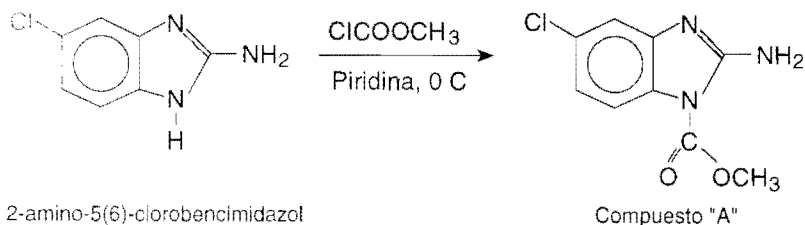
Síntesis química del compuesto.- Para la preparación del compuesto "A" se partió del 2-amino-5(6) clorobencimidazol (9); posteriormente, este se disolvió en piridina y trató con dos equivalentes de cloroformiato de metilo en frío, bajo atmósfera inerte (N₂) y agitación vigorosa. La mezcla de reacción se trabajó con agua-hielo y el sólido crema obtenido en un 81% de rendimiento se purificó por tratamiento con isopropanol, Fig. 1. El producto purificado consistió en un sólido blanco, con una sola mancha por cromatografía en placa fina y punto de fusión de 171-172 C, insoluble en agua y en diversos disolventes orgánicos y soluble en solución ácida.

Los datos espectroscópicos de IR; hrnm, y masas fueron concordantes con la estructura esperada. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 1.

Los especímenes de *F. hepatica* requeridos, se obtuvieron de una colonia de caracoles del género *Lymnaea humilis*, mantenida en laboratorio y alimentada con alga *Oscillatoria spp.* (10).

Evaluación *in vitro*.- El procedimiento, se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Ibarra y Jenkins (11). Para ello, se utilizaron placas de cultivo de 24 pozos de 1 cm de diámetro (NUNC, Dinamarca) donde se colocaron 1.6 ml de medio de cultivo RPMI 1640. Se colocaron 10 metacercarias desenquistadas (fasciolas inmaduras tempranas) por pozo.

FIG. 1
ESQUEMA DE REACCION. SINTESIS DE 2-AMINO-5(6)-CLORO-1-METOXICARBONILBENCIMIDAZOL COMPUESTO "A".



CUADRO 1
CONSTANTES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL 2-AMINO-5(6)-CLORO-1-METOXICARBONILBÉNCIMIDAZOL. COMPUESTO "A"

p.f. C ^a	R.f. ^b	I.R. ^c (cm-1)	¹ H RMN ^d (ppm)	Masas ^e (m/z)
171-172	0.56	3420(-NH ²),	3.99 (S, 3H, CH ³ O)	225 (71%)
		3240-3100 (-C=C-),	6.85 (dd, l=9Hz y 3Hz,	226 (8%)
		2980 (-CH-),	1H, arom. en 5 o 6),	227 (22%)
		1735 (-CO-),	7.08 (sd, 1H, arom. 7 o 4),	
		1640 (-N=C-),	7.20 (s, 2H, NH ₂),	
		1600, 1455, 1340	7.45 (d, l=9Hz, 1H), arom. en 4 o 7	

- a** Determinado en un aparato Buchi 530, no está corregido.
- b** Sistema de cloroformo-metanol 95:5, 5 ml con 2 gotas de NH₄OH conc.
- c** Determinado en un aparato Perk in Elmer 337 en pastilla de K Br.
- d** Corrido en un espectrofotómetro Varian V xR-3005, usando DMSO-D₆ como disolvente y TMS como estandar interno.
- e** Determinado en un cromatógrafo de gases-espectrometro de masas Hewlett-Packard 5988.

adicionadas en un volumen de 0.2 ml de medio de cultivo (12) bajo condiciones asépticas. El compuesto "A" se probó a concentraciones de 50, 40, 30, 20, 10, 5.0, 1.0, 0.5 y 0.1 mg/L, utilizando 4 pozos por concentración. Ocho pozos conteniendo fasciolas sin tratamiento, fungieron como testigo. Las placas se colocaron en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire, e incubadas a 37 C durante 4 días. El examen de los especímenes se realizó con microscopio invertido utilizando 40x de magnificación. Las fasciolas se examinaron cuidadosamente en los días 1 y 4. El criterio de evaluación de la actividad del compuesto se determinó con base a la motilidad o mortalidad de las fasciolas de los pozos tratados, comparándolas con las de los pozos testigo (11).

Evaluación *in vivo*

Animales.- 60 conejos machos y hembras, de 2 meses de edad, de la raza Nueva Zelanda, se confinaron individualmente y se alimentaron con dietas comerciales *ad libitum*.

Compuesto experimental.- El compuesto

"A" se administró por vía oral a los conejos, en una suspensión conteniendo agua destilada y dimetilsulfóxido (DMSO) al 5%, el cual se incluyó para disolver el compuesto.

Conducción del experimento.- Los 60 animales experimentales, se distribuyeron en 7 grupos: cinco de ellos (1, 2, 3, 4, y 5) de 10 animales cada uno y los dos restantes (6 y 7) de 5 animales. En el día 0, los primeros 5 grupos se infectaron por vía oral con 60 metacercarias de *F. hepatica* contenidas en una cápsula de gelatina. Dos meses después, cuando los conejos fueron positivos a la eliminación de huevos del parásito en heces (10), se procedió a realizar los tratamientos siguientes: Los grupos 1 al 4 recibieron por vía oral una dosis de 5, 10, 15 y 20 mg/kg de peso corporal del compuesto experimental, respectivamente. El grupo 5 fungió como testigo sin tratamiento. El grupo 6, permaneció como testigo de vehículo dosificado, utilizando únicamente una solución de DMSO al 5% en agua destilada. El grupo 7 fue el testigo sin infección ni tratamiento.

Exámen a la necropsia.- Con la finalidad de

que los conejos eliminaran el mayor porcentaje de compuesto experimental, estos se sacrificaron a los quince días postratamiento; el hígado y los conductos biliares fueron disectados y examinados cuidadosamente para coleccionar y cuantificar los parásitos presentes. El conteo de las fasciolas fragmentadas requirió de la identificación de la ventosa oral (13).

Para determinar la eficacia, se utilizó la fórmula descrita por Powers y col. (14), donde se compara el número promedio de fasciolas coleccionadas en el grupo testigo, menos el número promedio de fasciolas que sobreviven en los conejos tratados divididos entre el promedio de fasciolas del grupo testigo y se multiplica por 100.

Asimismo, se midió la longitud promedio de las fasciolas de animales tratados y no tratados para determinar si el compuesto podría producir alguna inhibición en el crecimiento de estas.

Análisis estadístico.- Los datos obtenidos fueron sometidos a la prueba de "t" de student (15).

RESULTADOS

Después de realizar las correspondientes reacciones de síntesis química, se obtuvo el compuesto "A" en un 85% de rendimiento. Como se mencionó anteriormente, se trata de un derivado del grupo del bencimidazol cuyo principio activo es el 2-amino-5(6)-cloro-1-metoxicarbonil bencimidazol. Las características físicoquímicas del compuesto indican que se trata de un polvo blanco con peso molecular de 225.63; poco soluble en acetona, metanol, etanol e insoluble en agua, siendo puro por cromatografía en placa fina. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 1.

El cuadro 2 muestra la eficacia *in vitro* de este compuesto experimental contra

CUADRO 2
EFICACIA *in vitro* DEL COMPUESTO "A" CONTRA METACERCARIAS DE
F. hepatica RECIEN DESENGUISTADAS.

Concen- tración mg/litro	Metacercarias desenquistadas muertas (ó Fasciolas inmaduras tempranas)				Promedio ± D.E.	Mortalidad %
	Pozos *					
	1	2	3	4		
50	10	10	10	10	10 (± 0.0)	100.0 d
40	10	10	10	10	10 (± 0.0)	100.0 d
30	9	7	7	8	7.7 (± 0.9)	77.5 c
20	6	5	6	7	6 (± 0.8)	60.0 c
10	6	4	7	5	5.5 (± 1.2)	55.0 c
5	2	3	1	1	1.7 (± 0.9)	17.5 b
1	0	0	0	0	-----	0.0 a
0.5	0	0	0	0	-----	0.0 a
0.1	0	0	0	0	-----	0.0 a
Testigo	0	0	0	0	-----	0.0 a

a, b, c, d = Difieren estadísticamente (P < 0.01).

* Porcentaje de Mortalidad de la suma de las cuatro observaciones de cada concentración probada.

* = 10 metacercarias / pozo.

CUADRO 3
EFICACIA DEL COMPUESTO "A" ORAL EN GRUPOS DE CONEJOS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE CON *Fasciola hepatica*.

Grupo	No. de animales	Dosis mg/kg	Media de Fasciolas colectadas D.E.	Longitud en mm de Fasciolas promedio \pm D.E.	Intervalo	Eficacia %
I	(10)	5	28 \pm 3.52	10 \pm 1.52	0 -4	70.3 ^b
II	(10)	10	14 \pm 3.06	11 \pm 3.06	0 -10	85.2 ^c
III	(10)	15	9 \pm 1.59	10 \pm 0.08	0 -5	90.4 ^c
IV	(7)*	20	0	0	0	100.0 ^d
V	(10)	Testigo	94 \pm 4.52	13 \pm 0.23	6 - 20	0.0 ^a

a, b, c, d, difieren estadísticamente ($p < 0.01$).

D. E. = Desviación Estandar.

* 3 animales fueron eliminados del análisis porque vomitaron parte del compuesto al momento de ser tratados.

F. hepatica. Las concentraciones de 50 y 40 mg/L mostraron 100% de eficacia en virtud de que no se observó movimiento en las metacercarias en estudio. cuando el compuesto fue probado a concentraciones de 30, 20 y 10 mg/L, los porcentajes de mortalidad de fasciolas fueron 77.5%, 60.0% y 55.0% respectivamente. A concentraciones de 5.0 mg/L la mortalidad fué del 17.7%. A menores concentraciones, no se observó ninguna eficacia, todas las fasciolas se encontraron en movimiento y de tamaño similar a las del grupo testigo.

El análisis de datos sobre la eficacia del compuesto entre grupos, indicó diferencias significativas ($P < 0.01$).

El cuadro 3 muestra la eficacia *in vivo* del compuesto experimental para cada grupo de conejos tratado, así como la longitud de las fasciolas. Los datos muestran que los parásitos fueron removidos de los conejos en mayor ó menor escala por el compuesto, alcanzando un porcentaje de reducción de fasciolas de 70.3%, 85.2%, 90.4% y 100.% a las dosis de 5, 10, 15 y 20 mg/kg de peso respectivamente ($P < 0.01$). En el grupo testigo se encontró un total de 94 fasciolas. Los resultados sobre longitud promedio de las fasciolas se muestran en el cuadro 3. La

longitud mínima promedio fue de 10 mm + 1.52 en el grupo tratado con 5 mg/kg; la longitud máxima promedio fue de 13 mm + 0.23, en el grupo testigo sin tratamiento; el intervalo de longitud obtenido, fue entre 8 y 17 mm. Las fasciolas del grupo testigo sin tratamiento fueron ligeramente mayores en comparación con las de los grupos tratados; sin embargo, el análisis estadístico indicó que no había diferencias significativas en la longitud de los vermes entre grupos ($p > 0.01$), ni tampoco se apreció en ellas efecto inhibitorio o de letargo.

Con relación al grupo 6, testigo del disolvente, no generó ninguna reacción adversa al DMSO tanto externamente como al análisis macroscópico de cada hígado expuesto. De manera similar, el grupo 7, testigo sin infección ni tratamiento, se mostró clínicamente sano.

DISCUSION

Novak y Blackburn (16), señalan que dentro de los carbamatos bencimidazólicos, todos los compuestos clorados tienen actividad biológica contra *F. hepatica*, situación ampliamente demostrada por el triclabendazol y razón principal por la que se

buscó sintetizar un compuesto análogo que incluyera un radical cloro.

Aunque en este trabajo se describe la síntesis del compuesto "A" como una reacción de un solo paso, la materia prima 2-amino-5-clorobencimidazol tuvo que prepararse por un procedimiento descrito en la literatura (9) tratando al 2-aminobencimidazol en HCl con H_2O_2 . Esta parte llevó tiempo debido a los bajos rendimientos y difícil purificación del producto, por lo que se estudian vías alternas para preparar este compuesto. La reacción que lleva al compuesto "A" se realizó sin complicaciones y con altos rendimientos, es factible que el producto sea en realidad una mezcla de isómeros, el cloro en 5 y el cloro en 6, por la naturaleza tautomérica de la materia prima del bencimidazol. La posición del metoxicarbonilo en el N-1 del bencimidazol se determinó por la banda a 3420 del IR y la señal de singulete a 7.2 ppm del espectro de HRMN, la cual integra para dos protones y desaparece con D₂O.

Con relación a la evaluación biológica del compuesto, la actividad fasciolicida *in vitro*, mostrada a concentraciones de 10 mg/L, es relevante en virtud de que todo compuesto que muestra eficacia a concentraciones menores, se considera digno de evaluarse en otros estudios para determinar su real potencial antihelmíntico (8). Ibarra y Jenkins (11) utilizando el mismo sistema de evaluación, determinaron la eficacia de fasciolicidas como disophenol, nitroxinil, meniclofolan, bromofenofos, bithionol, oxyclozanida, rafoxanida y albendazol contra fasciolas inmaduras tempranas, encontrando que a unas concentraciones de 50 mg/L los compuestos no mostraron eficacia. El resultado encontrado en este trabajo puede considerarse importante, en virtud de que solo diamfenetide y triclabendazol han demostrado ser eficaces contra fasciolas inmaduras tempranas (6,17). Por otro lado, el seleccionar la concentración de 10 mg/L como idonea, es el resultado de una estandarización para buscar ese posible

potencial antihelmíntico, situación ya demostrada con otros parásitos como *Nippostrongylus brasiliensis* (18), *Nematospiroides dubius* (19) y *Trichinella spiralis* (20).

Con relación a los resultados obtenidos en conejos, los porcentajes de eficacia para los grupos tratados con 5, 10, 15 y 20 mg/kg que mostraron eficacias del 70.3, 85.2, 90.4 y 100%, pueden ser considerados como promisorios, ya que se considera factible mejorar esa eficacia, si se adiciona al compuesto un vehículo adecuado. Es pertinente señalar que en el grupo de 20 mg/kg se tuvieron problemas en la administración del fármaco, ya que los conejos 1,3 y 8 vomitaron parte de la dosis inmediatamente después de la administración, razón por la cual estos animales fueron eliminados del análisis y la valoración de eficacia para este grupo, se hizo utilizando los datos de los restantes 7 conejos.

También es pertinente hacer notar que todos los bencimidazoles son insolubles en agua (2), por lo que, estos compuestos son administrados por vía oral, como una suspensión o en ocasiones en forma de pastilla. En el presente estudio, el compuesto experimental, fue administrado en suspensión conteniendo DMSO al 5% en agua destilada.

Si el compuesto tuviese un mejor vehículo que lo transportara en mayor porcentaje al hígado, podría mejorar su eficacia.

Con relación al parámetro sobre la longitud de fasciolas, es importante hacer notar que, aún cuando el análisis estadístico indicó que no había diferencias significativas en la longitud de los vermes entre grupos, las fasciolas, en los grupos tratados, mostraron ligera disminución en su talla. Resultados semejantes han sido encontrados al utilizar closantel en ovinos y ratas (21) y clorsulon, en bovinos donde las fasciolas colectadas postratamiento fueron más pequeñas que las del grupo testigo (22).

Varios bencimidazoles utilizados para el control de nemátodos como el fenbendazol, mebendazol y albendazol, tienen una eficacia marginal contra *F. hepatica* a dosis más altas que las recomendadas por el fabricante (5). De estos compuestos, solo albendazol se recomienda para el tratamiento contra fasciolias pero su eficiencia es restringida a fasciolias de más de 12 de semanas de edad (23). En este estudio, el compuesto "A" muestra cierta ventaja en comparación con el albendazol, pues resultó eficaz contra fasciolias de 8 semanas de edad.

Indudablemente la mejor prueba es aquella en la cual se utiliza el hacedero natural; sin embargo, la mayoría de los estudios quimioterapéuticos son llevados a cabo inicialmente bajo condiciones *in vitro*, y si el compuesto en estudio muestra un potencial promisorio contra el parásito o parásitos contra los que fue dirigido, se debe evaluar en los hospederos naturales.

Se concluye que el compuesto experimental, puede sintetizarse consistentemente, que muestra alta eficacia contra metacercarias desenquistadas *in vitro*, así como resultados promisorios bajo condiciones *in vivo*, utilizando el modelo conejo.

Estudios futuros a realizar en el hacedero natural, ayudarán a dilucidar el verdadero potencial fasciolicida de este compuesto.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al MVZ. Eduardo Casas-Carrillo, por su asistencia en el análisis estadístico de los datos, así como al Dr. Raúl Flores-Crespo por su amable revisión y valiosas observaciones a este manuscrito. También se agradece a Graciela Chávez, Silvia Mendoza, Maricela Gutiérrez, Alejandrina Acosta, Amparo Ortega, Humberto Gómez y Georgina Duarte por la determinación de los diversos espectros.

SYNTHESIS OF AN EXPERIMENTAL FASCIOLICIDE AND ITS EVALUATION *IN VITRO* AND *IN VIVO* IN RABBITS

SUMMARY

The chemical synthesis of 2-amino-5(6)-chloro-1-methoxycarbonylbenzimidazole, (compound "A") by reaction of the 2-amino-5-chlorobenzimidazole methyl chlorophormiate in pyridine and its biological evaluation against *Fasciola hepatica* was carried out *in vitro*, and *in vivo* in rabbits. Compound A was obtained as 81% pure as shown by thin layer chromatography analysis. The compound was tested *in vitro* at concentrations of 50, 40, 30, 20, 10, 5.0, 1.0, 0.5 and 0.1 mg/L. The *in vitro* efficacy was determined by comparing the survival of the flukes after a four day period of exposition to the chemical. The *in vitro* results showed efficacy of 100, 100, 77.5, 60.0 and 55.0% for concentrations of 50, 40, 30, 20 and 10 mg/L of compound, respectively. Sixty New Zealand rabbits were divided into 7 groups, 5 composed of 10 animals each and 2 of 5 animals. On day 0, the rabbits in the first 5 groups were orally infected each with 60 *F. hepatica* metacercariae per group. Two months after infection, rabbits were treated as follows: Groups 1 to 4 were treated orally with 5, 10, 15 and 20 mg/kg live weight of compound "A", respectively. Group 5 remained as non-treated control. Group 6 served as a solvent-control dosed with a suspension of 5% DMSO in distilled water and group 7 as a non infected/non-treated control. Fifteen days after treatment, all rabbits were euthanized to count the flukes present in the liver. The efficacy was determined as the percentage of fluke reduction in the treated groups relative to the controls. The *in vivo* assay, showed 70.3, 85.2, 90.4 and 100.0% fluke reduction at dose rates of 5, 10, 15 and 20 mg/kg of live weight.

KEY WORDS: Experimental fasciolicide, Chemical synthesis, Evaluation in rabbits.

REFERENCIAS

1. Bruce J I. New Anthelmintics. Int. J. Parasit. 1987; 17: 131.
2. Van den Bossche H, Rochette F, Horig C. Mebendazole and related anthelmintics. Adv. Pharmacol Chemother. 1982; 19: 67.
3. McCracken R O, Stillwell W H. A posible biochemical mode of action for bencimidazole anthelmintics. Int. J. Parasitol 1991; 21: (1) 99.
4. Eckert J, Schneiter G, Wolf K. FASINEX (Triclabendazole)- A new Fasciolicide. Berl. Munch. Tierarztl. Wschr. 1984; 91: 349.
5. Boray J C. Chemotherapy of Fasciolosis. New South Wales Veterinary Proceedings. 1982; 18: 42.
6. Boray J C, Crowfoot P D, Strong M B, Allison J R, Schellenbaum M, Orelli Von M, Serasin G. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* in sheep with triclabendazole. Vet. Rec. 1983; 113: 315.
7. Hernández C M A. Síntesis de bencimidazoles con

- actividad antihelmíntica potencial. Tesis de Maestría en Farmacia. Facultad de Química, U.N.A.M. 1990.
8. Ibarra-Velarde O F. Chemotherapeutic studies on parasitic Helminths. PhD Thesis. Brunel University. London, Great Britain. 1983: 1 to 235.
 9. Leonard N J, Curtin D Y, Beck K M J. Sulfonate Salts of Substituted Benzimidazoles. *J. Am. Chem. Soc.* 1947: 69: 2459.
 10. Anónimo. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. Technical Bulletin 1977 No. 18. Her Majesty's Stationery Office, England, United Kingdom.
 11. Ibarra O F, Jenkins D C. An *in vitro* screen for new fasciolicidal agents. *Z. Parasiten* 1984; 70: 655.
 12. Smith M A, Clegg J A. Improved culture of *Fasciola hepatica* *in vitro*. *Z. Parasiten* 1981; 66:9.
 13. Boray J C. Chemotherapy of Fasciolosis with triclabendazole against *Fasciola hepatica* N. *Z. Vet. J.* 1985; 33: 182.
 14. Powers K G, Wood I B, Eckert J, Gibson T, Smith H J. Guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (Bovine and ovine). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.), 1982. 265-284.
 15. Burr-Foster Q. General lineal models. In: Design of Experiments: A realistic approach. Vol. 5 Ed. Anderson V H, Mc Lean R A. Marcel Dekker New York, 1974. pp.44-55.
 16. Novak M, Blackburn B J. Anthelmintic activity of several 5-substituted benzimidazolyl carbamates against *Hymenolepis nana* cysticercoids. *Experientia*, 1981; 37:250.
 17. Harfenist M. Diamphenetide -A new fascioliscide active against immature parasites. *Pestic. Sci.* 1973; 4: 871.
 18. Jenkins D C, Armitage R, Carrington T S. A new primary screening test for anthelmintics utilizing the parasitic stages of *Nippostrongylus brasiliensis*, *in vitro*. *Z. Parasiten.* 1980; 63: 261.
 19. Jenkins D C, Ibarra O F. *Nematospiroides dubius* response of the late fourth stage larvae to anthelmintics *in vitro*. *Z. Parasiten.* 1984; 70:395.
 20. Jenkins D C, Carrington T S. An *in vitro* screening test for compounds active against the parenteral stages of *Trichinella spiralis*. *Tropenmed. and Parasitol.* 1981; 32:1.
 21. Maes L, Lauwers H, Deckers O, Vanparijs O. Flukicidal action of closantel against immature and mature *Fasciola hepatica* in experimentally infected rats and sheep. *Res. Vet. Sci.* 1988; 44: 229.
 22. Yazwinski T A, Feathers H, Presson B I, Greenway T E, Pote L M, Holtzen H. Efficacy of injectable clorsulon in the treatment of immature bovine *Fasciola hepatica* infections. *Agri-Practice*, 1985; 6: 6.
 23. Losson B. Chimio prophylaxie et chimiothérapie de la Distomatose: Médicaments classiques et molécules nouvelles. *Ann. Med. Vet.* 132: 93.