

00563



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

1
2er

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FARMACOCINETICA DE DIAZEPAN EN ANCIANOS

T E S I S

Que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN FARMACIA
(Biofarmacia)**

P R E S E N T A:

Q.F.B. MARTA GECILIA CASTILLO DEL RIO

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

Capitulo		Página
	RESUMEN	i
	ABSTRACT	iii
I	INTRODUCCION	1
II	GENERALIDADES	3
	1. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS	3
	1.1. Nombre Químico	3
	1.2. Fórmula Condensada	3
	1.3. Fórmula Desarrollada	3
	1.4. Composición Porcentual	4
	1.5. Peso Molecular	4
	1.6. Apariencia Física	4
	1.7. Rotacion Optica	4
	1.8. Punto de Fusión	4
	1.9. pKa	4
	1.10. Absorción Ultravioleta	4
	1.11. Solubilidad	5
	1.12. Coeficiente de Distribución	6
	1.13. Estabilidad	6

2.	FARMACOLOGIA DE DIAZEPAM	
2.1.	Aspectos Farmacodinámicos	8
2.1.1.	Efectos farmacológicos y usos terapéuticos	8
2.1.2.	Mecanismo de acción	13
2.1.3.	Toxicidad	14
2.1.4.	Dependencia y tolerancia	17
2.1.5.	Síndrome de abstinencia	20
2.2.	Aspectos Farmacocinéticos	22
2.2.1.	Absorción	22
2.2.2.	Distribución	26
2.2.3.	Eliminación	41
2.2.4.	Farmacocinética durante el embarazo	53
3.	MÉTODOS DE VALORACION EN FLUIDOS BIOLOGICOS	
3.1.	Análisis Espectrofotométrico	56
3.2.	Análisis Polarográfico	56
3.3.	Radioinmunoanálisis	59
3.4.	Cromatografía en Placa Delgada	59
3.5.	Cromatografía de Gas - Líquido	61
3.5.1.	Detector de captura de electrones	61

Capítulo	Página
3.5.2. Detector de ionización de flama	65
3.5.3. Detector sensible a fósforo y nitrógeno	65
3.6. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	66
4. FARMACOCINETICA EN EL ANCIANO	69
4.1. Absorción	70
4.2. Distribución	72
4.3. Metabolismo	72
4.4. Eliminación	73
III PARTE EXPERIMENTAL	76
1. METODOLOGIA ANALITICA PARA LA CUANTIFICACION DE DIAZEPAM EN PLASMA	76
1.1. Validación del Método de Cromatografía de Gas - Líquido	76
1.2. Validación del Método de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	85
1.3. Estabilidad de Diazepam en Plasma	92

Capitulo	Pagina
2. ESTUDIO FARMACOCINETICO	93
2.1. Diseño de Regímenes de Dosificación	95
IV RESULTADOS	99
1. METODOLOGIA ANALITICA PARA LA CUANTIFICACION DE DIAZEPAM EN PLASMA	99
1.1. Validación del Método de Cromatografía de Gas - Líquido	99
1.1.1. Selectividad	99
1.1.2. Concentración mínima detectable	102
1.1.3. Linealidad	102
1.1.4. Repetibilidad	103
1.1.5. Exactitud	103
1.2. Validación del Método de Cromatografía de Líquidos	104
1.2.1. Selectividad	104
1.2.2. Concentración mínima detectable	112
1.2.3. Linealidad	112

Capítulo	Página
1.2.4. Repetibilidad	112
1.2.5. Exactitud	113
1.3. Prueba de Estabilidad en Plasma	113
2. ESTUDIO FARMACOCINETICO	117
2.1. Análisis de Momentos Estadísticos	131
2.2. Diseño de Regímenes de Dosificación	136
V DISCUSION DE RESULTADOS	141
1. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS PARA CUANTIFICAR DIAZEPAM EN PLASMA	141
1.1. Selectividad	141
1.2. Concentración Mínima Detectable	142
1.3. Linealidad	142
1.4. Repetibilidad	143
1.5. Sensibilidad	144
1.6. Exactitud	145
1.7. Tiempo de Análisis	147
1.8. Prueba de Estabilidad en Plasma	148
2. ESTUDIO FARMACOCINETICO	150
2.1. Análisis de Momentos Estadísticos	154

Capítulo		Página
	2.2. Diseño de Regímenes de Dosificación	163
	2.3. Diferencia entre sexos	164
	2.4. Efecto de la Edad Sobre los Parámetros Farmacocinéticos de Diazepam	165
VI	CONCLUSIONES	173
	APENDICES	176
	1. PRUEBA DE DISOLUCION DE TABLETAS DE DIAZEPAM	176
	2. METODO INCREMENTAL PARA LA ESTIMACION DE MICROCONSTANTES DE VELOCIDAD PERTENECIENTES A FARMACOS QUE SIGUEN UN MODELO ABIERTO DE DOS COMPARTIMIENTOS	182
	3. DISEÑO DE REGIMENES DE DOSIFICACION	190
	4. PERFILES DE CONCENTRACION PLASMATICA TIEMPO PARA CADA VOLUNTARIO	193
VII	BIBLIOGRAFIA	204

R E S U M E N

El diazepam es un fármaco ampliamente utilizado como ansiolítico, anticonvulsivante y relajante muscular, principalmente; debido a que este fármaco actúa sobre sistema nervioso central, produce reacciones adversas serias. Se ha observado que los efectos colaterales de esta benzodiazepina, tales como confusión e incoordinación motora aumentan con la edad, ya que su administración a ancianos produce depresión aún a dosis pequeñas.

En el presente trabajo se validaron 2 métodos analíticos para cuantificar diazepam en plasma, uno por cromatografía de gas - líquido y el otro por cromatografía de líquidos de alta resolución, en ellos se encontró una linealidad satisfactoria en un intervalo de concentración de 15 a 125 ng/ml y de 15 a 1000 ng/ml, respectivamente; una exactitud del $95 \pm 5\%$ (CGL) y $70 \pm 5\%$ (CLAR), una concentración mínima detectable de 7 ng/ml (CGL) y 8 ng/ml (CLAR) y un coeficiente de variación para cada concentración menor del 10%. Asimismo, se encontró que el fármaco es estable en plasma durante 4 semanas.

Se determinó la farmacocinética de diazepam (5 mg p.o.) en 13 voluntarios (7 mujeres y 6 hombres) de 61 a 92 años de edad; en ellos el fármaco se ajustó a un

modelo abierto de 2 compartimientos utilizando el criterio de Akaike; en los parámetros cinéticos del compuesto estudiado (α , β , k_{10} , k_{12} y k_{21}) se encontró una amplia variación interindividual, sin embargo, de manera general, los valores de tiempo de vida media de eliminación obtenidos en los ancianos fueron similares a los publicados en la literatura (10) (50.8 ± 30.2 h con respecto a 43 ± 13 h), detectándose que la eliminación fue más lenta en una voluntaria en la que se registró falla hepática ($t_{1/2} = 130.8$ h).

Asimismo, se determinó el régimen de dosificación para cada voluntario en base a los parámetros farmacocinéticos los cuales fueron independientes de la edad y sexo, cuando se evaluaron como factores aislados en una regresión lineal simple; no obstante, se encontró que la interacción entre ellos (mediante un análisis de regresión lineal múltiple) influye sobre la disposición del diazepam.

A B S T R A C T

Diazepam es a widely used drug as an anticonvulsivant, ansiolitic and muscle relajant; due to its effects on the central nervous system, it produces serious adverse reactions. It has been observed that the side effects of this benzodiazepine, i.e. confusion and motor incoordination, increase with age, because its administration produces depression in elederly people even in small doses.

In this work, 2 analytical methods were validated to quantify diazepam in plasma, the first one using gas-liquid chromatography (GLC) and the second one by high performance liquid chromatography (HPLC). In both methods, it was obtained a satisfactory linearity in concentration ranges of 15 - 125 ng/ml and 15 - 1000 ng/ml, respectively; with accuracy of $95 \pm 5\%$ for GLC and $70 \pm 5\%$ for HPLC. The lower limit of sensitivity for GLC was 7 ng/ml and 8 ng/ml for HPLC. The coefficient of variation for each concentration was less than 10%. It was found that this drug is stable in plasma during 4 weeks.

The pharmacokinetics of diazepam was studied (5 mg p.o.) with 13 volunteers (7 women and 6 men) ranging from 61 to 92 years. According to the Akaike's criterion,

the drug followed by a two - compartment open model; it was found a wide interindividual variation in the values of the parameters studied (α , β , k_{10} , k_{12} y k_{21}); in general, however, the obtained values for elimination half - life in the elderly people (50.8 ± 30.2 h) were similar to previous results (43 ± 13 h)(10). In the case of one male volunteer with hepatic failure, it was determined a slower elimination ($t_{1/2} = 130.8$ h).

The dosage regimen was determined for each volunteer based on the calculated pharmacokinetic parameteres, which were independent of age and sex when they were evaluates as isolated terms in a simple linear regression; it was found, however, that interaction between them (by means of a multiple linear regression analysis) influenced the disposition of diazepam.

C A P I T U L O I

INTRODUCCION

El diazepam es un fármaco ampliamente utilizado en la clínica desde 1963 en el tratamiento de estados de tensión y ansiedad (1). Debido a que este fármaco actúa sobre sistema nervioso central, produce efectos adversos serios como confusión, depresión respiratoria e incoordinación motora (2,3). La magnitud de estos efectos generalmete van acompañados de altas concentraciones plasmáticas de diazepam (4).

Se ha observado, que los efectos colaterales del diazepam aumentan con la edad, ya que pacientes geriátricos tienden a la depresión aún a dosis pequeñas (3). Para evitar estos transtornos, recientemente, se ha sugerido el empleo de parámetros farmacocinéticos para el diseño y ajuste de regímenes de dosificación (5).

Cabe mencionar que existen diferencias interindividuales en los parámetros de eliminación de

diazepam, con respecto a la edad (5,6), obesidad (6), algunas enfermedades como cirrosis y hepatitis viral (3) y a la raza (7); esto provoca que en la práctica, las dosis de fármaco deben individualizarse de acuerdo al diagnóstico de cada paciente y a la respuesta terapéutica observada (8,9).

En la literatura se ha descrito el comportamiento farmacocinético de diazepam en niños, adultos y ancianos (10,11,12). No obstante, estos estudios se han realizado en poblaciones distintas a la nuestra, bajo condiciones de raza, dieta y farmacogenética distintas.

En nuestro país, no existen reportes acerca de la farmacocinética en estos grupos de edades, es por ello que esta investigación esta encaminada a obtener los parámetros farmacocinéticos en ancianos y utilizarlos para el diseño de regímenes de dosificación, asimismo, a detectar diferencias posibles debido al sexo en la cinética de este fármaco.

CAPITULO II

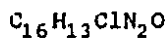
GENERALIDADES

1.1. Nombre Químico

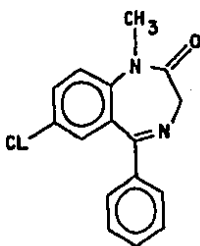
7 - cloro - 1,3 dihidro - 1 - metil - 5 fenil - 2H -
1,4 benzodiazepin - 2 ona (9)

Sinónimos: diazepam, valium, atensim, tensium

1.2. Fórmula Condensada



1.3. Fórmula Desarrollada



1.4. Composición Porcentual

Carbono = 67.49%, hidrógeno = 4.57%, cloro = 12.48%,
nitrógeno = 9.84% y oxígeno = 5.62%.

1.5. Peso Molecular

284.75

1.6. Apariencia Física (9,13)

Es un polvo cristalino color blanco a amarillo,
prácticamente sin olor y con sabor amargo

1.7. Rotación Óptica (13)

El diazepam no exhibe rotación óptica

1.8. Punto de fusión (13)

131 - 135 °C

1.9. pKa (9,13)

3.4 determinado espectrofotométricamente a 20 °C

1.10. Absorción Ultravioleta (9,13)

En HCl 0.1 N el diazepam presenta máximos a 242 ± 2 nm (E 1%, 1 cm=964), 285 ± 2 nm (E 1%, 1 cm=490) y 368 ± 2 nm

nm (E 1%, 1 cm = 148); en alcohol al 95% se presenta un máximo de 229 nm (E 1%, 1 cm = 1082)

1.11. Solubilidad

La solubilidad de diazepam en diferentes disolventes obtenida a temperatura ambiente se muestra en la tabla 2.1. (13).

Tabla 2.1. Solubilidad de diazepam en diferentes disolventes a temperatura ambiente.

Disolvente	Solubilidad (mg/ml)
Agua	0.05
Eter de petróleo (30 a 60°C)	0.9
Propilenglicol	17
Eter	18
Isopropanol	20
Etanol al 95%	41
Metanol	49
Acetona	125
Benceno	220
Dimetilacetamida	296
Cloroformo	> 500

1.12. Coeficiente de Distribución (14)

El coeficiente de distribución de diazepam entre octanol y solución amortiguadora de fosfatos (pH=7.4 y 0.05 M) a 25 °C es 631 (octanol/solución acuosa).

1.13. Estabilidad (13)

Han y colaboradores (15) estudiaron la cinética de reacción de degradación de diazepam, así como la constante de velocidad a diferentes temperaturas y a condiciones ácidas y alcalinas; los resultados que obtuvieron se encuentran en la tabla 2.2.

En soluciones ácidas y básicas el diazepam se hidroliza formando a 2-metilamino-5-clorobenzofenona y glicina de acuerdo a la siguiente reacción:

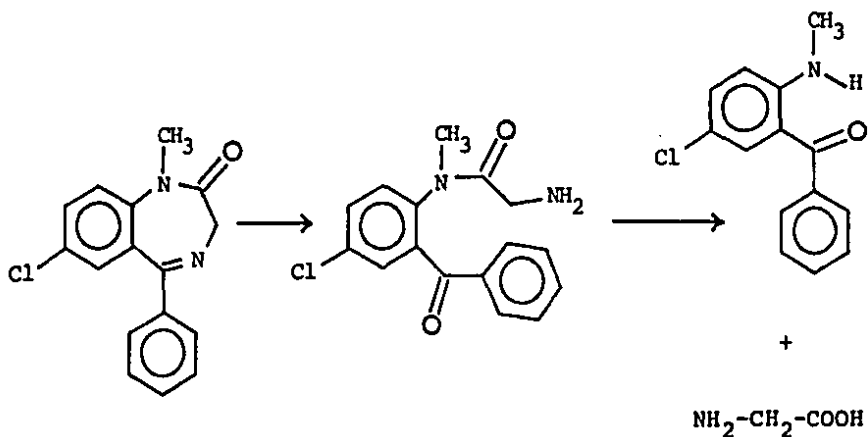


Tabla 2.2. Valores de las constantes de velocidad de primer orden, $10^4 k$ (min^{-1}) y parámetros termodinámicos para la hidrólisis de diazepam.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	pH	
	0.93	10.18
85	157.0	2.3
80	94.0	1.7
75	67.0	1.2
70	49.6	0.8
Ea (Kcal/mol)	18.4 ± 1.9	17.2 ± 0.6
ln P	24.0 ± 2.8	15.9 ± 0.9

Ea = energía de activación y P = factor de frecuencia.

2. FARMACOLOGIA DE DIAZEPAM

2.1. Aspectos Farmacodinámicos

2.1.1. Efectos farmacológicos y usos terapéuticos

El diazepam se utiliza ampliamente como tranquilizante (ansiolítico), sedante, hipnótico, antidepresivo, en casos de insomnio y tensiones de individuos normales y neuróticos (1,3).

Es empleado en psiquiatría, se aplica a gran variedad de enfermedades neurológicas y mentales; disminuye la aprehensión, el temor en pacientes con problemas de personalidad, de cáncer, cuadros de histeria y en víctimas de accidentes (16). Alivia los síntomas de delirium tremens desencadenados por la abstinencia de alcohol (9).

Es un relajante muscular esquelético (9), particularmente se utiliza en el tratamiento de diversas formas de espasmos musculares como tétanos y el síndrome de "hombre tieso".

Evita las convulsiones causadas por estriknina o el pentilentetrazol (17); es un producto de elección en el tratamiento de estados epilépticos (pequeño y gran mal) (16).

El diazepam se utiliza cada vez más como preanestésico: en anestesia regional, en cirugía mayor (cardiaca), dental y durante el parto (16).

En la tabla 2.3. se muestra el esquema de dosificación de este fármaco recomendado en la literatura (8) para el tratamiento de distintos padecimientos; sin embargo, se menciona que las dosis deben individualizarse para obtener mejores beneficios (8,9). En algunos estudios (18) se ha propuesto que la concentración mínima efectiva para el tratamiento de estados de ansiedad y en pacientes epilépticos se encuentra entre 400 a 500 ng/ml, observándose cambios en el electroencefalograma a partir de 100 ng/ml.

Rao y Lee (19,20) han estudiado el efecto del diazepam sobre la respiración. En 18 pacientes con enfermedad crónica pulmonar obstructiva administraron al fármaco a dosis de 34 mg, los efectos observados fueron: una disminución en la presión sanguínea sistólica, en la ventilación alveolar y en la producción de CO_2 sin registrarse cambios significativos en la presión sanguínea ni en la resistencia vascular periférica; asimismo, se detectó una depresión respiratoria a grandes dosis.

Los efectos colaterales observados en el hombre son: confusión, apatía, debilidad muscular, incoordinación

Tabla 2.3. Esquema de dosificación para niños y adultos de diazepam recomendado para diferentes padecimientos.

Padecimiento	Adultos	Niños(*)
Ansiedad moderada	Dosis de 2 a 10 mg (2 a 4 veces al día)	
Ansiedad severa	5 a 10 mg (cada 3 a 4 horas) las vías más utilizadas son I.V. e I.M.	
Síndrome de abstinencia de alcohol	Dosis inicial 5 a 10 mg y de mantenimiento 5 mg cada 3 o 4 horas	
Procedimientos endoscópicos	Titular la dosis hasta obtener los efectos deseados, generalmente se requieren 5 a 20 mg	
Espasmos musculares	Dosis inicial 5 a 10 mg, de mantenimiento 5 mg cada 3 o 4 horas	En casos de tétanos en niños menores de 5 años, 1 a 2 mg y cada 3 a 4 h, si es necesario. En mayores de 5 años de 5 a 10 mg

(*) Se recomienda no administrarse a niños menores de 6 meses.

Tabla 2.3. (continuación) Esquema de dosificación para niños y adultos de diazepam recomendado para diferentes padecimientos.

Padecimiento	Adultos	Niños (*)
Epilepsia (se recomienda la vía I.V.)	Dosis inicial de 5 a 10 mg, repitiéndose si es necesario cada 10 a 15 min hasta 30 mg como máximo	Niños menores de 5 años, de 0.2 a 0.5 mg cada 5 min si es necesario, hasta 5 mg como máximo. Para mayores de 5 años, 1 mg en el mismo intervalo de tiempo hasta 10 mg.
Pacientes geriátricos	2 a 2.5 mg, una a 2 veces al día; la dosis se puede aumentar gradualmente conforme sea tolerada	

(*) Se recomienda no administrarse a niños menores de 6 meses.

motora, visión borrosa, letargia, erupción cutánea, inconciencia, náusea, ataxia, somnolencia diurna, pereza, desorientación, vértigo, deterioro de la memoria,

debilidad, constipación, retención urinaria, bradicardia, hipotensión, cambios en la salivación, diplopia, la manera de hablar es balbuceante y de prisa y excitación paradójica (3,16,17). Se ha detectado que los efectos secundarios de este fármaco, usualmente están asociados con concentraciones mayores de 1 µg/ml (17), el nivel asociado a la aparición de síntomas tóxicos graves en humanos es de 5 a 20 µg/ml (17) y la concentración letal sanguínea publicada es mayor de 50 µg/ml (17).

La administración intravenosa en animales produce irritación localizada de tejidos alrededor de los sitios de inyección y en las paredes de las venas. Se han reportado casos de trombosis y flebitis en el sitio de inyección (9), por lo cual se recomienda que en una administración intravenosa la solución debe inyectarse lentamente y no aplicarse en venas pequeñas como en el dorso de la mano o en la muñeca (8).

Después de la administración de diazepam, se puede observar una respuesta paradójica, con síntomas de irritabilidad, insomnio y aumento en la espasticidad muscular, ansiedad y alucinaciones (3,17). A nivel bioquímico se ha propuesto que este fármaco es un antagonista de la norepinefrina y la serotonina, inhibe la incorporación del oxígeno en el cerebro y en el hígado y en

poco tiempo aumenta la concentración de glucosa y glucógeno cerebral (17).

Este fármaco debe de administrarse con precaución en niños (8), se ha observado depresión prolongada en el sistema nervioso central en recién nacidos debido a la inhabilidad de metabolizar al principio activo.

Los efectos colaterales del diazepam sobre el sistema nervioso aumentan con la edad (3,9), los ancianos tienden a la depresión aún a dosis pequeñas (3); este efecto se ha atribuido a que aumentan las concentraciones del fármaco en el cerebro de pacientes geriátricos por un cambio en la distribución en el organismo con respecto a la edad (ver Rahman en la sección 2.2.2.) debido a que posiblemente se incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (21).

2.1.2. Mecanismo de acción

Las células blanco de diazepam son neuronas que contienen receptores del ácido gama aminobutirico (GABA).

Se ha propuesto como modelo del receptor farmacológico (22) a un complejo constituido por 4 subunidades muy similares. Esta estructura es capaz de formar un poro central que se puede cerrar o abrir como respuesta a cambios en la conformación de las subunidades.

Dentro del modelo, cada subunidad tiene al menos 3 funciones diferentes; una de ellas es formar el poro, y las otras el de unir al GABA y a las benzodiazepinas en sus sitios correspondientes. Cuando el diazepam interactúa con su sitio receptor se producen cambios conformacionales en la subunidad los cuales inducen a que los sitios de unión de GABA tengan un estado de alta afinidad hacia el neurotransmisor, provocando que se abra un poro para que permita la permeabilidad de aniones, principalmente cloruros, en mayor proporción que en condiciones normales (el diazepam así, aumenta la potencia de GABA).

Möhler (23) determinó que la constante de disociación (KD) en preparaciones de sinaptosomas aislados de corteza cerebral fue de 3.6 ± 0.1 nM. Se ha observado que el valor de KD no difiere con respecto al sexo de ratas, sin embargo, $V_{m\acute{a}x}$ fue 15% mayor en hembras que en machos.

2.1.3. Toxicidad

Dí Palma y Rojas (16,24) han señalado que la ingestión crónica de diazepam puede dar lugar a ideas e intentos suicidas; cuando se administra en forma crónica a grandes dosis produce una lentificación en las frecuencias

electroencefalográficas espontáneas (24), parece provocar amnesia retrograda (16), disminuye la reacción del despertar provocada por la estimulación eléctrica del hipocampo (16).

Es rara la toxicidad sobre el hígado y la sangre a dosis comunmente usadas tanto en forma aguda como crónica (16). Experimentos a largo plazo en ratas no revelaron disturbios en la función endócrina (8).

La dosis letal 50 determinada en ratón es de 720 mg/kg y de 1240 mg/kg en rata utilizando la vía oral. En monos una dosis intraperitoneal de 400 mg/kg provoca la muerte al sexto día de la administración del fármaco (8).

En estudios enfocados a conocer el efecto de diazepam sobre la reproducción en ratas (8), se administró oralmente el fármaco a dosis de 1, 10, 80 y 100 mg/kg en periodos de 60 a 228 días previos al apareamiento de estos animales. A 100 mg/kg se observó un número disminuido de embarazos y de neonatos sobrevivientes. Estos resultados se atribuyeron a una sedación prolongada en las ratas que provocó una falta de interés en el apareamiento y un descuido hacia las ratas recién nacidas por parte de sus madres. Se determinó, en esta investigación que la mortalidad de las ratas a dosis mayores de 100 mg/kg se encontraba dentro de los límites normales. Estudios

adicionales en ratas incluyendo dosis de 80 mg/kg/día, revelaron que no existen efectos teratogénicos significantes sobre la descendencia (8).

Por otra parte, Kellog y colaboradores (25) encontraron que la administración de diazepam en la tercera semana de gestación en ratas provoca cambios en el desarrollo celular y alteraciones en la diferenciación del tejido nervioso. Este periodo es especialmente sensible a fármacos que actúan sobre el sistema nervioso central dando como consecuencia excitación además de efectos teratogénicos. En ratas expuestas a dosis altas (10 mg/kg) durante la tercera semana postnatal, se observa ausencia de la actividad potencial locomotora y una reducción en los reflejos ante el ruido (25).

En una investigación realizada en conejos en los cuales se les administró oralmente al diazepam a dosis de 1, 2, 5 y 8 mg/kg desde el sexto hasta el dieciochoavo día de gestación, se concluyó que no existen efectos adversos sobre la reproducción ni daños teratogénicos (8).

Con respecto a humanos, los efectos que origina el diazepam sobre los cromosomas in vitro e in vivo, proporcionan resultados contradictorios (26). Se llega a concluir que como sustancia usada en terapia no produce daño genético (26). No obstante, otros estudios demuestran

lo contrario (27,28). Estudios realizados en leucocitos humanos in vitro sugieren que el diazepam es capaz de inducir daños cromosómicos tales como rompimientos en cromátidas; generalmente, el incremento de estas alteraciones aumenta de acuerdo a la dosis (27).

Stenchever y colaboradores (27) observaron alteraciones cromosómicas al analizar el cariotipo de un cultivo celular perteneciente a mujer de 24 años de edad expuesto a concentraciones de 10 a 20 µg/ml de diazepam, durante 72 horas. Asimismo, las mismas alteraciones se detectaron en 23 pacientes después de 6 meses de haber recibido un tratamiento crónico de 30 mg/kg durante 18 meses.

El diazepam atraviesa fácilmente la barrera placentaria (secciones 2.2.2. y 2.2.4). Se ha observado que la administración de este fármaco en mujeres durante el primer trimestre del embarazo ha causado malformaciones en el feto, tales como el hendimiento del labio con o sin paladar hendido (29).

2.1.4. Dependencia y tolerancia

Algunos investigadores han mostrado que el diazepam no produce adicción (30), otros, que la ingestión crónica de dosis terapéuticas empleadas en la práctica clínica, no

origina dependencia física (24). No obstante, hay evidencias que demuestran que el diazepam, siendo un tranquilizante menor tiene la propiedad de causar adicción (31,32).

Maletzky y colaboradores (31) publicaron con respecto a la adicción ansiolítica del diazepam, que se puede presentar el problema de adicción, debido en primer lugar, a la necesidad de una administración crónica para llegar a controlar los estados de ansiedad; ya que de un total de 24 pacientes expuestos al fármaco, 22 de ellos resultaron incapaces de renunciar a él.

Por otra parte, se ha determinado que dosis elevadas de diazepam (80 a 100 mg) administradas diariamente durante varios meses, originó dependencia física en pacientes psiquiátricos (24).

La tolerancia farmacológica es un estado de disminución en la respuesta hacia los efectos de un fármaco debido a una exposición previa a este en el organismo (33).

Se ha publicado, que en hombres jóvenes y ancianos, se puede desarrollar tolerancia después de administraciones continuas de fármaco (34). Frey (35) observó que con dosis intravenosas de diazepam de 0.25 a 0.50 mg/kg/3 veces al día durante 15 días, se desarrolló tolerancia al efecto anticonvulsivante en perros; una vez que se alcanzó el

estado estacionario en las concentraciones plasmáticas de diazepam y sus metabolitos, estas se mantuvieron inalteradas durante el estudio, sin embargo, se observó una disminución en el efecto farmacológico.

Existen algunas hipótesis orientadas a explicar el mecanismo de esta tolerancia.

Algunos investigadores han propuesto que el diazepam puede inducir su propio metabolismo (36-39), provocando una eliminación mayor conforme el organismo se expone al fármaco; sin embargo, no se han encontrado evidencias claras que soporten esta hipótesis (sección 2.2.3.) (40,41).

Otro mecanismo propuesto por Barnett y Fiore, descrito por Frey (35) para explicar la tolerancia hacia este fármaco es que durante la administración crónica se producen cantidades considerables del metabolito desmetildiazepam, el cual puede desplazar al fármaco inalterado de su receptor farmacológico, ya que tiene una afinidad alta hacia este, pero una potencia menor, por lo que se observa una respuesta biológica disminuida.

Por otra parte, se ha publicado (35) una unión disminuida de la benzodiazepina dependiente de la dosis en cultivos celulares de corteza cerebral expuestos a diazepam durante 10 días.

Se han realizado algunas investigaciones para determinar si existe alguna alteración en el sitio de unión y número de receptores farmacológicos de diazepam que pudieran provocar tolerancia después de administraciones crónicas del fármaco, sin embargo, los resultados publicados son contradictorios (22).

2.1.5. Síndrome de abstinencia

El síndrome de abstinencia se origina al interrumpir el diazepam después de dosis elevadas o por administraciones durante un periodo prolongado (3). La suspensión ocasiona el volver a las condiciones previas al tratamiento o aún peor, los estados de ansiedad son mayores a los padecimientos antes de la administración, esto puede entenderse como un efecto de rebote incrementado.

En el caso de pacientes psicóticos, se ha observado, que durante la abstinencia se presentan crisis convulsivas, y posteriormente, se desarrolla epilepsia de gran mal. Entonces, la dependencia psíquica se ve reforzada por una dependencia física. En la tabla 2.4. se presentan los principales síntomas de abstinencia de diazepam, en un estudio realizado con 24 personas por Maletzky y Kloter (31), después de dosis elevadas o por haberse administrado

durante largo tiempo.

Tabla 2.4. Síntomas de abstinencia en humanos (24 pacientes) causados por diazepam.

Síntoma	Frecuencia	%
Ansiedad	23	95
Agitación	18	75
Insomnio	14	58
Temblor	10	42
Diaforesis	7	29
Dolor	6	25
Depresión	4	17
Pesadillas	4	17

2.2. Aspectos Farmacocinéticos

2.2.1. Absorción

Se ha publicado en la literatura, que después de una administración oral, el diazapam es cuantitativa y rápidamente absorbido en el tracto gastrointestinal (10). En algunos estudios (42) con voluntarios sanos, se calculó la absorción oral en relación a una administración intravenosa, obteniendo valores del 90 al 97%, alcanzándose la concentración plasmática máxima en un intervalo de 1 a 1.5 horas, con una constante de absorción de 1.92 h^{-1} ($t_{1/2} = 22$ minutos). Más tarde, Eatman y colaboradores (43) informaron que en su estudio con 6 hombres sanos de peso promedio de 70 kg y 26 años de edad, se obtuvo una constante de absorción de 1.31 h^{-1} ($t_{1/2} = 32$ minutos) en una administración oral del fármaco, siendo el valor de la constante independiente de la dosis (5 a 15 mg).

Clinicamente se ha observado, que a pacientes a quienes se les ha administrado diazepam oralmente presentan mayor sedación durante los primeros 90 minutos que cuando se les administra el fármaco intramuscularmente. Assaff y colaboradores (44) evaluaron las dos vías de administración en 97 pacientes hospitalizados, utilizando 10 mg de

principio activo y cuantificándolo posteriormente, a diferentes tiempos; los resultados se pueden observar en la tabla 2.5., de manera general, estos investigadores encontraron que la vía oral presenta mejor absorción que la intramuscular, ya que en esta última intervienen algunos factores como el ejercicio y el músculo donde se deposita la dosis.

Similarmente, en voluntarios sanos, se ha observado absorción pobre e irregular después de la administración intramuscular, ya que se alcanzan niveles plasmáticos de diazepam del 60% de los encontrados después de una oral, corroborándose, al igual que en pacientes hospitalizados, que la variación es en la absorción, y esta depende de la técnica y sitio de inyección (10,45). Asimismo, Morselli (12) obtuvo un tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima del fármaco en niños de 15 a 30 minutos y de 30 a 40 minutos después de una administración oral e intramuscular, respectivamente.

Por otra parte, en investigaciones realizadas con supositorios, se informó que existe una absorción lenta errática e incompleta siendo del 50% con respecto a una administración oral (10); por lo que se limita a utilizar las vías intramuscular y rectal solo en casos clínicos justificados.

Tabla 2.5. Concentración plasmática media después de una dosis de 10 mg de diazepam (n = 97 pacientes)

Número de pacientes	Administración	Tiempo (minutos)			
		15	30	60	90
40	oral	75	100	208	117
10	intramuscular (glúteo)	96	105	110	100
33	intramuscular (muslo)	80	110	152	149
10	intramuscular (muslo y ejer- cicio)	214	284	272	243

Mandelli y colaboradores (10) publicaron que existen diferencias entre la concentración plasmática máxima y el $t_{máx}$ después de una administración oral del fármaco entre grupos de individuos de diferentes edades; en la figura 2.1. se muestran los perfiles de concentración plasmática-tiempo de diazepam para niños, adultos y ancianos obtenidos por estos investigadores.

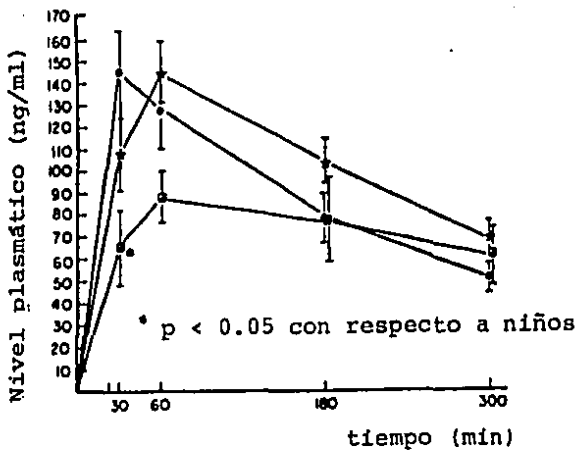


Figura 2.1. Niveles sanguíneos de diazepam en niños, adultos y ancianos después de una administración oral simple (0.25 mg/kg). —●— Niños (0.3 a 4 años); —★— Adultos (17 a 59 años) y —□— Ancianos (60 a 80 años).

En un estudio efectuado por Rutherford (46) con 36 voluntarios de edad entre 29 y 72 años, se encontró que la concentración plasmática de diazepam se ve disminuida en ancianos con respecto a voluntarios jóvenes, después de una dosis de fármaco, este hallazgo se atribuyó a una absorción pobre en el grupo de edad avanzada, sin embargo, existe la posibilidad de que el cambio en el volumen de distribución pueda contribuir a que se manifiesten estas diferencias (sección 2.2.2.).

Asimismo, al comparar la absorción oral en ancianos con respecto a jóvenes, Wiles (47) utilizó una formulación de liberación prolongada conteniendo 15 mg de diazepam; las concentraciones plasmáticas del fármaco observadas en el grupo de ancianos fueron siempre más bajas que las encontradas en jóvenes.

2.2.2. Distribución

Se ha observado en el hombre, que el diazepam sigue un modelo abierto de dos y tres compartimientos (37,42,43,48,49). Este fármaco se distribuye ampliamente en todos los tejidos del cuerpo. En una investigación realizada por Schawrtz (50) para estudiar la distribución de diazepam en ratas, se administró por vía intraperitoneal al fármaco marcado radioactivamente, una hora después se encontró que la relación de concentraciones tejido/plasma fue mayor de 1.0 en todos los tejidos excepto cerebro; la concentración más alta se observó en hígado, seguido por la grasa peri-renal y riñón; durante la administración crónica el fármaco se acumula preferentemente en tejidos ricos en lípidos (3).

El diazepam es un fármaco que se une ampliamente a proteínas plasmáticas; según la técnica que se utilice para

su determinación, se ha publicado que su unión a albúmina es de 96.8 a 98.6% (10), siendo independiente en el intervalo de concentración de 0.2 a 16 µg/ml (48,51). En la tabla 2.6. se muestra el % de unión de diazepam y sus metabolitos a proteínas plasmáticas y séricas encontradas por Gordon (52).

Tabla 2.6. % de fármaco unido a proteínas utilizando diálisis al equilibrio.

	% de unión en plasma	% de unión en suero
Diazepam	98.3	96.8
Desmetildiazepam	96.3	96.6
Oxazepam	95.7	-

El % de fármaco libre en circulación sanguínea depende de algunos factores. Routledge (53) estudió la unión a proteínas en voluntarios sanos para observar la influencia del sexo sobre el % de diazepam libre en el plasma, encontrando que para mujeres que tomaban

anticonceptivos orales, el % de fármaco libre fue de $1.99 \pm 0.34\%$, en mujeres que no recibían ningún medicamento $1.67 \pm 0.34\%$ y en hombres $1.46 \pm 0.12\%$. En todos los sujetos participantes, el cociente fármaco unido/fármaco libre fue inversamente relacionado al logaritmo de ácidos grasos no esterificados en plasma y directamente relacionado a la concentración de albúmina plasmática; asimismo, en una investigación realizada posteriormente (54) con el mismo objetivo, se llegó al mismo resultado, ya que se observó un % de fármaco libre de 1.46% y 1.64% en hombres y mujeres respectivamente menores de 30 años y de 1.81% y 2.05% para hombres y mujeres mayores de 69 años. Sin embargo, Ochs y colaboradores (49) no encontraron diferencias significativas en el % de fármaco libre en mujeres (1.06) y hombres (1.26) de edad entre 20 y 33 años.

Con respecto a la influencia de la edad sobre el % de unión de diazepam en proteínas plasmáticas existen resultados contradictorios; en la tabla 2.7. se muestran los datos publicados por diferentes autores (55) en la cual, se puede observar la variabilidad de los resultados encontrados; Swift (56) trabajando con 2 grupos: jóvenes (edad 19 a 26 años) y ancianos (66 a 78 años) notó una correlación significativa entre la fracción libre y la edad, sin embargo, Allin en 1984 (55) no detectó

Tabla 2.7. Efecto de la edad sobre el % de unión de diazepam a proteínas plasmáticas.

INVESTIGADOR	SUJETOS (No./tipo/sexo/edad)	CAMBIO EN EL % DE FARMACO LIBRE	COMENTARIOS
Klotz (1975)	33S: 27H/6M, 15-82	inalterado	
Abel (1979)	103S: 19-70	umenta	correlación de albúmina con la edad $r=-0.28$, $p<0.01$
Johnson (1979)	20S: 25-86	inalterado	en el estudio solo 6 eran ancianos
Greenblatt (1980)	44S: 11H 23-37	umenta en mujeres	correlación entre albúmina y la edad: $r=-0.36$, $p<0.05$; correlación entre % FL con albúmina: $r=-0.25$, $p>0.1$
	11H 63-76		
	11M 21-32	inalterado en hombres	
	11M 61-84		

Abreviaturas: H=hombre, M=mujer, S=voluntarios sanos, P=paciente y % FL=fármaco libre;
la edad está expresada en años.

Tabla 2.7. (continuación) Efecto de la edad sobre el % de unión de diazepam a proteínas plasmáticas.

INVESTIGADOR	SUJETOS (No./tipo/edad/sexo)	CAMBIO EN EL % DE FARMACO LIBRE	COMENTARIOS
Macklon (1980)	4S/15P:12M/7H, 18-95	aumenta	correlación entre albúmina y edad: $r=-0.86$. Los pacientes estaban sometidos a gastroscopia
Allen (1981)	62S: 19H 22-43 10H 62-76 20M 20-38 13H 61-85	aumenta en mujeres inalterado en hombres	
Ochs (1981)	40S/P: 27H 20-91 13M 21-33	inalterado	todos los ancianos eran hombres.
Davis (1985)	63S: 34H/29M 18-88	disminuido	

diferencias en el % libre entre hombres jóvenes (1.44%) y ancianos (1.59%), pero si en mujeres ancianas (1.64%) con respecto a mujeres jóvenes (1.39%).

En feto y en niños recién nacidos se ha encontrado una fracción del fármaco libre del 16% (10).

Por lo anteriormente expuesto, no se puede aseverar que la edad sea un factor que influya en la unión del fármaco a proteínas plasmáticas.

Por otra parte, no se han observado (54) diferencias en la unión a proteínas del diazepam entre fumadores (8 cigarros/día) y no fumadores, siendo estos voluntarios sanos menores de 30 años.

Con respecto a la unión de diazepam a albúmina, se han encontrado: 1 (57) y 2 (52,58,59) clases de sitios de unión; en la tabla 2.8. aparecen el número de sitios de cada clase de unión, así como la constante de asociación fármaco-proteína para diazepam y sus metabolitos principales.

El desmetildiazepam y el oxazepam se unen en menor extensión a albúmina que diazepam, sin embargo, el fármaco es desplazado en presencia de sus metabolitos y la K_a de diazepam y el número de sitios de unión, en ambos casos se reduce significativamente; el mismo desplazamiento ocurre cuando el principio activo se encuentra en presencia de

Tabla 2.8. Constantes de afinidad y número de sitios de unión para diazepam y sus metabolitos publicados por diferentes autores, K_a (M^{-1}).

COMPUESTO	n	$K_a(1)$	n	$K_a(2)$	METODO	REFERENCIA
Diazepam		4.9×10^5			Filtración en gel	(57)
Diazepam		3.9×10^5			Ultrafiltración	(57)
Diazepam		1.8×10^5			Micropartícula	(57)
Diazepam		2.5×10^5			Difusión	(57)
Diazepam	1.00	5.1×10^5	2.00	2.2×10^3	Difusión	(59)
Diazepam	0.90	9.5×10^5	5.30	1.9×10^3	Difusión	(52)
Desmetildzp	0.9	4.4×10^5	4.60	4.4×10^3	Difusión	(52)
Oxazepam	0.70	6.5×10^5	6.30	1.39×10^3	Difusión	(52)

ácido palmítico u oléico, y en general, con ácidos grasos y triglicéridos (69). Ni el ácido úrico, ni la bilirrubina alteran la unión de diazepam a albúmina (52,60). Por otra parte, no se han encontrado diferencias en términos de la constante de afinidad y sitios de unión para diazepam entre sangre de niño y adulto (12).

Marruyama y colaboradores (58) caracterizaron que una parte del sitio de unión de diazepam a albúmina está localizada en un fragmento de la proteína resistente a tripsina (residuos 182-585) ya que este es capaz de unir al fármaco, aunque la afinidad es muy débil, asimismo, estos investigadores postularon que tirosina-411 en albúmina forma parte del sitio de diazepam, ya que se observa una reducción pronunciada de la unión del fármaco después de su modificación selectiva con tetranitrometano.

Después de la administración oral de la misma dosis de diazepam a un grupo de individuos, se ha detectado que existe gran variación interindividual en la concentración plasmática del fármaco; en la figura 2.2. se muestra una gráfica de barras encontrada por Garattinni (10,61) en la que se puede notar una gran dispersión en los niveles de estas benzodiazepinas a los 180 minutos después de su administración. Este hallazgo se ha atribuido a que existen grandes diferencias en el volumen de distribución de este

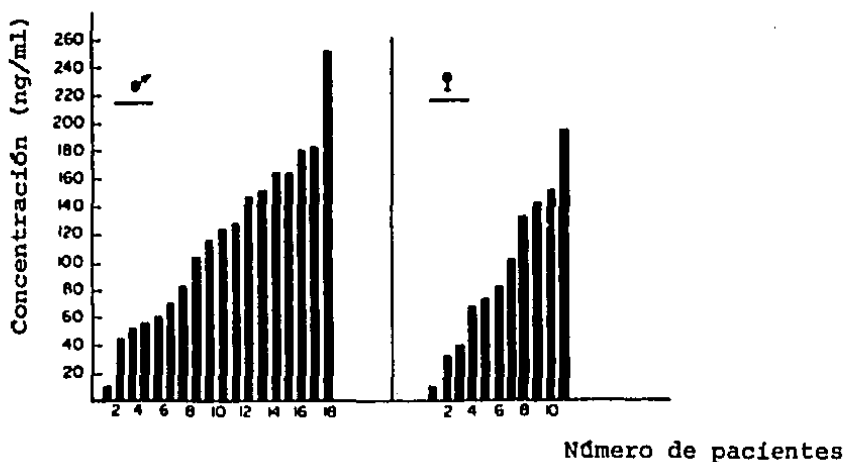


Figura 2.2. Niveles sanguíneos de diazepam 180 minutos después de la administración oral de 15 mg del fármaco en hombres y mujeres sanos.

fármaco en el organismo, ya que se ha encontrado para el volumen del compartimiento central valores de 1.6 a 3.2 l/kg en individuos sanos de 25 a 43 años (42).

La edad, el sexo y algunas enfermedades hepáticas son factores que se han encontrado que afectan el volumen de distribución del diazepam.

El volumen del compartimiento central (V1) y el de distribución durante el estado estacionario (VdEE) han mostrado tener una dependencia significativa (lineal) con la edad (10,11,47,49,57) en el intervalo de 15 a 82 años, debido a los cambios en la composición corporal que sufre el organismo al envejecer, ya que al acumularse tejido adiposo y disminuir la masa muscular, este fármaco dada su liposolubilidad tiende a permanecer mayor tiempo en los lípidos del organismo y así alterar su disposición; por otra parte, se ha encontrado que la albúmina sérica tiende a disminuir con la edad (49,54,62) la concentración de esta proteína en sujetos de 80 años, es aproximadamente 20% menor que en sujetos de 20 años.

Swift y colaboradores (56) al comparar un grupo de 12 jóvenes (19 a 26 años de edad) con otro formado por 12 ancianos (edad 66 a 78 años) encontraron diferencia estadísticamente significativa en la concentración plasmática máxima de diazepam (261.72 ± 30.59 ng/ml contra 161.5 ± 18.4 ng/ml, respectivamente) y el área bajo la curva concentración plasmática-tiempo (1982 ± 156 ng/ml/h contra 1227 ± 116 ng/ml/h, respectivamente). Asimismo, se ha observado diferencia en el volumen de distribución en recién nacidos y niños (1.3 a 2.6 l/kg) con respecto a adultos (1.6 a 3.2 l/kg) (12).

Por otra parte, Uchs (59) estudió a 71 voluntarios (34 mujeres y 37 hombres) entre 21 a 33 años con el objeto de establecer si existen diferencias en el volumen de distribución de diazepam con respecto al sexo; a quienes les administró intravenosamente 10 mg del fármaco, los resultados mostraron un volumen de distribución mayor en mujeres (1.87 l/kg) que en hombres (1.34 l/kg); al realizar el cálculo del volumen de distribución del fármaco libre, los resultados fueron consistentes ya que se obtuvieron valores de 103 l/kg y 179 l/kg para hombres y mujeres respectivamente.

Las enfermedades hepáticas pueden provocar cambios importantes en la cinética de diazepam, ya que es probable que se presenten algunas alteraciones: a) acumulación de algunas sustancias que compiten por los sitios de unión del fármaco en proteínas, b) exista disminución en la cantidad de proteínas plasmáticas y c) disminuya la actividad enzimática del hígado (62). En investigaciones realizadas (11) con enfermos de cirrosis hepática y hepatitis viral (crónica y aguda) se encontró que no hay diferencia significativa en el V_i pero si en el V_{dEE} (1.74 ± 0.21 en enfermos, contra 1.13 ± 0.28 l/kg en sujetos normales).

Existen algunos trabajos publicados (39,63) en los cuales se ha estudiado el comportamiento cinético de

diazepam en pacientes alcohólicos. En general, se detectó, que las concentraciones plasmáticas del fármaco en estos pacientes siempre eran menores que los encontrados en sujetos normales después de una administración oral e intravenosa, sin embargo, no se registraron cambios en la concentración plasmática de desmetildiazepam; por los hallazgos anteriores se ha propuesto que existe un aumento en el volumen de distribución del fármaco en los pacientes alcohólicos.

Después de 1 a 6 semanas de tratamiento con diazepam, se ha detectado que la CpEE disminuye con respecto a la CpEE inicial, debido a una acumulación del fármaco en eritrocitos después de 11 semanas (64). Sin embargo, se ha encontrado una relación lineal ($r = 0.9484$) entre el VdEE y la dosis diaria en 25 pacientes que tomaban este principio activo a dosis de 5 a 20 mg/día (61).

En un estudio desarrollado por Abernethy y colaboradores (65) se observó que el metabolito principal de diazepam (desmetildiazepam) no tiene influencia sobre el volumen de distribución del fármaco inalterado, ya que el valor de este parámetro se mantuvo constante antes (1.26 l/kg) y después (1.32 l/kg) de la administración crónica de clordiazepóxido (profármaco de desmetildiazepam) en 6

voluntarios sanos a los cuales se les administró 10 mg de diazepam intravenosamente.

Líquido cefalorraquídeo

El paso de plasma hacia el líquido cefalorraquídeo, corresponde a la fracción libre de diazepam (2 a 3%) y de su metabolito principal (1 a 4%). En un régimen de dosificación prolongado (15 a 30 mg/día durante algunos meses), no se observa cambio en la concentración de diazepam en líquido cefalorraquídeo, pero es acompañado de una acumulación significativa de desmetildiazepam en este fluido biológico (30.9% del nivel plasmático) (10).

Cerebro

En un estudio realizado (10) con respecto a la cinética de diazepam y sus metabolitos en cerebro de gatos, se observó una fase de distribución rápida en la materia gris y una fase larga de acumulación del fármaco y sus metabolitos en la materia blanca (esta zona es rica en lípidos). Esta acumulación es más marcada después de dosis repetidas del fármaco. Arendt (66) encontró que la desaparición de esta benzodiazepina del sistema nervioso central es paralela con la desaparición del compuesto en el plasma de gatos, asimismo, determinó un cociente de

concentraciones SNC/plasma de 0.12.

Rahman (57) examinó los cambios en los niveles de diazepam y sus metabolitos en el cerebro, asociados con la edad en ratas macho Fisher jóvenes (3 a 4 meses), maduros (12 a 15 meses) y viejos (29 a 31 meses), a los cuales se les administró una dosis intravenosa de 180 µg/kg de peso. El área bajo la curva (ABC) del fármaco y sus metabolitos de 0 a 60 minutos y 0 a 120 minutos en cerebro fueron mayores en las ratas ancianas que en los otros dos grupos; algunos valores encontrados en este estudio se muestran en la tabla 2.9.

Tabla 2.9. ABC de 0 a 120 minutos (µg/min/g) en cerebro de ratas viejas, maduras y jóvenes después de una administración de 180 µg/kg.

Compartimiento	Promedio ± desviación estándar		
	Viejos	Maduros	Jóvenes
Cerebro (n=5)	12.31±0.66	8.56±0.48(b)	5.75±0.49(b,c)
% fármaco libre	2.83±0.26	2.08±0.35	2.51±0.40

b = diferencia con respecto a ratas viejas, c = diferencia significativa con respecto a ratas maduras (p<0.01).

Tejido adiposo

Se cuantificó diazepam en tejido adiposo después de una administración intravenosa de 10 mg a 2 pacientes, encontrándose a los 30 minutos una concentración de 300 y 345 ng/g de tejido adiposo, así como 200 y 239 ng/g a los 60 minutos (10).

Saliva

Después de la administración oral de 0.14 mg/kg de diazepam a 5 voluntarios sanos (24 a 33 años), se colectaron muestras de sangre y saliva (67), las gráficas de concentración plasmática contra tiempo, determinadas para los dos fluidos no fueron correspondientes, la relación de concentraciones saliva/plasma fue significativamente dependiente del tiempo ($t_{\text{máx}}$ en saliva = 100 minutos, $t_{\text{máx}}$ en plasma = 60 minutos); este hallazgo se comprobó posteriormente, (51) donde para una administración de diazepam, no se encontró una relación lineal al hacer un ajuste de mínimos cuadrados a las variables: concentración plasmática - concentración salival ($r = 0.89$, $n = 4$ y 6 voluntarios), sin embargo, con una administración crónica del fármaco, si se presenta una relación lineal entre ellas ($r = 0.99$, $n = 27$). Gier y colaboradores (68) encontraron un $r = 0.96$ entre los niveles de diazepam en

saliva y plasma para 18 voluntarios después de 2.5 a 3 horas de la administración del fármaco (concentración salival/concentración plasmática = 0.17), asimismo, observaron que después de este tiempo (en el cual ya se ha alcanzado el equilibrio, las curvas de concentración plasmática y salival son paralelas).

Barrera placentaria

Este fármaco puede atravesar fácilmente la barrera placentaria (sección 2.2.4.)

2.2.3. Eliminación

La vía principal de eliminación del diazepam es el metabolismo, en la figura 2.3. se muestran los metabolitos del fármaco; el diazepam sufre una desmetilación (50) con la formación de N-desmetildiazepam y una hidroxilación con la formación de N-metiloxazepam, el primero es hidroxilado y el segundo subsecuentemente desmetilado para convertirse en oxazepam y glucurónidos, los cuales son principalmente excretados en orina. Los metabolitos del diazepam poseen actividad farmacológica (3). En hombre, después de una administración de 10 mg del principio activo se recupera el 70% de la dosis en orina y 10% en heces (50).

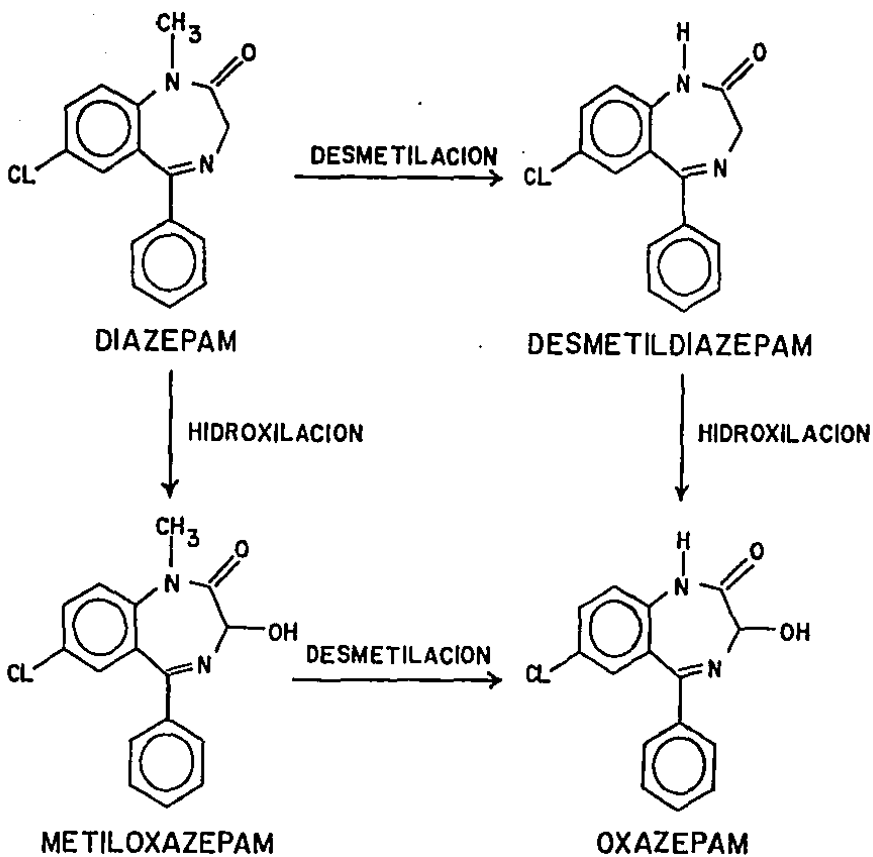


Figura 2.3. Vía metabólica de diazepam.

En una investigación realizada por Kanto (69) se determinaron los niveles plasmáticos y urinarios de diazepam y sus metabolitos después de una dosis terapéutica en niños y adultos para compararlos con pacientes intoxicados, a fin de conocer el efecto de la dosis en el metabolismo y excreción del fármaco. En adultos sanos de 31 ± 4 años el metabolito principal encontrado en suero, plasma o sangre fue el desmetildiazepam y a las 24 horas después de una dosis de 5 mg del fármaco, se excretó el 12.8% de la dosis en orina, de la cual 12.7% correspondió a desmetildiazepam conjugado y el 87.2% de oxazepam conjugado. Brandt (10) al estudiar a diazepam y sus metabolitos en individuos sanos se encontró que existe una gran variación interindividual en la relación plasmática diazepam/desmetildiazepam la cual varía de 0.21 a 1.7.

En niños prematuros y recién nacidos (69) el desmetildiazepam es el metabolito principal en orina (esto se debe a la baja capacidad de hidroxilación al nacer). En niños de 2 a 6 años de edad, después de una dosis oral única de diazepam de 0.5 a 10 mg, el compuesto principal eliminado en orina fue oxazepam conjugado (57.4%), siguiendo en importancia el desmetildiazepam conjugado (38.2%), metiloxazepam (3%) y diazepam (1.4%). Un promedio del 11% de la dosis del fármaco fue excretado en orina las

primeras 24 horas.

El principal componente del plasma en los pacientes intoxicados (69) fue diazepam inalterado, después desmetildiazepam y cantidades significativas de oxazepam y desmetildiazepam conjugado, la excreción diaria fue del 71.6% de la dosis administrada, siendo para los metabolitos conjugados: 62.3% de oxazepam, desmetildiazepam 28%, metiloxazepam 9.3% y 0.4% de diazepam.

Por las observaciones anteriores, Kanto y colaboradores (69) concluyeron que la dosis de diazepam administrada a humanos tiene efecto sobre la cantidad de sus metabolitos en plasma y orina.

En algunos trabajos publicados, se ha propuesto que el diazepam puede ser un inductor enzimático y estimular su propio metabolismo (36-38), lo que puede explicar la tolerancia de algunos pacientes y el síndrome de abstinencia observado. Sin embargo, en la literatura existen resultados conflictivos con respecto a este tema. En un estudio desarrollado por Martti (39) se comparó a este fármaco con 2 compuestos estimulantes del metabolismo (fenobarbital y 3,4 benzopireno) en ratas; estos animales se trataron previamente durante 6 días con cada fármaco, se decapitaron y se les extrajo el hígado, los resultados se muestran en la tabla 2.10.; el diazepam no tuvo efecto

sobre el contenido de citocromo P450 ni inducción en su propio metabolismo.

Por otra parte, (40) al comparar la actividad in vivo e in vitro, para conocer si induce el metabolismo de otros fármacos tomando como sustratos a p-nitrofenol, anilina y aminopirina, se observó que el diazepam aumentó

Tabla 2.10. Efecto del tratamiento de diazepam, fenobarbital y 3,4 benzopireno sobre el metabolismo de diazepam y citocromo P450 en microsomas hepáticos de rata.

Grupo	Contenido de cit. P450 (nmol/g hígado)	Sustratos y metabolitos recobrados después de la incubación (nmol)		
		D	MO	DD
		Control	8.3±1.6	28.1±0.6
Diazepam	7.5±0.8	28.3±0.7	2.9±0.5	2.5±0.3
Fenob.	19.1±3.4	14.9±1.5*	10.4±2.2*	8.3±1.9*
Benzop.	10.6±3.6	29.6±0.7	2.8±0.4	2.3±0.3

Valores promedio ± desviación estándar, * = p<0.001,

D = diazepam, MO = metiloxazepam y DD = desmetildiazepam.

la actividad de las enzimas metabolizadoras microsomales en los 2 casos.

Igarí y colaboradores (41) evaluaron los parámetros enzimáticos hepáticos y extrahepáticos de diazepam en rata, ellos trabajaron in vitro con fracciones microsomales de riñón, pulmón e hígado y calcularon la constante de Michellis-Menten (K_m), la velocidad máxima ($V_{máx}$) así como la depuración de cada órgano, los resultados encontrados se muestran en la tabla 2.11.; en la cual se puede observar que la contribución más importante a la depuración corporal es la que aporta el hígado seguida por el riñón y después por el pulmón.

Al investigar el efecto de la unión de diazepam a proteínas plasmáticas sobre el cociente de extracción hepático, Rowland (70) detectó que este valor disminuye considerablemente conforme al grado en que la unión a proteínas aumenta, trabajando in situ con una preparación de hígado perfundido de rata, como se puede observar en la figura 2.4. En hombre, la extensión de la unión de diazepam a proteínas plasmáticas es el determinante más importante de la disposición del fármaco y limitante en la depuración plasmática (10,48) debido a que la unión a proteínas juega un papel muy importante en el metabolismo de este principio activo y la depuración hepática es independiente del flujo sanguíneo hepático.

Tabla 2.11. Parámetros enzimáticos para el metabolismo de diazepam por microsomas de hígado, pulmón y riñón de rata.

Parámetro	Órgano		
	Hígado	Riñón	Pulmón
Km ($\mu\text{g/ml}$)	0.409	0.198	0.343
V _{máx} $\mu\text{g/min/g}$ pro- teína microsomal	125.0	18.5	27.8
V _{máx} $\mu\text{g/min/g}$ de órgano	6.08	0.33	0.26
Cl intrínseca (ml/min/g de órgano)	14.87	1.68	0.76
Cl corp. ml/min/0.25 kg de rata	8.95	0.22	0.10

Existen grandes variaciones interindividuales en la eliminación de este fármaco, el tiempo de vida media biológica en individuos sanos se ha encontrado entre 26 a 65 horas (10,11,42,71) siendo este parámetro dependiente de la edad, enfermedades hepáticas y obesidad. Asimismo, se ha encontrado que la depuración plasmática de diazepam es de

20 a 60 ml/min para individuos sanos (48); este parámetro es independiente de la edad (10,12), ya que se observa que no hay diferencia en un intervalo de 15 a 82 años.

El tiempo de vida media se ve afectado por la edad de los pacientes (51); en niños prematuros se han observado valores de 40 a 400 horas, este valor se encuentra estrechamente relacionado al grado de maduración de la actividad metabólica; en recién nacidos de 20 a 50 horas; en infantes de 8 a 14 horas; adultos de 26 a 65 horas y

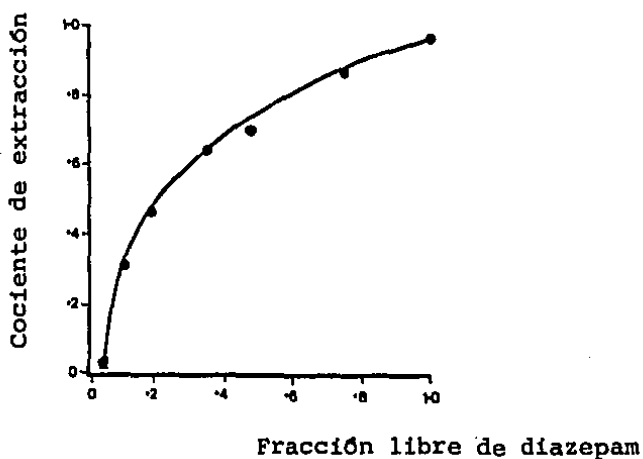


Figura 2.4. Cociente de extracción hepática de diazepam con respecto a la fracción libre de fármaco observado en preparaciones de hígado de rata.

ancianos aproximadamente de 90 horas, en este último grupo se observa un aumento lineal del tiempo de vida media con respecto a la edad.

La eliminación no es dosis dependiente en el intervalo de 5 a 15 mg debido a que no se detectan diferencias en el tiempo de vida media ni en la depuración (48). Asimismo, después de una administración crónica de 15 días con este fármaco, la constante de eliminación no se ve afectada con respecto a la obtenida a una administración simple (42).

Abernetty y colaboradores (65) estudiaron la influencia del desmetildiazepam, sobre el comportamiento farmacocinético del diazepam en 6 voluntarios sanos a quienes les administraron por vía intravenosa 10 mg del fármaco, antes y después de una administración crónica del clordiazepóxido (profármaco de desmetildiazepam), los resultados mostraron que el tiempo de vida media y la depuración de esta benzodiazepina se mantuvieron inalterados, por lo que concluyeron que el metabolito no tiene influencia en la eliminación del fármaco inalterado ($t_{1/2} = 44.9 \pm 9.7$ contra 43.3 ± 5.3 horas en el grupo control; $Cl = 0.394 \pm 0.055$ contra 0.364 ± 0.048 ml/min/kg en el grupo control).

Las enfermedades hepáticas inducen alteraciones en

la eliminación de diazepam, en algunos trabajos publicados (10,11) se ha encontrado un valor de $t_{1/2}$ de 79.1 a 132.6 horas en casos de cirrosis, de 47.8 a 129.2 horas en hepatitis viral aguda y de 30 a 187 horas en enfermedades biliares. En pacientes cirróticos la unión a proteínas se ve disminuida (95.3 a 97.8%), el volumen de distribución aumenta y la depuración plasmática disminuye; por otra parte, en ellos hay un retardo en la aparición de desmetildiazepam en plasma. Se ha observado (11), que después de recobrase de hepatitis viral aguda, la $t_{1/2}$ en estos pacientes llega a valores normales.

No se ha encontrado correlación estadística entre la $t_{1/2}$ de diazepam o la depuración plasmática con pruebas de funcionamiento hepático en pacientes con cirrosis alcohólica y con hepatitis viral (11), por lo que las pruebas bioquímicas de rutina no pueden funcionar como predictoras en la $t_{1/2}$ de este fármaco.

El sexo tiene influencia sobre la depuración del fármaco libre, se han determinado (49) valores de 40.2 y 60.0 ml/min para hombres y mujeres sanos respectivamente, sin embargo, no se ha visto diferencia en la $t_{1/2}$ de eliminación con respecto a los dos sexos.

En un estudio (72) en el cual participaron voluntarios obesos (105.4 kg) se observó que existen

cambios en la $t_{\frac{1}{2}}$ con respecto a sujetos normales (66.5 kg) debido a un aumento en el volumen de distribución del fármaco, sin embargo, la depuración no se ve afectada por este factor.

Los derivados conjugados del grupo de las benzodiazepinas hidroxiladas poseen un peso molecular alto, lo que las hace ser candidatas a excretarse en bilis.

Linnoila (73) en su investigación con voluntarios sanos, encontró picos secundarios en los perfiles plasmáticos del fármaco después de una comida rica en grasas, proponiendo que existe una circulación enterohepática; sin embargo, en estudios realizados en ratas, a las cuales se les obstruyó el conducto biliar, se encontró que no existía esta recirculación (48). Después de la administración intravenosa de 5 mg de diazepam a ratas, cuyos y ratones, se determinó la eliminación de desmetiloxazepam y oxazepam en bilis durante 3 horas. Los resultados obtenidos en esta investigación realizada por Bertagni (74) se muestran en la tabla 2.12. en la que se puede observar que esta vía de excreción es más importante en ratón que en las otras especies estudiadas.

Similarmente, después de la administración intravenosa de 0.1 mg/kg de diazepam, Klotz (11) colectó bilis cada 6 horas durante 3 días en voluntarios con

función hepática normal y encontró el 0.3% de la dosis en este periodo de tiempo; en una investigación posterior (75), se determinó que los metabolitos principales en bilis son desmetildiazepam (74% en forma conjugada) y oxazepam.

Tabla 2.12. % de la dosis de diazepam administrado a diferentes especies excretado en bilis (\pm desviación estándar) n = 4.

	Rata	Cuyo	Ratón
Metiloxazepam	-	-	-
Oxazepam	-	3.0 \pm 0.8	13.1 \pm 1.9

Otra vía de excreción de diazepam es la leche (76), durante una administración crónica, la relación de concentraciones de diazepam leche/plasma durante el estado estacionario se ha encontrado de 0.20 a 0.19 y para desmetildiazepam de 0.19 a 0.35, y niveles máximos en leche

de 43 ng/ml y 85 ng/ml para el diazepam y su metabolito principal respectivamente. No se ha detectado oxazepam en este fluido biológico.

2.2.4. Farmacocinética durante el embarazo

El diazepam en ocasiones se administra durante el embarazo y el parto como ansiolítico y relajante muscular (3), en esta etapa existen cambios fisiológicos y bioquímicos que alteran la cinética del fármaco (77).

La transferencia de diazepam a través de la placenta es más lenta al principio que al final del embarazo. Erkkola y colaboradores (10) encontraron una relación en los niveles plasmáticos feto-madre de 1.2 al inicio del embarazo y de 1.8 a 2.0 en los últimos estados con una dosis simple del fármaco, y de 0.4 a 0.8 con dosis orales repetidas (60).

La distribución del compartimiento materno al fetal es rápido, se alcanzan concentraciones mayores en el feto que en la madre, y en tratamientos prolongados provocan acumulación de diazepam y metabolitos en el feto (10,60).

Durante el embarazo, hay una elevación marcada de la fracción libre del fármaco y desmetildiazepam con respecto a mujeres controles (96% contra 97.7%, respectivamente), el

% de fármaco libre aumenta en ellas debido a que aumentan los niveles de ácidos grasos y triglicéridos, el volumen sanguíneo se incrementa, en un 30 a 40% y la concentración plasmática de albúmina disminuye en un 20% (55); estos cambios tienen como consecuencia alteraciones en la disposición del diazepam. Nation (77) realizó una investigación en 14 mujeres embarazadas a las cuales les administró intravenosamente 10 mg del principio activo, los resultados mostraron un tiempo de vida media de eliminación de 65 ± 29 horas (mayor que las mujeres control), una depuración plasmática de 28 ± 9.6 ml/min, similar al grupo control y un aumento considerable del volumen de distribución.

El diazepam y sus metabolitos atraviesan rápidamente la placenta, y las concentraciones plasmáticas del fármaco y de cada uno de sus metabolitos en los niños al nacer son similares a los encontrados en el plasma de la madre (12). Durante los primeros días de nacimiento existe un aumento en la concentración de ácidos grasos libres en los bebés, y por lo tanto, la fracción libre aumenta (60) ocasionando efectos no deseables, tales como hipotonía, baja la valoración de Apgar, etc. (78). Por esta razón no se recomienda el fármaco en mujeres lactantes, ya que se excreta en leche materna y el recién nacido no lo puede

eliminar fácilmente (79).

Se ha propuesto (10), que los microsomas hepáticos del feto humano pueden metabolizar diazepam a las 13 semanas de gestación. Asimismo, se ha observado (77) una diferencia en las concentraciones plasmáticas del diazepam y del desmetildiazepam con respecto al cordón arteriovenoso en el recién nacido, después de la administración del fármaco a la madre, sugiriendo que existe actividad desmetilante en el feto, sin embargo, las reacciones de hidroxilación y conjugación se encuentran disminuidas en los primeros días de vida (12).

3. METODOS DE VALORACION EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

En la literatura se han publicado algunos métodos analíticos para cuantificar diazepam en fluidos biológicos:

- Método espectrofotométrico
- Polarografía
- Radioinmunoanálisis
- Cromatografía en placa delgada
- Cromatografía de gas - líquido
- Cromatografía de líquidos de alta resolución

3.1. Análisis Espectrofotométrico

Esta técnica fue desarrollada por De Silva en 1966 (80). Las muestras de sangre después de la adición de una solución amortiguadora pH = 7, se extraen 2 veces con éter dietílico. La fase orgánica se lava con una solución de NaOH. Por último, el fármaco es extraído con una solución de HCl y esta se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda a 240 nm. La eficiencia de esta extracción es de $90 \pm 5\%$ y es lineal en el intervalo de 1 a 10 μg de diazepam por mililitro de sangre.

El método presenta algunas desventajas. La concentración mínima detectable en sangre fue de 0.3 a 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lo que limita sus uso solo en casos de intoxicación con este fármaco o durante una administración crónica.

Por otra parte, la longitud de onda de máxima absorbancia para el diazepam, coincide con la de su metabolito, lo que ocasiona que el método no sea específico.

El espectro de absorción de los 2 compuestos, se puede observar en la figura 2.5.

3.2. Análisis Polarográfico

Brook M. y colaboradores (81) desarrollaron un

método el cual se basa en la determinación del potencial de reducción del grupo 4-5 azometina de diazepam y sus metabolitos. En la técnica, se realiza la extracción líquido - líquido de diazepam a partir de muestras sanguíneas previamente alcalinizadas con una mezcla de benceno - cloruro de metileno (9:1). La fase orgánica se evapora a sequedad y se reconstituye con 100 μ l de metanol

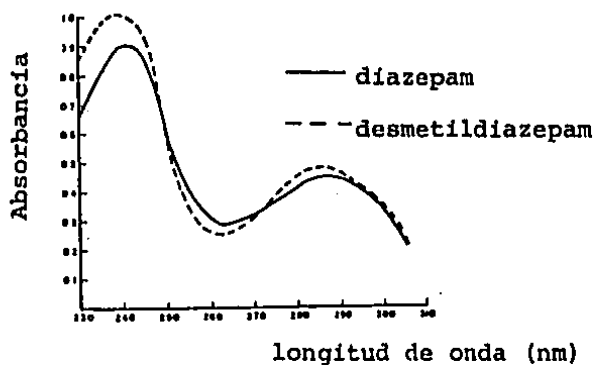


Figura 2.5. Espectro de absorción U.V. de diazepam y desmetildiazepam en HCl 2N; la concentración es de 10 μ g/ml.

y 1.9 ml de H_2SO_4 0.01 N. Las muestras se analizan en un polarógrafo equipado con un electrodo de gota de mercurio como electrodo indicador, un electrodo de calomel saturado como referencia y uno de platino como auxiliar; se utiliza de electrolito soporte a H_2SO_4 0.01 N y metoxipolietilenglicol 550 al 0.005%.

El potencial de reducción para diazepam y sus metabolitos se muestran en la tabla 2.13. La resolución de esta técnica no es buena; el % de recuperación del fármaco a partir de muestras sanguíneas fue del 75 al 85% para las benzodiazepinas estudiadas, excepto para el oxazepam que fue del 25%.

Tabla 2.13. Potencial de reducción de diazepam y metabolitos en H_2SO_4 0.01 N (con metoxipolietilenglicol 550 al 0.05%).

Compuesto	Ep
	$C_5 = N_4$
Diazepam	- 0.715
Desmetildiazepam	- 0.710
3-hidroxdiazepam	- 0.700
Oxazepam	- 0.695

3.3. Radioinmunoanálisis

Este método fue propuesto por Peskar (82). En el análisis se prepara un antisuero para diazepam y su metabolito más abundante (desmetildiazepam), inmunizando a conejos con los 2 antígenos obtenidos a partir de diazepam y desmetildiazepam con albúmina sérica bovina.

Las muestras de plasma después de la adición del antisuero diluido (suero de conejo con anticuerpos contra el fármaco y su metabolito) y solución de diazepam marcado con ^{14}C , se ajustan a un pH de 7.4; esta mezcla se incuba durante toda la noche a 4 °C; después se lava 2 veces con una solución de sulfato de amonio saturado, se le añade solución de Bray y la muestra es leída en un espectrofotómetro de centelleo.

Este método analítico es altamente sensible, utiliza 50 μl de plasma; su límite de determinación de 20 ng/ml y es lineal en el intervalo de 20 a 200 ng/ml.

3.4. Cromatografía en Placa Delgada

Wad N. y colaboradores (83,84) establecieron un método para la determinación de diazepam y sus metabolitos en suero por cromatografía en placa delgada.

En la técnica, la muestra de suero se extrae con tolueno a $\text{pH} = 10.5$. Las 2 fases se separan y el disolvente orgánico se evapora a sequedad. El residuo se reconstituye con 50 μl de cloroformo y se aplica en una placa cubierta con gel de sílice (20 X 20 cm), en la cual se realiza una cromatografía con una fase móvil compuesta por cloroformo-éter (60:40) a temperatura ambiente. Este procedimiento transfiere compuestos lipofílicos naturales del suero al frente del disolvente. La placa se deja secar, y nuevamente se realiza una separación cromatográfica con una mezcla de cloroformo - heptano - etanol (50:50:5) para lograr la separación de diazepam y sus metabolitos. La detección se realiza directamente en la placa cromatográfica a una longitud de onda de 230 nm. El % de extracción fue del $92.7 \pm 0.8\%$ y el intervalo lineal de 0.1 a 1.0 μg .

En una publicación posterior, Sun (85) utilizó esta técnica de separación. El diazepam y sus metabolitos los extrajo con benceno de muestras séricas, la fase orgánica la evaporó a sequedad y reconstituyó con 50 μl de metanol, la cual aplicó a una placa con gel de sílice (20 X 20 cm) y la separación cromatográfica se realizó con una mezcla de cloroformo - 2 propanol - hidróxido de amonio (95:5:0.5) a temperatura ambiente. La placa se dejó secar y las señales se revelaron con H_2SO_4 7 N; los compuestos

estudiados: diazepam, desmetildiazepam y oxazepam tuvieron un Rf de 0.72, 0.43 y 0.17, respectivamente. La detección fue directamente en la placa por fluorescencia a 388 nm de excitación, el rendimiento en la extracción de $96.4 \pm 0.7\%$ y la concentración mínima detectable de 18 ng/ml de suero.

3.5. Cromatografía de Gas - Líquido

Los métodos de cromatografía de gas - líquido, se pueden clasificar de acuerdo al detector que se utiliza para cuantificar diazepam.

3.5.1. Detector de captura de electrones

Este sistema de detección se ha utilizado ampliamente en la cuantificación de diazepam en plasma debido a las bajas concentraciones del fármaco que se encuentran en el organismo después de las dosis usualmente administradas.

De Silva y colaboradores (86) en 1964, desarrollaron un método para determinar diazepam y desmetildiazepam en sangre utilizando cromatografía de gases.

Este método consiste en extraer la muestra a un pH de 7 con éter dietílico y re-extraer con HCl 6 N. El

diazepam en un medio ácido es hidrolizado a 2-metilamino-5 clorobenzofenona y el metabolito produce al 2 amino-5 clorobenzofenona. La fase acuosa es neutralizada con NaOH, y los productos son extraídos con éter dietílico.

La fase etérea es evaporada y el residuo es reconstituido con hexano y analizado en el cromatógrafo.

Estos investigadores encontraron que el método tiene un límite de determinación de 20 ng/ml y un rendimiento en la extracción de $94 \pm 5\%$.

Posteriormente, se han desarrollado métodos que utilizan cromatografía de gas - líquido por diferentes autores; sin que se haga la hidrólisis de diazepam y sus metabolitos. De manera general, a las muestras de sangre, suero o plasma, se les adiciona una solución amortiguadora y se realiza una extracción líquido - líquido con un disolvente orgánico, las fases se separan por centrifugación y la orgánica se evapora a sequedad. El residuo se reconstituye (en la mayoría de los casos) con benceno o éter dietílico y se analiza en el cromatógrafo. En la tabla 2.14. se presentan las condiciones propuestas por algunos investigadores.

Tabla 2.14. Condiciones de análisis publicadas para diazepam utilizando cromatografía de gas - líquido.

AUTOR	VOLUMEN DE MUESTRA	DISOLVENTE DE EXTRACCION	pH DE EXTRACCION
Zingales (1973) (64)	1 ml (plasma)	Tolueno-heptano (8:2) + alcohol isoamílico (2%)	9.5
Arnold (1975) (87)	.2 ml (plasma)	Benceno	-
Linnoila (1977) (88)	1 ml (suero)	Tolueno-heptano (4:1) + alcohol isoamílico (1.6%)	9.0
Rutherford (1977) (89)	.1 ml (plasma)	Acetato de butilo	-
Ferguson (1977) (90)	1 ml (plasma)	Tolueno-alcohol isoamílico (98.5:1.5)	9.0
Kelly (1979) (91)	1 ml (suero)	Tolueno-hexano-alcohol isoamílico (78:20:0.2)	9.2
Douse (1984)	.2 ml (sangre)	Tolueno y amberlita XAD-7	-

Tabla 2.14. (continuación) Condiciones de análisis publicadas para diazepam por CGL, N.P. = dato no publicado.

AUTOR	COLUMNA	CONCENTRACION MINIMA DETECTABLE	% DE EXTRACCION	INTERVALO LINEAL (ng/ml)
Zingales (1973) (64)	OV-17, 3%	0.5 ng	96.1	0.5 a 5.0
Arnold (1975) (87)	E 350, 3%	5 ng/ml	98.0	25 a 1200
Linnoila (1977) (88)	OV-17, 3%	10 ng/ml	98.0	10 a 500
Rutherford (1977) (89)	OV-7, 3%	5 ng/ml	100.0	N.P.
Ferguson (1977) (90)	OV-17, 3%	10 ng/ml	82.7	500 a 10000
Kelly (1979) (91)	OV-17, 3%	50 ng/ml	N.P.	50 a 5000
Douse (1984) (92)	Capilar de gel de sílice fundida	1 ng/ml	56.0	1 a 100

3.5.2. Detector de ionización de flama

El método propuesto por Suyn y colaboradores (93) utiliza el mismo procedimiento de extracción e hidrólisis de diazepam y desmetildiazepam que De Silva publica en 1964 (86).

La modificación que estos investigadores realizan, es el de cuantificar sus muestras con un detector de ionización de flama; la desventaja que presenta, es que dadas las bajas concentraciones de diazepam en el plasma, después de la administración del fármaco se requieren volúmenes considerables de suero (3 ml), el % de recuperación del método fue $102 \pm 3.2\%$, intervalo lineal de 100 a 4000 ng/ml y concentración mínima detectable de 100 ng/ml.

3.5.3. Detector sensible a fósforo y nitrógeno

Mc Curd H. (94) publicó un método por cromatografía de gas - líquido para cuantificar diazepam en plasma. En este se utilizan 2 ml de sangre a la que se le añade una solución amortiguadora de pH = 10 y se extrae con 40 ml de éter. La fase etérea se lava con hidróxido de amonio 0.1 M y se extrae con HCl 1 M. La fase acuosa se extrae con

hexano. Las fases nuevamente se separan y la orgánica se evapora a sequedad. Las condiciones que se utilizan en el método son: detector sensible a fósforo y nitrógeno, fase estacionaria OV-1 al 3% sobre Chromosorb WHP 80/100 y es lineal en el intervalo de concentración de 0.25 a 1.5 µg/ml de sangre.

3.6. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

Durante los últimos años, se han desarrollado algunos métodos basados en cromatografía de líquidos de alta resolución; de manera general, se realiza una extracción líquido - líquido de diazepam a partir de muestras plasmáticas, la fase orgánica se evapora a sequedad; el residuo se reconstituye y se analiza en el cromatógrafo utilizando un detector espectrofotométrico en el intervalo de 232 a 254 nm. En la tabla 2.15. se muestran las condiciones propuestas por algunos investigadores.

Tabla 2.15. Condiciones de análisis publicadas por cromatografía de líquidos.

AUTOR	VOLUMEN DE MUESTRA	DISOLVENTE DE EXTRACCION	pH DE EXTRACCION	COLUMNA
Bugge (1976) (95)	1 ml (sangre)	benceno	-	Partisil 10
Kabra (1978) (96)	2 ml (sangre)	éter	7.0	Partisil 10
Brodie (1978) (97)	2 ml (plasma)	éter	9.0	Microbondapack C18
Vree (1979) (98)	.2 ml (plasma)	éter	-	Lichrosorb RP8
Raisys (1980) (99)	1 ml (plasma)	tolueno	9.0	Microbondapack C18
Cotler (1981) (100)	.5 ml (plasma).	benceno-cloruro de metileno	9.0	Microbondapack C18

Tabla 2.15. (continuación) Condiciones de análisis publicadas para diazepam por CLAR, N.P.=dato no publicado.

AUTOR	FASE MOVIL	CONCENTRACION MINIMA DETECTABLE (ng/ml)	% DE EXTRACCION	INTERVALO LINEAL (ng/ml)
Bugge (1976) (95)	heptano-isopro- panol-metanol	25	92.5	100 a 1500
Kabbara (1978) (96)	CH ₃ CN-buffer de fosfato pH=4.6	20	104.5	50 a 10000
Brodie (1978) (97)	metanol-agua	10	96	10 a 400
Vree (1979) (98)	CH ₃ CN-agua- metanol	30	96	30 a 10000
Ralsys (1980) (99)	CH ₃ CN-buffer de fosfato pH=6	N.P.	90	hasta 5 µg/ml
Cottler (1981) (100)	metanol-agua	50	73	50 a 1500

4. FARMACOCINETICA EN EL ANCIANO

En la práctica médica, se ha observado que para algunos fármacos la respuesta biológica se encuentra alterada en pacientes geriátricos con respecto a jóvenes (101).

La posibilidad de que se presenten reacciones adversas y efectos colaterales es 7 veces mayor en personas de 70 a 79 años de edad, que en aquellos entre 20 a 29 años (101,102). En estudios realizados por Seidl y colaboradores (103) se mostró claramente que la edad es un factor importante en determinar el riesgo de que se registren efectos adversos durante la terapia de un fármaco. Estos investigadores observaron que de 714 pacientes hospitalizados el 11.8% de un grupo de individuos entre 41 a 50 años manifestaron efectos colaterales y el 24.9% en personas mayores de 80 años.

La modificación de la respuesta farmacológica en ancianos puede ser explicada a 2 niveles:

- 1) Los cambios fisiológicos asociados con el envejecimiento pueden afectar la absorción, distribución, metabolismo y excreción (farmacocinética) de los fármacos y, por lo tanto, alterar la respuesta biológica.

- 2) Cambios relacionados con la edad afectan los

sistemas y tejidos que son influenciados directa e indirectamente por el mecanismo de acción (farmacodinámia).

Por lo expuesto anteriormente, las variables que afectan las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas juegan un papel muy importante en los regímenes de dosificación para ancianos (104).

Los cambios observados en la disposición de fármacos en pacientes geriátricos son secundarios a los cambios fisiológicos que alteran las funciones en el organismo (104), en la tabla 2.16. se muestra la disminución de algunas de estas funciones (101).

Se ha observado, que existe una gran variabilidad interindividual en los parámetros farmacocinéticos de algunos principios activos en personas de edad avanzada, esto se ha atribuido a que los cambios ocurridos en varias funciones fisiológicas con el envejecimiento son graduales, y la velocidad de cambio difiere considerablemente entre individuos (105). En la tabla 2.17 se muestran algunos cambios fisiológicos que pueden afectar la cinética de un fármaco en el organismo.

4.1. Absorción

Debido a que con la edad se registran algunos cambios en las funciones gastrointestinales (tabla 2.17.),

se ha propuesto que la desintegración y la disolución de fármacos a partir de formas farmacéuticas sólidas se puede retardar después de la administración oral en ancianos, incluso se ha observado, que para algunos fármacos, el tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima es mayor en ancianos que en jóvenes (10,101).

Sin embargo, la fracción del fármaco absorbido generalmente, no se ve influenciada por la edad (106).

Un caso especial se ha registrado en el clorazepato, el cual es un profármaco del desmetildiazepam que se produce mediante la hidrólisis ácida del precursor en estómago. En un estudio realizado por Ochs, se encontró que los niveles de la especie activa fueron menores en ancianos y pacientes gastrectomizados comparados con un grupo de voluntarios sanos, probablemente, como resultado de una hidrólisis incompleta del compuesto inicial en el grupo de ancianos (104).

El tiempo de vida media de absorción después de una administración intramuscular o subcutánea se puede ver retardada debido a una disminución en el flujo sanguíneo local y por el desplazamiento de tejido bien irrigado por tejido conectivo y adiposo en el sitio de inyección en pacientes geriátricos.

4.2. Distribución

Debido a los cambios en la composición corporal como son: aumento en la cantidad de grasa en el organismo, disminución en la masa muscular, del fluido corporal total y la concentración plasmática de albúmina; los patrones de distribución varían (101,103-106). Se ha visto que, generalmente, el volumen de distribución de fármacos con coeficiente de distribución lípido/agua bajo, disminuye proporcionalmente conforme aumenta la edad (101). Con respecto a la unión a proteínas, no existen evidencias de que se presenten alteraciones en la afinidad de albúmina u otras proteínas plasmáticas sobre los fármacos (105).

4.3. Metabolismo

En los procesos de biotransformación de los fármacos existe una amplia variación interindividual y esta se acentúa en ancianos. Para muchos fármacos la capacidad metabolizadora disminuye en sujetos de edad avanzada (102,104); sin embargo, no hay un patrón general establecido, ya que la disminución tanto del flujo sanguíneo como de la masa hepática no necesariamente producen un bajo metabolismo. Estas características

afectan, generalmente, a los fármacos con un cociente de extracción alto (5).

Para el grupo de las benzodiazepinas, se ha observado que las constantes de velocidad de reacción para la fase I (oxidación y desmetilación) tienden a disminuir con respecto a la edad, y las reacciones de la fase II (conjugación) son independientes de este factor (103,106,107).

4.4. Excreción

Con la edad disminuyen el número de nefronas funcionales, el flujo plasmático renal, la filtración glomerular y la función tubular (108). La depuración de creatinina en el anciano (90 años de edad) es de 56 ml/min/1.73 m² y en el adulto (20 años) de 122 ml/min/1.73 m² (106) por lo que se ha observado, que para muchos fármacos eliminados por vía renal aumenta el tiempo de vida media de eliminación; debido a esto, algunos autores han propuesto modificar el régimen de dosificación para estos principios activos en base a la depuración renal de creatinina en pacientes geriátricos (8,109).

Tabla 2.16. Disminución de algunas funciones corporales con el aumento de la edad.

Función	Disminución aproximada (%/año) a partir de los 25 años de edad	
Metabolismo basal	0.38	
Gasto cardiaco	0.75 - 1.01	
Masa celular	hombres 0.20	mujeres 0.16
Fluido corporal total	hombres 0.20	mujeres 0.13
Fluido intracelular	0.38	
Filtración glomerular	0.66	
Secreción tubular	0.62	
Capacidad máxima respiratoria	1.18	
Capacidad vital	0.81	
Masa hepática	1.0	
Flujo sanguíneo:		
cerebro	0.35 - 0.50	
corazón	0.5	
hígado	0.3 - 1.5	
riñón	1.1 - 1.9	
tejido	1.3	

Tabla 2.17. Cambios fisiológicos observados durante el envejecimiento que pueden alterar la farmacocinética.

La producción del ácido gástrico se encuentra disminuida	ABSORCION
pH gástrico aumentado	
Flujo sanguíneo intestinal disminuido	
Disminución del número de células en la mucosa gastrointestinal	
Motilidad gastrointestinal reducida	
Disminución en el agua corporal total	DISTRIBUCION
Disminución en la masa muscular	
Aumento en la grasa corporal	
Disminución en albúmina plasmática	
Reducción del gasto cardiaco	
Disminución en el flujo sanguíneo hepático	METABOLISMO
Disminución de la masa hepática	
Actividad enzimática reducida	
Disminución en el flujo sanguíneo renal	EXCRECION
Disminución en la filtración glomerular	
Disminución en la función tubular	

C A P I T U L O I I I

PARTE EXPERIMENTAL

En la figura 3.1 se presenta el esquema general de trabajo seguido en este estudio.

1. METODOLOGIA ANALITICA PARA LA CUANTIFICACION DE DIAZEPAM EN PLASMA

Se seleccionaron dos métodos, los cuales pueden funcionar alternativamente: cromatografía de gas-líquido y cromatografía de líquidos de alta resolución.

1.1. Validación del Método de Cromatografía de Gas -Líquido

1.1.1. Material y equipo

- Balanza Analítica Mettler modelo H 54-AR
- Agitador Vortex Syubron Thermolyne modelo M-16715

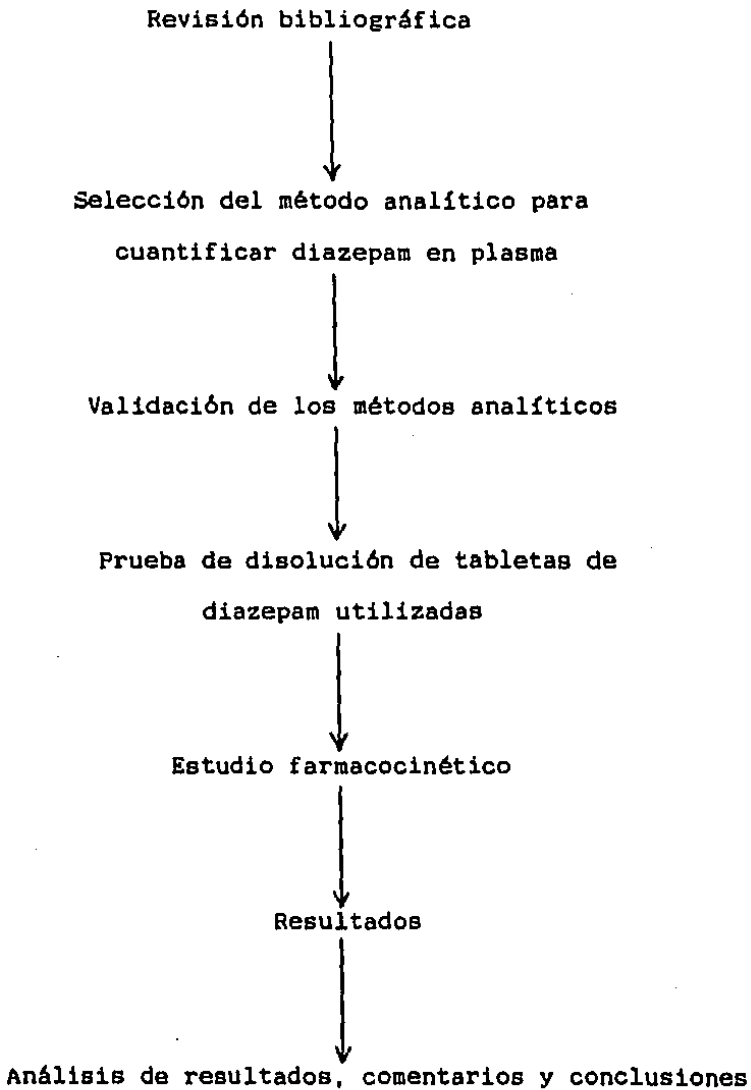


Figura 3.1. Esquema general de trabajo.

- Centrífuga Damon/IEC-Division modelo HN-SII
- Cromatógrafo de gases Varian modelo 3700, equipado con detector de captura de electrones con una fuente de Ni ⁶³
- Registrador Varian modelo 9176

1.1.2. Reactivos

- Estándar secundario de diazepam proporcionado por laboratorios Grossman
- Estándar interno: griseofulvina (laboratorios Scheramex)
- Oxazepam químicamente puro proporcionado por laboratorios Promeco
- Benceno, R.A. Merck, bidestilado en nuestro laboratorio

1.1.3. Soluciones

- Soluciones de diazepam en benceno a concentraciones de 1000 y 5 µg/ml, 50, 24, 12, 6 y 3 ng/ml
- Soluciones de diazepam en plasma concentraciones de 250, 120, 60, 30 y 15 ng/ml.
- Solución de griseofulvina (estándar interno) concentración de 1.5 µg/ml. Se pesaron 10 mg de griseofulvina y se aforó con 10 ml de benceno. De esta solución un volumen de 15 µl se colocó en un matraz volumétrico de 10 ml y se aforó con el mismo disolvente.

- Solución de 1.5 μg de oxazepam por mililitro de benceno. Esta se preparó como la solución de griseofulvina descrita anteriormente.

1.1.4. Preparación de las soluciones estándar

10 mg de diazepam se colocaron en un matraz volumétrico de 10 ml, se aforó con benceno.

50 microlitros de la solución anterior se transfirieron en un matraz volumétrico de 10 ml y se aforó con el mismo disolvente (concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). De la solución resultante, 100 microlitros se diluyeron hasta un volumen de 10 ml (50 ng/ml).

Una alícuota de 12 ml de la solución de 50 ng/ml se transfirió a un matraz volumétrico de 25 ml y se aforó con benceno (concentración de diazepam 24 ng/ml).

Para obtener una concentración de 12 ng/ml , se tomaron 5 ml de la solución anterior y se diluyeron a 10 ml.

Las soluciones de 6 y 3 ng/ml se prepararon una a partir de la otra, siguiendo el procedimiento anterior.

Un volumen de 0.5 ml de la solución de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de benceno, se transfirió a un tubo, el disolvente se evaporó a sequedad y se reconstituyó con 10 ml de plasma (concentración de 250 ng/ml = solución A)

1.1.5. Preparación de las soluciones plasmáticas de diazepam

La solución A se utilizó para preparar la curva de calibración en plasma como se indica a continuación:

Solución	Preparación	Concentración (ng/ml)
A	como se indica en el texto	250
B	480 μ l de A + 520 μ l de plasma	120
C	240 μ l de A + 760 μ l de plasma	60
D	120 μ l de A + 880 μ l de plasma	30
E	60 μ l de A + 940 μ l de plasma	15

1.1.6. Preparación de la muestra

La extracción de diazepam en plasma se efectuó de acuerdo a la técnica publicada por Arnold y colaboradores con algunas modificaciones (87). A 0.2 ml de plasma se le adicionó 1 ml de benceno, se agitó en vortex durante 1.5 minutos y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm. La fase orgánica se colocó en un tubo cónico y se evaporó a sequedad en baño maria a 90 °C. El residuo se reconstituyó con 50 μ l de una solución de griseofulvina en benceno (concentración 1.5 μ g/ml) y se analizó en cromatografía de

gas-líquido.

El procedimiento anterior se puede observar en la figura 3.2.

1.1.7. Condiciones cromatográficas

Columna: de vidrio longitud 200 cm y diámetro interno 2 mm

Empaque: aceite de silicona OV-17 al 1.5% sobre Chromosorb W-H-P, malla 80/100

Detector: captura de electrones con una fuente de ^{63}Ni

Gas portador: nitrógeno, flujo: 25 ml/min

Temperatura del inyector: 310 °C

Temperatura del detector: 330 °C

Temperatura del horno: 290 °C

Velocidad de la carta: 0.25 cm/min

Volumen inyectado: 1 μl

1.1.8. Selectividad

Para caracterizar la selectividad del método analítico se prepararon muestras plasmáticas con el fármaco y sin él; de acuerdo a la sección III.1.1.6.; asimismo, se analizó una solución de oxazepam (metabolito de diazepam) a una concentración de 1.5 $\mu\text{g/ml}$ bajo las condiciones cromatográficas propuestas en la sección III.1.1.7.

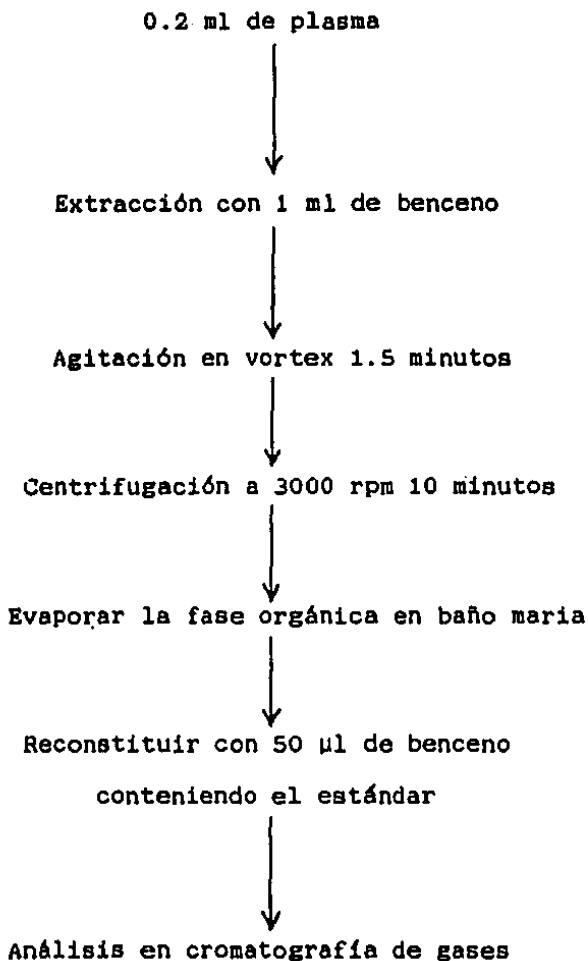


Figura 3.2. Técnica empleada para la extracción de diazepam en plasma (análisis por cromatografía de gas-líquido).

1.1.9. Concentración mínima detectable

La concentración mínima detectable se determinó preparando muestras plasmáticas de diazepam en un intervalo de concentración de 5 a 15 ng/ml, de acuerdo a la técnica descrita en la sección III.1.6.

1.1.10. Linealidad

Con el fin de determinar si la relación de áreas (diazepam/griseofulvina) y concentración de diazepam en plasma, presentaba un comportamiento lineal en el intervalo de concentraciones esperado, se prepararon cuatro curvas de calibración con concentraciones de 15, 30, 60, 120 y 250 ng/ml. A partir de los datos obtenidos se calculó el coeficiente de correlación, pendientes e interceptos de cada una de ellas.

1.1.11. Repetibilidad

La repetibilidad del método en un mismo día bajo condiciones idénticas de operador, aparato, laboratorio, etc., fue establecida preparando cuatro curvas de calibración a concentraciones de 15, 30, 60, 120 y 250 ng

de diazepam por mililitro de plasma, determinandose el coeficiente de variación (%), para cada una de las concentraciones.

La repetibilidad del método en diferentes días se obtuvo de manera similar a lo explicado anteriormente.

1.1.12. Exactitud

Para evaluar la exactitud del método, se determinó el rendimiento en la extracción como se indica a continuación:

Se prepararon cuatro curvas de calibración de diazepam en benceno con 50, 24, 12, 6 y 3 ng/ml, posteriormente, se colocó 1 ml de la muestra en un tubo cónico, se evaporó a sequedad en baño maria y el análisis se efectuó de acuerdo a la sección III.1.1.7.. Al mismo tiempo, se prepararon cuatro curvas de calibración de diazepam en plasma con 250, 120, 60, 30 y 15 ng/ml, como se describe en la sección III.1.1.6..

La exactitud se evaluó mediante el rendimiento en la extracción obtenido para cada concentración.

1.2. Validación del Método de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

1.2.1. Material y equipo

- Balanza analítica Mettler modelo H54-AR
- Agitador Vortex Sybron Thermolyne modelo M-16715
- Centrífuga Damon/IEC-Division modelo HN-SII
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Millipore Waters acoplado a un detector espectrofotométrico de longitud de onda variable Lambda-Max modelo 481 y a un registrador Goerz Metrawatt SE-120

1.2.2. Reactivos

- Estándar secundario de diazepam proporcionado por laboratorios Grossman
- Estándar interno: nitrazepam proporcionado por laboratorios Grossman
- Oxazepam proporcionado por laboratorios Promeco
- Lentejas de hidróxido de sodio, reactivo analítico, J.T. Baker
- Acido bórico, reactivo analítico, Técnica Química S.A.
- Cloruro de potasio, reactivo analítico, Química Dinámica S.A.

- Metanol HPLC, Merck
- Hexanos (85% n-hexano) HPLC, J.T. Baker
- Agua deionizada y filtrada para cromatografía de líquidos

1.2.3. Soluciones

- Soluciones de diazepam en metanol, concentraciones de 500, 250, 125, 60, 30, 15 y 7.5 ng/ml.
- Soluciones de diazepam en plasma concentraciones de 1000, 500, 250, 120, 60, 30 y 15 ng/ml.
- Solución de nitrazepam (estándar interno) concentración de 2.4 μ /ml disuelto en metanol-agua (6:4, v/v). Se colocaron 10 mg del estándar de nitrazepam en un matraz volumétrico de 10 ml y se aforó con metanol. De esta solución se tomaron 24 μ l y se aforaron con una mezcla de metanol-agua (6:4, v/v), hasta un volumen de 10 ml.
- Solución de oxazepam 5 μ g por mililitro de metanol:agua (6:4, v/v). Se pesaron 10 mg de oxazepam y se aforaron con metanol hasta un volumen de 10 ml. De la solución resultante se tomó un volumen de 50 μ l y se aforó con una mezcla metanol-agua (6:4, v/v) hasta 10 ml.
- Solución de hidróxido de sodio 0.2 M. Se pesaron 4 g de lentejas de hidróxido de sodio y se aforó con agua destilada hasta un volumen de 500 ml.

- Solución de ácido bórico y cloruro de potasio 0.2 M.
Se pesaron 3.092 g de H_3BO_3 y 3.728 g de KCl y se aforaron con agua destilada hasta un volumen de 250 ml.
- Solución amortiguadora pH=9. Una alícuota de 25 ml de la solución de H_3BO_3 y KCl 0.2 M se colocó en un matraz volumétrico de 100 ml. se le agregaron 10.5 ml de NaOH 0.2 M y se aforó con agua destilada.

1.2.4. Preparación de las soluciones estándar de diazepam

Se colocaron 10 mg de diazepam en un matraz volumétrico de 10 ml. aforándose con metanol.

Un volumen de 20 μ l de la solución descrita anteriormente se transfirió en un matraz de 10 ml y se aforó con plasma (concentración 2 μ g/ml = Solución A). Esta solución se utilizó para preparar la curva estándar de diazepam en plasma como se indica a continuación:

Solución	Preparación	Concentración (ng/ml)
A	como se indica en el texto	2000
B	2 ml de A + 2 ml de plasma	1000
C	1 ml de A + 3 ml de plasma	500

Solución	Preparación	Concentración (ng/ml)
D	0.5 ml de A + 3.5 ml de plasma	250
E	960 µl de C + 3 ml de plasma	121.21
F	960 µl de D + 3 ml de plasma	60.61
G	1 ml de F + 3 ml de plasma	30.31
H	0.5 ml de F + 3.5 ml de plasma	15.15

De manera similar a la que anteriormente se describe, se prepararon soluciones de diazepam, desde 1000 hasta 7.5 ng/ml de metanol.

1.2.5. Preparación de la muestra

Se efectuó la extracción de diazepam en plasma de acuerdo a la figura 3.3. A 0.5 ml de plasma se le adicionan 0.2 ml de la solución amortiguadora pH=9, se extrae con 3 ml de hexano agitando en Vortex durante 1.5 minutos y se centrifuga durante 10 minutos a 3000 rpm. La fase orgánica se transfirió a un tubo cónico, se evaporó a 75 °C en baño maria a sequedad. Para el análisis de la muestra en el cromatógrafo de líquidos, el residuo se reconstituyó en 50 µl de una solución de metanol-agua (6:4, v/v) conteniendo 2.4 µg por mililitro.

1.2.6. Condiciones cromatográficas

Columna: NOVAPACK C18 Millipore Watters; longitud 15 cm,
diámetro interno 4.6 mm

Fase móvil: mezcla de metanol-agua (6:4, v/v)

Flujo: 1 ml/min

Longitud de onda: 254 nm 0.01-0.002 AUFS

Velocidad de carta: 0.25 cm/min

Volumen inyectado: 25 μ l

1.2.7. Selectividad

Con el fin de determinar si el método analítico es selectivo, se prepararon muestras plasmáticas sin el fármaco (blanco) y con él, empleando la técnica de extracción descrita en la sección III.1.2.5. Al mismo tiempo, se analizó una mezcla de oxazepam, diazepam y nitrazepam de acuerdo a las condiciones cromatográficas de la sección III.1.2.6.

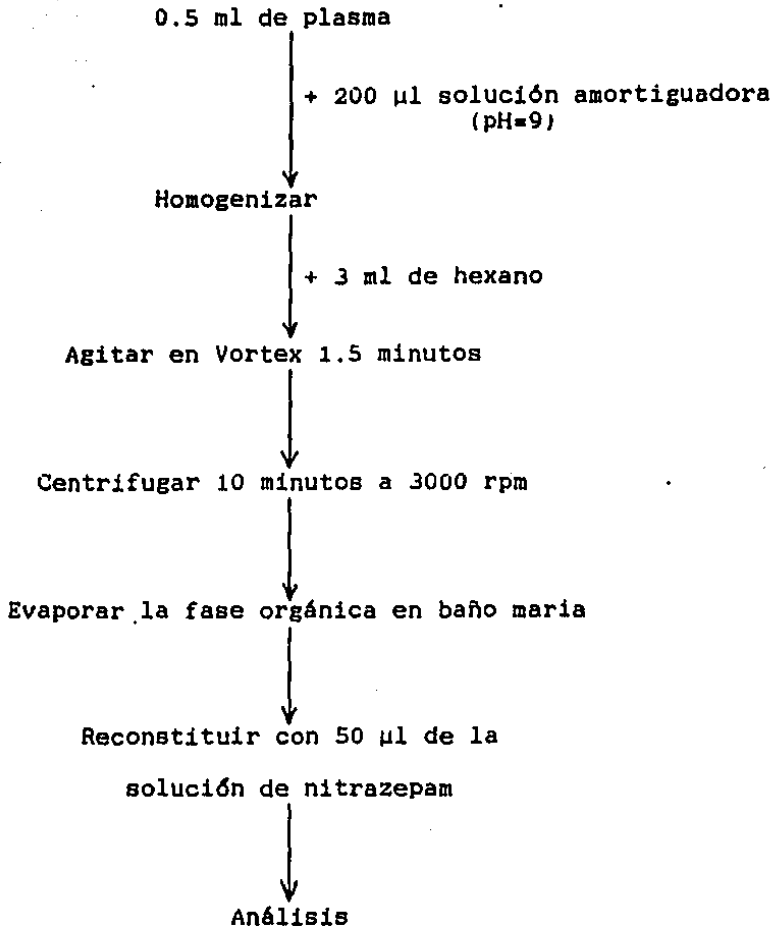


Figura 3.3. Técnica empleada para la extracción de diazepam en plasma (análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución).

1.2.8. Concentración mínima detectable

Se prepararon diluciones de diazepam en plasma en el intervalo de 5 a 30 ng/ml para determinar la concentración mínima detectable.

1.2.9. Linealidad

Con el objeto de conocer si la relación de alturas (diazepam/nitrazepam) era lineal con respecto a la concentración plasmática de diazepam, se prepararon cuatro curvas de calibración del fármaco en plasma en un intervalo de concentración de 15 a 1000 ng/ml.

1.2.10. Repetibilidad

Este parámetro fue establecido preparando por cuadruplicado muestras de diazepam en plasma a concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 60, 30 y 15 ng/ml, obteniéndose el % del coeficiente de variación para cada concentración.

1.2.11. Exactitud

Para evaluar la exactitud del método analítico, se

prepararon cuatro curvas de calibración de diazepam en plasma en un intervalo de concentración de 7.5 a 500 ng/ml, se colocó 1 ml de cada muestra en un tubo cónico y se evaporó a sequedad. El residuo se reconstituyó y se analizó de acuerdo a la sección III.1.2.6.

Asimismo, se prepararon cuatro curvas de calibración del fármaco en plasma con la técnica de extracción propuesta (sección III.1.2.5.) en un intervalo de concentración de 15 a 1000 ng/ml.

La exactitud se evaluó mediante el rendimiento en la extracción para cada concentración.

1.3. Estabilidad de Diazepam en Plasma

Para investigar la estabilidad del diazepam en plasma durante su almacenamiento se preparó la siguiente solución:

Un volumen de 0.5 ml de una solución de 50 µg del fármaco por mililitro de metanol se transfirió a un matraz volumétrico de 25 ml y se aforó con plasma (concentración 1 µg/ml).

De la solución descrita anteriormente, se tomaron alícuotas de 3 ml y se guardaron en tubos de vidrio a temperatura de -5 °C, los cuales fueron analizados a la 0, 1, 2 y 4a. semana de su preparación utilizando la

metodología de extracción indicada en la figura 3.3. (sección III.1.2.5.).

Las muestras se prepararon a partir de 0.5 ml de plasma previamente alcalinizado, se añadió hexano, se agitó y las fases se separaron por centrifugación.

La fase orgánica se evaporó a sequedad, el residuo se reconstituyó con agua-metanol y se analizó por cromatografía de líquidos.

2. ESTUDIO FARMACOCINETICO

En el estudio se seleccionaron 13 voluntarios: 7 de sexo femenino y 6 de sexo masculino, residentes de la Casa Hogar para Ancianos "Arturo Mundet" pertenecientes al Sistema Nacional para el Desarrollo Integral de la Familia, a los cuales se les dió a conocer el objetivo del estudio y se les solicitó su aprobación para participar en este así como el consentimiento de los médicos responsables. En la tabla 3.1. aparecen las características físicas de cada voluntario, donde se puede observar que se encontraban entre 61 a 92 años de edad, peso y talla corporal de 36.9 a 76.7 kg y de 1.41 a 1.79 m, respectivamente.

Asimismo, a cada voluntario se le efectuaron las pruebas de laboratorio indicadas en la tabla 3.2., estas

determinaciones se elaboraron en el laboratorio de análisis bioquímico-clínicos del Hospital Pediátrico del D.I.F.

Los voluntarios permanecieron en ayuno 12 horas antes de la administración del medicamento hasta 2 horas después. A la hora cero cada participante ingirió por vía oral una dosis única de 5 mg de diazepam (1 tableta de Rontipam, laboratorios Ronti, lote 7-29/1, a las cuales se les realizó la prueba de disolución descrita en el Apéndice 1), asimismo, antes de la administración de la tableta, se les canalizó la vena cefálica durante 8 horas con el objeto de evitar venopunciones frecuentes.

Se tomaron muestras sanguíneas de 3 ml a los siguientes tiempos: 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 24.0, 48.0 y 72.0 horas posteriores a la administración del diazepam. Las muestras se colocaron en tubos previamente heparinizados, el plasma se obtuvo por centrifugación y se congeló a -5 °C hasta el momento de su análisis, el cual se realizó por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución, siguiendo la técnica descrita en la sección III.1.2.5.

Cabe mencionar, que no se permitió la administración de otros fármacos durante el estudio, ni la ingestión de alcohol una semana antes y durante el estudio, excepto la voluntaria 7 que tomaba regularmente diazepam.

Una vez que se cuantificó el diazepam en las muestras plasmáticas, se determinó el modelo farmacocinético que mejor describiera los datos experimentales tomando como base la suma de cuadrados, criterio de Akaike (110) y la prueba estadística F de Snedecor (111); asimismo, se calcularon los parámetros farmacocinéticos para cada voluntario utilizando el método de los residuos, estos valores se optimizaron posteriormente, con el algoritmo de Marquardt; los cálculos se realizaron en una computadora Hewlett-Packard modelo 9816.

Por otra parte, se determinaron las microconstantes de transferencia intercompartamentales para el modelo farmacocinético obtenido en cada voluntario utilizando el algoritmo de Gerardin y colaboradores (112), el cual se explica en el apéndice 2; para tal efecto se utilizó una computadora Burroughs 7800 (sistema operativo 3.5.) desde una terminal remota Decuriter-II.

Asimismo, se realizó el análisis de momentos estadísticos para cada participante del estudio.

2.1. Diseño de Regímenes de Dosificación

A fin de diseñar los regímenes de dosificación para cada voluntario, se utilizaron los métodos mencionados a continuación, los cuales se describen en el apéndice 3.

Método 1 (113). La dosis de mantenimiento se mantuvo fija, variando el intervalo de dosificación.

Método 2 (114). El intervalo de dosificación se determinó en base al tiempo medio de residencia.

Las concentraciones plasmáticas de diazepam en el estado estacionario durante la administración del fármaco con los regímenes de dosificación mencionados se calcularon con el método de superposición (115).

Tabla 3.1. Características físicas de los voluntarios que participaron en el estudio.

Voluntario	Sexo	Edad (años)	Peso (kg)	Talla (m)	Superficie ₂ corporal (m ²)
1	F	75	47.8	1.58	1.47
2	F	70	47.5	1.45	1.36
3	F	61	67.0	1.57	1.67
4	F	64	61.8	1.45	1.53
5	F	77	44.2	1.41	1.29
6	F	92	60.3	1.62	1.65
7	F	67	36.9	1.42	1.21
8	M	63	76.7	1.79	1.95
9	M	67	70.6	1.62	1.76
10	M	87	65.0	1.70	1.76
11	M	73	69.3	1.56	1.69
12	M	81	64.8	1.56	1.65
13	M	79	58.0	1.51	1.54

Tabla 3.3. Pruebas de laboratorio efectuadas a los voluntarios participantes en el estudio.

Proteínas totales

Albúmina

Globulina

Urea

Creatinina

Transaminasa-glutámico-pirúvico (TGP)

Transaminasa-glutámico-oxalacético (TGO)

Bilirrubina total

Bilirrubina directa

Bilirrubina indirecta

C A P I T U L O I V

RESULTADOS

1. METODOLOGIA ANALITICA PARA LA CUANTIFICACION DE DIAZEPAM EN PLASMA

1.1. Validación del método de cromatografía de gas - líquido

1.1.1. Selectividad

En la figura 4.1 se muestran los cromatogramas típicos obtenidos en el análisis de muestras plasmáticas con diazepam y sin él (blanco plasmático) en los cuales se observó que el fármaco de interés tiene un tiempo de retención de 2.5 minutos y la griseofulvina (estándar interno) de 10.2 minutos.

De igual forma, se analizó una solución de oxazepam, la figura 4.2. muestra el cromatograma resultante,

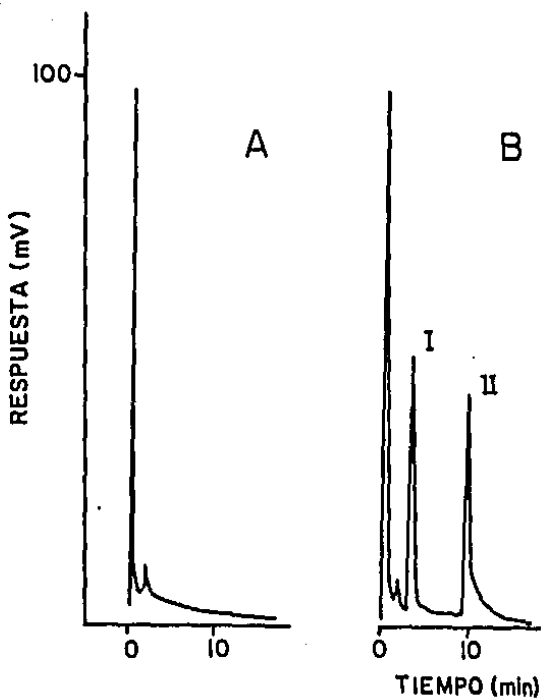


Figura 4.1. Cromatogramas obtenidos al analizar:

A = blanco plasmático, B = muestra plasmática con diazepam utilizando cromatografía de gas - líquido. Los números I y II representan la señal de diazepam y griseofulvina (estándar interno), respectivamente.

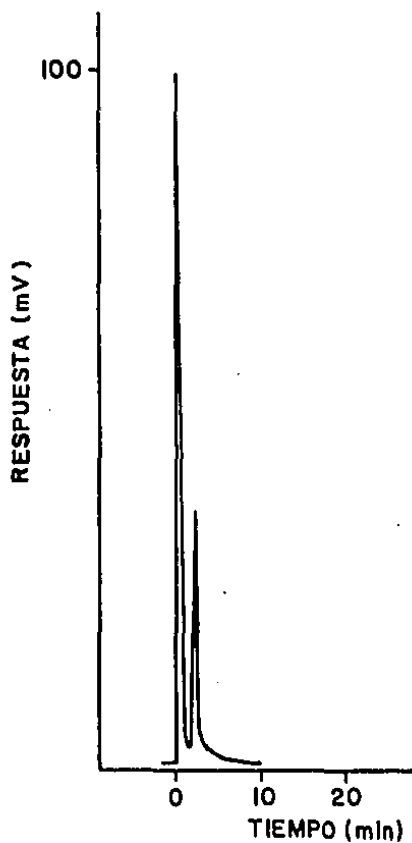


Figura 4.2. Cromatograma típico obtenido al analizar una solución de oxazepam utilizando cromatografía de gas - líquido.

observándose que el tiempo de retención para este metabolito de diazepam es de 0.9 minutos.

1.1.2. Concentración mínima detectable

De acuerdo a las condiciones propuestas en la sección III.1.1.7., se determinó que la concentración mínima detectable, después del tratamiento de las muestras corresponde a 7 ng de diazepam por mililitro de plasma.

1.1.3. Linealidad

En la tabla 4.1. se presentan los resultados obtenidos al preparar cuatro curvas de calibración de diazepam en plasma para evaluar la linealidad del método analítico en un intervalo de concentraciones de 15 a 245 ng/ml.

La representación gráfica de los resultados (figura 4.3.) nos muestra que solamente se encuentran en una línea recta las concentraciones de 15, 29, 59 y 118 ng/ml, observándose que para la concentración de 245 ng/ml, la relación de áreas diazepam/estándar no se ajusta a la ecuación de la recta descrita por las concentraciones anteriores.

1.1.4. Repetibilidad

Los resultados encontrados en cuatro curvas de calibración de diazepam en plasma preparadas en un mismo día se presentan en la tabla 4.1. A partir de ellas se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación en porciento para cada concentración. En la tabla 4.2., se muestra el coeficiente de variación calculado a partir de cuatro curvas estándar de diazepam en plasma preparadas en el día 2, bajo las mismas condiciones.

1.1.5. Exactitud

Para determinar la exactitud del método analítico, se siguió el método descrito en la sección III.1.10., los resultados encontrados se muestran en las tablas 4.1. y 4.3.

Con el fin de calcular el rendimiento en la extracción utilizada, se elaboró la tabla 4.4., en la cual se presentan los datos obtenidos en el tratamiento de muestras plasmáticas y muestras preparadas en benceno.

La curva de calibración resultante al utilizar la metodología de extracción en plasma con respecto a muestras

preparadas en benceno, se muestra en la figura 4.3., donde se puede observar, que a 245 ng de diazepam por mililitro de benceno, la relación de áreas con respecto a la concentración del fármaco no sigue un comportamiento lineal.

1.2. Validación del Método de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

1.2.1. Selectividad

En la figura 4.4. se muestran los cromatogramas obtenidos al analizar plasma conteniendo diazepam y una muestra plasmática libre del fármaco, en estos se puede observar que los tiempos de retención para diazepam y nitrazepam (estándar interno) son de 5.37 y 2.67 minutos respectivamente.

Al analizar una solución con diazepam, nitrazepam y oxazepam se obtuvo el cromatograma presentado en la figura 4.5. en donde se observa que el tiempo de retención de oxazepam es de 3.45 minutos.

Tabla 4.1. Valores promedio de la relación de áreas diazepam/estándar interno encontradas al analizar cuatro curvas de calibración de diazepam en plasma por cromatografía de gas - líquido (día 1).

Concentración (ng/ml)	Relación de áreas diazepam/estándar (D.E.)	Coefficiente de variación (%)
245.0422 (*)	1.1000 (0.0054)	0.4891
117.6202	0.3666 (0.0250)	6.8170
58.8101	0.2012 (0.0105)	5.2377
29.4051	0.0970 (0.0051)	5.2260
14.7025	0.0460 (0.0010)	2.2420
$r = 0.9982$	$M = 0.0031$	$I = 0.0064$

Las áreas se obtuvieron por triangulación. (*) La ecuación de la línea recta se calculó omitiendo el valor de 245.0422 ng/ml.

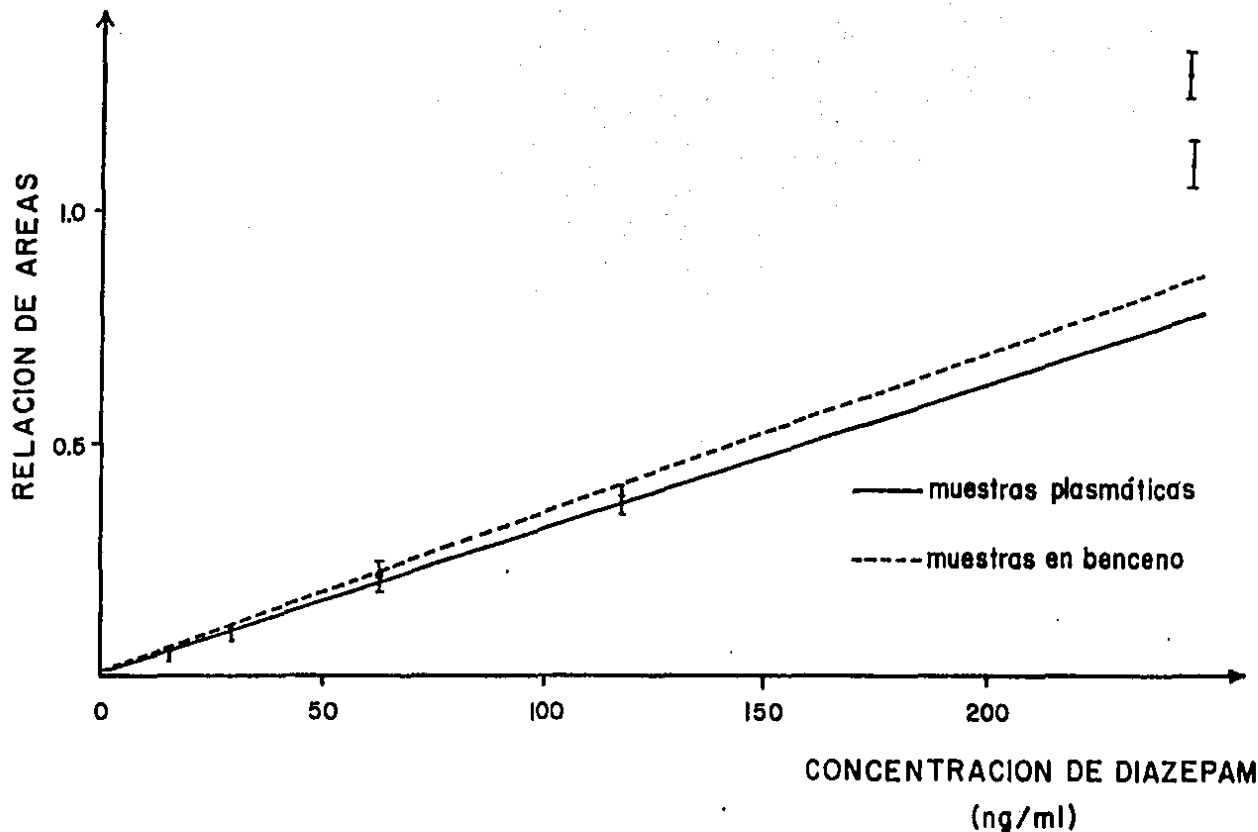


Figura 4.3. Gráfica promedio de la relación de áreas (diazepam/estándar) con respecto a la concentración de diazepam utilizando cromatografía de gas - líquido.

Tabla 4.2. Valores promedio de la relación de áreas diazepam/estándar encontradas al analizar cuatro curvas de calibración en plasma por cromatografía de gas - líquido (día 2).

Concentración (ng/ml)	Relación de áreas diazepam/estándar (D.E.)	Coefficiente de variación (%)
245.0422 (*)	1.0190 (0.0789)	7.7385
117.6202	0.4230 (0.0282)	6.6562
58.8101	0.2144 (0.0141)	6.5744
29.4051	0.0952 (0.0036)	3.7610
14.7025	0.0468 (0.0042)	8.9141
$r = 0.9996$	$M = 0.0037$	$I = -0.0081$

(*) La ecuación de la línea recta se calculó suprimiendo el valor de 245.0422 ng/ml.

Tabla 4.3. Valores promedio de la relación de áreas diazepam/estándar encontradas al analizar cuatro curvas de calibración en benceno por cromatografía de gas - líquido.

Concentración (ng/ml)	Relación de áreas diazepam/estándar (D.E.)	Coefficiente de variación (%)
245.0422 (*)	1.2930 (0.0647)	5.0034
117.6202	0.3913 (0.0194)	4.9485
58.8101	0.2224 (0.0122)	5.4848
29.4051	0.1001 (0.0046)	4.5976
14.7025	0.0449 (0.0041)	9.1847

$$r = 0.9959$$

$$M = 0.0034$$

$$I = 0.0045$$

(*) La ecuación de la línea recta se calculó suprimiendo el valor de 245.0422 ng/ml.

Tabla 4.4. Rendimiento en la extracción de diazepam en plasma calculado en dos diferentes días siguiendo la técnica descrita en la sección III.1.1.6. (utilizando cromatografía de gas-líquido).

Concentración de diazepam (ng/ml)	Promedio de muestras plasmáticas	Promedio de muestras en benceno	Rendimiento en la extracción (%)
DIA 1			
117.6202	0.3666	0.3913	93.6877
58.8101	0.2012	0.2225	90.4270
29.4051	0.0972	0.0956	101.4644
14.7025	0.0460	0.0484	95.0413
y = 95.1551%	s = 4.6306	C.V. = 4.8664	
DIA 2			
117.6202	0.4230	0.4276	98.9242
58.8108	0.2144	0.2014	93.9366
29.4051	0.0952	0.0964	98.7552
14.7025	0.0468	0.0529	88.4688
y = 95.0212%	s = 4.9426	C.V. = 5.2015%	

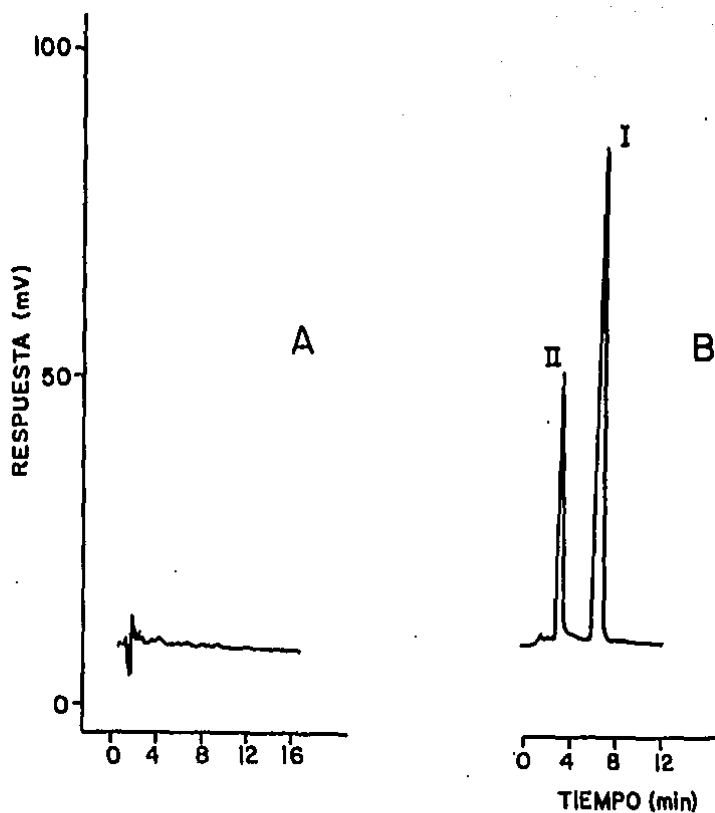


Figura 4.4. Cromatogramas obtenidos al analizar:
 A = blanco plasmático y B = muestra plasmática con diazepam utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución. I = diazepam II = nitrazepam.

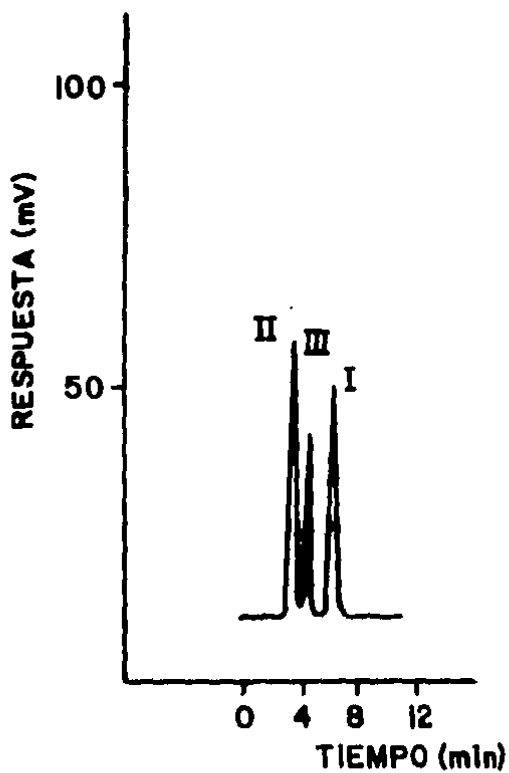


Figura 4.5. Cromatograma típico obtenido al analizar por cromatografía de líquidos de alta resolución una mezcla conteniendo: I = diazepam II = nitrazepam y III = oxazepam.

1.2.2. Concentración mínima detectable

Bajo las condiciones cromatográficas propuestas. (sección III.1.2.6.) se encontró que la concentración mínima detectable después del tratamiento de las muestras corresponde a 8 ng de diazepam por mililitro de plasma.

1.2.3. Linealidad

Los valores resultantes al analizar cuatro curvas de calibración de diazepam en plasma se muestran en la tabla 4.5., en la cual se puede observar el coeficiente de correlación promedio.

En la figura 4.6. se muestra la gráfica promedio de calibración de diazepam en un intervalo de 16 a 994 ng/ml en plasma y en metanol, con sus desviaciones estándar en cada concentración en el análisis de cuatro curvas.

1.2.4. Repetibilidad

Con el objeto de evaluar la repetibilidad del método analítico en un mismo día, se calculó el % de coeficiente de variación para cada concentración de los datos presentados en la tabla 4.5.

Lo anterior se realizó en el día 2 bajo las mismas condiciones con el fin de determinar la repetibilidad del método en diferentes días, los resultados obtenidos al analizar cuatro curvas de calibración de diazepam en plasma se muestran en la tabla 4.6. donde se puede observar el coeficiente de variación en porciento para cada concentración.

1.2.5. Exactitud

En la tabla 4.7. se presentan los resultados obtenidos en el análisis de cuatro curvas de calibración de diazepam en metanol así como el coeficiente de correlación, pendiente e intercepto en el intervalo de concentración de 16 a 994 ng/ml. La representación gráfica de los resultados se muestran en la figura 4.6.

A fin de calcular el rendimiento en la extracción se compararon los valores encontrados en el tratamiento de muestras plasmáticas y en metanol para cada concentración. En la tabla 4.8. se muestran los resultados obtenidos.

1.3. Prueba de Estabilidad en Plasma

En el estudio de estabilidad de diazepam en plasma, se

Tabla 4.5. Promedio de los valores obtenidos durante el análisis de cuatro curvas de calibración de diazepam en plasma utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución (día 1).

Concentración (ng/ml)	Relación de alturas diazepam/estándar	Coefficiente de variación (%)
994.4000	1.2467 (0.0784)	6.2875
497.2000	0.7091 (0.0279)	3.9310
126.5600	0.1774 (0.0117)	6.5992
63.2800	0.0828 (0.0057)	6.8563
31.6400	0.0585 (0.0040)	6.7989
16.2720	0.0341 (0.0022)	6.2909
$r = 0.9980$	$M = 0.0013$	$I = 0.0214$

1:

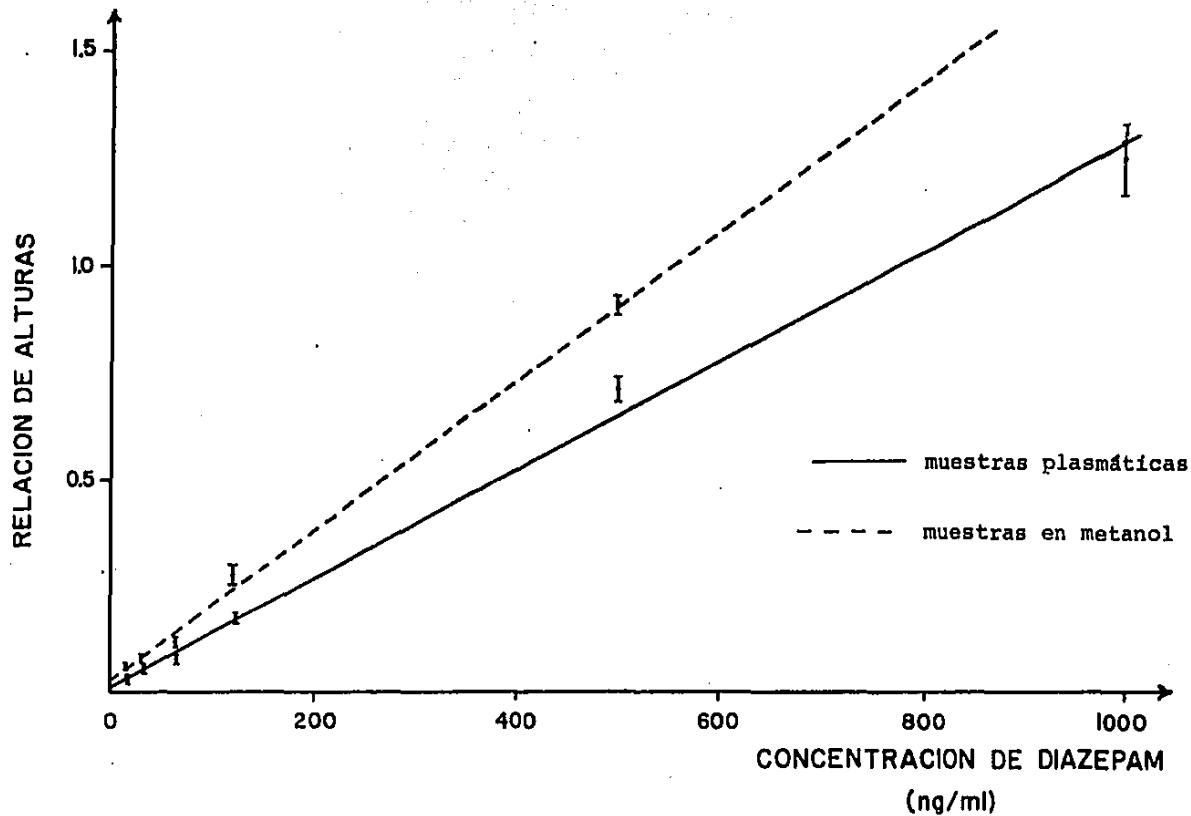


Figura 4.6. Curva de calibración promedio de la relación de alturas (diazepam/estándar) con respecto a la concentración del fármaco utilizando CLAR .

Tabla 4.6. Valores promedio de la relación de alturas diazepam/estándar encontrados al analizar cuatro curvas de calibración del fármaco en plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución (día 2).

Concentración (ng/ml)	Relación de alturas diazepam/estándar (D.E.)	Coefficiente de variación (%)
994.4000	1.2139 (0.0793)	6.5354
497.2000	0.5263 (0.0204)	3.8750
126.5600	0.1689 (0.0165)	9.7941
63.2800	0.0855 (0.0048)	5.6574
31.6400	0.0541 (0.0031)	5.7804
16.2720	0.0331 (0.0027)	8.0387
r = 0.9972	M = 0.0012	I = 0.0060

analizaron muestras que se mantuvieron en congelación durante la 0, 1, 2 y 4a. semana de su preparación (sección III.1.3.), las concentraciones del fármaco determinadas se encuentran en la tabla 4.9.

2. ESTUDIO FARMACOCINETICO

Los valores resultantes en las determinaciones bioquímicas de los voluntarios de sexo femenino y masculino, se presentan en las tablas 4.10. y 4.11. respectivamente, en ellas se puede notar que, de manera general, los ancianos participantes en el estudio se encuentran dentro de valores normales en las pruebas realizadas, excepto la voluntaria 4 que presentó alteraciones en la cantidad de proteínas totales, urea, TGO, bilirrubina y fosfatasa alcalina.

De acuerdo al protocolo descrito en la sección III.2. se determinaron las concentraciones plasmáticas de diazepam a diferentes tiempos después de la administración oral del fármaco para cada voluntario, la cuantificación se realizó por el método de cromatografía de líquidos de alta resolución; estos resultados así como su representación gráfica se presentan en el apéndice 4. En la tabla 4.12. se muestran los valores de concentración plasmática máxima de

Tabla 4.7. Valores promedio de la relación de alturas diazepam/estándar obtenidas al analizar cuatro curvas de calibración en metanol utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución.

Concentración (ng/ml)	Relación de alturas diazepam/estándar (D.E.)	Coefficiente de variación (%)
994.4000	1.7749 (0.0489)	2.7551
497.2000	0.9146 (0.0228)	2.4959
126.5600	0.2744 (0.0183)	6.6530
63.2800	0.1226 (0.0098)	7.7927
31.6400	0.0783 (0.0050)	6.3718
16.2720	0.0539 (0.0023)	4.2340
$r = 0.9998$	$M = 0.0018$	$I = 0.0285$

Tabla 4.8. Rendimiento en la extracción de diazepam en plasma calculado en dos diferentes días utilizando cromatografía de líquidos.

Concentración de diazepam (ng/ml)	Promedio de muestras plasmáticas	Promedio de muestras en metanol	Rendimiento en la extracción (%)
DIA 1			
994.4000	1.2467	1.7749	70.2406
497.2000	0.7091	0.9146	77.5312
126.5600	0.1774	0.2744	64.6501
63.2800	0.0828	0.1226	67.5367
31.6400	0.0585	0.0788	74.2386
16.2720	0.0343	0.0539	63.6364
y = 69.6389%	B = 5.4616	C.V. = 7.8427%	
DIA 2			
994.4000	1.2139	1.7379	69.8487
497.2000	0.5263	0.9086	57.9243
126.5600	0.1689	0.2468	68.4360
63.2800	0.0855	0.1284	66.5888
31.6400	0.0541	0.0836	64.7129
16.2720	0.0331	0.0566	58.4800
y = 64.3319%	B = 5.0559	C.V. = 7.8592%	

Tabla 4.9. Concentración plasmática de diazepam en el estudio de estabilidad. Las muestras se analizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución bajo las condiciones indicadas en la sección III.1.3., utilizando una concentración inicial de 1.0 µg/ml.

Tiempo (Semana)	Concentración de diazepam en plasma (µg/ml)			
0	0.9418	0.8908	1.0280	0.9368
1	1.0050	1.0147	0.9374	0.9799
2	1.0097	0.8965	0.9922	0.9594
4	0.9724	0.9711	0.9566	0.9262

diazepam ($C_{p\text{máx}}$) así como el tiempo para alcanzar esta concentración ($T_{\text{máx}}$) obtenidos en cada individuo.

Los criterios seguidos para la elección del modelo farmacocinético que mejor describiera los resultados experimentales como son suma de cuadrados, criterio de información de Akaike y F estadística para los voluntarios de sexo femenino y masculino, se encuentran en las tablas 4.13. y 4.14. respectivamente; en ellas se puede notar que, de manera general, para todos los voluntarios los datos se ajustan adecuadamente a un modelo abierto de dos compartimientos con administración de primer orden (MADC), excepto para dos participantes: voluntario 13 en quien se obtuvo un modelo abierto de tres compartimientos (MATC) y 7 en quien no fue posible determinar el modelo farmacocinético debido a que ingería regularmente diazepam antes del estudio y durante el mismo no suspendió su tratamiento con este fármaco.

En las tablas 4.15. y 4.16. se muestran los valores individuales de los parámetros farmacocinéticos obtenidos en cada voluntario utilizando el método de los residuos, el método incremental de Gerardin y el ajuste no lineal.

Tabla 4.10. Resultados de las determinaciones bioquímicas en los voluntarios de sexo femenino.

VOLUNTARIO	P.T.	ALB.	GLOB.	UREA	CREAT	TGP	TGO	F.A.	B.D.	B.T.
1	8.9	3.9	5.1	39.3	1.1	6.4	15.2	114.7	0.3	0.5
2	7.2	4.1	3.1	35.8	1	21.9	18.5	99.8	0.5	0.8
3	6.8	4.1	2.6	41.4	0.8	11.8	20.3	60.3	0.8	1
4	6.8	3.6	3.3	80.7	1.5	14.2	42.2	194.6	0.4	0.8
5	6	3.7	2.3	27.1	0.9	14.1	28.5	126.1	0.2	0.6
6	7	3.7	3.3	50	1.3	10	24.7	103.4	0.3	0.5
7	6.4	4	2.5	32.9	0.8	19.8	27.5	69.9	0.3	0.4

P.T.=proteínas totales (g%), ALB.=albúmina (g%), GLOB.=globulina (g%), CREAT=creatinina (mg%), TGP (UI/ml), TGO (UI/ml), F.A.=fosfatasa alcalina (UI/ml), B.D.=bilirrubina directa (mg%) y B.T.=bilirrubina total.

Tabla 4.11. Resultados en las determinaciones bioquímicas en los voluntarios de sexo masculino.

VOLUNTARIO	P.T.	ALB.	GLOB.	UREA	CREAT	TGP	TGO	F.A.	B.D.	B.T.
8	7.7	4.4	3.3	41.4	1.6	11.1	20.1	79.1	0.4	0.5
9	7.5	4	3.4	42.1	0.9	8.5	17.3	96.7	0.5	0.8
10	7	4	3	37.2	1	13.1	11.8	92.8	0.3	0.5
11	6.9	4.2	2.7	28.2	0.9	9.5	21.1	59.5	0.5	0.6
12	6.4	3.7	2.8	33.2	0.9	13.1	21.4	92.4	0.3	0.6
13	6.3	3.7	2.6	31.7	0.7	12.9	24.5	68.9	0.5	0.5

Las abreviaturas son iguales a las de la tabla 4.10.

Tabla 4.12. Valores individuales de la concentración plasmática máxima Cp máx y tiempo para alcanzarla (T máx) resultantes en cada voluntario.

Voluntario	Cp máx (ng/ml)	T máx (h)
1	138.0644	1.0
2	121.9750	1.0
3	100.4101	1.0
4	58.9480	2.0
5	194.5022	1.0
6	153.2870	1.0
7	579.9992	2.0
8	68.5370	2.0
9	105.0155	1.0
10	84.7246	1.0
11	136.4058	2.0
12	107.3764	1.0
13	270.2450	0.5

Tabla 4.13. Valores calculados por el método de los residuos para la elección del modelo farmacocinético en los voluntarios de sexo femenino.

VOLUNTARIO	MODELO	SUMA DE CUADRADOS	CRITERIO DE AKAIKE	VALOR DE F (1 A 2)	F tablas ($\alpha = 0.05$)
1	MADC	3.0333	23.0960	3045.8	9.55
2	MADC	136.3381	61.1510	34.6130	9.55
3	MADC	279.9455	57.0770	28.9320	19
4	MADC	65.3110	49.6120	26.9470	19
5	MADC	790.5197	78.7270	59.8780	9.55
6	MADC	172.5612	63.5080	85.7490	9.55

(1 a 2) = comparación entre modelo abierto de 1 y 2 compartimientos.

Tabla 4.14. Valores calculados por el método de los residuos para la elección del modelo farmacocinético en los voluntarios de sexo masculino.

VOLUNTARIO	MODELO	SUMA DE CUADRADOS	CRITERIO DE AKAIKE	VALOR DE F (1 A 2)	F tablas ($\alpha = 0.05$)
8	MADC	68.7654	54.307	4.4170	9.55
9	MADC	199.9471	64.191	41.381	6.94
10	MADC	17.1786	34.749	9.6371	199.5
11	MADC	746.7610	78.157	16.168	9.55
12	MADC	138.3903	61.301	31.631	9.55
13	MATC	130.8655	34.742 (2 A 3)	78.746	19

(1 a 2) = comparación entre modelo abierto de 1 y 2 compartimientos, (2 a 3) = entre 2 y 3 compartimientos.

Tabla 4.15. Parámetros farmacocinéticos para los voluntarios de sexo femenino, obtenidos por: método de los residuos (M.R.), método incremental (M.I.) y ajuste no lineal (N.L.).

VOLUNTARIO	α (h^{-1})			β (h^{-1})			k_a (h^{-1})		
	M.R.	M.I.	N.L.	M.R.	M.I.	N.L.	M.R.	M.I.	N.L.
1	0.2654	0.2554	0.2722	0.0132	0.013	0.0133	3.2842	-	3.0148
2	0.5683	0.5483	0.9606	0.112	0.0112	0.0119	3.4643	-	1.4191
3	0.3532	0.2546	-	0.0243	0.0195	-	3.6717	-	-
4	0.3362	0.3262	-	0.0053	0.0054	-	1.5827	-	-
5	0.1764	0.1714	-	0.0072	0.0069	-	7.4434	-	-
6	1.0503	0.9303	1.2958	0.0294	0.0306	0.0368	2.3406	-	1.7497

Tabla 4.15. (continuación) Parámetros farmacocinéticos para los voluntarios de sexo femenino, obtenidos por: método de los residuos (M.R.), método incremental (M.I.) y ajuste no lineal (N.L.).

VOLUNTARIO	k12 (h ⁻¹)			k21 (h ⁻¹)			k10 (h ⁻¹)		
	M.R.	M.I.	N.L.	M.R.	M.I.	N.L.	M.R.	M.I.	N.L.
1	0.1566	0.1203	0.1616	0.0758	0.072	0.0766	0.0462	0.0416	0.0473
2	0.2952	0.3149	0.451	0.2598	0.2162	0.4986	0.0245	0.0284	0.0229
3	0.1743	0.1301	-	0.1433	0.0869	-	0.0599	0.0571	-
4	0.2417	0.2363	-	0.0765	0.0702	-	0.0233	0.0251	-
5	0.1122	0.1095	-	0.0376	0.0345	-	0.0338	0.0343	-
6	0.6783	0.5256	0.6016	0.2976	0.3552	-	0.1037	0.0802	-

Tabla 4.16. Parámetros farmacocinéticos para voluntarios de sexo masculino, obtenidos por: método de los residuos (M.R.), método incremental (M.I.) y ajuste no lineal (N.L.).

VOLUNTARIO	α (h^{-1})			β (h^{-1})			k_a (h^{-1})		
	M.R.	M.I.	N.L.	M.R.	M.I.	N.L.	M.R.	M.I.	N.L.
8	0.1065	0.1165	0.12	0.0074	0.0083	0.0086	2.0787	-	2.1379
9	0.3255	0.2455	0.3063	0.0083	0.0068	0.008	3.5721	-	3.9975
10	0.1952	0.3375	-	0.389	0.039	-	7.8901	-	-
11	0.8819	0.8669	0.8723	0.0118	0.0098	0.0098	1.6561	-	1.1404
12	0.8119	0.3825	-	0.0086	0.0075	-	2.2758	-	-
13	= 2.7818		= 0.1272	= 0.0085		ka = 6.0041			

Tabla 4.16. (continuación) Parámetros farmacocinéticos para voluntarios de sexo masculino obtenidos por: método de los residuos (M.R.), método incremental (M.I.) y ajuste no lineal (N.L.).

VOLUNTARIO	k12 (h ⁻¹)			k21 (h ⁻¹)			k10 (h ⁻¹)			
	M.R.	M.I.	N.L.	M.R.	M.I.	N.L.	M.R.	M.I.	N.L.	
8	0.0442	0.0479	0.0474	0.0555	0.061	0.0654	0.0142	0.0158	0.0158	
9	0.1733	0.142	0.17	0.1418	0.0922	0.1246	0.0191	0.0181	0.0197	
10	0.0145	0.0316	-	0.1766	0.3012	-	0.043	0.0437	-	
11	0.5769	0.6343	0.5283	0.2796	0.1999	0.3277	0.0372	0.0425	0.0261	
12	0.5022	0.2127	-	0.2946	0.1593	-	0.0237	0.018	-	
13	1.7679	-	-	0.6733	-	-	0.1479	-	-	
	k13 = 0.2982					k31 = 0.0302				

2.1. Análisis de Momentos Estadísticos

A fin de comparar los resultados de área bajo la curva de concentración plasmática - tiempo de cero a infinito (ABC_0^∞) se elaboraron las tablas 4.17. y 4.18. donde se muestran los valores calculados por la ecuación integrada utilizando el teorema de L'Hopital y por el algoritmo de trapezoides lineales y logarítmicos. Asimismo, se determinaron los tiempos medios de residencia y el tiempo de vida media de eliminación para cada voluntario, los resultados aparecen en las tablas mencionadas anteriormente.

En 1982, Vaughan y colaboradores (116) publicaron un método basado en el tiempo medio de residencia de un fármaco para conocer su volumen de distribución en el compartimiento central durante el estado estacionario, siendo este cálculo modelo y administración independiente para sistemas catenarios y mamiliars.

Por otra parte, con el objeto de verificar el método mencionado se determinó el volumen de distribución del compartimiento central en el estado estacionario utilizando para tal efecto las microconstantes de transferencia intercompartamentales suponiendo una absorción completa completa para cada voluntario; los valores resultantes se muestran en las tablas 4.19. y 4.20.

Tabla 4.17. Momentos estadísticos y tiempo de vida media de eliminación para voluntarios de sexo femenino. (1)=área bajo la curva obtenida utilizando la ecuación $C_p(t)$, (2) obtenida con trapezoides lineales y (3) con trapezoides logarítmicos.

VOLUNTARIO	ABC_{∞}^{∞} (1) (ng/ml/h)	ABC_{∞}^{∞} (2) (ng/ml/h)	ABC_{∞}^{∞} (3) (ng/ml/h)	TMR (3) (h)	T1/2 β (h)
1	3564.119	3681.786	3682.239	64.786	52.116
2	6029.172	6153.101	6148.695	84.101	58.248
3	1908.501	1907.593	1919.382	38.465	28.525
4	3552.880	3592.925	3610.204	175.607	130.783
5	5138.894	6009.658	6011.715	116.808	96.270
6	2225.879	2430.475	2411.108	29.994	18.836

Tabla 4.18. Momentos estadísticos y tiempo de vida media de eliminación para voluntarios de sexo masculino. (1)=área bajo la curva obtenida integrando la ecuación $C_p(t)$, (2) utilizando trapezoides lineales y (3) trapezoides logarítmicos.

VOLUNTARIO	ABC_0^{∞} (1) (ng/ml/h)	ABC_0^{∞} (2) (ng/ml/h)	ABC_0^{∞} (3) (ng/ml/h)	TMR (3) (h)	$T_{1/2}$ β (h)
8	4519.222	4632.315	4619.088	109.811	80.599
9	6145.341	6483.738	6489.901	125.686	86.643
10	1599.872	2027.089	1988.227	25.621	17.819
11	6056.52	6106.574	6099.174	97.107	70.729
12	6851.23	7068.367	7080.966	119.54	80.599
13	3954.875	3862.015	3834.272	93.33	81.547

Tabla 4.19. Volúmenes de distribución de diazepam determinados por el método de Vaughan y utilizando (2) la ecuación: $Vd(EE) = V1 (1+ k12/k21)$ para los voluntarios de sexo femenino.

Voluntario	Vd(EE) (L) Método de Vaughan	Vd(EE) (L) (2)
1	87.9704	91.9828
2	68.3890	69.8019
3	100.2003	96.9768
4	243.2096	245.6084
5	97.1505	98.6808
6	62.1994	50.8261

Vd(EE) = volumen de distribución en el estado estacionario;
 V1 = volumen de distribución en el compartimiento central en litros; k12 y k21 = microconstantes de transferencia en los compartimientos 1 y 2 (1/horas).

Tabla 4.20. Volúmenes de distribución de diazepam determinados con el método de Vaughan y utilizando (2) la ecuación: $Vd(EE) = V1 (1 + k12/k21)$ para los voluntarios de sexo masculino.

Voluntario	Vd(EE) (L) Método de Vaughan	Vd(EE) (L) (2)
8	118.8663	120.2902
9	96.8320	97.8193
10	64.4315	63.3702
11	76.6069	86.2501
12	84.4093	83.2448
13	121.7043	-

Vd(EE) = volumen de distribución en el estado estacionario;
Vd1 = volumen de distribución en el compartimiento central en litros; k21 y k12 = microconstantes de transferencia en los compartimientos 1 y 2 (1/horas).

2.2. Diseño de Regímenes de Dosificación

En las tablas 4.21. y 4.22. se muestran los regímenes de dosificación así como la concentración plasmática mínima y máxima en el estado estacionario de diazepam calculados para los voluntarios de sexo femenino utilizando el método uno, y el fundamentado en el tiempo medio de residencia de acuerdo a la sección III.2.1. Los resultados obtenidos para los participantes de sexo masculino aparecen en las tablas 4.23. y 4.24.

Tabla 4.21. Regímenes de dosificación y valores individuales de las concentraciones plasmáticas mínima (Cp_{\min}^{EE}) y (Cp_{\max}^{EE}) máxima de diazepam durante el estado estacionario en los voluntarios de sexo femenino calculados con el método uno.

Voluntario	D_m (mg)	τ (h)	Cp_{\min}^{EE} (ng/ml)	Cp_{\max}^{EE} (ng/ml)
1	5	24	111.4688	248.4241
2	5	24	217.9755	343.9027
3	5	12	110.9218	220.4343
4	5	24	139.3950	198.0435
5	5	24	197.0538	387.8877
6	5	12	124.7990	299.1415

D^* = D_m ; D^* = dosis de carga; τ = intervalo de dosificación y D_m = dosis de mantenimiento.

Tabla 4.22. Regímenes de dosificación y valores individuales de las concentraciones plasmáticas mínima (Cp_{\min}^{EE}) y máxima (Cp_{\max}^{EE}) de diazepam durante el estado estacionario en los voluntarios de sexo femenino, calculados con el método fundamentado por el tiempo medio de residencia del fármaco.

Voluntario	D_m (mg)	τ (h)	Cp_{\min}^{EE} (ng/ml)	Cp_{\max}^{EE}
1	5	29	90.8554	226.0984
2	5	60	73.9484	190.3387
3	5	23	50.8484	154.6824
4	5	59	52.4884	109.2681
5	5	40	107.3890	302.9365
6	5	19	67.8074	231.4639

D^* = D_m ; D^* = dosis de carga; D_m = dosis de mantenimiento;
 τ = intervalo de dosificación.

Tabla 4.23. Regímenes de dosificación y valores individuales de las concentraciones plasmáticas mínima (CP_{\min}^{EE}) y máxima (CP_{\max}^{EE}) de diazepam durante el estado estacionario en los voluntarios de sexo masculino, calculados por el método uno.

Voluntario	D_m (mg)	τ (h)	CP_{\min}^{EE} (ng/ml)	CP_{\max}^{EE}
8	5	24	164.9997	229.6641
9	5	24	216.4640	326.6404
10	5	12	145.4620	223.3524
11	5	24	237.2506	364.7319
12	5	24	245.9629	360.4018
13	5	24	116.2850	386.9809

$D^s = D_m$; $D^s =$ dosis de carga; $D_m =$ dosis de mantenimiento;
 $\tau =$ intervalo de dosificación.

Tabla 4.24. Regímenes de dosificación y valores individuales de las concentraciones plasmáticas mínima (Cp_{min}^{EE}) y máxima ($Cp_{máx}^{EE}$) de diazepam durante el estado estacionario en los voluntarios de sexo masculino, calculados por el método fundamentado en el tiempo medio de residencia del fármaco.

Voluntario	Dm (mg)	Γ (h)	Cp_{min}^{EE} (ng/ml)	$Cp_{máx}^{EE}$
8	5	86	36.2721	101.8238
9	5	69	66.6581	168.6949
10	5	53	32.1507	113.6314
11	5	52	86.8303	224.7515
12	5	58	91.0800	196.7671
13	5	82	28.1120	296.4636

D^* = Dm; D^* = dosis de carga; Dm = dosis de mantenimiento;
 Γ = intervalo de dosificación.

C A P I T U L O V

DISCUSION DE RESULTADOS

1. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS PARA LA CUANTIFICACION DE DIAZEPAM EN PLASMA

1.1. Selectividad

De acuerdo a los cromatogramas obtenidos en el método de cromatografía de gas - líquido (figura 4.1.) se puede observar que no se registran señales de componentes del plasma que interfieran en la determinación de diazepam. Por otra parte, al caracterizar oxazepam, uno de los metabolitos del fármaco (figura 4.2.), se determinó que este no interfería durante se análisis ya que la resolución entre ellos es de 1.0 equivalente a una separación dl 98%.

Asimismo, para probar la selectividad del método de cromatografía de líquidos, se obtuvieron cromatogramas típicos (figuras 4.4. y 4.5.) en los cuales se puede notar que no existen señales de compuestos del plasma, así como

una buena resolución entre diazepam y oxazepam.

1.2. Concentración Mínima Detectable

En el método de cromatografía de gas - líquido utilizado para la determinación de diazepam en plasma, se pudo detectar una concentración mínima de 7 ng/ml, mientras que en cromatografía de líquidos fue de 8 ng/ml.

El límite de determinación puede disminuir en cromatografía de gases si se aumenta el volumen de muestra.

1.3. Linealidad

En la representación gráfica de los resultados obtenidos por cromatografía de gases (figura 4.3.) se muestra que se presentó una linealidad satisfactoria en el intervalo de concentración de 15 a 120 ng/ml, con un coeficiente de correlación de 0.9982, a concentraciones mayores (250 ng/ml) no hay un comportamiento lineal entre la relación de áreas - concentración. Resultados similares observaron Arnold y colaboradores quienes publicaron (87) que existe una relación lineal limitada en la cuantificación de diazepam en plasma por este método. Tal efecto se manifiesta, debido a que tal vez, exista una

saturación en el sistema de detección. Para evitar este problema, se recomendaría que en el caso de cuantificar diazepam en muestras plasmáticas concentradas, estas se preparen de acuerdo a la técnica descrita en la sección III.1.2.5., y al reconstituir las muestras antes de su análisis en cromatografía de gases, se haga en un volumen mayor de benceno que el indicado, a fin de manejar concentraciones dentro del intervalo lineal. Sin embargo, por esta modificación se tendría que validar nuevamente el método.

En el ajuste de mínimos cuadrados a los resultados obtenidos en el análisis de muestras plasmáticas por cromatografía de líquidos se encontró un coeficiente de correlación de 0.9980 en el intervalo de concentración de 15 a 1000 ng/ml (tabla 4.5.); al efectuar un análisis de varianza se obtuvo un valor F de 988.5311 que al compararlo con el valor de tablas ($\alpha = 0.05$) es mayor, indicando que el método es lineal en ese intervalo de concentración.

1.4. Repetibilidad

Con el propósito de determinar la repetibilidad de los métodos en un mismo día, se calculó el coeficiente de variación (%) para cada concentración en el método de

cromatografía de gases (tabla 4.1.) y de líquidos (tabla 4.5.) en las cuales se obtuvieron valores máximos de 8.6095% y 6.8563%, respectivamente.

La repetibilidad en diferentes días presentó un coeficiente de variación más alto de 9.5157% para el método de cromatografía de gases y de 16.2342% para el de líquidos, por lo que se consideró conveniente preparar una curva de calibración cada día que se cuantificara diazepam en muestras plasmáticas.

Por otra parte, para determinar la repetibilidad en la exactitud de ambos métodos analíticos en diferentes días se compararon por medio de una prueba de "t" los % de extracción promedio de diazepam obtenidos en cada día (tabla 4.4. para CGL y tabla 4.8. para CLAR). Los valores resultantes mostraron que no existen diferencias al 95% de confianza en la exactitud de los métodos en diferentes días.

1.5. Sensibilidad

Al analizar los resultados obtenidos en las pendientes de las gráficas (tablas 4.1. y 4.5.) en cromatografía de gas - líquido (0.0030) y líquidos (0.0013) se pudo observar que la cuantificación de diazepam en plasma es dos veces más sensible en cromatografía de gases que en líquidos.

1.6. Exactitud

A fin de conocer la exactitud de los métodos analíticos estudiados se calculó el rendimiento en la extracción para cada técnica (tablas 4.4. y 4.8.). obteniéndose para cromatografía de gases una recuperación del 95.1551%, mientras que cromatografía de líquidos se observa de 69.6389%.

Una comparación de los valores promedio mencionados anteriormente, utilizando para tal efecto una prueba de contraste de hipótesis se muestra en la tabla 5.1., en la cual se puede observar, que existen diferencias estadísticamente significativas al 95% de confianza entre las dos técnicas de extracción.

Con el objeto de aumentar la eficiencia en la extracción de diazepam utilizada en el método de cromatografía de líquidos se varió el pH de extracción líquido - líquido a valores de 6, 7, 8 y 9; así como el tiempo de agitación de las muestras a 1.5, 3 y 5 minutos en la técnica descrita en la sección III.1.2.5. Los resultados indican que no existen diferencias en la recuperación del fármaco al variar dichos factores; sin embargo, las condiciones se eligieron de acuerdo a la limpieza obtenida en el análisis de las muestras. Asimismo, se probó la

Tabla 5.1. Evaluación estadística del rendimiento en la extracción de diazepam en plasma utilizando cromatografía de gases y líquidos t (tablas $\alpha = 0.05$) = 2.31.

Método analítico	% de recuperación	t(cal)
cromatografía de gases	95.1551 (4.6306)	7.6524
cromatografía de líquidos	69.6389 (5.4616)	

extracción de diazepam con otros disolventes (cloroformo, benceno, tolueno y acetato de butilo), encontrándose que con ellos, se extraían compuestos del plasma con tiempos de retención muy cercanos al fármaco, lo cual provoca que la técnica no fuera específica para la cuantificación del diazepam.

1.7. Tiempo de Análisis

El tiempo de análisis requerido para las muestras en cromatografía de gases de 15 minutos, mientras que en cromatografía de líquidos de 10 minutos.

Con el objeto de realizar una comparación entre los parámetros encontrados en los dos métodos analíticos, se elaboró la tabla 5.2., en la cual se muestran los resultados obtenidos.

Cabe mencionar que, el intervalo lineal limitado en el método de cromatografía de gases provoca que se requieran modificaciones en la técnica de preparación de las muestras plasmáticas si se utilizara el método para la cuantificación del fármaco en estudios de dosificación múltiple de diazepam; sin embargo, el método sería de elección en estudios de dosificación única. En este trabajo las concentraciones obtenidas se encontraban dentro del intervalo lineal.

Con respecto a la exactitud del método de cromatografía de líquidos, no era la óptima; sin embargo, es válido ya que cumplía con los demás parámetros. De acuerdo a su sensibilidad, el método sería de mayor utilidad si se empleara en estudios de dosificación múltiple de diazepam.

1.8. Pruebas de Estabilidad en Plasma

Para determinar la estabilidad química de diazepam en plasma, en los resultados obtenidos en las muestras almacenadas durante cuatro semanas (tabla 4.9), se efectuó un análisis de varianza la cual aparece en la tabla 5.3., en ella se puede observar que el valor calculado de F es menor que el valor de F en tablas, lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas en las cantidades de fármaco presentes en las muestras plasmáticas durante cuatro semanas.

Tabla 5.2. Comparación de los métodos analíticos utilizados para la cuantificación de diazepam en plasma. Valores promedio (desviación estándar).

Parámetro	Método Analítico	
	cromatografía de gas - líquido	cromatografía de líquidos
Selectividad	+	+
Volumen de muestra (ml)	0.2	0.5
Conc. mínima detectable (ng/ml)	7.0	8.0
Intervalo lineal (ng/ml)	15 a 120	15 a 1000
Coefficiente de variación (%)	4.0024 (2.5684)	6.1273 (1.1084)
Sensibilidad	0.0030	0.0013
Recuperación (%)	95.1551 (4.6306)	69.6389 (5.4616)
Tiempo de análisis (min)	15	10

Tabla 5.3. Análisis de varianza para concentraciones de diazepam en plasma obtenidos en diferentes semanas.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F
Entre semanas	3	0.0028	0.0009	0.4865
Dentro de las semanas	12	0.0222	0.0019	
Total	15	0.0250		

2. ESTUDIO FARMACOCINETICO

De acuerdo a los resultados presentados en el apéndice 1, se determinó que las tabletas de diazepam se encontraban dentro de especificaciones en la prueba de disolución de la USP XXI (117), por lo cual se utilizaron en el presente estudio.

Con respecto a las características físicas de los participantes del estudio existía una amplia variación en el peso, talla corporal y edad (tabla 3.1.), esto es de

interés, ya que se ha encontrado que la farmacocinética del diazepam se ve afectada por características como la obesidad y la edad de los pacientes.

En las tablas 4.10. y 4.11. puede observarse, que en la mayoría de los voluntarios los niveles de protefina sérica se encontraban bajos con respecto a los valores normales. Este resultado es importante, debido a que el diazepam se une ampliamente a proteínas, y una modificación en ellas puede alterar la disposición del fármaco.

Por otra parte, en la voluntaria 4 se obtuvieron manifestaciones bioquímicas de daño hepático indicadas por las concentraciones alteradas en proteínas, urea, TGO, creatinina y fosfatasa alcalina (tabla 4.10.).

Durante el análisis cuantitativo de las muestras plasmáticas obtenidas después de la administración del diazepam, se registraron cromatogramas con señales únicamente a los tiempos de retención del fármaco y su estándar interno (no se registraron picos correspondientes a oxazepam); en las muestras previas a la administración del medicamento (tiempo cero) no se detectaron compuestos a los tiempos de retención de interés.

Los valores de concentración plasmática máxima de diazepam alcanzada para cada participante se muestran en la tabla 4.12., en la cual se puede observar una amplia

variación en ellos, ya que van de 58.95 a 270.25 ng/ml, con un promedio de 128.29 y desviación estándar de 58.31; asimismo, para $t_{(máx)}$ se obtuvo un intervalo de 0.5 a 2.0 horas con un promedio de 1.125 y desviación estándar se 0.433.

La elección del modelo farmacocinético adecuado para cada voluntario, se fundamentó en la suma de cuadrados, criterio de Akaike y la F estadística (tablas 4.13. y 4.14.), los valores obtenidos en las tablas anteriores mostraron una dispersión muy amplia, sin embargo para todos ellos (excepto el voluntario 13) los datos experimentales $C_p(t)$ se ajustaron a un modelo abierto de dos compartimientos (MADC).

En un MADC con administración de primer orden, existen tres posibilidades (114): a) cuando la eliminación del fármaco es exclusivamente del compartimiento central, b) cuando la eliminación ocurre únicamente del compartimiento periférico y c) la eliminación es por ambos compartimientos. Para el caso de la cinética de diazepam en el organismo, se ha publicado (42), que el fármaco se elimina exclusivamente por el compartimiento central a través del metabolismo, ya que k_{10} (constante de velocidad de eliminación del compartimiento central) es aproximadamente igual a la constante de formación del

desmetildiazepam (metabolito principal de diazepam).

El cálculo de los parámetros farmacocinéticos de diazepam para cada voluntario siguiendo el modelo mencionado se llevó a cabo utilizando los métodos: de los residuos, el incremental de Gerardin y un ajuste no lineal, los valores resultantes aparecen en la tablas 4.15. y 4.16., en ellas se puede observar la gran variación interindividual obtenida en las microconstantes de transferencia del modelo farmacocinético.

Los valores de las microconstantes de velocidad de transferencia para el MADC de diazepam encontrados en este trabajo, se asemejan a los publicados en la literatura por Eatman y colaboradores (43), ya que estos investigadores encontraron valores de 0.0145 a 0.5769 para k_{12} , 0.0345 a 0.4986 para k_{21} y de 0.0158 a 0.057 para k_{10} en un estudio farmacocinético utilizando esta benzodiazepina en 6 voluntarios sanos.

Para comparar los métodos de Gerardin y el ajuste no lineal, se normalizaron los valores de los parámetros encontrados tomando como referencia el método de los residuos; la representación gráfica de los resultados se muestran en las figuras 5.1. a 5.5. donde puede apreciarse que, de manera general, existe mayor diferencia entre el método de ajuste no lineal con respecto a los otros dos

métodos en los cuales se obtuvieron resultados similares; lo que indica que el método de los residuos y el incremental, en este caso, son equivalentes para el cálculo de las microconstantes de transferencia intercompartamental.

De acuerdo a la bibliografía (112), el método incremental presenta ventajas sobre el de los residuos, ya que es un algoritmo que determina mas exactamente el valor de dichas microconstantes al compararlos con los obtenidos con ajuste no lineal, sin embargo, en este estudio, no se observó esto, debido a que el intervalo en los tiempos de muestreo fue muy grande y no se presenta un comportamiento lineal entre dos puntos como supone este método.

2.1. Análisis de Momentos Estadísticos

El tiempo en el cual se tomaron las muestras sanguíneas durante el estudio fue insuficiente, la fase de eliminación del diazepam no pudo caracterizarse adecuadamente, esto provoca error al estimar el ABC_0^{∞} de la $C_p(t)$ utilizando el algoritmo numérico de trapezoides lineales. Por otra parte, se caracterizaron las ABC_0^{∞} con trapezoides logarítmicos e integrando la ecuación por medio del teorema de L'Hopital (tablas

4.17. y 4.18.), en ellas se observó una amplia variación interindividual ya que los resultados se encontraban de 1599.87 a 6851.23 con promedio de 4608.51 y desviación estándar de 1765.18. Los valores de ABC_0^{∞} se utilizaron para el cálculo de los tiempos medios de residencia, así como para la determinación de las microconstantes de transferencia por el método de Gerardin.

Los valores resultantes por el método de trapezoides se normalizaron con respecto a los encontrados, empleando la ecuación integrada con el objeto de confrontar los tres procedimientos mencionados, las diferencias se pueden apreciar en la figura 5.6.

El método de cálculo que más se aproximó a los resultados obtenidos con la ecuación integrada fue el de trapezoides logarítmicos por lo que se eligió para determinar el tiempo medio de residencia (TMR).

En los valores de TMR y tiempo de vida media de eliminación de diazepam, se observó una gran dispersión, sin embargo la voluntaria 4 presentó un valor muy alto con respecto a los demás (175.61 y 130.78 horas, respectivamente), este hallazgo se puede atribuir a un mal funcionamiento hepático en ella (indicado por los niveles alterados en las pruebas bioquímicas) que provoque una eliminación lenta del fármaco. No obstante, en

esta voluntaria, no se manifestaron efectos adversos provocados por el diazepam, durante el estudio.

Para evaluar el método de Vaughan que calcula el $V_d(EE)$ se determinó este parámetro con las microconstantes de transferencia intercompartamental (tablas 4.19. y 4.20.), a los resultados se les aplicó la prueba U de Man Whitney la cual indicó que no hay diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) entre los dos métodos de cálculo para este volumen.

Al igual que los parámetros farmacocinéticos anteriores, en los volúmenes de distribución se encontró una variación muy amplia, observándose que para la voluntaria 4 el valor fue mayor que los demás participantes en el estudio. Este hallazgo está de acuerdo con algunas investigaciones publicadas (118) en las cuales se ha encontrado que en estado de enfermedad hepática el % de unión de diazepam a proteínas plasmáticas disminuye significativamente con respecto a voluntarios sanos, debido a que en estos casos existe acumulación de compuestos endógenos, que pueden provocar la disminución de la unión del fármaco a albúmina; aumentando así la fracción libre, por lo tanto, el diazepam queda disponible para distribuirse a otros tejidos principalmente el adiposo, donde se puede acumular debido a su lipofilia, y aumentar así el volumen de distribución.

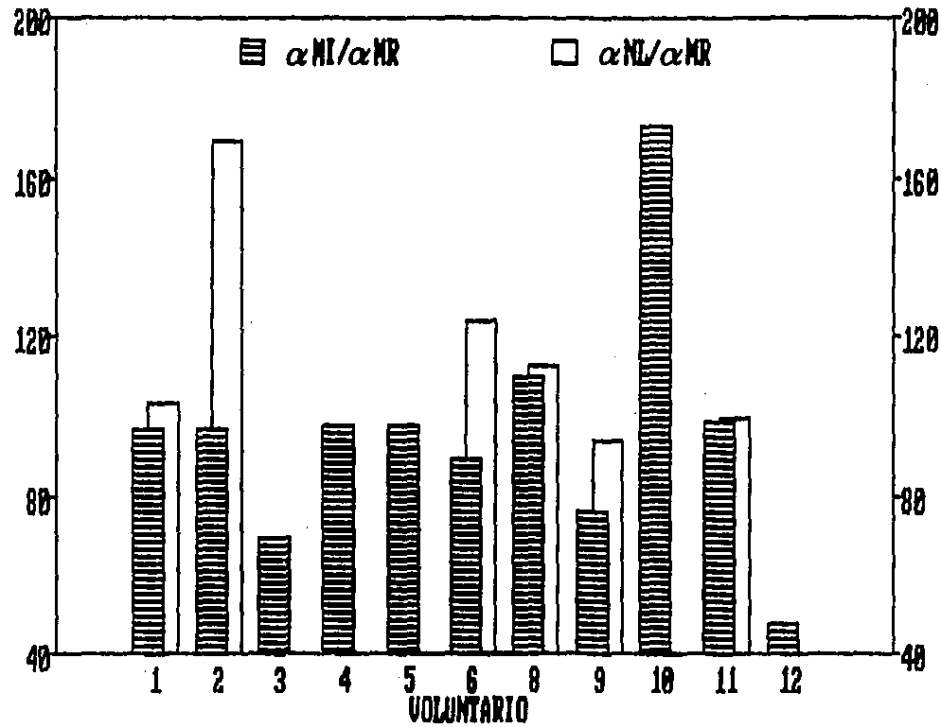


Figura 5.1. Representación gráfica de los valores normalizados de α tomando como referencia al método de los residuos para cada voluntario.

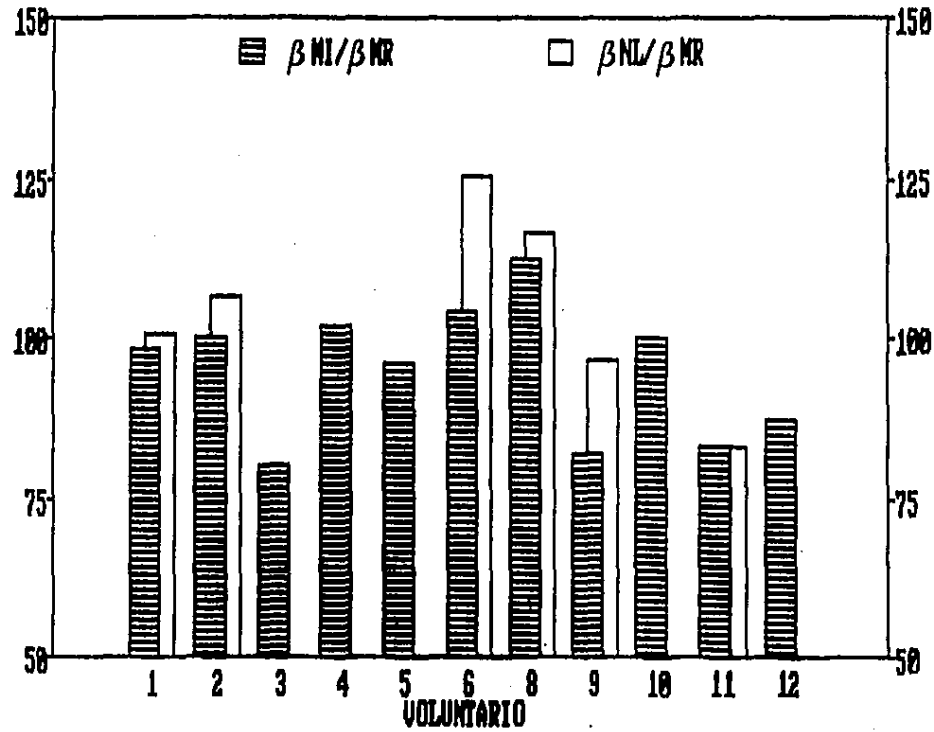


Figura 5.2. Representación gráfica de los valores normalizados de β tomando como referencia al método de los residuos para cada voluntario.

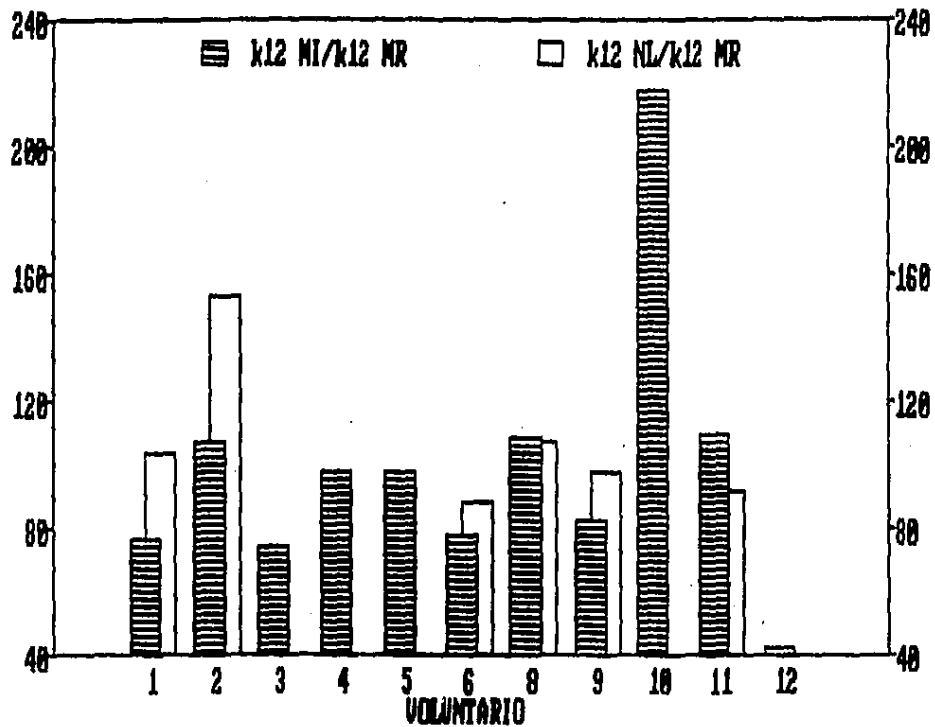


Figura 5.3. Representación gráfica de los valores normalizados de k_{12} tomando como referencia al método de los residuos para cada voluntario.

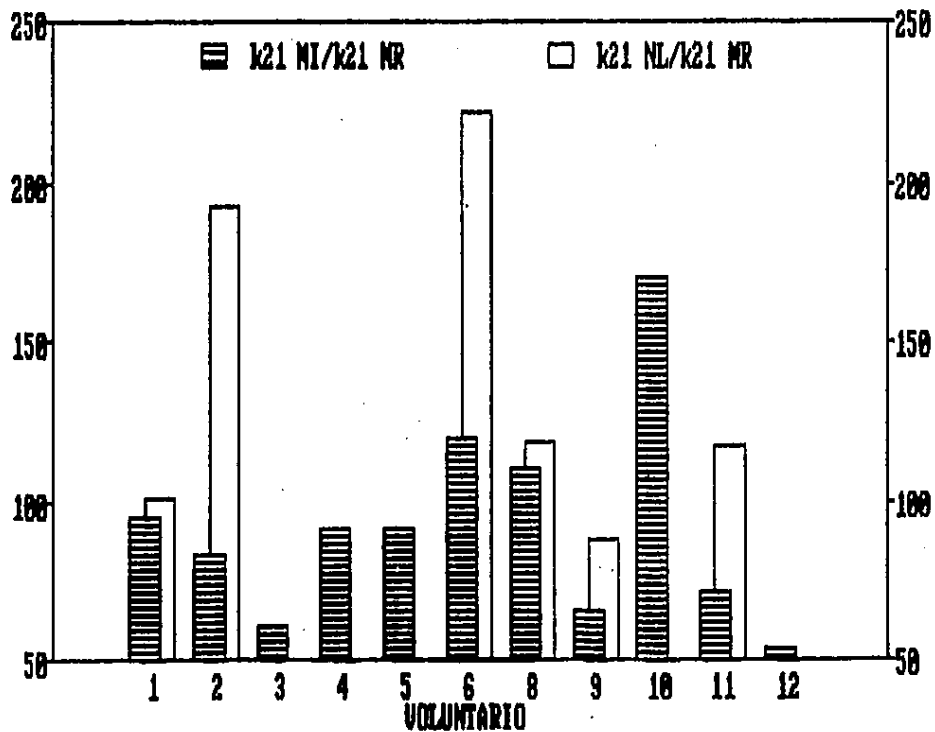


Figura 5.4. Representación gráfica de los valores normalizados de k21 tomando como referencia al método de los residuos para cada voluntario.

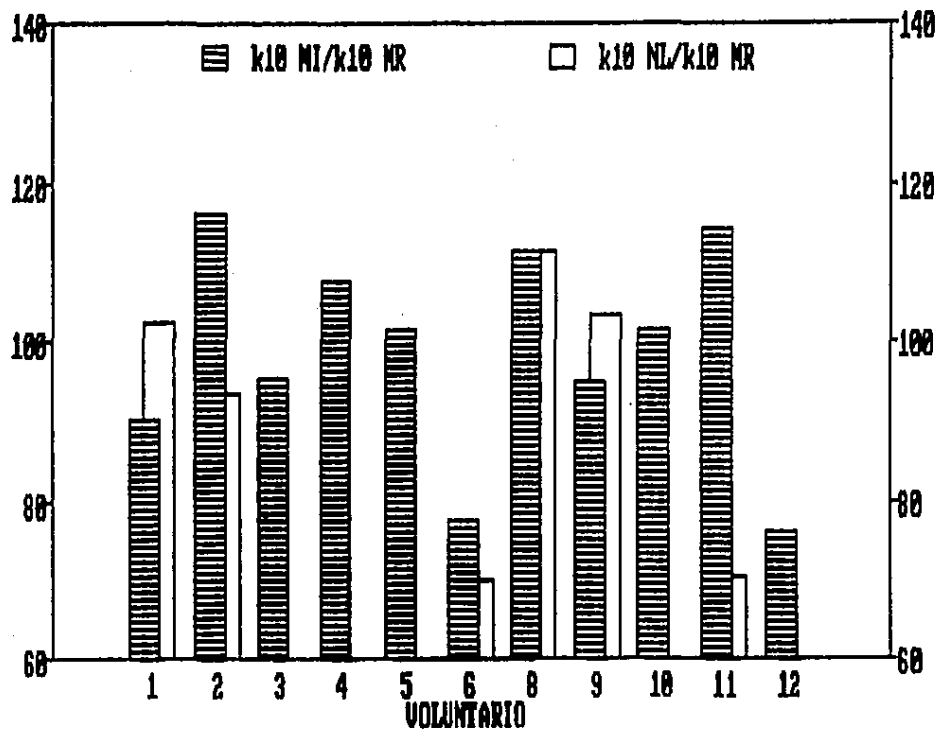


Figura 5.5. Representación gráfica de los valores normalizados de k_{10} tomando como referencia al método de los residuos para cada voluntario.

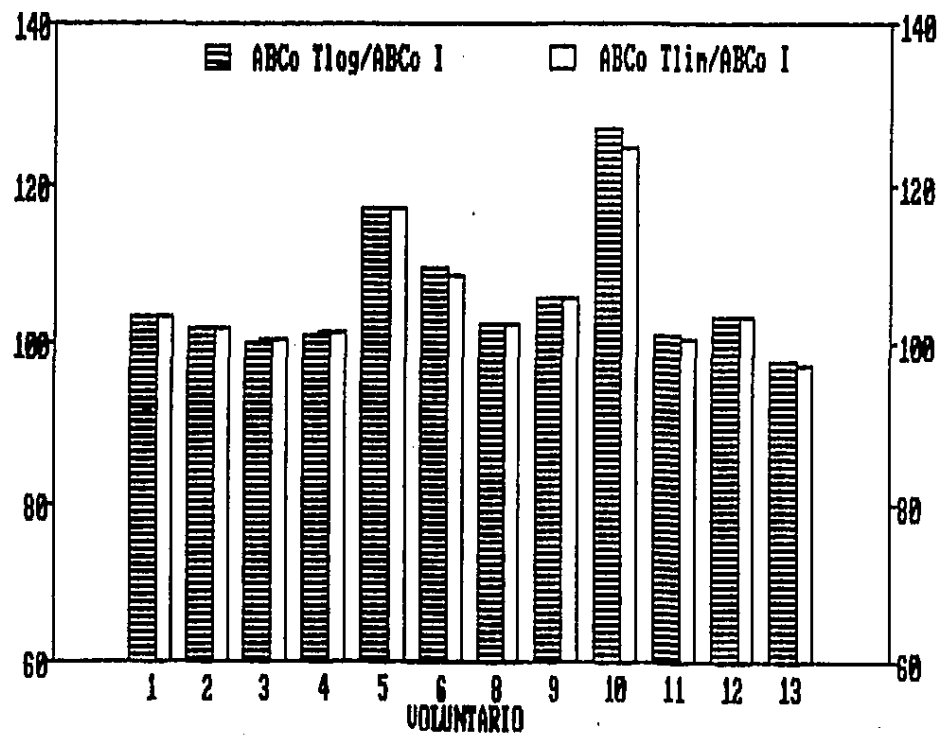


Figura 5.6. Representación gráfica de los valores normalizados de ABC_0^m tomando como referencia a la ecuación integrada para cada voluntario.

2.2. Diseño de Regímenes de Dosificación

Las concentraciones plasmáticas de diazepam calculadas con el método de superposición a partir de los regímenes de dosificación obtenidos por el método uno y el fundamentado en el TMR (2) aparecen en las tablas 4.21. a 4.24., en ellas se puede apreciar que de manera general, existe mayor fluctuación entre los niveles del fármaco utilizando el método dos que con el uno. Por otra parte, la concentración plasmática mínima durante el estado estacionario obtenida con el método dos en cada voluntario fue menor de 100 ng/ml, la cual ha sido reportada (5) como la mínima efectiva para disminuir los estados de tensión y ansiedad, provocando que potencialmente el intervalo de dosificación (calculado por el método 2) pudiera ser inefectivo en la práctica. Una prueba de Man Whitney a los valores, mostró con un 95% de confianza que existen diferencias entre los dos métodos.

En ambos procedimientos utilizados, se determinó una amplia variación en las concentraciones plasmáticas del fármaco durante el estado estacionario, este hecho concuerda a que en la práctica, se recomienda que las dosis de diazepam se individualicen de acuerdo al diagnóstico de cada paciente y a la respuesta terapéutica observada (8).

Para la voluntaria 4, en quien se esperaría un intervalo de dosificación muy prolongado, por su tiempo de vida media de eliminación alto, se obtuvo un régimen similar a los demás participantes en el estudio, esto se debe a que su volumen de distribución es muy grande y para alcanzar una concentración plasmática de 100 ng/ml se requiere una dosis continua, sin embargo, este esquema de dosificación, puede ser de alto riesgo, ya que la relación k_{21}/k_{12} para ella es muy baja y podría haber acumulación del fármaco en el compartimiento periférico durante una administración crónica. En este caso para prevenir complicaciones terapéuticas, se propondría utilizar otra benzodiazepina (como oxazepam), en la que su eliminación no se viera afectada por fallas hepáticas (118).

2.3. Diferencia entre sexos

En algunas investigaciones, realizadas por Routledge (53) en 1980 y Davis (54) en 1985, se encontró que existe diferencia significativa en el % de unión de diazepam a proteínas plasmáticas con respecto al sexo de los voluntarios estudiados, siendo mayor el fármaco libre en mujeres (sobre todo las que ingerían

anticonceptivos) que en hombres; esto se ha atribuido a ser una consecuencia del aumento en la concentración sérica de ácidos grasos esterificados que desfavorecen la unión del fármaco a albúmina. Este efecto puede tener consecuencias en la farmacocinética del compuesto.

Con el fin de conocer si existen diferencias estadísticamente significativas entre sexos en la farmacocinética de diazepam en los voluntarios participantes en el estudio, se aplicó la prueba U de Man Whitney para contrastar los parámetros farmacocinéticos calculados, los resultados mostraron con el 95% de confianza que no existen diferencias entre sexos en dichos parámetros. Asimismo, se determinó el promedio y la desviación estándar de cada uno para hombres y mujeres, los valores obtenidos aparecen en la tabla 5.4., los que muestran la gran dispersión que existe entre ellos.

2.4. Efecto de la Edad Sobre los Parámetros Farmacocinéticos de Diazepam

Existen trabajos publicados en los cuales se ha encontrado influencia de la edad de los pacientes sobre la disposición del diazepam, generalmente, en ellos se

ha estudiado un intervalo amplio de edad (20 a 90 años) (29, 31, 60). A fin de conocer si existía una relación directa entre los parámetros farmacocinéticos y la edad de los voluntarios (intervalo de edad de 61 a 92 años), se realizó un ajuste de mínimos cuadrados a estas dos variables. Los valores resultantes de interceptos, pendientes, coeficientes de correlación y F estadística calculados se presentan en la tabla 5.5., en la cual se puede notar que el valor de F calculado es menor que el que aparece en tablas, por lo que no existe una relación lineal entre la edad y los parámetros farmacocinéticos estudiados; excepto para el volumen del compartimiento central (V_1/F).

Por otra parte, con el objeto de evaluar si existe influencia de la interacción entre las características físicas de los voluntarios sobre algún parámetro de eliminación o disposición del fármaco, se realizó una regresión lineal múltiple tomando como variables independientes: la edad, superficie corporal y sexo; y como variables de respuesta: el $t_{1/2}$ de eliminación, k_{10} , β , k_{12} , k_{21} , k_{12}/k_{21} , V_dEE , V_1/F y Cl/F de diazepam.

Del análisis anterior, las variables que mejor se relacionaron fueron: edad, superficie corporal y sexo con k_{10} . La matriz de correlación lineal simple entre

estas dos variables se presenta en la tabla 5.6., en ella se puede notar por los valores de los coeficientes que estas son independientes.

Los resultados obtenidos después del análisis de regresión múltiple se muestran en la tabla 5.7., en ellos se encontró que existe una relación entre los factores anteriores ya que la F calculada es significativa a un valor de $\alpha = 0.05$ y el coeficiente de determinación (r^2) es alto, por lo que la eliminación del fármaco a partir del compartimiento central, no depende únicamente de la edad, sino de la interacción entre este factor y el sexo de los voluntarios, siendo más estrecha esta relación en los participantes de sexo femenino.

En los cálculos se suprimieron los voluntarios 4 y 13 debido a que uno presentaba falla hepática y el otro un modelo abierto de tres compartimientos.

Tabla 5.4. Valores promedio (desviación estándar) de los parámetros farmacocinéticos encontrados en los voluntarios. En los cálculos se suprimieron los parámetros de la voluntaria 4.

PARAMETRO	MUJERES	HOMBRES
α (h^{-1})	0.6116 (0.4902)	0.4611 (0.3547)
β (h^{-1})	0.0187 (0.0119)	0.0137 (0.0123)
k_a (h^{-1})	3.4597 (2.4084)	3.8243 (2.6013)
k_{10} (h^{-1})	0.0437 (0.0198)	0.0257 (0.0105)
k_{12} (h^{-1})	0.3001 (0.2145)	0.2525 (0.2469)
k_{21} (h^{-1})	0.2829 (0.2783)	0.1978 (0.1113)
C_p máx (ng/ml)	141.6477 (35.4594)	128.7174 (73.0253)
T máx (h)	1.1667 (0.4082)	1.2500 (1.6124)
$t_{\frac{1}{2}} \alpha$ (h)	1.9390 (1.3951)	2.6477 (2.0859)
$t_{\frac{1}{2}} \beta$ (h)	50.7989 (30.1773)	69.6559 (25.9141)
$t_{\frac{1}{2}} k_a$ (h)	0.2793 (0.1602)	0.2730 (0.1900)
ABC_0^{∞} (ng/ml/h)	3773.3128 (1793.708)	5018.6047 (1914.739)
TMR (h)	66.8306 (35.2199)	95.1824 (36.2869)
VdEE (l)	83.1819 (17.0790)	94.3084 (22.6572)

Tabla 5.5. Regresión lineal de los parámetros farmacocinéticos de diazepam con la edad.

PARAMETRO	N	r	M	I	F (cal)	F ($\alpha = 0.05$)
β (h^{-1})	9	-0.5456	-0.0004	0.0413	3.0131	5.1200
$T_{1/2\beta}$ (h)	9	0.4466	1.1522	-12.7567	1.7443	5.1200
α (h^{-1})	10	0.0750	0.0030	0.2376	0.0395	4.9600
$T_{1/2\alpha}$ (h)	10	-0.2989	-0.0511	6.1067	0.7851	4.9600
TMR (h)	9	0.3731	1.5354	-15.6319	1.1317	5.1200
C_p máx (ng/ml)	10	0.3623	1.3146	22.9577	1.2087	4.9600

N = número de sujetos, r = coeficiente de correlación, M = pendiente e I = intercepto.

Tabla 5.5. (continuación) Regresión lineal de los parámetros farmacocinéticos de diazepam con la edad.

PARAMETRO	N	r	M	I	F (cal)	F ($\alpha = 0.05$)
$k_{10} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	10	0.4429	0.0008	-0.0254	1.9522	4.96
$k_{12} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	10	0.3567	0.0078	-0.3063	1.1662	4.96
$k_{21} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	10	0.4969	0.0102	-0.5171	2.6235	4.96
$V_1/F \text{ (l)}$	9	-0.7076	-1.017	111.6951	7.02	5.59
k_{21}/k_{12}	10	0.3796	0.1377	-9.4062	1.3461	4.96

Tabla 5.6. Matriz de correlación obtenida en la regresión lineal.

	Superficie corporal	Sexo	k10
Edad	-0.1611	0.0421	0.5477
Superficie corporal		-0.7260	-0.0786
Sexo			0.5277

Tabla 5.7. Análisis de varianza de la regresión lineal múltiple.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F
Regresión	3	0.0053	0.0018	12.37**
Edad	1	0.0019	0.0019	12.93*
Sup. corp.	1	0.0000	0.0000	0.00
Sexo	1	0.0035	0.0035	24.17**
Residual	6	0.0009	0.0001	
Total	9	0.0062		

$r = 0.9278$ Error estándar = 0.0119

* y ** indican valores significativos a $\alpha = 0.05$ y 0.01 , respectivamente.

Coefficiente \pm Intervalo de confianza al 95%

Constante	-0.2849 \pm 0.1597
Edad	0.0017 \pm 0.0010
Sup. Corp.	0.1077 \pm 0.0726
Sexo	0.0544 \pm 0.0271

C A P I T U L O V I

CONCLUSIONES

Para la cuantificación de diazepam en plasma se evaluaron los métodos de cromatografía de gas - líquido y líquidos de alta resolución, tomando en cuenta los parámetros de linealidad, sensibilidad, repetibilidad, selectividad y concentración mínima detectable.

Ambos métodos se consideraron adecuados para ser utilizados en el estudio farmacocinético de diazepam. De acuerdo a sus características, se sugiere que el método de cromatografía de gas - líquido se utilice en estudios donde se administre en dosis única al fármaco, y el de líquidos en administraciones repetidas.

Se encontró que este fármaco en plasma es estable durante cuatro semanas a -5°C .

Asimismo, se determinó que la farmacocinética de diazepam en ancianos, se ajustó a un modelo abierto de dos compartimientos en mujeres y hombres. Al calcular

las microconstantes de transferencia intercompartamental del modelo con el método de los residuos y el incremental, los resultados mostraron que ambos son equivalentes en este caso.

Al calcular los momentos estadísticos, el algoritmo de trapezoides logarítmicos demostró ser más preciso que el de trapezoides lineales.

En los parámetros farmacocinéticos determinados, se observó una gran variación interindividual, los cuales son independientes de la edad y sexo de los voluntarios, tomando estos factores aislados, sin embargo, la interacción entre las microconstantes de velocidad del modelo, la edad y el sexo influyen sobre la disposición del diazepam.

En los tiempos de vida media del fármaco, en general se encontraron valores que están de acuerdo con los publicados en la literatura (50.8 ± 30.2 h, con respecto a 43 ± 13 h), en reportes que señalan una eliminación lenta en ancianos; por otra parte, se pudo observar que el tiempo de vida media y el volumen de distribución se ven notablemente aumentados en caso de falla hepática.

En el régimen de dosificación para cada participante, de manera general, se encontró un intervalo de dosificación muy amplio debido al $t_{1/2}$

prolongado de diazepam, por lo que se recomendaría que para disminuir dicho intervalo y obtener menores fluctuaciones en los niveles plasmáticos del fármaco en ancianos se utilice otro miembro del grupo de las benzodiazepinas con un tiempo de vida media más corto.

En los dos métodos de cálculo utilizados para determinar los regímenes de dosificación se encontraron diferencias, siendo más adecuado el método uno.

Debido a las características farmacológicas de diazepam (como el provocar dependencia y metabolitos activos) y la gran variación interindividual en los parámetros farmacocinéticos, en la práctica se debe individualizar la dosis de fármaco se acuerdo a las características de cada paciente.

A P E N D I C E 1

PRUEBA DE DISOLUCION DE TABLETAS DE DIAZEPAM

1. Material y Equipo

- Aparato de disolución automatizado Hanson Research acoplado a un espectrofotómetro Beckman modelo DU-50
- Balanza análtica Mettler modelo H-54AR
- Acido clorhídrico, R.A., J.T. Baker
- Diazepam químicamente puro obtenido de laboratorios Grossman
- Tabletass de Rontipam con 5 mg de diazepam (laboratorios Ronti S.A. lote 7-29/1 clave 3214)

2. Soluciones

Acido clorhídrico 0.1 N. Se tomaron 8.5 ml de HCl concentrado y se aforaron a 1000 ml con agua destilada.

Curva de calibración de diazepam. Se pesaron 10 mg de diazepam y se aforaron a 100 ml con HCl 0.1 N. De esta solución se tomaron alícuotas para la preparación de diluciones con las concentraciones siguientes: 8, 4, 2, 1 y 0.5 µg/ml, las cuales se leyeron en el espectrofotómetro a 242 nm.

3. Validación del Método Analítico

3.1. Linealidad

Con el fin de determinar si la relación entre la concentración de diazepam y absorbancia era lineal, se prepararon cuatro curvas de diazepam en HCl 0.1 N en el intervalo de concentración de 0.5 a 8 $\mu\text{g/ml}$.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla A1.1., en la cual se pueden observar los valores de coeficiente de correlación, pendiente e intercepto calculados; estos resultados se muestran gráficamente en la figura A1.1.

3.2. Repetibilidad

La repetibilidad del método fue establecida preparando cuatro curvas de diazepam en el medio de disolución a concentraciones de 0.5, 1, 2, 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$ en dos diferentes días; con estos resultados se calculó el % de coeficiente de variación para cada concentración, los que aparecen en la tablas A1.1. y A1.2.

4. Prueba de Disolución

La prueba de disolución de las tabletas de diazepam se realizó de acuerdo a las condiciones publicadas en la

USP XXI (117): aparato número 1, medio de disolución 900 ml de HCl 0.1 N a 37 °C y velocidad de agitación 100 rpm.

Al desarrollar la prueba se colocaron seis tabletas en el aparato de disolución y se tomaron muestras durante 45 minutos cada 5 minutos para cada tableta. Las muestras obtenidas se leyeron directamente en el espectrofotómetro y la concentración de diazepam se determinó interpolando el valor de la absorbancia en la curva de calibración del fármaco en HCl 0.1 N. Los resultados se muestran en la figura A1.2.

Tabla A1.1. Valores promedio de absorbancia obtenidos al analizar cuatro curvas de calibración de diazepam en HCl 0.1 N (día 1)

Concentración de diazepam (µg/ml)	Absorbancia (desv. est.)	Coefficiente de variación (%)
0.5	0.0850 (0.0028)	3.3276
1.0	0.1580 (0.0018)	1.1555
2.0	0.3043 (0.0033)	1.0860
4.0	0.5965 (0.0083)	1.3993
8.0	1.1765 (0.0148)	1.2580
$r = 1.0000$	$M = 0.1455$	$I = 0.0129$

Tabla A1.2. Valores promedio de absorbancia obtenidos al analizar cuatro curvas de calibración de diazepam en HCl 0.1 N (día 2).

Concentración de diazepam ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia (desv. est.)	Coefficiente de variación (%)
0.5	0.0820 (0.0014)	1.7247
1.0	0.1503 (0.0031)	2.0322
2.0	0.2830 (0.0028)	0.9994
4.0	0.5520 (0.0042)	0.7686
8.0	1.0933 (0.0095)	0.8693
$r = 1.0000$	$M = 0.1348$	$I = 0.0143$

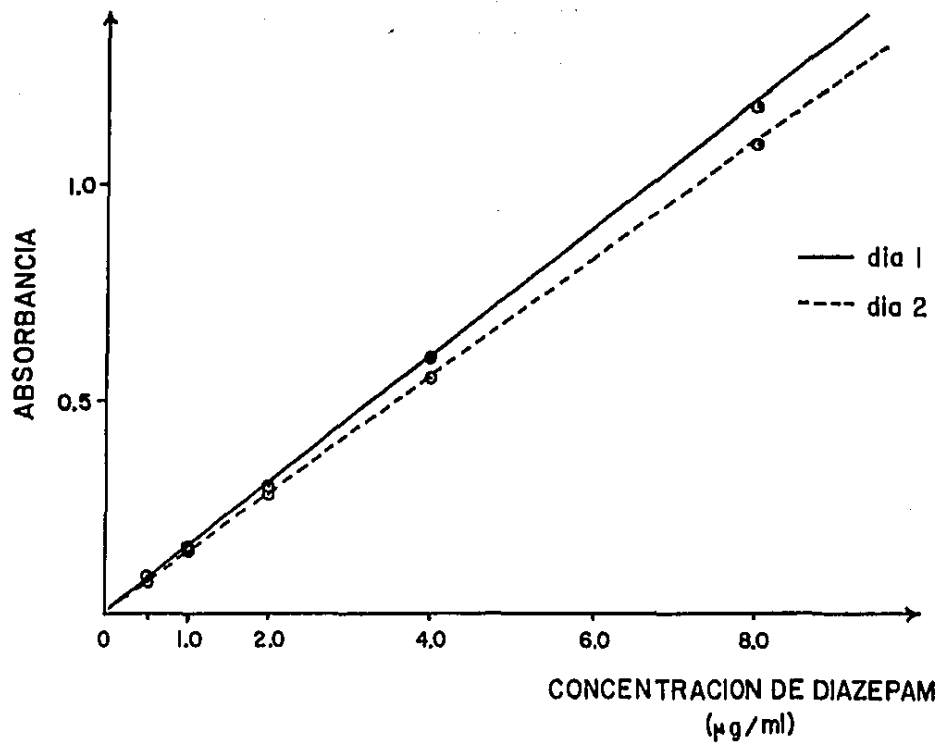


Figura A1.1. Curvas de calibración promedio de Absorbancia - Concentración de diazepam en HCl 0.1 N determinadas en dos diferentes días.

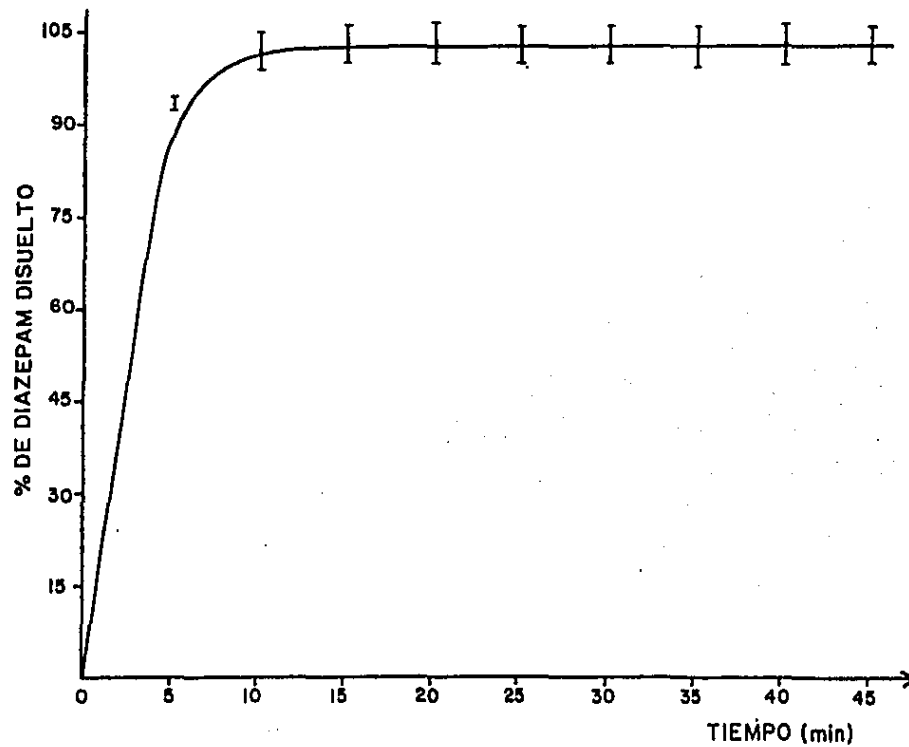


Figura A1.2. Perfil de disolución de las tabletas de diazepam utilizadas en el estudio.

A P E N D I C E 2

METODO INCREMENTAL PARA LA ESTIMACION DE MICROCONSTANTES DE VELOCIDAD PERTENECIENTES A FARMACOS QUE SIGUEN UN MODELO ABIERTO DE DOS COMPARTIMIENTOS

Este método ha sido propuesto por Gerardin y colaboradores en 1983 (112). Está basado en las ecuaciones diferenciales que describen un MADC con una farmacocinética lineal y eliminación del compartimiento central. La ecuación del balance de masa del fármaco a un tiempo t en este modelo es:

$$A = A_1 + A_2 + A_e \quad (1)$$

donde A , A_1 , A_2 y A_e son la cantidad de fármaco absorbido, las cantidades en los compartimientos 1 y 2, y la cantidad eliminada, respectivamente. $V_1 \cdot C_p$, donde V_1 es el volumen aparente del compartimiento central y la C_p la concentración del fármaco en plasma, puede ser sustituido por A_1 . Al integrar la ecuación diferencial que describe la eliminación del fármaco, $\frac{dA_e}{dt} = k_{10} \cdot A_1$, resulta:

$$A_e = \int_0^t k_{10} \cdot A_1 \cdot dt = k_{10} \cdot V_1 \int_0^t C_p \cdot dt = k_{10} \cdot V_1 \cdot ABC_0^t$$

donde ABC_0^t es el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo entre 0 y el tiempo t. Cuanto $t \rightarrow \infty$ se obtiene:

$$FD = k_{10} \cdot V_1 \cdot ABC_0^\infty$$

Sustituyendo $V_1 \cdot C_p$ y $k_{10} \cdot V_1 \cdot ABC_0^t$ y A_1 y A_e , respectivamente, en la ecuación (1) y multiplicando ambos lados de la ecuación por $\frac{100}{FD}$ se obtiene:

$$\frac{100}{FD} \cdot A = A(\%) = \frac{100}{ABC_0^\infty} \left\{ \frac{C_p}{k_{10}} + ABC_0^t \right\} + A_2(\%) \quad (2)$$

donde $A(\%)$ y $A_2(\%)$ son A y A_2 expresados como el % de la cantidad de la FD absorbida después de la administración del fármaco.

Si consideramos un intervalo pequeño de tiempo Δt , tal que t_1 sea el tiempo inicial y t_2 el final ($t_2 = t_1 + \Delta t$). La cantidad de fármaco absorbido durante el intervalo de tiempo, expresado como % de FD, es obtenido al restar los valores de $A(\%)$ dados por la ecuación (2) aplicados a los tiempos t_1 y t_2 , obteniéndose:

$$A(\%) = \frac{100}{ABC_0^\infty} \left\{ \frac{\Delta C_p}{k_{10}} + \Delta ABC \right\} + A_2(\%) \quad (3)$$

donde ΔC_p , ΔABC y $\Delta A_2(\%)$ son las variaciones de C_p , ABC y

A2(%) durante el intervalo de tiempo considerado. En el presente método, se ha supuesto, que la concentración plasmática varía linealmente en el intervalo de tiempo entre dos datos plasmáticos consecutivos.

La cinética en el compartimiento 2 esta descrita por la ecuación diferencial $\frac{dA_2}{dt} = k_{12} \cdot A_1 - k_{21} \cdot A_2$.

Substituyendo $V_1 \cdot C_p$ por A_1 y multiplicando por $\frac{100}{FD}$, se obtiene:

$$\begin{aligned} \frac{100}{FD} \cdot \frac{dA_2}{dt} &= \frac{d(100A_2/FD)}{dt} = \frac{dA_2(\%)}{dt} = \\ &= \left\{ \frac{100 \cdot k_{12}}{k_{10} \cdot ABC} \cdot C_p \right\} - \{ k_{21} \cdot A_2(\%) \} \end{aligned}$$

Al integrar la ecuación anterior en los límites t_1 y t_2 se tiene:

$$\int_{t_1}^{t_2} \frac{dA_2(\%)}{dt} \cdot dt = \Delta A_2(\%) = \frac{100 \cdot k_{12}}{k_{10} \cdot ABC} \int_{t_1}^{t_2} C_p \cdot dt - k_{21} \int_{t_1}^{t_2} A_2(\%) \cdot dt \quad (4)$$

En el método se hace la siguiente aproximación:

$$\int_{t_1}^{t_2} A_2(\%) \cdot dt \approx \left\{ A_2(\%) + \frac{A_2(\%)}{2} \right\} \Delta t \quad (5)$$

donde $A_2(\%)$ es la cantidad de fármaco en el compartimiento 2, expresado como el % de la FD al tiempo t_1 . Entonces, la ecuación (4) toma la forma:

$$\Delta A_2(\%) = \frac{100 \cdot k_{12}}{k_{10} \cdot ABC} \Delta ABC - k_{21} \left\{ A_2(\%) + \frac{\Delta A_2(\%)}{2} \right\} \Delta t$$

$$\Delta A_2(\%) = \frac{2}{2 + k_{21} \cdot \Delta t} \left\{ \frac{100 \cdot k_{12}}{k_{10} \cdot ABC} \cdot \Delta ABC - k_{21} \Delta t \cdot A_2(\%) \right\}$$

(6)

Las ecuaciones (3) y (6) son usadas para determinar A(%) contra tiempo a partir de los datos de concentración plasmática. El lado derecho de la ecuación (6) depende de los parámetros del modelo, los datos y la cantidad del fármaco en el compartimiento 2 al tiempo t₁. En esto se supone que las constantes del modelo son conocidas. A tiempo t = 0, A(%) y A₂(%) son iguales a cero, y ΔA₂(%) para el intervalo de tiempo Δt puede ser calculado por la ecuación (6). Sustituyendo este valor por ΔA₂(%) en la ecuación (3) se calcula ΔA(%). Entonces ΔA₂(%) se adiciona a A₂(%) obtenido en la ecuación (6) para el siguiente intervalo de tiempo. Este proceso se repite, permitiendo la determinación de A(%) con respecto al tiempo como valores acumulados de ΔA(%). Se puede notar que A(%) varía con el tiempo en el intervalo de valores de 0 a 100, y los de ΔA(%) pueden ser positivos o al menos cero. El final de la absorción se detecta cuando ΔA(%) es negativo. A este tiempo, A(%) debe ser igual a 100. Si A(%) es diferente de 100, significa que los valores de las constantes de velocidad no están correctas y deberán ser

modificadas hasta que $A(\%) = 100$ cuando se detecte el final de la absorción.

El algoritmo utilizado en este método se presenta en la figura A2.1.

Los datos con los que se inician los cálculos son: los valores de concentración plasmática-tiempo, t_i, c_i ($i = 1, 2, \dots, n$), las constantes de velocidad α y β (estimados iniciales) obtenidos a partir de algún método como el de los residuos y el ABC_0^∞ a partir de la regla de los trapecoides (ecuación 7).

En el método, se ha supuesto, que la concentración varía linealmente dentro del intervalo de tiempo definido por 2 puntos consecutivos. Δt es calculado como $[t_i - t_{(i-1)}]/10$. La concentración plasmática al principio de cada intervalo de tiempo Δt y el correspondiente ΔC_p son determinados por interpolación lineal.

$$ABC_0^\infty = 0.5 \sum_{i=1}^n [C_{pi} + C_{p(i-1)}][t_i - t_{(i-1)}] + \frac{C_p(n)}{\beta} \quad (7)$$

El valor inicial de k_{10} se iguala a β . Enseguida, el proceso iterativo comienza, se calcula k_{12} y k_{21} ($k_{21} = \alpha\beta/k_{10}$, $k_{12} = \alpha + \beta - k_{10} - k_{12}$) y la cinética de absorción se determina como previamente se ha descrito.

La condición de que $A(\%) = 100$ ($99.9 < A(\%) < 100.1$)

al final de la absorción, se obtiene modificando el valor de k_{10} , cada modificación se considera como una nueva determinación. Este proceso iterativo permite la determinación de los parámetros del modelo asociados con los valores de ABC, α y β utilizados para los cálculos. La cinética del fármaco en el compartimiento 1 se calcula con la ecuación:

$$A_1(\%) = \frac{2}{\Delta t \cdot k_{21}} \left\{ \Delta t [k_{21} \cdot A_2(t_1) - k_{12} \cdot A_1(t_1)] + \Delta A_2 \left[1 + \frac{\Delta t \cdot k_{12}}{2} \right] \right\}$$

La conversión del % de FD en el compartimiento 1 a concentración plasmática es obtenida sustituyendo $k_{10} \cdot V_1 \cdot ABC_0^\infty$ por FD:

$$A_1(\%) = \frac{100 \cdot A_1}{FD} = \frac{100 \cdot A_1}{k_{10} \cdot V_1 \cdot ABC_0^\infty}$$

donde $A_1/V_1 = C_p$ entonces:

$$C_p = \frac{A_1(\%)}{100} \cdot k_{10} \cdot ABC_0^\infty \quad (8)$$

El ABC_0^∞ descrita por los valores calculados de concentración plasmática, es determinada de acuerdo a la regla de los trapezoides, ecuación (7). Generalmente, este valor es diferente al utilizado en la ecuación (8).

Entonces, el proceso iterativo inicia nuevamente con este nuevo valor de ABC. Esto se repite hasta que la diferencia entre los 2 valores de ABC sean menores a 0.1%. El valor de α y β son óptimos cuando se obtiene una menor suma de cuadrados entre las concentraciones plasmáticas observadas y las calculadas a partir de las microconstantes, α , β y ABC obtenidas. Cuando esto ocurre, los parámetros relacionados a las constantes de velocidad del modelo han sido determinados.

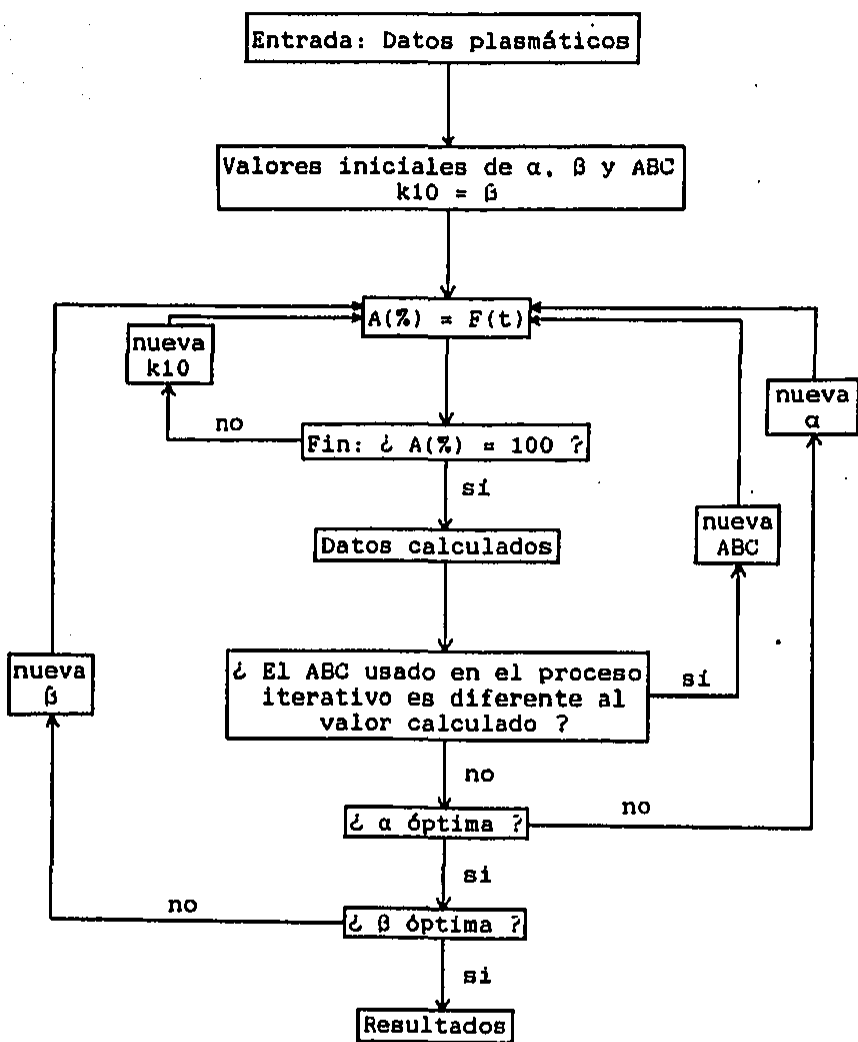


Figura A2.1. Diagrama mostrando los detalles de los cálculos del algoritmo de Gerardin.

A P E N D I C E 3

DISENO DE REGIMENES DE DOSIFICACION

Método 1 (113)

La dosis de mantenimiento (D_m) y la concentración plasmática de diazepam mínima durante el estado estacionario ($C_{p_{min}}^{EE}$) se mantienen fijos y el intervalo de dosificación (Γ) variable.

En este estudio, se tomó a la D_m de 5 mg, la $C_{p_{min}}^{EE} = 100$ ng/ml y la dosis de carga igual a la de mantenimiento.

El cálculo para determinar el Γ se realizó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\Gamma = 3.32 t_{\frac{1}{2}} \log (1 + Co/C_{p_{min}}^{EE})$$

donde:

$t_{\frac{1}{2}}$ = tiempo de vida media de eliminación

Co = concentración al tiempo cero después de la administración oral, extrapolada de la fase lineal de post-absorción

Método 2:

Wagner en 1987 (114) calculó la concentración plasmática durante el estado estacionario para un fármaco que sigue un modelo abierto de dos compartimientos con administración de primer orden y eliminación del compartimiento central con diferentes valores de k_a , k_{12} , k_{21} y k_{10} ; tomadno dos casos diferentes para el cálculo del intervalo de dosificación (Γ):

a) $\Gamma = 0.693/\beta$ y b) $\Gamma = 1.35 (1/k_a + 1/k_{10})$, donde $1/k_a$ es el tiempo medio de residencia en el sitio de absorción y $1/k_{10}$ el tiempo medio de residencia en el compartimiento central.

Para cada simulación, los parámetros de interés fueron la relación de $C_{p\text{máx}}^{\text{EE}}/C_{p\text{mín}}^{\text{EE}}$ y el % de variación de los niveles del fármaco durante el estado estacionario de acuerdo a la ecuación:

$$\frac{C_{p\text{máx}}^{\text{EE}} - \overline{C_{p\text{EE}}}}{\overline{C_{p\text{EE}}}} \times 100 = \frac{\overline{C_{p\text{EE}}} - C_{p\text{mín}}^{\text{EE}}}{\overline{C_{p\text{EE}}}} \times 100$$

donde:

$C_{p\text{máx}}^{\text{EE}}$ = concentración plasmática máxima durante el estado estacionario

$C_{p\text{mín}}^{\text{EE}}$ = concentración plasmática mínima durante el estado estacionario

\overline{CpEE} = concentración plasmática promedio durante el estado estacionario

Los resultados mostraron que cuando $\Gamma = 0.693/\beta$, el promedio de la relación $Cp_{\max}^{EE}/Cp_{\min}^{EE}$ fue 2.00, sin embargo, se encontró una amplia dispersión (C.V. = 47.9%); mientras que, cuando el $\Gamma = 1.35 (1/k_a + 1/k_{10})$ el promedio de la relación de concentraciones fue de 1.89 y menos variación entre los datos (C.V. = 18.3%). El % de variación de los niveles en el estado estacionario fue también significativamente menor que en el caso que Γ se calculó en base al tiempo medio de residencia que cuando fue igual al tiempo de vida media del fármaco; por lo que el autor recomienda el uso de este método para el cálculo de intervalos de dosificación.

A P E N D I C E 4

**PERFILES DE CONCENTRACION PLASMATICA
TIEMPO PARA CADA VOLUNTARIO**

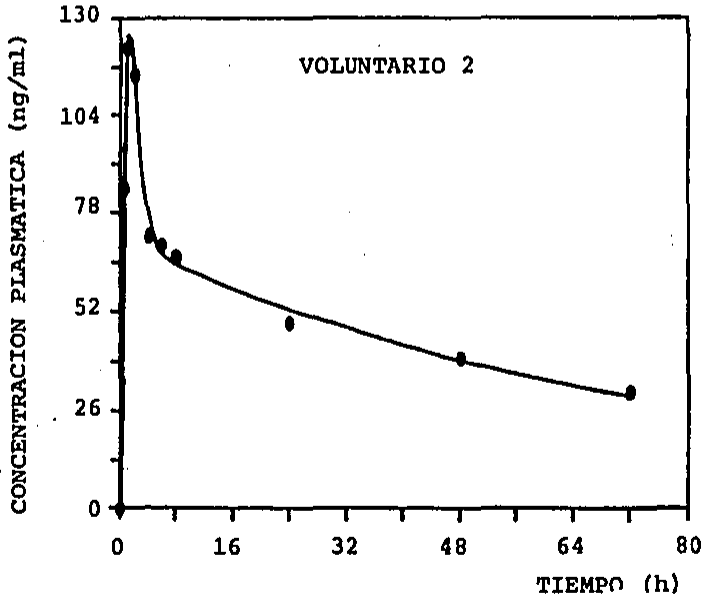
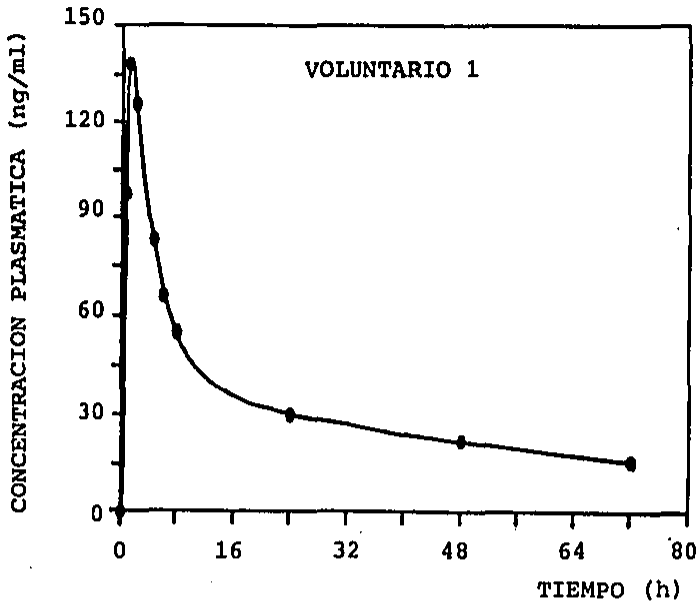
Los valores obtenidos en la cuantificación de diazepam en plasma a diferentes tiempos, así como la representación gráfica de estos resultados para cada voluntario se presentan a continuación. El trazo de los perfiles de concentración plasmática-tiempo, se realizó con el programa ENERGRAPHICS (versión 1.0)

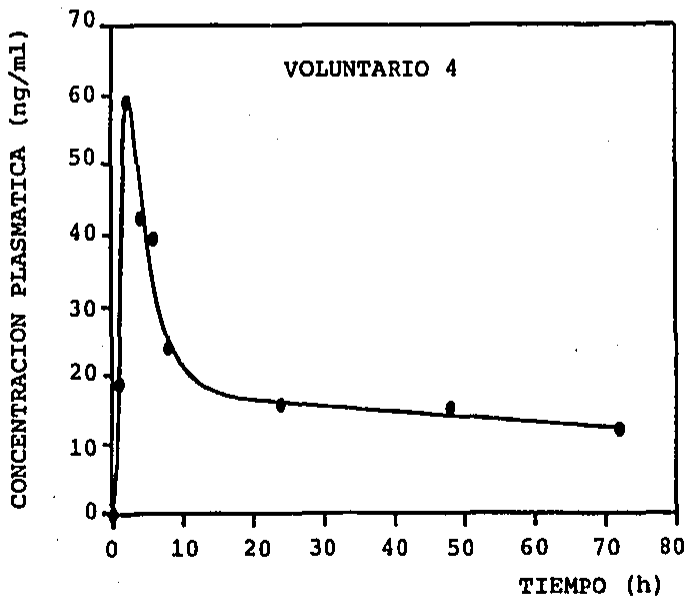
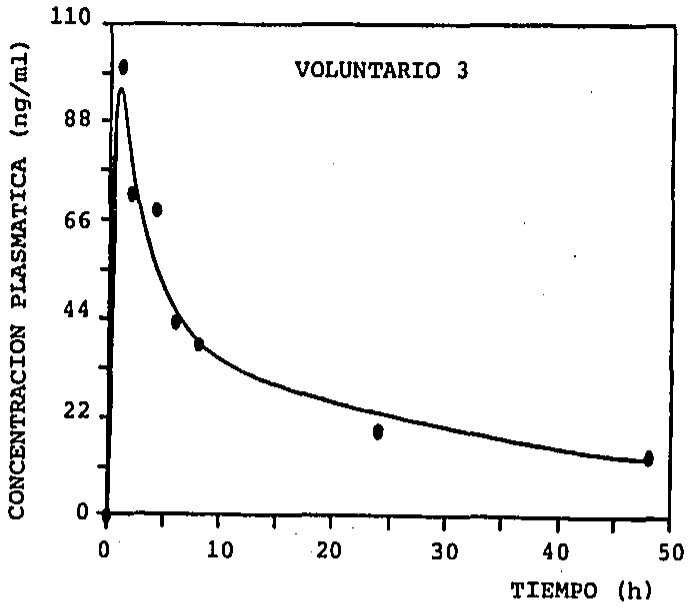
Tiempo (h)	Concentración plasmática (ng/ml)			
	1	Voluntario: 2	3	4
0.0	0	0	0	0
0.5	96.87	84.37	-	-
1.0	138.06	121.98	100.41	18.79
2.0	126.25	114.75	71.34	58.95
4.0	83.07	72.06	67.84	42.22
6.0	66.81	69.70	43.21	39.29
8.0	55.07	66.60	38.61	23.92
24.0	30.19	49.19	19.05	15.61
48.0	22.16	40.01	< 15.00	15.29
72.0	15.99	31.39	-	< 15.00

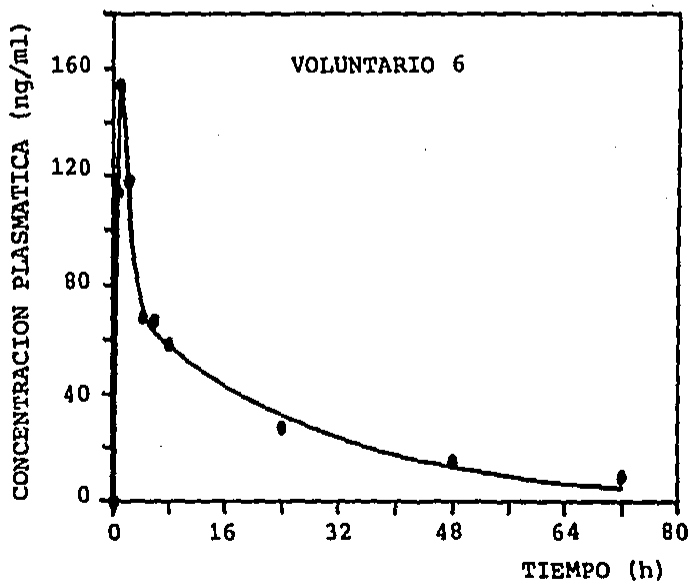
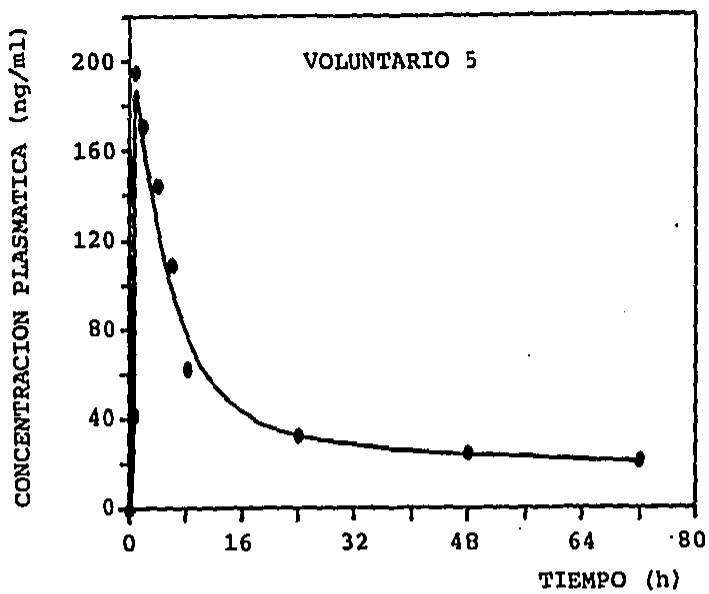
Tiempo (h)	Concentración plasmática (ng/ml)		
	Voluntario:		
	5	6	7
0.0	0	0	379.80
0.5	42.38	113.79	514.66
1.0	194.50	153.29	501.80
2.0	170.51	118.30	580.00
4.0	144.52	68.20	478.79
6.0	108.62	67.11	456.96
8.0	62.77	58.86	422.69
24.0	33.18	27.50	310.01
48.0	25.50	< 15.00	359.36
72.0	21.47	< 15.00	214.77

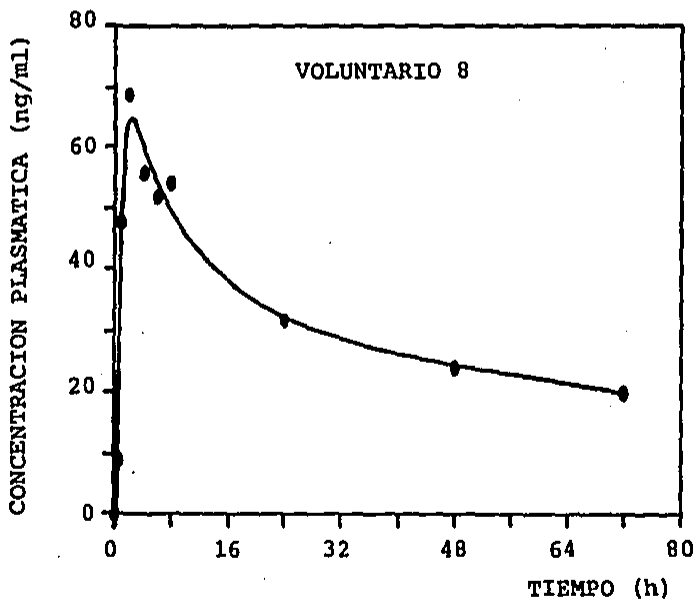
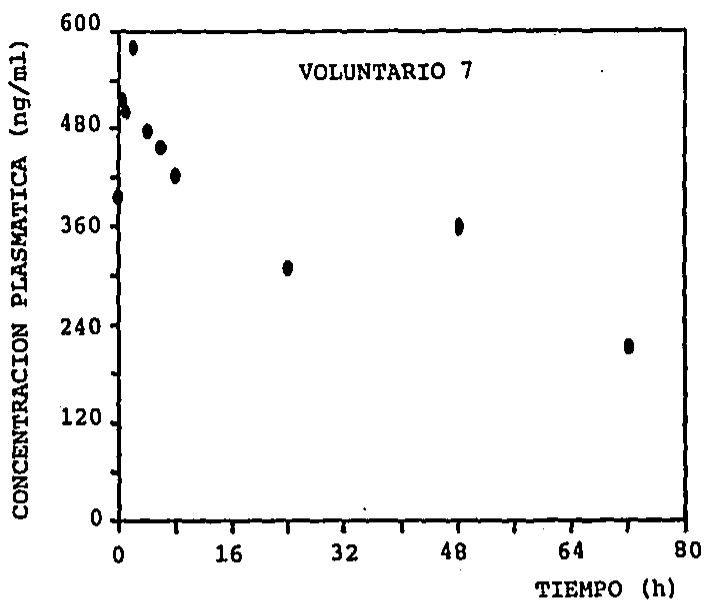
Tiempo (h)	Concentración plasmática (ng/ml)			
	Voluntario:			
	8	9	10	11
0.0	0	0	0	0
0.5	15.00	91.81	19.11	26.95
1.0	47.61	105.02	84.72	104.63
2.0	68.54	92.02	78.94	136.41
4.0	55.53	62.56	71.11	73.31
6.0	51.42	59.53	64.49	58.39
8.0	53.88	55.99	55.60	56.00
24.0	31.65	32.09	30.98	53.21
48.0	24.02	31.73	15.00	32.71
72.0	20.11	29.70	-	28.00

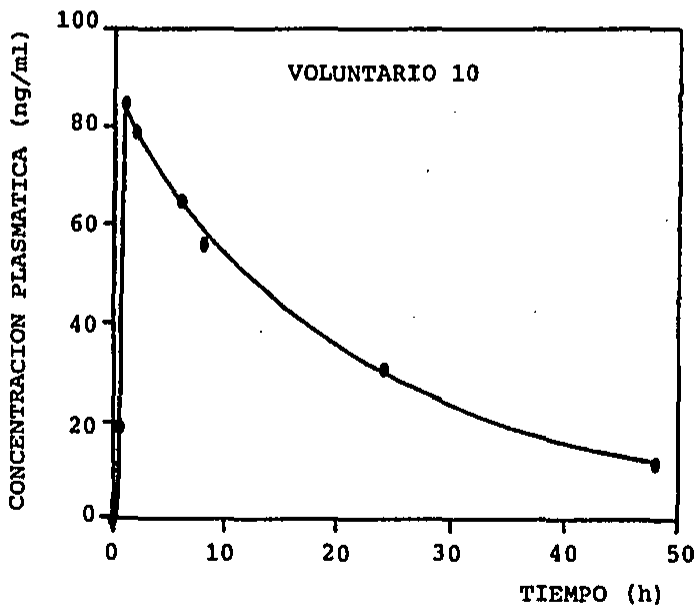
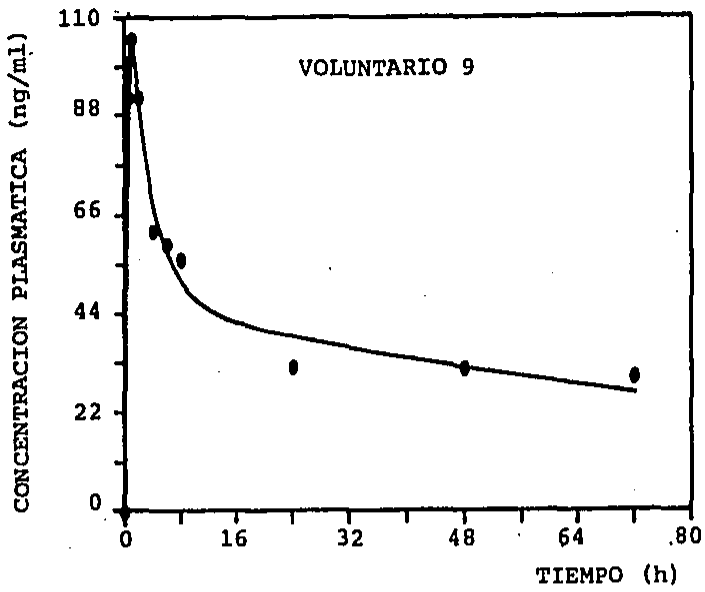
Tiempo (h)	Concentración plasmática (ng/ml)	
	Voluntario:	
	12	13
0.0	0	0
0.5	82.35	270.25
1.0	107.38	144.08
2.0	92.99	91.04
4.0	63.23	82.77
6.0	60.94	60.31
8.0	58.58	59.13
24.0	38.35	20.69
48.0	36.33	19.23
72.0	34.24	15.00

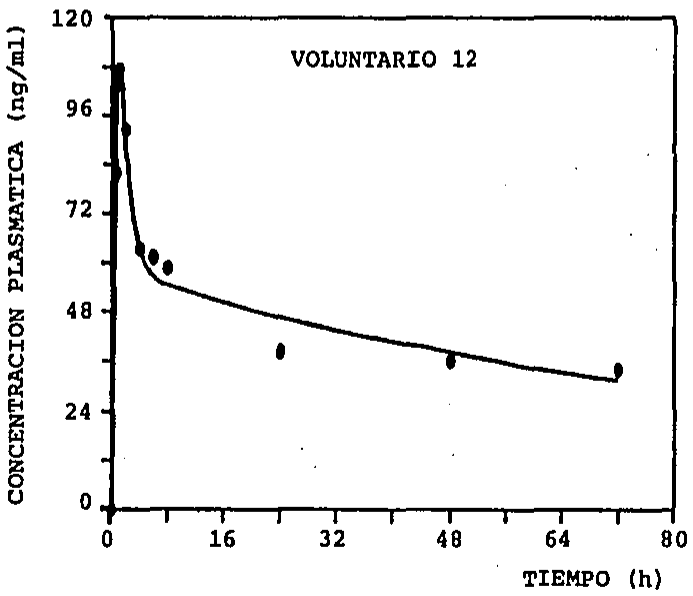
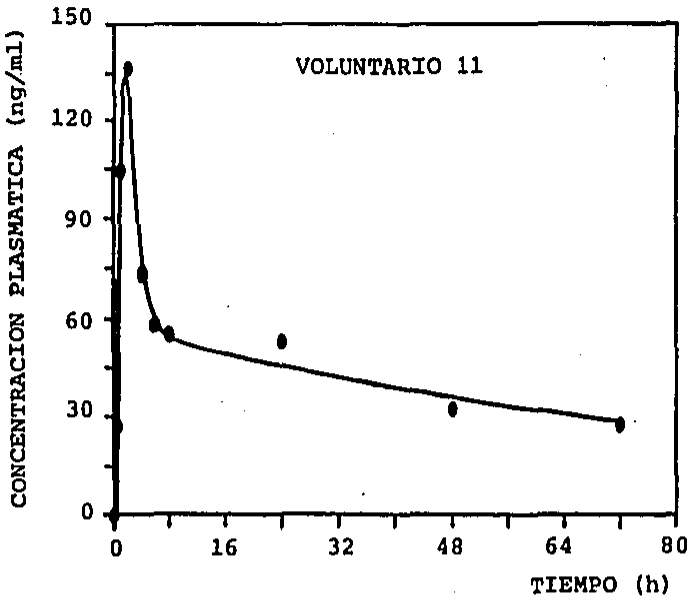


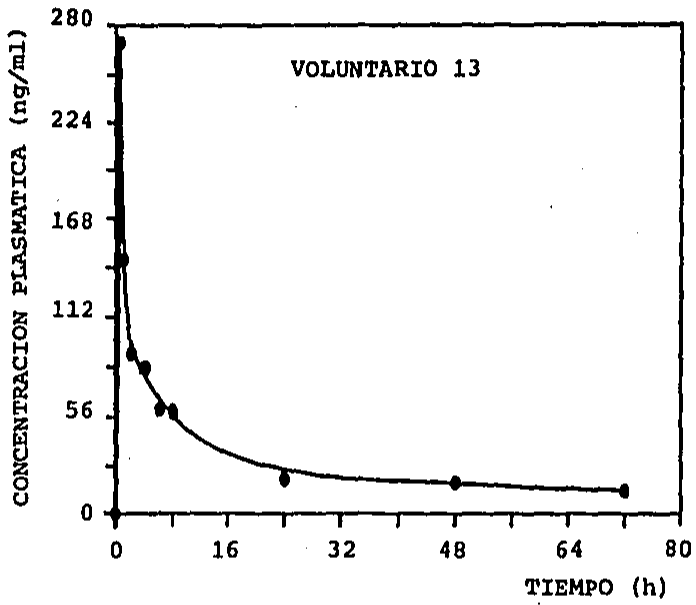












C A P I T U L O V I I

BIBLIOGRAFIA

- (1) Stenbach H. *Journal of Medicinal Chemistry* 22:1 (1979)
- (2) Tallman F.J. *Sciences* 207:274 (1984)
- (3) Goodman S. & Gilman A. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Mac Millan Publishing Company, seventh edition 1985.
- (4) Hillestad L. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 16:479 (1974)
- (5) Rowland M., Tozer N. *Clinical Pharmacokinetics*. Lea & Febiger Philadelphia, 1984
- (6) Benet Z.L. *Pharmacokinetics Basis for Drug Treatment*. Rawn Press New York, 1984
- (7) Yhoneim M. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 29:749 (1981)
- (8) Barnhart E. *Physician's Desk Reference* 41a. edition
- (9) The Martindale. *The Extra Pharmacopoeia*, The Pharmaceutical Press Edition, 27 th., 1978

- (10) Mandelli M. *Clinical Pharmacokinetics* 3:72 (1978)
- (11) Klotz U. *Journal of Clinical Investigation* 55:347 (1975)
- (12) Morselli P. *Clinical Pharmacokinetics* 5:485 (1980)
- (13) Mac Donald A. *Profiles Drug Substances* 1:80 (1972)
- (14) Seiler & Zimmerman *Arzneim-Forsch/Drug Research* 33 (II) Nr 11:1519 (1983)
- (15) Han W. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 66:573 (1977)
- (16) Rojas J.A. *Revista de la Facultad de Medicina* 32:35 (1976)
- (17) Goth A. *Farmacología Médica*. Editorial Interamericana, México, 2a. edición 1984
- (18) Fink M. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 20:185 (1976)
- (19) Rao S. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 14:182 (1973)
- (20) Lee B. *Anesthesiology* 64:460 (1986)
- (21) Lang P. *Pharmacy International* 7:46 (1986)
- (22) Haefely W. *Advances in Drug Research* 14:165 (1985)
- (23) Möhler H. *Sciences* 198:849 (1977)
- (24) Di Palma *Drill/Farmacología Médica*. Editorial Prensa Médica Mexicana, México 1978
- (25) Kellog C. *Science* 207:205 (1980)

- (26) White B.L. J.A.M.A. 230:414 (1974)
- (27) Stenchever M.A. Am. J. Obstet. Gynecol. 103:836
(1969)
- (28) Stenchever M.A. Am. J. Obstet. Gynecol. 107:456
(1970)
- (29) Safra M. Lancet 2:478 (1975)
- (30) Moreno G. Tesis Profesional. Propiedades
Biofarmacéuticas del Diazepam, Facultad de Ciencias
(1982)
- (31) Maletzky B.M. The International Journal of
Addictions 11:95 (1976)
- (32) Domino E.F. Clinical Pharmacology and Therapeutics
3:599 (1962)
- (33) Goldstein A. Farmacología. Editorial Limusa,
1a. edición en español, México 1979
- (34) Swift C. Age and Aging 13:335 (1984)
- (35) Frey Hans-Hanso European Journal of Pharmacology
104:27 (1984)
- (36) Sellman R. Acta Pharmacol. et Toxicol. 37:345
(1975)
- (37) Hillestad L. Clinical Pharmacology and
Therapeutics 16:485 (1974)
- (38) Klotz U. Clinical Pharmacology and Therapeutics
17:237 (1975)
- (39) Vorne M. Experientia 31:962 (1974)

- (40) Igari Y. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 72:826
(1984)
- (41) Jori A. *Journal Pharm. Pharmac.* 21:387 (1969)
- (42) Kaplan S. *Journal Pharmaceutical Sciences* 62:789
(1973)
- (43) Eatman F.J. *Journal of Pharmacokinetics and
Biopharmaceutics* 5:481 (1977)
- (44) Assaff R. *British Journal of Clinical Pharmacology*
1:343 (1974)
- (45) Hillestad L. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*
16:479 (1974)
- (46) Rutherford D.M. *British Journal of Clinical
Pharmacology* 6:69 (1978)
- (47) Willes R. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*
5:241 (1984)
- (48) Klotz U. *The Journal of Pharmacology and
Experimental Therapeutics* 199:67 (1978)
- (49) Ochs H. *Pharmacology* 23:24 (1981)
- (50) Schwartz M. *The Journal of Pharmacology and
Experimental Therapeutics* 149:423 (1965)
- (51) Hallston C. *British Journal of Clinical
Pharmacology* 9:333 (1980)
- (52) Bordon B. *Biochemical Pharmacology* 28:3265 (1979)
- (53) Routledge P. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*
27:282 (1980)

- (54) Davis D. *British Journal of Clinical Pharmacology* 19:261 (1985)
- (55) Yoshikawa T. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 36:201 (1984)
- (56) Swift C. *British Journal of Clinical Pharmacology* 20:111 (1985)
- (57) Rahman A. *Drug Metabolism and Disposition* 14:229 (1986)
- (58) Marruyama K. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 33:5002 (1985)
- (59) Krag-Hansen *Biochemical Journal* 225:629 (1985)
- (60) Kuhns W. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 34:220 (1983)
- (61) Tanja J. *Journal of Analytical Toxicology* 1:175 (1977)
- (62) Wallace C. *Clinical Pharmacokinetics* 12:41 (1987)
- (63) Sellman R. *Acta Pharmacol. et Toxicol.* 36:25 (1975)
- (64) Zingales I. *Journal of Chromatography* 75:55 (1973)
- (65) Abernethy D. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 29:757 (1981)
- (66) Arendt M. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 227:98 (1983)
- (67) Giles H.G. *British Journal of Clinical Pharmacology* 4:711 (1977)

- (68) Gier J. *British Journal of Clinical Pharmacology* 10:151 (1980)
- (69) Kanto J. *Int. J. Clinical Pharmacol.* 16:258 (1978)
- (70) Rowland M. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 12:129 (1984)
- (71) Ochs H. *British Journal of Clinical Pharmacology* 12:829 (1981)
- (72) Abernethy D. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 71:942 (1982)
- (73) Linnoila M. *Acta Pharmacol. et Toxicol.* 36:181 (1975)
- (74) Bertagni P. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 61:965 (1972)
- (75) Sellman R. *Acta Pharmacol. et Toxicol.* 37:242 (1975)
- (76) Brandt R. *Arzneim-Forsch/Drug Research* 26:454 (1976)
- (77) Nation L. *Clinical Pharmacokinetics* 5:340 (1980)
- (78) Burn J. *British Medical Journal* May:1216 (1978)
- (79) Wilson T. *Clinical Pharmacokinetics* 5:66 (1980)
- (80) De Silva A. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 55:66 (1980)
- (81) Brooks M. *Journal Analytical Toxicology* 1:179 (1977)

- (82) Peskasr B. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 186:167 (1973)
- (83) Wad N. *Journal of Chromatography* 128:231 (1976)
- (84) Wad N. *Journal of Chromatography* 143:214 (1977)
- (85) SunSy-Rong *Journal of Pharmaceutical Sciences* 67:1413 (1978)
- (86) De Silva A. *Analytical Chemistry* 36:2099 (1964)
- (87) Arnold E. *Acta Pharmacol. et Toxicol.* 36:335 (1975)
- (88) Linnoila M. *Acta Pharmacol. et Toxicol.* 41:458 (1977)
- (89) Rutherford D. *Journal of Chromatography* 137:439 (1977)
- (90) Fergusin L. *Journal of Analytical Toxicology* 1:174 (1977)
- (91) Kelly R. *Clinical Toxicology* 14:445 (1979)
- (92) Douse J. *Journal of Chromatography* 301:137 (1984)
- (93) Steyn M. *Journal of Chromatography* 107:196 (1975)
- (94) Mc Curdy *Journal of Analytical Toxicology* 3:195 (1979)
- (95) Bugge A. *Journal of Chromatography* 128:111 (1976)
- (96) Kabra M. *Journal of Chromatography* 150:355 (1978)
- (97) Brodie R. *Journal of Chromatography* 150:361 (1978)
- (98) Vree T.B. *Journal of Chromatography* 162:605 (1979)
- (99) Raisys V. *Journal of Chromatography* 183:441 (1980)

- (100) Cotler S. *Journal of Chromatography* 222:95
(1981)
- (101) Ritschel W. *Pharmacy International* 1:226 (1980)
- (102) Triggs E. *Journal of Pharmacokinetics and
Biopharmaceutics* 3:387 (1975)
- (103) Douglas B. *Journal of the American Geriatrics
Society* XXII:296 (1974)
- (104) Cohen J. *The American Journal of Medicine* 80 Supp
517:31 (1986)
- (105) Oulander J. *Annals of Internal Medicine* 95:711
(1981)
- (106) Morgan J. *Clinics in Rheumatic Diseases* 12:227
(1986)
- (107) Lamy P. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*
20:295 (1985)
- (108) Anderson S. *The American Journal of Medicine* 80:
435 (1986)
- (109) Freeman J. *American Geriatrics Society* XXII:289
(1974)
- (110) Yamaoka K. *Journal of Pharmacokinetics and
Biopharmaceutics* 6:165 (1978)
- (111) Boxenbaum H. *Journal of Pharmacokinetics and
Biopharmaceutics* 2:123 (1983)
- (112) Gerardin A. *Journal of Pharmacokinetics and
Biopharmaceutics* 11:401 (1983)

- (113) Schumacher G. Soucerbook of Clinical Pharmacy
2nd. edition
- (114) Wagner J. Journal of Pharmaceutical Sciences 76:35
(1987)
- (115) Gibaldi M. Pharmacokinetics Marcel Dekker, Inc.,
N.Y. 2nd. edition 1982
- (116) Vaughan D. Journal Pharmaceutical Sciences 71:793
(1982)
- (117) U.S.P. XXI & N.F. XVI, United States Pharmacopeial
Convention, Inc., Washington D.C. 1985
- (118) Mungall D. Applied Clinical Pharmacokinetics Raven
Press N.Y., 1983