



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD AL
ESTADO ESTACIONARIO DE PRODUCTOS
COMERCIALES CONTENIENDO DIAZEPAM

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN FARMACIA
(B I O F A R M A C I A)
P R E S E N T A :

Q. F. B.

ADRIANA MIRIAM DOMINGUEZ RAMIREZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1991



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 está 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
I INTRODUCCION	1
II GENERALIDADES	3
2.1. Nombre químico	
2.2. Fórmula condensada	
2.3. Fórmula desarrollada	
2.4. Peso molecular	
2.5. Propiedades fisicoquímicas	
2.6. Farmacodinamia	6
2.7. Farmacocinética	8
2.8. Concentración plasmática terapéutica	16
2.9. Efectos secundarios relacionados a concentración plasmática	17
2.10. Tolerancia	18
2.11. Dependencia	20
2.12. Usos terapéuticos	21
2.13. Biodisponibilidad del diazepam	22
2.14. Métodos analíticos para la determinación del diazepam en fluidos biológicos	31
III PARTE EXPERIMENTAL	41
3.1. Adquisición de estándares y productos empleados en el estudio	41
3.2. Control de calidad de los productos	41
3.3. Pruebas de Disolución	43
3.4. Método analítico para cuantificar diazepam en plasma	45
3.5. Validación del método analítico para la cuantificación del diazepam en plasma	49
3.6. Aplicación del método analítico en el análisis de muestras de pacientes sometidos a terapia múltiple.	51

3.7. Estudio de biodisponibilidad al estado estacionario en productos comerciales	52
---	----

IV RESULTADOS

4.1. Control de calidad de los productos	55
4.2. Validación del método espectrofotométrico empleado en la determinación del contenido de diazepam en comprimidos.	56
4.3. Pruebas de Disolución	59
4.4. Validación del método empleado en la cuantificación del diazepam en plasma	63
4.5. Estabilidad del diazepam en muestras plasmáticas	67
4.6. Aplicación del método analítico en el análisis de muestras en pacientes sometidos a terapia múltiple	67
4.7. Estudio de biodisponibilidad al estado estacionario a partir de productos comerciales en pacientes psiquiátricos.	69

V DISCUSION DE RESULTADOS

5.1. Control de calidad de los productos	76
5.2. Pruebas de Disolución	76
5.3. Validación del método empleado en la cuantificación de diazepam en plasma	87
5.4. Aplicación del método analítico en el análisis de muestras en pacientes sometidos a terapia múltiple	88
5.5. Muestras clínicas	89
5.6. Estudio de biodisponibilidad al estado estacionario a partir de productos comerciales en pacientes psiquiátricos	90
5.7. Niveles plasmáticos de diazepam encontrados en pacientes psiquiátricos con tratamiento crónico	96

VI	CONCLUSIONES	98
	APENDICES	
	A. Validación de los métodos empleados en las pruebas de disolución	101
	B. Protocolo del estudio de biodisponibilidad	106
	Carta de consentimiento	108
	C. Análisis de varianza de medidas repetidas	109
VII	BIBLIOGRAFIA	111

CAPITULO I

INTRODUCCION.

Desde el punto de vista biofarmacéutico, es deseable que los productos medicamentosos existentes en el mercado, presenten mínimas diferencias en cuanto a su biodisponibilidad dado a que es una característica determinante del inicio, duración e intensidad de la acción de un fármaco y se relaciona directamente al poder terapéutico de un medicamento.

El diazepam es un agente psicoactivo ampliamente utilizado como ansiolítico, como relajante muscular y como anticonvulsivo. De acuerdo a los criterios establecidos por la FDA (1), el diazepam es un fármaco que tiene un alto riesgo potencial para presentar problemas de biodisponibilidad. Se sabe por estudios realizados en otros países (2,3) que numerosos factores tanto de formulación como del proceso de fabricación pueden originar alteraciones en la disolución, así como en la biodisponibilidad de este fármaco a partir de las formas farmacéuticas sólidas, provocando niveles subterapéuticos o bien niveles muy elevados que pueden traducirse en fallas clínicas (4). A la fecha, la FDA ha establecido los requisitos necesarios para conducir los estudios de biodisponibilidad de comprimidos que contienen diazepam (5), donde se mencionan como estudios "in vitro", la prueba de uniformidad de contenido y la prueba de disolución bajo las condiciones USP para unidades del mismo lote que habrá de ser utilizado en el estudio "in vivo".

Considerando que una vez disuelto el diazepam se absorbe rápidamente, es posible pensar que el proceso de absorción pudiera estar limitado por la velocidad de disolución.

Dentro de los estudios realizados en otros países para comprimidos de diazepam, la biodisponibilidad del fármaco ha sido estimada tanto después de una dosis única al igual que al estado estacionario después de dosis repetidas. A pesar de que diversos productos que contienen diazepam han sido retirados del mercado en nuestro país, a la fecha existen seis laboratorios diferentes que

medicamentos que contienen diazepam, ya sea como monofármaco o bien combinado con otros fármacos. En estudios anteriores realizados con productos elaborados en México, se encontraron marcadas diferencias en la disolución de diversos productos comerciales (6, 7). En base a estos resultados, se consideró que dichos productos podrían presentar igualmente diferencias en su biodisponibilidad.

En vista de que a la fecha no se ha reportado ningún estudio de biodisponibilidad con productos comerciales nacionales, fue nuestro interés llevar a cabo un estudio de bioequivalencia con tres marcas comerciales de comprimidos de diazepam en comparación con el producto innovador Valium Roche (Suiza). El estudio se llevó a cabo en pacientes, determinando los niveles alcanzados al estado estacionario por las tres formulaciones comerciales en comparación al producto estándar. Dicho estudio permitió además, establecer las concentraciones plasmáticas alcanzadas al estado estacionario en pacientes, siguiendo el régimen comúnmente recomendado en la clínica, lo cual reviste también gran importancia, ya que en nuestro medio no existe ninguna información al respecto.

CAPITULO II
GENERALIDADES.

2.1. Nombre Químico.

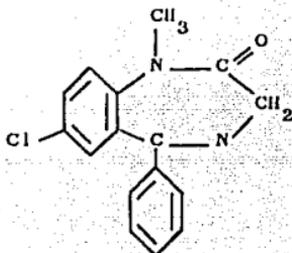
7-cloro- 1,3 dihidro- 1- metil-5 fenil- 2 H-1,4.- benzodiazepin-2
ona.

Sinónimos: diacepam, valium, atensim, tensium.

2.2. Fórmula Condensada :



2.3. Fórmula Desarrollada :



2.4. Peso Molecular :

284.75

2.5. Propiedades Fisicoquímicas :

2.5.1. Descripción :

El diazepam es un polvo cristalino, amarillento, prácticamente inodoro y de sabor amargo.

2.5.2. Punto de Fusión :

131 - 135 °C

2.5.3. Solubilidad :

El diazepam es soluble en cloroformo, etanol, dioxano y ácido clorhídrico diluido. Es insoluble en agua .

Los datos de solubilidad a temperatura ambiente se resumen en la siguiente tabla: (8).

Solvente	Solubilidad mg/ml
Agua	0.05
Eter de petróleo (30°-60°)	0.90
Propilenglicol	17.00
Eter	18.00
Isopropanol	120.00
Etanol 95 %	41.00
Acetona	125.00
Benceno	220.00
Dimetilacetamida	298.00
Cloroformo	500.00

2.5.4. Constante de disociación :

El pK_a para el diazepam ha sido determinado espectrofotométricamente, obteniéndose un valor de 3.4. (8).

2.5.5. Espectro de Absorción al U.V.

En alcohol ácido, el diazepam exhibe tres máximos de absorción, a 242 ± 2 nm ($a = 100$), 285 ± 2 nm ($a = 43.7$) y 358 ± 2 nm ($a = 14.5$). Los mínimos se observan a 221 ± 2 nm, 266 ± 2 nm y 334 ± 2 nm.

En HCl 2N los máximos de absorción se encuentran aproximadamente a 242 nm y 287 nm; en H_2SO_4 0.1 N, los máximos están en 241 nm ($E_{1\%}^{1cm} = 1402$), 284 nm ($E_{1\%}^{1cm} = 700$), y 359 nm ($E_{1\%}^{1cm} = 170$).

2.5.8. Espectro de Infrarrojo.

El espectro de infrarrojo, determinado en disco de KBr presenta los siguientes picos principales; A 1681, B 1484, y C 1313. (cm⁻¹).

2.5.7. Extracción :

El diazepam es extraído de sus soluciones acuosas alcalinas por solventes orgánicos.

2.5.8. Coeficiente de distribución :

El coeficiente de distribución del diazepam entre octanol y solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4 , 0.05M), a 25°C es de 831.

2.6. Farmacodinamia.

2.6.1. Introducción .

El diazepam pertenece al grupo farmacológico de las benzodiazepinas, fármacos de elección para una gran variedad de indicaciones clínicas, como son el tratamiento de la ansiedad, y en la inducción del sueño; también son efectivos como relajantes musculares y anticonvulsivos. Estos efectos, actualmente bien documentados, junto con su alto nivel de seguridad, los han hecho gozar de popularidad mundial. Desde que la primera benzodiazepina, el clordiazepóxido, fue introducido en la clínica, se han introducido otras 30 benzodiazepinas, las cuales han sido utilizadas por más de 500 millones de personas a nivel mundial.

2.6.2. Acción farmacológica y mecanismo de acción

El diazepam ejerce una acción calmante o sedante en pacientes con síntomas y signos de ansiedad y tensión.

Aún cuando no se han establecido los sitios de acción molecular o celular se piensa que actúa en forma relativamente específica deprimiendo el sistema límbico y disminuyendo así la reactividad emocional y las manifestaciones somáticas que acompañan a la emoción. A pesar de que el diazepam es efectivo en el tratamiento de pacientes con agitación aguda originada por la supresión de la ingestión de alcohol, deberá ser utilizado con suma precaución en el tratamiento del alcoholismo.

Los espasmos musculares asociados con desórdenes agudos del sistema musculoesquelético y algunos desórdenes neuromusculares, agudos y crónicos, pueden responder al efecto sedante del diazepam. (9), éste al igual que el resto de las benzodiazepinas, deprime los reflejos polisinápticos en mayor proporción que los monosinápticos, pero ambos son modificados.

Actúa tanto a nivel supraespinal como a nivel de médula. Existen datos que indican que las benzodiazepinas estimulan receptores de glicina en el sistema nervioso central. La glicina probablemente funciona como transmisor inhibitor en el sistema nervioso central y la capacidad de estos compuestos para imitar su acción puede contribuir a sus efectos depresores sobre la actividad motora excesiva. (10).

El diazepam, junto con el nitrazepam y clonazepam, son fármacos importantes en el control de la epilepsia. Los tres son útiles en la epilepsia mioclónica por inyección intravenosa. En 1977 se demostró la existencia de sitios de unión específicos para las benzodiazepinas en el sistema nervioso central y pronto hubo suficiente evidencia de que estos sitios de gran afinidad estereoespecífica comprendían los receptores funcionales más relevantes de este grupo.

Los descubrimientos iniciales electrofisiológicos que sugerían que estos fármacos ejercían su acción por un aumento de la transmisión GABAérgica, han sido verificados por la técnica de "unión al ligando" (11). La hipótesis actual sugiere la existencia de un complejo supramolecular de GABA y receptores de benzodiazepinas, junto con un canal proteico para iones cloruro. El diazepam actúa promoviendo la apertura del canal de iones cloruro, lo cual favorece la potenciación de la transmisión GABAérgica y consecuentemente da lugar a los efectos usuales de este fármaco.

2.7. FARMACOCINETICA.

2.7.1. Absorción :

Después de la administración oral, el diazepam es rápidamente absorbido, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas dentro de los 30 a 90 min . Con dosis de 5, 10 y 20 mg de diazepam, se han obtenido niveles plasmáticos máximos de 145 ng/ml (110-180 ng/ml), 218 ng/ml (130-300 ng/ml) y 370 ng/ml (300-500 ng/ml), respectivamente (12 - 17). La absorción es prácticamente completa, como lo indican los resultados obtenidos al comparar las áreas bajo la curva de concentraciones plasmáticas obtenidas después de la administración oral intravenosa de diazepam (18). La biodisponibilidad de comprimidos de Valium^R fue del 75% en dos voluntarios (19). El alcoholismo crónico, o la administración de morfina, fetidina, o atropina pueden alterar la absorción (20). Así mismo, los antiácidos o los alimentos pueden afectar la velocidad de absorción del diazepam (21). La ingestión de metoclopropamida (22) y posiblemente de alcohol (23,24) pueden aumentar la absorción.

2.7.2. Administración Intravenosa :

Después de la administración intravenosa de dosis de 10 y 20 mg de diazepam en voluntarios sanos, se obtienen concentraciones de 700 y 800 ng/ml y de 1100 y 1607 ng/ ml respectivamente (12,15). Haram y col.(25) estudiaron las concentraciones plasmáticas inmediatamente después de la administración intravenosa de 30 mg de diazepam durante el parto. Después de 55 segundos, se encontró una concentración de 1047 ng/ml y a los 135 segundos después de la administración, se alcanzó una concentración promedio de 991 ng/ml. Estos datos indican que en menos de 1 minuto se alcanzan concentraciones superiores a los 500 ng/ml, que es la concentración mínima requerida para el control de la crisis. En niños, con dosis de aproximadamente 0.2 mg/Kg de peso, se pueden

alcanzar concentraciones alrededor de 500 ng/ml (26, 27). En dos recién nacidos, a los 5 minutos después de la administración de 1 mg/kg ó de 0.1 mg/kg, se encontraron concentraciones entre 5 775 a 10 800 ng/ml y 2 750 a 6 450, respectivamente (28).

2.7.3. Administración Intramuscular.

En adultos, se obtienen concentraciones plasmáticas máximas entre 35 a 300 ng/ml dentro de los 30 a 90 minutos después de la administración intramuscular de 10 a 20 ng/ml de diazepam (15,20,30,31).

El uso de esta vía de administración es poco recomendable, debido a las grandes variaciones encontradas en las concentraciones plasmáticas, al igual que un retardo en la absorción. Las fuentes de variación incluyen el sitio y profundidad de inyección, el tamaño de la aguja, etc.(14). En recién nacidos y en niños hasta de 12 años, después de la administración intramuscular se obtienen resultados menos erráticos y concentraciones superiores a los 500 ng/ml dentro de los primeros 10 minutos. Dentro de los 10 a 60 minutos después de la administración de 0.24 a 1.0 mg/kg, se obtienen concentraciones plasmáticas máximas entre 208 a 1400 ng/ml (26,28,32), sin embargo, estos datos difieren de los encontrados por otros autores, estando en función del vehículo empleado , por lo cual es preferible utilizar la vía intravenosa en caso de emergencia.

2.7.4. Administración Rectal.

La administración de 0.5 mg/kg ó de 1 mg/kg de solución de diazepam en tubos rectales, produce concentraciones plasmáticas máximas de 300 a 800 ng/ml dentro de los primeros 4 a 45 minutos y de 800 a 1400 ng/ml después de 10 a 60 minutos de la administración. En infantes y niños menores a 11 años, las concentraciones de 500 ng/ml requeridas para el control de la

crisis aguda, se alcanzan entre los 2 a 8 min. (28,29,32,33,34). En contraste, los supositorios no son adecuados para el tratamiento agudo de la crisis en los niños (29,33) o en los adultos (31), debido a que se retrasa el tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima además de obtener concentraciones bajas del fármaco.

2.7.4. Distribución :

Después de que la concentración plasmática máxima ha sido alcanzada, se puede observar una caída biexponencial de las concentraciones plasmáticas obtenidas, por lo que el modelo generalmente empleado para describir la disposición del diazepam es un modelo abierto de dos compartimentos (35). La fase inicial de distribución presenta una vida media de aproximadamente 1 h. Se ha propuesto un modelo menos utilizado de tres compartimentos, con un compartimento profundo adicional (18,36). En 1983, Jack y Colburn (37) combinaron este modelo con el de dos compartimentos para el metabolito de diazepam, el N-desmetil-diazepam, estableciendo un modelo de 5 compartimentos para describir la farmacocinética global del fármaco.

Como resultado de su bajo pK_a y su carácter lipofílico, el diazepam se distribuye rápidamente a los tejidos y cruza la barrera hematoencefálica. Después de una hora de la administración intraperitoneal de 0.6 mg/kg en ratas, el diazepam se localiza en hígado, riñones, corazón, pulmones, y tejidos muscular, peri-renal y adiposo en concentraciones mayores a las plasmáticas (38). En el hombre, después de 30 a 60 minutos de la administración intravenosa, el diazepam se acumula en el tejido adiposo (38) lo cual debe ser un factor importante a considerar el diseño del régimen de dosificación en pacientes obesos.

Basándose en su efecto antiepiléptico sumamente rápido, el cual es observado incluso después de segundos de la administración intravenosa, se puede asumir una penetración muy rápida del diazepam al cerebro humano.

Tanto el diazepam como el N-desmetildiazepam se encuentran fuertemente unidos a las proteínas plasmáticas, principalmente la albúmina (96.0 a 97.0% en voluntarios sanos) (39,40).

La constante de asociación aparente K_{app} es de $1.3 \times 10^{-4} M^{-1}$ en suero normal (41).

El alto grado de unión es el responsable de que el diazepam se distribuya en muy baja proporción dentro de los eritrocitos, resultando en una relación sangre/plasma de 0.58 ± 0.15 (19). Las concentraciones en saliva y líquido cefalorraquídeo son muy bajas (2 a 3.5 %), dado a que representan la fracción libre (42-44), la cual es independiente de la concentración plasmática total (45).

En enfermedades hepáticas ó en uremia la unión se ve afectada, resultando en una K_{app} menor de 0.9 ó $0.2 \times 10^{-4} M^{-1}$ respectivamente. (41,48).

Con respecto a la influencia de la edad y del sexo sobre el porcentaje de fármaco unido a proteínas plasmáticas, los resultados contradictorios, sin embargo se ha establecido que el cociente de fármaco unido/ fármaco libre es inversamente proporcional al logaritmo de los ácidos grasos no esterificados presentes en el plasma y directamente proporcional a la concentración de albúmina plasmática (47).

Después de la administración oral de la misma dosis de diazepam, se ha encontrado una gran variación interindividual en las concentraciones plasmáticas del fármaco, la cual ha sido atribuida a las grandes diferencias que existen en el volumen de distribución del mismo (48).

En voluntarios sanos de 25 a 43 años, los valores del volumen de distribución del compartimento central se encuentran entre 1.6 a 3.2 l/kg.

La edad, el sexo y algunas enfermedades hepáticas pueden afectar el volumen de distribución del diazepam, alcanzando valores mayores en mujeres y ancianos. (38). Las diferencias encontradas por Greenblatt y col. (49) en las concentraciones plasmáticas y en el volumen de distribución , debidas al sexo , no pudieron ser corroboradas por Swift y col. (50). En cirrosis hepática y hepatitis, el volumen de distribución presenta un valor más elevado, debido a una disminución en la unión a proteínas plasmáticas. La ingestión simultánea de etanol puede disminuir el volumen de distribución. (51).

Después de la administración de alimento, puede aparecer un segundo pico, más pequeño, en la concentración plasmática. El mecanismo de la redistribución no ha sido aclarado. Se ha sugerido un cambio en la unión a proteínas plasmáticas e incluso a una recirculación enterohepática, pero a la fecha no se ha podido establecer adecuadamente (52).

2.7.5. Eliminación.

La vía principal de eliminación del diazepam es la biotransformación.

Los principales pasos de biotransformación del diazepam son la N-desmetilación en N-1, para dar lugar al N-desmetil-diazepam, que es metabolizado posteriormente por oxidación en la posición C-3 a oxazepam, y la oxidación directa de diazepam en el C-3 a N-metiloxazepam, antes de la desmetilación (Fig I). Los compuestos oxhidrilados son excretados como glucurónidos, mientras que el N-desmetildiazepam es excretado en forma conjugada y sin conjugar.

El glucurónido de oxazepam es el principal metabolito encontrado en orina del hombre. Los microsomas hepáticos son el sitio principal de biotransformación. El N-desmetildiazepam representa un metabolito muy importante ya que posee actividad antiepileptica, sedante, hipnótica, y ansiolítica (53,54).

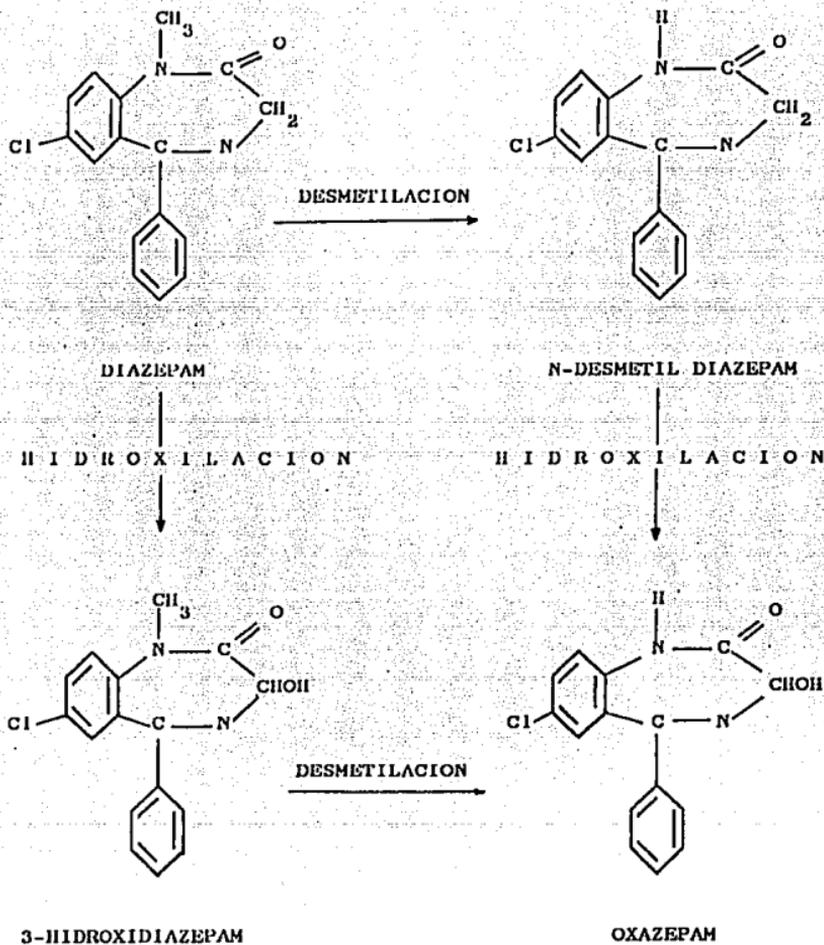


Fig. 1 Principales rutas metabólicas de diazepam en el hombre.

Se ha demostrado que los tres metabolitos, N - desmetildiazepam, metiloxazepam y el oxazepam, ejercen una actividad farmacológica sobre el sistema nervioso central similar a la del compuesto original. A partir de la evaluación comparativa del efecto de los tres fármacos, el N-desmetil - diazepam presentó la mayor actividad, a excepción de la actividad relajante.

El oxazepam también presenta propiedades antiepilépticas importantes en el hombre, sin embargo, debido a sus concentraciones tan bajas en plasma, tanto el oxazepam como el N-metiloxazepam no contribuyen significativamente al efecto antiepiléptico durante el tratamiento con diazepam. La biotransformación del diazepam es dependiente de la edad.

La vida media aparente de eliminación en voluntarios sanos es de aproximadamente 1 a 2 días, la cual puede prolongarse a más de 100 hs en ancianos y en pacientes con enfermedades hepáticas. En pacientes tratados crónicamente con fármacos antiepilépticos que son inductores enzimáticos, la vida media de eliminación es aproximadamente un 30% más corta, correspondiendo a una velocidad de depuración metabólica más elevada. La vida media de eliminación es independiente de la dosis, no existiendo evidencia de una cinética de orden cero (55).

Cuando se comparó la administración de una dosis única contra una dosificación repetida en humanos, se encontró una vida media similar e incluso más larga, lo cual indica que el diazepam no induce su propio metabolismo como se había sugerido anteriormente (18,55).

Durante la administración crónica de diazepam a voluntarios sanos ó a pacientes (15- 20 mg diarios), los niveles promedio en el estado estacionario se encuentran entre 200 a 1000 ng/ml para el diazepam y 120 a 1070 ng/ml de N-desmetildiazepam en un lapso de 1 a 2 semanas (18,40,53,56). En pacientes con epilepsia, tratados con otros fármacos antiepilépticos se encontraron concentraciones entre 100 a 500 ng/ml.

La velocidad de eliminación es dependiente de la edad. Los recién nacidos prematuros presentan una vida de eliminación más larga que los nacidos en término. En contraste, los niños presentan una vida de eliminación más corta, que probablemente se deba a una depuración aumentada. Los ancianos muestran una vida media de eliminación más prolongada, principalmente por un cambio en el volumen de distribución. Los padecimientos hepáticos pueden disminuir la depuración y aumentar el volumen de distribución, con lo cual puede haber un aumento de 2 ó hasta 5 veces de la vida media de eliminación (57) mientras que la ingestión de alcohol en ausencia de daño hepático importante, puede acelerar la eliminación del diazepam (58).

En el hombre, aproximadamente entre el 62 al 73% de la dosis administrada de diazepam es excretada en orina y un 10 % en las heces (36). Los principales metabolitos encontrados en la orina son el glucurónido de oxazepam y el de N- desmetildiazepam, mientras que los metabolitos conjugados de N- metiloxazepam y el N- desmetildiazepam son de menor importancia.

En 1973 Kaplan observó que después de una administración I.V., el N-desmetildiazepam es excretado en cantidades mayores a las obtenidas después de una administración por vía oral, sugiriendo un efecto de primer paso, que concuerda con lo reportado por Klotz (59) quien indica una biodisponibilidad del 75%.

2.8. CONCENTRACION PLASMATICA TERAPEUTICA.

Dasberg encontró que se requiere una concentración plasmática al estado estacionario de 400 ng/ml para lograr el efecto ansiolítico del fármaco (53), sin embargo en otros pacientes se han observado efectos adecuados a concentraciones de 270 ng/ml. La relación entre las concentraciones plasmáticas de diazepam y el control de las crisis epilépticas se basa en estudios prospectivos, en los cuales la concentración plasmática del fármaco se monitorea antes y durante el control de la crisis. sin embargo, existe muy poca información al respecto.

En un estudio se encontró que después de la administración intravenosa de 0.14 a 0.34 mg/kg de diazepam a tres niños de 4, 5, y 15 años, el control inicial de las crisis focales se obtiene al alcanzar concentraciones plasmáticas de diazepam entre 300 y 700 ng/ml., y el control de las crisis se puede mantener con concentraciones plasmáticas entre 130 a 180 ng/ml.(80). En un segundo estudio, después de la administración rectal de 0.12-0.45 mg/kg) a los 10 minutos después de la administración, se logró el control de la crisis con concentraciones plasmáticas de 183-1135 ng/ml (28). Otros dos niños requirieron concentraciones de 250 y 330 ng/ml respectivamente para el control de la crisis. Las diferencias tan marcadas en las concentraciones terapéuticas entre pacientes puede ser el resultado del tipo de severidad de la epilepsia, lo cual sugiere que las epilepsias focales primarias generalizadas probablemente requieren diferentes concentraciones para el tratamiento tanto agudo como crónico.

La ineficacia relativa durante el tratamiento oral del diazepam puede reflejar además el desarrollo de tolerancia durante los primeros meses de tratamiento ó bien a la existencia de concentraciones subterapéuticas . Esto sugiere que el monitoreo terapéutico del diazepam puede ser de gran utilidad cuando no se obtiene el efecto deseado o cuando existen efectos secundarios.

Las concentraciones plasmáticas tóxicas se encuentran sobre los 1000ng/ml de diazepam y 2000 ng/ml de N- desmetildiazepam, aunque no se cuenta con información definitiva (81).

2.9. EFECTOS SECUNDARIOS RELACIONADOS A CONCENTRACION PLASMÁTICA.

La sedación es el efecto secundario más destacado del diazepam durante la medicación oral crónica; también son frecuentes la ataxia y la falta de coordinación. Estos efectos ocurren en su mayor parte al inicio del tratamiento en un 40 a 50 % de los pacientes y desaparecen con reducción de la dosis .

Existe una buena correlación entre la concentración plasmática del diazepam después de una dosis única de diazepam y los efectos sedantes. Niveles de 200 ng/ml producen cansancio y sueño ligero. La mayoría se duerme profundamente a los 15 minutos después de la administración intravenosa, cuando los niveles alcanzan valores de 1200 ng/ml. En algunos casos, la deficiencia de la capacidad aritmética, visión borrosa y amnesia persisten durante las primeras 2 horas, hasta que las concentraciones alcanzan valores inferiores a 450ng/ml (17).

De acuerdo a Morselli, la aparición de efectos secundarios tales como somnolencia marcada, mareos, vértigo, ataxia y disturbio en el comportamiento general, se asocia a concentraciones mayores a 900-1000 ng/ml (82). Otros efectos inconvenientes incluyen disartria, vahídos, falta de atención e hipotonía. De cuando en cuando hay excitación. Los efectos sobre la conducta son variados, pero han incluido crisis psicóticas agudas. Puede presentarse aumento de apetito con ganancia de peso, ó anorexia con pérdida de peso.

En niños es común la irritabilidad, falta de atención, sedación e hipotonía (28) y puede estar relacionada a la acumulación del N-desmetildiazepam (33). En niños puede ser molesto el aumento de las secreciones salival y bronquial.

Los efectos secundarios más severos, aunque poco frecuentes son: apnea, hipotensión, paro cardíaco. Sin embargo, la administración intravenosa lenta no produce hipotensión ni hipoventilación de importancia clínica.

Algunos factores de riesgo incluyen el tratamiento con otros fármacos tales como sedantes, barbitúricos, lidocaina, epinefrina, metacualona, clordiacepóxido y amobarbital. Otros factores como la edad y enfermedades hepáticas, aumentan la sensibilidad al disminuir la eliminación del fármaco.

Dosis masivas de diazepam pueden originar paro cardíaco, hipotensión, apnea y coma, sin embargo algunos pacientes intoxicados que presentaron concentraciones de 20000 ng/ml de diazepam y 5000 ng/ml de N-desmetildiazepam han logrado sobrevivir. La recuperación después de una sobredosis ha sido atribuida a una tolerancia al efecto depresor del fármaco (83).

2.10. Tolerancia.

El término "tolerancia", se refiere convencionalmente al efecto disminuido de una dosis dada de un fármaco después de su administración repetida. Existen 2 tipos de tolerancia : tolerancia de " disposición " ó "farmacocinética", y tolerancia " farmacodinámica " ó "tolerancia del sitio del receptor ". La primera se refiere a la modificación de las propiedades farmacocinéticas del fármaco después de la exposición prolongada al mismo; la segunda se refiere a la adaptación en el sentido de que la concentración en el sitio del receptor de un fármaco dado, puede dar lugar a diferentes efectos dependiendo del tiempo de exposición a éste. La tolerancia cruzada es aquella en la cual la exposición a un fármaco da lugar a tolerancia no sólo a dicho fármaco, sino a otros fármacos pertenecientes al mismo grupo químico ó bien a otros fármacos diferentes (84).

La tolerancia a los efectos sedantes de las benzodiazepinas en animales ha sido demostrada en numerosos estudios, sugiriendo que después del tratamiento de 10 días con dosis moderadas se presenta desarrollo de tolerancia al efecto ansiolítico (65). Diversos estudios han demostrado el desarrollo de tolerancia y tolerancia cruzada a los efectos sedantes del diazepam, aún después de un tratamiento de sólo una semana a las dosis comúnmente empleadas. Existe información respecto al desarrollo de cierto grado de tolerancia en el humano a los efectos sedantes del diazepam, en el caso de administración múltiple ó en intoxicación (66). Se ha demostrado que después de 4 días de la administración intravenosa de diazepam, persiste cierta tolerancia al fármaco (66). Por otro lado, se ha demostrado que pacientes que utilizaron diazepam, por lo menos un año antes del tratamiento, requirieron dosis más elevadas para lograr el efecto adecuado durante la premedicación para endoscopia (67,68).

Se ha demostrado el desarrollo de tolerancia y de tolerancia cruzada a los efectos psicomotores del diazepam y otras benzodiazepinas, después del tratamiento subagudo (65).

Algunos autores han propuesto que los metabolitos del diazepam, principalmente el nordiazepam (N- desmetildiazepam), pueden estar involucrados en el desarrollo de tolerancia al diazepam bajo dosificación múltiple, modificando sus efectos (69).

El tratamiento previo con nordiazepam (N- desmetildiazepam) no disminuye significativamente los efectos psicomotores del diazepam, indicando que dicho metabolito no interviene significativamente en el desarrollo de la tolerancia del compuesto original. Adicionalmente se ha demostrado un aumento significativo de las concentraciones plasmáticas, independientemente del pretratamiento con diazepam u otras benzodiazepinas, lo cual indica que la tolerancia en este caso es de naturaleza farmacodinámica y no farmacocinética (66).

Diversos informes clínicos sugieren que el diazepam puede perder parte de su efecto antiepiléptico, después de un tratamiento de

4- 6 meses. en aproximadamente el 40 % de todos los casos , sin embargo , es posible la existencia de un cambio en la severidad del padecimiento independientemente del fármaco. Aún se desconoce el mecanismo que involucra el desarrollo de la tolerancia a benzodiazepinas. Existen estudios realizados en animales , en los cuales no se ha podido demostrar cambio alguno en el número ó en la afinidad de los receptores, mientras que otros autores han reportado una disminución en el número de receptores, después del tratamiento crónico (70); sin embargo, estudios más recientes apoyan una disminución en la sensibilidad GABA-postsináptica, más que una disminución en la densidad del receptor (71).

2.11. Dependencia .

Existen pocos datos reportados de dependencia a las benzodiazepinas durante las primeras décadas de su uso , sin embargo en 1961 Hollister (72) demostró la presencia de síntomas de abstinencia después de la suspensión drástica de altas dosis de benzodiazepinas. Estudios más recientes han demostrado que aún el tratamiento de 3 a 4 semanas con dosis terapéuticas de estos fármacos, pueden dar lugar a dependencia, manifestándose generalmente por síntomas de abstinencia (73). En adultos se han informado síntomas de agitación, ansiedad, temblor alucinación y crisis tónico-clónicas generalizadas en algunos casos particulares al suspender el tratamiento con diazepam.

Hasta la fecha no se conoce el desarrollo de dependencia en pacientes con epilepsia tratados crónicamente con diazepam. En recién nacidos expuestos intrauterinamente al fármaco, puede presentarse el síndrome de abstinencia neonatal después del nacimiento, caracterizado por temblor, irritabilidad, hipertonicidad, y aumento lento de peso.

2.12. USOS TERAPEUTICOS.

El diazepam es el fármaco de elección para el tratamiento del "status epilepticus", o de las crisis epilépticas recurrentes, independientemente de la etiología ó del tipo de crisis. Actualmente se encuentra bajo estudio el uso de tubos rectales de diazepam en episodios febriles para evitar las convulsiones, los cuales han sido propuestos como alternativa al tratamiento con fenobarbital.

Para el tratamiento de emergencia se prefiere la administración intravenosa. Con administración lenta se logra detener el 70 a 80 % de las crisis, siendo poco frecuentes los efectos secundarios. En muy raras ocasiones se ha presentado apnea ó hipotensión, pero es conveniente tenerlo en cuenta sobre todo cuando existen factores de riesgo presentes (edad avanzada, corazón alterado, enfermedades pulmonares ó hepáticas, tratamiento con sedantes ó bolo intravenosos rápido).

El diazepam se utiliza en adultos en dosis de 10 a 20 mg diarios, para el tratamiento de problemas psiquiátricos del paciente epiléptico i.e. ansiedad, tensión, episodios psicóticos con insomnio, etc.

2.13. BIODISPONIBILIDAD DE DIAZEPAM.

De acuerdo a los criterios establecidos por la Administración de Fármacos y Medicamentos (1), el diazepam es un fármaco que tiene alto riesgo potencial para presentar problemas de biodisponibilidad dada su baja solubilidad en agua (0.05 mg/ml), así como la relación tan elevada de excipientes a fármaco con que se le presenta en comprimidos (>5:1).

El diazepam presenta un pKa de 3.4; las características de transferencia del diazepam a través de la membrana invertida de intestino de rata, son consistentes con una buena absorción (18). Esto sugiere que una vez en solución, la permeabilidad (absorción) del diazepam a través de la mucosa gastrointestinal no es un factor limitante para la administración oral del diazepam. Se ha demostrado que diferencias en la disolución del fármaco pueden originar igualmente diferencias en su biodisponibilidad.

Numerosos estudios previos han señalado diferencias en la disolución del diazepam a partir de diversas marcas comerciales de comprimidos (74,75,76). El efecto de algunos excipientes que son comúnmente utilizados en la elaboración de comprimidos, sobre la velocidad de disolución y la biodisponibilidad de este fármaco también ha sido estudiado con anterioridad (77,78,79).

En 1974 se realizó un estudio de biodisponibilidad en dosis única en 16 voluntarios sanos (6 mujeres y 10 hombres), para dos formulaciones de comprimidos y dos de supositorios (Stesolid y una formulación experimental "Diazepam II") (80).

Adicionalmente se determinó su velocidad de disolución del diazepam empleando agua como medio y canastillas a 50 rpm . Los resultados demostraron que existen diferencias tanto entre tabletas como entre los supositorios en el T_{50} (aproximadamente 5 min para Stesolid tabletas y supositorios de referencia y mayor a 50 minutos para las preparaciones experimentales). Sin embargo en

los estudios in vivo se encontró equivalencia entre los 2 preparaciones de tableta, mientras el caso de los supositorios se observaron diferencias significativas en el t_{max} , lo cual indica que no existe una correlación directa entre los resultados obtenidos "in vitro" por estos autores y los estudios "in vivo".

En 1982, Ogata et al. (3) realizaron estudios de disolución de 15 preparaciones comerciales de diazepam (comprimidos de 5 mg), utilizando 8 métodos diferentes (vaso, canastillas rotatorias, canastilla oscilante, un simulador de solubilidad, frasco rotatorio y canastilla única). La disolución del diazepam a pH de 1.2 en todos los productos fue muy rápida; el t_{50} (tiempo en que se disuelve el 50% del fármaco) fue inferior a los 5 minutos en todos los casos, pero a pH de 4.6, los valores de T_{50} utilizando el método de canastillas estuvieron comprendidos entre los 3 a 120 minutos, con lo que se demostró que algunas de las preparaciones de diazepam muestran una disolución pH dependiente. Cuatro de los productos empleados en el estudio de disolución fueron utilizados en un estudio de biodisponibilidad (dosis única) en humanos, en el cual se demostraron diferencias estadísticamente significativas en la velocidad de absorción (C_{max} y $C_{1,2}$ y $3h$), pero no en la cantidad total absorbida (ABC). La concentración plasmática promedio y la concentración a una hora presentaron una buena correlación con el T_{50} y T_{70} determinados por el método del frasco rotatorio a pH 4.6. En contraste, la velocidad de disolución a pH 1.2 no presentó correlación con los parámetros in vivo.

Posteriormente se pudo demostrar que la acidez del jugo gástrico afecta la biodisponibilidad de dicho fármaco, dado que su disolución es pH dependiente y especialmente baja a pH entre 3 a 7, con lo cual se sugiere que para estudios de biodisponibilidad sería conveniente medir la acidez del fluido gástrico de sujetos tratados con diazepam, a fin de explicar las posibles diferencias en los niveles plasmáticos del fármaco. Este factor es importante

a considerar también en la administración conjunta de algunos antiácidos, ya que se sabe que éstos pueden retardar el vaciamiento gástrico, al igual que neutralizar el fluido gástrico (81)

En el Tercer Suplemento de la USP XX (82), se publicó por primera vez la prueba de disolución para comprimidos de diazepam. Esta prueba se realiza en el Aparato 1 de la USP (canastillas) a 100 r.p.m. , empleando HCl 0.1N como medio de disolución a 37°C. El límite establecido indica que debe disolverse no menos del 85 % de diazepam en 30 minutos. Sin embargo a la fecha no ha sido publicada referencia alguna que demuestre la correlación in "vivo-in vitro" de la misma. Así mismo, la FDA ha establecido los requisitos necesarios para conducir los estudios de biodisponibilidad de comprimidos de diazepam (10 mg), en los que se recomienda realizar los estudios "in vitro", de uniformidad de contenido y la prueba de disolución de acuerdo a las especificaciones de la USP XXI ". Esta prueba deberá realizarse a unidades del mismo lote que habrá de ser utilizado en el estudio "in vivo". La prueba USP XXI así como la USP XXII no presentan diferencias respecto a la USP XX. Para los comprimidos de 2 y 5 mg, deberá realizarse el estudio de biodisponibilidad de los productos , ó bien podrá ser aprobado si se cuenta con la siguiente documentación :

- a. Las tabletas de 2 y 5 mg presentan una composición de principio activo y excipientes proporcional a la de 10 mg.
- b. Las tabletas de 2 y 5 mg presentan un comportamiento de disolución satisfactoriamente comparable a las tabletas de 10 mg.
- c. Se han llevado a cabo estudios in vivo aceptables para las tabletas de 10 mg.

Anteriormente se han realizado algunos estudios de disolución de productos comerciales de comprimidos de diazepam (5 mg), elaborados en México (6). En este caso la prueba de disolución USP no presentó un poder discriminativo adecuado para los 21

lotes estudiados. Adicionalmente al método oficial se probaron 3 métodos experimentales de disolución, de los cuales el método que utiliza el Aparato 2 USP, a 50 rpm, con 500 ml de agua como medio de disolución resultó ser el más adecuado para diferenciar las características de disolución de los productos. Posteriormente se evaluó la liberación de diazepam en 3 productos comerciales, analizando 3 lotes diferentes por ambos métodos (7).

A diferencia del estudio anterior, al utilizar el método USP, fue posible diferenciar claramente las características de los productos. En este trabajo se distinguieron 3 tipos de productos, unos de baja, otros de mediana y los de alta disolución y solamente 3 de los 9 lotes estudiados cumplieron con las especificaciones de la USP ($T_{95} = 30 \text{ min}$), todos ellos pertenecían a un mismo fabricante.

La biodisponibilidad del diazepam a partir de diferentes formulaciones para administración rectal también ha sido objeto de estudio para diversos autores. En 1975, Kanto estudió la biodisponibilidad de diazepam a partir de supositorios en voluntarios sanos. La concentración plasmática máxima después de la administración de supositorios fue comparable con la obtenida después de la administración oral de diazepam, alcanzándose rápidamente en una hora. El autor llegó a la conclusión de que la base empleada en el supositorio juega un papel crucial sobre la absorción rectal del diazepam (18).

En 1981 Viukari y col. (83) compararon la biodisponibilidad relativa del fármaco en supositorios, respecto a tubos rectales, en seis pacientes geriátricos hospitalizados (3 hombres y 3 mujeres). La biodisponibilidad relativa de los supositorios con respecto a los tubos fue de 118 %, sin embargo no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el ABC, ú otros parámetros farmacocinéticos.

La administración del tubo no presentó grandes ventajas frente a supositorios bien formulados. En este caso no se observaron diferencias con respecto al sexo de los pacientes.

Igualmente se ha informado sobre la importancia de la formulación en la efectividad del diazepam a partir de preparaciones inyectables. En un estudio realizado con una preparación en forma de emulsión ("Diazemulus ") en comparación al diazepam solubilizado (" Valium), las concentraciones plasmáticas fueron consistentemente mayores para la solución (84). Este estudio se realizó en 8 voluntarios (6 hombres y 2 mujeres), entre 22-50 años . Las $C_{p_{5\text{ min}}}$ fueron de 682 ± 58 ng/ml v.s 480 ± 43 ng/ml ($p < 0.025$) y a los 15 min de 514 ± 28 v.s. 380 ± 33 ($p < 0.001$). Las ABC_{0-24h} fueron respectivamente de 2921 ± 198 ng/ h/ ml v.s. 2257 ± 177 ng/ h/ ml para Valium y Diazemulus. ($p < 0.001$). Sin embargo estos resultados no concuerdan con los de Naylor y col, quienes no encontraron diferencias en un estudio similar (85).

La comparación de la biodisponibilidad del diazepam en diversos estudios ha dado diferentes resultados. Esto se debe principalmente a diferencias en la biodisponibilidad interindividual que puede llegar a ser del orden de 30 % (48).

La biodisponibilidad relativa de una cápsula de liberación controlada en relación a las tabletas normales, fue determinada en un estudio realizado en voluntarios de edad avanzada (55-74 años). El estudio de dosis única cruzado de 2 vías se realizó en 18 voluntarios, quienes recibieron una cápsula de liberación controlada de 15 mg ó una tableta de 5 mg, 3 veces en un día (t.i.d.), a las 7, 12 y 17 hs. Las concentraciones plasmáticas permanecieron estables entre las 2 a las 24 hs en el caso de la cápsula de liberación controlada, evitando el pico inicial y las otras fluctuaciones asociadas con el régimen convencional (5 mg t.i.d.). Las áreas bajo la curva similares, indicaron iguales cantidades absorbidas entre formulaciones y regímenes. (86).

La comparación de los parámetros de esta población , en relación con la de adultos jóvenes (87) mostró valores inferiores en las concentraciones plasmáticas máximas y una mayor estabilidad de las mismas .

Tuomisto y col. también determinaron la biodisponibilidad del diazepam y sus metabolitos en una cápsula de liberación controlada, comparándola con la tableta regular (88). En este estudio se determinó tanto el diazepam como el N-desmetildiazepam por cromatografía de gases . Así mismo se realizó el análisis de receptores marcados que determina la actividad total de benzodiazepinas, y se determinó la concentración de diazepam en saliva. En general las concentraciones plasmáticas fueron menores para el caso de la cápsula de liberación controlada que para la tableta.

Estas variaciones sin embargo pueden significar una ventaja desde el punto de vista clínico, ya que durante la administración crónica, se evitará el pico inicial obtenido con la tableta normal.

Dentro de los estudios realizados, la biodisponibilidad del diazepam ha sido estimada después de una dosis única al igual que al estado estacionario después de dosis repetidas . La estimación de un fármaco después de la dosificación repetida ofrece ciertas ventajas frente a la estimación de una dosis única. En el caso de fármacos muy potentes, las dosis administradas son del orden de unos cuantos miligramos, como lo es en el caso del diazepam, por lo que las concentraciones plasmáticas alcanzadas después de una dosis única son del orden de nanogramos de manera que se requiere contar con métodos analíticos muy sensibles. Cuando se administra una dosificación múltiple, se alcanzan concentraciones mayores, lo cual facilita el análisis de las muestras; en el caso de que el

estudio se realice en pacientes, no se requiere suspender la terapia, evitando el período de lavado, el cual suele ser muy prolongado en el caso de fármacos con vida media muy larga. Al permitir cambiar de una formulación a otra inmediatamente, el paciente actúa como su propio control.

Puesto que la biodisponibilidad es uno de los factores más importantes que determina la eficacia y seguridad del fármaco, es importante conocer el comportamiento in vivo, durante la administración clínica del fármaco.

Kaplan y col. (18), demostraron la absorción completa del diazepam al ser administrado por vía oral y basándose en los parámetros farmacocinéticos obtenidos después de la administración de una dosis única, estimaron los perfiles de concentración plasmática bajo dosificación múltiple. Recientemente, Eatman y col. (35) confirmaron los valores mediante un estudio de dosis múltiple comparando dos regímenes de dosificación diferentes, por lo que los datos en el estado estacionario indicaron características reproducibles entre dosis tanto de disposición como de absorción, y concentraciones plasmáticas en el estado estacionario comparables para fármaco y metabolito, tanto en el régimen de 5 mg 3 veces al día como 15 mg una vez al día.

Las concentraciones plasmáticas de diazepam y su metabolito, el N-desmetildiazepam después del tratamiento con una dosis oral de 5 mg tres veces al día fueron investigadas en 7 pacientes psiquiátricos (2). En este trabajo se incluyó un estudio cruzado para evaluar la biodisponibilidad al estado estacionario de 2 productos comerciales de tabletas de 5 mg de diazepam y una suspensión oral en comparación con el producto de referencia "Valium".

Las formulaciones se administraron al azar, la primera formulación se administró durante 10 días y las tres siguientes por un período de una semana cada una (7 días). Se incluyó el estudio de disolución de las formulaciones usando el aparato 1 USP en medio ácido a 50 r.p.m.. No se encontraron diferencias en la disolución de los productos. De su estudio concluyeron que se requiere un período de una semana para obtener niveles estacionarios del diazepam, cuando se administra crónicamente. Las tabletas dieron lugar a niveles semejantes, mientras que la suspensión mostró niveles más bajos al estado estacionario, indicando por lo tanto una absorción incompleta.

Finalmente, Gustafson y col. (89) determinaron la biodisponibilidad de una cápsula de liberación controlada en comparación a la tableta normal tanto en dosis única como en dosis repetidas. Igualmente incluyeron un estudio para determinar la influencia del alimento en la biodisponibilidad del fármaco.

El objetivo del estudio de dosis única fue comparar los perfiles plasmáticos de diazepam observados después de la administración de una cápsula de liberación controlada (15 mg) en voluntarios sanos, tanto en ayunas como en presencia de alimento, con los correspondientes perfiles observados después de la administración en un día de las tabletas convencionales (Valium 5 mg t.i.d.). La tableta estándar se disolvió completamente en menos de 15 minutos bajo las condiciones de la farmacopea (USP); la disolución para la cápsula fue gradual y se completó en un término de 8 a 12 hs. Las áreas bajo la curva obtenidas para los tres casos fueron prácticamente iguales, indicando una biodisponibilidad equivalente.

El objetivo del estudio de dosis múltiple fue definir la biodisponibilidad de la cápsula después de la administración crónica, comparando los perfiles de concentración plasmática tanto de diazepam como del N-desmetildiazepam, siguiendo la administración del estándar durante 14 días (5 mg t.i.d.) y la

cápsula de liberación controlada por 14 días más (una vez al día). Las muestras se tomaron antes de la 1a. y 3a. administración del día y a las 1.5 hs (aproximadamente t_{max} para la tableta estándar) después de cada administración.

Los resultados de área bajo la curva obtenidos después de la administración crónica en un intervalo de dosificación al estado estacionario fueron consistentes con el estudio de dosis única. Los autores observaron que en el estado estacionario, después del octavo día de tratamiento, las concentraciones de diazepam y N-desmetildiazepam $C_{p_{min}}$ y $C_{1.5 h}$ fueron virtualmente las mismas. Los datos demostraron concentraciones plasmáticas virtualmente idénticas a estos dos tiempos con ambos tratamientos. No se encontraron diferencias en presencia de alimentos.

2.14. METODOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACION DE DIAZEPAM EN FLUIDOS BIOLOGICOS.

La determinación simultánea de diazepam y sus metabolitos en fluidos biológicos ha sido objeto de un gran número de investigaciones. Para este análisis se requiere contar con técnicas analíticas muy sensibles puesto que las concentraciones encontradas durante la terapia generalmente son menores a 1 mg/l.

Cromatografía Gas-Líquido.

La técnica más extensamente empleada para la determinación y cuantificación de estos compuestos ha sido la cromatografía de gases, la mayoría con detector de captura de electrones, debido a la presencia de un grupo electronegativo (Cl) en posición 7 de la molécula y el grupo carbonilo en posición 2, del anillo 1-4 benzodiazepínico. Las primeras publicaciones a este respecto comprendían la conversión del compuesto original a su correspondiente derivado de O-aminobenzofenona, mas volátil y sensible al detector de captura de electrones (90).

Sin embargo, a pesar de la sensibilidad de estos métodos , su especificidad es cuestionable, debido a que los metabolitos del fármaco pueden dar lugar a los mismos derivados, disminuyendo así la exactitud y especificidad del análisis.

En 1978, de Silva y col (91) presentaron la determinación del diazepam y otras benzodiazepinas utilizando un procedimiento más sencillo para la extracción. La técnica requiere una muestra de 2 ml de sangre, a la cual se añaden 2 ml de solución saturada de Na_3PO_4 0.8M, a pH de 12.8, y se extrae con 8 ml de una mezcla de benceno-cloruro de metileno (9:1). Después de centrifugar a 2600 rpm por 15 minutos, a 10°C, se separa la fase orgánica y se evapora a sequedad. El residuo se redisuelve en una mezcla de benceno: acetona:metanol (80:15:5) y se inyectan de 10 a 100 μl al cromatógrafo de gases, equipado con detector de captura de electrones.

Se utiliza una columna de vidrio de 3 pies de largo por 2 mm de diámetro interno, empacada con OV-17 al 2% sobre Chromosorb W(HP) de malla 80/100. El método permite detectar concentraciones de 1 a 10 ng / ml de plasma.

El método de Berlin y col. (2) describe la extracción directa del diazepam y el N-desmetildiazepam usando benceno como solvente extractor y griseofulvina como estándar interno. Este método permite determinar niveles terapéuticos plasmáticos en un volumen de muestra de 50 a 100 μ l de plasma utilizando la siguiente técnica: a 100 μ l de plasma se añaden 100 μ l de solución saturada de KCl y 4 ml de benceno . se extrae por 10 minutos y se centrifuga. De la capa orgánica se separan 3 ml y se evaporan a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno. El residuo se reconstituye con 100 μ l de benceno que contiene la griseofulvina y se inyecta 1 μ l al cromatógrafo.

Se emplea una columna de vidrio de 6 pies de largo por 3 mm de diámetro interno, empacada con OV- 17 al 3% sobre Gas Chrom (80/100), detector de captura de electrones con Ni ⁶³ como fuente de radiación y nitrógeno a 25 ml/ min como gas de arrastre.

Las temperaturas de la columna, inyector y detector fueron: 236°C, 285°C y 314 °C respectivamente.

Los tiempos de retención obtenidos fueron: 4 min para diazepam , 5 min para N-desmetil-diazepam y 12.5 min para griseofulvina.

El método presenta resultados satisfactorios en cuanto a la precisión en el análisis de las muestras y una linealidad adecuada hasta 1000 ng/ml. La concentración mínima detectable es de 30 ng/ml para diazepam y de 40 ng/ml para N-desmetildiazepam. Este procedimiento fue reproducido por otros autores con algunas modificaciones menores, pero algunos presentaban fuentes potenciales de error. Gamble (92) aumenta el tamaño de la muestra a 200 μ l de plasma y después de la extracción con benceno separa únicamente 2 ml de la fase orgánica a fin de evitar interferencia con la interfase. Las demás condiciones son muy parecidas ya que utiliza la misma columna e igual gas de

arrastre. Las temperaturas del horno, inyector y detector fueron 238°C, 270°C y 280°C, respectivamente.

Los tiempos de retención para diazepam, N-desmetil diazepam y griseofulvina bajo estas condiciones son respectivamente: 2 minutos, 3 minutos 10 segundos y 7 minutos 20 segundos. La linealidad del método abarca de 100 a 400 ng/ml para diazepam y de 200 a 800 ng/ml para N-desmetildiazepam; sin embargo, los cromatogramas de Gamble presentaban picos asimétricos para el metabolito y la griseofulvina y considerando que las concentraciones fueron calculadas en base a la altura de los picos, este factor puede aumentar la posibilidad del error analítico.

Igualmente, Arnold (80) modifica el método de Berlin para el análisis de muestras de 200 a 1000 μ l de plasma, las cuales se extraen directamente con 3 ml de benceno y se mezcla por 3 min. Después de separar las fases, se pipetea 2 ml de fase orgánica en un tubo y se evaporan a sequedad en baño María y el residuo se redissuelve en 100 μ l de benceno conteniendo 0.25 μ g/ml de clordiacepóxido (estándar interno). De la solución final se inyectan 2 μ l al cromatógrafo. Esta técnica utiliza una columna de aluminio de 5 pies de largo por 1/4 de pulgada de diámetro interno, empacada con E 350 al 3% en diatomita CQ (100-200). Como gas de arrastre se utiliza una mezcla de argón-metano (9:1), a 100 ml/min, y detector de captura de electrones.

Las temperaturas empleadas son: inyector 300°C, horno 270°C y detector 320°C.

Los tiempos de retención obtenidos bajo estas condiciones son: 1 minuto para diazepam, 0.55 min para oxazepam; 1.35 para N-desmetildiazepam ; 2.15 min para hidroxidazepam y 5.4 min para el clordiacepóxido.

El porcentaje de recuperación es del 98 % y la sensibilidad de 5 ng/ml.

Algunos autores han argumentado que el uso de clordiacepóxido como estándar interno no es adecuado, ya que se ha encontrado que es termolábil bajo condiciones cromatográficas similares a las empleadas por Arnold (93).

Otros métodos existentes en la literatura que utilizan la cromatografía gas-líquido consideran otro tipo de solventes, o bien cambian la fase estacionaria, con diferentes propósitos.

El método de Howard & Nickless (94), describe un método rápido para determinar niveles de diazepam y sus metabolitos en orina, sangre y plasma con relativa rapidez y una exactitud aceptable. Este método emplea un volumen pequeño de solvente extractor (200 μ l de benzoato de etilo, el cual contiene el estándar interno, prazepam), para extraer un volumen de 2 ml de muestra. Este método es aplicable a la determinación de los compuestos mencionados a concentraciones similares a las obtenidas en estado estacionario y no es recomendable para niveles muy pequeños de benzodiazepinas, a pesar de la sensibilidad de 10 ng/ml para diazepam y 30 ng/ml para N-desmetildiazepam. Presenta además el inconveniente de la formación de una emulsión la cual se rompe por congelación, durante el proceso de extracción .

Rutherford (93) desarrollo un micrométodo rápido (20 a 100 μ l de plasma) con una extracción simple (no requiere pasos de transferencia, ni de evaporación) para la determinación simultánea de diazepam y N-desmetildiazepam. El método requiere de 100 μ l de plasma, se le agrega prazepam como estándar interno, se extrae con acetato de n-butilo y se agita en vortex por 30 segundos. Se toman 2 μ l de la fase orgánica y se inyecta al cromatógrafo de gases, equipado con detector de captura de electrones. Se utiliza una columna de vidrio en espiral de 2m de largo x 4 mm de diámetro interno, con OV- 17 al 3% sobre Varaport 30 (80/ 100). Las temperaturas empleadas para columna, y detector son 250°C y 270°C, respectivamente. Como gas de arrastre emplea argón a una velocidad de flujo de 80 ml/ mín.

Bajo estas condiciones, el diazepam, desmetildiazepam, oxazepam y prazepam presentan tiempos de retención de 3.8 min, 4.7 min, 2.7 min y 6.0 min, respectivamente.

La sensibilidad del método es de 20 ng/ ml para diazepam y desmetildiazepam en plasma y puede aumentarse a 5 ng/ml en caso necesario con buena precisión (4-5% C.V.). Este método ofrece grandes ventajas en cuanto al tiempo de análisis, volumen de la muestra y facilidad de extracción sobre muchos otros que incluyen cromatografía gas-líquido con detección de captura de electrones. Wallace y col. (95), utilizan una nueva fase líquida estacionaria, SP 2250-DB para el análisis por cromatografía de gases con captura de electrones, que presenta la ventaja de aumentar la sensibilidad del análisis y la simetría de los picos obtenidos en comparación con las otras fases comúnmente empleadas, la OV-17 y la OV-1.

Aunque se han publicado otros métodos de cromatografía de gases que utilizan detector de ionización a la flama (96) ó detector de flama sensible a nitrógeno (97), estas técnicas son menos sensibles que la detección con captura de electrones.

Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

En la literatura se han publicado numerosos métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución para el análisis cuantitativo del diazepam y sus metabolitos, tanto en fase normal como en fase inversa.

Bugge A. (98) utiliza cromatografía de líquidos sobre sílica porosa (Partisil 10, de tamaño de partícula de 10 μ m), empleando una mezcla de n-heptano-isopropanol-metanol (40:10:1). Para propósitos forenses, ó clínicos de rutina, 1 ml de sangre es suficiente para detectar concentraciones superiores a 100

ng/ml; en el caso de niveles más bajos, se requieren 2 ml de sangre. Este método requiere de un procedimiento de extracción bastante elaborado, siendo lineal hasta 1500 ng/ml. El procedimiento de extracción es similar al de Berlin, sólo que utiliza un volumen menor para la extracción y un procedimiento de retroextracción para la limpieza de las muestras. La recuperación para niveles sanguíneos comprendidos entre 100 y 500 ng/ml, determinada con 10 extracciones paralelas es de $92 \pm 7\%$ para ambos compuestos.

El método propuesto por Brodie y col. (99), en fase inversa, requiere una muestra de 2 ml de plasma y prazepam como estándar interno. El pH se ajusta a 9.0 con una solución de boratos y se extrae con 10 ml de éter dietílico. Después de agitar y centrifugar, la fase etérea se evapora a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno. El residuo se redisuelve con 25 μ l de metanol y se inyectan de 10 a 20 μ l al cromatógrafo de líquidos.

Se utiliza una columna de 30 cm x 4 mm de diámetro interno, empacada con μ Bondapak C18 (Waters), y una fase móvil constituida por una mezcla de metanol-agua (65:35 v/v) a una velocidad de flujo de 2 ml/min. Los tiempos obtenidos para el diazepam, N-desmetildiazepam y prazepam bajo estas condiciones fueron 8min, 5 min y 10.5 min , respectivamente.

La recuperación total de diazepam es de $96 \pm 3\%$ y para N-desmetildiazepam de $94 \pm 4\%$ en un rango de concentración de 10 a 400 ng/ml. El límite de detección fue de 10 ng/ml para diazepam y de 2 ng/ml para el N-desmetildiazepam.

El método de Kabra et al (100) requiere de 2 ml de sangre para la determinación de diazepam y N desmetildiazepam por CLAR también utiliza prazepam como estándar interno, una columna Partisil-10 ODS (Reeve Angel, Clifton) de 25 cm x 4.5 mm D.I. y una fase móvil constituida de una mezcla de acetonitrilo-solución amortiguadora de acetato de sodio 0.01 M (pH 4.6) (35:65 v/v) a una velocidad de flujo de 2 ml/min. La detección de

los compuestos la realiza a 240 nm, lo cual da una sensibilidad de 40 ng/ml para diazepam y de 30 ng/ml para el desmetildiazepam y una linealidad de 0.05 a 10 mg/ml. Este método es lo suficientemente sensible para el monitoreo de diazepam y sus metabolitos a las concentraciones terapéuticas normalmente encontradas.

El método descrito por Vree y col. (101) facilita la determinación simultánea de diazepam , N-desmetildiazepam oxidiazepam y oxazepam en 0.2 ml de muestra (sangre). Este método ha sido aplicado satisfactoriamente a estudios farmacocinéticos en el hombre y en perro y también para el análisis rutinario de muestras.

A 0.1 ml de plasma ó urina se agregan 10 μ l de acetonitrilo conteniendo 400 ng de flunitrazepam como estándar interno y 2 ml de éter dietílico y se mezcla por 1 minuto. La mezcla se centrifuga por 5 min a 4000 rpm. Se separa la capa etérea y se evapora a sequedad. Se redisuelve con 0.2 ml de fase móvil y se inyectan 0.1 ml al cromatógrafo. Este método utiliza una columna de Lichosorb RP8 (5 μ de tamaño de partícula) y detección a 230 nm. Como fase móvil se emplea una mezcla de agua-metanol-acetonitrilo (500:450:50) a una velocidad de flujo de 1.6 ml/min. Los tiempos de retención obtenidos para el flunitrazepam, diazepam y N-desmetildiazepam y oxazepam son: 6.5min, 21.8 min, 17 min y 10.67 min respectivamente.

La recuperación de la extracción para el diazepam es del 96 \pm 7%, del 91 \pm 7% para N-desmetildiazepam y 89 \pm 6% para oxazepam. Se observa una buena linealidad en el rango de 10 a 10 000ng/ml. La sensibilidad es de 30 ng/ ml para todos los compuestos.

Recientemente, Tada Koji y col. (102), informaron de un método rápido y sensible para la determinación del diazepam y sus metabolitos nordiazepam, oxazepam y temazepam : de 250 a 1000 μ l de suero se extraen en éter y los compuestos son cuantificados por cromatografía de líquidos de alta resolución sobre una columna de micropartículas " Shimpack FLC- C8. (3 μ m diámetro).

El estándar interno que se utiliza es estazolam y la extracción se lleva a cabo en éter dietílico previa alcalinización del suero con solución de hidróxido de sodio. El extracto se evapora bajo atmósfera de nitrógeno a 40°C. La fase móvil empleada fue una mezcla de solución amortiguadora de fosfatos pH 8.0- metanol (47/53 v/v). La detección se realiza a 254 nm. El límite de detección es de 10 ng/ml . El método es lineal en un rango de 20 a 2000 ng/ml para diazepam y nordiazepam y de 20 a 500 ng/ml para oxazepam y temazepam. La precisión es adecuada, presentando C.V. de 2.4 a 4.7% para oxazepam y temazepam y 1.9 a 8.9 para nordiazepam y diazepam, dentro del día.. La variación entre días es de 3.8 a 5.7 % para oxazepam y temazepam y de 3.2 a 7.6% para nordiazepam y diazepam en 4 días diferentes.

La recuperación analítica es de 94.4% para oxazepam, 96.6% para temazepam, 92.6% para nordiazepam y 87.1% para diazepam.

Este método difiere de los anteriores en que incluye el análisis completo de todos los metabolitos del diazepam, lo cual es de importancia clínica, sobre todo en el caso del tratamiento con dosis masivas de diazepam en pacientes esquizofrénicos, sin embargo se menciona que es necesario aumentar el límite de detección para poder monitorear el oxazepam a las concentraciones tan bajas en las que se encuentra en sangre.

En general, la cromatografía de líquidos de alta resolución para la determinación del diazepam y sus metabolitos comprende una extracción simple y una linealidad en un rango mucho mas amplio de concentraciones, comparada con la cromatografía de gases, por lo cual es aplicable en la determinación de concentraciones tanto terapéuticas como tóxicas.

Las columnas de fase inversa utilizadas en la cromatografía de líquidos, son actualmente las de elección, ya que es posible separar una gran variedad de fármacos con ellas y requieren relativamente poco mantenimiento y preparación.

Cromatografía en Capa Fina.

Algunos autores han desarrollado métodos para la determinación del diazepam y sus metabolitos en placa fina determinándolos directamente de la placa sin revelado por densitometría, a un máximo de absorción de 232 nm. después de la extracción con tolueno del plasma (103). La sensibilidad es de 25 ng/ml. El método implica una extracción directa, sin derivatización, pero tarda 2.5 horas para su desarrollo.

Sun y col (104) describen un método altamente sensible (5 - 18 ng/ml de plasma) por determinación fluorodensitométrica del diazepam y sus metabolitos desmetildiazepam y oxazepam. La fluorescencia se genera tratando las placas de gel de sílice con un spray de H_2SO_4 . Este procedimiento es aplicable a otras benzodiazepinas.

Radioinmunoanálisis.

Peskar y col. (105) obtuvieron dos anticuerpos separados, uno para diazepam y el otro que reconoce al N-desmetildiazepam. El radioinmunoanálisis es capaz de detectar 20 ng/ml del fármaco en cantidades hasta de 50 μ l de suero. El método tiene una excelente sensibilidad pero poca especificidad con respecto a los metabolitos, al comparársele con los procedimientos cromatográficos.

Técnica del Radio-receptor.

El diazepam, al igual que otras benzodiazepinas pueden ser analizadas en fluidos biológicos mediante una técnica de "radio-receptor" (106). Este análisis se basa en el desplazamiento de un ligando marcado con tritio, i.e. 3H-flunitrazepam, por un ligando no marcado, de los sitios de unión de las benzodiazepinas, en un homogenado de corteza cerebral de rata. La concentración del ligando no marcado puede

estimarse a partir de la actividad inhibitoria sobre la unión del radio-ligando, cuando se compara con concentraciones conocidas del mismo ligando, o bien uno relacionado. El equipo utilizado es un contador líquido de centelleo y la sensibilidad del método es de 40 ng/ml para diazepam, al emplear una muestra de 50µl de plasma. Esta técnica ha sido aplicada satisfactoriamente al análisis de muestras de saliva, con una sensibilidad de 40 a 80 ng/ml.

Este método mide la concentración total de la actividad de benzodiazepinas y puede aplicarse, en relación a la afinidad del receptor, a todos sus derivados. Este método es poco útil cuando se requiere separar los metabolitos del compuesto original; sin embargo es una herramienta útil al proveer un parámetro biológico para la comparación de los efectos de las benzodiazepinas.

CAPITULO III
P A R T E E X P E R I M E N T A L .

3.1. Adquisición de estándares y productos empleados en el estudio

Se utilizó diazepam estándar nacional de referencia (FNEUM), lote DMZ-1 el cual fue adquirido directamente de la S.S.A.. El nitrzepam y oxazepam utilizados como estándares secundarios fueron amablemente donados por Laboratorios Grossman de México. Los productos comerciales nacionales estudiados, Alboral (Lote 88 608), Pacitrán (Lote 8E 1003), Valium (Lote 871002), fueron solicitados directamente a los laboratorios productores. El producto innovador Valium, Roche (Lote B 2478), fue amablemente donado por Laboratorios Roche, Suiza.

A cada uno de los productos se le asignó una clave: "A" (Alboral); "P" (Pacitrán); "M" (Valium , México) y "V" (Valium, Suiza).

3.2. Control de calidad de los productos.

Todos los productos fueron sometidos a las siguientes pruebas de control de calidad:

3.2.1. Variación de Peso:

Se pesaron individualmente 20 comprimidos. Se obtuvo el peso promedio y la desviación estándar. La Farmacopea USP XXI especifica que no debe existir una variación mayor del 5% en no más de 2 comprimidos (107).

3.2.2. Contenido Químico.

Para la cuantificación del diazepam en los comprimidos, se utilizó un método espectrofotométrico, el cual fue validado en cuanto a su exactitud y repetibilidad y que se describe a continuación:

3.2.2.1. Equipo.

Espectrofotómetro Marca Zeiss, modelo PM2-DL

Balanza Analítica Sartorius, modelo 1801

Agitador vortex múltiple Thermolyne, modelo 18700.

3.2.2.2. Reactivos:

Etanol Absoluto R.A. Merck, Acido Sulfúrico R.A., Merck

3.2.2.3. Soluciones :

Solución de Acido sulfúrico en etanol: 1.4 ml de ácido sulfúrico se diluyen y aforan a 1000 ml con etanol absoluto.

3.2.2.4. Método :

Se pesan y se pulverizan no menos de 20 comprimidos. Del polvo se pesa una cantidad equivalente a 5 mg de diazepam, transfiriéndose a un matraz volumétrico de 100 ml. Se agregan 50 ml de la solución alcohólica de ácido sulfúrico, se agita en vortex por 5 minutos, y se afora a volumen con la misma solución. Se mezcla y se filtra descartando los primeros mililitros del filtrado. Se toma una alícuota de 10 ml y se transfiere a un matraz aforado de 50 ml, aforando a volumen con la solución etanólica, y se mezcla. Se determina la absorbancia de esta solución a una longitud de onda de 284 nm. Paralelamente se determina la absorbancia de una solución patrón de diazepam, estándar de referencia, en etanol ácido, a una concentración de aproximadamente 10 µg/ml.

3.2.2.5. Validación del Método.

Para determinar la linealidad y repetibilidad del método espectrofotométrico se prepararon 3 curvas de calibración en 2 días diferentes en el rango de concentración de 0.5 a 10 µg/ml y se calculó el coeficiente de correlación y los coeficientes de variación para cada concentración.

Para la validación de la técnica de cuantificación, se hicieron por lo menos 20 determinaciones de una misma muestra de polvo de comprimidos de diazepam, estableciendo la desviación estándar y los límites de confianza al 95% para la media. Igualmente se determinaron los intervalos de confianza sobre la varianza a fin de establecer la exactitud del método.

3.2.3. Uniformidad de Contenido.

Se analizaron individualmente 10 comprimidos de cada uno de los productos estudiados empleando el siguiente método: se pulveriza un comprimido y se transfiere a un matraz aforado de 50 ml, se agregan 20 ml de la solución etanólica de ácido sulfúrico, se agita en vortex por 5 minutos y se afora al volumen. Se filtra y del filtrado se toma 1 ml, aforando a 10 ml con la solución etanólica. Se determina la absorbancia de esta solución y la de una solución de estándar de diazepam de concentración aproximadamente igual a $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ empleando una longitud de onda de 242 nm, y solución etanólica ácida como blanco de ajuste.

De acuerdo a la USP XXI, el contenido de principio activo debe estar comprendido entre el 85 - 115 % de la cantidad especificada en el marbete y el coeficiente de variación debe ser menor del 8 %. Si una unidad cae fuera del 85- 115 % y ninguna fuera del 75-125 %, ó bien si el coeficiente de variación excede el 8 %, se analizan otras 20 unidades más. La prueba se cumple si no más de una unidad de las 30 cae fuera del 85- 115 % y el coeficiente de variación no excede el 7.8 % (107).

3.3. Pruebas de Disolución.

Los productos estudiados fueron sometidos a las siguientes pruebas de disolución:

3.3.1. Prueba USP XXI :

Se utilizó el Aparato 1 de disolución USP, con una velocidad de

giro de las canastillas de 100 r.p.m. y 900 ml de HCl 0.1N como medio de disolución. Se determinó el perfil de disolución, tomando muestras durante 2 hs, a intervalos de tiempo previamente establecidos (6). La prueba se realizó con 12 unidades de cada lote. De acuerdo a la USP XXI debe disolverse por lo menos el 85% de diazepam a los 30 minutos.

3.3.2. Método II.

Se utilizó el Aparato 2 USP de disolución, con una velocidad de agitación de 50 r.p.m. y 500 ml de agua deionizada deaerada como medio de disolución (8). Este método fue previamente propuesto como alternativa al método USP, ya que presentó un mayor poder discriminativo con respecto a las características de disolución de diversos productos comerciales.

3.3.3. Análisis de las muestras.

En un principio se prepararon por lo menos 6 curvas de calibración (3 por día, en dos días diferentes), tanto en HCl 0.1 N, como en agua deionizada , a fin de establecer la linealidad y precisión de los métodos en un rango de concentración de 0.825 a 10 $\mu\text{g/ml}$ de diazepam. La absorbancia de las soluciones en HCl 0.1N, se determinó a 242 nm (según lo establece la USP XXI) y a 228 nm en el caso del agua (Apendice A).

Para ambos métodos se tomaron alícuotas filtradas de 5 ml del medio de disolución, sin reposición de medio a los 1, 3, 5, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos. La concentración de diazepam en las muestras se determinó a partir de una curva patrón preparada el mismo día de la prueba. En todos los casos se realizaron dos pruebas , con 6 comprimidos cada una. A partir de los datos se calculó el por ciento promedio disuelto a los tiempos establecidos.

3.4. METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR DIAZEPAM EN PLASMA.

3.4.1 .Equipo.

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Marca Beckmann, equipado con 2 bombas recíprocas Modelo 110 A y 110 B. Detector de U.V. de longitud de onda variable Modelo 240. Un inyector de asa de volumen constante de 20 μ l y un módulo de datos Modelo 427.

Columna de fase inversa. Novapak C 18 de 15 cm de longitud y 39 mm de diámetro interno (Waters).

Agitador vortex Thermolyne, modelo 16700.

Centrífuga Beckmann, modelo TJ- 8.

Balanza analítica Sartorius, modelo 1801.

Evaporador de solventes

3.4.2. Reactivos y Estándares.

n-Hexano R. A. Merck

Metanol absoluto R. A Merck

Acido bórico, R. A. , Merck

Hidróxido de sodio, R. A. , Merck

Cloruro de Potasio, R. A. , Merck.

Diazepam estándar nacional de referencia FNEUM (S.S.A.), Lote DMZ-1

Nitrazepam, estándar secundario de referencia (donado por Lab Grossmann)

Oxazepam, estándar secundario de referencia (donado por Lab Grossmann).

Agua destilada

Agua deionizada

3.4.3. Preparación de las soluciones.

Solución de Acido Bórico- Cloruro de Potasio 0.2 M:

Disolver 12.37 g de ácido bórico y 14.91 g de cloruro de potasio en agua y aforar a 1000 ml.

Solución de Hidróxido de sodio 1 M:

Disolver 162 g de hidróxido de sodio R.A. en 150 ml de agua libre de CO₂. Enfriar la solución y filtrar por papel grueso. Transferir 54.5 ml del filtrado claro y diluir con agua libre de CO₂ y aforar a 1000 ml.

Solución de hidróxido de sodio 0.2 M :

Diluir un volumen adecuado de la solución 1 M de hidróxido de sodio con agua suficiente para obtener una solución de concentración 0.2M.

Solución Amortiguadora de Boratos pH 9.0 (USP XXI):

Colocar 50 ml de solución de ácido bórico- cloruro de potasio 0.2M en un matraz volumétrico de 200 ml y agregar 20.8 ml de solución 0.2M de hidróxido de sodio. Diluir y aforar a volumen con agua destilada.

Solución Patrón de Diazepam :

Pesar y disolver 12.5 mg de diazepam estándar de referencia en metanol absoluto, aforando a 25 ml (concentración 500 µg/ml). Esta solución se puede conservar a temperatura ambiente hasta por seis meses (103).

Solución de nitrazepam (estándar externo):

Disolver aproximadamente 3.25 mg de estándar de nitrazepam en metanol absoluto y aforar a 25 ml para obtener una concentración de 250 µg/ml, la cual es estable en refrigeración. Esta solución se diluye en el momento del análisis en una mezcla de metanol/ agua (80:40) para obtener una concentración final de 2.5 µg/ml.

3.4.4. Procedimiento.

El método analítico empleado es el propuesto por Castillo y col. (108) con algunas modificaciones.

En tubo de vidrio de 10 ml con tapón de rosca, se colocan 0.5 ml del plasma conteniendo el diazepam y se añaden 200 μ l de solución amortiguadora de boratos pH 9.0. se mezcla y se agregan 3 ml de hexano R.A., agitando vigorosamente en vortex por 90 segundos. Se centrifuga por 15 minutos a 3500 r.p.m.. La fase orgánica se separa y se coloca en un tubo cónico, donde se evapora a sequedad en baño maría a no más de 50° C y bajo atmósfera de nitrógeno. El residuo se reconstituye con 50 μ l de una solución metanólica de nitrazepam a una concentración de 2.5 μ g/ml (estándar externo) y se inyectan 20 μ l al cromatógrafo.

3.4.5. Condiciones Cromatográficas.

El análisis se llevó a cabo utilizando una columna Novapack C-18 (Waters), de 15 cm de longitud y 3.9 mm de diámetro interno. La fase móvil empleada fue una mezcla de metanol- agua 60:40 (V/V). La velocidad de flujo se mantuvo constante a 1 ml/min y operando el detector a una longitud de onda de 254 nm. La velocidad de carta fue de 0.25 cm/min. El procedimiento se esquematiza en la Figura 2.1.

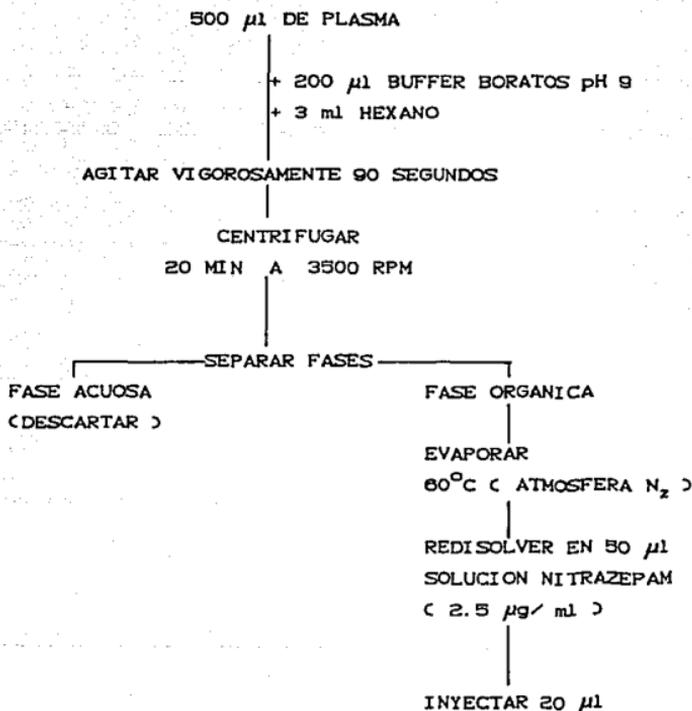


Fig. 2.1 Procedimiento empleado para la extracción de diazepam en muestras plasmáticas (análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución).

3.5. VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DEL DIAZEPAM EN PLASMA.

Con el fin de contar con un método confiable, se evaluaron los parámetros de linealidad, precisión, recuperación, estabilidad y repetibilidad en diferentes días.

3.5.1. Preparación de las soluciones en plasma:

De la solución stock de diazepam en metanol (conc. 500 $\mu\text{g/ml}$), se tomó un ml y se diluyó a 10 ml con metanol absoluto. De esta solución se tomaron 2 ml y se aforaron a 10 ml con agua destilada. A partir de esta solución se hicieron las siguientes diluciones con plasma libre de fármaco :

1 ml se diluyó y aforó a 10 ml (c= 1000 ng/ml) Solución A
5 ml de solución A se aforaron a 10 ml (c= 500 ng/ml) Solución B
5 ml de Sol. B se aforaron a 10 ml (c= 250 ng/ml) Solución C
5 ml de Sol. C se aforaron a 10 ml (c= 125 ng/ml) Solución D
5 ml de Sol. D se aforaron a 10 ml (c= 62.5 ng/ml) Solución E
5 ml de Sol E se aforaron a 10 ml (c= 31.25 ng/ml) Solución F

3.5.2. Linealidad :

Se prepararon 8 curvas en plasma añadiendo diazepam en un rango de concentración de 30 a 1000 ng/ml y se analizaron por el procedimiento descrito previamente. La relación de áreas del diazepam con respecto al nitrazepam se graficó contra la concentración de diazepam a fin de determinar si la respuesta era lineal.

3.5.3. Precisión :

Para determinar la variabilidad en un mismo día, se analizaron por sextuplicado muestras plasmáticas a las cuales se les adicionó diazepam a concentraciones de 30, 60, 120, 250, 500 y 1000 ng/ml, y se calculó el coeficiente de variación.

La repetibilidad en diferentes días se determinó analizando una vez al día soluciones a la misma concentración en 8 días diferentes.

3.5.4. Recuperación :

Se prepararon soluciones de diazepam en metanol (30-1000 ng/ml) las cuales se evaporaron a sequedad. El residuo se reconstituyó con 50 µl de la solución metanólica del nitrazepam e inyectando al cromatógrafo.

A partir de una matriz de plasma se prepararon 30 muestras de concentración conocida de diazepam (30-1000 ng/ml), las cuales se analizaron de acuerdo al procedimiento descrito y fueron inyectadas paralelamente a las muestras arriba mencionadas. La recuperación se calculó como la relación de la respuesta de las muestras extraídas y las obtenidas con las soluciones de diazepam en metanol.

3.5.5. Selectividad :

Se analizaron muestras del plasma libre de fármaco (blanco) y al mismo tiempo muestras a las que se agregaron cantidades conocidas de diazepam, nitrazepam y oxazepam, uno de los metabolitos del diazepam.

3.5.6. Sensibilidad :

Concentración mínima detectable: Se prepararon soluciones de diazepam en plasma en concentraciones de 5 a 30 ng/ml y se analizaron por el método descrito, junto con muestras de plasma blanco.

3.5.7. Estabilidad del diazepam en Plasma.

A fin de establecer la estabilidad del diazepam en plasma, se prepararon soluciones del fármaco de concentración conocida en el mismo, se dividieron en tubos de ensayo y se guardaron en congelación hasta el momento de su análisis. Se retiraron muestras a tiempo cero, y a intervalos de una semana durante un mes y fueron analizadas bajo el método descrito, preparando paralelamente una curva estándar de diazepam en plasma.

3.6. APLICACION DEL METODO ANALITICO EN EL ANALISIS DE MUESTRAS DE PACIENTES SOMETIDOS A TERAPIA MULTIPLE.

3.6.1. Especificidad del método analítico.

Se prepararon soluciones de estándares de algunos de los fármacos más comúnmente empleados en clínica junto con el diazepam, utilizando la mezcla de metanol/agua 80:40 (v/v) como disolvente, a una concentración aproximadamente igual a la informada como terapéutica promedio. Estas soluciones fueron inyectadas directamente al cromatógrafo con el objeto de conocer la respuesta de cada fármaco al sistema cromatográfico empleado. Posteriormente se prepararon muestras en plasma agregando cantidades conocidas de diazepam y de cada uno de los fármacos bajo estudio, y se analizaron por el método ya mencionado.

3.6.2. Muestras Clínicas.

Se eligieron pacientes hospitalizados de uno y otro sexo, seleccionados al azar y de distintas edades. Los pacientes sufrían de diversas enfermedades de etiología mixta. En la mayoría de los casos fueron tratados con diazepam y diversos fármacos. Se recolectaron muestras de sangre (5 ml) 90 minutos después de la administración del diazepam, en un tubo heparinizado. Después de centrifugar, se separó el plasma y se guardó en congelación hasta el momento de su análisis. La concentración de diazepam se determinó en cada una de las muestras utilizando el método cromatográfico descrito.

El análisis de cada muestra se verificó por cuadruplicado a fin de conocer la repetibilidad del análisis bajo la presencia de otros fármacos.

3.7. ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD AL ESTADO ESTACIONARIO EN PRODUCTOS COMERCIALES CONTIENDO DIAZEPAM

Se evaluó la biodisponibilidad de tres productos comerciales de fabricación nacional, en comparación al producto de referencia Valium Roche, Suiza (Lote B 2478). El estudio se llevó a cabo en 8 pacientes psiquiátricos (6 mujeres y 2 hombres) cuyas edades se encuentran comprendidas entre los 17 a los 46 años y en estado de salud somática general buena. El estado de salud se determinó por examen físico y clínico de laboratorio que incluía biometría hemática, examen general de orina, glucosa en sangre, funcionamiento renal, funcionamiento hepático, BVL, fosfatasa alcalina, bilirrubina. Las características físicas de los pacientes se incluyen en la Tabla 2.1.

Se excluyeron del estudio aquéllos pacientes que pudieran tener antecedentes de alteraciones vasculares, gastrointestinales, hepáticas o renales. Igualmente aquéllos que tuvieran antecedentes de hipersensibilidad a benzodiazepinas u otros fármacos. Los pacientes y sus familiares fueron enterados del propósito del estudio y de los riesgos posibles y se les pidió firmar una carta de consentimiento, de acuerdo a las formas utilizadas en el Hospital de Neurología (Apéndice B). En el estudio fueron incluidos aquéllos pacientes psiquiátricos cuyo principal diagnóstico era ansiedad y para los cuales el tratamiento propuesto por el médico era diazepam. Al médico responsable se le entregó un protocolo (Apéndice B), a fin de que se sujetara a las restricciones lo más posible, como era el evitar hacer modificaciones en la administración de fármacos una vez iniciado el protocolo, salvo que fuera indispensable para la salud del paciente. El protocolo fue sometido igualmente al Comité Científico del Instituto para su aprobación. No se permitió la administración de ningún fármaco fuera de los señalados en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. CARACTERISTICAS DE LOS PACIENTES EN EL ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD.

Paciente	Edad (años)	Sexo	Peso (kg)	Estatura (cm)	Terapia Simultánea
1	32	F	57.0	159	-
2	38	F	68.5	162	Amitriptilina
3	17	F	58.2	157	Sulpirida
4	39	F	51.0	151	-
5	17	M	53.0	160	Amitriptilina
6	45	F	72.0	158	Amitriptilina
7	37	M	60.0	168	Mapotrilina
8	27	F	52.0	149	Imipramina

El estudio se llevó a cabo bajo un régimen de dosificación de dosis múltiples, de 5 mg t.i.d., a las 9, 14 y 19 hs (35, 89), y siguiendo un diseño experimental de cuadrado latino. Los pacientes fueron asignados al azar a uno de los 4 grupos, de 2 sujetos cada uno, y se les dió la secuencia de tratamiento de acuerdo al diseño que aparece en la Tabla 2.2.

El primer producto se administró en dosis de 5mg de diazepam t.i.d. durante los 10 primeros días, el segundo producto por los siguientes 7 días, el tercer producto por los siguientes 7 días y el último producto por los últimos 7 días del protocolo. El estudio se desarrolló con los pacientes hospitalizados. Todos los pacientes recibieron el producto de referencia (Valium, Roche Suiza) y cada uno de los productos comerciales nacionales. Todos los medicamentos se administraron con un vaso de agua.

Se recolectaron muestras de sangre (5ml) a las 9 hs (antes de la administración del medicamento) y a las 10:30 hs durante los días 9 y 10, 16 y 17, 23 y 24 y 30 y 31 de tratamiento. Las

muestras se centrifugaron y se separó el plasma, el cual se guardó en congelación a -4°C hasta el momento de su análisis. Las muestras fueron analizadas empleando el método cromatográfico previamente validado.

Tabla 2.2. Diseño de Tratamiento

Grupo	Pacientes	Fase I (1-10)	Fase II (11-17)	Fase III (18-24)	Fase IV (25-31) día
I	1,2	A	M	V	P
II	3,4	M	P	A	V
III	5,6	P	V	M	A
IV	7,8	V	A	P	M

A = ALBORAL Lote 88608

M = VALIUM ROCHE Lote 871002 (México)

P = PACITRAN Lote 8E1003

V = VALIUM ROCHE Lote 82478 (Suiza)

CAPITULO IV
R E S U L T A D O S

4.1. Control de Calidad de los Productos.

En la Tabla 4.1. se muestran los resultados obtenidos para las pruebas de variación de peso y uniformidad de contenido de los cuatro productos estudiados.

Tabla 4.1. Resultados de las pruebas de control de calidad

PRODUCTO	VARIACION DE PESO				UNIFORMIDAD CONTENIDO			
	\bar{x} (g)	(% C.V.)	%max	%min	% \bar{x}	(% C.V.)	%max	%min.
P	0.1927	(2.5)	3.4	5.5*	99.2	(1.0)	1.4	1.0
M	0.1708	(1.8)	2.6	5.3*	98.3	(1.5)	1.3	2.6
A	0.0812	(1.4)	2.7	1.9	102.8	(1.1)	2.1	1.4
V	0.1712	(1.1)	2.0	1.6	99.9	(1.1)	1.5	1.7

* sólo un comprimido presentó esta variación
 variación de peso n = 20
 uniformidad contenido n = 10

4.2. Validación del método espectrofotométrico empleado para la determinación del contenido de diazepam en comprimidos.

4.2.1. Linealidad.

En la Fig. 4.2. se muestra la curva de calibración obtenida para el método espectrofotométrico empleado en el rango de concentración de 0.5 a 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de diazepam.

4.2.2. Repetibilidad.

En la Tabla 4.2. se muestran los resultados obtenidos al analizar distintas curvas de calibración en dos días diferentes.

Tabla 4.2. Valores promedio de absorbancia obtenidos al analizar 6 curvas de calibración de diazepam en solución alcohólica de H_2SO_4 .

CONCENTRACION ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ABSORBANCIA (D.E.)	COEFICIENTE VARIACION %
0.625	0.060 (0.0019)	3.13
1.250	0.106 (0.0012)	2.78
2.500	0.220 (0.0033)	1.52
5.000	0.441 (0.0021)	1.16
10.000	0.870 (0.0032)	0.36

$$\bar{y} = 0.0869 x + 0.0028$$

$$r = 0.9999$$

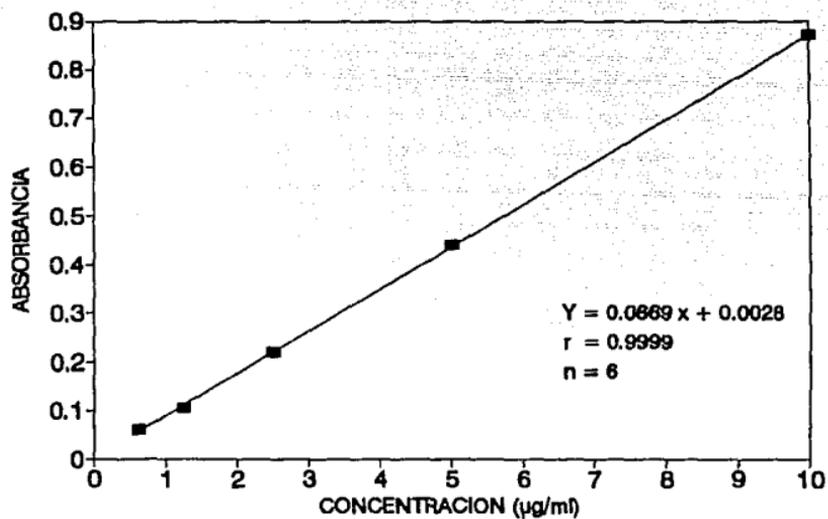


Fig. 4.2 Linearidad del método espectrofotométrico empleado en la cuantificación de diazepam en comprimidos.

4.2.3. Validación del método para cuantificar diazepam en comprimidos.

En la Tabla 4.3. se muestran los resultados obtenidos para el análisis estadístico de las muestras analizadas por el método propuesto para cuantificar el diazepam en los comprimidos.

Tabla 4.3. Validación del método espectrofotométrico para cuantificación de diazepam en comprimidos

$$\begin{aligned} \bar{X} &= 99.575 \\ S &= 1.060 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} S/\sqrt{n} &= 0.2370 \\ \text{I.C.}_{95} &= \bar{X} \pm t (S/\sqrt{n}) \end{aligned}$$

a)

$$\text{I.C.}_{95} = 99.08\% - 100.07\%$$

$$t_{\text{cal}} = 1.7932$$

$$t_{\text{td}, 0.05} = 2.093$$

b)

$$\text{Pr} (0.6496 < s^2 < 2.397) = 0.95 ; x_{\text{cal}} = 5.3371$$

$$\text{Pr} (0.8059 < s < 1.548) = 0.95 ; x_{\text{td}, 0.05} = 30.14$$

4.3. Pruebas de Disolución.

4.3.1. Prueba de disolución USP.

En la Tabla 4.4. se presentan los valores obtenidos para el porcentaje disuelto promedio (12 comprimidos), a distintos tiempos de muestreo para los cuatro productos estudiados (tres productos de fabricación nacional y el producto innovador, Valium Suiza), al emplear el método especificado en la USP XXI.

En la Figura 4.3., se muestran los perfiles de disolución obtenidos bajo las condiciones mencionadas.

Tabla 4.4. Promedio del porcentaje disuelto de diazepam por el método USP XXI

TIEMPO (min)	PORCIENTO DISUELTO			
	P % (C.V.)	M % (C.V.)	A % (C.V.)	V % (C.V.)
1	12.11 (9.7)	95.06 (8.1)	68.80 (8.5)	70.24 (4.2)
3	23.51 (7.1)	101.18 (1.7)	91.73 (5.4)	92.20 (1.9)
5	38.20 (3.3)	101.99 (1.7)	102.81 (2.4)	100.12 (1.7)
10	59.33 (3.3)	102.48 (1.3)	107.20 (4.3)	103.64 (1.5)
15	78.92 (1.9)	101.99 (1.5)	107.83 (4.2)	104.19 (1.7)
30	102.38 (2.4)	102.02 (1.6)	106.00 (4.3)	103.54 (1.7)
45	108.49 (0.9)	101.19 (1.8)	103.72 (4.3)	103.72 (4.0)
60	109.37 (0.8)	100.96 (1.9)	104.71 (3.8)	102.66 (1.7)
90	107.89 (1.3)	99.41 (1.4)	103.00 (3.6)	101.35 (1.4)
120	106.57 (1.8)	97.23 (1.1)	100.18 (4.5)	100.07 (1.9)

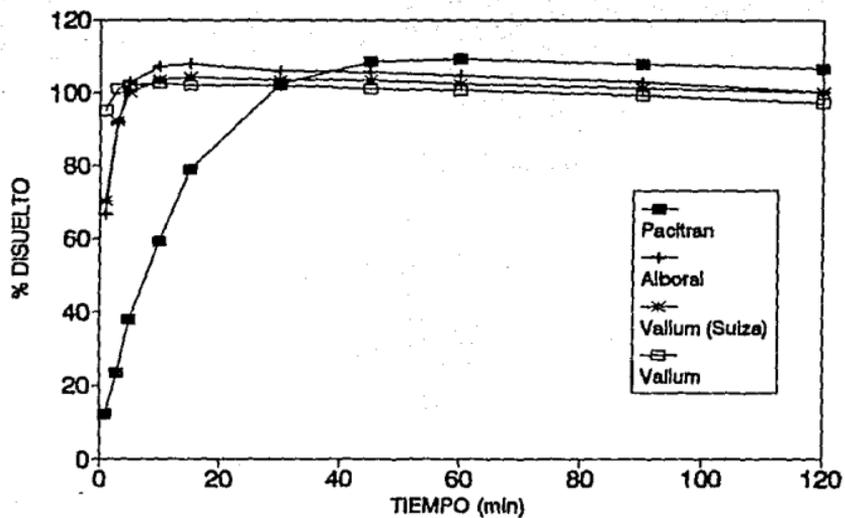


Fig. 4.3 Perfiles de disolución de los productos estudiados. (Método U.S.P. XXI: Apto 1, 100 rpm, 900 ml HCl 0.1N.)

4.3.2. Prueba de disolución por el método experimental II (Aparato 2 USP, a 50 r.p.m. en agua deionizada.).

En la Tabla 4.5. se presentan los valores obtenidos para el por ciento promedio disuelto (12 comprimidos), al emplear el método propuesto en agua.. Con estos valores se graficaron igualmente los perfiles de disolución de los productos bajo estudio, los cuales se presentan en la Figura 4.4.

Tabla 4.5. Promedio por ciento disuelto de diazepam por el método experimental II (Apto. 2 USP, 50 rpm y agua deionizada)

TIEMPO		PORCIENTO DISUELT O			
(min)	P % (C.V.)	M % (C.V.)	A % (C.V.)	V % (C.V.)	
1	4.36 (9.4)	6.50 (7.5)	7.76 (5.4)	8.94 (8.8)	
3	5.48 (9.3)	9.84 (10.9)	20.55 (4.5)	18.42 (8.9)	
5	9.37 (4.4)	12.58 (5.9)	32.12 (3.4)	23.92 (6.2)	
10	19.01 (6.8)	18.24 (3.7)	45.69 (2.1)	32.98 (3.8)	
15	29.22 (3.7)	21.62 (2.3)	52.85 (2.9)	38.58 (3.1)	
30	52.63 (4.8)	31.19 (4.7)	64.93 (3.2)	48.33 (2.8)	
45	71.87 (4.2)	37.98 (3.7)	69.34 (2.4)	54.93 (2.8)	
60	85.78 (3.5)	43.90 (3.1)	73.02 (3.2)	58.94 (1.8)	
90	94.22 (1.2)	52.11 (1.8)	75.80 (2.9)	64.88 (2.5)	
120	99.00 (1.8)	58.89 (1.3)	78.55 (2.9)	66.08 (1.3)	

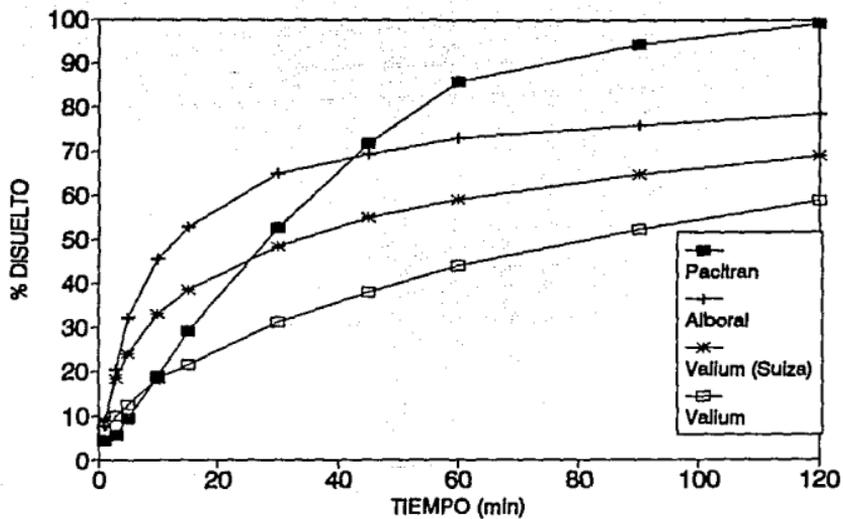


Fig. 4.4 Perfiles de disolución de los productos estudiados.
(Método II: Apto. 2, 50 rpm, 500 ml agua deionizada)

4.4. Validación del método empleado en la cuantificación de diazepam en plasma.

En la Figura 4.5. se presenta el cromatograma obtenido para el nitrazepam (estándar externo) y el diazepam en plasma, con tiempos de retención de 3.0 y 7.1 minutos respectivamente.

4.4.1. Linearidad.

En la Figura 4.6. se observa la linearidad del método en el rango de concentración de 30- 1000 ng/ml. Mediante un análisis de regresión por el método de mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación de una línea recta con pendiente 0.0028, intercepto -0.019 y coeficiente de correlación de 0.9999.

4.4.2. Precisión.

En la Tabla No. 4.6 se resumen los resultados de la precisión del método analítico en el rango de concentración de 30 a 1000 ng/ml.

4.4.3. Recuperación .

Los resultados de recuperación se presentan en la Tabla 4.7.

4.4.4. Sensibilidad .

Después del tratamiento de las muestras bajo las condiciones cromatográficas propuestas (Sección 3.4.4. y 3.4.5.), se encontró que la concentración mínima detectable corresponde a 25 ng/ml de diazepam en plasma.

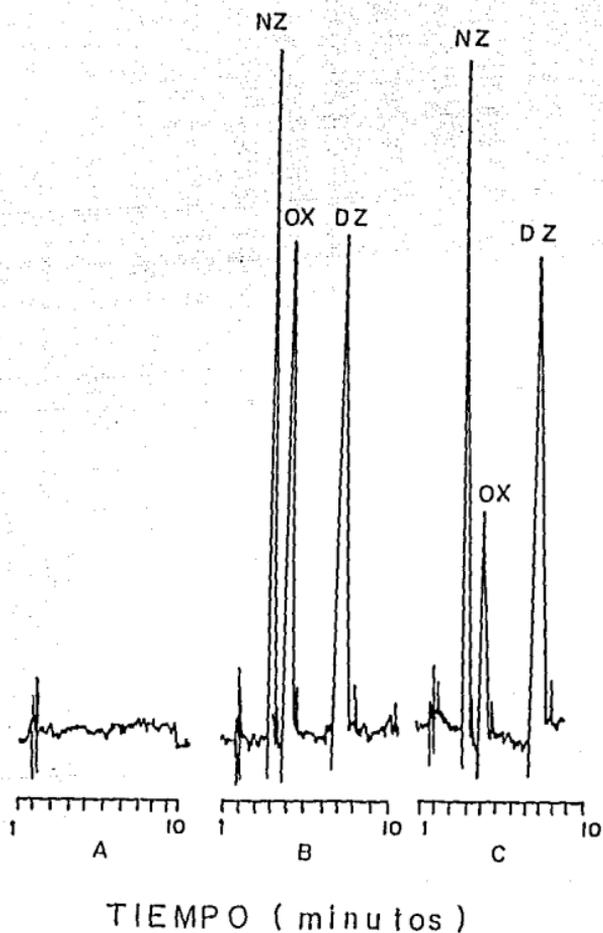


Fig. 4.5 Cromatogramas típicos de A) Extracto de plasma, B) Mezcla de estándares de nitrazepam (NZ), oxazepam (OX) y diazepam (DZ), C) Extracto de plasma conteniendo los tres compuestos.

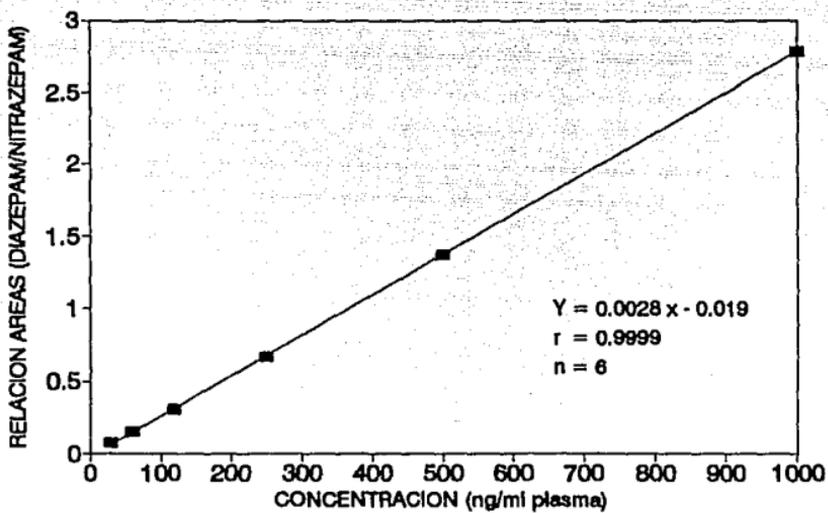


Fig. 4.6 Linealidad del método de cromatografía de líquidos de alta resolución empleado en la cuantificación de diazepam en plasma.

Tabla 4.6. Precisión del análisis de diazepam por cromatografía de líquidos de alta resolución

INTRA-ANALISIS Concentración (ng/ml)				INTER-ANALISIS Concentración (ng/ml)			
MEDIA	±	D.E. % C. V.	MEDIA	±	D.E. %	C. V.	
33.4	± 2.1	8.1	36.9	± 3.9	10.6		
62.9	± 4.8	7.6	69.1	± 7.3	10.6		
118.7	± 6.5	5.5	125.5	± 14.6	11.6		
244.9	± 9.0	3.7	234.8	± 27.9	11.9		
499.4	± 11.4	2.3	498.6	± 29.4	5.9		
1001.2	± 16.1	1.6	1003.9	± 65.2	6.5		
PROMEDIO 4.8			PROMEDIO 9.5				

Tabla 4.7. Recuperación de diazepam en plasma

CONCENTRACION (ng/ ml)	AREAS PROMEDIO DIAZEPAM PLASMA	AREAS PROMEDIO DIAZEPAM SOLUCION	% RECUPERACION
30	0.076	0.105	72.4
80	0.153	0.219	69.9
120	0.307	0.459	68.9
250	0.672	0.986	68.2
500	1.376	1.989	69.2
1000	2.782	3.912	71.1

n = 9
 MEDIA = 69.8
 D. E. = 1.98
 % C. V. = 2.8

4.5. ESTABILIDAD DE DIAZEPAM EN MUESTRAS PLASMATICAS.

Al efectuar la prueba de estabilidad se obtuvieron los valores de la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Estabilidad del diazepam en plasma

TIEMPO (semanas)	CONCENTRACION (ng/ ml)				
INICIAL	82.5	125	250	500	1000
1	80.4	130	240	492	1009
2	68.0	128	248	493	1012
3	80.0	129	228	502	976
4	63.0	125	248	499	1001

4.6. APLICACION DEL METODO ANALITICO EN EL ANALISIS DE MUESTRAS EN PACIENTES SOMETIDOS A TERAPIA MULTIPLE.

4.6.1. Especificidad.

En la Tabla 4.9. se muestran los tiempos de retención de diversos fármacos analizados conjuntamente con el diazepam.

Tabla 4.9. Tiempos de Retención obtenidos al analizar soluciones conteniendo mezclas de diazepam y otros fármacos.

FARMACO	TIEMPO DE RETENCION (min)	CONC. TERAPEUTICA (μ g/ ml)
Carbamazepina	3.78	4 - 10
Difenilhidantoina	2.40	8 - 12
Fenilbutazona	0.98	50 - 150
Imipramina	*	100 - 300
Fenobarbital	1.65	10 - 25
Primidona	1.32	5 - 10
Diazepam	7.00	0.3 - 0.6
Acetaminofen	*	10 - 20

* No se detecta

4.6.2. Muestras clínicas.

En la Tabla 4.10. se presentan las concentraciones plasmáticas encontradas en pacientes bajo terapia con este fármaco. Igualmente en la Tabla 4.11. se resumen los niveles encontrados en tres pacientes psiquiátricos a los que se les administró un régimen de tres dosis diarias de diazepam de 5 mg (5 mg t.i.d.), durante cuatro semanas.

Tabla 4.10. Niveles de diazepam encontrados en muestras clínicas

PACIENTE	DOSIS	TERAPIA SIMULTANEA	CONCENTRACION (ng/ ml)
1	10 mg (I.V.) (dosis única)	Difenilhidantoína	396 [±] 10.9 (2.7)
2	10 mg / día p.o. 3 días	Difenilhidantoína, paracetamol, dextropopoxifeno, imipramina	440 [±] 5.3 (1.2)
3	10 mg/ día p.o. 19 días	Isosorbide, amiodarona dipiridamol	314 [±] 7.9. (2.5)
4	5 mg/ día p.o. 5 días	Isoniazida, etambutol rifampicina, Vit B ₆	204 [±] 5.6 (2.7)
5	2 mg/ día p.o. 10 días	Difenilhidantoína, paracetamol, dextropopoxifeno, imipramina	175 [±] 6.5 (8.7)
6	8 mg (I.V.) (dosis única)	Difenilhidantoína	57 [±] 2.8 (4.9)
7	10 mg p.o. (dosis única)	Ninguna	35 [±] 2.4 (4.9)
8	6 mg/ día	Trimetoprim, acetaminofén, sulfametoxazol, rifampicina, dextropropoxifeno, hidróxido de magnesio	No detectable

* Media [±] D.E. (% C.V.).

Tabla 4.11. Niveles de diazepam obtenidos en el estado estacionario en pacientes psiquiátricos.

PACIENTE	SEXO	EDAD	MEDICACION SIMULTANEA	Cp EE (ng/ml) *
9	F	32	Ninguna	262.5 [±] 5.9 (2.2)
10	F	17	Sulpirida	463.7 [±] 11.7 (2.5)
11	M	17	Am triptilina	485.5 [±] 32.6 (6.7)

* Media [±] D.E. (%C.V.)

4.7. ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE DIAZEPAM AL ESTADO ESTACIONARIO A PARTIR DE PRODUCTOS COMERCIALES, EN PACIENTES PSIQUIATRICOS.

En la Tabla 4.12. se muestran los valores promedio de las concentraciones de diazepam en plasma (C_{min} y $C_{1.5h}$) obtenidos para cada sujeto después de la administración de los cuatro productos estudiados (todos los análisis se realizaron por duplicado).

Los resultados promedio para la concentración mínima (antes de la primera dosis diaria), y la concentración a las 1.5 h después de la primera dosis, encontrados en cada sujeto en los dos últimos días de tratamiento están representados en la Figura 4.7. En la Figura 4.8 se presentan las concentraciones promedio de ocho pacientes obtenidas a los mismos tiempos (C_{min} y $C_{1.5h}$) con las cuatro formulaciones comerciales.

Tabla 4.12. Concentraciones de diazepam al estado estacionario obtenidas a partir de los productos estudiados.

Sujeto	Día	T. muestr.	* Semana 1 Semana 2 Semana 3 Semana 4			
			Concentración (ng /ml)			
1	1	C mín	279.6	296.9	236.9	210.5
		C 1.5	338.0	320.9	266.0	253.5
	2	C mín	276.9	258.8	310.0	265.4
		C 1.5	315.0	362.9	367.2	265.6
2	1	C mín	344.8	261.6	196.9	273.6
		C 1.5	380.1	406.1	353.7	307.2
	2	C mín	349.1	313.8	216.8	256.6
		C 1.5	387.5	352.3	347.2	377.0
3	1	C mín	478.1	450.6	518.7	224.3
		C 1.5	488.1	470.3	565.0	229.9
	2	C mín	470.2	399.8	519.0	215.2
		C 1.5	490.3	448.2	550.0	280.4
4	1	C mín	314.6	452.2	424.2	493.5
		C 1.5	465.4	452.2	424.2	493.5
	2	C mín	436.6	484.7	439.9	490.5
		C 1.5	480.1	561.5	472.8	517.1
5	1	C mín	542.3	393.3	478.7	424.2
		C 1.5	543.6	506.9	531.5	601.5
	2	C mín	461.0	366.8	474.8	462.7
		C 1.5	671.2	521.0	530.7	485.9
6	1	C mín	290.6	447.5	510.0	418.4
		C 1.5	332.7	478.4	528.0	477.7
	2	C mín	299.5	457.0	444.7	443.3
		C 1.5	302.8	448.5	423.5	550.9
7	1	C mín	491.1	392.6	403.9	407.1
		C 1.5	515.5	675.2	588.5	568.4
	2	C mín	417.6	497.1	426.2	412.3
		C 1.5	485.9	528.9	632.9	433.7
8	1	C mín	424.8	294.2	346.8	468.6
		C 1.5	479.6	497.5	606.7	668.1
	2	C mín	427.1	322.8	347.1	409.5
		C 1.5	440.0	497.9	609.7	576.5

* La secuencia de tratamiento se indica en la Tabla 2.2.

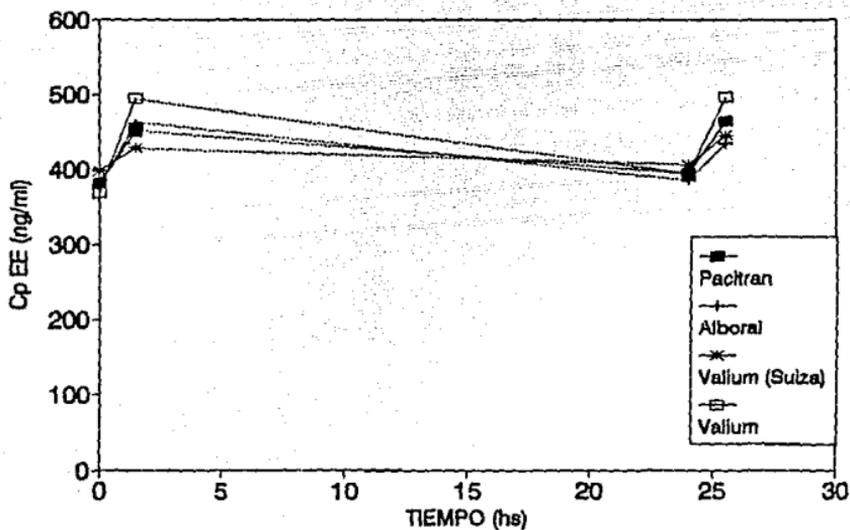


Fig. 4.8 Niveles plasmáticos promedio de diazepam al estado estacionario obtenidos a partir de los productos estudiados (n=8).

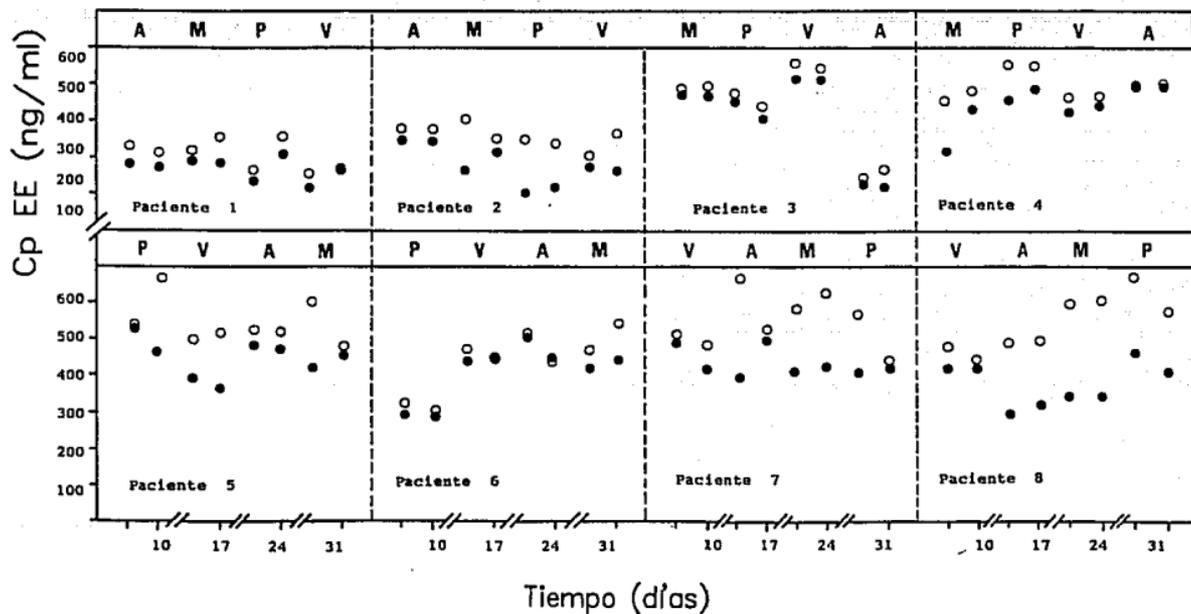


Fig. 4.7 Niveles plasmáticos de diazepam al estado estacionario obtenidos a partir de las cuatro formulaciones (o antes de la 1a. dosis (Cmin), o a la 1.5 h (C1.5)).

A partir de los datos crudos de niveles plasmáticos alcanzados después de la administración de los diferentes productos, se aplicó un análisis de varianza para cuadrado latino en los dos últimos días de cada tratamiento, a cada uno de los tiempos de muestreo (C_{mtn} , $C_{1.5h}$). Los resultados del análisis de varianza se resumen en la Tabla 4.13.

Los niveles plasmáticos encontrados se corrigieron posteriormente en relación al peso corporal de cada paciente. Estos datos aparecen en la Tabla 4.14.

4.7.1. Concentraciones de diazepam al estado estacionario.

En vista de que existe muy poca información respecto a los niveles de diazepam al estado estacionario después de una administración crónica (que es el régimen más comúnmente empleado), se calculó el promedio de las concentraciones al estado estacionario, $\bar{C}_{p_{\infty}}$, (media de todas las concentraciones determinadas durante el tratamiento de 31 días para cada uno de los pacientes, las cuales se resumen en la Tabla 4.15).

Finalmente, se calculó la relación de $C_{p_{max}}$ ($C_{1.5h}$) respecto a C_{mtn} para cada paciente. Los valores de dichos cocientes se presentan en la Tabla 4.16.

Tabla 4.13 . Análisis de varianza de las concentraciones obtenidas al estado estacionario, con los productos estudiados

	R A D I O				F			
	C_{mtn}	D_1	$C_{1.5}$	D_1	C_{mtn}	D_2	$C_{1.5}$	D_2
GRUPO	8.82 *		11.87 *		7.58 *		7.90 *	
SUJ/ GRUPO	0.23		1.20		0.80		1.65	
SEMANAS	0.20		0.21		0.33		0.79	
TRATAMIENTO	0.16		0.45		0.14		0.91	

* $p < 0.01$

Tabla 4.14. Valores de concentración plasmática al estado estacionario corregidos por peso corporal

Sujeto	Día	T. muestr.	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
			Concentración / Kg peso			
1	1	C mln	4.91	5.21	4.16	3.69
		C 1.5	5.93	5.83	4.67	4.48
	2	C mln	4.86	4.54	5.44	4.86
		C 1.5	5.53	6.37	6.44	4.66
2	1	C mln	5.03	3.81	2.87	3.99
		C 1.5	5.54	5.92	5.16	4.48
	2	C mln	5.09	5.57	3.16	3.74
		C 1.5	5.65	5.14	5.06	5.49
3	1	C mln	8.21	7.74	8.91	3.95
		C 1.5	8.39	8.08	9.71	3.95
	2	C mln	8.08	6.87	8.92	3.70
		C 1.5	8.42	7.70	9.45	4.82
4	1	C mln	6.17	8.87	8.32	9.68
		C 1.5	9.13	11.12	9.23	9.74
	2	C mln	8.56	9.50	8.62	9.62
		C 1.5	9.41	11.01	9.27	10.14
5	1	C mln	10.23	7.42	9.03	8.80
		C 1.5	10.25	9.58	10.03	11.35
	2	C mln	8.70	6.92	8.96	8.73
		C 1.5	12.66	9.83	10.01	9.17
6	1	C mln	4.04	6.22	7.08	5.81
		C 1.5	4.62	6.64	7.33	6.63
	2	C mln	6.16	6.35	6.18	6.16
		C 1.5	4.21	6.23	5.88	7.65
7	1	C mln	8.19	6.54	6.73	6.79
		C 1.5	8.59	11.25	9.81	9.47
	2	C mln	6.96	8.29	7.10	6.87
		C 1.5	8.10	8.82	10.55	7.23
8	1	C mln	8.17	5.66	6.67	9.01
		C 1.5	9.22	9.57	11.67	12.85
	2	C mln	8.21	6.21	6.66	7.88
		C 1.5	8.46	9.23	11.73	11.00

Tabla 4.15 . Concentraciones promedio de diazepam al estado estacionario

Sujeto	\bar{C}_p	D. E.
1	289.0	44.0
2	320.0	62.6
3	424.9	119.0
4	477.9	58.0
5	499.8	75.2
6	428.3	81.0
7	492.3	87.5
8	453.8	109.8

\bar{C}_p = Promedio de todas las determinaciones

Tabla 4.16. Valores obtenidos para la relación $C_{1.5} / C_{min}$ en los 8 pacientes

DIA	A	P	M	D	U	C	T	O	V
1	1.22	1.34	1.18						1.08
2	1.13	1.26	1.17						1.10
		MEDIA =		1.18 =		1.2			
		D. E. =		0.08					
		% C. V. =		7.3					

CAPITULO V
DISCUSION DE RESULTADOS

5.1. CONTROL DE CALIDAD DE LOS PRODUCTOS.

5.1.1. Variación de Peso.

De los resultados obtenidos (Tabla 4.1) se encontró que sólo en el caso de los productos "P" y "V" un comprimido de los 20 utilizados para la prueba sobrepasó ligeramente el límite del 5% establecido oficialmente; sin embargo, la farmacopea acepta una variación de esta magnitud hasta en 2 comprimidos. En el resto de los productos la variación de peso fue inferior al 5%, por lo que se puede considerar que todos los productos cumplieron satisfactoriamente con las especificaciones que marca la USP XXI para la prueba de variación de peso.

5.1.2. Contenido Químico.

5.1.2.1. Validación del método espectrofotométrico.

En vista de que se consideró un método espectrofotométrico como alternativa para la cuantificación del diazepam, fue necesario validar este método. De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede considerar que el método presenta una linealidad satisfactoria (Figura 4.2.). El método a su vez, presenta una precisión adecuada dado que el coeficiente de variación para las concentraciones consideradas en las curvas de calibración en el rango de 0.5 a 10 $\mu\text{g/ml}$, es inferior al 3%, como puede observarse en los datos de la Tabla 4.2.. Al realizar un análisis de varianza a los datos de las curvas obtenidas en 2 días diferentes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, por lo que el método presenta una repetibilidad adecuada de día a día (Tabla 5.1.).

Tabla 5.1. Repetibilidad entre días para el método espectrofotométrico empleado en la cuantificación de diazepam en comprimidos

FUENTE DE VARIACION	SUMA CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIO	F
DIA	5.40×10^{-9}	1	5.40×10^{-9}	0.0214
ERROR	1.01×10^{-6}	4	2.53×10^{-7}	(N.S.)
TOTAL	1.0154×10^{-6}			

$$F_{0.05; 1, 4} = 7.75$$

5.1.2.2. Validación de la Técnica para cuantificación de diazepam en comprimidos.

De acuerdo a los intervalos de confianza establecidos para la exactitud y la precisión del método (Tabla 4.2.), se puede considerar que el método es reproducible y exacto. Los mismos resultados se obtuvieron al llevar a cabo el análisis estadístico por pruebas de hipótesis.

Respecto a esta técnica es posible decir que es lo suficientemente exacta y reproducible para ser utilizada en el análisis del contenido de principio activo de comprimidos de diazepam, además de ser sencilla y rápida. Dado que esta técnica es la que se utilizó para la determinación de la uniformidad de contenido, la rapidez del análisis constituye un factor importante a considerar. en función del número de muestras analizadas por lote (10 comprimidos).

5.1.3. Uniformidad de contenido.

Todos los productos estudiados cumplieron satisfactoriamente con la prueba de uniformidad de contenido. Como puede apreciarse en los datos obtenidos en la Tabla 4.1., la variación es mínima en todos los casos, y en ningún comprimido sobrepasa el 5%, en

comparación al 15% que establece como límite la USP. El coeficiente de variación fue menor al 6% para todos los casos. Esta prueba debe realizarse a cada producto para tener un control efectivo de las dosificaciones y conocer la variabilidad que pudiera existir. La prueba de uniformidad de contenido para diazepam ha sido incluida dentro de los requisitos de biodisponibilidad que establece la FDA y que deben reunir los productos comerciales que contienen diazepam para poder ser considerados como bioequivalentes ("PRUEBAS IN VITRO"). En el presente trabajo es básico que los productos presenten una uniformidad de contenido adecuada, a fin de descartar la posibilidad de que ésta pudiera ser la causa de posibles diferencias en los niveles obtenidos al administrar este producto en humanos.

5.2.. PRUEBAS DE DISOLUCION.

5.2.1. Como se puede observar en la Tabla 4.4. y en la Figura 4.3., los productos estudiados cumplieron con las especificaciones que marca la USP (no menos del 85% disuelto a los 30 minutos), ya que a ese tiempo todos los productos liberaron el 100% de principio activo. La disolución del diazepam en las condiciones que marca la farmacopea es muy rápida, y sólo en el producto "P" se llega a observar una disolución mas lenta durante los primeros 15 minutos productos sin embargo, el porcentaje disuelto para este producto iguala el 100% a los treinta minutos.

Con objeto de establecer si las diferencias encontradas en la disolución de los productos a los tiempos iniciales son estadísticamente significativas, se realizó el análisis de varianza para el porcentaje disuelto de diazepam al minuto (Tabla 5.2.) y a los 15 minutos (Tabla 5.3.) respectivamente,

encontrándose que existen diferencias altamente significativas, por lo que a pesar de que no existen diferencias en la cantidad total disuelta para los productos estudiados, sí se encontraron en la velocidad de disolución, bajo las condiciones especificadas en la USP.

Con objeto de establecer la cinética de disolución de diazepam en estas condiciones, se graficó el logaritmo del porcentaje no disuelto v.s. tiempo para cada producto (Figura 5.1.).

Al graficar el log de porcentaje no disuelto v.s. tiempo, se obtuvo una línea recta para los productos "A", "M " y "P"., lo cual indica que la velocidad de disolución en estos casos sigue una cinética de primer orden (109).

Tabla 5.2. Análisis de varianza para el porcentaje de diazepam disuelto a un minuto por el método USP XXI.

FUENTE VARIACION	SUMA CUADRADOS	G. L.	CUADRADO MEDIO	F
PRODUCTOS	7345.8328	3	2448.61	99.7895 ***
ERROR	98.1511	4	24.54	
TOTAL	7443.9837	7		

$$F_{3,4;0.05} = 6.59$$

$$F_{3,4;0.01} = 18.69$$

Tabla 5.3. Análisis de varianza para el por ciento de diazepam disuelto a los 15 minutos por el método USP XXI.

FUENTE VARIACION	SUMA CUADRADOS	G. L.	CUADRADO MEDIO	F
PRODUCTOS	1029.5097	3	343.1699	281.87 **
ERROR	4.8699	4	1.2175	
TOTAL	1034.3796	7		

$$F_{3,4,0.05} = 6.59$$

$$F_{3,4,0.01} = 16.69$$

A partir de la pendiente de las rectas de regresión, obtenidas por el método de mínimos cuadrados, se obtuvo la constante de velocidad de disolución para cada producto (Tabla 5.4.). En el caso del producto "M", no fue posible determinar la cinética de disolución, ni consecuentemente la constante, puesto que este producto liberó el 100% de principio activo a los 3 minutos de iniciada la prueba. Para los productos "A" y "V", se liberó el 100% de principio activo a los 5 minutos. Considerando que existen diferencias entre el producto "P" y el producto de referencia (innovador), es posible pensar que estas diferencias pudieran reflejarse en la velocidad de absorción del diazepam, en el caso de que la disolución represente el paso limitante para la absorción del principio activo.

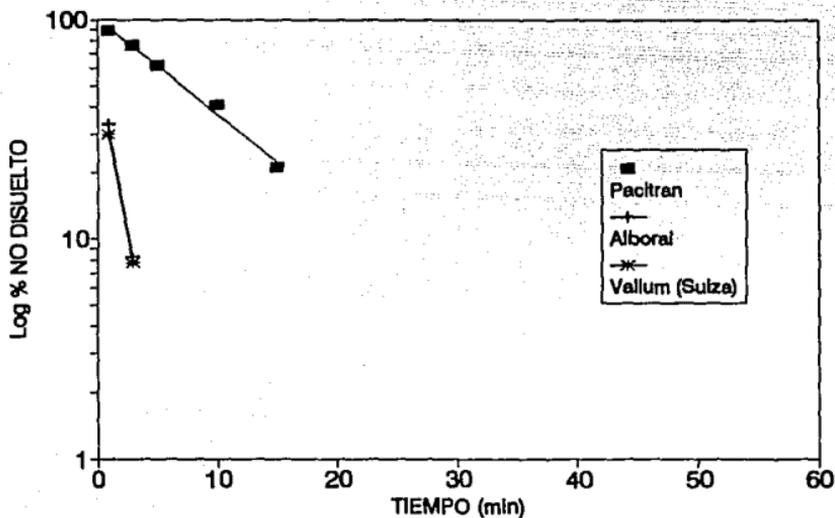


Fig. 5.1 Porcentaje remanente de diazepam por disolverse con el método U.S.P. XXI (Apto. 1, 100 rpm, 900 ml HCl 0.1N).

A partir de los datos obtenidos se obtuvo también el t_{50} para cada producto, que aparece en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Constantes de velocidad de disolución de los productos estudiados (Método USP XXI)

PRODUCTO	K dis (min^{-1})	T_{50} (min)	T_{50} (exp) (min)	COEFICIENTE CORRELACION
A	0.6950	0.99	*	1.0000
M				-
P	0.1010	6.9	7.2	0.9945
V	0.6780	1.0	*	1.0000

* no se puede determinar por la magnitud de la velocidad.

Es importante hacer notar que en los cuatro productos se obtuvieron coeficientes de variación inferiores al 5% para los datos obtenidos en la prueba de disolución, lo cual habla de un estrecho control de calidad y en la producción de los productos estudiados. Únicamente en los primeros tiempos, como era de esperarse, los coeficientes de variación son mayores (1 y 3 min) para algunos de los productos (Tabla 4.4.).

5.2.2. Como se puede observar en los datos de la Tabla 4.5. y en la Figura 4.5., la disolución bajo las condiciones experimentales propuestas (Apto.2 USP a 50 r.p.m. y agua como medio de disolución), es muy baja en comparación a los resultados que se obtienen con la prueba de disolución farmacopeica. Así mismo, las características de disolución varían grandemente en comparación a

las obtenidas en el medio ácido que recomienda la farmacopea. En el caso del método propuesto, sólo el producto "P", que presenta

la velocidad de disolución más lenta en medio ácido, alcanza alrededor del 100 % disuelto a los 120 minutos; los otros tres sólo liberan de un 80 a 80 % del principio activo bajo las condiciones de esta prueba. Como se hizo referencia en un estudio previo (8) , estas condiciones permiten diferenciar más claramente entre productos, sin embargo a pesar de las diferencias en los perfiles, lo importante es tener un comportamiento similar al producto estándar y la conclusión final deberá basarse en la posible correlación de estos datos con los resultados obtenidos " in vivo ". El comportamiento de disolución del producto "P" puede atribuirse a la inclusión de algún excipiente en la formulación que favorece la disolución en agua, el cual podría ser un agente tensoactivo ó bien un agente solubilizante. Cabe mencionar que en este caso, también se obtuvieron coeficientes de variación muy bajos, lo cual comprueba la uniformidad de los productos estudiados (Tabla 4.5.).

Al igual que para el caso de la prueba de disolución farmacopeica, se determinó la cinética de disolución de los productos, graficando el logaritmo del porcentaje no disuelto contra tiempo, obteniéndose las curvas que aparecen en la Figura 5.2. En este caso se presentan diferentes velocidades de disolución para cada producto (distintas pendientes), lo cual indica que existen distintos procesos de liberación (110). En esta gráfica es evidente el diferente comportamiento observado para el producto "P".

Los datos de disolución obtenidos por este método se representaron gráficamente, de acuerdo a una cinética de orden cero, de la ley de la raíz cúbica y de la raíz cuadrada, sin embargo en ningún caso se obtuvo una alineación adecuada para la representación global del proceso de disolución de los productos, por lo cual se concluye que bajo estas condiciones se presenta una serie de procesos continuos de disolución. Al graficar el

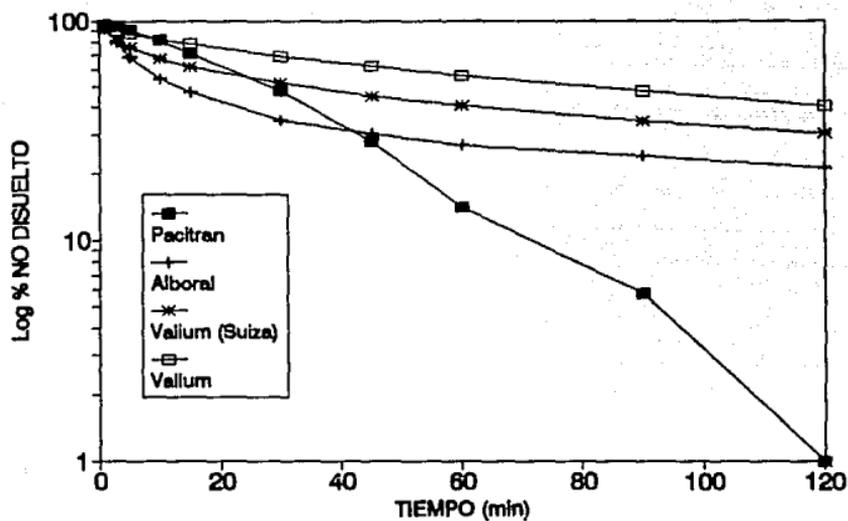


Fig. 5.2 Porcentaje remanente de diazepam por disolverse con el método II (Apto. 2, 50 rpm, 500 ml agua desionizada).

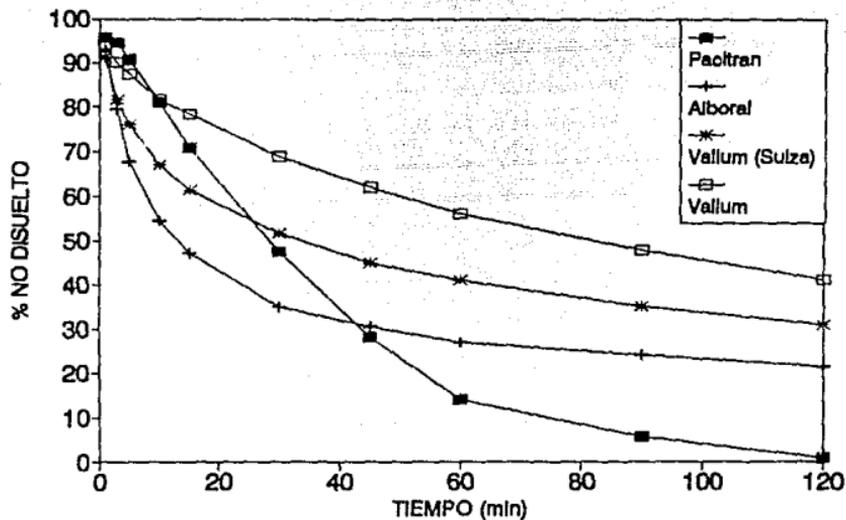


Fig. 5.3 Porcentaje remanente de diazepam por disolverse con el método II (Apto. 2, 50 rpm, 500 ml agua delonizada).

porcentaje remanente para ser disuelto para los distintos productos (Figura 5.3) se obtuvieron también una serie de procesos, sin embargo, si se toman como referencia los primeros tiempos de muestreo, los valores para las constantes de orden cero que se obtienen se acercan más a los T_{50} experimentales, por tal motivo, se considera que estas constantes representan más adecuadamente la cinética del proceso que controla la velocidad de disolución (paso limitante del proceso de disolución). Es probable que en este caso, el primer proceso de liberación del principio activo esté representado por la porción final (proceso más lento), el cual pudiera atribuirse a la disgregación. Las constantes de velocidad de orden cero y los valores de T_{50} obtenidos para los productos, por el método experimental II, se muestran en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7. Constantes de velocidad de disolución de los productos estudiados (método II)

PRODUCTO	K dis (% min ⁻¹)	T ₅₀ (min)	T ₅₀ (exp) (min)	COEFICIENTE CORRELACION
A	4.1444	12.06	13.00	0.9723 (r _B *)
M	0.8161	81.16	84.00	0.9817 (r _D *)
P	1.7029	29.36	30.00	0.9878 (r _A *)
V	1.281	39.03	36.00	0.9958 (r _A *)

(*) r_B, r_D, etc. = # de datos considerados en el cálculo de K dis

5.3..VALIDACION DEL METODO EMPLEADO EN LA CUANTIFICACION DE DIAZEPAM EN PLASMA.

Como se puede observar en la Figura 4.6, el método presenta una buena resolución tanto para el diazepam como para el nitraxepam (estándar externo). No se observó interferencia con el material endógeno del plasma (Figura 4.6 A); así mismo el oxazepam, metabolito del diazepam se resuelve satisfactoriamente, con un tiempo de retención de 5 minutos.

5.3.1. Linearidad.

La curva promedio obtenida para la cuantificación del diazepam en plasma (Fig.4.7) presentó una linealidad satisfactoria en el rango de concentración de 30 a 1000 ng/ml. Dado que las concentraciones reportadas en la literatura después de la administración de un régimen de dosificación semejante al utilizado en el presente estudio se encuentran entre 150 y 800 ng/ml (3,15,18,35), el método puede ser utilizado adecuadamente para los fines propuestos.

5.3.2. Precisión.

En la Tabla 4.6 se puede observar que el máximo coeficiente de variación obtenido fue de 8.3% a una concentración de 33.4 ng/ml, por lo que el método puede considerarse preciso; así mismo el coeficiente de variación entre días se encuentra entre 5.9 y 11.9%, lo que indica que el método es repetible en diferentes días.

5.3.3. Recuperación.

La recuperación del diazepam, determinada por comparación de las áreas de extractos de diazepam en plasma, con las áreas de muestras de diazepam en solución, corresponde aproximadamente al 70% (Tabla 4.7.). Kabra y col. (100) encontraron valores de 65-70%, Dousse y col. (111) informan 69-72% y Cottler y col. (112) 65-70%, por lo que los resultados obtenidos con el presente método, son comparables a los de otros autores.

5.3.4. Estabilidad.

Las muestras pueden ser congeladas durante un periodo mínimo de un mes sin que se observe degradación de las mismas. (Tabla 4.8.).

5.3.5. Sensibilidad (Concentración mínima detectable).

El límite de detección (determinado como la concentración a la cual la relación señal a ruido es igual a 2) es de 25 ng/ml.

5.3.6. Concentración mínima cuantificable.

La concentración mínima cuantificable (mínima concentración a la cual se obtiene un coeficiente de variación inferior al 10%), corresponde a 30 ng de diazepam/ml de plasma (Tabla 4.8.). Considerando que las concentraciones mínimas encontradas por otros autores después de la administración de una dosis única de 10 mg de diazepam son de 20 a 30 ng/ml, el método puede ser utilizado satisfactoriamente en estudios de farmacocinética (18).

5.4. APLICACION DEL METODO ANALITICO EN EL ANALISIS DE MUESTRAS DE PACIENTES SOMETIDOS A TERAPIA MULTIPLE.

5.4.1. Especificidad.

En la Tabla 4.9. se muestran los tiempos de retención obtenidos al inyectar soluciones metanólicas conteniendo diazepam y diversos fármacos, bajo las condiciones cromatográficas descritas, donde se puede apreciar que todos los fármacos tienen tiempos de retención muy cortos. A pesar de que los tiempos de

retención para la carbamazepina y la difenilhidantoina son cercanos al nitrazepam, la resolución es buena. Al analizar muestras plasmáticas conteniendo mezclas de diazepam con otros fármacos, sólomente se detectaron el diazepam, nitrazepam y oxazepam, lo que indica que el procedimiento es selectivo.

5.5. MUESTRAS CLINICAS .

En la Tabla 4.10. se presentan las concentraciones plasmáticas encontradas en pacientes tratados con diazepam en combinación con distintos fármacos. El análisis de cada muestra se verificó por cuadruplicado interpolando el valor del área en una curva patrón preparada el día del análisis. No se observaron interferencias de los fármacos administrados al utilizar el método. La repetibilidad del análisis de estas muestras es igualmente satisfactoria, ya que los coeficientes de variación obtenidos son menores del 10%.

Los niveles de diazepam encontrados en la mayoría de los pacientes se encuentran dentro de los valores informados por otros autores. Así después de la administración intravenosa de 10 mg se han obtenido concentraciones iniciales entre 150 a 574 ng/ml (18) y entre 700 a 800 ng/ml dentro de los primeros 3 a 15 minutos (15).

Siguiendo una administración oral de una dosis de 5, 10 ó 20 mg, las concentraciones plasmáticas máximas informadas se encuentran entre 120 a 250 ng/ml, 130-300 ng/ml y de 300-500 ng/ml, respectivamente en voluntarios sanos (113).

En el caso de los pacientes 6 y 7, las concentraciones encontradas fueron mas bajas de las esperadas, sin embargo la recolección de muestras en estos pacientes no se realizó a los 90 minutos sino 5 horas después de la toma del medicamento. En el caso del paciente 8 no se logró detectar el diazepam, a pesar de que el tiempo de muestreo fue correcto. Este resultado se puede

atribuir a la administración simultánea de hidróxido de magnesio, ya que se sabe que éste puede afectar la absorción del diazepam. (35).

En la Tabla 4.11. se muestran los niveles plasmáticos encontrados en tres pacientes psiquiátricos, después de un régimen de 5mg t.i.d., durante 4 semanas. Eatman y colaboradores (35) encontraron en 1984 , concentraciones al estado estacionario en un rango de 123 a 659 ng/ml al emplear el mismo régimen en voluntarios sanos. Como se observa, los valores encontrados en estos pacientes, se encuentran dentro del mismo rango.

5.6. ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE DIAZEPAM AL ESTADO ESTACIONARIO A PARTIR DE PRODUCTOS COMERCIALES, EN PACIENTES PSIQUIATRICOS.

Con los datos que se presentan en la Tabla 4.12 se graficaron los perfiles plasmáticos de diazepam obtenidos al estado estacionario, durante el estudio de biodisponibilidad clínica, llevado a cabo con las tres formulaciones comerciales de fabricación nacional y el producto de referencia, los cuales se muestran en la Figura 4.8.. Como puede apreciarse en todos los casos los niveles permanecieron dentro del rango terapéutico recomendado para lograr el efecto ansiolítico, manteniéndose entre 200 y 380 ng/ml en el caso de los pacientes que presentaban los niveles menores, y entre 300 y 600 ng/ml para el resto de los pacientes.

Al graficar los valores promedio de los 8 pacientes, obtenidos a cada uno de los tiempos de muestreo (Figura 4.9.), puede observarse claramente que dichos niveles pueden ser prácticamente superpuestos, por lo que las concentraciones alcanzadas con los cuatro productos pueden considerarse comparables.

A pesar de que pudiera pensarse que los tiempos de muestreo son

insuficientes para un estudio de biodisponibilidad, debido a las restricciones establecidas por el responsable médico del estudio con el fin de proteger la estabilidad de los pacientes, fue necesario plantear en el diseño experimental un número mínimo de determinaciones, el cual a la vez permitiera obtener resultados válidos, por lo cual se tomaron como base dos investigaciones realizadas con anterioridad en otros países. En uno de estos estudios Berlin y colaboradores (2), evaluaron la bioequivalencia de 2 formulaciones comerciales de tabletas de 5 mg de diazepam y una suspensión, mediante un tratamiento de dosis múltiples, siguiendo un diseño prácticamente igual al del presente trabajo, y encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles alcanzados después de administrar la suspensión y compararlos con los obtenidos con el producto de referencia (Valium, Roche); en el caso de las tabletas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Gustafson y colaboradores (89) determinaron la biodisponibilidad de una cápsula de liberación controlada, comparando los perfiles al estado estacionario obtenidos después de la administración de este producto en relación a una dosis similar repartida en 3 dosis diarias al día del estándar de referencia. En este estudio tanto el patrón de referencia (5 mg t.i.d.) como la cápsula de liberación controlada de 15 mg, se administraron durante 14 días. Los resultados obtenidos de área bajo la curva después de la administración crónica en un intervalo de dosificación al estado estacionario fueron consistentes con un estudio previo de dosis única. Los datos demostraron concentraciones plasmáticas virtualmente idénticas antes de la primera toma diaria del medicamento (C_{min}) y a las 1.5 horas después de la administración ($C_{1.5 h}$), al estado estacionario, para ambos tratamientos.

Por otro lado, el hecho de que dichos niveles hayan sido determinados bajo condiciones reales de tratamiento en pacientes

psiquiátricos, a su vez permite contar con información del comportamiento clínico de los productos, así como la respuesta de los pacientes al tratamiento.

5.6.2. Análisis Estadístico.

De acuerdo al análisis de varianza realizado a los datos crudos, que aparecen en la Tabla 4.13, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre los niveles plasmáticos encontrados al estado estacionario para las cuatro formulaciones; esto es, los perfiles sanguíneos después de la administración de los productos comerciales de fabricación nacional estudiados y el del producto de referencia, son estadísticamente equivalentes.

Se ha sugerido que un método más satisfactorio para analizar perfiles sanguíneos, es el considerar al diseño como un "split-plot", el cual presenta la ventaja de que da una prueba simple de los niveles sanguíneos promedio, y otra sobre los perfiles plasmáticos a lo largo del tiempo (114 - 118), por lo que se realizó un análisis a los cuatro tiempos de muestreo, con un análisis de medidas repetidas, donde los datos de concentración plasmática fueron corregidos por peso, sin considerar los efectos residuales.

Los cálculos se efectuaron empleando el módulo 2V (análisis de varianza y covarianza de medidas repetidas del BMDP) (Apéndice C)

Uno de los supuestos de este modelo es la homogeneidad de varianzas entre todos los tiempos de muestreo, lo cual se puede probar por medio de la esfericidad. Como se puede observar, este supuesto se cumple ya que $p = 0.6588$ (Apéndice C). Los resultados de este análisis se presentan en la Tabla 5.6.

En el renglón Formulación de esta tabla, (media de las

concentraciones a diferentes tiempos) y en el de la interacción tiempo-formulación (evaluar si los perfiles a través del tiempo son similares), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, por lo que se puede asumir que las formulaciones son equivalentes.

Tabla 5.6. Análisis de varianza para los niveles de diazepam obtenidos con los cuatro productos (medidas repetidas)

FUENTE VARIACION	SUMA CUADRADOS	G. L.	CUADRADO MEDIO	F	
SUJETOS	6913.5571	7	58.2255	10.31	
PERIODOS	407.5588	3	3.7596	0.67	N.S.
FORMULACIONES	11.2788	3	1.1474	0.20	N.S.
1 ERROR	101.6133	18	5.6452		
T S	29.8961	21	1.4236	2.95	*
T P	8.3984	9	0.9332	1.94	N.S.
T F	6.9838	9	0.7760	1.61	N.S.
2 ERROR	26.0224	54	0.4819		

* $p < 0.05$

ESTIMACION DE EFECTOS RESIDUALES DE LAS FORMULACIONES.

Adicionalmente al análisis estadístico se realizó un análisis de varianza con los valores promedio de los cuatro tiempos de muestreo con el fin de evaluar la presencia de efectos residuales. El análisis se realizó utilizando el módulo 2V de análisis de varianza y covarianza con medidas repetidas del BMDP y la evaluación de los efectos residuales utilizando un modelo de regresión en el módulo 3 R (regresión no lineal). Ambos

resultados se conjuntaron en un solo ANADEVa con objeto de evaluar tanto los efectos de sujeto, período, formulación como los efectos residuales. Los resultados obtenidos para dicho análisis se muestran en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7. Análisis de varianza para cuadrado latino considerando los efectos residuales

FUENTE VARIACION	SUMA CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIO	F	
SUJETOS	101.89	7	14.56	8.88	
PERIODOS	2.82	3	0.94	0.57	N.S.
FORMULACION	0.86	3	0.29	0.18	N.S.
EFECTO RESIDUAL	0.82	3	0.27	0.17	N.S.
ERROR	24.58	15	1.64		

En esta tabla se observa que no existe presencia de efectos residuales $p > 0.05$, por lo que no hay necesidad de calcular la suma de cuadrados para la formulación ajustada por efectos residuales, por lo que se puede concluir que no existen diferencias en los niveles plasmáticos después de la administración de las diferentes formulaciones. De acuerdo a la definición de que los productos que al ser administrados al mismo grupo de individuos dan lugar a niveles plasmáticos que no presentan diferencias estadísticamente significativas pueden ser considerados como bioequivalentes, es posible establecer que los productos comerciales estudiados son bioequivalentes con el

producto de referencia.

Westlake ha propuesto el uso de los intervalos de confianza con el objeto de establecer si las diferencias encontradas representan una importancia clínica. (117) Por tal motivo se calculó el intervalo de confianza para los tres productos estudiados, en relación al producto de referencia. Los intervalos obtenidos para los tres productos se resumen a continuación:

$$1) 7.27 - 1.221 < \mu A < 7.27 + 1.221$$

$$6.05 < \mu A < 8.49$$

$$0.63 \mu V < \mu A < 1.17 \mu V$$

$$2) 7.27 - 1.042 < \mu M < 7.27 + 1.042$$

$$6.23 < \mu M < 8.31$$

$$0.86 \mu V < \mu M < 1.14 \mu V$$

$$3) 7.27 - 1.138 < \mu P < 7.27 + 1.138$$

$$6.13 < \mu P < 8.41$$

$$0.84 \mu V < \mu P < 1.16 \mu V$$

donde : μV = media poblacional de los niveles del producto V
(estándar)

μA = media poblacional de los niveles del producto A

μP = media poblacional de los niveles del producto P

μM = media poblacional de los niveles del producto M

Los resultados anteriores indican que los niveles del producto A se encuentran comprendidos en el rango del 17 % de los del producto V (estándar); los del producto M están comprendidos dentro del rango del 14 % del producto estándar y los del producto P en un rango del 16 % del por lo cual se considera que dichos productos son equivalentes al producto de referencia.

5.7. NIVELES PLASMATICOS DE DIAZEPAM ENCONTRADOS EN PACIENTES PSIQUIATRICOS CON TRATAMIENTO CRONICO.

A pesar del amplio uso del diazepam en la clínica , en México no existe ninguna información acerca de los niveles plasmáticos de diazepam alcanzados en pacientes, durante tratamientos prolongados con este fármaco.

En estudios anteriores realizados en otros países, (2) se ha demostrado que se requiere un período de una semana de administración crónica de diazepam, para obtener niveles estables de este fármaco. Igualmente se requiere una semana de tratamiento para alcanzar concentraciones estables del metabolito N-desmetilado. Por esta razón en el presente trabajo se administró inicialmente el fármaco por 10 días, con objeto de alcanzar el estado estacionario antes de proceder a la determinación de los niveles de diazepam. En este caso no fue posible determinar las concentraciones del N-desmetil diazepam presente en las muestras, ya que no se contaba con el metabolito, sin embargo al analizar las muestras se encontró en los cromatogramas una señal a los 5.9 minutos, la cual puede deberse a la presencia del metabolito, ya que ningún otro de los fármacos administrados presenta esta señal.

Los niveles plasmáticos del diazepam en general se mantuvieron estables durante todo el tratamiento (31 días) en los 8 pacientes. El hecho de que en el análisis estadístico se demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre períodos, muestra que el tiempo durante el cual se administró cada producto fue suficiente para llegar al estado estacionario. Así mismo, a pesar de que se probaron diferentes productos y se administraron otros fármacos, no se encontró una marcada variabilidad interindividual (\bar{x} = 289 a 499 ng/ ml). En la literatura se ha demostrado que después de la administración crónica en voluntarios sanos, pueden obtenerse diferencias hasta del triple en los niveles del diazepam.

Existe una tendencia en los pacientes 1 y 2 (Grupo I) a presentar concentraciones menores que el resto de los pacientes, sin que aparentemente exista una causa atribuible a este hecho. Dado a que los pacientes se asignaron al azar a los grupos, es posible pensar que la vida media de estos dos pacientes pudiese ser más corta a los del resto, lo cual produciría concentraciones menores en el estado estacionario (2).

La relación de los valores $C_{p_{max}} / C_{p_{min}}$ al estado estacionario en los 8 pacientes fue de 1.2 : 1 . Esto concuerda con los datos obtenidos por Gustafson y col (89), mientras que otros autores han obtenido relaciones de 3:1 (18).

En general, las concentraciones encontradas en los diferentes pacientes se encuentran dentro del rango terapéutico propuesto para obtener el efecto ansiolítico.

No fue posible hacer un seguimiento adecuado de la respuesta clínica al tratamiento con diazepam ya que la mayoría de los pacientes se encontraban bajo tratamiento con otros fármacos, sin embargo, todos los pacientes repondieron satisfactoriamente al tratamiento y en ningún caso se presentaron efectos adversos que pudiesen ser atribuibles al diazepam.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

- Los productos comerciales estudiados, cumplieron satisfactoriamente con las pruebas de control de calidad que marca la Farmacopea.

- El método espectrofotométrico empleado para la cuantificación de diazepam en comprimidos, además de ser rápido y sencillo, resultó ser preciso y exacto, por lo cual se consideró adecuado para ser utilizado en la prueba de uniformidad de contenido en el presente estudio.

- Los métodos analíticos empleados para cuantificar el diazepam en los dos medios de disolución utilizados (HCl y agua deionizada), presentaron una linealidad y precisión satisfactorias para los fines de la prueba de disolución.

- Todos los productos cumplieron con las especificaciones que marca la Farmacopea para la prueba de disolución de comprimidos de diazepam.

- No se observaron diferencias en la cantidad total disuelta de diazepam a los 30 minutos, sin embargo los productos presentaron diferencias estadísticamente significativas en la velocidad inicial de disolución.

- Al utilizar HCl como medio de disolución, la velocidad de disolución de los productos fue mucho más alta que en agua. A pesar de que en este medio se presentó una mayor diferenciación

entre los lotes la mayoría de los productos (incluyendo al producto de referencia) no se disolvieron completamente, por lo cual se considera que dicho medio no es adecuado para evaluar la liberación de diazepam en comprimidos.

- El método por cromatografía de líquidos de alta resolución descrito para cuantificar diazepam en plasma, además de ser lineal y repetible, requiere de un volumen pequeño de muestra (1.0 ml de sangre), es sencillo, sensible y rápido (se pueden analizar 25 muestras en un día), por lo que se puede utilizar en la vigilancia de los niveles plasmáticos, así como en estudios de biodisponibilidad, farmacocinética y farmacocinética clínica.

- El método además, es aplicable al análisis de muestras plasmáticas de pacientes que están sometidos a terapia con otros fármacos que comúnmente se emplean en la clínica junto con diazepam, ya que presenta una gran especificidad para este fármaco.

- Los niveles plasmáticos observados en la mayoría de los pacientes, tanto después de una dosis única como después de dosificación múltiple, se encontraron dentro de los niveles recomendados para obtener tanto el efecto ansiolítico, como el efecto antiepiléptico del diazepam.

- El estudio de biodisponibilidad realizado en 8 pacientes, demostró que los niveles plasmáticos obtenidos al estado estacionario después de la administración de los 3 productos mexicanos, fueron comparables a los obtenidos después de la administración del producto innovador, por lo que estos productos son bioequivalentes.

- Las diferencias observadas en la velocidad de disolución de los productos no se reflejó en los datos obtenidos *in vivo*, lo cual

sugiere que para este fármaco la cantidad total disuelta es un indicador más confiable de los niveles de diazepam al estado estacionario cuando es administrado bajo dosificación repetida.

- La gran variabilidad interindividual observada en el estudio de biodisponibilidad, así como el efecto de otros factores que pueden alterar la biodisponibilidad del diazepam (edad, efecto de pH gastrointestinal, presencia de antiácidos, etc.) apoyan la necesidad de la vigilancia rutinaria de los niveles plasmáticos de diazepam, a fin de optimizar su uso terapéutico.

A P E N D I C E A

VALIDACION DE LOS METODOS ANALITICOS EMPLEADOS EN LA PRUEBA DE DISOLUCION

A.1. Linealidad

Con el fin de determinar si la relación entre la concentración de diazepam y la absorbancia era lineal, se prepararon seis curvas de diazepam tanto en HCl 0.1 N como en agua deionizada en un intervalo de concentración de 0.625 a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La absorbancia de las soluciones en HCl 0.1 N se determinó a 242 nm y en el caso del agua a 228 nm.

Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras A.1 y A.2.

A.2. Repetibilidad

La precisión se estableció preparando 3 curvas de calibración de diazepam en los medios mencionados, a las mismas concentraciones en dos días diferentes y se calculó el coeficiente de variación para cada concentración (Tablas A.1 y A.2). No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre días (Tablas A.3 y A.4).

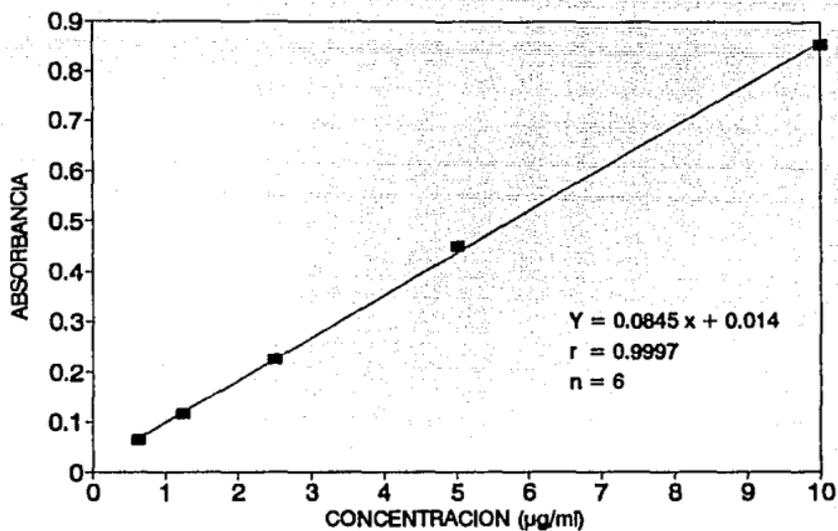


Fig. A.1 Curva de calibración de diazepam en HCl 0.1 N.

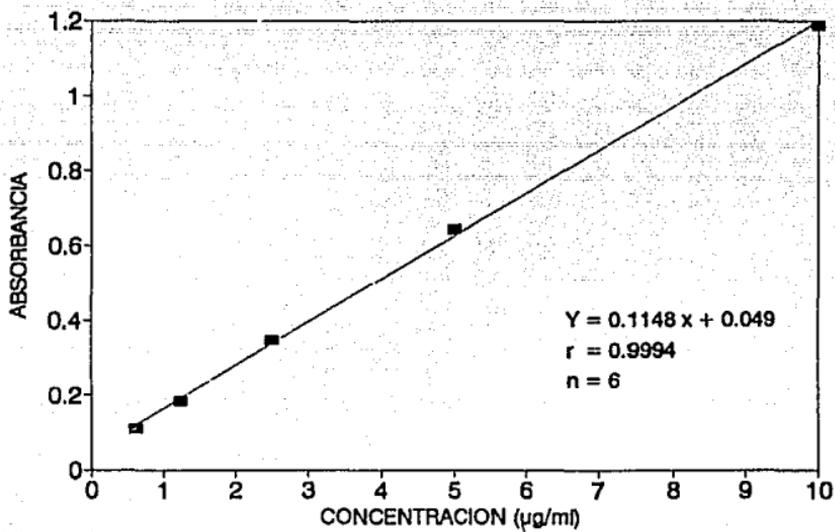


Fig. A.2 Curva de calibración de diazepam en agua.

Tabla A.1. Promedio de los valores de absorbancia obtenidos para las curvas de calibración de diazepam en HCl

CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$)	ABSORBANCIA (D.E.)	COEFICIENTE VARIACION %
0.625	0.064 (0.0015)	2.39
1.250	0.117 (0.0021)	1.78
2.500	0.224 (0.0032)	1.44
5.000	0.450 (0.0050)	1.12
10.000	0.854 (0.0032)	0.38

$$\bar{Y} = 0.0845 X + 0.014$$

$$r = 0.9997$$

$$n = 6$$

Tabla A.2. Promedio de los valores de absorbancia obtenidos para las curvas de calibración de diazepam en agua.

CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$)	ABSORBANCIA (D.E.)	COEFICIENTE VARIACION %
0.625	0.111 (0.0043)	3.87
1.250	0.184 (0.0048)	2.49
2.500	0.348 (0.0062)	1.78
5.000	0.644 (0.0040)	0.62
10.000	1.187 (0.0031)	1.60

$$\bar{Y} = 0.1148 X + 0.0499$$

$$r = 0.9994$$

$$n = 6$$

Tabla A.3. Análisis de varianza para el método espectrofotométrico empleado en la prueba de disolución USP (HCl 0.1N).

FUENTE VARIACION	SUMA CUADRADOS	G. L.	CUADRADO MEDIO	F
DIA	1.093×10^{-5}	1	1.093×10^{-5}	0.9226
ERROR	4.739×10^{-5}	4	1.185×10^{-5}	(N.S.)
TOTAL	5.833×10^{-5}			

$F_{1,4; 0.05} = 7.71$

Tabla A.4. Análisis de varianza para el método espectrofotométrico empleado en la prueba de disolución II (H₂O).

FUENTE VARIACION	SUMA CUADRADOS	G. L.	CUADRADO MEDIO	F
DIA	1.067×10^{-7}	1	1.067×10^{-7}	0.3834
ERROR	1.111×10^{-6}	4	2.783×10^{-6}	(N.S.)
TOTAL	1.220×10^{-6}			

$F_{1,4; 0.05} = 7.71$

A P E N D I C E B

"ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD AL ESTADO ESTACIONARIO DE PRODUCTOS COMERCIALES CONTENIENDO DIAZEPAM".

P R O T O C O L O

1. Para participar en el estudio, es necesario que el paciente no presente evidencia de hipersensibilidad ó idiosincracia a medicamentos y/ ó benzodiazepinas.
2. Cualquier sujeto que tenga antecedentes de alteraciones vasculares, gastrointestinales, hepáticas ó renales, deberá ser excluido del estudio.
3. No deberá tomar ningún otro medicamento, por lo menos una semana antes del estudio. Una vez iniciado el protocolo, no se permitirá ningún cambio en el tratamiento del paciente, a menos que la salud del mismo lo requiera. De ser así, notificar al responsable del estudio.
4. No deberá tomar alcohol por lo menos 24 horas antes de iniciar el tratamiento, ni durante el mismo.
5. Previamente a la inclusión al protocolo, se tomará una muestra de sangre para las pruebas sanguíneas y otra para ser utilizada como blanco.
6. El día 1 del tratamiento, el paciente iniciará la toma del medicamento "I" del cual tomará un comprimido 3 veces al día bajo el siguiente horario: 8, 13 y 18 hs junto con 200 ml de agua, continuando hasta el día 10.
7. Los días 9 y 10 del protocolo, se tomarán muestras sanguíneas (5 ml) a los siguientes tiempos: 8 hs (antes de la primera

toma del medicamento) y a las 9:30 hs. Este día, no deberá ingerirse alimento, por lo menos 2 horas después de la primera toma del medicamento.

8. A partir del día 11, el paciente empezará a tomar el medicamento "II", que será entregado al responsable médico, siguiendo el mismo horario, y sin interrumpir el medicamento. El medicamento II se administrará por los siguientes 7 días (11 al 17), bajo el mismo régimen.
9. Los días 16 y 17 se hará la toma de muestras sanguíneas, a los mismos tiempos que en los días 9 y 10.
10. El medicamento III empezará a tomarse el día 18, y así hasta el día 24 inclusive. La toma de muestras se hará los días 23 y 24.
11. Finalmente, el medicamento IV se administrará por los últimos 7 días (del 25 al 31), tomando las muestras los días 30 y 31
12. Las muestras de sangre serán centrifugadas para separar el plasma, el cual se guardará en congelación (-4°C) hasta el momento de su análisis.

HOJA DE CONSENTIMIENTO

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y NEUROCIRUGIA
UNIDAD DE INVESTIGACIONES CEREBRALES
Y DEPARTAMENTO DE PSIQUIATRIA

En forma voluntaria, hago constar que he sido informado ampliamente de los objetivos del protocolo de investigación de "Estudio de Biodisponibilidad al Estado Estacionario de Productos Comerciales Conteniendo Diazepam ", por lo cual otorgo amplia facultad al responsable médico del mismo para que se administre el medicamento que considere adecuado para el tratamiento del paciente _____ en vista de este será con el único fin de lograr la recuperación de su salud.

NOMBRE DEL PACIENTE _____

EDAD _____

PESO _____

SEXO _____

ESTATURA _____

RESPONSABLE DEL PACIENTE _____

FIRMA _____

FECHA _____

RESPONSABLE DEL PROTOCOLO _____

MEDICO RESPONSABLE _____

A P E N D I C E C

BMDP2U - ANALYSIS OF VARIANCE AND COVARIANCE WITH REPEATED MEASURES.
 Copyright 1977, 1979, 1981, 1982, 1983, 1985, 1987, 1988, 1990
 by BMDP Statistical Software, Inc.

PROGRAM INSTRUCTIONS

```

/BMDP,2U
/PROBLEM TITLE IS 'BIOEQUIVALENCIA'.
/INPUT VARIABLES ARE 7.
        FORMAT IS FREE.
/VARIABLE NAMES ARE Sujeto, Periodo, Forma, 11,12,13,14.
/GROUP CODES(1) ARE 1 to 8.
        NAMES(1) ARE Suj1,Suj2,Suj3,Suj4,Suj5,Suj6,Suj7,Suj8.
        CODES(2) ARE 1 to 4.
        NAMES(2) ARE Periodo1,Periodo2,Periodo3,Periodo4.
        CODES(3) ARE 1 to 4.
        NAMES(3) ARE Forma1,Forma2,Forma3,Form4.
/SAVE RESIDUAL.
        FILE = RESIDUAL.Blog.
        CODE = RESIDUAL.Blog.
        MEAN.
/DESIGN GROUPINGS ARE Sujeto, Periodo, Forma.
        DEPENDENT ARE 1 to 7.
        LEVEL IS 4.
        NAME IS T:empo.
        EXCLUDE ARE 12,13,23,123.
        RESIDUAL = MEAN.
/PRINT #LINESIZE = 72.
        RESIDUAL.
/END
    
```

DESIGN SPECIFICATIONS

```

GROUP = 1 2 3
DEPEND = 4 5 6 7
LEVEL = 4
    
```

SUMS OF SQUARES AND CORRELATION MATRIX OF THE
 ORTHOGONAL COMPONENTS POOLED FOR ERROR 2 IN ABOVE TABLE BELOW.

```

7.40719      1.000
10.82224     -0.229  1.000
7.79259      0.291  0.026  1.000
    
```

SPHERICITY TEST APPLIED TO ORTHOGONAL COMPONENTS - TAIL PROBABILITY = 0.658

ANALYSIS OF VARIANCE FOR 1-ST DEPENDENT VARIABLE -

	11	12	13	14						
SOURCE	SUM OF SQUARES	D.F.	MEAN SQUARE	F	TAIL PROB.	GREENHOUS GEISSEK PROB.	HUYNH FELDT PROB.			
MEAN	6913.5571	1	6913.5571	1224.68	0.0000					
Sujeto	407.5788	7	58.2255	10.31	0.0000					
Periodo	11.2788	3	3.7596	0.67	0.5838					
Forma	3.1422	3	1.1474	0.20	0.8928					
1 ERROR	101.6133	18	5.6452							
T:empo	63.9333	3	21.3111	44.22	0.0000	0.0000	0			
TS	29.8961	21	1.4236	2.95	0.0007	0.0012	0.0007			
TP	8.3984	9	0.9332	1.94	0.0660	0.0749	0.066			
TF	6.9838	9	0.7760	1.61	0.1357	0.1457	0.1357			
2 ERROR	26.0224	54	0.4819							

ERROR
TERM

EPSILON FACTORS FOR DEGREES OF FREEDOM ADJUSTMENT

2	GLZENHOUSE-GCISSEK 0.8994	HUYNH-FELDT 1.0000
---	------------------------------	-----------------------

ERROR SUM
OF SQUARES

CORRESPONDING RESIDUALS

1	R0
2	R1 R2 R3 R4

CASE	Sujeto	Periodo	Forma	R0	R1	R2	R3	R4
1	Suj1	Peri1	Form1	0.50141	-0.23703	0.87184	-0.56453	-0.07328
2	Suj1	Peri2	Form2	-0.29109	0.60047	-0.21391	-0.52078	0.26422
3	Suj1	Peri3	Form3	0.41234	-0.22047	-0.59731	0.85203	-0.03422
4	Suj1	Peri4	Form4	-0.62266	-0.14297	0.06611	0.23378	-0.15672
5	Suj2	Peri1	Form1	0.92641	0.02547	-0.03766	-0.02453	0.03672
6	Suj2	Peri2	Form2	-0.46359	-0.05953	0.02109	0.41672	-0.37829
7	Suj2	Peri3	Form3	-0.29766	-0.23297	0.50516	0.01703	-0.28922
8	Suj2	Peri4	Form4	-0.16516	0.26703	-0.46859	-0.40922	0.63078
9	Suj3	Peri3	Form1	-2.60516	0.04328	-0.29484	0.07078	0.18078
10	Suj3	Peri1	Form2	0.80859	0.21703	0.02391	0.44703	-0.38297
11	Suj3	Peri4	Form3	0.21297	0.53511	-0.06297	-0.18181	-0.20859
12	Suj3	Peri2	Form4	1.58359	-0.79572	0.33391	-0.07797	0.45078
13	Suj4	Peri3	Form1	1.13547	1.05016	-0.51797	0.06766	-0.55984
14	Suj4	Peri1	Form2	-1.12328	-0.92359	0.42978	0.37141	0.17891
15	Suj4	Peri4	Form3	0.76609	0.03078	0.15141	-0.29047	0.10828
16	Suj4	Peri2	Form4	-0.77828	-0.10734	-0.05672	-0.14859	0.31266
17	Suj5	Peri2	Form1	-0.14141	-0.05297	-0.56484	0.48578	0.13203
18	Suj5	Peri4	Form2	-0.32797	0.23234	0.69422	0.55109	-1.42766
19	Suj5	Peri1	Form3	0.99328	0.12334	-0.72703	-0.62766	1.23234
20	Suj5	Peri3	Form4	-0.52391	-0.25172	0.64766	-0.40922	0.11328
21	Suj6	Peri2	Form1	0.44734	0.29078	0.13691	-0.26797	-0.16172
22	Suj6	Peri4	Form2	0.40078	0.19609	-0.76203	-0.13266	0.69859
23	Suj6	Peri1	Form3	-1.72047	-0.41141	0.30922	0.17109	-0.06891
24	Suj6	Peri3	Form4	0.88234	-0.07547	0.31391	0.22953	-0.16797
25	Suj7	Peri4	Form1	0.74109	-0.83547	0.69141	0.25328	-0.10922
26	Suj7	Peri3	Form2	0.52266	0.05672	-0.45891	-0.25828	0.66047
27	Suj7	Peri2	Form3	-1.14266	0.07453	0.03391	0.46078	-0.56922
28	Suj7	Peri1	Form4	-0.12109	0.70422	-0.26641	-0.45578	0.01797
29	Suj8	Peri4	Form1	-1.00516	-0.28422	-0.28984	-0.07047	0.59453
30	Suj8	Peri3	Form2	0.47391	-0.26953	0.40234	-0.56953	0.43672
31	Suj8	Peri2	Form3	0.78609	0.05078	0.43766	-0.39797	-0.09047
32	Suj8	Peri1	Form4	-0.25484	0.50297	-0.55016	0.98797	-0.94078

ERROR TERM	SUM OF SQUARES	RECOMPUTED FROM RESIDUALS	RELATIVE ERROR
1	101.61330	101.61330	0.00000
2	26.02244	26.02244	0.00000

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFIA

- (1) Code of Federal Regulations. 21 Part (320.52). Office of Federal Register, U.S.A. (1981).
- (2) Berlin, A. y col. *Clin. Pharmacol. & Therap.* 13, Part I: 733 (1972).
- (3) Ogata, H. y col. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. & Toxicol.* 20 : 159 (1982).
- (4) Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 7th. Ed. Mc. Millan Pub. Co. U.S.A. (1985).
- (5) The Food & Drug Administration. The Gold Sheet. "Guidance for conducting in vivo bioavailability studies for diazepam" 14 : 375 (1986).
- (6) Domínguez, R. A. y col. *Rev Soc. Quim. Mex.* 27 : 306 (1983).
- (7) Arellano, R. y col. "Biodisponibilidad de Productos comerciales de diazepam. Fase I: Estudios in vitro". Trabajo presentado en el XX Congreso Nal. C. Farm. Pto. Vallarta, Jal. México (1988).
- (8) Mac Donald A., Michaelis, A.F. & Senkowski, B.Z. "Analytical profiles of drug substances ". Vol I (1). Florey Ed. Academ. New York (1972).
- (9) AMA Drug Evaluations. 2nd. Ed. , Publishing Sciences Group. Inc. U.S.A. (1973).
- (10) Bowman, W.C. & Rand, M.J. "Farmacología. Bases Bioquímicas y Patológicas. Aplicaciones Clínicas". 2a. Edición. Editorial Interamericana México (1984).
- (11) Haefely, W. y col. "Neuropharmacology of benzodiazepines: synaptic mechanism and neural basis of action" in Costa E. Editor. "The benzodiazepines. From molecular biology to clinical practice". Raven Press New York (1983).
- (12) Baird, E.S. y col. *Br. J. Anaesthesiol.* 44: 803 (1972).

- (13) "Antiepileptic Drugs: Quantitative Analysis " Pippenger, C.E., Penry J.K. & Kutt, H. Editors. Raven Press , New York (1978).
- (14) Gamble, J.A.S. y col. *Anaesthesia* 30 : 164 (1975).
- (15) Hillestad, L. y col. *Clin. Pharmacol. Ther.* 18: 479 (1974).
- (16) Kanto, J. y col. *J. Clin. Pharmacol.* 12 : 427 (1975).
- (17) Kortilla, K. y col. *Br. J. Anaesth.* 47 : 857 (1975).
- (18) Kaplan, S.A. y col. *J. Pharm. Sci.* 62 :1789 (1973).
- (19) Klotz, U. y col. *J. Clin. Invest.* 55 : 347 (1975).
- (20) Gamble, J.A.S. y col. *Br. J. Anaesth.* 48: 1181 (1976).
- (21) Greenblatt, D.J., y col. *Clin. Pharmacol. Ther.* 24 :600 (1978).
- (22) Nair, S.G. y col. *Br. J. Anaesth.* 48 : 1175 (1976).
- (23) Hayes, S.L. y col. *N. Engl. J. Med.* 298 : 186 (1977).
- (24) Linoila, M. y col. *Ann. Clin. Res.* 6 : 4 (1974).
- (25) Haram, K. y col. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 14: 545 (1976).
- (26) Agurell, S. y col. *Epilepsia* 18 : 277 (1976).
- (27) Kanto, J.H. y col. *Br. J. Anaesth.* 48 : 168 (1974).
- (28) Langslet, A. y col. *Acta Paediatr. Scand.* 67 : 699 (1978).
- (29) Baird, E.S. y col. *Br. J. Anaesth.* 45: 546 (1973).
- (30) Bank- Mikkelsen, O.K. *Acta Anaesthesiol. Scand. (Suppl).* 67 : 91 (1978).
- (31) Kortilla, K.A. y col. *Acta Pharmacol. et Toxicol.* 39: 104 (1976).
- (32) Meberg, A. y col. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 14: 273 (1978).
- (33) Knudsen, F. U. y col. *Acta Paediatr. Scand.* 66 : 563 (1977).
- (34) Dulac, O. y col. *J. Paediatr.* 93 : 1093 (1978).
- (35) Eatman, F.B. y col. *J. Pharmacokin. & Biopharm.* 5 : 481 (1977).
- (36) Moolenaar, F. y col. *Int. J. Pharmac.* 5: 127 (1980).
- (37) Jack, M.L. y col. *J. Pharm. Sci.* 72: 1318 (1983).
- (38) Marcucci, F. y col. *Eur. J. Pharmacol.* 4: 464 (1968).
- (39) Klotz, U. y col. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 199: 67 (1976).
- (40) Van der Kleijn, E. y col. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Suppl)* : 109 (1971).

- (41) Kober, A. y col. *Biochem. Pharmacol.* 28: 1037 (1979).
- (42) Di Gregorio, G.J. y col. *Clin. Pharmacol. Ther.* 24 : 720 (1978).
- (43) Hendel, J. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 37: 17 (1975).
- (44) Kanto, J. y col. *Br. J. Anaesth.* 46: 168 (1974).
- (45) Moschitto, L.J. y col. *J. Pharm. Pharmacol.* 35: 179 (1983).
- (46) Kober, A. y col. *Biochem. Pharmacol.* 28: 1037 (1978).
- (47) Davis, D. y col. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 19: 26 (1985).
- (48) Mandelli, M. y col. *Clin. Pharmacokin.* 3: 72 (1978).
- (49) Greenblatt, D.J. y col. *Clin. Pharmacol. Therap.* 27: 301 (1980).
- (50) Swift, C.G. y col. *Br. J. Clin. Pharmac.* 20: 111 (1985).
- (51) MacLeod, S.M., y col. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 11: 345 (1977).
- (52) Kortilla, K. y col. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 40: 241 (1977).
- (53) Dasberg, H.H. y col. *Clin. Pharmacol. Ther.* 15: 473 (1974).
- (54) Tognoni, G. y col. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2: 227 (1978).
- (55) Klotz, U. y col. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 10: 121 (1976).
- (56) Hillestad, L. y col. *Clin Pharmacol. Ther.* 16: 485 (1974).
- (57) Greenblatt, D.J. y col. *Int. J. Clin. Pharmacol.* 18: 177 (1978).
- (58) Sellman, R. y col. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 36 : 33 (1975).
- (59) Klotz, U. y col. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 10: 121 (1978).
- (60) Ferngren, H.G. *Epilepsia* 15: 27 (1974).
- (61) Woodbury, J.K., Penry, A. & Pippenger, G.E. "Antiepileptic Drugs". Raven Press. New York (1982).
- (62) "Drug Interactions" Edited by Morselli, P. L., Garratini, S. & Cohen, J. Raven Press. New York (1974).
- (63) Greenblatt, D.J. y col. *J.A.M.A.* 240: 1872 (1978).
- (64) Jaffe, J.H. "Drug Addiction and Drug Abuse". In : Goodman y Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 6th Ed. Mac Millan. New York (1980).
- (65) File, S. *Neuropharmacol. Biol. Psychiatr.* 8: 19 (1984).
- (66) Aranko, K., y col. *Br. J. Clin. Pharmac.* 15: 545 (1983).

- (67) Cook, L. y col. *Br. Med. J.* 289: 351 (1984).
- (68) Ghoneim, M.M. y col. *Psychopharmacology* 73: 147 (1981).
- (69) Elsass, P. y col. *Ibid.* 70: 307 (1980).
- (70) Rosenberg, H.C. y col. *E. J. Pharmacol.* 70: 453 (1981).
- (71) Gallager, D.W. y col. *Nature* 308: 74 (1984).
- (72) Hoolister, L.E. y col. *Psychopharmacologia* 2: 63 (1981).
- (73) Murphy, S.M. y col. *Lancet* 15: 1389 (1984).
- (74) Said, S. y col. *Manuf. Chem. Aer. News.* 47: 54 (1976).
- (75) Chandrashekhar, S. y col. *Indian J. Pharm.* 40: 8 (1978).
- (76) Steinbach, D. y col. *Pharm. Ztg.* 125: 1385 (1980).
- (77) Omaray, A.K. y col. *Indian J. Hosp. Pharm.* 15: 18 (1978).
- (78) Leucuta, S. y col. *Clujul Med.* 53: 79 (1980). A través del *Chem. Abstr.* 94 (8) 52813c (1981).
- (79) Leucuta, S. y col. *Farmacia* 28: 143 (1980). A través del *Chem. Abstr.* 94 (20) 182651 (1981).
- (80) Arnold, E. y col. *Acta Pharmacol. et Toxicol.* 36 : 335 (1975)
- (81) Ogata H y col. *Int. J. Clin. Pharmacol. Therapy & Toxicol.* 20: 186 (1982).
- (82) The United States Pharmacopeia XX . Twentieth Rev. Third Suppl. U.S. Pharmacopeial Convention Inc. U.S.A. (1980).
- (83) Viukari, M. y col. *Acta Pharmacol et Toxicol.* 49: 59 (1981).
- (84) Fee, J.P.H. y col. *The Lancet* Oct 8: 813 (1984).
- (85) Naylor, H.C. y col. *The Lancet* March 2: 518 (1985).
- (86) Wills, R.J. y col. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 5 : 241 (1984).
- (87) Wills, R.J. y col. *J. Clin. Pharmacol.* 22: 557 (1982).
- (88) Tuomisto, J. y col. *Acta Pharmacol. et Toxicol.* 55: 50 (1984).
- (89) Gustafson, H. y col. *J. Pharmacokin. & Biopharm.* 9 : 879 (1981).
- (90) de Silva, J.A.F. y col. *Analyt. Chem.* 36: 2099 (1964).
- (91) de Silva, J.A.F. y col. *Analyt. Chem.* 48: 10 (1976).
- (92) Gamble, J.A.S. y col. *Anaesthesia* 30: 159 (1975).
- (93) Rutherford, D.M. *J. Chrom.* 137: 439 (1977).

- (94) Howard, A.G. y col. *J. Chrom.* 90: 323 (1974).
- (95) Wallace, E.J. y col. *Clin. Chem.* 25: 1296 (1979).
- (96) Steyn, M. y col. *J. Chrom.* 107: 196 (1975).
- (97) Mc. Curdy, y col. *J. Analyt. Toxicol.* 3: 195 (1979).
- (98) Bugge, A. y col. *J. Chrom.* 128: 111 (1978).
- (99) Brodie, R.R. y col. *J. Chrom.* 150: 361 (1978).
- (100) Kabra, P.M. y col. *J. Chrom.* 150: 355 (1978).
- (101) Vree, T.B. y col. *Ibid.* 162: 605 (1979).
- (102) Tada, K. y col. *Clin. Chem.* 31: 1712 (1985).
- (103) Wad, N.H. *J. Chrom.* 128: 231 (1976).
- (104) Sun Sy- Rong, y col. *J. Pharm. Sci.* 67:1413 (1978).
- (105) Peskar, B. y col. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 186: 167 (1973).
- (106) Hunt, P. y col. *J. Pharm & Pharmacol.* 31: 448 (1979).
- (107) The United States Pharmacopeia. XXI Ed. United States Pharmacopeial Co. Inc. U.S.A. (1985).
- (108) Castillo, R.M.C. "Farmacocinética de diazepam en ancianos" Tesis de maestría en Farmacia. D.E.P.G. F.Q. U.N.A.M. (1988).
- (109) Wagner J.C. "Biopharmaceutics & Relevant Pharmacokinetics" Drug Int. Pub. Inc. Illinois, U.S.A. (1971).
- (110) Aiache, J.M., y col. "Biofarmacia". Traducido de la 2a. Ed. por Roca, R. Ed. El Manual Moderno. México (1983).
- (111) Dousse, J.M.F. y col. *J. Chrom.* 301: 137 (1984).
- (112) Cottler, S. y col. *J. Chrom.* 222: 95 (1981).
- (113) Principles of Psychopharmacology. 2nd. Ed. William, G.C. & Joseph G. Editors. Academic Press, N.Y. (1978).
- (114) Cole, J.W.L. y col. *Biometrics* 22: 810 (1966)
- (115) Grizzle, J.E. y col. *Biometrics* :5 357 (1969).
- (116) Westlake, W.J. "The Design and Analysis of comparative blood-level trials" in Swarbrick, J. Editors "Current Concepts in the Pharmaceutical Sciences: Dosage Form & Bioavailability. Lea & Febiger. Philadelphia, U.S.A. (1973).
- (117) Westlake, W.J. *J. Pharm. Sci.* 61: 1340 (1972).