

38
2 Ecu



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE GLIBENCLAMIDA

EDICIÓN DE AGOSTO DE 1985

TRABAJO MONOGRAFICO MANCOMUNADO

Que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Presentan

VICTOR MANUEL FAJARDO RODRIGUEZ
ELOINA BEATRIZ PUIG LOPEZ





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 I	INTRODUCCION	Pág. 1
CAPITULO II	GENERALIDADES	Pág. 3
CAPITULO III	PROPIEDADES	Pág. 9
CAPITULO IV	SINTESIS	Pág. 22
CAPITULO V	METODOS ANALITICOS	Pág. 32
CAPITULO VI	FARMACOLOGIA	Pág. 49
CAPITULO VII	CONCLUSIONES	Pág. 75
CAPITULO VIII	BIBLIOGRAFIA	Pág. 80

CAPITULO I
INTRODUCCION

INTRODUCCION

El objetivo de éste trabajo es realizar una recopilación bibliográfica sobre la glibenclamida, una sulfonilurea de administración oral con acción hipoglucemian-te, indicada para el tratamiento de la diabetes de los adu-ltos, denominada leve. Este padecimiento se inicia después de los 40 años de edad y se caracteriza porque puede contro-larse únicamente con la dieta y los requerimientos de insu-lina no pasan de 30 unidades internacionales diarias.

También está indicada en el diabético adul-lto que no se ha podido controlar con otros fármacos, en pa-lcientes recién diagnosticados sin tendencia a la cetosis y en pacientes en los cuales los tratamientos con otros hipog-lucemiantes orales han fracasado.

Esta sulfonilurea tiene una acción beta ci-ltotrópica. Informes realizados por investigadores clíni-lcos que han tratado pacientes con glibenclamida, indican -- que éste fármaco tiene el mismo campo general de aplicabili-ldad que las otras sulfonilureas, pero con mayores ventajas.

Estas ventajas son: (a) su gran actividad, en base de peso por peso, mayor que otros compuestos de és-lta clase; (b) acción más prolongada que la tolbutamida; --

(c) baja frecuencia de efectos colaterales de naturaleza alérgica u otros y (d) su seguridad. Es por esto que tiene un amplio uso en las Instituciones de Seguridad Social del Sector Público.

Por éstas razones consideramos importante realizar el presente estudio ya que respecto a éste tema es poca la información que se encuentra en los libros de consulta, principalmente en lo que se refiere a la parte química del compuesto, como sería lo relacionado con sus propiedades fisicoquímicas, síntesis, métodos analíticos.

El conocer estos aspectos puede ser de gran utilidad en la elaboración de los preparados farmacéuticos de la glibenclamida y para efectuar el control adecuado de ellos, así como para lograr la optimización de los regímenes farmacoterapéuticos de éste compuesto a través de estudios biofarmacéuticos y farmacocinéticos.

C A P I T U L O I I

G E N E R A L I D A D E S

GENERALIDADES

La utilidad de sustancias activas que administradas por vía oral pudieran modificar favorablemente el metabolismo de los hidratos de carbono en la diabetes (agentes hipoglucemiantes orales), es evidente especialmente en una enfermedad crónica, como lo es aquella que requiere del empleo frecuente de inyecciones de insulina. Por eso representa un gran progreso la introducción de éstos agentes hipoglucemiantes orales, de los cuales existen dos clases de acuerdo a su estructura: las biguanidas y las sulfonilureas.

Aunque las investigaciones referentes a ciertas sulfonamidas sobre el efecto de disminuir la glucosa en sangre aparecieron en 1930 en Argentina y en 1941 en Italia, dos hechos tardíos surgieron prominentemente: a) el rápido-reconocimiento por Loubatieres, (1) del modo de acción, significancia y posibilidades terapéuticas de dichas sustancias, al surgir el descubrimiento de Janbon y colaboradores en --- 1942 (1) de que ciertos derivados de sulfonamidas ejercen -- una acción hipoglucémica; b) la demostración por Franke y - Fuchs en 1955 de que pacientes seleccionados con diabetes de aparición en la madurez, pueden ser tratados exitosamente -- con sulfonilureas. Desde entonces, miles de compuestos han sido sintetizados y probados con el propósito de descubrir - el compuesto ideal. De un número pequeño de compuestos que

han parecido prometer lo suficiente para sujetarse a un experimento clínico, la mayoría han sido descartados porque presentan toxicidad inexplicable o porque no ofrecen ventajas significativas sobre medicamentos ya existentes en el mercado.

Las sulfonilureas constituyen los compuestos más empleados en el tratamiento de la diabetes, y son en realidad sulfonamidas modificadas, siendo las principales:

1) La Carbutamida, que deriva de la sulfanilamida por sustitución del hidrógeno del grupo amida por un radical derivado de la urea (tabla I)

2) La tolbutamida, en la que se ha sustituido el grupo amino de la anterior por un grupo metilo, por lo que ya no se trata de una sulfanilamida. Esta sustancia se usa como tal y como sal sódica hidrosoluble para preparados inyectables. (tabla I)

3) La cloropropamida, en la que es reemplazado aquel grupo metilo por cloro y el radical alquilo unido a la urea es el propilo.

4) La gliciclamida, derivada de la tolbutamida por reemplazo del radical alquilo unido al nitrógeno de la urea por un radical alicíclico, el ciclohexilo. (tabla 1)

5) La acetohexamida, que deriva de la anterior por sustitución del grupo metilo por acetilo. (tabla 1)

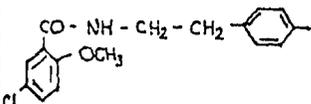
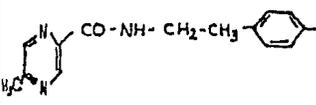
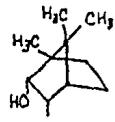
6) La glibenclamida o gliburida en que el radical acetilo del compuesto anterior está reemplazado por un radical acilaminoalquilo. (tabla 1)

7) La glipizida, en que el citado radical contiene en lugar del anillo bencénico como en el compuesto anterior, el heterociclo pirazina, con un metilo en la posición 5. (tabla 1).

8) La glibornurida, derivado de la gliciclamida por reemplazo del anillo alicíclico de ciclohexilo por otro anillo, el hidroxibornilo. (tabla 1)

La estructura esencial de las sulfonilureas para la acción hipoglucemiante es justamente ese grupo químico (tabla 1); sin embargo el agregar el anillo bencénico, unido al radical sulfona, aumenta la actividad de dichos compuestos. En ese sentido, si en la acetohexamida, con su radical ciclohexilo, a nivel del nitrógeno ureico, se reem-

AGENTES HIPOGLUCEMIANTES SINTETICOS (1)

CLASE	GRUPO	FARMACO	ESTRUCTURA QUIMICA	POTENCIA HIPOGLUCEMIANTE.
FARMACOS HIPOGLUCEMIANTES SINTETICOS. AGENTES HIPOGLUCEMIANTES ORALES.	SULFONIL-UREAS.	ESTRUCTURA FUNDAMENTAL	$\begin{array}{c} \text{SULFONA} \quad \text{UREA} \\ \text{SO}_2 - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH} \\ \text{SULFONILUREA} \end{array}$	—
		CARBUTAMIDA	$\text{H}_2\text{N} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$ (SULFANILAMIDA)	150
		TOLBUTAMIDA.	$\text{CH}_3 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$ [-NH - SAL SODICA] [-N Na - (RASTINOL)]	100
		CLORPROPAMIDA.	$\text{Cl} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$ CLORO	400
		GLICICLAMIDA.	$\text{CH}_3 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{C}_6\text{H}_{10}$	100
		ACETONERAMIDA.	$\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{C}_6\text{H}_{10}$ ACETILO	200
		GLIBENCLAMIDA O GLIBURIDA.	$\text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{OCH}_3$ 	20000
		GLIPIZIDA.	$\text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{N} - \text{C}_4\text{H}_3\text{N}_2$ 	10000
		GLIBORNURIDA.	$\text{CH}_3 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{C}_6\text{H}_{10}$  UNIDO AL RADICAL UREICO	4000
		BIGUANIDAS.	FENFORMINA.	$\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C}(=\text{NH}) - \text{NH} - \text{C}(=\text{NH}) - \text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$
BUFORMINA.	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C}(=\text{NH}) - \text{NH} - \text{C}(=\text{NH}) - \text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$	500		
METFORMINA.	$\text{CH}_3 - \text{N}(\text{CH}_3) - \text{C}(=\text{NH}) - \text{NH} - \text{C}(=\text{NH}) - \text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$	100		

plaza el grupo acetilo unido al anillo bencénico, que está -- vez unido a la sulfona, por un radical acilaminoalquilo, aumenta la actividad hipoglucemiante, la cual se incrementa -- aún más por la adición de un anillo bencénico y todavía más -- si se introduce un átomo de cloro y un metoxilo sobre ese último anillo, dando lugar al compuesto de mayor actividad conocida, la glibenclamida.

La glibenclamida es efectiva a dosis bajas, -- por lo que la dosis de administración es pequeña, observándose que presenta una actividad considerablemente mayor que -- sus congéneres tanto en animales como en investigación clínica en humanos, cinco miligramos de glibenclamida equivalen -- en actividad a 1 gramo de glicodiazina, a 250 miligramos de -- cloropropamida, a 250 miligramos de tolzamida y 500 milgramos de acetohexamida.

No hay duda pues que en base a peso, la glibenclamida tiene una gran actividad, más que otras sustan -- cias sintéticas relacionadas. Estudios clínicos indican que el intervalo de dosis efectiva es de 2.5 a 30 miligramos díarios con la mayoría de los pacientes respondiendo satisfactoriamente a dosis de 5 a 20 miligramos diariamente. Esto contrasta marcadamente con el intervalo de la dosis efectiva para la tolbutamida que es de 500 a 2000 mg. Esto es una ventaja ya que se ha postulado que existe menos probabilidad de una respuesta alérgica cuando se ingiere una pequeña canti --

dad del fármaco. Además en general se ha observado que la frecuencia de efectos colaterales es menor con glibenclamida que con otras sulfonilureas.

El mecanismo de acción de la glibenclamida es resumiblemente el mismo que el de otras sulfonilureas y se ha postulado como la estimulación de la liberación de insulina preformada, de las células beta, en los islotes de Langerhans. Sin embargo hubo especulaciones hacia alguna acción única del compuesto para explicar su incremento de actividad. (1)

C A P I T U L O I I I

P R O P I E D A D E S

PROPIEDADES FISICAS Y FISICOQUIMICAS

SINONIMOS

Glibenclamida, glibenciclamida, HB 419, adiab, diabeta, daonil, auglucón, maninil, lisaglucón, glidiabet, euciamfn y hemi-daonil. (5)

NOMBRES QUIMICOS

5-cloro-N- [2- [4- [[(ciclohexilamino) carbonil] amino] sulfonil] fenil] etil] -2-metoxibenzamida (5)

1- [[p- [2-(5-cloro-o-anisamido) etil] fenil] sulfonil] -3-ciclohexilurea. (5).

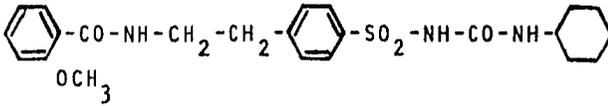
N'- [4- [β-(2-metoxi-5-clorobenzoilamino) etil] bencensulfonil] -N²-ciclohexilurea. (5)

N- [4-(β-(2-metoxi-5-clorobenzamido)etil)benzo-sulfonil] -N² ciclohexilurea. (5)

1- [4- [2-(5-cloro-2-metoxibenzamido)etil] ben-censulfonil] -3- ciclohexilurea. (5)

FORMULA DESARROLLADA

Cl



PESO MOLECULAR

494.00 (2)

DESCRIPCION

Polvo cristalino, blanco o casi blanco, inodoro o casi inodoro, insípido. En presencia de álcalis da lugar a sales. (2,3).

PUNTO DE FUSION

La glibenclamida funde entre 172°C y 174°C- (4,5).

COMPORTAMIENTO FISICOQUIMICO

La glibenclamida es un ácido débil y la determinación de su constante de disociación en agua es prácticamente imposible de realizar por mediciones de pH o titulaciones potenciométricas, dada la solubilidad de la sustancia.

El pKa de la glibenclamida, es de 6.3 ± 0.1 en contrado por titulación potenciométrica en mezclas de disolventes metanol/agua.

SOLUBILIDAD

La glibenclamida es prácticamente insoluble en agua y éter, soluble 1 : 330 partes de etanol (96%), 1 : 36 partes de cloroformo y 1 : 250 partes de metanol. Soluble en soluciones de hidróxidos alcalinos y en dimetilformamida.

(3)

COEFICIENTE DE REPARTO

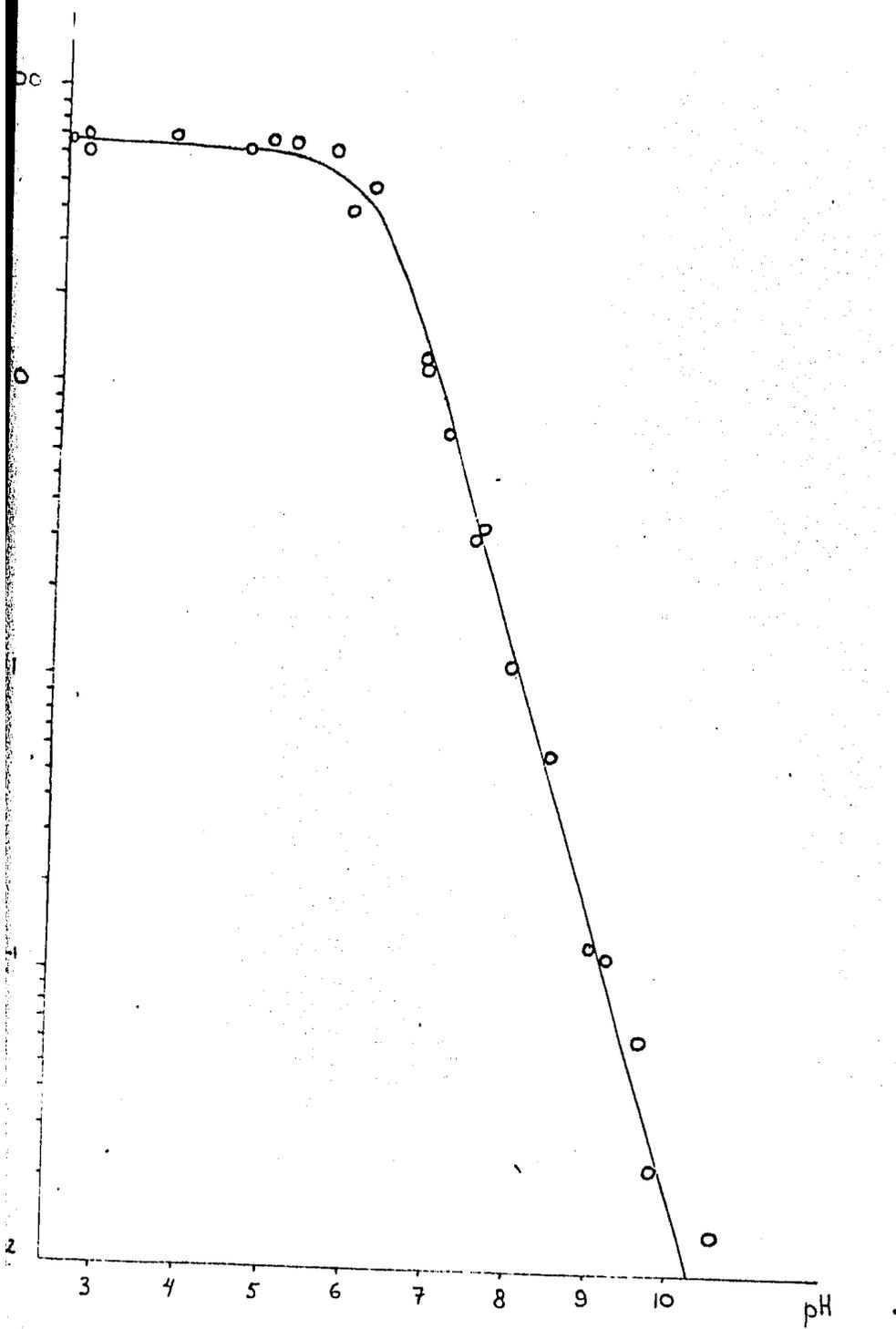
Dentro de los estudios realizados para determinar las propiedades fisicoquímicas de la glibenclamida están los que se llevaron a cabo por Hajdú, Koheler, Schmidt y Spingler (4) para determinar el coeficiente de reparto y la

constante de acidez de esta sustancia. En la determinación - se utilizó éter como fase orgánica y como fase acuosa glibenclamida sódica de pH=2.4 a 10.4 en solución amortiguadora de Britton-Robinson.

Después de cada extracción se obtuvieron las lecturas de absorbancia a 273 nm, evaporando la fase etérea- y reconstituyéndola con solución de hidróxido de sodio 0.01N y la fase acuosa se diluye con esta misma solución.

Se encontró que el coeficiente de reparto es de 65 ± 10 y el pKa de 6.3.

La dependencia del coeficiente de reparto -- con respecto al pH se muestra en la figura 1.



DEPENDENCIA DEL COEFICIENTE DE REPARTO DE LA GLIBENCLAMIDA CON RESPECTO AL pH (4)

Sholtan (4) estudió la unión de la glibenclamida a proteínas por medio de un equilibrio de diálisis. En una cámara de diálisis se colocaron de 40 a 200 microgramos- de glibenclamida/mililitro de suero de caballo. Se dializa- ron contra amortiguador de fosfatos (1/15 M, pH 7.2) durante una noche a temperatura ambiente. La determinación de sue- ro en el amortiguador se hizo colorimétricamente. En la figu- ra 2 se muestran los resultados obtenidos.

Se obtiene la siguiente igualdad:

$$\text{Log } C_{\text{ligado}} = 1.13 \log C_{\text{libre}} + 1.22 \pm 0.06$$

En las pruebas realizadas por Heptener (4) se trabajó con glibenclamida marcada con isótopo radiactivo y con suero de diversas especies en muy bajas concentracio- nes:

<u>SUERO</u>	<u>INTERVALO DE CONCENTRACION</u>	<u>ECUACION</u>
Perro	0.1 - 10 µg/ml	$1.21 \log C_{\text{libre}} + 2.23$
Conejo	0.05 - 10 µg/ml	$1.11 \log C_{\text{libre}} + 2.18$
Rata	0.05 - 10 µg/ml	$1.11 \log C_{\text{libre}} + 2.35$
Hombre	0.05 - 10 µg/ml	$1.151 \log C_{\text{libre}} + 2.45$

La porción de glibenclamida no ligada a pro- teínas en porcentaje de la concentración total se muestra en la figura 3.

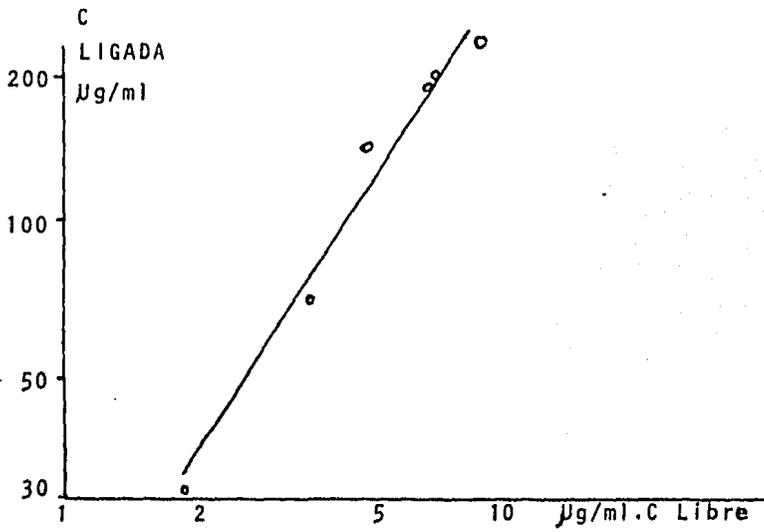


FIG. 2
 RESULTADO GRAFICO DEL ESTUDIO DE LA UNION A
 PROTEINAS DE GLIBENCLAMIDA POR MEDIO DE UN-
 EQUILIBRIO DE DIALISIS (4)

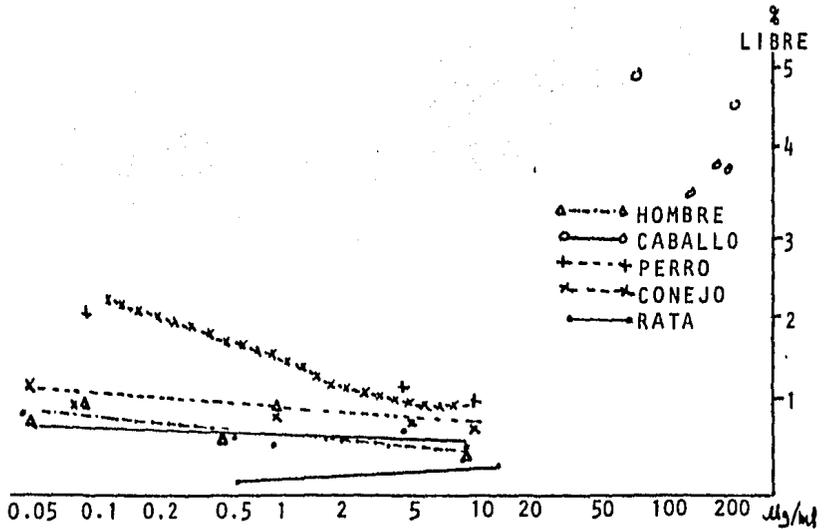


FIG. 3
 PORCION NO LIGADA DE GLIBENCLAMIDA VS. PORCIENTO
 DE LA CONCENTRACION TOTAL DE DIVERSAS ESPECIES.
 (4)

DATOS ESPECTROSCOPICOS

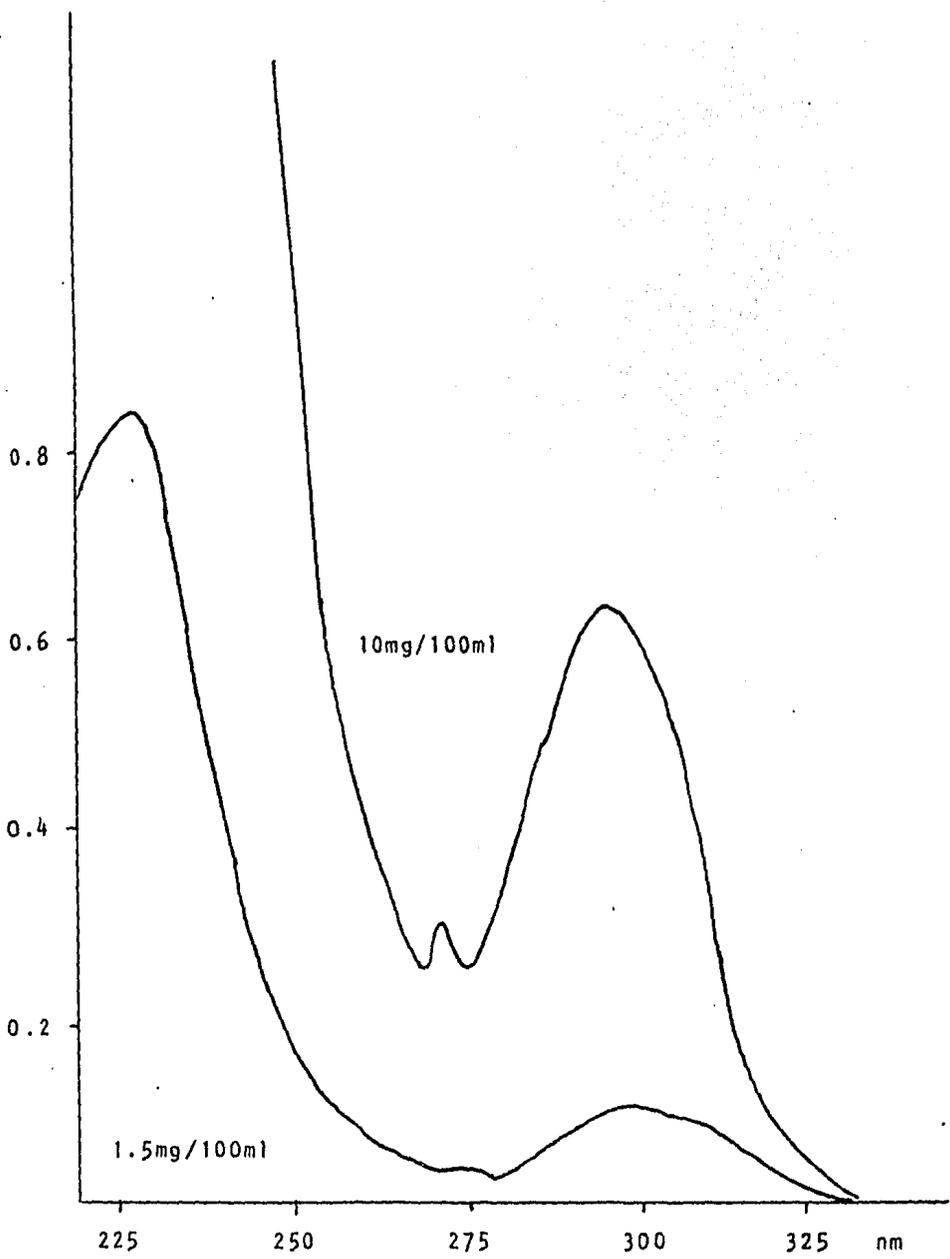
ESPECTRO DE ABSORCION

El espectro de absorción fué determinado por Haján, Kohler, Schmidt y Spingler (4). Usaron un espectrofotómetro Beckman DK2. Emplearon soluciones de glibenclamida de concentración de 1.5 a 10mg/100ml de metanol. Los máximos de absorción se localizarón a 227 nm (Log = 4.47) a 273m (Log = 3.20) y a 298nm Log = 3.53. Se caracteriza por la -- aparición de un pico pequeño entre las dos bandas principa - les a 273 nm. El espectro es aditivo de los dos espectros - cromóferos independientes del sistema. El máximo localizado a 273 nm corresponde a la primera parte identificada de la - molécula en tanto que a 227 nm se detecta la segunda parte.

ESPECTRO DE ABSORCION IR

El espectro de absorción IR se determinó en un espectrofotómetro IR Perkin Elmer (de rejilla 225 con com primidos de bromuro de potasio) La sensibilidad es suficien te para las pruebas de identificación y pureza.

Se encuentran dos bandas medianamente fuertes a 3313 cm^{-1} y 3363 cm^{-1} que se asignan a los grupos amino.



JRA 4. ESPECTRO DE ABSORCION UV DE GLIBENCLAMIDA (4)

Otra banda medianamente fuerte aparece en el intervalo de vibración de las valencias C-H (2925 cm^{-1}). Uno de los picos afiliados, aunque débil a 2843 cm^{-1} parece ser característico del resto ciclohexilo. Aparece también una banda fuerte a 1715 cm^{-1} que se asigna a las vibraciones del carbonilo procedente del resto benzoilo. (4)

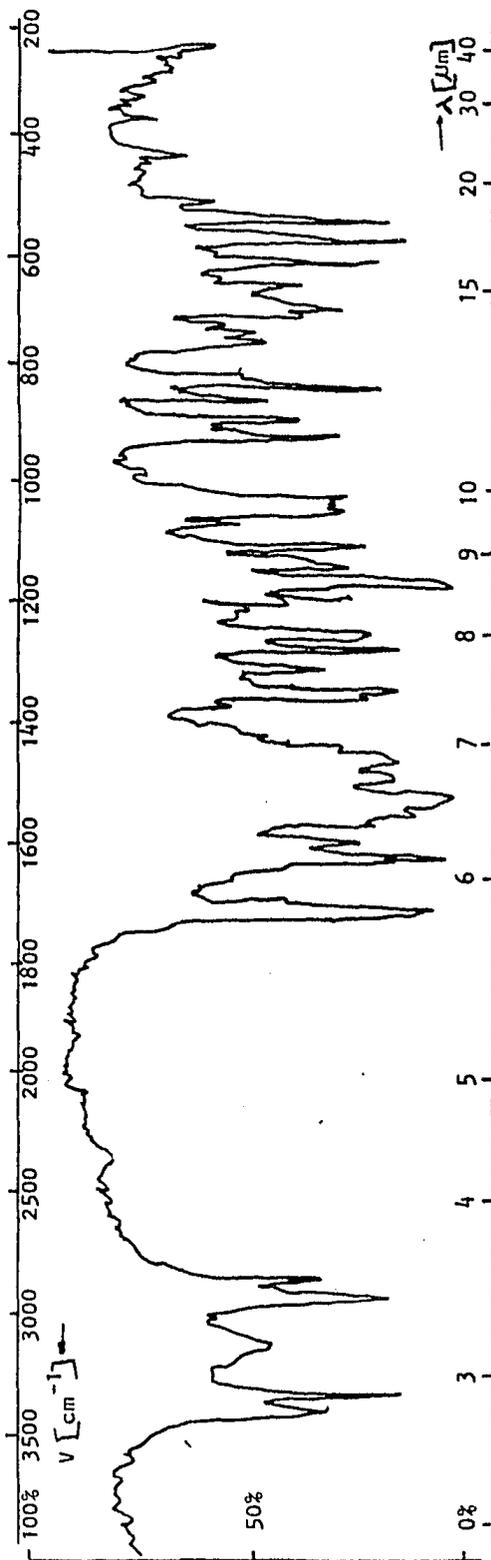


FIGURA 5 ESPECTRO DE ABSORCION IR DE GLIBENCLAMIDA (4)

ENSAYOS DE PUREZA

PERDIDA AL SECADO

La glibenclamida cuando se seca a 105°C no debe perder más de 1% de su peso.

HUMEDAD

La humedad determinada por el método de Karl Fisher no debe ser mayor de 0.5%. (3)

CENIZAS SULFATADAS

La glibenclamida no debe tener más del 0.1% de cenizas sulfatadas. (3)

METALES PESADOS

Los metales pesados determinados en 1.5 gramos de muestras según el método de la Farmocopea Británica no deben encontrarse en cantidad mayor a 2 ppm de Pb. (3)

SUSTANCIAS RELACIONADAS

La determinación de las sustancias relacionadas con la glibenclamida se efectúa por el método de cromatografía en capa delgada. Se utilizan placas de sílica gel GF 254 y como eluyente cloroformo-ciclohexano - etanol (96%) - ácido acético glacial (45 : 45 : 5 : 5).

Las sustancias relacionadas con glibenclamida son:

4- [2-(5-cloro-2-metoxibenzamido)N etil] bencensulfonamida, - producto intermedio de sus síntesis y N-4- [2-(5-cloro-2-metoxibenzamido)etil] bencensulfonil-N-metilcarbamato de etilo. (3)

C A P I T U L O I V

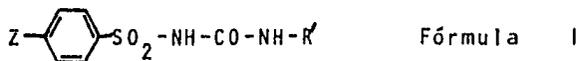
S I N T E S I S

SINTESIS DE LA GLIBENCLAMIDA

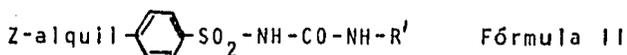
Al hacer una revisión del desarrollo histórico sobre el uso de la glibenclamida en la terapia hipoglucemiante, se encontró lo siguiente:

El conocimiento de las sulfonilureas como antidiabéticos orales, comienza con la introducción de la carbutamida y la tolbutamida por Boehringer Mannheim y Farbwerke Hoechst en 1956. Esto causó investigaciones extensas en el mundo sobre la química y la farmacología de esta clase de compuestos.

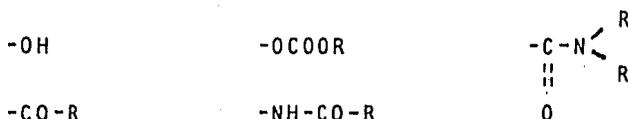
Una vez que se encontró la posible variabilidad de Z y R₁ en la fórmula I, sin pérdida de la actividad hipoglucémica, se sintetizaron gran número de sustancias terapéuticamente activas.



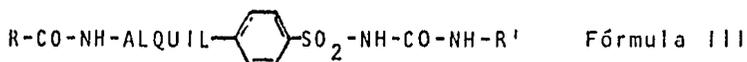
Algunos años antes, estos mismos investigadores descubrieron un tipo de sulfonilurea que tenía una alta actividad para bajar el nivel de glucosa en sangre. Esto se pudo observar con la inserción de una cadena alquílica entre ciertos grupos Z y el núcleo bencénico, incrementando la actividad (fórmula II).



El mejor efecto hipoglucémico se observa si Z está en la posición 4 (fórmula I). El grupo Z puede ser:



Especialmente fué favorable la investigación sobre acilaminoalquilbencensulfonilureas (Fórmula III)

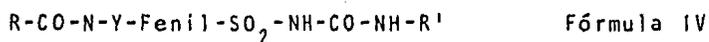


Algunos compuestos de esta serie en donde -- R = -CH₃ fueron descritos por Momose, Shogi (1961) (5). En conexión con las correspondientes aminoalquilbencensulfonilureas libres, Boyono compara la N-acetilaminoetilbencensulfonil-N'-etilurea, así como los correspondientes propil y butil derivados y la N-acetil-aminoetil-bencensulfonil-N-butilurea, con carbutamida encontrándola menos activa.

Durante extensas investigaciones, se sintetizó un considerable número de acil-aminoalquil-bencensulfonilureas con desconocida pero alta actividad para bajar el nivel de glucosa en sangre. Estas son fáciles de obtener.

Generalmente pueden ser sintetizadas haciendo reaccionar aminoalquil-bencen-sulfonamidas con derivados-activados de ácidos, los resultados son acil-aminoalquil-bencensulfonamidas que junto con isocianatos dan las sulfonilureas, pero pueden utilizarse otros métodos.

La mayoría de los compuestos preparados presentan la fórmula general:



Donde:

R-CO = Radical de un ácido orgánico

NH-R' = Radical amino derivado de un gran número de radicales alifáticos, cicloalifáticos, policíclicos y arilalifáticos.

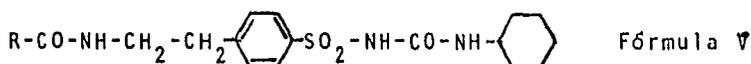
R' = H, radical alifático o radical aromático

Y = Cadena hidrocarbonada conteniendo de 1 a 4 átomos de carbono.

La fórmula general está dada para un gran número de compuestos.

Durante el desarrollo de estos compuestos, se encontraron también relaciones importantes entre su estructura química y su actividad farmacológica.

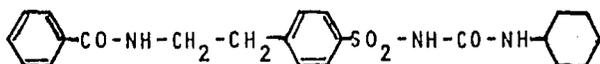
Así por ejemplo compuestos que contienen como R' el radical ciclohexilo, tienen un buen efecto hipoglucémico y haciendo variaciones adicionales de R' y Y se llega a la conclusión de que los compuestos más interesantes desde el punto de vista farmacológico están dados por la fórmula - V:



Casi todos los compuestos derivados de esta estructura bajan el nivel de glucosa en sangre en conejos, - mucho más que tolbutamida o carbutamida.

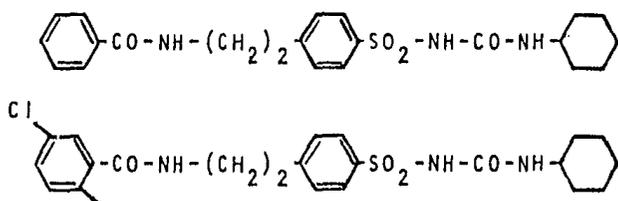
Las propiedades de las acilaminoalquil-benzensulfonilureas dependen especialmente de la naturaleza del componente acilo R-CO; el cual ha sido modificado sistemáticamente. Entre las posibilidades de R como grupo alifático, aromático, arilalifático y heterocíclico, las benzoamidodetil-bencen-sulfonilureas nos dan las series más interesantes.

El compuesto:



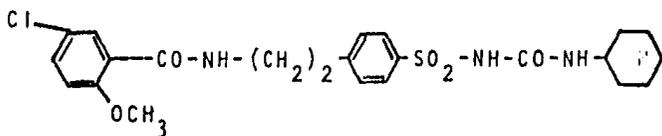
mostró sorprendentemente una actividad mayor que la tolbutamida en más de 100 veces. Esta fué la clave para futuras investigaciones.

La modificación del grupo benzamido por introducción de sustituyente en el anillo aromático, trajo nuevos éxitos. Así, la introducción de un grupo orto metoxi da varios compuestos con los cuales el efecto de bajar el nivel de glucosa en sangre se inicia con dosis muy bajas. Esto se extendió también considerablemente a algunas sulfonilureas que tenían cloro como sustituyente en la posición 3.



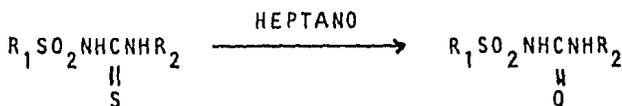
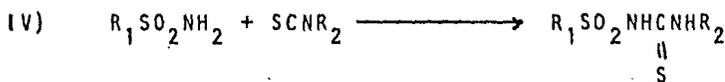
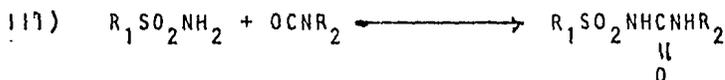
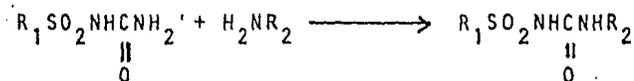
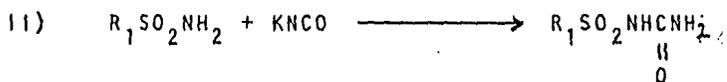
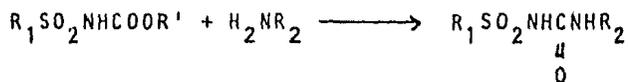
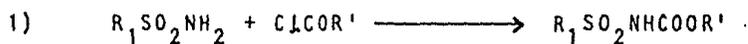
La actividad máxima fué investigada por combinación de ambos principios, dando como resultado la N-4-(o-(5-cloro-2-metoxi-benzamido)etil)-bencensulfonil-N'-ciclohexilurea, que es la glibenclamida, motivo de nuestro estudio.

(5)



En la industria farmacéutica se usan actualmente por lo menos 4 métodos para sintetizar sulfonilureas. En todos éstos la única sustancia en común es la sulfonamida:

Una síntesis general para estos compuestos -
 es la siguiente:

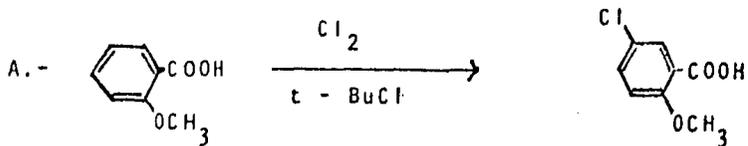


(15)

A continuación se cita una de las síntesis - más usadas para la obtención de la glibenclamida, la cual involucra 6 pasos.

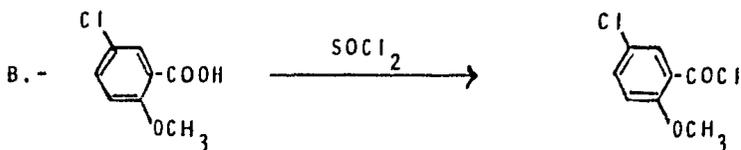
Las principales sustancias que intervienen - en estos pasos son: ácido 2-metoxi-benzoico, 2-fenil-etilamina e isocianato de ciclohexilo.

Como se puede ver en la siguiente figura, la molécula de sulfonilurea se origina hasta el último paso, -- por la reacción entre la sulfonamida y el isocianato de ciclohexilo.

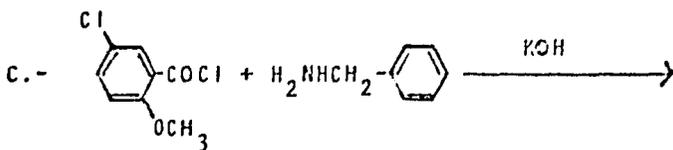


Ac. 2 Metoxi-benzoico

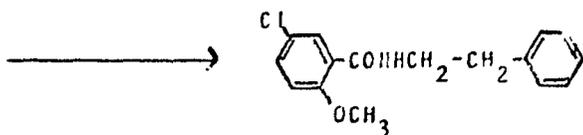
Ac. 5-cloro 2 Metoxibenzoico



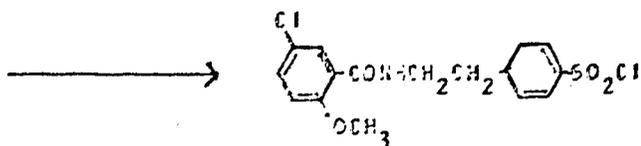
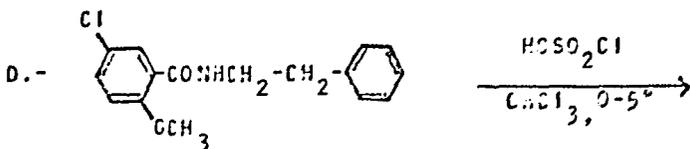
Cloruro de 5 cloro-2Metoxi-benzoilo



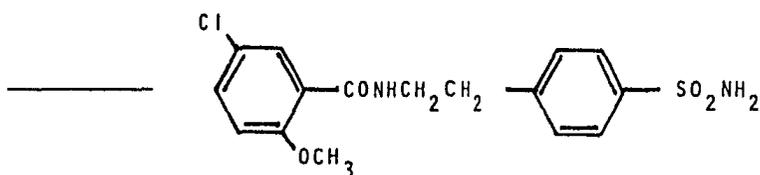
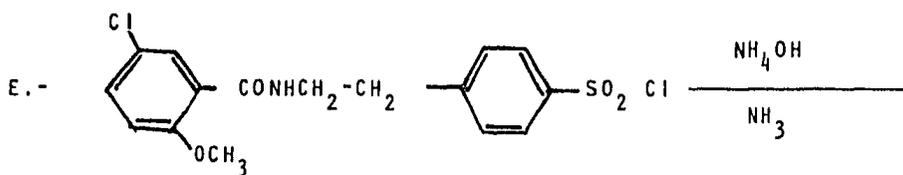
2 fenil etil anina



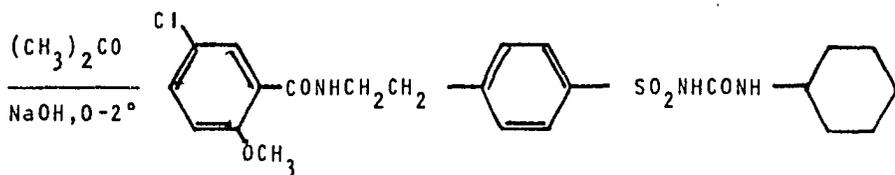
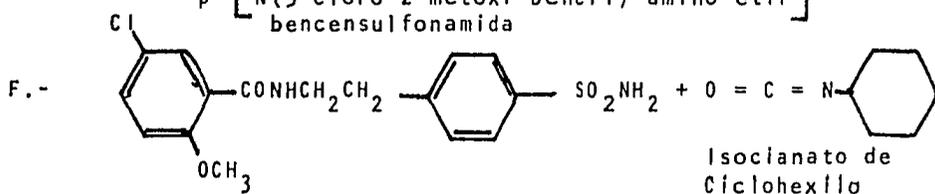
N-(2-fenil etil) 5 cloro 2 metoxi benzamida



Cloruro de p-(5-cloro, 2 metoxibenamido N etil) bencen sulfonilo.



p- [N(5 cloro 2 metoxi benzil) amino etil] -
bencensulfonamida



1- [4- [2-(5-cloro-2-metoxibenzamido) etil] bencensulfonyl] -3
-ciclohexilurea.

(Glibenclamida) (6)

Es importante mencionar que para llevar a cabo la síntesis de la glibenclamida descrita anteriormente se utilizan sustancias que son fáciles de conseguir.

El uso de las sulfonilureas para controlar - la diabetes significa un gran avance para evitar el uso de - la insulina, aunque esta sigue siendo de gran importancia para controlar el nivel de glucosa en sangre cuando el paciente no se puede controlar con otros medicamentos.

El desarrollo de nuevas sulfonilureas ha sido muy rápido y por su efectividad se piensa que en el futuro, la diabetes se podrá tratar con productos totalmente sin téticos, de los cuales los más importantes, por el momento - son las sulfonilureas y de éstas la que ha mostrado mayores-ventajas para su uso es la glibenclamida.

C A P I T U L O V

M E T O D O S A N A L I T I C O S

MÉTODOS DE ANALISIS

De acuerdo a las características estructurales de la glibenclamida, se han desarrollado diferentes tipos de métodos analíticos, muchos de ellos aplicados en estudios farmacológicos y clínicos, para determinar la concentración de esta sustancia en fluidos biológicos (suero, orina, etc.) así como en sus preparados farmacéuticos.

De éstos métodos analíticos se han recopilado en este trabajo los más importantes y algunos de ellos, por considerarlo de interés, se citan en forma detallada.

MÉTODOS POR TITULACION ACIDO - BASE

Estos métodos se basan en las propiedades ácidas de la glibenclamida. Pueden a su vez dividirse en volumétricos directos y en potenciométricos y es factible llevar a cabo ambos tipos de métodos en medios acuoso y no acuoso.

MÉTODOS VOLUMETRICOS DIRECTOS

Como se mencionó anteriormente éstos métodos se basan en las propiedades ácidas de la glibenclamida.

1) Titulación con NaOH 0.1 N

Se disuelve la muestra en etanol (96%) ca - -
liente previamente neutralizado. Se titula con NaOH 0.1 N
usando solución de fenoftaleína como indicador y protegien-
do la mezcla de la exposición al dióxido de carbono atmosfé-
rico. (5)

2) Titulación en medio no acuoso con Metóxido de Litio
0.1 N.

La glibenclamida se disuelve en tetrametilu-
rea previamente neutralizada. La solución se titula con me-
tóxido de Litio 0.1 N. Durante el curso de la titulación -
el extremo de la bureta se mantiene sumergido en la solu- -
ción. Se puede utilizar como indicador azo-violeta al 0.2%
en tolueno. Esta titulación también puede efectuarse poten-
ciométricamente como se explicará más adelante.(5)

METODOS POTENCIOMETRICOS

En la determinación potenciométrica de gli-
benclamida se aprovechan también las características ácidas
de la molécula y así podemos citar los siguientes métodos:

1) Titulación potenciométrica con NaOH 0.1 N

Se selecciona preferentemente una combinación de electrodos de vidrio-calomel, utilizando mezcla de piridina-agua como disolvente y como titulante NaOH 0.1N (4)

2) Titulación potenciométrica en medio no acuoso con Metóxido de Litio 0.1 N.

Al desarrollar éste método según citan los investigadores, se utilizó un potenciómetro Pye pH-mv-meter, equipado con una combinación de electrodo vidrio-calomel (Pye 401 E-07). El puente de la solución salina en el electrodo se reemplaza por una solución saturada de KCl en metanol. El electrodo modificado se sumerge toda la noche en tetrametilurea antes de su uso.

El fármaco se disuelve en tetrametilurea previamente neutralizada. La solución se titula potenciométricamente con metóxido de litio 0.1 N. (4)

METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS

Basandose en las propiedades espectrofotométricas en la región U.V. de la glibenclamida, ésta sustancia

puede determinarse empleando esta técnica. La glibenclamida tiene 3 máximos de absorción, y son a 227, 273 y 298 nm. Esta técnica resulta adecuada empleando soluciones de baja concentración que sigan la ley de Beer. Los coeficientes de extinción de ésta sustancia son 0.650 0.505 y 0.547 a 227, - 273 y 298 nm respectivamente.

1) Determinación espectrofotométrica de glibenclamida en suero.

La fuerte absorción de la glibenclamida en la región UV del espectro hace posible su determinación cuantitativa en suero. Estos trabajos fueron desarrollados por Hadjú, Kohler, Schmidt y Spingler. (4)

La determinación se realizó en solución acuosa alcalina a 227nm. Las muestras de suero se diluyeron con solución de NaOH 0.01 N y como blanco se empleó la misma solución alcalina. Se encontró que la cantidad mínima detectable en estas condiciones fué de 0.2 µg/ml.

El suero se preparó mezclándolo con a - mortiguador de fosfatos 0.66 M (pH 6.2) y agitando con acetato de etilo. El extracto residual se concentró a sequedad. - Se recuperó con acetato de etilo para determinar el coefi --

ciente de extinción en un espectrofotómetro Beckman DB a 293 nm y usando celdas de cuarzo de 20 mm. La figura 6 muestra la extinción observada para concentraciones de glibenclamida -suero. En la figura se encuentran también los resultados -análogos de diversos experimentos (n=3) corridos en solución acuosa.

Estas pruebas muestran un rendimiento -cuantitativo de hasta 10 $\mu\text{g/ml}$ en suero. Los valores obtenidos en suero informan un 77% del total.

Con ayuda de éste método es posible de terminar concentraciones de glibenclamida en suero, desde 2 hasta 20 $\mu\text{g/ml}$. (4)

2) Determinación espectrofotométrica de glibenclamida en mezcla de etanol-hexano

Este método espectrofotométrico consiste en disolver 10 mg de glibenclamida previamente secada a 100°C durante una hora, en 60 mililitros de alcohol etílico grado -espectro y aforar a 200 mililitros con hexano puro. Comparar con una solución estándar de glibenclamida a la misma concentración y leer a 227 nm. (4)

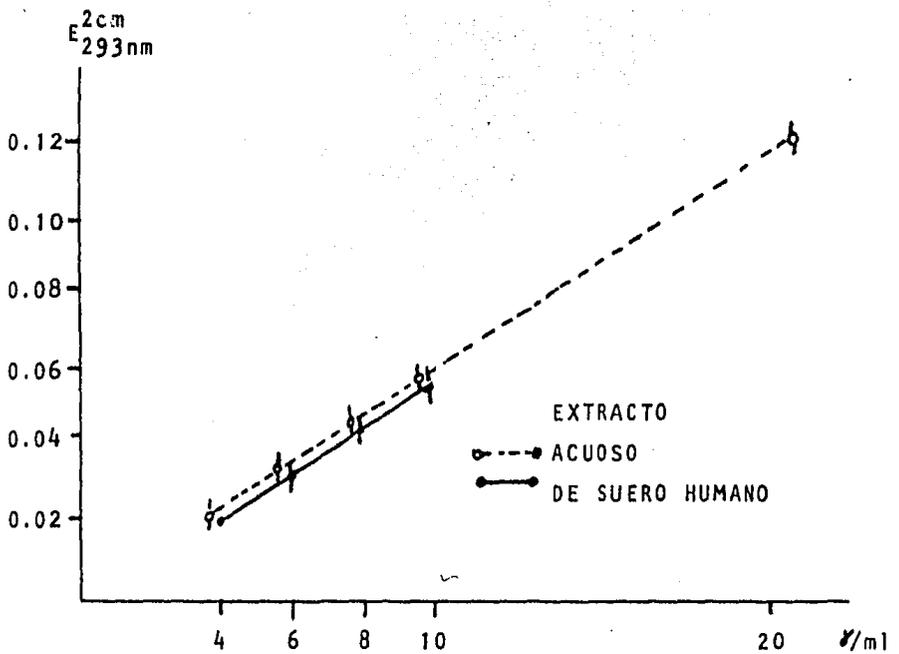


FIG. (6)

CONCENTRACION EN ACETATO DE
 ETILO DE GLIBENCLAMIDA

MÉTODOS COLORIMÉTRICOS

Los métodos colorimétricos están basados en la formación de sustancias con propiedades cromogénicas adecuadas para efectuar su cuantificación, midiendo el grado de absorción de energía radiante por dichas sustancias a una longitud de onda particular. Para lograr esto se efectúan reacciones químicas (cuando un espécimen no posee propiedades adecuadas) por medio de las cuales la sustancia puede convertirse en una especie absorbente.

Un ejemplo de esto es la formación de complejos organometálicos. (8)

En el caso de la glibenclamida se pueden formar complejos coloridos en presencia de algunos reactivos como azul de bromotimol y otros, los cuales presentan absorción en la región visible del espectro.

1) Determinación colorimétrica de glibenclamida con dinitrofluobenceno.

La glibenclamida se puede determinar por el método propuesto por Spingler (4) para tolbutamida en orina y suero. La determinación en suero no es sencilla y -

las dificultades pueden resolverse haciendo un tratamiento - previo, acidulando la muestra con ácido tricloroacético al -- 10%, se centrifuga y del sobrenadante se extrae con éter la glibenclamida del suero. Una alícuota de la fase etérea se evapora a sequedad y el residuo se recupera con acetato de a milo, se adiciona dinitrofluorobenceno al 0.1% en acetato de amilo y se calienta en baño de aceite a 150°C, se enfría rápidamente y se lee contra acetato de amilo puro a 380 nm.

2) Determinación colorimétrica de glibenclamida con a -
zul de bromotímol.

La glibenclamida en tabletas puede ser determinada colorimétricamente tratando la muestra pulverizada con cloroformo para disolver la glibenclamida, pasar el extracto clorofórmico a un embudo de separación, agitar con amortiguador de citrato-fosfato pH 5.6 conteniendo azul de bromotímol y medir la absorbancia del complejo formado en la capa clorofórmica, a 414 nm.

Aplicándose éste método para la determi nación de glibenclamida en tabletas conteniendo 5 miligramos del fármaco, se observó que la absorbancia fué lineal para - 10-100 microgramos de glibenclamida por mililitro. La recuperación fué del 100%, y la desviación estandar fué de 0.02-0.06. (8)

METODOS FLUOROMETRICOS.

Quando una solución de ciertas sustancias se irradia con luz ultravioleta, se puede producir fluorescencia, es decir, se produce la emisión inmediata de luz (del orden de 10^{-8} segundos) por una molécula después de haber absorbido radiación. La radiación emitida tiene longitudes de onda características de las moléculas que han absorbido la luz y no solamente de la longitud de onda del rayo de luz incidente. (7)

Esta propiedad la presenta la glibenclamida.

Método fluorométrico para la determinación de glibenclamida.

La glibenclamida muestra una débil fluorescencia propia (excitación máxima a 244 nm y 308 nm; máxima fluorescencia a 350 nm). Las determinaciones cuantitativas se logran en aparatos de alta sensibilidad como el Perkin Elmer Hitachi. En disoluciones etanólicas se obtienen lecturas de concentraciones hasta de 0.05 $\mu\text{g/ml}$.

Un método fluorométrico aplicado para la determinación de la glibenclamida en suero, consiste en -

mezclar éste con HCl 0.1N, agitar con cloroformo, centrifugar, tomar una alícuota de la fase clorofórmica, agregar NaOH 0.1 N y centrifugar nuevamente. Una vez terminada la centrifugación se procede a la cuantificación de glibenclámidas en la fase acuosa. (determinando la fluorescencia 350 nm). - (4)

MÉTODOS CROMATOGRAFICOS

La cromatografía es una técnica de separación en la que los componentes de la muestra se distribuyen entre dos fases, una llamada fase estacionaria, y la otra eluyente, para cromatografía en columna en papel y en capa delgada o fase móvil para cromatografía de gases o líquida de alta resolución.

El desplazamiento de la fase móvil se manifiesta en una migración diferencial de los componentes de la muestra.

En el caso de glibenclámidas ésta técnica es aplicable en sus diferentes tipos como se verá a continuación (9)

1) Cromatografía en capa delgada para la determinación de glibenclamida.

En la determinación de glibenclamida -- por cromatografía en capa delgada se trabaja con placas de sílica gel GP 254.

Se usan como eluyentes los siguientes sistemas:

1) Acetato de butilo-isopropanol-agua amoníaco (30;50;-15;5).

Rf = 0.70

11) Cloroformo-ácido acético- metanol (95;1;5). Rf=0.32- (4)

2) Cromatografía de gases para la determinación de glibenclamida en plasma.

En el método descrito por Daniele Castoldi y Odoardo Tofaneti, se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Pakard, equipado con un detector de captura de electrones de Ni⁶³ y una columna de vidrio de 1.8 metros por 3 mm de diámetro interno, empacada con OV-17 sobre Chrom GAW-DMCS de 80 a 100 mallas. (9)

Las temperaturas de la columna, inyector i. y detector fueron de 250°C. Se usó como gas acarreador 5% de metano en argón a una velocidad de flujo de 100 ml/min. La evaluación cuantitativa fué efectuada con integrador HP 3380-A usando tolbutamida como estándar interno.

La glibenclamida se administró oralmente a una dosis de 5 mg a 5 adultos voluntarios sanos en ayuno -- por 12 horas al tiempo de la administración. Las muestras de plasma se centrifugaron y se mantuvieron a -20°C hasta el análisis.

A muestras de 1 ml de plasma se adicionó una alícuota adecuada de estándar interno (100 mg de tolbutamida en 10 ml de acetona) se acidificaron con 0.3 ml de ácido fosfórico 0.2 M y se agitaron con 8 ml de cloroformo. La mezcla se centrifugó, la fase orgánica se separó y se secó adicionando sulfato de sodio anhidro, después se evaporó en una corriente de nitrógeno. El residuo se reconstituyó con 80 ml de acetato de amilo y 20 µl de 2,4 dinitrofluorobenceno al -- 0.05% v/v en acetato de amilo. La solución obtenida se mantiene a 130°C por una hora en baño de aceite, después se enfría.

La cantidad mínima detectable en estas condiciones resultó ser de 5 ng. La técnica descrita es espe

cífica para glibenclamida y no muestra interferencia de sus metabolitos, principalmente la 4-hidroxiclibenclamida, la cual puede ser determinada cuantitativamente usando el mismo procedimiento utilizando para glibenclamida, modificando las condiciones cromatográficas (temperatura de la columna, inyector y de detector; 300°C, 5% de metano en argón como gas acarreador a una velocidad de flujo de 100 ml/min).

El % de extracción de glibenclamida y tolbutamida en las condiciones del método son del 95 y 88% respectivamente. Estos valores se encontraron empleando placebo adicionados de cantidades conocidas de ambas sustancias, es decir se emplearon muestras de plasma de pacientes no tratados con los medicamentos. También se hizo una curva de calibración con soluciones de glibenclamida en concentraciones de 5 a 400 ng/ml de plasma.

La linealidad del método fue verificada para cantidades entre 10 y 100 ng por muestra. Según informan los autores de la cantidad mínima detectable es de 100 pcg (9)

3) Cromatografía de Líquidos de alta resolución para la determinación de glibenclamida en tabletas.

William F. Beyer, (10) desarrolló un método para cuantificar glibenclamida por cromatografía de lí-

quidos de alta resolución, en donde utiliza como estándar in terno testosterona en concentración de 0.125 mg/ml disuelta en una mezcla de etanol: metano, 95:5.

Durante el desarrollo de ésta técnica se usó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Dupont, modelo 820, y una columna de acero inoxidable de 100 cm de longitud y 2.1 mm de diámetro interno empacada con un polímero hidrocarbonado (propileno-etileno al 1% sobre un soporte Dupont HCP).

Las condiciones de operación fueron las siguientes:

Fase móvil: borato de sodio 0.01 M con 27.5% de metanol y un pH de 9.2.

Velocidad de flujo: 0.25 ml/min y a una presión de 500 psig.

Volúmen de inyección: 1 μ l.

PROCEDIMIENTO

Las tabletas se homogeneizan hasta obtener un polvo fino, se peso una cantidad de polvo equivalente a 5 mg de glibenciamida y se transfiere a un frasco ampula - que contiene 20 ml de estándar interno, se cierra herméticamente y se agita vigorosamente durante 30 minutos, se centrifuga y se inyecta en el cromatógrafo 1 ul del sobrenadante.- El estándar contiene 0.5 mg/ml de glibenciamida y 0.25 mg/ml de testosterona.

El tiempo de retención de la glibenciamida es de 8.5 minutos y 12.4 minutos el de la testosterona.

El método resultó ser lineal en un intervalo de 0.2 a 1.8 μg . La recuperación del compuesto utilizando placebos adicionados resultó cuantitativa (100.7%) y la desviación estándar relativa del ensayo fué de 1.81%. (10)

Además de estos métodos Wade J. y D. -- Scott desarrollaron un método cromatográfico de líquidos de alta resolución para la determinación rápida de glibenciamida intacta en suero de perro. (11)

También Wahline y Melander A. (12) desarrollaron un método por cromatografía de líquidos de alta re

solución para la determinación de glibenclamida en plasma.

RADIOINMUNOENSAYO DE GLIBENCLAMIDA

Un método de radioinmunoensayo sensible, específico y simple fué desarrollado también para la determinación de glibenclamida. El antisuero para glibenclamida es obtenido de conejos inmunizados con un antígeno preparado -- por la conjugación de la sal de diazonio de 'N-(p-amino-benzamidoetil)-bencen-sulfoni-N' ciclohexilurea a albúmina de suero bovino a través de la diazocopulación. La glibenclamida-marcada con H^3 es usada como un trazador. Para separar la glibenclamida marcada unida y libre en la mezcla de reacción se usó carbón recubierto con Dextrán.

El radioinmunoensayo es capaz de detectar cantidades hasta de 25 pcg de glibenclamida directamente en plasma sin necesidad de extracción. El antisuero usado - para el ensayo fué altamente específico y no reaccionó con los principales metabolitos conocidos de la glibenclamida.

(13, 14)

Como se puede observar se han desarro -
llado numerosos métodos para la determinación de glibenclami
da en fluidos biológicos que son importantes tanto para los
estudios farmacológicos como para la adecuada vigilancia te-
rapeútica de pacientes tratados con éste fármaco, dado el ti
po de actividad que presenta.

CAPITULO VI

FARMACOLOGIA

F A R M A C O L O G I A

En este capítulo se incluirán los aspectos farmacológicos más importantes de la glibenclamida.

Como se dijo anteriormente un acontecimiento importante en el tratamiento de la diabetes, fué la introducción de agentes hipoglucemiantes eficaces de administración oral.

En 1930 Rufz y colaboradores encontraron que ciertas sulfonamidas modificadas tenían un efecto hipoglucemiante.

Posteriormente Janbon y colaboradores en 1942, en el curso de estudios clínicos sobre el tratamiento de la fiebre tifoidea descubrieron que una sulfonamida -- (p-aminobencensulfaminoisopropiltiadiazol) provocaba hipoglucemia. En 1950 Loubatfiers, colaborador de Janbon, descubrió que éste compuesto no tenía efecto hipoglucemiante en el animal completamente pancreatomizado y sugirió que la acción de la sulfonamida era el resultado de la estimulación del páncreas para secretar insulina. La aplicación práctica de estos importantes hallazgos no fué aprovechada hasta que Franke y Fuchs observaran que el agente antibacteriano carbutami

da, usado para el tratamiento de enfermedades infecciosas, bajaba el nivel de glucosa en sangre, y así demostraron la utilidad de la carbutamida en el tratamiento de la diabetes.

Poco tiempo después, en 1956 la compañía farmacéutica Hoechst, sintetizó la tolbutamida, sustancia que no tenía acción antibacteriana, de menor toxicidad que la carbutamida y que pronto logró aceptación para el tratamiento de ciertos pacientes diabéticos. Así comenzó a surgir la primera generación de sulfonilureas, entre las que se encuentran:

- a) Cloropropamida, sintetizada en 1957.
- b) Acetoxamida, sintetizada en 1963.
- c) Tolzamida, sintetizada en 1966.

Buscando compuestos de menor toxicidad y de mayor actividad que los anteriores, fué como se empezaron a sintetizar las sulfonilureas de la segunda generación, entre las que se encuentran, glipzida, glibornuride, glicazida, glibutamida, glifumida y glibenclamida, siendo ésta última una de las más activas y de menor toxicidad. (17).

M E C A N I S M O D E A C C I O N

Para entender el mecanismo de acción de la glibenclamida, es necesario conocer la manera como es secretada la insulina.

La insulina está formada por dos cadenas de aminoácidos unidas por puentes disulfuro. Aunque se admitió que las cadenas A y B se sintetizaban por separado y luego se unían en las células B de los islotes pancreáticos, Steiner y col. (18) y Chance y col. (19), demostraron que las células B forman insulina a partir de un precursor de cadena única denominado pro-insulina (20). La insulina puede existir como monómero, dímero, o hexámero, formado por tres dímeros. Dos átomos de Zn^{2+} se coordinan en el hexámero, que es la forma como la insulina se almacena en las células β .

La proinsulina es sintetizada en los elementos polirribosómicos asociados con membranas del retículo endoplásmico rugoso de las células B del páncreas. La proinsulina primero es transferida a las cisternas del retículo, después por medio de los elementos de transición (vesículas) al aparato de Golgi, donde se concentra en los gránulos inmaduros. Aquí comienza la conversión de proinsulina a

insulina, finalmente los gránulos de almacenamiento que contienen proinsulina e insulina hacen protrusión desde el aparato de Golgi, y se completa la conversión enzimática de proinsulina a insulina, más péptido C. Los gránulos pueden quedar almacenados, o ser destruidos por los lisosomas, o liberados por emiocitosis (18, 21, 22).

En el hombre la glucosa es el único nutriente que estimula la biosíntesis y secreción de insulina en concentraciones fisiológicas; ésta acción ha sido ampliamente estudiada y existen datos demostrativos en el sentido de que es la propia molécula de la hexosa la que resulta secretagoga. (21)

La glucosa parece ejercer un doble papel, actúa como secretagoga por interacción con un glucoreceptor de la membrana celular y, claro está, sirve como fuente de energía de las células β .

El hecho de que los agonistas β adrenérgicos estimulen la secreción de insulina sugiere que el AMP_c media la respuesta. También se sabe que el glucagón aumenta el AMP_c en los islotes y estimula la secreción de insulina. (23, 24, 25, 44).

No está claro cual sea el papel exacto del AMP_c , pero guarda relación con la necesidad de Ca^{2+} . Los agentes insulíntrópicos sólo actúan en presencia de Ca^{2+} extracelular y facilitan su flujo. El AMP_c y el Ca^{2+} activan el sistema microtúbulos-microfilamentos (fig. 7) que intervienen en la migración emiocitosis de los gránulos que contienen insulina. El contenido de insulina del páncreas es paralelo al grado de granulación de las células B. (26, 27, 28, 29).

Los individuos con diabetes de aparición en la madurez tienen células B funcionales, como lo muestra la presencia en plasma de insulina y péptido C. (30)

Sin embargo, existe un retraso en la secreción inicial de insulina cuando es estimulado por glucosa, incluso en las formas más tempranas de la enfermedad. El trastorno de la función de las células B también lo demuestra el hecho de que se secreta menos insulina con una concentración determinada de glucosa, en los diabéticos y en los que tienen la enfermedad latente. El defecto puede estar en los glucoreceptores de la membrana de las células B. (31, 32, 33)

El mecanismo de acción insulíntrópica de la glibenclamida hasta la fecha no es bien conocido, en lo que concuerdan los diferentes autores, es en el hecho de que

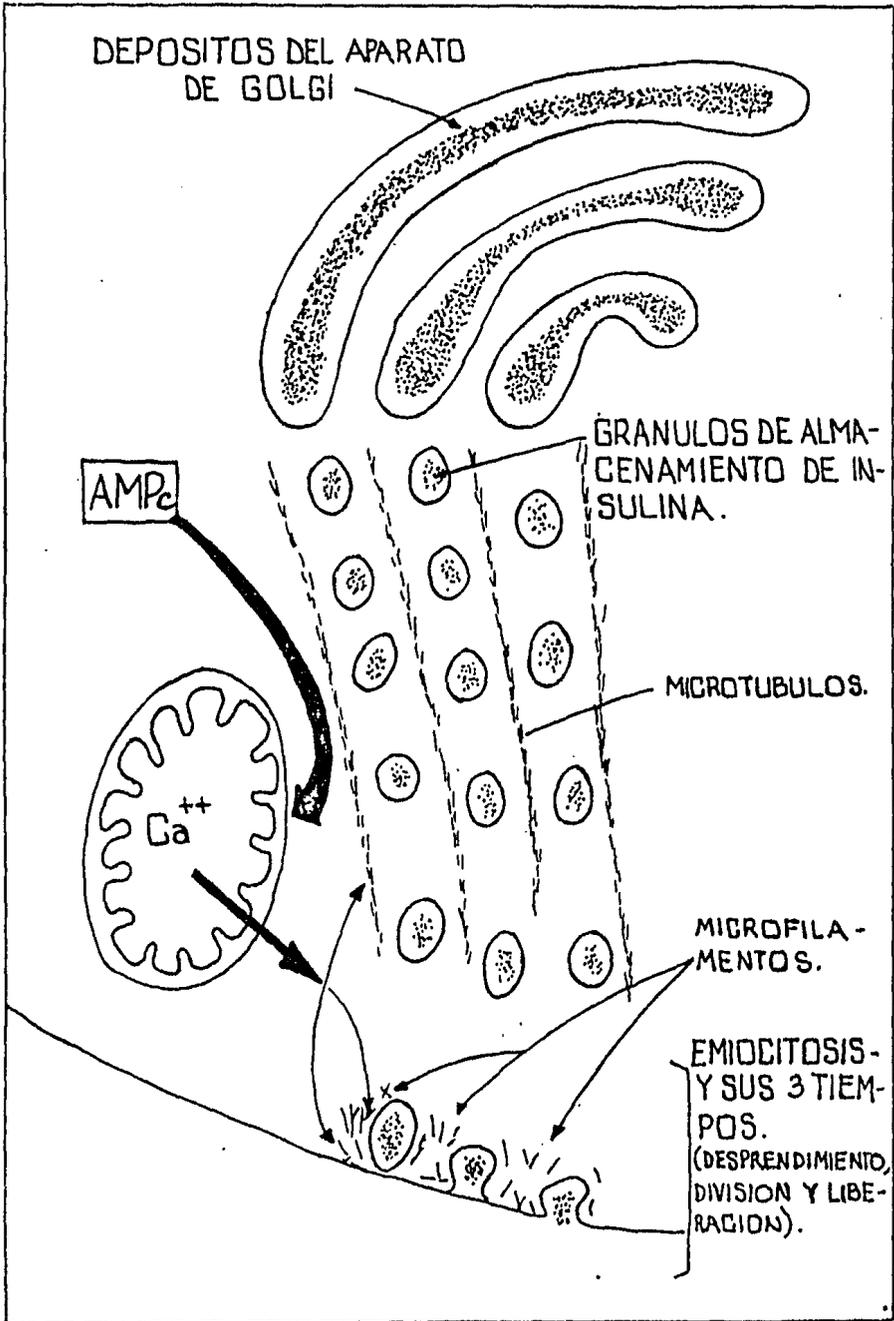


FIG. 7 ACTIVACION DEL SISTEMA MICROTUBULOS-MICROFILAMENTOS

la glibenclamida se fija en la membrana plasmática (34, 35, 36).

Existen dos hipótesis acerca del mecanismo de acción de la glibenclamida:

a) Aumenta el nivel de AMP_c dentro de las células β y por consiguiente se estimula la secreción de insulina.

b) Actúa sobre los lisosomas y libera la amiloglucosidasa. Esta enzima hidroliza el glucógeno de las células β y eleva el nivel de glucosa intracelular, y por lo tanto - habrá una activación de los glucoreceptores y dará origen a la estimulación de la secreción de insulina, debido a que mejora la sensibilidad de los glucoreceptores de las células B a la glucosa extracelular. (fig. 8)

Lundquist (37, 38), apoya la segunda hipótesis, ya que una serie de experimentos realizados in vivo, mostraron una activación de los lisosomas y una liberación de la amiloglucosidasa, observando también un aumento en la actividad de ésta enzima minutos después de la inyección intravenosa de glibenclamida y observándose un aumento de los niveles plasmáticos de insulina.

SULFONILUREAS

SEGUNDO MENSAJERO

LISOSOMAS

AMILOGLUCOSIDASA

GLICOGENO

GLUCOSA

AMP_c

GLUCOSA EXOGENO

GLUCORECEPTORES.

GRANULOS DE INSULINA

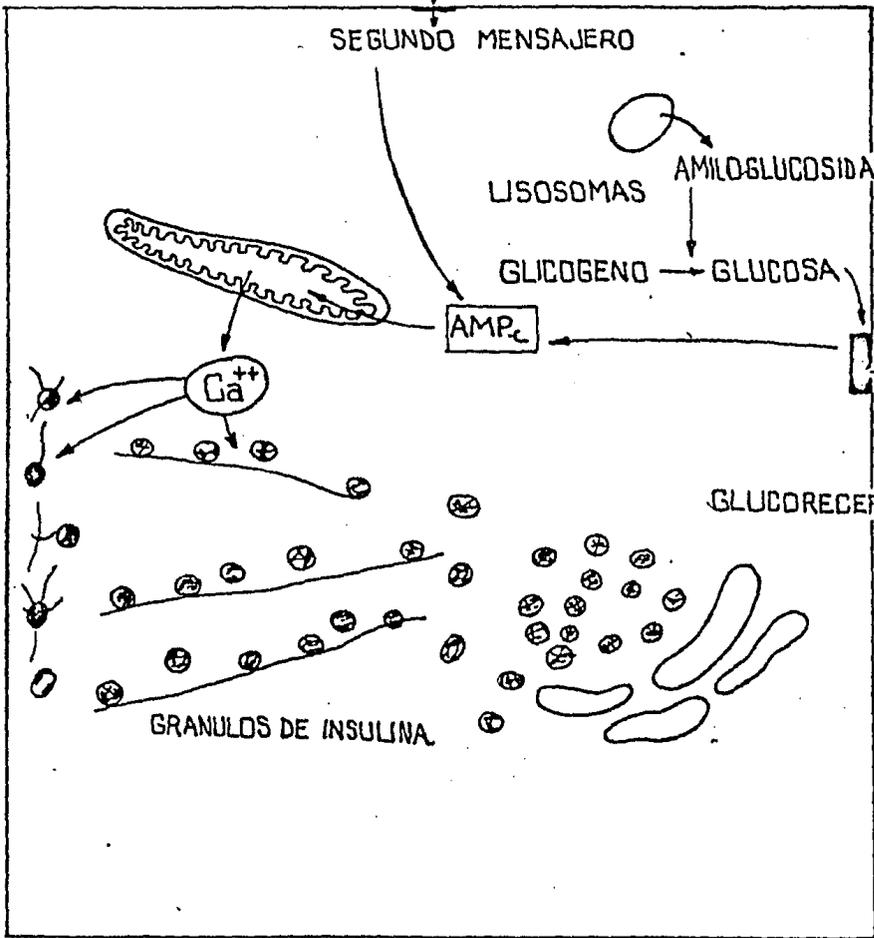
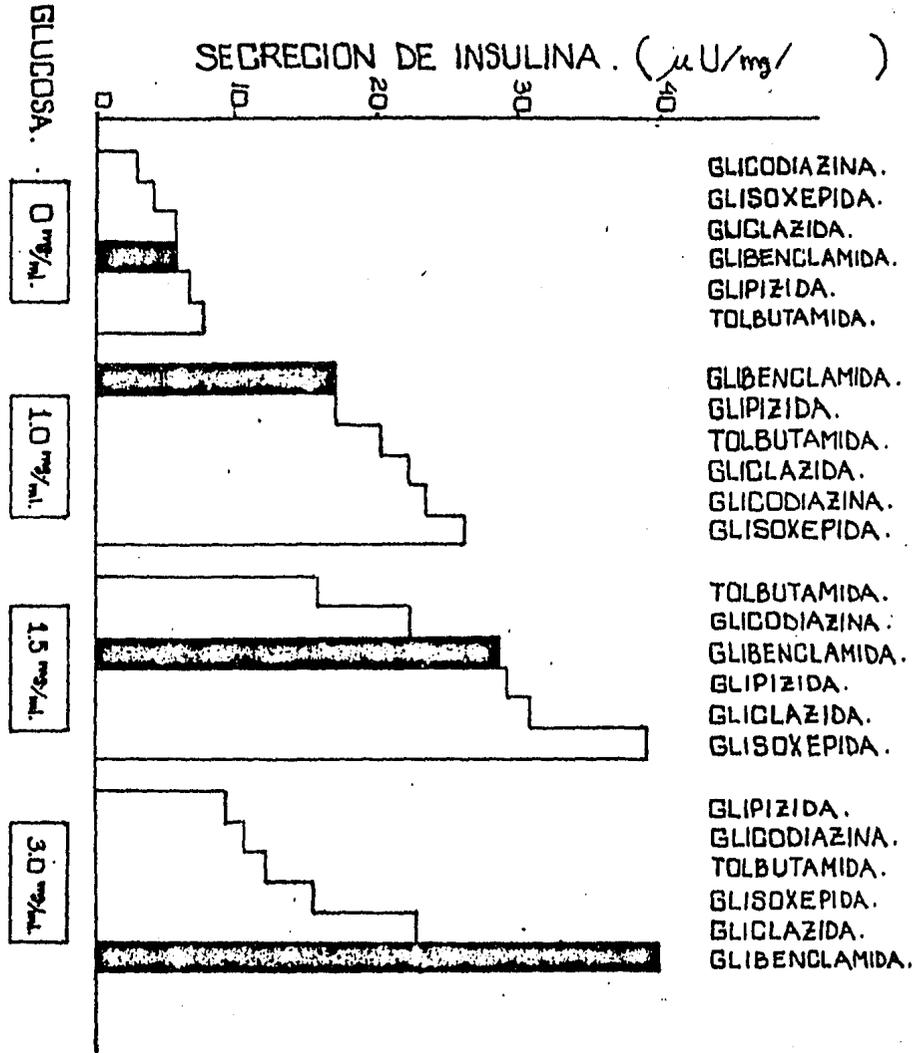


FIGURA 8 HIPOTESIS ACERCA DEL MECANISMO DE ACCION DE
DE LAS SULFONILUREAS SOBRE LAS CELULAS BETA
DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS

Cualquier hipótesis que apoye un mejoramiento en la sensibilidad de los glucoreceptores de las células β por efecto de la glibenclamida, explicaría los resultados obtenidos por Malassie (39), quién observó que la glibenclamida presenta una acción insulínica, la cual es función de la glucosa extracelular (fig. 9). Esto explica que la secreción de insulina, bajo la acción de la glibenclamida se incremente con la glicemia.

Así el mecanismo de acción de la glibenclamida, queda en el terreno de la investigación, lo que sí se sabe a ciencia cierta es que provoca la desgranulación de las células β de los islotes de Langerhans, con lo cual produce un aumento en la cantidad y velocidad de secreción de la insulina. Esta evidencia se ha basado en una variedad de estudios experimentales y clínicos, que en forma inequívoca permiten aseverar ésta conclusión (40-75).

FIG. 9 SECRECIÓN DE INSULINA VS. CONCENTRACION DE GLUCOSA



A C C I O N T E R A P E U T I C A

Existen numerosos y extensos estudios sobre la acción terapéutica de la glibenclamida, pero para el propósito de nuestro trabajo, resultaría impráctico describirlos, por lo que sólo daremos a conocer las conclusiones de los estudios de mayor interés.

Con base a los estudios realizados por los diferentes grupos experimentales, se puede concluir que la glibenclamida es un potente agente hipoglucemiante, capaz de bajar los niveles de glucosa sanguínea en individuos adultos sanos y en pacientes con diabetes de aparición en la madurez. (76-84).

Christ y col. (85) afirman que las concentraciones máximas en plasma se alcanzan a las cuatro horas y las determinaciones realizadas 24 horas después, muestran que los niveles plasmáticos de la glibenclamida disminuyen en más de un 95% de los detectados a las cuatro horas. No obstante, se demuestra que el efecto hipoglucémico del fármaco persiste en los individuos adultos estudiados, 15 horas después de una dosis inicial de 5 mg de glibenclamida. Esto se demostró con la determinación de la glucosa sanguínea en individuos que se encontraban en ayunas y fué signifi

cativamente más baja que los valores obtenidos en los individuos control.

En todas las pruebas realizadas después de 15 horas de la administración del fármaco a los pacientes diabéticos, se confirmó la acción hipoglucemiante de la glibenclamida durante éste período.

Otros autores difieren en el tiempo de duración del efecto. Diferentes informes sobre el empleo de la glibenclamida en la investigación clínica en humanos, demuestran que ésta sulfonilurea es un hipoglucemiante efectivo que puede ejercer su efecto durante 24 horas, después de una dosis oral única en el desayuno, o después de la comida de mayor aporte calórico.

Existe una relación directa en la dosis efecto y se sabe que con dosis exageradas se puede provocar hipoglucemia marcada. Por lo que, los enfermos deben ser -- controlados en forma estrecha desde el punto de vista de su glicemia. La mejor forma de encontrar la dosis de sostén de la glibenclamida, es iniciar el tratamiento con dosis reducidas y aumentar éstas progresivamente hasta que se demuestre que la glucosuria desaparece o es mínima. Debe hacerse hincapié, sin embargo, que cuando el fármaco se administra iniciándose el tratamiento en grandes dosis, o que la dosis día

ría se aumenta rápidamente, el riesgo de hipoglucemia es considerable en individuos ancianos.

O'Sullivan (86), recomienda que la administración del medicamento se inicie a dosis de 5 mg diarios y cuando el enfermo se encuentre hospitalizado, ésta puede ser aumentada a razón de 2.5 mg al día, pero en pacientes externos, la dosis debe aumentarse con incrementos semanales de 5 mg, hasta que el diabético sea controlado llegando a dosis máximas de 20 mg al día. Sin embargo, al iniciar la terapia a base de 2.5 mg al día y si con la dosis inicial no se obtuvieran los resultados óptimos, tres o cuatro días después se aumenta la dosis a razón de 2.5 mg. Este esquema es el más aconsejable, es posible aumentar la dosis progresivamente hasta 15 mg al día. Cantidades mayores habitualmente no reportan beneficio efectivo. Cuando se administra ésta última dosis, es preferible fraccionarla en dos tomas después de las comidas de mayor aporte calórico del día.

REGIMENES DE ADMINISTRACION

a) Para los diabéticos que no responden favorablemente sólo al régimen dietético y en el caso de cambio de tratamiento en diabéticos compensados con otros hipogluce

miantes orales que acusan intolerancia (el cambio se efectúa de un día para otro):

Iniciar con media tableta diaria (2.5 - mg). Si la dosis inicial no resulta satisfactoria es necesario aumentar la dosis diaria con otra media tableta, y así sucesivamente hasta obtener el control óptimo.

Los casos de diabetes incipiente pueden controlarse con media tableta diaria.

La mayoría de los pacientes requieren de una dosis de 1 a 3 tabletas diarias (5 - 15 mg). Se recomienda que cuando haya que administrarse más de 10 mg al día, la ingesta se haga en dos tomas.

b) Diabéticos que no responden con otros hipoglucemiantes orales (fracasos primarios y/o secundarios). El cambio se efectúa de un día para otro.

El tratamiento se iniciará con una tableta diaria. Según la respuesta obtenida y en caso necesario, la dosis podrá ser aumentada en forma gradual, de media tableta en media tableta.

Generalmente la dosis máxima diaria es de tres tabletas. Cuando se hace uso de esta dosis, es conveniente administrarla en dos tomas. Se ha comprobado que muchos pacientes pueden ser tratados satisfactoriamente con la glibenclamida, aunque no se hayan podido controlar adecuadamente y durante un tiempo prolongado con otras sulfonilureas.

c) Cambio de insulina a glibenclamida. Para aquellos enfermos adultos con necesidades de insulina menores a 40 U.I. y breve duración de la enfermedad, el cambio puede efectuarse de la siguiente manera:

- I) Suspender el tratamiento previo.
- II) Se administrará una tableta de glibenclamida - al día, preferentemente por la mañana.

Se controlará la situación metabólica y según la necesidad se aumentará la dosis a dos y hasta tres tabletas al día, de media tableta en media tableta.

En todos los casos, cada aumento en la dosis debe ser determinada previa prueba de glucemia y glucosuria.

Los informes de Davidson y otros autores (51, 76, 77, 78), consideran que la glibenclamida es un potente agente hipoglucemiante tanto en individuos normales como en pacientes con diabetes de aparición en la madurez. La tolerancia clínica al medicamento es muy satisfactoria y el control de los niveles sanguíneos de glucosa se logra rápidamente. Los efectos secundarios en un grupo de pacientes tratados durante siete meses, fueron mínimos y despreciables, no obstante que algunos de ellos recibieron dosis hasta de 30 a 40 mg al día.

La actividad de ésta sulfonilurea se demuestra por el hecho de que puede lograrse un control satisfactorio en diabetes de aparición en la madurez con dosis tan reducidas como 2.5 mg al día, en comparación con 500 mg de cloropropamida ó 100 mg de tolbutamida. (76, 87, 88, 89).

Cuando los pacientes cambiaron el tratamiento de otras sulfonilureas a glibenclamida, la mejoría en el control de su diabetes fué evidente, no obstante, que las primeras estaban administradas a dosis máximas. Como es de esperarse, la glibenclamida no puede ser un medicamento sustitutivo de la insulina, por lo que, los pacientes que sólo logran el control con la hormona, deberán permanecer con su tratamiento.

En los individuos diabéticos, los niveles elevados de insulina plasmática encontrados tres horas después de la administración de la glibenclamida, fueron iguales a los encontrados 24 horas después de su administración. Es esta uniformidad de su efecto lo que da diferencias cualitativas y cuantitativas en relación a las otras sulfonilureas.

La investigación a largo plazo (54), por períodos de un año, confirman que la glibenclamida es un potente estimulante de la secreción de insulina en diabéticos adultos, y su efecto estimulante se mantiene aún en períodos de ocho meses, sin necesidad de aumentar la dosis.

En resumen, la glibenclamida administrada por vía oral tiene un efecto hipoglucemiante en el hombre docientas veces mayor que la tolbutamida en igualdad de dosis.

El efecto hipoglucemiante se manifiesta más efectivo durante las dos primeras horas después de su administración, pero se mantiene hasta las ocho horas con muy ligera variación, inclusive puede prolongarse por más de doce horas.

La vida media biológica del fármaco ha sido calculada entre cinco y siete horas, por lo que no existen problemas de acumulación en el organismo. La administración prolongada de la glibenclamida durante dos años, demuestra que es posible lograr respuestas excelentes y control satisfactorio en el 68% de los casos tratados, compensación suficiente en el 14%, insuficiente en el 8% y fracaso en un 10%. Desde otro punto de vista, la tolerancia se consideró excelente durante 24 meses en el 96% de los casos tratados. (90, 91)

Existen varios informes con respecto a que la glibenclamida produce un incremento en el glucógeno hepático y que la glucosa en sangre es incorporada como glucógeno hepático. (92, 93)

Con una baja concentración de glibenclamida, se demostró una inhibición de la lipólisis en las células grasas aisladas. En voluntarios sanos, después de la administración oral de 5 mg de glibenclamida, se encontró un descenso en la concentración de ácidos grasos libres. (94, 95)

Por un período de tres a seis meses los niveles de colesterol descendieron en un promedio de 56.5 mg/100 ml en 25 de 30 pacientes diabéticos, mientras -

los niveles iniciales estuvieron por arriba de 240 mg/100ml
Los niveles de triglicéridos descendieron de un promedio de
126 mg/100 ml a 63 mg/100 ml, en un grupo de 90 pacientes -
con diabetes controlada. (96-101)

ASPECTOS BIOFARMACEUTICOS

Se han realizado también numerosos estudios sobre la absorción, distribución, metabolismo y excreción de la glibenclamida, de los cuales mencionaremos algunos.

ABSORCION

Christ y col. (85), encontraron que -- después de la administración de 5 mg de glibenclamida a -- seis voluntarios sanos, aproximadamente el 45% de la dosis -- fué absorbida.

Los niveles máximos en sangre, 0.044 -- $\mu\text{g}/\text{ml}$, fueron encontrados dos horas después de la adminis -- tración, y se mantiene su efecto por lapsos de 8 - 12 horas sin necesidad de repetir la dosis, en la mayoría de los ca -- sos, hasta las proximas 24 horas.

En otro estudio realizado por Kellner -- y col. (102), usando el fármaco con un tamaño pequeño de -- partícula y administrando 5 mg de éste, la concentración -- más alta fué detectada a las dos horas con un valor de ---- 0.084 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Las concentraciones a diferentes tiempos las mostramos en la tabla 1, en éste estudio se demostró que la absorción de la glibenclamida es virtualmente completa.

Experimentos realizados en ratas, conejos y perros han mostrado que la concentración de glibenclamida comienza a ser constante después de dosis múltiples y no se encontró evidencia de acumulación.

DISTRIBUCION

Después de la administración intravenosa de la glibenclamida marcada con carbono catorce, a ratones, se tomaron radiografías de todo el cuerpo del ratón y ocho horas después se reveló una acumulación de radiactividad en el parénquima del hígado y en el intestino. En órganos tales como hipófisis, glándula tiroides y glándula adrenal no se detectó radiactividad. (103, 104)

Haptner y col. (106) determinaron el volumen aparente de distribución para la glibenclamida, el cual fué del 52% de peso corporal.

La glibenclamida se une a las proteínas plasmáticas en un 99%. Con una concentración de 10 ug/ml de glibenclamida en el suero humano, sólo puede encontrarse el 0.5% de glibenclamida libre.

METABOLISMO

La glibenclamida es metabolizada por hidroxilación en el C₃ y C₄ del anillo ciclohexílico, así nos da los compuestos 3 cis y 4 trans hidroxilados. (105)

Se identificaron también los metabolitos 2-metoxi-5-clorobenzamida y N-(4-carboxi-benzensulfonil) N-ciclohexilurea. Estos estudios fueron realizados en conejos, perros y ratas, después de la administración intravenosa de la glibenclamida, y se encontraron dichos metabolitos en bñlis, heces y orina en todos los animales. (106)

En el hombre la glibenclamida administrada por vía oral es absorbida en el intestino. El principal metabolito fué identificado también como un compuesto hidroxilado. Muestras de suero tomadas a las 4,6 y 8 horas -- después de la administración oral de la glibenclamida, muestran a las 8 horas un incremento por arriba del 27% en la --

concentración del 4 trans hidroxí metabolito. Se observó - que los metabolitos son eliminados tan rápidamente como se forman y no tienen efecto hipoglucemiante significativo. - (85, 107, 108, 109)

EXCRECION

En el hombre después de la administración de la glibenclamida, el 22% se excreta por la orina y el 37% en las heces a las 24 horas. (110)

En otro estudio se determinó que el -- 95% se excreta en los primeros cinco días, 72% en las heces y 23% en la orina.

La glibenclamida se excreta en la orina en forma del 4 trans hidroxí metabolito. El fármaco no transformado (54%) se excreta sólo por las heces, pero no - por la orina.

El tiempo de vida media es de 8.5 ho - ras (85)

T O X I C I D A D

Por lo que se refiere a estudios de -- toxicidad y efectos secundarios, se tienen también múltiples informes de trabajos realizados, de los cuales citaremos algunos.

La administración prolongada por períodos de siete meses a dos años, ha mostrado una tolerancia -- magnífica del medicamento en más del 96% de los pacientes -- que la han recibido.

Las pruebas de función hepática, urea - sanguínea y biometrías hemáticas, fueron normales, después - de siete meses de tratamiento, no se observó cambio importante en el peso corporal. En una de las casuísticas clínicas - revisadas, solamente se reportaron dos pacientes, uno con -- diarrea y el otro con erupción cutánea. Durante el período - de tiempo que se observó la toxicidad a largo plazo de la -- glibenclamida, no existió ningún caso con evidencia de hipotiroidismo; la captación de yodo ligado a proteína sérica, - no mostró cambios significativos, no se registraron niveles - por debajo de los límites aceptados como normales.

Se ha reportado el caso de hipoglucemia severa, en pacientes diabéticos, pero en la mayoría de los -

casos se trataba de pacientes ancianos, que fueron sometidos a un tratamiento con dosis elevadas. (86)

No se han encontrado informes de acumulación después de dosis repetidas de glibenclamida.

Mizukami y col. (111) informa que la LD_{50} en rata fué de 3750 mg/Kg y de 5900 mg/Kg, en ratón.

Otros autores también han citado el valor de la LD_{50} alrededor de esas dosis (112, 113)

También se han realizado estudios dís - morfológicos, de los cuales citaremos uno.

Se administraron dosis orales por arriba de los 2000 mg/Kg diarios a grupos de 20 ratones hembras de 4 a 13 días de embarazo, y a grupos de 18 ratas hembras de 6 a 15 días de embarazo. Según las conclusiones del estudio, no existió diferencia en el número de fetos vivos o --- muertos, tampoco se observaron en los productos efectos en el peso, altura, estructura osea o distribución del sexo, en tre los productos de los animales tratados y los del grupo control. En conclusión no existieron evidencias de efectos dís - morfológicos por el tratamiento con glibenclamida. (111, 114, 115).

Existen también datos de estudios en conejos, a los que se les administraron 350 mg/Kg de glibenclamida diariamente, pero no se informa evidencia de efectos dismorfológicos por parte de la glibenclamida.

EFFECTOS COLATERALES

Son poco frecuentes y habitualmente de relativa importancia, pero pueden presentarse casos de rash cutáneo y prurito, intolerancia gástrica, náuseas, anorexia y fenómenos de sensibilidad.

Se han observado algunos casos de trombocitopenia y leucopenia, aunque son habitualmente transitorios y sin significación clínica, pero solamente se han presentado con una terapia muy prolongada. (116, 117)

Existe potenciación de su efecto con los tuberculostáticos, como la etionamida y con fenilbutazona o derivados cumarínicos. También se presenta intolerancia con el alcohol.

Su asociación con otras sulfonilureas y biguanidas también puede potenciar su efecto. (117)

C A P I T U L O V I I
C O N C L U S I O N E S

C O N C L U S I O N E S

Después de estudiar la bibliografía incluida en éste trabajo y las consideraciones mencionadas en relación con la glibenclamida, se pueden hacer las siguientes conclusiones.

- 1.- La glibenclamida está indicada en la diabetes de aparición en la madurez y es el fármaco de primera elección para el tratamiento de éste tipo de diabetes.
- 2.- Su mecanismo de acción hasta la fecha no es bién conocido, lo que si se sabe a ciencia cierta, es que provo-ca la desgranulación de las células B de los islotos de Langerhans y por lo tanto existe un aumento en la cantidad y velocidad de secreción de la insulina.
- 3.- Su superioridad con relación a la tolbutamida y otros hipoglucemiantes orales se basa en:
 - a) Su relación estructura-actividad. El radical acilamino alquilo aumenta su actividad hipogluce-miante, la cual se acrecienta aún más por la a-dición del anillo bencénico, sustituido en la posición 2 por un grupo metoxilo y en la posición 5 por un átomo de cloro.

- b) La concentración máxima en el plasma se alcanza a las dos horas.
- c) Puede ejercer su efecto 24 horas después de una dosis oral única, en el desayuno o después de la comida de mayor aporte calórico.
- d) Su toxicidad y efectos colaterales son mínimos.
- e) La tolerancia clínica al medicamento es muy satisfactoria y el control de los niveles sanguíneos de glucosa se logra rápidamente.
- f) Se puede lograr un control satisfactorio de la diabetes con dosis tan reducidas como 2.5 mg al día, en comparación con 500 mg de cloropropamida ó 100 mg de tolbutamida.
- g) Cuando los pacientes cambiaron su tratamiento con otras sulfonilureas a glibenclamida, la mejora en el control de su diabetes fué evidente, no obstante que las primeras estaban administradas a dosis máximas.
- h) Su uniformidad de efecto

- i) Su efecto se mantiene aún en períodos de ocho - meses, sin necesidad de incrementar la dosis de sostén.
- j) Su absorción es virtualmente completa y no existe evidencia de acumulación.
- k) Es posible usar la glibenclamida como un sustituto de la insulina, en aquellos pacientes en los cuales los requerimientos de insulina no sean mayores de 40 U.I.

4.- No obstante la baja toxicidad y efectos colaterales de la glibenclamida, el médico debe tener especial cuidado al prescribir éste medicamento y no generalizar el esquema terapéutico, sino que éste debe ser específico para cada persona, ya que el riesgo de hipoglucemia severa es considerable sobre todo en pacientes ancianos especialmente cuando el tratamiento se inicia administrando grandes dosis del fármaco. Por esta razón los enfermos deben ser controlados en forma estrecha desde el punto de vista de su glicemia. La mejor forma de encontrar la dosis de sostén de la glibenclamida, es iniciando el tratamiento con

dosís reducidas y aumentar estas progresivamente, - hasta que se demuestre que la glucosuria desaparece o es mínima.

5.- Se cuenta con una amplia gama de métodos analíticos para la determinación de la glibenclamida como materia prima y en la forma farmacéutica que se presenta, que van desde una simple titulación volumétrica, hasta el análisis por cromatografía líquida de alta resolución, del tal forma que los laboratorios farmacéuticos podrán utilizar el método que mejor se adapte a sus necesidades y recursos, para evaluar la calidad de los medicamentos que fabrican.

6.- Se han desarrollado también numerosos métodos para la determinación de la glibenclamida en fluidos biológicos, que se consideran de gran utilidad para los estudios biofarmacéuticos, los cuales servirán a su vez para lograr la optimización de los esquemas de dosificación que se diseñen para este fármaco, lográndose así una terapia más racional para cada paciente.

7.- No obstante que la glibenclámidá es uno de los fármacos de primera elección para el tratamiento de la diabetes de aparición en la madurez y está incluida dentro del cuadro básico de medicamentos del Sector-Salud, su prescripción en estas instituciones en comparación con tolbutamida es menor, debido a que la glibenclámidá es más cara, ya que el proceso para su síntesis es más costoso.

Dadas las ventajas que tiene la glibenclámidá con respecto a otros hipoglucemiantes orales y su gran aceptación clínica, en México existe un laboratorio que tiene dentro de sus proyectos una síntesis menos costosa para ésta sulfonilurea.

CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFIA

B I B L I O G R A F I A

- 1) Farmacología Experimental y Clínica
Manuel Litter
Quinta Edición.
Ed. El Ateneo.
P. 971-1000

- 2) The Merck Index
Merck and Co., Inc. U.S.A.
Novena Edición. 1976.
P. 4310

- 3) The British Pharmacopoeia
London Her Majesty's Stationery Office
1980.
P. 210

- 4) Hajdú P.; Koheler K.; Schmidt H.; Spingler H.
Physicochemical and Analytical Studies on HB
419 [N-4- [2-(5-chloro-2-metoxibenzamido) e-
thyl] phenyl]-N' cyclohexylurea
Arzneimittel Forschung. 1969, 19(8), 1381 -
1386.

- 5) Suraj P.; Agarwal and Mohammed I.
Nonaqueous titration of oral hypoglycemic -
and diuretic drugs in tetramethylurea.
Indian Journal of Pharmacy.
1972, 34(5), 109-111
- 6) Connors K.A.
Curso de Análisis Farmacéutico.
Ed. Reverté, S.A. 1980
P. 221
- 7) Willard H.; y Merrit D.
Métodos Instrumentales de Análisis
Ed. C.E.C.S.A.
Quinta Edición. 1972
P. 323
- 8) Shingbal D.M.; Natekar G.B.
Estimation of glibenclamide in pharmaceuti-
cal dosage forms.
East. Pharm. 1980, 23(269), 113-114.
- 9) Daniele Castoldi and Odardo Tofanetti.
Gas chromatographic determination of gliben-
clamide in plasma.
Clinica Chimica Acta. 1979, 93(2), 195-198.

- 10) Beyer William F.
Quantitative liquid chromatography of sulpho-
nylureas in pharmaceutical products.
Analytical Chemistry. 1972, 44(7), 1312-1314.
- 11) Wade J.; and Scott Krueger.
Specific and sensitive high performance li-
quid chromatographic determination of glybu-
ride.
Journal of Pharmaceutical Sciences. 1979, 68
(9), 1138-1140.
- 12) Elizabeth Wahlin and Arne Melander.
High performance liquid chromatographic deter-
mination of glipzide and some other sulphony-
lureas drus in serum.
Journal of Chromatography. 1979, 164, 541-546
- 13) Koichiro K.; Takeshi K. and Ayako M.
Radioimmunoassay of glibenclamide.
Diabetes. 1979, 28(3), 221-226.
- 14) Glogner N.; and Nissen L.
The radioimmunological determination of gliben-
clamide and its metabolites in serum.
Arzneimittel Forschung. 1977, 27(9), 1703-1706

- 19) Chance R.
Amino acid sequences of proinsulin an inter
mediates.
Diabetes. 1972, 2(suppl), 461-467
- 20) Long-Term action of sulphonylureas on proin
sulin biosynthesis and secretion I.
Hormone and Metabolism Research. 1977, 9(6)
457-465
- 21) Lacy P.; Greider M.
Ultrastructural organization of mammalian-
pancreatic islets.
Endocrinology, vol. 1. Handbook of Physiolo
gy.
American Physiological Society, Washington,
D.C. 1972.
PP. 77-89
- 22) Renold A.; Stauffer W.; and Cahill G.
Diabetes Mellitus. In metabolic basis of in
herited disease, 3 rd. ed.
Mc. Graw-Hill Book Co., New York, 1972
PP. 83-118.

- 23) Goldfine L.; Roth J.; and Birnbaumen L.
Glucagon receptors in B cells.
Journal of Biology Chemistry.
1972, 247, 1211-1218.
- 24) Sams D.; Montague W.
Possible involvement of adenosine 3', 5' -
cyclic monophosphate in the mechanism of ac -
tion of sulphonylureas in insulin secretion
from islets of langerhans.
Biochem. Soc. Trans. 1974, 2(3), 411-412.
- 25) Cerasi E.; Grill U.
The role of cyclic AMP in the control of in
sulin secretion.
Muench. Med. Wochenschr. 1977, 119(38), 1229
-1236
- 26) Halim D.; Hhalifa K.
Serum mineral changes in alloxan diabetes -
before and after treatment with some hypo -
glucemic drug.
Z. Ernaehrungswiss. 1977, 16(1), 39-43

- 27) Elbert R.; Hillebrandt O.; Schwabe U.
Role of calcium and adenosine cyclic 3', 5'-mono-phosphate in the antilipolytic effect of tolbutamide and glibenclamide.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.
1974, 286(2), 181-194
- 28) Kloeppe G.; Schaefer H.
Effects of sulphonylureas on histochemical- and ultracytochemical calcium distribution- in β cells of mice.
Diabetologia. 1976, 12(3), 227-235
- 29) Malaisse W.
Hormonal and environmental modification of β cells activity. In Endocrinology, vol. 1. Handbook of Physiology.
American Physiological Society, Washington-D.C. 1972
PP. 237-260
- 30) Beischer W.; Rapits S.
Human c-peptide. Part III. Dynamics of secretion of β cells in adult diabetic following glibenclamide, glucose I.V.
Klin. Wochenschr. 1978, 56(3), 111-120

- 31) Kipnis D.M.
Nutrient regulation of insulin secretion in human subjects.
Diabetes. 1971, 2(suppl), 606-616
- 32) Cerasi E.; Luft R.
Dose-response relationship between plasma - insulin and blood-glucose levels during oral glucose loads in prediabetic and diabetic subjects.
Lancet. 1973, 1, 794-797
- 33) Robertson R. and Porte D.
The glucose receptor. A defective mechanism in diabetes mellitus distinct from a beta - adrenergic receptor.
Journal of clinical investigation
1973, 52, 870-876
- 34) Barjot B.
Donnes actuelles sur le mode D'action du -- glibenclamide
Journées Annuelles Diabetologie Hoteldieu.
1978, 2, 325-331

- 35) Nieve J.
Receptors of oral antidiabetic. Glibenclamide in liver and interaction between glibenclamide and proteins in extrapancreatic sites.
Boichem. Soc. Trans. 1975, 3(3), 430-431.
- 36) Sehelin J et al.
Evidence for especific bindin of tolbutamide and glibenclamide to the plasma membrane of the pancreatic B cells
Acta Diabetologica Latina. 1980, 10(5)
1052 - 1060
- 37) Lundquist I.
Significance of acid amyloglucosidase in -
sulphonylureas induced insulin release.
Diabetologia. 1974, 10, 717-721
- 38) Lundquist I.
Islet amyloglucosidase and sulphonylureas -
stimulated insulin release in three diffe -
rent;strain of mice.
Hormone and Metabolism Research. 1975, 7(1)
6-9

- 39) Malssie W.; Malassie L.
Combined effects of glucose and sulphonylureas on insulin secretion by the rat pancreas in vitro.
In; U.C. Dubach A. Bickert.
Recent hypoglycemic sulphonylureas, mechanism of action and clinical indications. -
Bern. 1971, Huber ed.
P. 114
- 40) Paff Von W.; Shone H.
The liberation of insulin from the pancreas by sulphonylureas.
Arzneimittel Forschung. 1969, 19, 1445-1447
- 41) Bender Von A.; Paff Von W.
Light optic morphological studies on the B cells of Langerhans' islets after administration of HB 419
Arzneimittel Forschung. 1969, 19.
1448 - 1951
- 42) Kern Von H.; Kern D.
The fine structure of Langerhans' islets in the rat after the action of HB 419
Arzneimittel Forschung. 1969, 19, 1452-1455

- 43) Engelbarth K.; Bahr H.
Ultrastructure of the B cells of rat pancreas after single and repeated administration of HB 419
Arzneimittel Forschung. 1969, 19, 1456-1460
- 44) Sirek O.; Vigas M.
Beta adrenergic stimulation and insulin release in dog following HB 419
Diabetologia. 1969, 5, 207-211.
- 45) Schwarz H.; Ammon J.
Stimulation of insulin secretion in vitro by a new and highly active hypoglycemic agent.
Diabetologia. 1968, 4, 10-15
- 46) Loybatiers A.; Mariani M.
Pharmacological study of a new particularly active hypoglycemic sulphonamide: glibenclamide.
Hormone and Metabolic Research. 1969
1 (suppl), 10-12

- 47) Loffler G.; Truntschold I.
Effects of glibenclamide and tolbutamide on
isolated pancreatic islets of rat.
Hormone and Metabolic Research. 1969
1 (suppl) 41
- 48) Weinges K.; Biro G.
Comparative studies on HB 419 (glibenclami-
de) and tolbutamide as to their effects on
insulin release by islets of rat pancreas -
in vitro.
Arzneimittel Forschung. 1969, 19, 1467-1472
- 49) Goberna R.; Rapits S.
Glibenclamide and the prediabetes of subto-
tally pancreatectomised rats.
Hormone and Metabolic Research. 1969, 1, --
175-179.
- 50) Brunetti P.; Santeusiano F.
Insulin-stimulating properties of HB 419 in
healthy subjects (comparison with tolbutami-
de).
In. Tergernsee conference on the new oral-
antidiabetic agent HB 419. 27. Th to 29 Th -
January 1969, P. 72

- 51) Davidson M.; Lewis A.
Metabolic and clinical effects of glibenclamide
Lancet. 1970, 1, 57-64
- 52) Quabbe H.; Kliems G.
Plasma insulin and blood sugar levels in -
normal and diabetic patients after repeated
doses of tolbutamide and glibenclamide.
Pharmacologia Clinica. 1970, 2, 143-148
- 53) Chandalia H.; Hollobaugh S.
Use of glibenclamide in maturity onset dia-
betes, effects of the drug on serum insulin
levels.
Hormone and Metabolic Research. 1969
1 (suppl.) 73
- 54.- Anderson J.; Coulson R.
Clinical and metabolic study in diabetic-
patients treated with glibenclamide
British Medical Journal. 1970, 2, 568-573.

- 55). Rapits S.; Rau R.
Comparative study of insulin secretion following repeated administration of glucose, tolbutamide and glibenclamide in diabetic and non-diabetic human subjects.
Hormone and Metabolic Research. 1969, 1, 65-70
- 56) Haupt E.; Koeberich W.
Liberation of insulin by hypoglycemic sulphonylureas and glucose in maturity onset diabetes
Arzneimittel Forschung. 1972, 22, 2198-2202
- 57) Malaisse W.; Malisse L.
Effects of glibenclamide and glicodiazine upon insulin secretion in vitro
European Journal Pharmacology. 1970, 9(1), 93-98
- 58) Libman J.; Rodriguez A.
Oral administration of glibenclamide and tolbutamide in maturity onset diabetes
Acta de Diabetologia Latina. 1974, 10(3), 503-517

- 59) Haussmann L.; Schuman.
Studies on insulin and proinsulin secretion
after intravenous application of tolbutamide,
glisoxepide and glibenclamide.
Arzneimittel Forschung. (1978, 28(1), 83-86
- 60) Malassie W.; Mahy M.
Stimulus-secretion couplin of glucose indu-
ced release combined effects of glucose and
sulphonylureas.
European Journal of Clinical Investigation
1972, 2(2), 85-90
- 61) Cerasi E.; Efendic S.
Effects of two sulphonylureas on the dose -
kinetics of glucose-induced insulin release
in normal and diabetic subjects.
Acta of Endocrinology. 1979, 91(2), 1979
- 62) Basabe J.; Farina J.
Studies on the dinamics and mechanism of -
glibenclamide Induced insulin secretion
Hormone and Metabolic Research. 1976, 8(6),
413-419.

- 63) Gotfredsen C.
Dynamics of sulphonylureas-induced insulin-
release from the isolated perfused rat pan-
creas
Diabetologia. 1976, 12(4), 339-342
- 64) Galabova R.; Juergen E.
Electron optical studies on Langerhan's is-
let of the rat pancreas following peroral-
application of glibenclamide
Endokrinologie. 1975, 66(2), 211-217
- 65) Alberti Kurt.; Houghton C.
Experimental studies with glibenclamide in
the rat.
Postgraduate medical Journal. suppl. 1970,-
46(Dec), 9-15
- 66) Loubatiers A.; Mariani M.
Physiological and Pharmacological studies -
on insulin secretion on the isolated perfu-
sed rat pancreas. Effects of glucose and hy-
poglycemic sulphonylureas.
Journal Pharmacology. 1970, 1(1), 7-24

- 67) Feldman J.; Levobitz H.
Endocrine and metabolic effects of glibenclamide. Evidence for a extrapancreatic mechanism of action.
Diabetes. 1971, 20(11), 745-755
- 68) Summ H.; Neubáver H.
Effect of insulin and oral antidiabetics on glucose and disappearance in the blood of rabbit.
Biochemistry Pharmacology. 1980, 29(10)
1441 - 1444
- 69) Haupt E.; Kriebel R.
Insulin and peptide C leveles following oral and intravenous aplication of different sulphonylureas.
C-pept. Proc. Int. Symp. 1977, 133-143
- 70) Galubova R.; Petkov. P.
Peculiar intramitochondrial bodies in the B cells of Langerhan's islands in glibenclamide treated rats.
Acta Med. Bulg. 1979, 6(1), 75-78

- 71) Korchin V.
Mechanism of action of glibenclamide on the insulinogenic function of the pancreatic islands.
Patol. Fiziol. Eksp. Ter. 1977, 1(4), 63-65
- 72) Bickel M.; Geisen K.
Studies on the effect of tolbutamide, glibenclamide and glucose on serum insulin.
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 1978, 234(1), 118-138
- 73) Lazaris Y.; Korchin V.
Effects of glibenclamide on insulin and --- zinc content in pancreatic islets.
Probl. Endokrinol. 1977, 23(3), 89-94
- 74) Ziegler B.; Wilke B.
Insulin secretion and pro-insulin biosyn -- thesis of cultured mice islets after glibenclamide load in vitro.
Experientia. 1980, 36(4), 467-468
- 75) Banelskii Z.
Effects of glibenclamide on the ultrastructure of the pancreatic islets and their in-

sulin leveles. Probl. Endokrinol. 1980, -
26(4), 72-76

- 76) Shersten A.; Waahlin B.
Comparative single dose kinetics and effects
of four sulphonylureas in healthy volunteers
Acta Médica Scandinava. 1980, 208(4), 301 -
307
- 77) Owens D.; Seldrup J.
Repeated blood glucose and plasma insulin -
leveles in normal volunteers subjects re --
ceiving isocaloric meals before and after -
chloropropamide and glibenclamide.
Hormone and Metabolic Research. 1977, 9(5),
1977
- 78) Klaff L.; Vinik A.
Effects of sulphonylureas drugs, glicazide
and glibenclamide on blood glucose control
South African Medical Journal. 1979, 56(7),
447-250

- 79) Rizzi G.; Isaia G.
Changes in blood sugar and insulin concentrations in four normal subjects after administration of a single dose of glibenclamide and glipzide.
Minerva Medica. 1974, 65(1), 58-59
- 80) Mueller R.
Differential therapy in diabetes mellitus - with special reference to the second generation of sulphonylureas.
Rev. Bras. Clin. Ter. 1974, 3(11), 431-438
- 81) Haupt. E.; Schoeffling K.
Clinical pharmacology of new blood sugar depressant sulphonamide derivatives in comparison with older antidiabetics of the first and second generation
Pro-Diaban, Ber. Symp. 1974, 1117-1134
- 82) Haupt E.; Kuellmer K.
The pharmacodynamics of two new sulphonylurea derivatives.
Klin. Wochenschr. 1977, 55(14), 695-703.

- 83) Haupt E.; Kuellmer K.
Pharmacodynamics of glurenorm
Diabetol. Croat. 1976, 5(3), 373-391
- 84) Fukuchi; Hiroshi Tsukiaf
Studies on oral hypoglycemia agents. Blood-
levels and hypoglycemic effects of sulpho-
nylureas compounds.
Hiroshima Journal Medical Science. 1977, 26
(4), 269-276
- 85) Christ O.; Heptner
Investigation on absorption, excretion and -
metabolism in man after administration of -
¹⁴C-labelled HB 419
Hormone and metabolic research. 1969, 1, 51
-59
- 86) O'Sullivan D.; Cashman W.
Blood glucose variations and clinical expe-
rience with glibenclamide in diabetes melli-
tus.
British Medical Journal. 1970, 2(6), 572-574

- 87) Dulin W.
Significant aspects of the pharmacology of gliburide and its comparison to other sulphonylureas.
Excerpta Medica International Congress Service. 1974, 17-19
- 88) Loubatiers A.; Mariani M.
Pharmacological comparison between tolbutamide and sulphonylureas (glibenclamide and glisoxepide)
Acta Diabetol. Lat. 1974, 10(2), 261-282
- 89) Jost H.; Hasselblatt A.
Insulin release by tolbutamide and glibenclamide. A comparative study on the perfused rat pancreas.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. 1979, 306(13), 185-188
- 90) Cabarron A. y col.
Un nuevo hipoglucemiante oral HB 419
Sem. Med. Mex. LXIV: 1970,
P. 174.

- 91) Patel R.; Gandhi T.
Bioavailability of glibenclamide
Indian Journal Pharmacy. 1977, 39(3), 45-47
- 92) Ramesar X.; Herrera E.
Glycogen phosphorylase activities in sul -
phonylureas treated rats.
Hormone and Metabolic Research. 1978, 10(4)
355-356
- 93) Annamala P.; Augusti K.
Effects of glibenclamide on normal rabbits:
a biochemical study
Indian Journal Experimental Biology. 1980
18(8), 847-849
- 94) Stork H.; Schmidt F.
The influence of HB 419 (a new oral antidia
betic) on lipoid metabolism.
Arzneimittel Forschung. 1969, 19, 1426
- 95) Rosak C.; Haupt E.
Antilipolytic activity of sulphonylureas in
man with indication on limit dosages due to
their insulin secretion effects
Hormone and Metabolic Research. 1974, 6(6),
464-470

- 96) Cannesa I.; Valiente S.
Changes in the blood indices of carbohydrate and fat metabolism after oral administration of HB 419.
IN, Tergernsee conference on the new oral antidiabetic agent HB 419. 27 th to 29 th - January. 1969, P. 87
- 97) Matrass M. Hinks L.
Comparative effects of two doses of glibenclamide upon metabolic rhythms in maturity onset diabetes
Diabetes Metabolism. 1978, 4(3), 175-180
- 98) Schatz H. Laube H.
Long-Term action of sulphonylureas on pro-insulin biosynthesis and secretion
Hormone and metabolic Research. 1979, 3(4), 525-530
- 99) Tamai Toshitaka
The effects of glibenclamide and insulin on plasma high density lipoproteins in diabetics.
Nippon Naibumpi Gakkaizasshi. 1980, 56(1), 57-77

- 100) Guirgis F.; Ghanem M.
Comparative study of the hypoglycemic and -
antilipolytic effects of four antidiabetic-
agents administered
Arzneimittel Forschung. 1976, 26(3), 435 -
437
- 101) Gerge K.; Augusti K.
Studies on certain serum components of trea
ted and newly detected maturity onset diabe
tics and nondiabetics.
Indian Journal of Experimental Biology.
1978, 16(10), 1052-1056
- 102) Kellner H.; Rupp W
Absorption, distribution and excretion follo
wing administration ¹⁴C-labelled HB 419 to
rabbits, rats and dogs
Arzneimittel Forschung. 1969, 19, 1368-1371
- 103) Hellman B.; Idahl L.
Observations on the hypoglycemic mechanism-
of action of the sulphonylureas compound HB
419
Arzneimittel Forschung. 1969, 19, 1470-1472

- 104) Somogyi J.
Subcellular distribution of ^{14}C -labelled --
glibenclamide in different tissues of rat.
Hormone and Metabolic Research. 1974, 6(3),
181-183
- 105) Glogner P.; Heni N.
Hydroxylation of glibenclamide by liver ---
biopsy specimens.
Arzneimittel Forschung. 1975, 25(6), 860 -
861
- 106) Heptner W.; Kellner H.
Metabolism of HB 419 in the animal
Arzneimittel Forschung. 1969, 19, 1400 - 1414
- 107) Samimi H.; Loutan L.
Metabolites of sulphonylureas hypoglucemics,
clinical interest.
Schweiz. Med. Wochenschr. 1977, 107(37), -
1291-1296
- 108) Kruse U.; Puchinger H.
New Sulphonylurea derivatives and their me-
tabolites in isolated Lanherhan's islets of
the rat pancreas.
Arzneimittel Forschung. 1975, 25(8), 1231-1233

- 109) Balant L.; Fabre J.
Does 4-trans-didroxy-glibenclamide show hypoglycemic activity?
Arzneimittel Forschung. 1979, 29(1), 162 - 163
- 110) Schmidt H.; Petrides P.
Concentrations of glucose and HB 419 in the blood and the excretion of HB 419 with the urine after single oral application of HB 419
Arzneimittel Forschung. 1969, 19, 1422
- 111) Mizukami K.; Miyamoto M.
Toxicologic test of HB 419 in the animal.
Arzneimittel Forschung. 1969, 19, 1404
- 112) Hebold G.; Schutz E.
Toxicological test of HB 419 in the animal.
Arzneimittel Forschung. 1969. 19, 1404
- 113) Webster H.; Gruizenga N.
Toxicologic studies of gliburide.
Excerpta Medica International Congress Service. 1975, 5-16

- 114) Remner H.
Mutagenicity of sulphonylureas
Mutat. Research. 1980, 77(4), 349-355
- 115) Tofanetti O.; Albiero L.
Toxicological and pharmacological studies -
of glibenclamide
Ann. Univ. Ferrara Sez. 1973, 4(6), 68-84
- 116) Mueller R.; Bauer G.
Summary report of clinical investigation of
the oral antidiabetic drug HB 419 (gliben -
clamide)
Hormone and Metabolic Research. suppl. 1969
1, 88
- 117) Seftel H.
Clinical trial of a new sulphonylurea in ma
turity onset diabetes (HB 419)
South African Medical Journal. 1969, 43, --
979