

**UNIVERSIDAD NACIONAL SIGLO XX
CARRERA DE BIOQUÍMICA FARMACIA
UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO
E INVESTIGACIÓN EN SALUD
UNIDAD DE TOXICOLOGÍA**



**OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN E
IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS BENZODIACEPÍNICOS
(ALPRAZOLÁM Y DIAZEPÁM)
EN MUESTRAS DE ORINA**

POSTULANTE: UNIV. EDGAR VARGAS CHOQUE

**TESINA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN
BIOQUÍMICA - FARMACIA**

LA PAZ – BOLIVIA
2007

**UNIVERSIDAD NACIONAL SIGLO XX
CARRERA DE BIOQUÍMICA FARMACIA
UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO
E INVESTIGACIÓN EN SALUD
UNIDAD DE TOXICOLOGÍA**



**OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN E
IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS BENZODIACEPÍNICOS
(ALPRAZOLÁM Y DIAZEPÁM)
EN MUESTRAS DE ORINA**

**POSTULANTE: UNIV. EDGAR VARGAS CHOQUE
ASESORA: DRA. MSC. MERCEDES MORALES V.**

**TESINA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN
BIOQUÍMICA - FARMACIA**

LA PAZ – BOLIVIA
2007

El pensar por la ciencia de un modo libre y abierto, reconociendo por encima de uno solo la ley de la verdad, apreciar lo viejo sin desdeñar lo nuevo, tratar de obtener nuevas y mas profundas soluciones partiendo del origen del problema, tal es el espíritu con que ha sido concebido el presente trabajo.

DEDICATORIA

`` Tomado de tu mano inicié mi aprendizaje en la vida. Ahora casi todo lo que soy se lo debo a tu ejemplo de tenacidad y valor.

Por haber sido siempre mi mas dilecto(a) y respetable amigo (a), este trabajo dedico con orgullo, en especial a mi madre: Agustina Choque Ch.; y a mi padre: Francisco Vargas C.

A mis hermanos Renán, Wilson, Alain, Karina y Eric``.

Gracias por creer en mí y ayudarme en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a las diversas instituciones gubernamentales y universitarias: SELADIS, UMSA, UNSXX. Por su cooperación al proporcionarme fuentes de conocimientos muy importantes para la realización y conclusión del trabajo de investigación realizada.

En particular estoy agradecido a mi asesora Dra. Msc. Mercedes Morales V. quien con su generosidad ha intervenido en la elaboración de inicio y culminación de nuestra Tesina.

Agradecer también a la Dra. Germaine Hailloth Directora de Hospital de Psiquiatría C.N.S., al Dr. Carlos Dipp Director de la unidad de Psiquiatría del Hospital de Clínicas, por ceder la autorización para recolectar el material biológico, al personal de enfermería de ambas instituciones hospitalarias. Así mismo agradecer al Dr. Arturo Mallea A., a la Dra. Gloria Paco y a todos los amigos (as), compañeras y compañeros que de distintas formas han colaborado en la realización y finalización del presente trabajo.

RESUMEN

Por estar relacionado los hechos delictivos con la ley es necesario contar con un método práctico y confiable para extraer e identificar los metabolitos benzodicepínicos en muestras de orina por ser la mayor vía de eliminación; dado que dichos metabolitos pueden ser confundidos con otras sustancias metabólicas provenientes del organismo o de algunos fármacos que ingirió el sujeto. En el presente trabajo se optimizó un método de extracción e identificación de metabolitos benzodicepínicos en muestras de orina, considerando el alprazolám y diazepám. Se seleccionaron dos tipos de consumidores: habituales (pacientes del Hospital de Psiquiatría Caja Nacional de Salud; y pacientes del Hospital de Clínicas Unidad de Psiquiatría, de la ciudad de La Paz) y ocasionales. Se obtuvieron 32 muestras, se realizo el análisis mediante 2 métodos de extracción. Se tuvieron resultados satisfactorios con uno de los métodos (primer método de extracción), logrando obtener un 75 % de muestras positivas (13 para diazepám y 11 para alprazolám) con los métodos de identificación utilizados: cromatografía en capa fina y microcristalización. Además se demuestra que con las modificaciones incorporadas se optimizó el método **1**, mejorando su eficiencia siendo un método de extracción sencillo, práctico y confiable para extraer e identificar los metabolitos benzodicepínicos y estadísticamente aceptable con grado de error de 5%.

INDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN:.....	1
II. MARCO TEÓRICO:.....	2
III. HISTORIA:	2
IV. ESTRUCTURA GENERAL:.....	3
V. CLASIFICACIÓN:	4
VI. FARMACODINAMIA:	5
1. Sistema nervioso central:.....	5
2. Respiración y aparato cardiovascular:.....	5
3. Mecanismo de Acción:	6
4. Aplicación en la Anestesia:.....	8
5. Otras acciones:	8
6. Tolerancia:.....	9
VII. FARMACOCINÉTICA:.....	10
1. Absorción:.....	10
2. Distribución:.....	11
3. Metabolismo:.....	12
4. Excreción:	16
VIII. INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS:.....	16
IX. EFECTOS ADVERSOS:.....	18
1. Efectos psicológicos adversos:	18
2. Efectos en la gente mayor:	18
3. Efectos adversos durante el embarazo:.....	20
3.1. Dimorfo-génesis y otros efectos sobre el feto y neonato:	20
X. CONTROL DE PSICOTRÓPICOS:	20
XI. TOXICIDAD:	21
1. Intoxicación Aguda:	21
1.1. Los suicidas:.....	22
1.2. Homicidio:.....	22
1.3. Accidental:	22
1.4. Manifestaciones clínicas:	23
1.5. Almacenamiento y estabilidad de la muestra:.....	25
2. Intoxicación crónica:	25
2.1. Deterioro de la memoria:	26
2.2. Dependencia:	26
2.3. Tratamiento:	26
2.3.1. La nutrición:	27
XII. ANTECEDENTES:.....	27
XIII. JUSTIFICACIÓN:.....	28

XIV. OBJETIVOS:.....	28
A) OBJETIVO GENERAL:.....	28
B) OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	28
XV. DESCRIPCIÓN DEL AMBIENTE DE ESTUDIO:	29
XVI. DISEÑO METODOLÓGICO:.....	29
A. MODELO TEÓRICO:	29
B. POBLACIÓN:	30
C. UNIDAD DE ANALISIS:	30
D. MUESTREO:	30
E. TOMA DE MUESTRA:	30
F. HIDRÓLISIS DE LA MUESTRA:	31
XVII. MATERIAL Y MÉTODOS:.....	32
XVIII. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS:.....	32
XIX. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS Y CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS:.....	33
A. PRIMER MÉTODO DE EXTRACCIÓN:.....	33
B. SEGUNDO MÉTODO DE EXTRACCIÓN:.....	34
XX. CONTROLES POSITIVOS:.....	34
1. PROCESO DE OBTENCIÓN DE CONTROLES POSITIVOS (METABOLITOS DE DIAZEPÁM):.....	35
XXI. IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS:.....	35
1. MICROCRISTALIZACIÓN:.....	35
1.1. Fundamento:.....	36
1.2. Procedimiento:.....	36
2. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE ADSORCIÓN:.....	37
2.1. Fundamento:.....	37
2.2. Procedimiento:.....	37
XXII. RESULTADOS:	38
XXIII. CÁLCULO ESTADÍSTICO:.....	42
C.1. Test de Ji-Cuadrado:.....	42
C.2. Teoría estadística de las decisiones, mediante contraste de medias y proporciones usando distribuciones normales:.....	45
XXIV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:	47
XXV. RECOMENDACIONES:	49
XXVI. BIBLIOGRAFIA:.....	50
XXVII. ANEXOS:.....	52

I. INTRODUCCIÓN:

Las benzodiazepinas son un grupo de fármacos que son utilizados para tratar y controlar diferentes males psicológicos (ansiedad e insomnio) y neuromusculares (epilepsias, espasmos, convulsiones, etc.), cuya acción principal se ejerce sobre los procesos mentales y emocionales modificando selectivamente la actividad psíquica que se acompaña de relajación y sosiego del sistema neuromuscular, en especial del sistema nervioso central¹.

Es importante señalar que las benzodiazepinas calman la hiperexcitabilidad nerviosa en dosis terapéuticas, pero las dosis prolongadas son capaces de llevar a una intoxicación crónica con tolerancia y dependencia psíquica-física en el individuo; donde, los pacientes se ven incapacitados de superar sus propios problemas incluso inhibir el normal desarrollo psicomotor. Las dosis altas de benzodiazepinas producen una intoxicación aguda; como resultado se observa sueño profundo, depresión cardiorrespiratoria, coma y muerte.

Una vez administradas y absorbidas las drogas benzodiazepínicas ya sea en dosis terapéutica o tóxica (en casos de suicidio, homicidio, etc.), sus metabolitos pueden ser identificados en secreciones corporales como en orina, por métodos sencillos y prácticos: microcristalización y cromatografía en capa fina.

Por el crecimiento del comercio, de la población y el avance de la medicina, han logrado que las industrias farmacéuticas aumenten su producción, pero también se incrementa el contrabando y la venta indiscriminada de estos fármacos y muchas personas aprovechando estos factores han incurrido en actos delictuosos. Por esta razón el presente trabajo tiene por objeto optimizar un

¹ LITTER, Manuel: COMPENDIO DE FARMACOLOGÍA; 6ª Ed, Buenos Aires-Argentina. 2001 Ed. "El Ateneo", Pág. 129

método de extracción e identificación de metabolitos benzodiacepínicos en muestras de orina, especialmente de aquellos de mayor prevalencia, venta y administración en salud: diazepam y alprazolam.

II. MARCO TEÓRICO:

Las benzodiacepinas son sustancias farmacológicas de origen sintético empleadas principalmente para el control de enfermedades psicopatológicas (son tranquilizantes ansiolíticos e hipnóticos potentes y anticonvulsivantes); se absorben fácilmente por vía oral y no tanto así por la vía rectal y parenteral. Su acción se debe a un aumento inhibitorio del GABA (*ácido gamma-amino butírico*) en el espacio interneuronal, que permite la entrada de iones cloruro en los receptores de la neurona, este efecto inhibe el impulso nervioso eléctrico bloqueando completamente la transmisión neuronal. Una vez cumplida su vida media y su función son biotransformados en el hígado y eliminados en su mayor parte por vía renal (70 a 90 %) y en menor cantidad por heces y sudor [1].

III. HISTORIA:

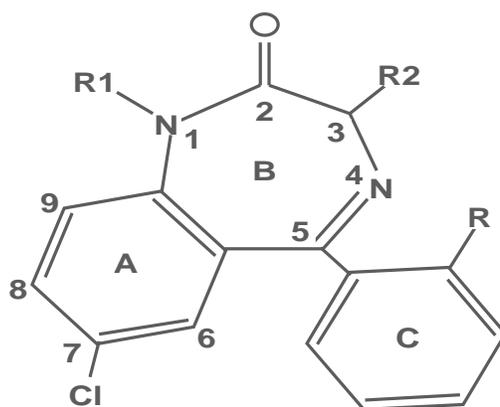
Desde la antigüedad se emplearon numerosas sustancias como bebidas alcohólicas y pociones que contenían laudano y numerosas hierbas para inducir el sueño, los primeros agentes que se introdujeron de manera específica como sedante e hipnótico fueron los bromuros, a mediados del siglo XIX se emplearon en gran proporción el hidrato de cloral, el paraldehído, el uretano y el sulfonal². En 1912 los barbitúricos (fenobarbital) disfrutaron de un periodo prolongado en su aplicación como sedante, hipnótico, anticonvulsivante y como preanestésico. Con el ritmo de vida y exigencias siempre crecientes, la ciencia farmacéutica incentivó a buscar nuevos agentes con efectos más selectivos sobre el Sistema Nervioso Central, en consecuencia a finales de 1930 salió a luz la fenilhidantoína

² Goodman & Gilman, LAS BASES FARMACOLÓGICAS DE LA TERAPÉUTICA, Ed. Interamericana-México 1996, 8ª edición, Vo: 1; Pág. 386.

y la trimetadiona, en 1950 la clorpromazina y meprabamato. Con el advenimiento de nuevos métodos mas especializados para valorar los efectos de fármacos hipnóticos, el químico polaco L. Steinbach en 1957 encontró un compuesto con propiedades mio-relajante, sedante y anticonvulsivante, *el clordiazepóxido*. Se empezó a comercializar en 1960 como Librium, tres años mas tarde se distribuyo el *diazepám* (valium), desde el momento la cifra de compuestos benzodiazepínicos sintetizados son más de 2000, los cuales han sido sometidos a pruebas biológicas, de ellas 35 se encuentran en aplicación clínica en diversas regiones del mundo. Desde entonces las benzodiazepinas están íntimamente relacionadas con el estrés psíquico y social, de ahí que la mayoría de las recetas médicas fueron seleccionadas por su potencia ansiolítica alta y su baja capacidad de causar depresión mortal del SNC³.

IV. ESTRUCTURA GENERAL:

El término de benzodiazepina se refiere a la parte de la estructura molecular, compuesta por un anillo de benceno (A) fusionado con un anillo de diazepina de siete miembros (B) con dos átomos de nitrógeno en las posiciones 1 y 4, y un anillo sustitutivo (C), en resumen se refiere al 5-aryl-1,4-benzodiazepina⁴.



³ BENZODIAZEPINAS, www.abcmedicus.com/articulo/medicos/id/246/pagina/1/benzodiazepinas.html.

⁴ Velásquez P. et al, *FARMACOLOGÍA BÁSICA CLÍNICA*, 16ª edición, Ed. Interamericana – MC Graw-Hill; Pág. 325

V. CLASIFICACIÓN: Se clasifican en cuatro categorías, según su vida media (cuadro 1).

CUADRO 1

DATOS FARMACOCINÉTICOS DE ALGUNAS BENZODIACEPINAS ANSIOLÍTICAS, HIPNÓTICOS Y ANTIEPILÉPTICOS Y OTROS FÁRMACOS QUE ACTÚAN SOBRE RECEPTORES BENZODIACEPÍNICOS

	Vida media Hrs.	Metabolito Activo	Vo. de distribución l/Kg.	Unión a Prot. Plasmática	T. máx. Oral (hrs)
Acción prolongada: Semivida efectiva superior a 24 horas					
Clobazám a-e	9 - 60	Si	0,8 - 1,8	87 - 92	1 - 4
Clorazepato a	Muy corta	Si	0,93 - 1,27	82	1 - 2
Clordiazepóxido a	5 - 30	Si	0,26 - 0,58	94 - 97	0,5 - 4
Diazepám a-e	14 - 100	Si	0,7 - 2,6	96,8 - 98,6	0,5 - 2
Flurazepám h	Muy corta	Si	3,4	96	0,5 - 3
Halazepám a	9 - 28	Si	0,71 - 0,13	98	
Ketazolám a	32	Si		96	
Medazepám a	1 - 2	Si		98,7 - 99,5	
Prazepám a	29 - 193	Si			4 - 6
Quazepám h	27 - 40	Si	5	>95	< 2,5
N-desmetildiazepám	36 - 200	Si	0,93 - 1,27	97,6	0,5 - 2
N-dasalquilflurazepán	40 - 250	Si			
Acción intermedia: Semivida efectiva entre 14 y 24 horas					
Bromazepám a	7,9 - 19,3	No		70	
Flunitrazepám h	15 - 30	Si			
Nitrazepám h-e	15 - 38	¿Si?		86 - 87	0,5 - 5
Acción corta: Semivida efectiva entre 6 y 14 horas					
Alprazolám a	6 - 20	¿Si?	0,7 - 1,5	70 - 80	0,25 - 3
Lorazepám a	9 - 22	No	0,7 - 1	85	1 - 3
Lormetazepám h	9 - 15	No			1,5 - 4,5
Oxazepám a	4 - 24	No	0,6 - 1,6	97 - 90	1 - 4
Temazepám h	5 - 22	No	1,3 - 1,16	96 - 98	
Loprazolám h	7 - 21	Si		80	2 - 5
Acción muy corta: Semivida inferior a 6 hrs.					
Brotizolám *	4 - 6,3	Si	0,66	89 - 95	< 2
Midazolám	1,5 - 3,1	No	0,8 - 1,8		0,67
Triazolám h	1,3 - 3,9	¿Si?	0,8 - 1,3	78 - 79	0,7 - 2
Zolpidem * h	1,5 - 2,4	No	0,54		2,2
Zopiclonca * h	4,5 - 6,1	Si	1,43	45	1

Datos reproducidos de Velásquez P. et al, FARMACOLOGÍA BÁSICA CLÍNICA, 16ª edición, Ed. Interamericana – MC Graw-Hill; Pág. 364. (a) Ansiolíticos, (h) hipnóticos, (e) antiépilépticos, (*) no son benzodiazepinas, pero actúan sobre receptores benzodiazepínicos.

VI. FARMACODINAMIA:

1. Sistema nervioso central: Se demuestra con facilidad que las benzodiazepinas disminuyen la actividad motora del SNC: son capaces de inhibir los reflejos raquídeos mediados por el sistema reticular del tallo encefálico o mesencefálico, conforme se va incrementando su acción se produce flacidez y pérdida del reflejo de enderezamiento, con advenimiento de relajación muscular, sedación, hipnosis y actividad anticonvulsivante [1].

La acción tranquilizante ansiolítica de las benzodiazepinas está en relación con la depresión de los centros del sistema límbico, sobre todo del núcleo amigdaloides o amígdala que desempeña funciones excitadoras.

2. Respiración y aparato cardiovascular: Las dosis terapéuticas de benzodiazepinas carecen de efecto sobre la respiración y sistema cardiovascular en sujetos normales. Pero en medicación preanestésica y en dosis altas, los pacientes con enfermedades pulmonares obstructivas crónicas se ven afectados levemente por la depresión del sistema respiratorio, pudiendo producir hipoxia, narcosis por CO₂ y acidosis respiratoria. El sistema cardiovascular también se ve afectado, especialmente en cardiopatías, en muchas ocasiones se observa una depresión arterial e incremento de la frecuencia cardíaca, este último efecto probablemente sea ocasionado por una disminución del trabajo en el ventrículo izquierdo e incremento del flujo sanguíneo a nivel coronario [2].

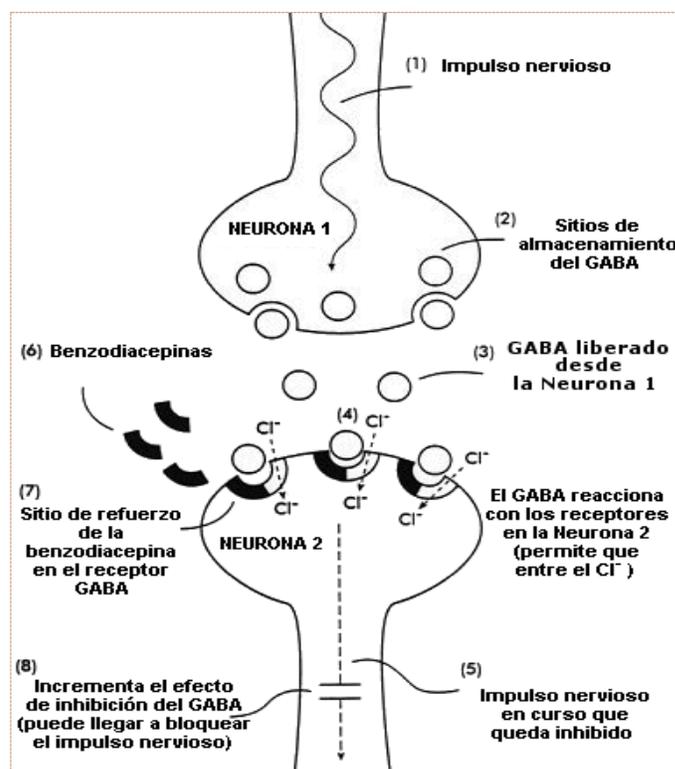
Uno de los sistemas inhibidores más importantes de la neurotransmisión en el cerebro es mediado por los receptores GABA, que favorece el ingreso de iones Cl⁻ a la célula, lo cual genera hiperpolarización celular y hace que disminuya la

excitabilidad neuronal. En efecto, las benzodiazepinas influyen directa o indirectamente en casi todos los procesos mentales o funciones cerebrales.

3. Mecanismo de Acción: Todas las benzodiazepinas actúan aumentando la acción de una sustancia química natural del cerebro, el GABA, es un neurotransmisor, es decir, un agente que transmite mensajes desde una célula cerebral (neurona) hacia otra. El mensaje que el GABA transmite es un mensaje de inhibición: le comunica a las neuronas con las que se pone en contacto que disminuyan la velocidad o que dejen de transmitir los impulsos eléctricos. Como más o menos el 40% de los millones de neuronas del cerebro responden al GABA, significa que el GABA tiene un efecto general tranquilizante en el cerebro: de cierta forma, es el hipnótico-tranquilizante natural con que cuenta el organismo. Las benzodiazepinas aumentan esta acción natural del GABA, ejerciendo de esta forma una acción adicional (frecuentemente excesiva) de inhibición en las neuronas.

Diagrama del mecanismo de acción del neurotransmisor natural GABA (ácido gamma-amino butírico) y de las benzodiazepinas en las células neuronales del sistema nervioso central

- 1,2) El impulso nervioso hace que el GABA sea liberado de los sitios en que está almacenado en la neurona.
- 3) El GABA liberado en el espacio interneuronal.
- 4) El GABA reacciona con los receptores de la neurona 2; la reacción permite la entrada de los iones de cloruro (Cl⁻) en la neurona.
- 5) Este efecto inhibe o detiene el progreso del impulso nervioso.
- 6,7) Las benzodiazepinas reaccionan con el sitio de refuerzo de los receptores GABA.
- (8) Esta acción aumenta los efectos inhibidores del GABA; el impulso nervioso en curso queda bloqueado completamente.



La forma en que el GABA transmite su mensaje inhibitor es a través de lo que podríamos llamar un inteligente dispositivo electrónico. Su reacción con los sitios especiales (receptores GABA) ubicados en la parte exterior de la neurona que lo recibe abre un canal, permitiendo así que las partículas con carga negativa (iones cloruro) entren en la neurona.

Estos iones negativos “sobrecargan” la neurona, debilitando la respuesta de la misma a otros neurotransmisores, que en condiciones normales, la excitarían. Las benzodiazepinas también reaccionan en sus propios sitios especiales (receptores benzodiazepínicos) que precisamente están ubicados en los receptores GABA. Los distintos subtipos de receptores benzodiazepínicos tienen acciones levemente distintas. Uno de estos subtipos, (el alfa 1) es el responsable de los efectos sedativos, otro (el alfa 2) es el que ejerce efectos ansiolíticos, mientras que ambos, el alfa 1 y el alfa 2, como también el alfa 5, son los responsables de los efectos anticonvulsivos. Todas las benzodiazepinas se combinan, en mayor o menor grado, con todos estos subtipos y todas aumentan la actividad del GABA en el cerebro.

Como resultado de este incremento de la actividad inhibitora del GABA causada por las benzodiazepinas, disminuye la producción cerebral de neurotransmisores excitativos, incluso se reduce la producción de norepinefrina (noradrenalina), serotonina, acetil-colina y dopamina. Estos neurotransmisores excitativos son necesarios para las funciones involucradas en el estado normal de vigilia y alerta, memoria, tono muscular y coordinación, respuestas emocionales, secreciones de las glándulas endocrinas, control del ritmo cardíaco, tensión sanguínea y para muchas otras funciones, todas las cuales pueden ser perjudicadas por las benzodiazepinas. Hay otros receptores benzodiazepínicos, no relacionados con el

GABA, que se encuentran en el riñón, colon, células sanguíneas y corteza suprarrenal, que pueden ser afectados por algunas benzodiazepinas. Estos efectos directos e indirectos son responsables de los bien conocidos efectos adversos causados por el uso de las benzodiazepinas⁴.

4. Aplicación en la Anestesia: Para la inducción de anestesia las benzodiazepinas se dan por vía intravenosa en dosis de 5 – 10 mg [2] ej.: diazepam (0,1 a 1 mg/kg.) una hora antes que el paciente sea trasladado a la sala de operaciones. A fin de evitar la sensación quemante y reducir el riesgo de trombosis venosa, la solución de diazepam y de otros fármacos como el lorazepam, midazolam y flunitrazepam debe de inyectarse con lentitud [1]. Una vez inyectado el fármaco se distribuye con rapidez hacia el cerebro y su acción comienza a los pocos minutos (5 – 10 minutos), como resultado se observa somnolencia, amnesia y por último pérdida del conocimiento. Las benzodiazepinas, también son útiles como agentes únicos para procedimientos que no requieren analgesia: Ej. En endoscopia, cateterismo, laringoscopia y broncoscopio.

5. Otras acciones:

- Estimulan el apetito de la rata y del perro con aumento del consumo alimentario y del peso corporal y lo mismo sucede con el hombre, sin que se conozca el modo de acción [1].
- El diazepam ejerce una acción depresora sobre el útero, existe una disminución de la frecuencia, amplitud y tono, sobre todo en el útero grávido.

⁴ BENZODIAZEPINAS: MECANISMO DE ACCIÓN, <http://www.benzo.org.uk/espman/bzcha01.htm>

6. Tolerancia: El consumo prolongado de las benzodiazepinas puede llevar al desarrollo de tolerancia, que se caracteriza por una disminución progresiva de la intensidad de los efectos del medicamento, requiriendo de un aumento de la dosis para obtener el mismo efecto a lo que era en un principio. Con frecuencia la tolerancia puede deberse a tres factores:

1. Por consumo prolongado y de forma continua de un fármaco siempre a la misma dosis. En muchos casos, la dosis inicial de la droga tiene cada vez menos efecto y se necesita una dosis más elevada para lograr obtener el efecto inicial, esto ha llevado a los doctores a recetar dosis cada vez más alta o bien a añadir otra benzodiazepina, de modo que los pacientes terminan tomando dos tipos de benzodiazepinas al mismo tiempo.
2. Por una eliminación lenta de los metabolitos demetilados de benzodiazepinas de acción larga superior a las 24 hrs. que son tranquilizantes ansiolíticos activos de potencia menor, de acción prolongada y vida media mucho mayor que las benzodiazepinas originales. Ocurre especialmente con el clordiazepóxido, medazepám, diazepam, prazepam, cloxazolam y clobazam.
3. La insuficiencia hepática–renal y el envejecimiento: Reducen la eliminación de las benzodiazepinas y sus metabolitos. En la primera especialmente se afecta los procesos de biotransformación que debe sufrir el fármaco benzodiazepínico (oxidación, demetilación e hidroxilación), como también la conjugación con el ácido glucurónico.

De esta manera se llega a una acumulación y fijación de los metabolitos benzodiazepínicos en las proteínas plasmáticas y tejido adiposo, los cuales son responsables directos de la inhibición de sus efectos farmacológicos.

En general, el organismo responde a la presencia de la droga con una serie de mecanismos de adaptación que tiende a superar los efectos de la misma. En el caso de las benzodiazepinas, los cambios que se producen para compensar su presencia tienen lugar en el GABA y en los receptores benzodiazepínicos, los cuales se hacen menos reactivos, de modo que disminuye la acción inhibitoria del GABA y la de las benzodiazepinas [5].

VII. FARMACOCINÉTICA:

1. Absorción: Las benzodiazepinas se absorben con facilidad y de forma completa en las vías digestivas, aunque no todas con la misma rapidez cuando se administra por vía oral. Así por ejemplo el clorazepato sufre primero una descarboxilación de forma rápida en el jugo gástrico hasta N-desmetildiazepam, que a continuación se absorbe como tal, otro ejemplo el diazepam se absorbe más rápido en los intestinos que el clordiazepóxido. La acción farmacológica de las distintas benzodiazepinas se da a los 30 a 40 minutos con una acción máxima de 2 a 4 hrs.

Por vía intramuscular. La absorción no está buena debido a que estos fármacos se combinan con las proteínas del músculo, además su elevada lipofilia hace que se conjugue gradualmente con la grasa del cuerpo y se observe niveles de biodistribución muy variables y erráticos (a excepción del lorazepam). En muchas ocasiones el empleo de estos fármacos por vía IM resulta ser doloroso e irritante en el lugar de la inyección.

Por vía intravenosa. Es muy bueno el efecto terapéutico, su acción comienza a los pocos minutos (1 a 5 minutos), las drogas como tal y sus metabolitos se captan rápidamente en el cerebro y otros órganos bien perfundidos como en los músculos, ganglios, tejido adiposo, etc. La administración intravenosa requiere

que se haga lentamente en casos de urgencia, valorando el riesgo de depresión respiratoria.

2. Distribución: Una vez absorbidas, en la sangre, las drogas benzodiazepínicas y sus metabolitos activos, como el N-desmetil-diazepam (nordazepam), se distribuyen ampliamente a los diversos tejidos del organismo, incluso pudiendo atravesar la barrera placentaria y encontrarse en el feto y recién nacido en concentraciones sanguíneas semejantes a la de la madre, también secretarse a través de las glándulas mamarias y presentarse en la leche materna.

A nivel sanguíneo (plasma) las benzodiazepinas se combinan con las proteínas plasmáticas, especialmente con la albúmina, en proporciones variables que van desde el 70 % para el bromazepam al 99,5 % para el ketazolam.

La administración por vía oral, intramuscular e intravenosa de diazepam se obtiene una biodisponibilidad del 86 a 100% a los 30 a 90 minutos, se une a las proteínas plasmáticas en un 98%, logrando un volumen de distribución (0.7-2,6 L/kg) y vida media de 14-100 horas. Mientras que el alprazolam (vía oral) presenta una biodisponibilidad del 80%, la máxima concentración plasmática se observa después de 1 a 2 hrs de haber administrado una dosis única de alprazolam (14,4 ng/ml vía oral), los niveles en plasma son proporcionales a la dosis administrada: con dosis de 0,50 a 3,0 mg se observan niveles de 8,0 a 37 ng/ml. Con un grado de unión a proteínas plasmáticas del 70-80% (principalmente albúminas) y vida media de 12 a 16 hrs.

En muchas ocasiones estas concentraciones pueden incrementarse especialmente en niños y ancianos, probablemente se deba a diferentes factores, como un mal

funcionamiento hepático, hipoproteinemias, disfunciones renales y una elevada sensibilidad hacia los efectos de la droga.

3. Metabolismo: Se metabolizan específicamente en los microsomas hepáticos por efecto de diversos sistemas enzimáticos intracelulares, por consiguiente, las drogas son suficientemente liposolubles como para atravesar la membrana celular. El metabolismo (biotransformación) de las benzodiazepinas da lugar a la formación de sustancias farmacológicamente activas de acción larga y de vida media prolongada, por ejemplo el diazepam tiene una vida media de 14 – 100 hrs. y de su metabolito N-desmetildiazepam de 36 – 200 hrs. (en algunas ocasiones la vida media de estos fármacos puede ser hasta el doble de la sustancia de origen) [4]. Parte de esta variabilidad condiciona la biotransformación y eliminación con mayor lentitud y las causas de determinadas circunstancias fisiológicas y patológicas. También existen otros factores que influyen en su biotransformación, así como enfermedades hepáticas, consumo de algunos inhibidores de la monoamino-oxidasa (IMAO), *tranilcipromina*, fármaco que inhibe las enzimas microsómicas hepáticas, el cual conduce al incremento de la potencia y alarga el tiempo de eliminación de la droga por una mala conjugación con ácido glucurónico [1]. Estas y otros factores como el envejecimiento reducen notablemente la biotransformación de las benzodiazepinas que deben ser oxidadas, hidroxiladas o desalquiladas.

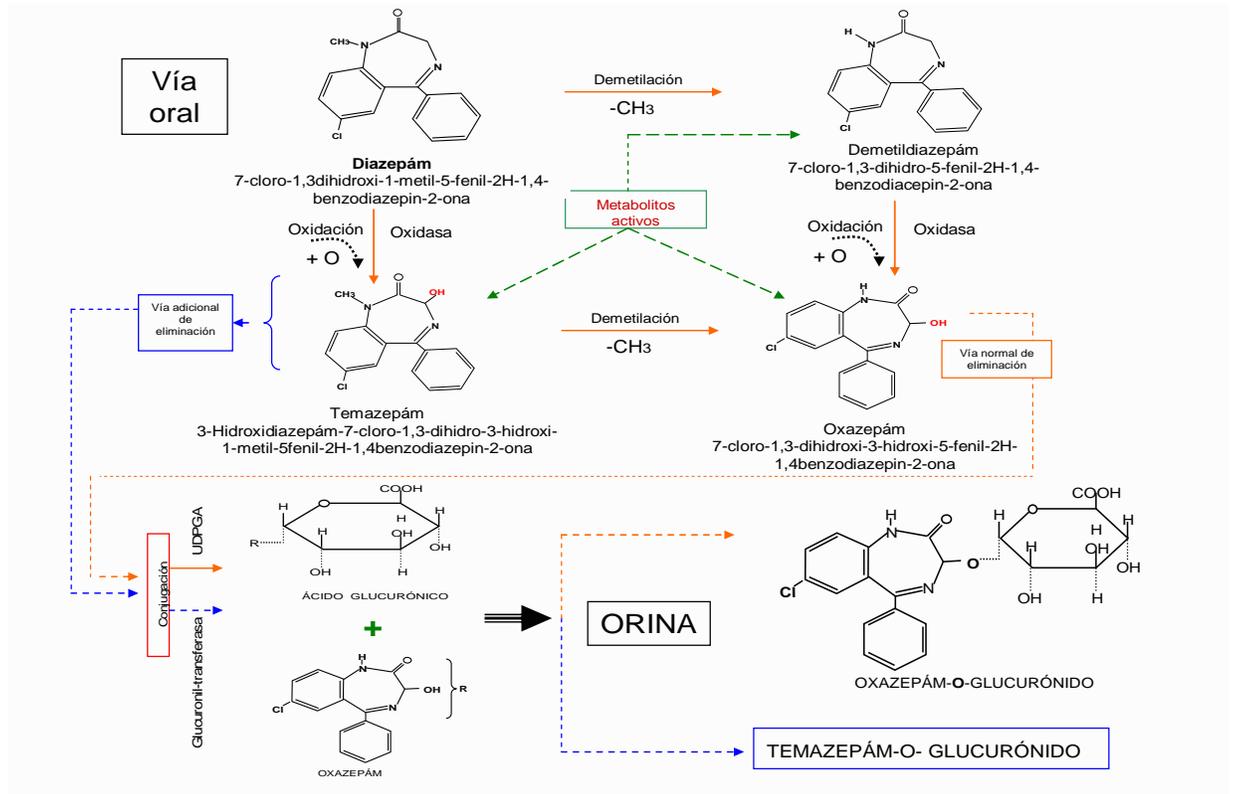
Una “familia” importante de benzodiazepinas acaba produciendo oxazepam, previamente N-desmetil-diazepam (nordazepam). El clorazepato y el prazepam son pro-fármacos activos por convertirse en desmetildiazepam en el organismo. El primero en el propio tubo digestivo y el segundo en el hígado. El flunitrazepam, nitrazepam y flurazepam sufren una hidroxilación una N-

desalquilación y una oxidación ulterior para luego conjugarse con el ácido glucurónico y excretarse [3].

En la figura 1 se ilustran la existencia de numerosos metabolitos activos comunes entre los distintos fármacos de benzodiazepinas. Por su parte el diazepam sufre los procesos de demetilación y oxidación por dos caminos diferentes (figura 2A) para transformarse en oxazepam y conjugarse con el ácido glucurónico. A su vez existe una vía alterna de eliminación de uno de los metabolitos del diazepam (temazepam) que se encuentra presente en orina en casos de insuficiencia hepática y una administración excesiva de la droga (diazepam) que conduce al aumento de la concentración del fármaco y la de sus metabolitos a nivel sanguíneo. Como el organismo responde con una serie de manifestaciones y mecanismos de defensa contra un agente externo, parte de este metabolito (temazepam) será eliminado de forma directa por conjugación con el ácido glucurónico por vía renal y es la que condiciona una mala biotransformación del diazepam.

El alprazolam que contiene un anillo triazol (triazolobenzodiazepina), se biotransforma mediante reacciones de oxidación. Primero se produce una hidroxilación inicial a nivel del grupo metilo sobre el anillo triazol, posteriormente sobre el anillo B en posición 3. Los productos llamados alfa-hidroxilados (alfa-hidroxi-alprazolam) son muy activos y se metabolizan con gran rapidez sobre todo por conjugación con el ácido glucurónico de modo que no ocurre acumulación apreciable de los metabolitos activos sobre el organismo (figura 2B).

A)



B)

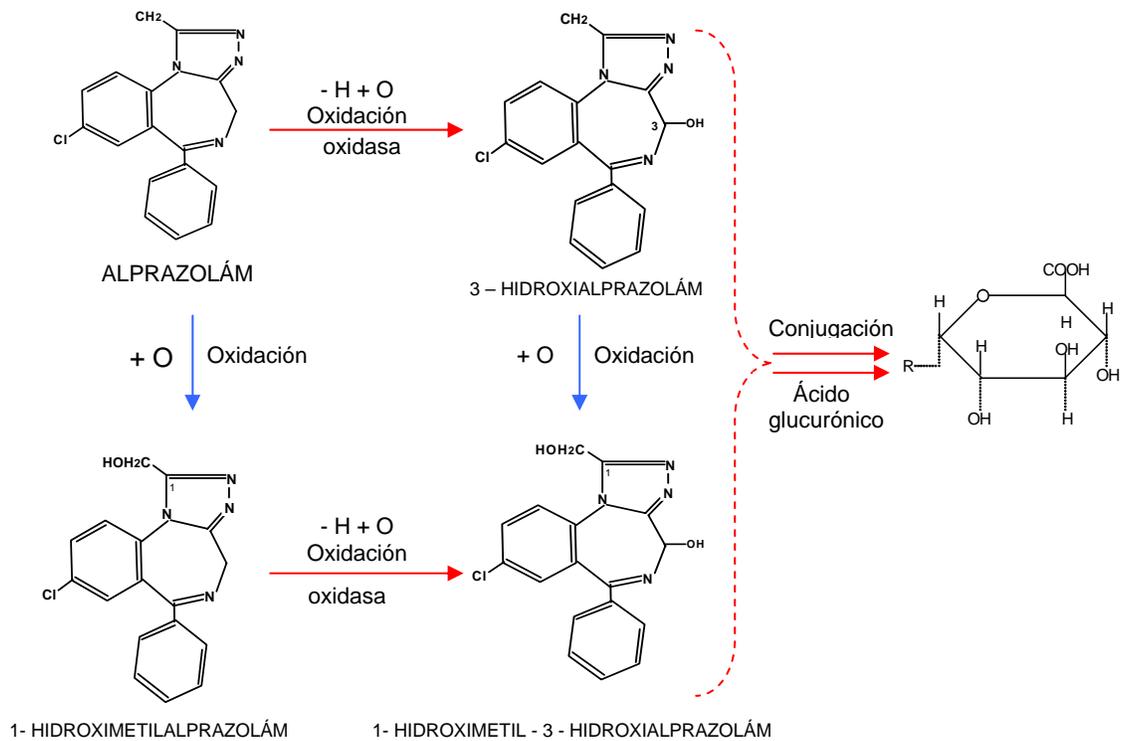


Figura 2: Biotransformación del diazepám (A) y alprazolám (B).

Datos reproducidos de Manuel Litter; FARMACOLOGÍA EXPERIMENTAL Y CLÍNICA; 5ª Ed. Buenos Aires-Argentina 1975; Ed. El ateneo; Pág. 325.

4. Excreción: Las benzodiazepinas y sus metabolitos se eliminan en su mayor parte por vía renal en forma de conjugados glucurónicos, cerca de 70 – 90%, el resto en las heces y a través de la bilis, en algunas circunstancias puede prolongarse su eliminación como ocurre en la insuficiencia hepática y renal, por ej. La semivida promedio de eliminación del diazepam es de 57 hrs. en condiciones normales, en insuficiencia renal aumenta a 62 hrs. Así mismo el alprazolam se elimina por vía renal en un 80% en forma glucuronizado, la cual se excreta a las 12-15 hrs. en condiciones normales, en insuficiencia hepática 19,7 hrs. y en ancianos a las 16,2 hrs. Al finalizar el mismo las concentraciones plasmáticas son subclínicas a las 24 hrs que desaparecen en 4 o menos días.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que en todas éstas consideraciones farmacocinéticas (absorción, distribución, etc.), la dosis juega un papel primordial en la terapéutica y un ajuste cuidadoso puede evitar muchos problemas secundarios.

VIII. INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS:

Los efectos depresores de las benzodiazepinas incluyendo el alprazolam y diazepam se potencian con la administración simultánea de otras drogas depresoras que poseen efectos sedativos e hipnóticos, los mismos pueden llevar a fenómenos indeseables de toxicidad aguda [(4), (5)].

Las interacciones más importantes son de naturaleza farmacodinámica, las cuales podrían llevar a fenómenos ya descritos en la parte superior, pero vale recalcar que sus efectos se potencian con los siguientes fármacos:

- Algunos antidepresores: Como la amitriptilina y la doxapina.

- Los tranquilizantes mayores o neurolépticos: Ej. Fenobarbital, la carbamazepina, la fenitoína, este último se eleva considerablemente en el plasma sanguíneo, debido a que las benzodiazepinas inhiben el metabolismo de la fenitoína.
- Los antihistamínicos sedativos: Como la fenhidramina y prometazina.
- Los fármacos opiáceos: Heroína, morfina y meperidina.
- Las bebidas alcohólicas (etanol): pueden ser especialmente graves.
- La coadministración de alprazolám con algunos imidazoles antifúngicos (itraconazol y ketoconazol) alteran el metabolismo oxidativo del alprazolám mediada por la isoenzima CYP3A4, prolongando su efecto.
- La fluvoxamina, nefazodona, fluoxetina aumenta las concentraciones plasmáticas del alprazolám.

Las interacciones de tipo farmacocinético son de menos trascendencia; así por ejemplo:

- La cimetidina: Reduce el metabolismo del diazepam y clordiazepóxido.
- Los antiácidos (*hidróxido de aluminio y magnesio*): reducen la absorción del clorazepato dipotásico y de otras benzodiazepinas.
- Los anticonceptivos orales: Alteran el metabolismo del diazepam y alprazolám.
- El diazepam: disminuye la acción terapéutica de la levodopa.
- La digoxina administrada juntamente con el alprazolám produce una intoxicación digitálica. Puede deberse a un aumento de las concentraciones plasmáticas de la digoxina al interferir el alprazolám con la fijación a las proteínas del plasma o por un efecto sobre los túbulos renales reduciendo la eliminación de la digoxina.

IX. EFECTOS ADVERSOS:

Después del tratamiento y una vez que hayan alcanzado las concentraciones plasmáticas de dosis terapéuticas (hipnóticas, ansiolíticas, etc.), las benzodiazepinas producen grados variables de aturdimiento, laxitud, trastornos funcionales mentales y motoras, confusión, amnesia anterograda, somnolencia residual durante el día, resaca (efecto de Hangover), con frecuencia debilidad, visión borrosa, vértigos náuseas y vómitos, malestar epigástrico, diarrea, artralgias, dolor del tórax e incontinencia. La presencia de estos efectos indeseables esta relacionada claramente con la dosis, la vida media del fármaco y el tiempo de administración.

1. Efectos psicológicos adversos: En ciertas ocasiones las benzodiazepinas pueden producir efectos paradójicos con un incremento del nivel de ansiedad, alucinaciones e incidencia de pesadillas; sobre todo durante la primera semana de tratamiento. En otras causa irritabilidad, comportamiento agresivo, taquicardia y sudación, euforia, inquietud, paranoia, conducta hipomaniáca e ideación suicida y empeoramiento de las convulsiones en epilépticos, tales reacciones son semejantes a las que a veces produce el alcohol (extremadamente frecuentes en individuos ansiosos y agresivos, en niños y gente mayor) [5].

2. Efectos en la gente mayor: Los pacientes geriátricos son más sensibles a los efectos secundarios de las benzodiazepinas, pudiendo provocar confusión, deambulación nocturna, amnesia, pérdida de equilibrio y Pseudodemencia.

Los efectos colaterales se atribuyen en parte a dos razones principales:

- Deficiencia en la biotransformación.
- Mayor sensibilidad a la acción farmacológica: Los ancianos experimentan a dosis bajas los efectos benéficos como los perjudiciales.

Por consiguiente tenemos tres reglas importantes en el tratamiento de pacientes geriátricos:

- Seleccionar benzodiazepinas que no sufran biotransformación lenta a nivel hepático y que no se acumulen.
- De absorción rápida (es imprescindible para que alcance las concentraciones terapéuticas en el tejido cerebral), y tiempo de actuación entre 4 a 6 horas.
- Ajustar progresivamente la dosis, debe ser la mitad que la de los adultos jóvenes.

Pautas posológicas⁶:

Alprazolám: 0,25-0,5 mg dos veces al día, incrementos de 0,25 mg.
Lorazepám: 0,5 mg (1/2 tableta) 1-2 veces al día. Con incrementos de 0,5 mg.
Triazolám: 0,125 mg como hipnótico. No incrementar la dosis.

⁶ Consideraciones generales Ansiolíticos, sedantes e hipnóticos. html.rincondelvago.com/ansioliticos-sedantes-e-hipnoticos.html

3. Efectos adversos durante el embarazo:

3.1. Dimorfo-génesis y otros efectos sobre el feto y neonato: Informes recientes señalan un aumento en la incidencia de malformaciones congénitas en recién nacidos de madres tratadas con benzodiazepinas, especialmente con clordiazepóxido, triazolám, flurazepám y alprazolám. Particularmente durante el primer trimestre de embarazo; estas drogas retrasan el crecimiento intrauterino del feto y el desarrollo cerebral. También, se han observado gran variabilidad de reacciones alérgicas, hematológicas y hepatotoxicidad, el cual se denomina síndrome de “*FLOPPY INFANT*“. El neonato presenta síntomas de hipotonía muscular, hiperexcitabilidad, llanto estridente, retraso mental, déficit de atención y dificultades en la alimentación [(4) (5)]. Las grandes dosis justo antes del parto o durante el mismo pueden causar hipotermia y depresión respiratoria leve. El abuso por parte de la embarazada entraña el peligro de síndrome de abstinencia.

X. CONTROL DE PSICOTRÓPICOS:

Las benzodiazepinas se encuentran contempladas en el Estatuto Nacional de Sustancias Controladas por Decreto Supremo 25235 de 30 de Noviembre de 1998 *Reglamento a la Ley del Medicamento* capítulo XVII *Psicotrópicos y Estupefacientes* en sus artículos 112 a 137 grupo IV tranquilizantes hipnóticos no barbitúricos⁷ y en la ley 1008: *Ley del Régimen de la Coca y Sustancias Controladas* de 19 de julio de 1988 en sus artículos 39, 62, 63 y 64. Que corresponden a un grupo de sustancias cuya importación, exportación, fabricación, distribución y venta son de control especial. Según Resolución Ministerial No. 050/2000 de 2000 del Ministerio de Salud.

⁷ Ministerio de Salud y Previsión Social Dirección General de Servicios de Salud Unidad de Medicamentos Laboratorios y Bancos de Sangre, LISTA DE MEDICAMENTOS CONTROLADOS, UNIMED. ED.5ª, Vol. 10 La Paz 2002

XI. TOXICIDAD:

A pesar de su amplio margen de seguridad y poca toxicidad de las benzodiazepinas en terapéutica no debe soslayarse la posibilidad de llegar a complicaciones tóxicas, que mayormente es ocasionado por el uso inadecuado e indiscriminado de dichos fármacos benzodiazepínicos. Ya sea con el aumento de su dosis o la administración continua en el paciente.

El estado de salud o enfermedad influye también en la acción de las benzodiazepinas, en términos generales puede decirse que los enfermos son los que resisten menos a los efectos tóxicos que las personas sanas y no solo los enfermos, sino también aquellas personas debilitadas por falta de alimentación o desnutridas [4]. Por consiguiente puede observarse dos tipos de intoxicaciones:

1. Intoxicación Aguda: Resulta de la administración y absorción de dosis altas de benzodiazepinas (sobredosis), 15 a 20 veces mayores que la dosis usual. En este tipo de intoxicación el paciente puede ser despertado con la conservación de sus signos vitales, como: presión arterial, respiración y pulso.

La ingestión de grandes dosis de un agente tóxico, en nuestro caso benzodiazepinas; el organismo responde con una fuerte reacción defensiva contra el fármaco con vómitos y diarrea, etc. Que hace que expulse la mayor cantidad del tóxico benzodiazepínico, antes de que haya producido lesiones irremediables en el SNC y cuerpo. Muy pocas veces se han observado muertes debido a benzodiazepinas por vía oral y son extremadamente raras a no ser que se ingirieron al mismo tiempo otros fármacos depresores, como barbitúricos, etanol, antipsicóticos, etc. Sin embargo la administración por vía intravenosa de forma rápida aún en dosis terapéuticas, pueden inducir al paro

cardiorrespiratorio, inconciencia y muerte. Posiblemente se deba en parte al vehículo de la ampolla (propilenglicol), por la formación de trombos y por enfermedad bronca pulmonar obstructiva crónica y en cardiópatas⁸. El envenenamiento de tipo agudo reconoce tres orígenes: suicidio, homicidio y accidental [1].

1.1. Los suicidas: Es decir las personas que voluntariamente toman dosis altas de benzodiazepinas para autoeliminarse. Es muy frecuente en mujeres y en general se debe a cuestiones amorosas, sexuales, como también a factores psicológicos.

1.2. Homicidio: Es frecuente; pero lo fue mucho mas antiguamente en que era el modo de desembarazarse de las personas que molestaban. Aparentemente el número de envenenamientos o intoxicación de tipo homicida ha disminuido considerablemente. Parece ser debido a las siguientes causas:

- Es más difícil ahora que antes conseguir el fármaco sin receta médica.
- Los progresos de la toxicología ha hecho que estas drogas sean descubiertas en los alimentos, bebidas, fluidos corporales y cadáveres.

Este tipo de intoxicación es muy frecuente en problemas de herencia de dinero o títulos, problemas amorosos y sexuales.

1.3. Accidental: Es la más importante; los accidentes mortales por error en la administración y equivocación de la dosis por parte del médico, durante intervenciones quirúrgicas (como preanestésico), del farmacéutico, del propio enfermo que a de tomar la benzodiazepina (frecuente en pacientes geriátricos) o

⁸ Intoxicación por benzodiazepinas www.fepafem.org.ve/Guias_de_Urgencias/Intoxicaciones/Intoxicacion_por_benzodiazepinas.

muchas veces sin que haya error de dosis, sino mas bien por una mayor susceptibilidad especial del sujeto; puede producir una intoxicación aguda.

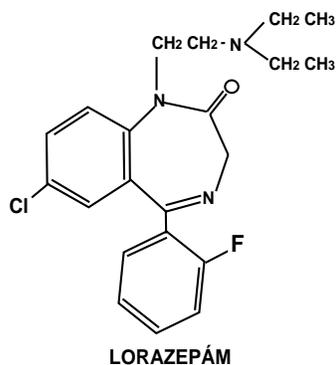
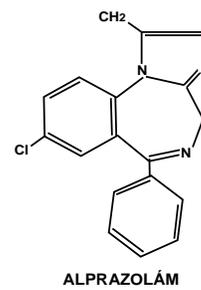
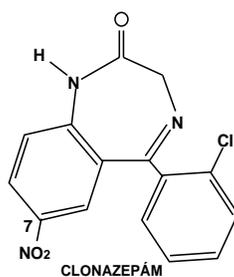
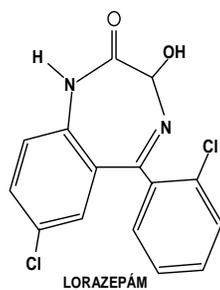
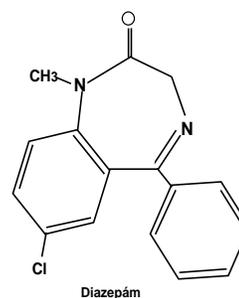
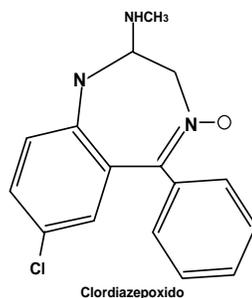
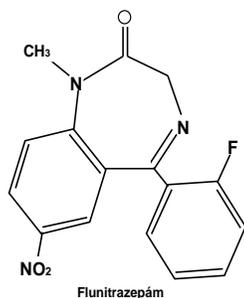
Las intoxicaciones accidentales graves y mortales son extraordinariamente repetidas en la actualidad, el cual es originado por el empleo de benzodiazepinas con otras sustancias depresoras del SNC, como: el alcohol, la morfina, cocaína, etc. La vida moderna ha traído esta nueva complicación y son ya muy frecuentes en la sociedad.

1.4. Manifestaciones clínicas: Debe recogerse todos los síntomas subjetivos y objetivos encontrados en el enfermo o presunto intoxicado. Lo que más lleva la atención en el cuadro sintomático es la depresión del SNC, que suele iniciarse de forma rápida, brusca y brutal ----por vía intravenosa a los 30 a 120 minutos y por vía oral depende del compuesto y de la cantidad del fármaco ingerido [8]--- el individuo de pronto se siente mal, con dolores abdominales, existe trastornos respiratorios (ataxia), sedación, somnolencia, disartrias, nistagmus y pupilas mióticas intermedias, además hiporreflexia, hipotermia e hipotensión con taquicardia compensatoria, la inmovilidad prolongada por inconciencia puede generar rhabdomiólisis u escaras. La aparición de coma debe hacer sospechar de la ingestión de otros fármacos depresores.

En presencia de una sintomatología de esta naturaleza y prontamente desarrollada, es cuando debemos preguntar e inquirir los alimentos, bebidas, medicamentos, etc. que el enfermo ha tomado en las últimas 24 hrs. y todo material biológico (vómitos, deposiciones, etc.) que nos de información sobre lo sucedido y las causas de la intoxicación. No hay que olvidar el hacer la recolección máxima de muestras biológicas e indicios del hecho, por que muchas veces puede sobrevenir la muerte, sin que el sujeto vomite más o

haga deposiciones o que puede hacer desaparecer lo que ingirió tirándolo, de esta manera entorpecer el estudio y la investigación.

Las benzodiazepinas que con mayor frecuencia llegan al laboratorio para análisis son: El alprazolám, lorazepám, clonazepám, clordiazepóxido, diazepám y flurazepám.



1.5. Almacenamiento y estabilidad de la muestra: La muestra es estable a temperatura de 4 - 8° C durante 7 días, pero lo aconsejable es realizar el análisis después de haberla obtenido o dentro de las 72 horas, con el objetivo de no permitir el desarrollo bacteriano y existan más interferencias para la identificación de los metabolitos benzodiazepínicos. En caso de no realizar el procesamiento y análisis de la muestra en el transcurso de este tiempo se procede a su congelación la cual es estable durante 5 meses.

2. Intoxicación crónica: Es de suponer que el consumo de dosis pequeñas y repetidas de benzodiazepinas conduzca a una intoxicación crónica. Aquí todos los síntomas están muy apagados, sin perjuicio de que haya agudizaciones relacionadas con ingestión de nuevas dosis, pero correspondiendo a debilitaciones del organismo. Es el problema principal que más frecuentemente se observa con las benzodiazepinas de acción larga. Conduce, además a una acumulación del fármaco y la de sus metabolitos, como también a la disminución de sus efectos benéficos terapéuticos.

Cualquier persona que luche por superar la toma de benzodiazepinas, se dará cuenta, que además de sus efectos terapéuticos, ejercen otros efectos profundos en la mente y en el organismo [5]. Ocasionalmente pueden observarse efectos paradójicos, como: agresión, excitación, psicosis o deterioro neurológico importante, siendo los niños y los ancianos los más afectados a este tipo de manifestaciones, así mismo también existe otro tipo de consecuencias, como: tendencia a accidentes, insomnio de rebote, ansiedad, cefalea, astenia, amnesia anterograda, síndrome de abstinencia, dependencia psíquica-física y tolerancia.

Todos estos efectos pueden trastornar en gran medida las tareas psicomotoras del individuo.

2.1. Deterioro de la memoria: Desde hace mucho tiempo se sabe que las benzodiazepinas causan amnesia; un efecto que se utiliza con frecuencia en cirugía, como: preanestésico y en turbaciones psicológicas. La pérdida de memoria en casos desagradables es positivo, pero el uso por períodos prolongados sin tener un cuidado en su administración o consumo, puede provocar pérdidas circunscritas de memoria, incapacidad de recordar números telefónicos por unos segundos, recordar palabras y casos que sucedieron mucho tiempo atrás, incluso inhibir el aprendizaje o adquisición de estrategias alternativas para afrontar sus problemas y obstaculiza el tratamiento cognitivo conductual. Por eso es necesario evitar tareas riesgosas que exigen cierto grado de alerta mental, como conducir vehículos u operar máquinas.

2.2. Dependencia: Son drogas que potencialmente provocan adicción, por su parte la dependencia física y psicológica se produce en un lapso que va desde semanas hasta meses de uso habitual o repetido con posibilidad de llegar aun síndrome de abstinencia (6 a 8 meses de tratamiento con dosis usuales), imposibilitando la suspensión del fármaco tras la administración continua. El cuadro se caracteriza por [6]:

- **Síntomas psicológicos:** Ansiedad, insomnio, irritabilidad, disforia, psicosis.
- **Síntomas somáticos de ansiedad:** Temblores, palpitaciones, vértigo, sudoración y espasmos vasculares.
- **Trastornos de la percepción:** Intolerancia al ruido y a la luz, sensación de movimiento y sabor metálico.

2.3. Tratamiento: Consiste en disminuir el régimen de dosificación de manera gradual y evaluar los factores biológicos, sociales y psicológicos. También incluye examen médico y análisis de tipo laboratorial, como: hemograma,

leucograma, análisis de lípidos (perfil lipídico), transaminasas y otros perfiles hepáticos, además de un estudio de orina y renal.

2.3.1. La nutrición: El enriquecimiento de la dieta con sales, oligoelementos, vitaminas, aminoácidos esenciales; etc. Es muy importante para la recuperación neuronal, cerebral y físico del paciente. Se debe de promover actividades favorables al cambio vital con participación activa del médico psiquiatra y de sus familiares⁹.

XII. ANTECEDENTES:

El análisis toxicológico de benzodiacepinas y de sus metabolitos durante los últimos años ha experimentado un considerable desarrollo, caracterizado especialmente por el empleo de instrumentos más o menos complejos, capaces de identificar y medir la cantidad del tóxico y sus metabolitos. Tal es el caso cuando se emplea técnicas inmonoquímicas, como el de EMIT (enzimoinmunoanálisis), espectrofotométricos (UV-IR), cromatografía de gases y otros. Estas técnicas instrumentales presentan indudables ventajas sobre los métodos analíticos clásicos: microcristalización, colorimétrico y cromatografía en capa fina.

En los estudios realizados por Iriarte Sanabria E. Cecilia; Diazepám una droga de abuso, La Paz 1998. (los metabolitos fueron identificados por espectrofotometría (UV); EMIT, colorimétrico (técnica de Bratton Marshall) y microcristalización). Y por Morales Flores Fanny Esther. Determinar la presencia de metabolito de diazepám (oxazepám) en muestras de orina de pacientes internados en el servicio de ginecología del Hospital Obrero CNS, La Paz 2001. (los metabolitos benzodiacepínicos fueron identificados por microcristalización).

⁹ Desintoxicacion Tranquilizantes Benzodiacepinas Tratamiento Contra ... www.tavad.com/desintoxicacion-tranquilizantes.htm

En ambos estudios, la identificación de metabolitos benzodiazepínicos resultó ser positiva, lo que permite hacer una comparación del procedimiento de análisis de microcristalización.

XIII. JUSTIFICACIÓN:

Debido a la facilidad de obtener las benzodiazepinas en el comercio, actualmente son causantes de numerosas intoxicaciones (accidentales, suicidas u homicidas). Por sus propiedades hipnótico-sedantes su uso se ha generalizado en hechos delictivos, como: robos, violaciones, etc. Al estar estos hechos relacionados con la ley es necesario contar con un método sencillo, práctico y confiable para extraer e identificar los metabolitos benzodiazepínicos en muestras de orina por ser la mayor vía de eliminación.

XIV. OBJETIVOS:

A) OBJETIVO GENERAL:

- Optimizar un método de extracción e identificación de metabolitos benzodiazepínicos en muestras de orina para su aplicación práctica.

B) OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

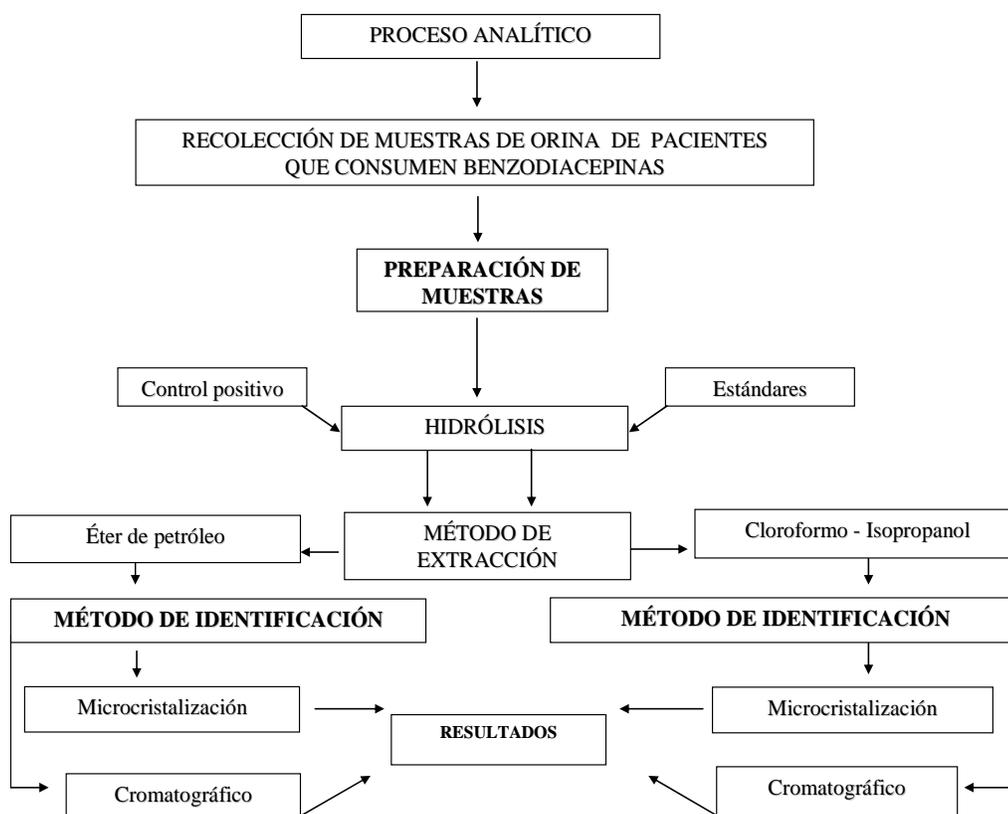
- Realizar la extracción de metabolitos benzodiazepínicos de alprazolám y diazepam en muestras de orina por dos métodos.
- Identificar los metabolitos de alprazolám y diazepam por microcristalización y cromatografía en capa fina.
- Demostrar que los métodos utilizados son útiles y confiables para el diagnóstico e identificación de los metabolitos benzodiazepínicos.
- Obtener controles positivos en animales de experimentación (conejos).

XV. DESCRIPCIÓN DEL AMBIENTE DE ESTUDIO:

El presente trabajo se desarrolló en el Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnostico e Investigación en Salud -- SELADIS --, en el laboratorio de Toxicología, quinto piso; del área fármaco-químico, dependiente de Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la UMSA. Ubicado en la avenida Saavedra, No 2224, Zona Miraflores de la Ciudad de La Paz y en la Universidad Nacional Siglo XX, Carrera de Bioquímica Farmacia. Ubicado en la Departamento de Potosí, Municipio de Llallagua.

XVI. DISEÑO METODOLÓGICO:

A. MODELO TEÓRICO:



B. POBLACIÓN:

Se seleccionaron dos tipos de consumidores: habituales y ocasionales.

Primero: Pacientes del Hospital de Psiquiatría Caja Nacional de Salud y pacientes del Hospital de Clínicas Unidad de Psiquiatría de la ciudad de La Paz. Instituciones grandes que prestan asistencia médica a pacientes que cursan procesos psicopatológicos, como: ansiedad, demencia, trastornos neurológicos, etc. En ambos hospitales los pacientes son tratados con benzodiacepinas y otros fármacos. Lamentablemente no fue posible discriminar cuántos recibían alprazolám y diazepám, por que no se tuvo acceso a todas las historias clínicas.

Segundo: Personas voluntarias que consumen ocasionalmente dichos fármacos de manera selectiva (alprazolám y/o diazepám).

Número de muestras: De 32 pacientes elegidos en ambos grupos de consumidores, se colectó 1 muestra por paciente, haciendo un total de 32 muestras.

C. UNIDAD DE ANALISIS: Orina colectada por las enfermeras de los nosocomios mencionados y por los propios voluntarios.

D. MUESTREO: Para el presente trabajo se realizó un muestreo no probabilístico aleatorio, teniendo cuidado de que la muestra sea representativa para el estudio propuesto.

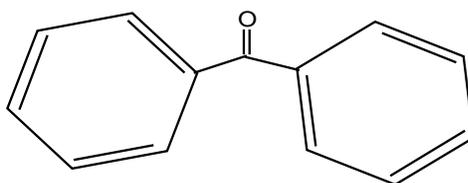
E. TOMA DE MUESTRA: Se recolectaron muestras representativas, primera orina de la mañana, en frascos de plástico limpios y secos, de boca ancha, capacidad de 100 ml, debidamente etiquetadas con: nombre, fecha, número de cama, etc.

En las personas que colaboraron voluntariamente en el presente trabajo se les entregó el frasco con una especificación de cómo coleccionar la muestra.

F. HIDRÓLISIS DE LA MUESTRA:

Por hidrólisis ácida (HCl), las benzodiazepinas presentes en muestras de orina, así como sus metabolitos libres y/o conjugados son transformados en las benzofenonas correspondientes. Estas benzofenonas son extraídas de las matrices de la muestra por medio de los solventes orgánicos (isopropanol-diclorometano, cloroformo-isopropanol o éter de petróleo), previa alcalinización. Después de ser extraídas en sus fracciones ácidas, neutras y básicas, son diferenciadas e identificadas por cromatografía en capa fina y microcristalización¹⁰.

Estructura general de las benzofenonas:

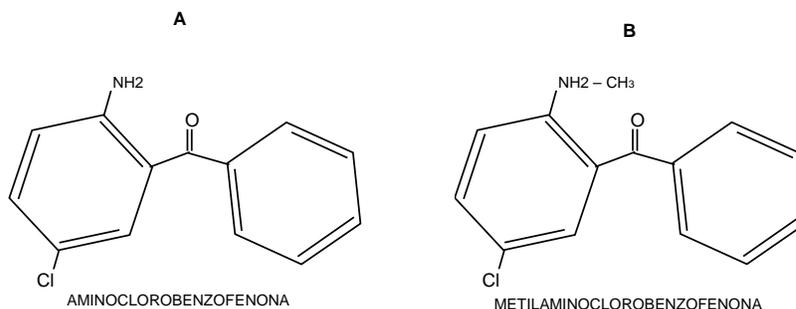


Benzofenonas que se encuentran con mayor frecuencia por análisis cromatográfico.

Benzofenona	Origen
Metilaminocloro-	Diazepám, ketazolám, medazepám, temazepám, camazepám.
Aminocloro-	Oxazepám, diazepám, prazepám, medazepám, ketazolám, camazepám, clordiazepóxido, demoxepám, nordazepám.
Aminodicloro-	Lorazepám, lormetazepám.
Aminoclorofluoro-	flurazepám
Aminonitro-	Nitrazepám
Diamino-	Nitrazepám
Aminonitroclo-	Clonazepám, loprazolám
Metilaminoaminofluoro-	Flunitrazepám

¹⁰ Noirfalise; NOTES DE TRAVAUX PRACTIQUES DE CHIMIE TOXICOLOGIQUE, 1986; presses universitaires de Liege (Bélgica) Pág. 49 – 51.

Benzofenonas originados a partir de la hidrólisis de los metabolitos del diazepám [oxazepám (A) y temazepám (B)].



XVII. MATERIAL Y MÉTODOS:

XVIII. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS:

Materiales	Reactivos	Equipos
Pipetas de 0,2; 5; 10 ml	Éter de petróleo	Baño Maria
Pro-pipeta	Isopropanol	Lámpara de luz UV 254 nm
Gradillas	Diclorometano	Centrífuga
Tubos de ensayo	Cloroformo	Vortex
Tubos tapa rosca de 30 ml	Acetona	Estufa
Embudo	Ácido clorhídrico p.a.	
Cronometro	Hidróxido de sodio p.a.	
Porta objetos	Carbón activo	
Cámara cromatográfica	Placas precubiertas con gel de sílice GF254	
Micro pipetas (microliters)	Patrones de diazepám y alprazolám	
Tubos cónicos de centrífuga de 15 ml	Papel pH de 0 a 14	
Papel filtro	Reactivo de Mayer	
Vidrio de reloj		

XIX. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS Y CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS:

Se utilizaron dos métodos de extracción para determinar el grado de aislamiento o separación de los metabolitos benzodiazepínicos del material biológico (muestras de orina) y elegir el método para luego ser optimizado.

A. PRIMER MÉTODO DE EXTRACCIÓN¹¹:

1. Se toma un tubo de vidrio con tapa rosca de 30 ml, se añaden 5 ml de orina, previamente centrifugada y atemperada a temperatura ambiente, se agregan 0,5 ml de ácido clorhídrico concentrado y se lleva a baño María hirviente por 1 hora.
2. De la misma forma se procede con los controles negativos y positivos. Se añade a una orina blanco o muestra negativa, un volumen de 200 µl de estándar ya preparado de alprazolám, de una concentración de 2µg/ml.
3. Se deja enfriar y se lleva a pH 9 con hidróxido de sodio al 40 %.
4. Se agrega 8 ml de una mezcla de diclorometano-isopropanol (85:15), agitar en vortex durante 10 minutos.
5. Centrifugar para separar las dos fases (orgánica y acuosa).
6. Trasvasar la fase orgánica a un tubo limpio y seco, añadir 3 mg de carbón activo, agitar suavemente, proceder a filtrar tres veces hasta que la solución este límpida libre de partículas de carbón, esto ayudará a que el extracto orgánico esté más cristalino, pero deberá cuidarse que la solución orgánica filtrada no este en contacto con la luz para evitar que la muestra y los controles positivos y negativos tomen nuevamente un color, difícil de eliminar, para esto se recubren los tubos con papel carbónico.

¹¹ AQUA-TOX001 CÓDIGO 11-001.

7. Luego de concluida la filtración se concentra la solución orgánica a sequedad y el residuo se reconstituye con 0,5 ml de cloroformo-isopropanol (90:10) para la siembra en placas cromatográficas.

B. SEGUNDO MÉTODO DE EXTRACCIÓN¹²:

1. Se mezclan 3 ml de ácido clorhídrico concentrado y 10 ml de muestra, de la misma forma el control positivo en un tubo de vidrio de 30 ml de capacidad con tapón.
2. Se coloca bajo campana en agua hirviente durante 30 minutos.
3. Se enfría y agregar 10 ml de éter de petróleo, previa alcalinización con hidróxido de sodio al 2 N, tapan el tubo y rotan cuidadosamente durante 10 minutos.
4. Centrifugar 5 minutos y transferir la capa superior orgánica a un tubo limpio.
5. Evaporar el extracto a sequedad bajo una corriente de aire a 60°.
6. Reconstituir con 100 µl de éter de petróleo para la posterior siembra en las placas cromatográficas.

XX. CONTROLES POSITIVOS:

Al no contar con los controles positivos de los metabolitos del diazepam (oxazepam y temazepam) que se excretan por orina se obtuvieron a partir de muestras de orina de conejos, previa administración de diazepam en dicho animal.

¹² MONOGRAFÍAS - ANALITOS Y TÉCNICAS TOXICOLÓGICAS.
http://www.msal.gov.ar/htm/site/pdf/Monografia_AC.pdf#search=%22benzodiazepinas%20y%20benzofenonas%20%22

1. PROCESO DE OBTENCIÓN DE CONTROLES POSITIVOS (METABOLITOS DE DIAZEPÁM):

Los animales de experimentación (4 conejos) fueron sometidos a una dieta estricta, con un solo tipo de alimento (zanahoria) y agua, durante una semana, con fines de eliminar las interferencias provenientes de la degradación y metabolismo de otros tipos de sustancias alimenticias.

Pasada la primera etapa se procede a la recolección de una muestra de orina de cada conejo antes de administrar el fármaco, que se constituye en el control negativo. Esta recolección duró 24 hrs. obteniéndose un volumen total de 20 ml de orina de cada animal. Luego se administró diazepam (ampolla de 10 mg – vol. 2 ml) en una concentración de 2,5 mg – vol. 0,5 ml, vía intramuscular cada 6 horas durante 2 días. En el transcurso de este tiempo se fue recolectando las muestras de control positivo en frascos de vidrios limpios y secos con capacidad de 50 ml. Llenos los frascos inmediatamente fueron sometidos a congelación para evitar la contaminación y el desarrollo bacteriano y degradación de los metabolitos benzodiazepínicos presentes en muestras de orina de conejos.

Obtenidas los controles positivos y negativos se procede a la extracción e identificación de presencia de los metabolitos del diazepam (oxazepam y temazepam). De la misma manera como se explica en los apartados de extracción e identificación (método 1 y 2).

XXI. IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS:

1. MICROCRISTALIZACIÓN: La microcristalización es una de las pruebas más antiguas, más simples y sensibles usadas en toxicología, aunque hoy en día

ha sido sustituido por métodos instrumentales, aun tiene valor como ensayo preliminar (screening).

1.1. Fundamento: En su forma mas simple la prueba consiste en eliminar el agua de una solución de prueba (muestra) por evaporación, esto hará que la solución se haga más saturada y concentrada cuando se pone en contacto con un reactivo (reactivo de Mayer) dando lugar a la formación de micro-cristales del derivado en forma de máscara sobre un porta objetos. La reacción del reactivo de Mayer con los metabolitos benzodiazepínicos (o benzofenonas) producen sales complejas por la reacción de los grupos amino (por lo general nitrógenos secundarios o terciarias) con el mercurio y átomos de oxígeno, formando un precipitado amarillento que poco a poco se vuelve blanco-amarillento, que llega a cristalizar sobre el portaobjetos después de 24 o 48 hrs.

Los microcristales formados de la solución de prueba o muestra, serán comparados en microscopio, con aquellos cristales microscópicos formados cuando el mismo reactivo es mezclado con una solución de sustancia conocida (estándares o muestra control positivo), procesadas de la misma forma y en las mismas condiciones que la muestra¹³.

1.2. Procedimiento:

Parte de la fase orgánica obtenida después de la concentración de las muestras y control positivo y negativo provenientes de la última etapa de los métodos de extracción (1 y 2). Se lleva a un tubo de hemólisis, un volumen de 150 µl de la fase orgánica y se mezcla con 150 µl de reactivo de Mayer. De la misma solución se toma 1 gota y se la deposita en un porta objetos, con su respectiva

¹³ E.G.G Clarke; ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS IN FARMACEUTICALS BODY FLUIDS AND POST-MORTEN MATERIAL, The Pharmaceutical Press, London 1975 vol.1 – 2 Pag, 43.

identificación, extender y dejar reposar 1 hr. y 30 min. sin recubrir con cubreobjetos. Observados por el microscopio se verán cristales en forma de rosetas irregulares (anexo: figura n° 5).

2. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE ADSORCIÓN:

Fundamento: La cromatografía de adsorción es un método fisicoquímico basado en la separación de los componentes de una mezcla por migración diferencial, de acuerdo a distintos mecanismos, en dos fases inmiscibles, una de las fases que es líquida es la fase móvil (FM) y la otra que es sólida es la fase estacionaria (FE). Los componentes de la mezcla a separar invierten un tiempo diferente en recorrer cada una de las fases, con lo que se produce la separación. Si un componente está la mayor parte del tiempo en la fase móvil el producto se mueve rápidamente, mientras que si se encuentra la mayor parte en la fase estacionaria, el producto queda retenido y su salida es mucho más lenta^{14 15}.

2.2. Procedimiento:

Fase estacionaria: placas precubiertas con gel de sílice GF254

Fase móvil: Cloroformo-acetona (4:1).

Revelador: Lámpara de luz ultravioleta 254 nm.

Se siguieron los siguientes pasos:

1. En una placa recubierta con sílica gel GF254, mediante un capilar de vidrio se siembra a 1 cm. del borde inferior las muestras y controles disueltos en cloroformo-isopropanol (90:10), de la misma forma para el éter de petróleo.

¹⁴ W.G. Thomas; CLARKES ISOLATION AND IDENTIFICATION DRUGS. The pharmaceutical Society of department of pharmaceutical Society of Great Britain, editorial staff. Lóndon 1986. Pág. 160.

¹⁵ Domínguez S. Xorge Alejandro , CROMATOGRAFÍA EN PAPEL Y EN CAPA DELGADA, Programa Regional de Desarrollo Científico Tecnológico Departamento de asuntos científicos Secretaría general de la OEA, monografía N° 16, Ed. EVA V. "Chesneau", México 1975; Pág. 7; 9; 35.

2. Se introduce la placa cromatográfica en la cámara previamente saturada con la FM durante 24 hrs.
3. Se cierra la cámara y dejando que la FM haga por capilaridad 10 cm. de distancia del punto de siembra, sacar la placa y marcar la altura recorrida del solvente con la ayuda de un lápiz de grafito.
4. Se revela la placa bajo una lámpara de luz ultravioleta de 254 nm de longitud de onda para observar y marcar la fracción de los metabolitos separados (anexo, figura 9 - 10), donde se encuentran los puntos (identificación de los metabolitos y controles positivos).
5. Se realiza la medición de recorrido de cada metabolito y se calcula su Rf.

Observar flujo grama de extracción e identificación de los metabolitos.

XXII. RESULTADOS:

1. En el presente estudio se ha logrado la extracción e identificación de los metabolitos benzodiazepínicos en la mayoría de las muestras analizadas y la optimización de uno de los métodos de extracción (método 1), el cual se verifica mediante CCF (figura n° 9).
2. En los ensayos de microcristalización se observó que del 100% (32) de las muestras analizadas, el 75% (24) resultaron ser positivas con ambos métodos de extracción (ver tabla 1), presentando los microcristales típicos de metabolitos benzodiazepínicos (anexo, figura n° 5).

PROCOLO PARA EXTRAER LOS METABOLITOS BENZODIACEPÍNICOS EN MUESTRAS DE ORINA

Método de Extracción 1

En un tubo con tapa rosca (c.s.p. 30ml) añadir 5 ml de orina centrifugada más 0,5ml de HCl p.a.

Hidrólisis 1Hr. (ebullición)

Enfriar llevar a pH 9 con OHNA 40%

Agregar 8ml de Diclorometano-isopropanol (85:15)

Agitar en vortex 10 minutos

Centrifugar 5 minutos

Descartar la fase acuosa

Añadir 3 mg de carbón activo (mezclar)

Filtrar 3 veces en tubos de ensayo cubiertos con papel carbónico

Evaporar a sequedad el solvente orgánico

El residuo solubilizar con 0,5ml cloroformo-isopropanol (90:10)

Método de Extracción 2

En un tubo con tapa rosca de 30ml añadir 10 ml de orina más 3ml de HCl p.a.

Hidrólisis 30 minutos (ebullición)

Enfriar y alcalinizar con OHNa 2N

Agregar 10ml de éter de petróleo

Agitar en vortex 10 minut.

Centrifugar 5 minutos

La fase orgánica transferir a un tubo de vidrio

Evaporar a sequedad el solvente orgánico

Reconstituir el residuo con 100 ul de éter de petróleo

IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS BENZODIACEPÍNICOS

Cromatografía en capa fina

En una placa cromatográfica sembrar a 1 cm. del borde inferior los metabolitos (muestras y controles) extraídos en cloroformo-isopropanol.

Introducir a la cámara cromatográfica, cerrar y dejar que hacienda la fase móvil por capilaridad (FM: cloroformo: acetona [4:1]), hasta 10 cm. de altura

Secar y revelar bajo lámpara de luz UV de 254 nm,

Marcar la fracción de los metabolitos

Medir los Rfs

Microcristalización

Mezclar 150 µl de extracto orgánico con 150 µl de reactivo de Mayer en un tubo de hemólisis, sobre un portaobjetos depositar una gota de la mezcla, extender y dejar reposar 1hr y 30minut.

Observar en microscodidio

RESULTADOS

Cromatografía en capa fina

En una placa cromatográfica sembrar a 1 cm. del borde inferior los metabolitos (muestras y controles) extraídos en éter de petróleo

Introducir a la cámara cromatográfica, cerrar y dejar que hacienda la fase móvil por capilaridad (FM: cloroformo: acetona [4:1]), hasta 10 cm. de altura

Secar y revelar bajo lámpara de luz UV de 254 nm,

Marcar la fracción de los metabolitos

Medir los Rfs

RESULTADOS

RESULTADOS

TABLA I

MUESTRAS IDENTIFICADAS POR MICROCRISTALIZACIÓN CON AMBOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

SUSTANCIAS ANALIZADAS	MÉTODO DE EXTRACCIÓN				
	Diclorometano-isopropanol (MÉTODO 1)		Éter de petróleo (MÉTODO 2)		
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	TOTAL
ESTÁNDARES					
C (-)		0		0	
C (+)	+		+		
C (+) A	+		+		
C (+) D	+		+		
MUESTRAS					
1	+		+		1
2	+		+		1
3	+		+		1
4		0		0	
5	+		+		1
6		0		0	
7		0		0	
8	+		+		1
9		0		0	
10	+		+		1
11	+		+		1
12	+		+		1
13	+		+		1
14	+		+		1
15		0		0	
16	+		+		1
17	+		+		1
18	+		+		1
19	+		+		1
20	+		+		1
21	+		+		1
22	+		+		1
23		0		0	
24	+		+		1
25	+		+		1
26	+		+		1
27	+		+		1
28		0		0	
29	+		+		1
30		0		0	
31	+		+		1
32	+		+		1
TOTAL (100%)	75%	25%	75%	25%	

Es necesario señalar que por micro-cristalización no se logra diferenciar los microcristales formados de los metabolitos de diazepam (oxazepam y temazepam) y alprazolam, como de otras benzodiazepinas libres o conjugadas; los cuales observados al microscopio son idénticos.

3. Por el método de cromatografía en capa fina se logró identificar y diferenciar las sustancias estudiadas, (tabla II). Correspondiendo el 40% a metabolitos de diazepam (oxazepam y temazepam) y 35% a metabolitos de alprazolam (tabla III); [figura anexo 11 - 12], siendo el resto negativos.

TABLA II

VALORES DE RF OBTENIDOS EN CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA
[FASE MÓVIL: CLOROFORMO: ACETONA (4:1)] CON LOS DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y SOLVENTES ORGÁNICOS UTILIZADOS

MÉTODO DE EXTRACCIÓN									
Sustancia Analizada	(método 1) CLOROFORMO-ISOPROPANOL				(método 2) ÉTER DE PETRÓLEO				Total de metab. encontrados
	Rf de oxazepam	Rf de temazepam	Rf de alprazolam	Rf de diazepam	Rf de oxazepam	Rf de temazepam	Rf de alprazolam	Rf de diazepam	
Estándares y controles positivos y negativo									
C (-)	--	--	--	--	--	--	--	--	
C (+)	0,20	0,50	0,074	0,75	--	--	--	--	
C (+) A	--	--	0,074	--	--	--	--	--	
C (+) D	--	--	--	0,75	--	--	--	--	
Muestras									
1.	0,20	0,50	--	--	--	--	--	--	2
2.	0,20	--	--	--	--	--	--	--	1
3.	--	--	0,075	--	--	--	--	--	1
4.	--	--	--	--	--	--	--	--	0
5.	0,20	0,50	--	--	--	--	--	--	2
6.	--	--	--	--	--	--	--	--	0
7.	--	--	--	--	--	--	--	--	0
8.	0,20	0,50	--	--	--	--	--	--	2
9.	--	--	--	--	--	--	--	--	0
10.	--	--	0,073	--	--	--	--	--	1
11.	0,20	0,50	--	--	--	--	--	--	2
12.	--	--	0,074	--	--	--	--	--	1
13.	0,21	--	--	--	--	--	--	--	1
14.	--	--	0,072	--	--	--	--	--	1
15.	--	0,50	--	--	--	--	--	--	1
16.	--	--	0,073	--	--	--	--	--	1
17.	0,20	0,51	--	--	--	--	--	--	2
18.	0,20	0,50	--	--	--	--	--	--	2
19.	0,21	--	--	--	--	--	--	--	1
20.	--	--	--	--	--	--	--	--	0
21.	--	--	0,072	--	--	--	--	--	1
22.	--	--	0,073	--	--	--	--	--	1
23.	--	--	--	--	--	--	--	--	0
24.	0,20	0,50	--	--	--	--	--	--	2
25.	--	--	0,073	--	--	--	--	--	1
26.	0,20	--	--	--	--	--	--	--	1
27.	--	--	0,074	--	--	--	--	--	1
28.	--	--	--	--	--	--	--	--	0
29.	--	--	0,073	--	--	--	--	--	1
30.	--	--	--	--	--	--	--	--	0
31.	--	--	0,073	--	--	--	--	--	1
32.	--	0,50	--	--	--	--	--	--	1

C+ = muestras de orina de conejo con metabolitos de diazepam.; C+A = muestra control positivo de alprazolam; C+D = muestra control positivo de diazepam p.a.

TABLA III

RELACIÓN DE METABOLITOS ENCONTRADO DE ALPRAZOLÁM Y DIAZEPÁM SEGÚN MÉTODO CROMATOGRÁFICO

	Porcentaje
Positivos para diazepám	40,6
Positivos para alprazolám	34,3
Muestras negativas	25
TOTAL nº 32	100,00

Del total de muestras que presentaban metabolitos de diazepám, 54 % contenían los dos metabolitos de dicho fármaco, en el 31% solo se observa oxazepám y en el 15% restante temazepám (tabla IV).

TABLA IV

RELACIÓN DE OXAZEPÁM Y TEMAZEPÁM SEGÚN MUESTRAS POSITIVAS PARA DIAZEPÁM ENCONTRADAS EN CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Metabolitos identificados	Porcentaje
Oxazepám - temazepám	54
Oxazepám	30,7
Temazepám	15,3
Total nº 13	100,00

En la corrida cromatográfica de los extractos del método 2, no se observa la separación de ningún metabolito (anexo figura 8), lo cual nos demuestra que el solvente utilizado (éter de petróleo) no es apropiado para la extracción de dichos metabolitos.

XXIII. CÁLCULO ESTADÍSTICO:

C.1. Test de Ji-Cuadrado:

Haciendo una comparación entre los dos métodos de extracción 1 y 2, se obtuvieron los siguientes resultados como se observa en la tabla A. De modo que la frecuencia esperada era: que el 50% (16) o más de las muestras analizadas fueran positivas, como se indica en la tabla B. A favor de un método a nivel de significación de 0.01. Contrastemos la hipótesis, a) existe diferencia entre los dos métodos; b) el método **1** es el elegido?.

Tabla A
Frecuencias observadas

Tabla B
Frecuencias esperadas

	Positivos	Negativos	total
Método 1	16	16	32
Método 2	16	16	32
Total	32	32	64

1) Uniendo tabla A y B (trabajando por separado).

	Método 1			Método 2		
	positivos	negativos	total	Positivos	Negativos	Total
Frecuencias observadas	24	8	32	0	32	32
Frecuencias esperadas (μ)	16	16	32	16	16	32
Total	40	24	64	16	48	64

2) Calculado la distribución teórica.

	MÉTODO 1			MÉTODO 2		
	Positivos	Negativos	total	Positivos	Negativos	Total
PROPORCIONES	0,625	0,375	1,00	0,25	0,75	1,00
%	62,5	37,5	100	25	75	100

3) Aplicar las proporciones a las dos muestras, luego emplear la formula:

$$\text{Calculado} = [40/64] * 32 = 20$$

$$\chi^2 = \frac{(O_1 - e_1)^2}{e_1} + \frac{(O_2 - e_2)^2}{e_2} + \dots + \frac{(O_k - e_k)^2}{e_k} = \sum_{j=1}^k \frac{(O_j - e_j)^2}{e_j}$$

a) Para frecuencia observada.

	Método 1			Método 2		
	positivos	negativos	total	Positivos	Negativos	Total
Calculado	20	12	32	8	24	32
observado	24	8	32	0	32	32
$(O_1 - e_1)^2$	16	16		64,00	64	

$\frac{(O_1 - e_2)^2}{e_1}$	0,8	1,33	2,13	8	2,66	10,66
-----------------------------	-----	------	------	---	------	-------

b) Para frecuencia esperada.

	Método 1			Método 2		
	positivos	negativos	total	Positivos	Negativos	Total
Calculado	20	12	32	8	24	32
observado	16	16	32	16	16	32
$(O_1 - e_2)^2$	16	16		64,00	64	
$\frac{(O_1 - e_2)^2}{e_1}$	0,8	1,33	2,13	8	2,66	10,66

Donde:

$$\chi_o^2 = \sum_{j=1}^k \frac{(O_j - e_j)^2}{e_j}$$

	Método 1	Método 2
$\sum \chi_o^2 (Fo-Fe)$	2.13 + 2.13 = 4,26	10,66 + 10,66 =21,32

Para determinar el número de grados de libertad (ν) consideramos entre los positivos y negativos para cada método y utilizamos la siguiente fórmula.

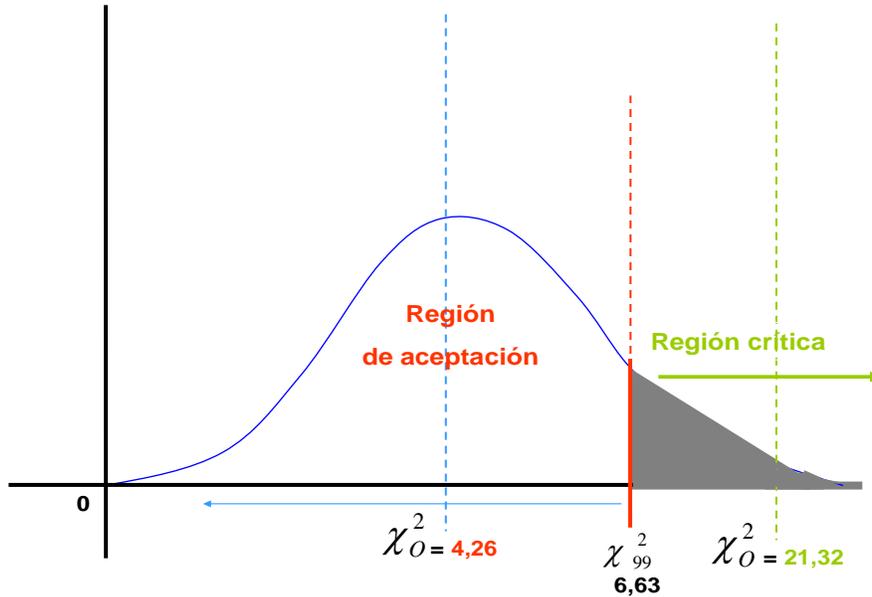
$$\begin{aligned} \nu &= (K - 1) (K - 1) \\ \nu &= (2 - 1) (2 - 1) = 1 \end{aligned}$$

Donde se tiene 1 grado de libertad, interpolando en la tabla de distribución χ_{99}^2 (anexo; cuadro 3), con probabilidad de 0,01 y un grado de libertad, el valor de χ_{99}^2 es 6,63 el cual se utilizará para ambos métodos de extracción **1** y **2**.

Interpretación:

a) Existe una diferencia significativa entre las frecuencias observadas, de los métodos de extracción por los resultados dados en χ_o^2 (ji-cuadrado observada).

b) El valor crítico χ_{99}^2 para 1 grado de libertad es 6,63. Así, como $\chi_o^2 = 4,26$ es $<$ 6,63, no podemos rechazar que el método **1** es bueno a nivel de significación de 0,01.



C.2. Ahora veamos si el método **1** es adecuado para extraer e identificar los metabolitos benzodiazepínicos según la teoría estadística de las decisiones, mediante contraste de medias y proporciones usando distribuciones normales.

Como de 32 muestras de orina, por método **1**, se encontró que en 24 de ellas contenían los correspondientes metabolitos benzodiazepínicos y con el se extrajo y se identifico por CCF 24 muestras positivas correctamente. Determinemos si el resultado es significativo y que el método es confiable, a nivel de significación de: a) 0,05; b) 0,01 y c) cuanto de error probable podríamos tener.

Si p es la probabilidad de que el método **1** es bueno y los resultados son significativos. De modo que hay que decidir entre dos hipótesis.

- H_0 $p \leq 0,05$. El método **1** y el resultado no son significativos.

- $H_1 \ p \geq 0,05$. El método **1** y el resultado son significativos.

Como estamos interesados de que el método **1** es bueno y los resultados son significativos, escogemos un contraste de una cola. Si la H_0 es verdadera, la media (μ) y la desviación típica (σ) vienen dadas, por:

$$\begin{array}{lll} \mu = Np & q = 1 - p & \sigma = \sqrt{Npq} \\ \mu = 32 * 0,5 = 16 & p = 0,5 & \sigma = \sqrt{32 * 0,5 * 0,5} \\ & q = 1 - 0,5 = 0,5 & \sigma = 2,83 \end{array}$$

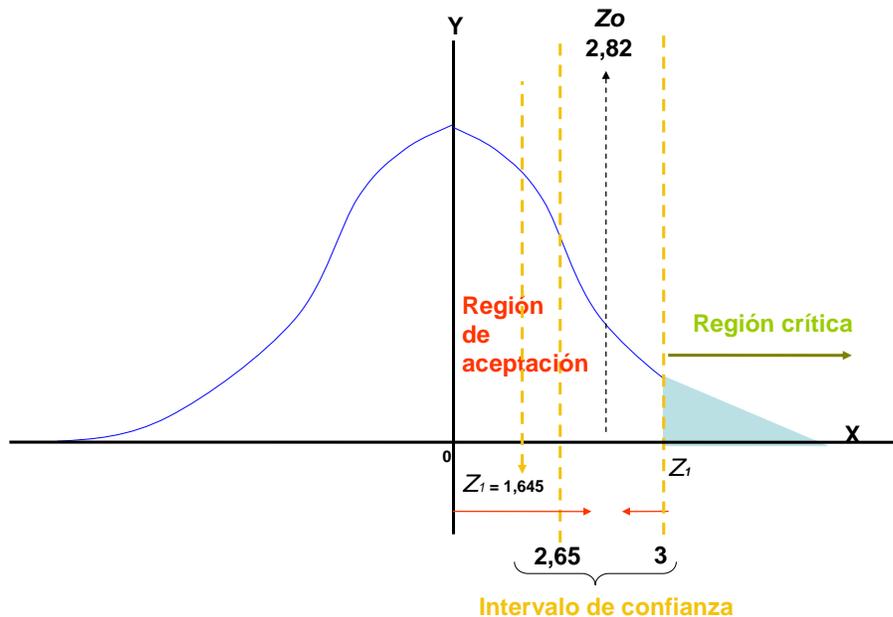
- a) Para un contraste unilateral, al nivel de significación 0,05; debemos tomar Z_1 : como se observa en la figura 2, de modo que el área entre 0 y Z_1 es de 0,4500, y su valor es 1,645 (anexo tabla 1), luego nuestra regla de decisión o contraste de significación es:

Si el valor de Z observado (Z_0) es mayor que $Z_1 = 1,645$, el resultado es significativo y el método **1** es bueno, a nivel de significación de 0,05. En caso contrario los resultados y el método **1** no son válidos.

Como existen 24 muestras positivas en unidades estándar, tenemos:

$$Z_0 = \frac{N - \mu}{\sigma} \qquad Z_0 = \frac{24 - 16}{2,83} = 2,82$$

Figura 2



Entonces decimos que como $Z_0 = 2,82 > Z_1 = 1,645$, concluimos que al nivel de 0,05, el método es válido y el resultado es significativo.

b) A nivel de significación de 0,01 el área entre 0 y Z_1 es 0,4900, y el valor de $Z_1 = 2,33$. Como $2,8 > 2,33$ hacemos una idéntica conclusión que (a).

c) Como los niveles de significación y el intervalo de confianza nos sirven de guía al tomar la decisión en el problema. Diríamos que sobre la base del estudio, la probabilidad en equivocarnos al concluir que el método **1** es bueno y los resultados son significativos es de alrededor de un 5%. La probabilidad obtenida en este caso es de 0,059; que lo llamaremos nivel de significación experimental.

$$O/ = \frac{(2.82 - 2.33) \times 0,6745}{\sqrt{32 - 1}} = 0,0593$$

$$O/ = 0,0593 \times 100 = 5,93 = 5\%$$

(O/) probabilidad de error.

XXIV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:

En el presente estudio se tuvo acceso a una población limitada de consumidores de tranquilizantes benzodiazepínicos: 32, de los cuales 21 eran de pacientes internados de las unidades de psiquiatría de la Caja Nacional de Salud y del Hospital de Clínicas, que hemos denominado consumidores habituales y 11 consumidores ocasionales (pacientes ambulatorios).

El 75% de muestras analizadas fueron positivas, encontrándose los metabolitos benzodiazepínicos de alprazolám y diazepam con el primer método de extracción que se usa en el laboratorio (PNO: AQA-TOX001; CÓDIGO 11-001) e identificadas por CCF y microcristalización.

Se demuestra que el método utilizado es sencillo, práctico, accesible, útil y confiable para extraer e identificar los metabolitos benzodiazepínicos y estadísticamente aceptable con grado de error de 5%.

No existiendo en el comercio los controles positivos de los metabolitos excretados después de la ingestión de diazepam (temazepam y oxazepam) se logró un método para su obtención, empleando conejos, lo cual redundó en la correcta identificación de estos metabolitos en las muestras analizadas.

Con las modificaciones incorporadas se optimizó el método 1, mejorando su eficiencia (anexo, figura 8 - 9):

- Para la obtención de extractos más limpios y con menor número de interferencias endógenas agitar la muestra y centrifugar antes de realizar la hidrólisis.

- Para evitar la presencia de colorantes interferentes filtrar la fase orgánica con carbón activo protegiendo de la luz.

Es necesario señalar que por micro-cristalización no se puede distinguir los microcristales formados de alprazolám, diazepám y de los metabolitos de oxazepám y temazepám y de otras benzodiazepinas libres o conjugadas; los cuales observados al microscopio son iguales. De tal manera podríamos decir que es una prueba de empleo limitado en toxicología; y considerada como una prueba inadecuada o como un método primario de identificación de un compuesto desconocido. Su verdadero valor está como medio confirmatorio después de utilizar la cromatografía en capa fina, de gases o por métodos espectrofotométricos (UV, IR, de masas, etc.), u otros métodos existentes para identificar benzodiazepinas y sus respectivos metabolitos.

Debemos hacer notar que estos resultados están limitados por el número de muestras (32). Sin embargo estamos demostrando, que el método **1** es eficaz y confiable y podríamos verificarlo con absoluta certeza aplicándolo en grupos mayores.

XXV. RECOMENDACIONES:

48

Es importante tener en cuenta que para realizar un análisis de metabolitos benzodiazepínicos en muestras de orina, se debe conocer la solubilidad; el metabolismo de cada benzodiazepina y contar con los materiales y equipos necesarios, así como también de sustancias de referencia metabolitos de diazepám (oxazepám y temazepám) alprazolám o controles positivos, con el fin de obtener resultados precisos y confiables; y evitar una pérdida innecesaria de esfuerzo, de tiempo y de recursos económicos.

Estudiado los efectos adversos y toxicidad de las benzodiacepinas, especialmente la crónica, en personas o pacientes que consumen asiduamente, se recomienda a los profesionales médicos, administrar aquellas benzodiacepinas, que no sufran una biotransformación lenta a nivel hepático, como los siguientes alprazolám, oxazepám, temazepám, triazolám, etc., con el fin de evitar la acumulación y los efectos colaterales de estos fármacos en el paciente.

XXVI. BIBLIOGRAFIA

1: LITTER, Manuel: COMPENDIO DE FARMACOLOGÍA; 6ª Ed, Buenos Aires-Argentina 2001. Ed. Ateneo, Pág. 111-113, 129 - 134, 145 – 147.

2: Goodman & Gillman, LAS BASES FARMACOLÓGICAS DE LA TERAPÉUTICA, 8ª edición Ed. Interamericana - México 1996, Vo: 1; Pág. 395 al 398.

3: BENZODIACEPINAS,
www.abcmedicus.com/articulo/medicos/id/246/pagina/1/benzodiacepinas.html.

4: A. Velazco Martín, FARMACOLOGÍA BÁSICA CLÍNICA, 16ª edición, Madrid-España 1992, Ed. Interamericana – MC Graw-Hill; Pág. 318 – 334.

- 5: BENZODIACEPINAS: MECANISMO DE ACCIÓN,
<http://www.benzo.org.uk/espman/bzcha01.htm>.
- 6: Consideraciones generales Ansiolíticos, sedantes e hipnóticos.
html.rincondelvago.com/ansioliticos-sedantes-e-hipnoticos.html.
- 7: Ministerio de Salud y Previsión Social Dirección General de Servicios de Salud Unidad de Medicamentos Laboratorios y Bancos de Sangre, LISTA DE MEDICAMENTOS CONTROLADOS, UNIMED. ED.5ª, Vol. 10 La Paz 2002.
- 8: Intoxicación por benzodiazepinas;
www.fepafem.org.ve/Guias_de_Urgencias/Intoxicaciones/Intoxicacion_por_benzodiazepinas.
- 9: Desintoxicación Tranquilizantes Benzodiazepinas Tratamiento Contra ...
www.tavad.com/desintoxicacion-tranquilizantes.htm.
- 10: Noirfalise; NOTES DE TRAVAUX PRACTIQUES DE CHIMIE TOXICOLOGIQUE, 1986; presses universitaires de Liege (Bélgica) Pág. 49 – 51.
- 11: AQA-TOX001 CÓDIGO 11-001.
- 12: MONOGRAFÍAS - ANALITOS Y TÉCNICAS TOXICOLÓGICAS,
http://www.msal.gov.ar/htm/site/pdf/Monografia_AC.pdf#search=%22benzodiazepinas%20y%20benzofenonas%20%22.
- 13: E.G.G Clarke; ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS IN FARMACEUTICALS BODY FLUIDS AND POST-MORTEN MATERIAL, The Pharmaceutical Press, London 1975 vol.1 – 2. Pag. 43, 135, 142, 294, 331, 443, 631, 697, 922.
- 14: W.G. Thomas; CLARKES ISOLATION AND IDENTIFICATION DRUGS. The pharmaceutical Society of department of pharmaceutical Society of Great Britain, editorial staff. Lóndon 1986. Pág. 160, 277, 331, 630, 815, 915, 1001.
- 15: Domínguez S. Xorge Alejandro , CROMATOGRAFÍA EN PAPEL Y EN CAPA DELGADA, Programa Regional de Desarrollo Científico Tecnológico Departamento de asuntos científicos Secretaria general de la OEA, monografía N° 16, Ed. EVA V. "Chesneau", México 1975; Pág. 7; 9; 35-67.
- 16: Iriarte Sanabria E. Cecilia; Diazepam una droga de abuso, tesis para optar al título de licenciatura, La Paz 1998.
- 17: Morales Flores Fanny Esther. Determinar la presencia de metabolito de diazepam (oxazepam) en muestras de orina de pacientes internados en el servicio de ginecología del Hospital Obrero CNS, tesis para optar al título de licenciatura La Paz 2001.

ANEXOS

I) PREPARACION DE REACTIVOS:

52

Reactivos de Mayer:

- a) Pesar 1,36mg de Cl_2Hg , disolver en 60 ml de H_2O destilado.
- b) Pesar 5 g. de KI y disolver en 10 ml de H_2O destilada.
- c) Mezclar ambas soluciones y enrazar a 100 ml de H_2O destilada.

HCL 0,1N: Con la ayuda de una pipeta medir un volumen de 0,83 ml de HCl p.a. llevar a matraz con 50 ml de H₂O destilada mezclar y enrazar a 100ml con H₂O destilada.

Na OH 40%: pesar 20 g de OHNa p.a. Diluir con 50 ml de H₂O destilada en un vaso de precipitado.

II) CUADROS ESTADISTICOS.

Cuado 1

CONTRASTES DE UNA Y DE DOS COLAS

Valores críticos de z para contrastes de una y dos colas en varios niveles de significación.

Nivel de significación	0,10	0,05	0,01	0,005	0,002
Valores críticos de z para tests unilaterales	-1,28 o 1,28	-1,645 o 1,645	-2,33 o 2,33	-2,58 o 2,58	-2,88 o 2,88
Valores críticos de z para tests bilaterales	-1,645 y 1,645	-1,96 y 1,96	-2,58 y 2,58	-2,81 y 2,81	-3,08 y 3,08

Cuadro 2

Estimaciones de intervalo de confianza

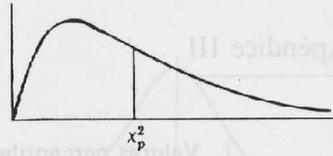
Muestra los valores de z_c correspondientes a niveles de confianza usados en la práctica.

Nivel de confianza	99,73%	99%	98%	96%	95,45%	95%	90%	80%	68,27%	50%
z_c	3,00	2,58	2,33	2,05	2,00	1,96	1,645	1,28	1,00	0,6745

Cuadro 3

Apéndice IV

Valores percentiles (χ_p^2) para la distribución ji-cuadrado con v grados de libertad (área en sombra = p)

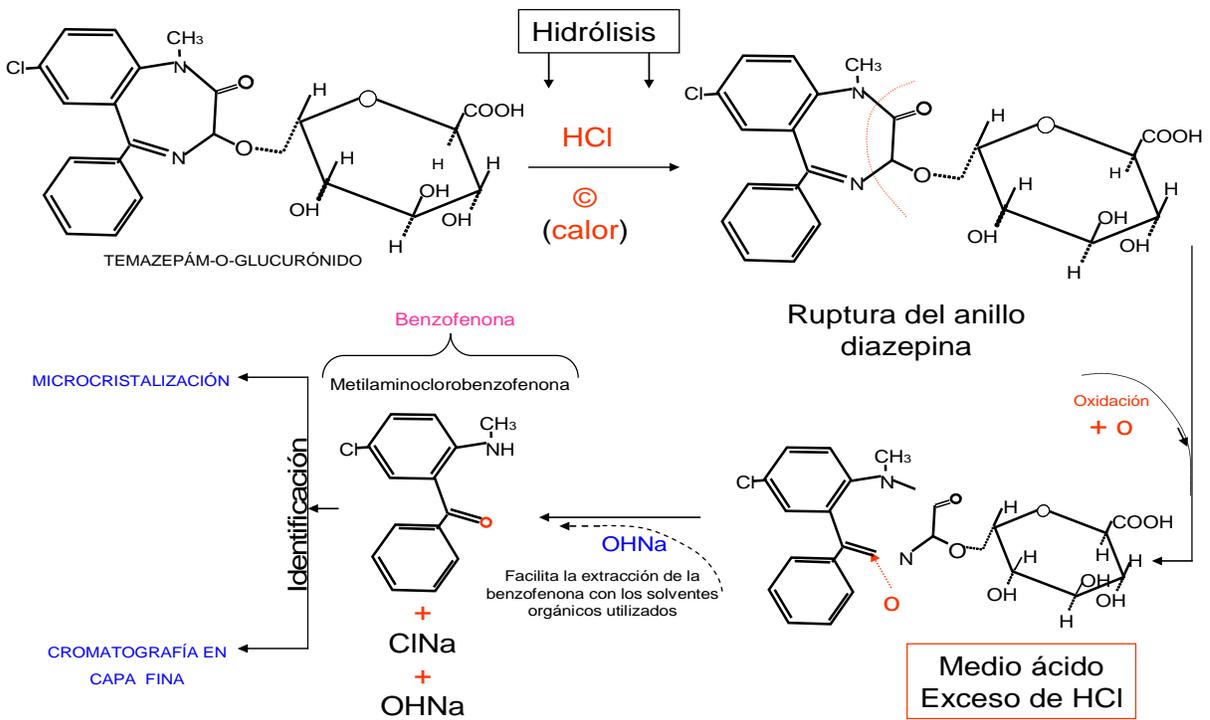
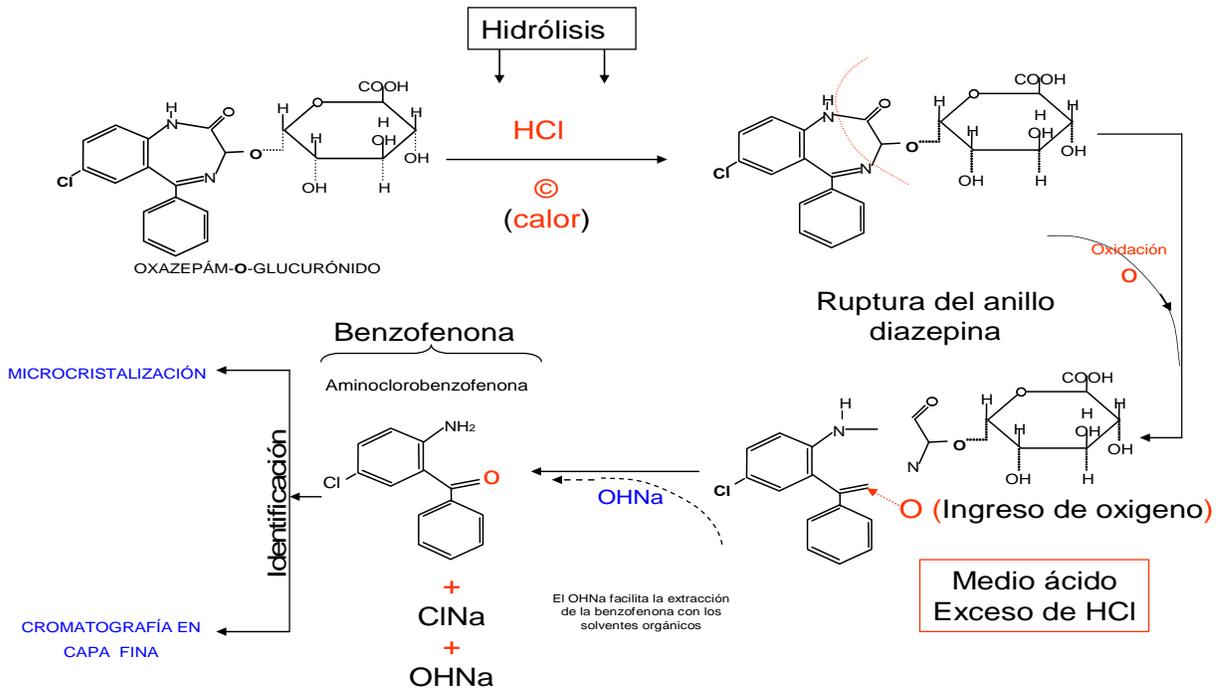


v	$\chi_{.995}^2$	$\chi_{.99}^2$	$\chi_{.975}^2$	$\chi_{.95}^2$	$\chi_{.90}^2$	$\chi_{.85}^2$	$\chi_{.80}^2$	$\chi_{.75}^2$	$\chi_{.70}^2$	$\chi_{.65}^2$	$\chi_{.60}^2$	$\chi_{.55}^2$	$\chi_{.50}^2$	$\chi_{.45}^2$	$\chi_{.40}^2$	$\chi_{.35}^2$	$\chi_{.30}^2$	$\chi_{.25}^2$	$\chi_{.20}^2$	$\chi_{.15}^2$	$\chi_{.10}^2$	$\chi_{.05}^2$	$\chi_{.025}^2$	$\chi_{.01}^2$	$\chi_{.005}^2$
1	7.88	6.63	5.02	3.84	2.71	1.32	.455	.102	.0158	.0039	.0010	.0002	.0000												
2	10.6	9.21	7.38	5.99	4.61	2.77	1.39	.575	.211	.103	.0506	.0201	.0100												
3	12.8	11.3	9.35	7.81	6.25	4.11	2.37	1.21	.584	.352	.216	.115	.072												
4	14.9	13.3	11.1	9.49	7.78	5.39	3.36	1.92	1.06	.711	.484	.297	.207												
5	16.7	15.1	12.8	11.1	9.24	6.63	4.35	2.67	1.61	1.15	.831	.554	.412												
6	18.5	16.8	14.4	12.6	10.6	7.84	5.35	3.45	2.20	1.64	1.24	.872	.676												
7	20.3	18.5	16.0	14.1	12.0	9.04	6.35	4.25	2.83	2.17	1.69	1.24	.989												
8	22.0	20.1	17.5	15.5	13.4	10.2	7.34	5.07	3.49	2.73	2.18	1.65	1.34												
9	23.6	21.7	19.0	16.9	14.7	11.4	8.34	5.90	4.17	3.33	2.70	2.09	1.73												
10	25.2	23.2	20.5	18.3	16.0	12.5	9.34	6.74	4.87	3.94	3.25	2.56	2.16												
11	26.8	24.7	21.9	19.7	17.3	13.7	10.3	7.58	5.58	4.57	3.82	3.05	2.60												
12	28.3	26.2	23.3	21.0	18.5	14.8	11.3	8.44	6.30	5.23	4.40	3.57	3.07												
13	29.8	27.7	24.7	22.4	19.8	16.0	12.3	9.30	7.04	5.89	5.01	4.11	3.57												
14	31.3	29.1	26.1	23.7	21.1	17.1	13.3	10.2	7.79	6.57	5.63	4.66	4.07												
15	32.8	30.6	27.5	25.0	22.3	18.2	14.3	11.0	8.55	7.26	6.26	5.23	4.60												
16	34.3	32.0	28.8	26.3	23.5	19.4	15.3	11.9	9.31	7.96	6.91	5.81	5.14												
17	35.7	33.4	30.2	27.6	24.8	20.5	16.3	12.8	10.1	8.67	7.56	6.41	5.70												
18	37.2	34.8	31.5	28.9	26.0	21.6	17.3	13.7	10.9	9.39	8.23	7.01	6.26												
19	38.6	36.2	32.9	30.1	27.2	22.7	18.3	14.6	11.7	10.1	8.91	7.63	6.84												
20	40.0	37.6	34.2	31.4	28.4	23.8	19.3	15.5	12.4	10.9	9.59	8.26	7.43												
21	41.4	38.9	35.5	32.7	29.6	24.9	20.3	16.3	13.2	11.6	10.3	8.90	8.03												
22	42.8	40.3	36.8	33.9	30.8	26.0	21.3	17.2	14.0	12.3	11.0	9.54	8.64												
23	44.2	41.6	38.1	35.2	32.0	27.1	22.3	18.1	14.8	13.1	11.7	10.2	9.26												
24	45.6	43.0	39.4	36.4	33.2	28.2	23.3	19.0	15.7	13.8	12.4	10.9	9.89												
25	46.9	44.3	40.6	37.7	34.4	29.3	24.3	19.9	16.5	14.6	13.1	11.5	10.5												
26	48.3	45.6	41.9	38.9	35.6	30.4	25.3	20.8	17.3	15.4	13.8	12.2	11.2												
27	49.6	47.0	43.2	40.1	36.7	31.5	26.3	21.7	18.1	16.2	14.6	12.9	11.8												
28	51.0	48.3	44.5	41.3	37.9	32.6	27.3	22.7	18.9	16.9	15.3	13.6	12.5												
29	52.3	49.6	45.7	42.6	39.1	33.7	28.3	23.6	19.8	17.7	16.0	14.3	13.1												
30	53.7	50.9	47.0	43.8	40.3	34.8	29.3	24.5	20.6	18.5	16.8	15.0	13.8												
40	66.8	63.7	59.3	55.8	51.8	45.6	39.3	33.7	29.1	26.5	24.4	22.2	20.7												
50	79.5	76.2	71.4	67.5	63.2	56.3	49.3	42.9	37.7	34.8	32.4	29.7	28.0												
60	92.0	88.4	83.3	79.1	74.4	67.0	59.3	52.3	46.5	43.2	40.5	37.5	35.5												
70	104.2	100.4	95.0	90.5	85.5	77.6	69.3	61.7	55.3	51.7	48.8	45.4	43.3												
80	116.3	112.3	106.6	101.9	96.6	88.1	79.3	71.1	64.3	60.4	57.2	53.5	51.2												
90	128.3	124.1	118.1	113.1	107.6	98.6	89.3	80.6	73.3	69.1	65.6	61.8	59.2												
100	140.2	135.8	129.6	124.3	118.5	109.1	99.3	90.1	82.4	77.9	74.2	70.1	67.3												

Fuente: Catherine M. Thompson, *Table of percentage points of the χ^2 distribution*, Biometrika, Vol. 32 (1941), con autorización del autor y del editor.

III) Posibles reacciones químicas en:

1) Hidrólisis ácida (HCl):



2) Micro-cristalización:

IV) Figuras del proceso de investigación:

Reactivos



Muestras



Materiales



A) Figuras de extracción de metabolitos y controles:

FIGURA 1: Hidrólisis.



FIGURA 2: Fase orgánica ya separada de la fase acuosa, previa centrifugación (no filtrada)



FIGURA 3: Filtración del solvente orgánico con carbón activo



FIGURA 4: Muestras filtradas



B) Figuras del proceso de identificación y resultados obtenidos

MICROCRISTALIZACIÓN

FIGURA 5: Cristales positivos de metabolitos benzodiazepínicos.



CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

FIGURA 6: Proceso de siembra



FIGURA 7: Corrida cromatográfica



Resultado:

Revelado de las placas cromatográficas bajo lámpara de luz UV a 240 nm de λ

FIGURA 8: Diferencia entre los dos métodos de extracción observado por cromatografía en capa fina y revelado bajo lámpara de luz UV 240 nm

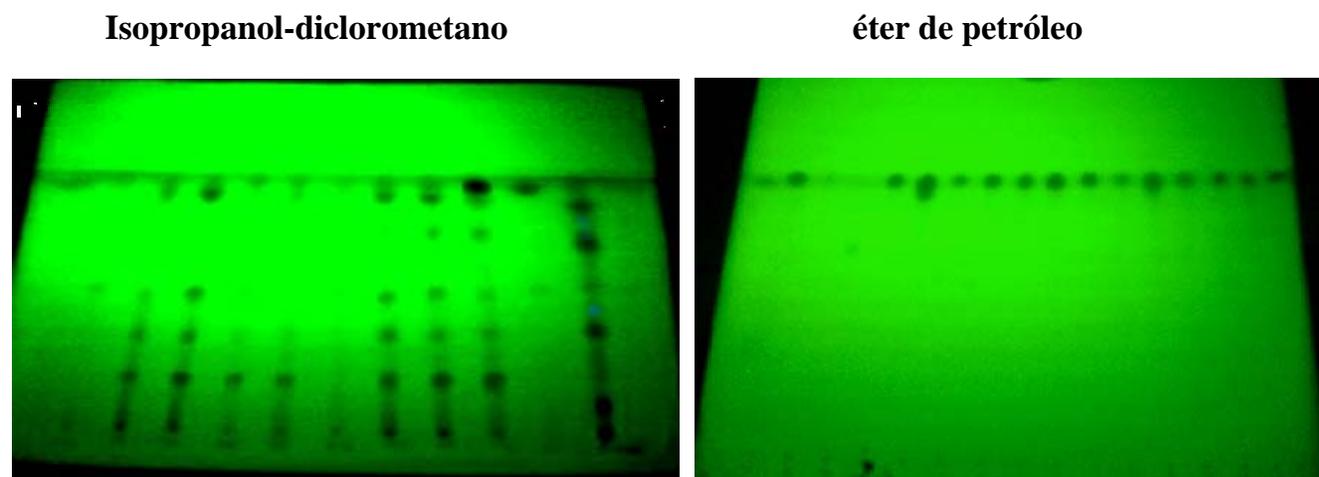


FIGURA 9: Diferencia entre lo filtrado y no filtrado método 1.

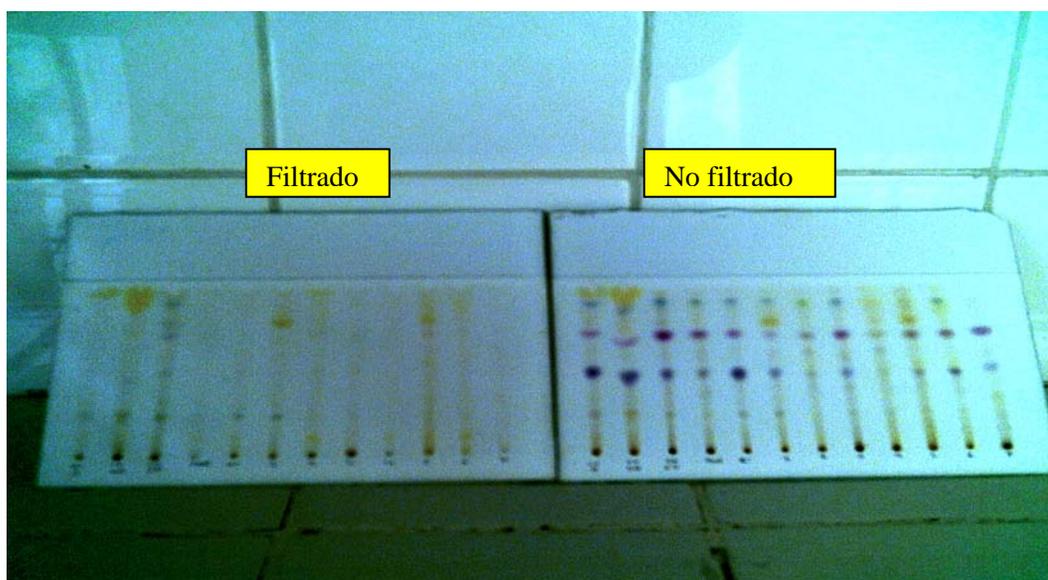


FIGURA 10:

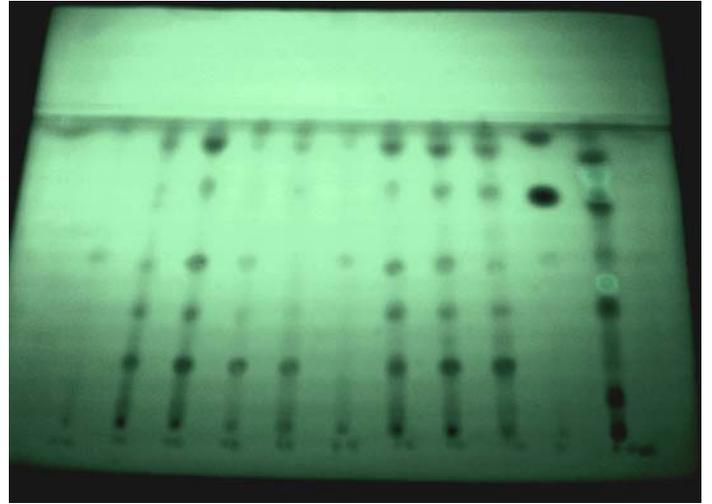
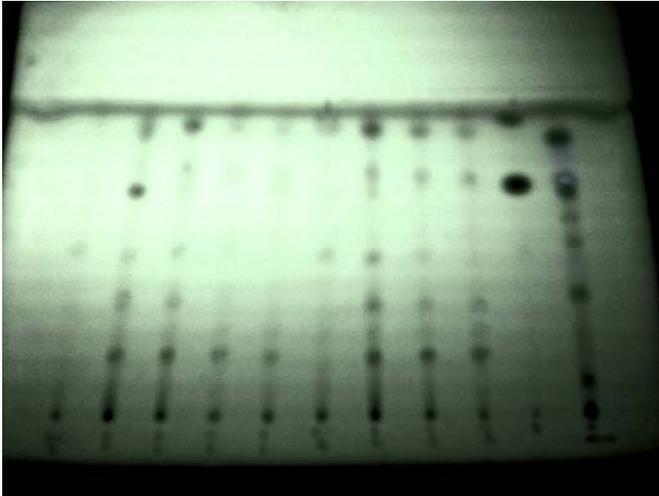
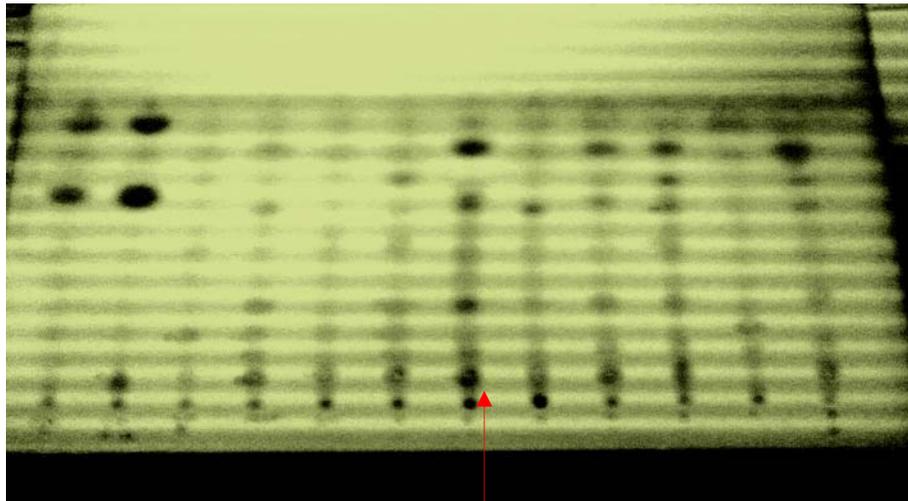


Figura 11:



Alprazolám

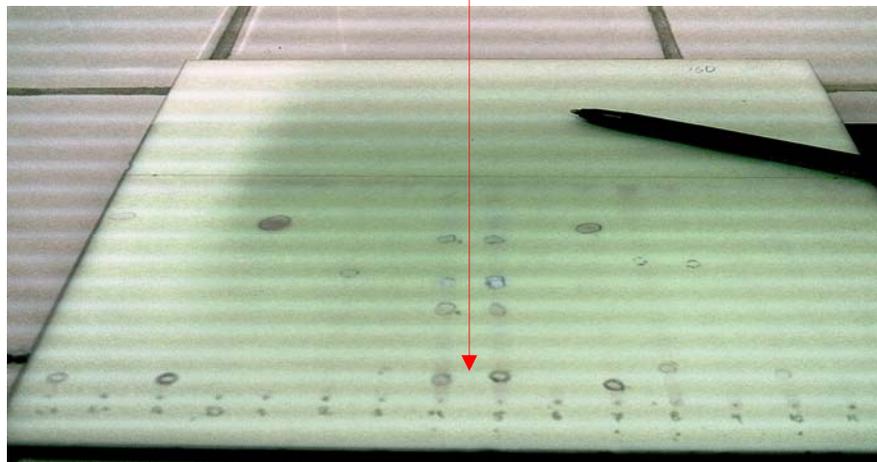
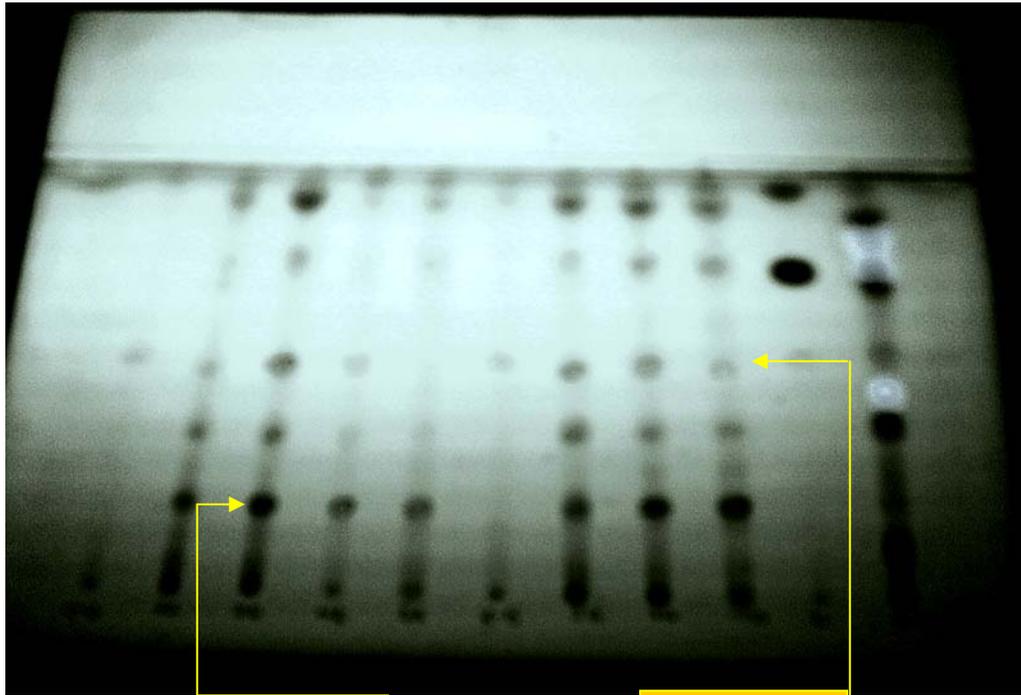


Figura 12:



Oxazepám

Temazepám