

# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
INSTITUTO DE CIENCIAS  
Centro de Química

**“ESTUDIO DE LA VALIDACIÓN  
CROMATOGRÁFICA Y DE LA ADSORCIÓN DE  
LOS ANSIOLÍTICOS DIAZEPAM Y SULPIRIDA”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**LICENCIADO EN FARMACIA**

PRESENTA

**MARICRUZ RAMÍREZ VARGAS**

DIRECTORA DE TESIS:

**DRA. MARÍA DE LA PAZ ELIZALDE GONZÁLEZ**

ASESOR INTERNO:

**M.C. MARCO ANTONIO GONZÁLEZ CORONEL**

**PUEBLA 2015**

## DEDICATORIAS

*Esta tesis la dedico a las dos personas más importantes en mi vida a Ma.*

*De los Ángeles y Ramón por su amor, trabajo y sacrificio durante todos estos años, por brindarme confianza, apoyo y por estar siempre a mi lado.*

*A mis hermanos Alfonso y Juan por su solidaridad, y compañía.*

*A mis verdaderos amigos Juan Carlos y Anahí por compartir su conocimiento, por apoyarme, y por haberme brindado su amistad incondicional durante toda la carrera.*

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A los integrantes de la Comisión Revisora y miembros del Jurado**

- |                                    |                                     |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| 1 Dra. Lidia Esmeralda García Díaz | Centro de Química ICUAP             |
| 2 Dr. Mario González Perea         | Facultad de Cs. Químicas de la BUAP |
| 3 Dr. Israel Camacho Abrego        | Instituto de Fisiología del ICUAP   |

### **A los profesores que colaboraron en el desarrollo del presente trabajo**

A la Dra. María de la Paz Elizalde González, directora de esta tesis por brindarme, apoyo, tolerancia, y por compartir su conocimiento y experiencia profesional en el desarrollo de este trabajo, mismos que han contribuido a mejorar mis capacidades personales.

A la Dra. Esmeralda García Díaz por contribuir en la realización de esta tesis compartiendo su conocimiento y experiencia.

Al M.C. Marco Antonio González Coronel, por ser el asesor interno de esta tesis, por brindarme su conocimiento y apoyo.

A los compañeros Mario, Alba, Carlos, Anahí y Jesica del Laboratorio de Adsorción y Cromatografía, por brindarme su amistad, apoyo y compartir su conocimiento durante el desarrollo de esta tesis.

**Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Adsorción y Cromatografía del  
Centro de Química del ICUAP**

## PRESENTACIÓN EN CONGRESOS

- ❖ Estudio de la adsorción de los ansiolíticos Diazepam y Sulpirida por carbón activado encapsulado.
  - XXVII Congreso Nacional de Química Analítica, Puebla, Puebla. Mex. Junio 2014.
  
  - Seminario del grupo académico Química Física Básica y Aplicada, Instituto de Ciencias de la BUAP, Puebla, Puebla. Mex. Septiembre 2014.
  
  - Segundo encuentro con la Calorimetría, Facultad de Ciencias Químicas, Puebla, Puebla. Mex. Noviembre 2014.

## RESUMEN

Numencial es un medicamento compuesto por dos ansiolíticos (Diazepam y Sulpirida) de amplio efecto terapéutico y es causante de intoxicaciones agudas que conllevan a la muerte del individuo. El uso irracional de estos medicamentos es la principal causa de suicidio tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. La intoxicación empeora si Numencial se consume en asociación con otros psicofármacos o con alcohol. Otra consecuencia que genera el uso de estos fármacos al ser eliminados por el organismo, es la contaminación de aguas residuales generando daños fisiológicos en animales acuáticos.

En el presente trabajo se optimizó la extracción de los principios activos contenidos en tabletas de Numencial. También se estudió la validación de un método cromatográfico por HPLC para el análisis cualitativo y cuantitativo de los fármacos Diazepam y Sulpirida basándose en los parámetros establecidos: linealidad, precisión, selectividad, exactitud, sensibilidad y robustez.

Se realizó la caracterización textural del carbón encapsulado comercial de venta contra intoxicaciones mediante la isoterma de adsorción de  $N_2$  A 77 K. También se determinó su acidez-basicidad superficial. Se obtuvieron isotermas y curvas cinéticas de adsorción de Diazepam y Sulpirida simultáneamente en disolución acuosa de Numencial en medio ácido y en presencia de etanol, por espectroscopía UV.

Para el estudio de la adsorción de ambos principios activos de manera individual sobre carbón encapsulado en medio de acidez gástrica y con el efecto de la presencia de alcohol, se utilizó la cromatografía HPLC.

## INDICE

Objetivos	1
Hipótesis	2
<b>Capítulo I. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Problema ambiental de fármacos en agua	3
1.1.1 Ansiolíticos	3
1.1.1.1 Benzodiazepinas	6
1.1.1.2 Benzamidas sustituidas	7
1.1.1.3 Diazepam y Sulpirida	7
1.1.2 Cromatografía	9
1.1.2.1 Validación de un método cromatográfico	11
1.1.3 Estudios cromatográficos del ansiolítico Diazepam	13
1.2 Problema social en el abuso de fármacos ansiolíticos	14
1.2.1 Tipos de intoxicaciones	15
1.2.2 Efectos de los ansiolíticos por sobredosificación	15
1.2.3 Métodos de desintoxicación	16
<b>Capítulo II. PARTE EXPERIMENTAL</b>	
2.1 Extracción de principios activos	18
2.2 Análisis por el método cromatográfico	18
2.2.1 Condiciones cromatográficas en medio ácido (HCl ajustado a pH= 1.6)	18
2.2.2 Condiciones cromatográficas en medio etanol al 50% y HCl ajustado a pH 1.6	19
2.3 Validación del método cromatográfico	19
2.3.1 Linealidad	19
2.3.2 Precisión	20
2.3.3 Límite de confianza	21
2.3.4 Exactitud	21
2.3.5 Sensibilidad	21
2.3.6 Robustez	22
2.3.7 Porcentaje de recuperación	22
2.4 Adsorción	23
2.4.1 Caracterización del adsorbente	23
2.4.1.1 Punto de carga cero ( $pH_{pzc}$ )	23
2.4.1.2 Isoterma de adsorción de $N_2$	23
2.4.2 Experimentos de adsorción en medio ácido	23
2.4.3 Experimentos de adsorción en medio ácido en presencia de etanol	24

<b>Capítulo III. RESULTADOS</b>	
3.1 Extracción de principios activos	27
3.2 Validación	29
3.2.1 Linealidad	30
3.2.2 Precisión	30
3.2.3 Exactitud	31
3.2.4 Sensibilidad	32
3.2.5 Robustez	32
3.3 Adsorción	34
3.3.1 Caracterización textural	34
3.3.2 Curvas cinéticas de adsorción en medio ácido	35
3.3.3 Curvas cinéticas de adsorción en medio ácido en presencia de etanol	36
3.3.4 Isotermas de adsorción en medio ácido	38
3.3.5 Isotermas de adsorción en medio ácido en presencia de etanol	39
3.4 Correlaciones estructura-retención cromatográfica-adsorción	41
3.4.1 Descriptores del Diazepam y la Sulpirida	41
3.4.2 Correlaciones polaridad-orden de elución	43
3.4.3 Correlaciones tamaño molecular-tamaño de poro-adsorción	43
<b>Capítulo IV. CONCLUSIONES</b>	46
<b>Capítulo V. BIBLIOGRAFÍA</b>	47

## Lista de abreviaturas

<b>Símbolo</b>	<b>Descripción</b>
5-HT <sub>LA</sub>	5-hidroxitriptamina
a	Cantidad adsorbida
$\alpha$	Selectividad
BET	Brunauer, Emmett y Teller
BJH	Barrett-Joyner-Halenda
C <sub>eq</sub>	Concentración en equilibrio
d <sub>p</sub>	Diámetro de poro
DAD	Detector de arreglo de diodos
GABA	Ácido gamma amino butírico
m/V	Relación masa volumen
MIM	Múltiple intoxicación medicamentosa
log P	Coeficiente de reparto
pH <sub>pzc</sub>	pH punto de carga cero
R <sup>2</sup>	Coeficiente de determinación lineal
RSD	Desviación estándar relativa
S <sub>BET</sub>	Superficie específica calculada a partir de la ecuación de BET
UV-Vis	Ultravioleta-Visible



## Lista de Figuras

<b>Número</b>	<b>Título de la Figura</b>	<b>Pág.</b>
1.1	Concentración de contaminantes emergentes en agua residual	4
1.2	Clasificación de fármacos ansiolíticos	5
1.3	Estructura química de los ansiolíticos Diazepam y Sulpirida	8
1.4	Principales componentes de un cromatógrafo de líquidos	11
2.1	Curva de calibración de Numencial por espectrofotometría UV-Vis	24
2.2	Curvas de calibración obtenidas por HPLC de Diazepam y Sulpirida	25
3.1	Cromatogramas de Diazepam, Sulpirida y Numencial	27
3.2	Cromatogramas DAD-HPLC Numencial en presencia de etanol	29
3.3	Isoterma de adsorción de N <sub>2</sub> a 77 K del carbón encapsulado comercial	34
3.4	Curvas cinéticas de adsorción sobre carbón de Diazepam, Sulpirida y Numencial	36
3.5	Curvas cinéticas de adsorción sobre carbón activado de Diazepam y Sulpirida en presencia de etanol.	37
3.6	Isotermas de adsorción de Numencial, Sulpirida y Diazepam	38
3.7	Isotermas de adsorción de Diazepam y Sulpirida en presencia de etanol	40
3.8	Isotermas de adsorción individuales de Diazepam y Sulpirida	44

## Lista de Tablas

Número	Título de la Tabla	Pág.
1.1	Concentraciones de psicofármacos encontrados en agua superficial	5
1.2	Clasificación de benzodiazepinas	7
1.3	Condiciones de extracción de Diazepam	13
1.4	Condiciones cromatográficas utilizando HPLC para Diazepam	14
2.1	Ecuaciones de regresión y coeficiente de correlación para curvas de calibración	26
3.1	Parámetros del análisis cromatográfico en régimen isocrático	28
3.2	Extracción de principios activos a partir de Numencial	29
3.3	Parámetros estadísticos de linealidad	30
3.4	Parámetros para evaluar la precisión del método cromatográfico	31
3.5	Prueba t de Student de Diazepam y Sulpirida	31
3.6	Determinación de la sensibilidad del método cromatográfico	32
3.7	Comparación de parámetros cromatográficos de ansiolíticos	33
3.8	Porcentajes de recuperación de los ansiolíticos	33
3.9	Caracterización textural del adsorbente.	35
3.10	Constantes de velocidad de adsorción de <i>pseudo</i> -primer orden	36
3.11	Constantes de adsorción en medio ácido sin y en presencia de etanol de Diazepam y Sulpirida	39
3.12	Propiedades fisicoquímicas de los psicofármacos	42
3.13	Estructuras espaciales de Diazepam y Sulpirida	42

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la validación de un método cromatográfico que permita cuantificar a los psicofármacos Diazepam y Sulpirida contenidos en el medicamento Numencial en estudios de adsorción sobre carbón activado encapsulado de venta contra intoxicaciones.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Optimizar la extracción de los principios activos contenidos en tabletas de Numencial por dos metodologías: por agitación con barra y digestor ultrasónico.
- Desarrollar un método analítico y estudiar la validación del mismo capaz de cuantificar confiablemente a los ansiolíticos Diazepam y Sulpirida.
- Comparar la cuantificación por dos metodologías: (a) como mezcla por espectrofotometría UV y (b) individualmente por cromatografía HPLC, de los ansiolíticos Diazepam y Sulpirida presentes en el medicamento Numencial
- Caracterizar al adsorbente carbonáceo seleccionado.
- Determinar curvas cinéticas e isothermas de adsorción a 37 °C de los ansiolíticos Diazepam y Sulpirida en jugo gástrico simulado y adicionalmente en presencia de alcohol sobre carbón activado encapsulado.

## **HIPÓTESIS**

El carbón activado es un poderoso adsorbente capaz de retener en su superficie una gran cantidad de sustancias químicas, portadoras de diferentes grupos funcionales, siendo así un método efectivo de descontaminación tanto ambiental como digestiva.

# CAPITULO I

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Problema ambiental de fármacos en agua

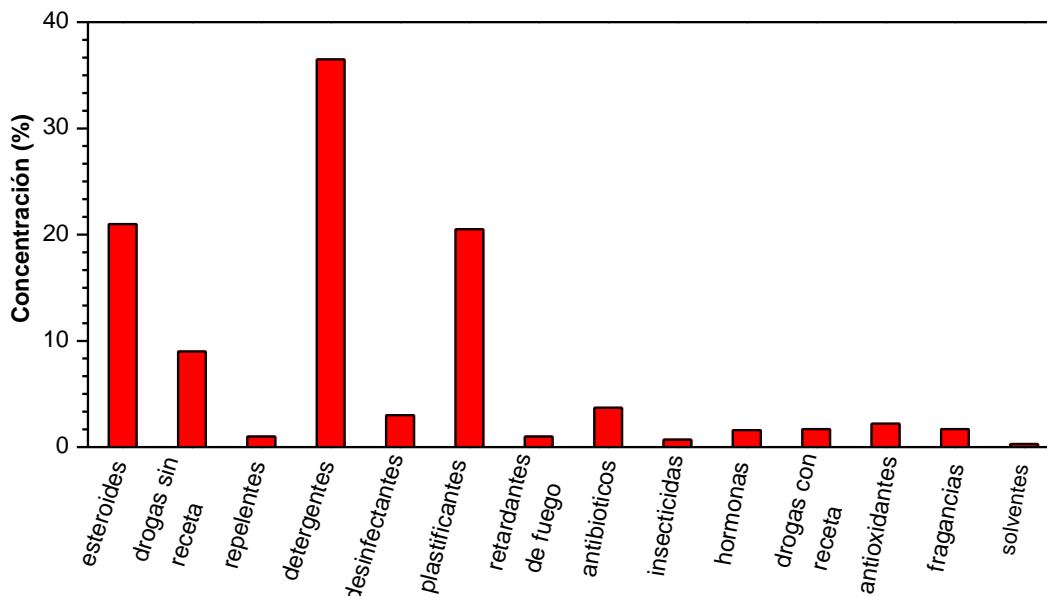
El agua es un recurso natural escaso, indispensable para la vida humana y el sostenimiento del medio ambiente. Como consecuencia del rápido desarrollo humano y económico y del uso inadecuado que se ha hecho de ella, el agua ha sufrido un alarmante deterioro. Durante décadas, toneladas de sustancias biológicamente activas sintetizadas para su uso en la industria, la medicina, la agricultura etc. han sido vertidas al medio ambiente sin tener en cuenta las posibles consecuencias.

Las principales vías de entrada de contaminantes en el medio ambiente acuático son las aguas residuales, entre las que se incluyen las urbanas, industriales, y las de origen agrícola o ganadero [1].

Los efectos que la contaminación química del agua produce son múltiples y entre los más importantes se destacan:

- Acción tóxica y cancerígena
- Incidencia sobre la producción de alimentos
- Cambios morfológicos en animales acuáticos
- Limitación del uso del agua con fines recreativos

Esta contaminación es causada por contaminantes emergentes cuyo origen y naturaleza química es distinta. De acuerdo con las numerosas revisiones bibliográficas realizadas en los últimos años (figura 1.1), los fármacos prescritos con y sin receta contribuyen con alrededor del 10% de la concentración de contaminantes, mientras que los detergentes constituyen el mayor porcentaje de contaminantes en aguas residuales, seguidos de los esteroides y plastificantes. [2]



**Figura 1.1** Concentración porcentual de diversos contaminantes emergentes en agua residual [2].

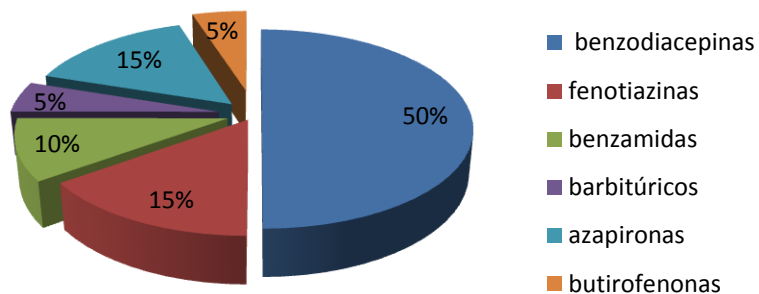
Entre los fármacos más prescritos en medicina humana destacan los analgésicos/antiinflamatorios, antibióticos, antihipertensivos y los ansiolíticos/antiepilépticos como las benzodiacepinas. Debido a las propiedades fisicoquímicas que presentan los medicamentos, sus metabolitos y sus productos de degradación, estas sustancias pueden llegar a alcanzar el agua subterránea y contaminar los acuíferos o bien quedar retenidas en el suelo y acumularse pudiendo afectar al ecosistema y a los humanos a través de la cadena alimenticia. Uno de los principales problemas que se tiene por la contaminación con fármacos es el daño físico-mental que se ocasiona a los animales acuáticos. En el caso de peces, el consumo de fármacos ansiolíticos los hace ser menos sociales, más atrevidos y devoradores [3].

Las concentraciones que se han encontrado en aguas superficiales o en aguas subterráneas se sitúan normalmente en el orden de  $\text{ng L}^{-1}$  o  $\mu\text{g L}^{-1}$ . En la tabla 1.1 se muestran concentraciones de fármacos ansiolíticos presentes en agua superficial [4].

**Tabla 1.1** Concentraciones de psicofármacos encontrados en agua superficial [4].

Fármaco	Concentración $\mu\text{g L}^{-1}$
Alprazolam	0.06
Bupiriona	1.6
Carbamazepina	346.5
Clobazam	353.3
Clonazepam	0.43
Diazepam	16.2
Flunitrazepam	1.5
Haloperidol	$6.5 \cdot 10^{-3}$
Levomepromazina	$7.7 \cdot 10^{-3}$
Lorazepam	2.7
Meprobamato	7300
Midazolam	0.2
Mirtazapina	14
Oxazepam	30.7
Oxcarbazepina	1400
Perfenazina	$9.9 \cdot 10^{-3}$
Fenobarbital	8100
Remoxiprida	70
Risperidona	0.13
Sulpirida	138
Triazolam	0.08

Estos principios activos pertenecen al grupo de los psicofármacos, el cual se ramifica de acuerdo a la estructura química del fármaco en benzodiazepinas, barbitúricos, benzamidas, fenotiazinas, butirofenonas, azapironas, etc. La figura 1.2 muestra que el grupo de las benzodiazepinas integra el mayor porcentaje de ansiolíticos encontrados como contaminantes.



**Figura 1.2** Clasificación de fármacos ansiolíticos y su porcentaje encontrado en agua superficial.

### **1.1.1 Ansiolíticos**

Los ansiolíticos son un grupo de fármacos con acción depresora sobre el sistema nervioso central destinados a disminuir o eliminar los síntomas de angustia y ansiedad del paciente [5]. Correctamente dosificados suprimen o mejoran esta sintomatología sin producir sedación o sueño. La ansiedad es una emoción compleja en la que coexisten:

- Sentimientos personales de temor, zozobra, amenaza.
- Irritabilidad y pérdida de concentración.
- Efectos somáticos y autonómicos: palpitaciones, temblor, tensión muscular, sudor, micciones frecuentes, rubor, cefaleas, molestias digestivas, etc.

Fisiológicamente, los sistemas neuroquímicos más implicados en la génesis y mantenimiento de la sintomatología ansiosa son el complejo receptor GABAA-benzodiacepínico, el sistema serotoninérgico y el noradrenérgico, aparte de otros sistemas neuropeptídicos menos estudiados.

Existen diversos fármacos ansiolíticos los cuales se han clasificado desde su punto de vista funcional de la siguiente manera:

- a) Los que producen además un efecto sedante-hipnótico: benzodiacepinas, barbitúricos y meprobamato.
- b) Los que ejercen además un efecto antipsicótico: benzamidas.
- c) Los agonistas parciales de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>: azaspirodecanodionas.
- d) Los que producen además, un bloqueo de algún componente vegetativo: neurolépticos, bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos.

#### **1.1.1.1 Benzodiacepinas**

Un grupo importante de ansiolíticos dados su prescripción y consumo son las benzodiacepinas; las cuales se catalogan de acuerdo a su tiempo de vida media en prolongada, intermedia, corta y de acción reducida. En la tabla 1.2 se muestran los fármacos benzodiacepínicos de acuerdo a esta clasificación.



**Tabla 1.2** Clasificación de benzodiazepinas de acuerdo a su semitiempo de vida.

<b>Tiempo de vida media</b>	<b>Fármaco</b>
Prolongada >24h	Diazepam, Fluracepam, Paracepam, Medacepam
Intermedia <24h	Clonazepam, Bromazepam, Nitracepam, Flunitrazepam
Corta <6h	Alprazolam, Lormetazepam, Lorazepam, Oxacepam
Reducida <2h	B-rotizolam, N-fidazolain

El mecanismo de acción general de este grupo de fármacos consiste en potenciar o amplificar la neurotransmisión gabaérgica inhibitoria puesto que son agonistas indirectos del ácido gamma amino butírico (GABA), uno de los neurotransmisores más importantes del sistema nervioso central (SNC) [6].

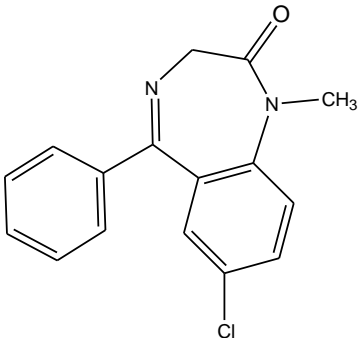
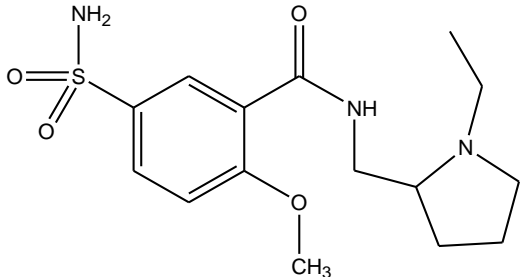
#### **1.1.1.2 Benzamidas sustituidas**

Grupo de fármacos ansiolíticos que además de ser antidepresivos ejercen un efecto antipsicótico, por lo cual también se conocen como neurolépticos y actúan bloqueando a receptores del sistema dopaminérgico y serotoninérgico del SNC bloqueando sus efectos y produciendo un estado de tranquilidad inmediata. De acuerdo con su estructura química podemos encontrar tres grandes grupos:

1. Benzamidas: Sulpirida, Amilsulpirida, Triapide
2. Butiroferonas: Haloperidol, Droperidol, Trifluoperidol
3. Fenotiazinas: Flufenazina, Cloropromazina, Levomepromazina, etc.

#### **1.1.1.3 Diazepam y Sulpirida**

Diazepam y Sulpirida (figura 1.3) son principios activos pertenecientes al grupo de los psicofármacos. Se pueden encontrar en preparados farmacéuticos de forma individual como Valium y Ekilid, respectivamente o en combinación como en el preparado farmacéutico Numencial.

Diazepam	Sulpirida
	
<p>Nombre IUPAC: 7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-1,4-benzodiazepina-2-ona Peso Molecular: 284.74</p>	<p>Nombre IUPAC: 5-aminosulfonil-N-1-etil-2-pirrolidinilmetil-2-metoxibenzamida Peso Molecular: 341.42</p>

**Figura 1.3** Estructura química de los ansiolíticos Diazepam y Sulpirida [7].

El Diazepam, perteneciente al grupo de los tranquilizantes benzodiazepínicos tiene múltiples efectos farmacológicos y dependiendo de la dosis con la que se administre está indicado como ansiolítico, antidepresivo, sedante, hipnótico, anticonvulsivo, anticomisial y como relajante muscular. Estas propiedades se deben a que Diazepam actúa en las sinapsis GABAérgicas, ligándose a la molécula del GABA, en la membrana postsináptica, ocasionando una mayor apertura de los canales clónicos y una hiperpolarización de la misma, impidiendo así una estimulación relativa del Sistema Activador Ascendente Reticular [6,8].

El Diazepam se administra por vía oral, intramuscular e intravenosa. Por vía oral e intramuscular la biodisponibilidad es del 86-100%. Se absorbe rápidamente, atraviesa barrera hemato-encefálica y placentaria, tiene una vida media de 20-70 horas, un volumen de distribución (0.7-1.7 L/kg) y un aclaramiento relativamente bajo (0.2-0.5 mL/kg/min). El Diazepam es metabolizado en el hígado a N-desmetildiazepam, un metabolito mayor activo con una vida media de 50-100 horas [8].

El fármaco Sulpirida es un antagonista específico de receptores dopaminérgicos D2 y D3. Pertenece al grupo de fármacos neurolepticos de las benzamidas. Esta indicado en el tratamiento de cuadros psicopatológicos diversos (neurosis,

depresiones, somatizaciones neuróticas), trastornos psicológicos funcionales, síndromes psicosomáticos, demencia senil y somatizaciones gastrointestinales.

Sulpirida se absorbe bien a través del tubo digestivo. La biodisponibilidad es relativamente baja, influyendo en forma importante los aspectos individuales del paciente. Su distribución se realiza rápidamente a través de todo el organismo; sin embargo, el paso por la barrera hemato-encefálica es dificultoso. Su vida media es de 7 a 9 horas. Menos del 40% se une a proteínas plasmáticas y es excretado por la orina [9].

### **1.1.2 Cromatografía**

La cromatografía es un método analítico usado prioritariamente para la separación de los componentes de una muestra en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa [10].

Las modalidades de la cromatografía son variadas de las cuales en función de diversos parámetros se pueden clasificar de acuerdo a:

- La naturaleza de la fase móvil. Si la fase móvil es un gas, la movilidad cromatográfica se denomina gaseosa (GC) y si es un líquido, cromatografía líquida (LC). A este último grupo pertenecen la cromatografía en capa delgada (TLC), la cromatografía líquida en columna abierta y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- La naturaleza de la fase estacionaria. Si la fase estacionaria es un sólido y la fase móvil un líquido se denomina cromatografía líquido-sólido (LSC), análogamente existirán una cromatografía líquido-líquido (LLC), gas-líquido (GLC) y gas-sólido (GC)
- El fenómeno que ocurre dentro de la columna. Puede ser de afinidad y por tamaño molecular.

Como ya se ha mencionado, los métodos cromatográficos pueden clasificarse de acuerdo a la naturaleza de la fase móvil y estacionaria, pero también así mismo la cromatografía puede clasificarse en función al fenómeno físico que provoca la

separación; pudiendo ser cromatografía de adsorción y de partición. En la primera, la fase estacionaria es un sólido y la fase móvil que contiene los solutos disueltos pasa por encima de la fase estacionaria, sobre la cual los analitos (solutos) se adsorben cuando se retienen y se desorben para eluirse.

En la segunda, la fase estacionaria es un líquido inmovilizado sobre un material inerte sólido que solo actúa de soporte y los fenómenos de retención y separación se producen a causa de la solubilidad relativa de los componentes analizados.

Otros dos fenómenos físicos de separación que difieren un poco en la cromatografía es el de intercambio iónico en el cual la separación se fundamenta en el intercambio selectivo de los iones enlazados a la fase estacionaria por los iones de la muestra, y el de exclusión, en donde la fase estacionaria proporciona una clasificación de las moléculas basadas en su mayor parte en la geometría y el tamaño molecular.

Este conjunto de técnicas permite la separación de componentes en mezclas complejas, sin embargo la eficacia con la que cada uno lo hace es dependiente de diversos factores entre los cuales el analito es una pieza fundamental en la elección del método cromatográfico.

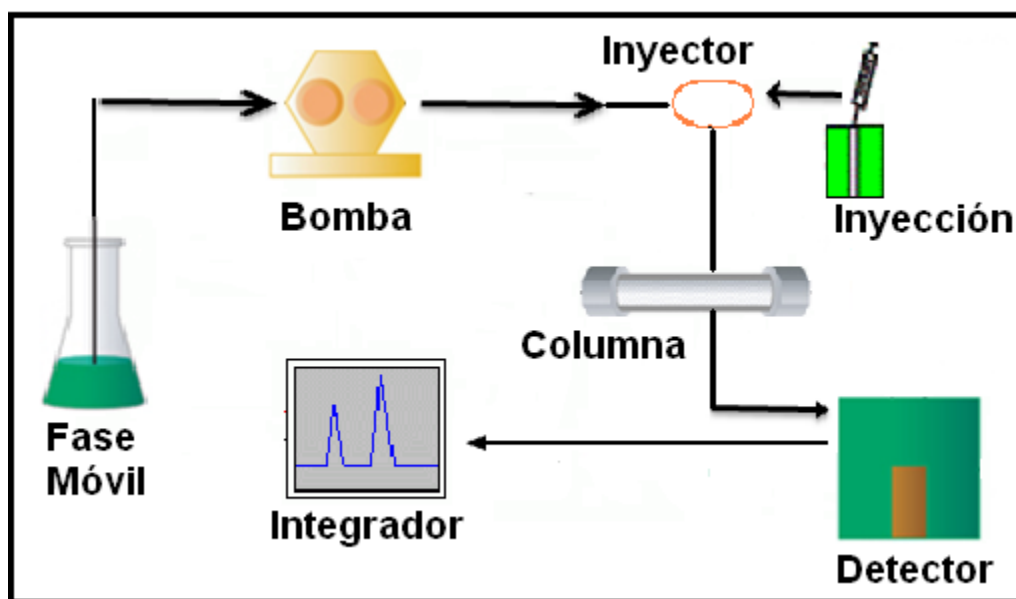
La cromatografía líquida “clásica” se lleva a cabo en una columna generalmente de vidrio, la cual está rellena con la fase estacionaria. Luego de colocar la muestra en la parte superior, se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. Sin embargo con el objetivo de aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de fase fija se fue disminuyendo hasta el tamaño de los micrones, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que la fase móvil fluya. De esta manera, se creó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que requiere de instrumental especial que permita trabajar con las altas presiones requeridas.

La figura 1.4 muestra un esquema de los componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución. Entre los componentes principales que constituyen este equipo se encuentra un reservorio de solventes para la fase móvil, sistemas de bombeo, sistemas de inyección de muestra, detector y un

sistema de registro, en el cual se recabarán los datos provenientes del detector [10].

Por consiguiente, como resultado de un análisis cromatográfico se obtiene un gráfico llamado cromatograma, que relaciona la señal en función del tiempo.

De esta manera, gracias a su alto poder de resolución, la cromatografía líquida de alta resolución HPLC se ha convertido en un método analítico de primer orden que permite separar, identificar y cuantificar los compuestos presentes en muestras líquidas y por ende de gran aplicación en la industria farmacéutica.



**Figura 1.4** Esquema de los principales componentes de un cromatógrafo de líquidos.

### 1.1.2.1 Validación de un método cromatográfico

Para asegurar confiabilidad en los resultados obtenidos, los métodos analíticos se someten a un proceso de validación. Mediante un proceso de validación se comprueba si el método es lo suficientemente confiable y si los resultados previstos se obtienen dentro de las condiciones prefijadas [11].

Para el desarrollo químico-farmacéutico de un nuevo medicamento es imprescindible la utilización de un método analítico que permita cuantificar el ingrediente activo de una formulación. La validación de los métodos analíticos se

fundamenta en la determinación de los parámetros de linealidad, precisión, selectividad, exactitud, sensibilidad y robustez [10].

### **Linealidad**

Es la capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en un intervalo definido. Se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis del analito a diferentes concentraciones. La selección del intervalo y del número de puntos experimentales está estrictamente relacionada con la aplicación del método.

### **Precisión**

Refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan sobre una muestra homogénea son semejantes entre sí. Las dos medidas más comunes de la precisión, que generalmente se define en términos de la desviación estándar o el coeficiente de variación (desviación estándar relativa), son la repetibilidad y la reproducibilidad.

### **Selectividad**

Se define como la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación o excipientes que pueden estar presentes en la muestra. Se expresa como el grado de inexactitud del método.

### **Exactitud**

Indica la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos posibles al valor verdadero. La exactitud debe ser tan grande como sea posible para que el valor se aproxime al de referencia.

## Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad son el límite de detección y el de cuantificación.

## Robustez

Corresponde a los estudios que indican el grado de confiabilidad del ensayo ante cambios en las condiciones operativas y ambientales normalizadas del método. Estos cambios pueden ser ligeras diferencias operativas, de equipos, de analistas, en la temperatura, en el pH, fuente de columnas, etc.

### 1.1.3 Estudios cromatográficos del ansiolítico Diazepam

Se han realizado diversos estudios cromatográficos por HPLC al fármaco ansiolítico Diazepam en presentación individual y combinada. En las tablas 1.3 y 1.4 se muestran algunas condiciones de extracción y cromatográficas utilizadas para este fármaco en diversos procedimientos utilizando formas farmacéuticas sólidas como cápsulas o tabletas [12-15].

**Tabla 1.3** Condiciones de extracción de Diazepam en formulación farmacéutica sólida.

<b>Peso de Diazepam</b>	<b>Disolventes/ volumen</b>	<b>Agitación</b>	<b>Filtración</b>	<b>Ref.</b>
20 tabletas trituradas	Etanol : agua (5:3)	Mecánica (30 min) y centrifugación (3000 rpm)	Sin filtración, eliminación del sobrenadante.	[12]
Equivalente a 25 mg	25 mL de 0.1N HCl	Cubeta ultrasónica (10 min)	Filtros membrana de 0.45 µm	[13]
5 mg	10 mL de metanol			[14]
1 cápsula	100 mL con metanol	Cubeta ultrasónica (60 min)	Filtros PTFE de 0.5 µm	[15]

**Tabla 1.4** Condiciones cromatográficas utilizando HPLC para el ansiolítico Diazepam.

<b>Columna</b>	<b>Condiciones cromatográficas</b>	<b>Referencia</b>
Hypersil ODS C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm)	Fase móvil: ACN/ MeOH y 1 % búfer de fosfatos a pH 3. Método isocrático, velocidad de flujo de 1 mL/min, volumen de inyección 20 µL, detección UV a 232 nm.	[13]
X Bridge C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm)	Fase móvil: ACN/ búfer de fosfato a pH 3.4 Método isocrático, velocidad de flujo de 1 mL/min, detección UV a 250 nm.	[14]
Wakosil 5 C18 (4.6 x 150 mm, 5 µm)	Fase móvil: 1-ácido heptanosulfónico 5 Mm de sal de sodio en agua/ACN ajustado con ácido fosfórico a pH 2.4 a una velocidad de flujo de 1 mL/min a 40 °C volumen de inyección 10 µL, detección UV a 225 nm.	[15]

## 1.2 Problema social en el abuso de fármacos ansiolíticos

Una problemática social por la cual ha cursado el individuo durante años es el consumo reiterado de fármacos o mejor conocido con el término de farmacodependencia sobre todo hacia sustancias ansiolíticas-antidepresivas destinadas a tratar problemas mentales. En general, la dependencia se presenta con una gran variabilidad interindividual pues hay personas capaces de consumir sustancias adictivas con moderación o de forma ocasional, mientras que otras, tras un breve o largo período de consumo se convierten en consumidores compulsivos y presentan grandes dificultades para abandonar dicho consumo. Esta ingesta irracional de fármacos puede conducir a la presencia de intoxicaciones agudas medicamentosas.

Las intoxicaciones agudas medicamentosas son la principal causa de suicidio tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, afectando mayormente a las mujeres comprendidas entre los 20 y 44 años [16]. En las investigaciones médico-legistas poco se menciona la cantidad de fármacos ingerida y la más frecuente es de 10 a 20 comprimidos. Se ha observado un amplio predominio de los psicofármacos y es el Diazepam el más frecuente causando adicción en un 86



% [17]. El uso inapropiado de este principio activo se debe principalmente a la facilidad con la que puede ser adquirido, ya que desde que las benzodiazepinas se introdujeron en el mercado, su utilización ha experimentado un constante incremento debido a sus propiedades ansiolíticas, hipnóticas y sedantes y a su amplio margen de seguridad en comparación con otros fármacos depresores del SNC. Sin embargo, en la actualidad la mayoría de estas sustancias suelen consumirse en asociación con otros psicofármacos o con alcohol aumentando la fatalidad de la intoxicación debido a la sinergia que provoca tal combinación.

### **1.2.1 Tipos de intoxicaciones**

Una intoxicación es la entrada de un tóxico en el cuerpo en cantidad suficiente como para producir un daño. Según el grado y sus efectos en el tiempo, podemos clasificar a una intoxicación como aguda o crónica. En la primera se produce un daño debido a la exposición o consumo de grandes dosis de un tóxico y el efecto se presenta dentro de las primeras 24 horas; mientras que en la segunda la persona ha sido expuesta a dosis bajas del tóxico y con cierta periodicidad; es decir, la intoxicación se produce poco a poco [8]. Existe una gran variedad de sustancias que pueden desencadenar una intoxicación entre las cuales predominan:

- Dosis excesivas de medicamentos o drogas
- Utilización inadecuada de insecticidas y raticidas
- Ingesta de hidrocarburos y cáusticos
- Inoculación de venenos por parte de animales

### **1.2.2 Efectos de los ansiolíticos por sobredosificación**

Al administrar dosis altas de un fármaco depresor del SNC la afección neurológica dependerá de la cantidad ingerida y de la tolerancia al fármaco.

Entre los síntomas que se encuentran en caso de alguna intoxicación por ansiolíticos están:

- ✓ Somnolencia
- ✓ Apatía

- ✓ Incoordinación Muscular
- ✓ Depresión respiratoria

Estudios realizados por Carson [18] demuestran que las concentraciones *post-mortem* de los fármacos individuales identificados no fueron letales, estableciendo que la combinación de fármacos en la “múltiple intoxicación medicamentosa” (MIM) y el consumo de alcohol al mismo tiempo pueden asociarse con la fatalidad de la intoxicación, provocando afecciones fisiológicas en el organismo tales como ataxia, depresión respiratoria y cardiovascular, hipotensión, broncoaspiración, coma e incluso la muerte del paciente. Se sabe que dosis mayores a 5 mg/kg del fármaco benzodiacepínico Diazepam puede desencadenar la presencia de esta sintomatología.

### **1.2.3 Métodos de desintoxicación**

Se conoce como método de desintoxicación a aquel procedimiento mediante el cual se ayuda a disminuir o eliminar alguna sustancia tóxica del organismo. Ante la presencia de una intoxicación medicamentosa en especial por benzodiacepinas, los tratamientos mayormente utilizados son el uso de antídotos y la descontaminación digestiva.

- a) Antídotos: suelen usarse Flumazenil y Aminofilina. El primero es un fármaco antagonista de los receptores de las benzodiacepinas.
- b) Descontaminación digestiva son: lavado gástrico, uso de eméticos, hemodiálisis e ingesta de carbón activado.

El lavado gástrico permite vaciar el contenido del estómago para evitar que el fármaco pase al resto del tubo digestivo y se absorba. Se introduce una sonda a través de la nariz o la boca, y se extiende a través del esófago hasta llegar al estómago. Esta técnica deberá llevarse a cabo dentro de la primera hora. Los eméticos inducen el vómito. Mediante la hemodiálisis se eliminan toxinas y exceso de fluidos de la sangre y los tejidos haciendo circular de forma continua la sangre a través de un filtro. El carbón activado es una sustancia de origen vegetal que

tiene la propiedad de adsorber sustancias químicas, gases, metales pesados, proteínas, desechos y toxinas, lo que lo convierte en un gran aliado para la desintoxicación. Se utiliza dentro de la primera hora después de la ingesta y la dosis habitual es de 1 g/kg corporal [19]. El carbón activado se queda en el tubo digestivo, sin que esto genere ningún efecto secundario y es ahí donde adsorberá todo aquello que resulte nocivo para el organismo y posteriormente será eliminado a través de las heces.

Se sabe que el carbón activado en cápsulas o en suspensión es un poderoso adsorbente que disminuye la cantidad de droga disponible para ser absorbida en el intestino. Se obtiene mediante la carbonización de la cáscara de coco, carbones vegetales, de madera, lignitos y turba. Se caracteriza por poseer una superficie específica con una gran cantidad de poros muy finos que son los que adsorben ciertos compuestos no deseados. Las altas temperaturas, la atmósfera especial y la inyección de vapor del proceso de fabricación del carbón activado es lo que “activa” y crea la porosidad [20].

## CAPITULO II

### 2 PARTE EXPERIMENTAL

#### 2.1 Extracción de principios activos

Para la extracción de los principios activos de los preparados farmacéuticos Numencial<sup>®</sup> y Ekilid<sup>®</sup> se usaron dos métodos: agitación con barra y digestor ultrasónico durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se trituraron 4 tabletas de Numencial, se promedió su peso y se tomaron 138.5 mg de tableta que resultaron equivalentes a 2.5 mg de Diazepam y 50 mg de Sulpirida. El polvo se llevó a un matraz aforado de 100 mL y se disolvió con 80 mL de una disolución previamente preparada de etanol al 50% y HCl ajustado a pH 1.6. Para la formulación de Ekilid se pesaron 4 cápsulas, se promedió su peso y se tomó el equivalente a 100 mg de Sulpirida. El polvo se llevó a un matraz aforado de 100 mL y se disolvió con 80 mL de la misma disolución ocupada anteriormente.

A manera de estándar de Diazepam se usó el preparado Valium<sup>®</sup>. Se tomaron 100 µL de la ampolleta y se aforó con la disolución etanol-HCl en un matraz aforado de 10 mL, para obtener una concentración de 50 mg L<sup>-1</sup> de Diazepam. La mezcla se sometió a agitación en cubeta ultrasónica por 5 minutos a temperatura ambiente.

De cada disolución se tomaron alícuotas para preparar las concentraciones deseadas y se filtraron utilizando filtros Minisart<sup>®</sup>-RC/SRP 0.45 µm.

#### 2.2 Análisis por el método cromatográfico

El análisis se realizó en dos equipos HPLC. Para los análisis cromatográficos de los ansiolíticos en medio ácido se utilizó un equipo Beckman Gold con bomba modelo 126 y para las disoluciones en medio etanol-HCl se utilizó un equipo Agilent 1260 ambos con detector UV e inyector automático.

##### 2.2.1 Condiciones cromatográficas en medio ácido (HCl ajustado a pH 1.6)

Se utilizó una columna EC Nucleosil 100-5 C18 AB (3 x 125 mm) de Macherey Nagel. Fase móvil A: acetonitrilo, B: 1 mM acetato de amonio acuoso. Se empleó un gradiente: 0-20 min 60-90%, pH 4 ajustado con CH<sub>3</sub>COOH a una velocidad de

flujo de 1.4 mL/min a 40 °C. La detección UV se realizó a 228 y 254 nm. El volumen de inyección fue de 20 y 5 µL para Diazepam y Sulpirida, respectivamente.

### 2.2.2 Condiciones cromatográficas en medio etanol al 50% y HCl ajustado a pH 1.6

Se utilizó una columna EC Nucleosil 100-5 C18 AB (3 x 125 mm) de Macherey Nagel. La composición de la fase móvil fue, A: acetonitrilo y B: acetato de amonio acuoso pH 4 ajustado con CH<sub>3</sub>COOH. La detección UV se realizó a 230 y 254 nm. Se empleó elución isocrática al 50% a una velocidad de flujo de 1 mL/min con un volumen de inyección de 20 µL y 5 µL, el tiempo de análisis fue de 5 minutos.

## 2.3 Validación del método cromatográfico

### 2.3.1 Linealidad

Para la determinación de este parámetro se realizó una curva de calibración de Diazepam (10-50 mg L<sup>-1</sup>) y Sulpirida (50-1000 mg L<sup>-1</sup>). Cada punto de las curvas de calibración se inyectó por triplicado en el equipo HPLC Agilent 1260. Se realizó un test estadístico de los datos y se determinó lo siguiente:

- Curva de regresión lineal

$$y = bX + a \quad (2.1)$$

Donde **b** es la pendiente y **a** la ordenada al origen.

- Coeficiente de correlación r y coeficiente de determinación R<sup>2</sup>. Estos valores se determinaron usando el programa Origin Pro<sup>®</sup> 8.0 para evaluar el ajuste al modelo lineal. El valor de r=1 indica una curva lineal.
- Test de correlación lineal

$$tr = \frac{r \sqrt{n-2}}{1-r^2} \quad (2.2)$$

- Test de Student de la pendiente

$$t_{exp} = \frac{b}{S_b} \quad (2.3)$$

- Intervalo de confianza de b

$$b = b \pm t * S_b \quad (2.4)$$

donde  $S_b$  es la varianza. Los criterios aceptables para los anteriores parámetros se presentan en la tabla 2.1.

**Tabla 2.1** Parámetros estadísticos de linealidad y criterios aceptables.

Parámetro estadístico	Criterio
r	$\geq 0.99$
$R^2$	$\geq 0.99$
Test de correlación lineal	$t_{exp} > t_{tabla}$
Test de Student de la pendiente	$t_{exp} > t_{tabla}$
Intervalo de confianza de b	No debe incluir 0

### 2.3.2 Precisión

La evaluación de la precisión del análisis cuantitativo de las sustancias se realizó haciendo 6 inyecciones de Diazepam ( $25 \text{ mg L}^{-1}$ ) y Sulpirida ( $400 \text{ mg L}^{-1}$ ). Se determinó la desviación estándar relativa (RSD) a partir de la desviación estándar S de los datos obtenidos de la siguiente manera:

$$S = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{n-1} \quad (2.5)$$

donde  $n$  es el número de mediciones,  $x_i$  es el valor medido en el ensayo  $i$  y  $\bar{x}$  el estimador de la media poblacional  $\mu$  y la desviación estándar relativa o coeficiente de variación:

$$RSD = \frac{S * 100}{\bar{x}} \quad (2.6)$$

La Farmacopea de los Estados Unidos (USP) indica como normativa una RSD de no más del 2% realizando 5 inyecciones de una misma disolución.

### 2.3.3 Límite de confianza

Se calculó de acuerdo a la distribución de t de Student, la cual se puede utilizar cuando el número de muestras es menor a 30 según:

$$x + \frac{t_{v,\alpha} * S}{\sqrt{n}} < \mu > x - \frac{t_{v,\alpha} * S}{\sqrt{n}} \quad (2.7)$$

Donde  $t_{v,\alpha}$  es el valor “t de Student”, tabulado para n mediciones con  $v=n-1$  grados de libertad y para  $\alpha=0.05$  correspondiente a un intervalo de confianza del 95%.

### 2.3.4 Exactitud

Para la determinación de exactitud se emplearon tres concentraciones de Diazepam (20, 25 y 30 mg L<sup>-1</sup>) y Sulpirida (400, 500 y 600 mg L<sup>-1</sup>). Estas se inyectaron por triplicado en el equipo HPLC. Para calcular la t experimental (ver ec. 2.8) se utiliza un ensayo t de Student. Se comparó con el t de tablas para n-1 grados de libertad en el nivel de confianza del 95%. Si  $t_{exp} < t_{tabla}$ , no existe diferencia significativa con el 100% de recuperación y la exactitud es apropiada.

- Valor de t

$$t_{exp} = \frac{100-R}{RSD * \bar{n}} \quad (2.8)$$

Siendo R la recuperación porcentual.

### 2.3.5 Sensibilidad

Para la obtención del límite de detección y cuantificación se usaron las ecs. 2.9 y 2.10. Se prepararon tres diluciones 1:10, 1:50 y 1:100 de la solución de Numencial<sup>®</sup> (Diazepam 25 mg L<sup>-1</sup> y Sulpirida 500 mg L<sup>-1</sup>) y se analizaron por triplicado.

- Se utilizó la pendiente calculada de la curva de calibración en el apartado de linealidad. Se construyó otra curva de calibración con estas nuevas

concentraciones y se determinó la ecuación de esta nueva recta (ver ec. 2.1) obteniendo un estimado de la respuesta del blanco  $Y_{bl}$ .

- Se determinó la desviación estándar correspondiente, se graficó concentración vs desviación y con el ajuste a una línea recta se determinó  $S_{bl}$  como intercepto a la ordenada (obteniéndose el estimado, correspondiente a la desviación estándar del blanco).

$$\text{Límite de detección} = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b} \quad (2.9)$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} \quad (2.10)$$

### 2.3.6 Robustez

La robustez consiste en realizar cambios de variables comunes al método cromatográfico con el fin de demostrar que es reproducible frente a estas modificaciones. Los cambios que se realizaron al método fueron: cambio de equipo (tolerancia), temperatura y concentración de fase móvil.

### 2.3.7 Porcentaje de recuperación

Finalmente se calculó la recuperación porcentual ( $R$ ) mediante la expresión:

$$R = \frac{x}{x} * 100 \quad (2.11)$$

Donde  $x$  es el valor medio y  $x$  el valor verdadero.



## **2.4 Adsorción**

### **2.4.1 Caracterización del adsorbente**

#### **2.4.1.1 Punto de carga cero ( $pH_{pzc}$ )**

La determinación del punto de carga cero  $pH_{pzc}$  se realizó por titulación potenciométrica empleando un titulador Metrohm. Se preparó una disolución de NaCl 0.01 M. Se colocaron 30 mL de dicha solución en vasos de precipitados. Se ajustó el pH a diferentes valores, desde 2 hasta 12 con HCl 0.1M o NaOH 0.1M ( $pH_i$ ). De las disoluciones con el pH ajustado se tomaron 30 mL y se colocaron en matraces Erlenmeyer con 0.1 g de muestra. El sistema se mantuvo en agitación durante 24 h, se filtró y se midió el pH final ( $pH_f$ ) de la disolución resultante. El  $pH_{pzc}$  es el punto donde la curva  $pH_f$  es intersecada por la recta  $pH_i$  ( $pH_i = pH_f$ ).

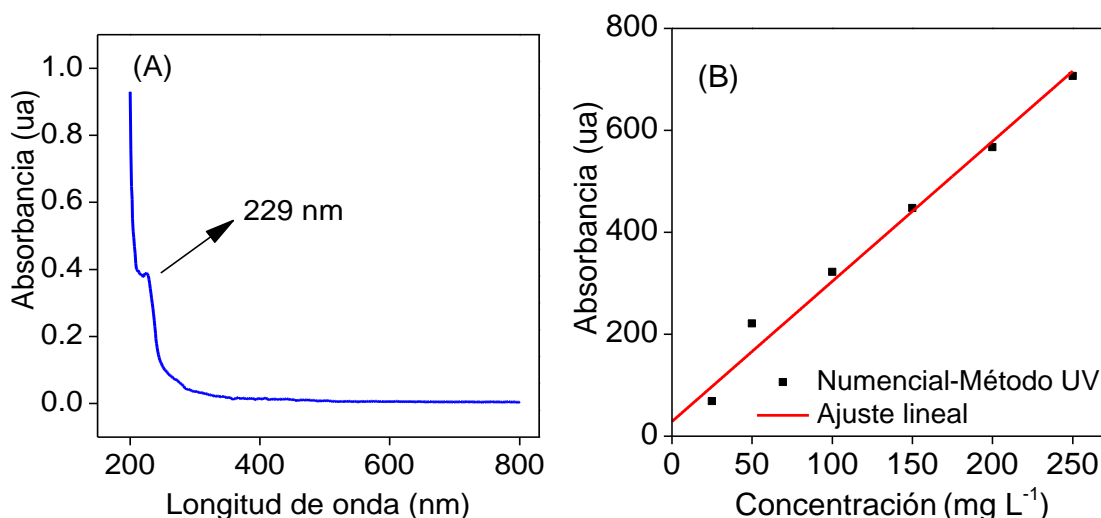
#### **2.4.1.2 Isotherma de adsorción de $N_2$**

Se utilizó un equipo Autosorb-1 Quantachrom para la determinación de la isoterma de adsorción de  $N_2$  a 77 K del material adsorbente que fue desgasificado durante 55 horas a una temperatura de 300 °C. El tamaño de partícula del adsorbente carbonáceo fue de 0.05 mm.

### **2.4.2 Experimentos de adsorción en medio ácido**

Los experimentos de adsorción se realizaron utilizando carbón activado encapsulado secado previamente a 200 °C por 24 h en una estufa y empleando una dosis del adsorbente de 6.7 g L<sup>-1</sup>. La concentración inicial fue de 250 mg L<sup>-1</sup> para Diazepam y 5000 mg L<sup>-1</sup> para Sulpirida. Se tomaron alícuotas durante un tiempo de 0 a 20 minutos para la cinética y para la isoterma el intervalo de concentración fue de 25 a 250 mg L<sup>-1</sup>. La preparación de las disoluciones acuosas de Numencial<sup>®</sup> fue la siguiente: se preparó una disolución stock triturando 10 tabletas de Numencial<sup>®</sup> y agregándolas a una disolución de 100 mL de HCl 0.03 N con un valor de pH 1.6. Los experimentos de adsorción se llevaron a cabo a una temperatura de 37 °C.

Las concentraciones de equilibrio se obtuvieron tanto por espectroscopía UV-Vis obteniendo el espectro perteneciente a la disolución de Numencial (ver figura 2.1A) y evaluando la curva de calibración con ecuación de regresión  $A = 2.7C + 28.8$  (Fig. 2.1B), como por cromatografía calculando el área bajo la curva de cada uno de los picos cromatográficos de la disolución antes mencionada en HPLC y evaluando en la curva de calibración correspondiente (Fig. 2.2A). Las condiciones de separación se dan en la sección 2.2.1.

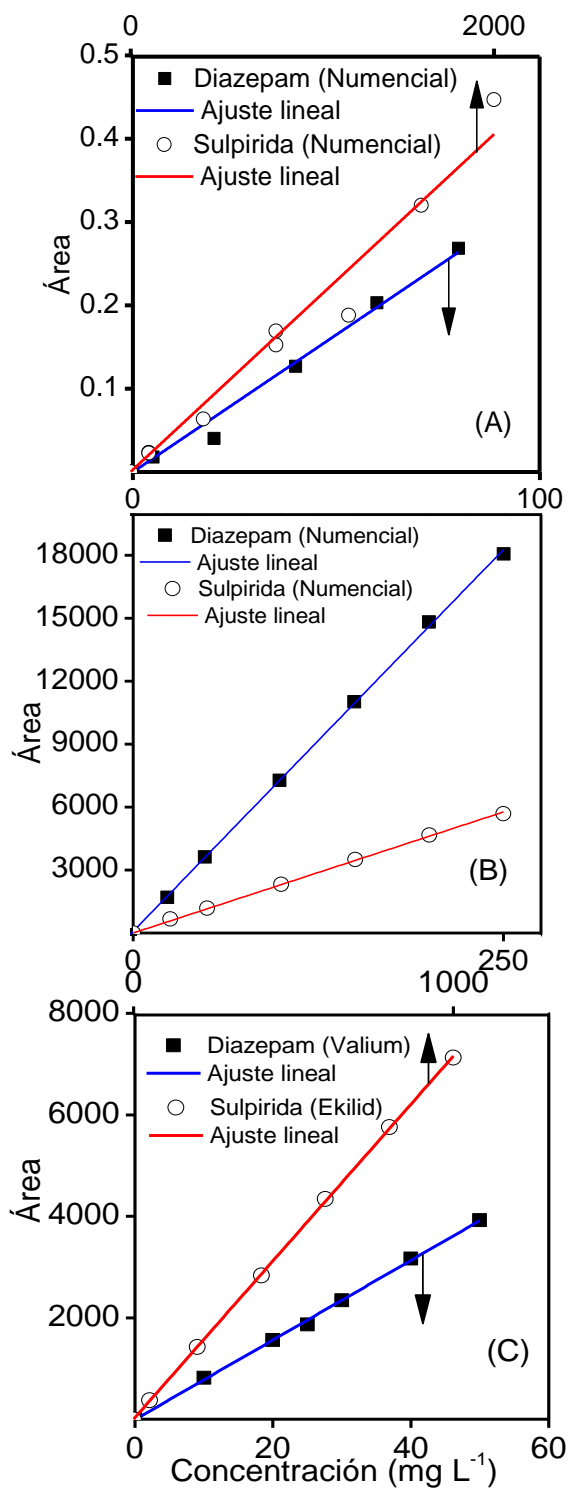


**Figura 2.1** Curva de calibración de Numencial por espectrofotometría UV-Vis (B) y su respectivo espectro UV (A).

### 2.4.3 Experimentos de adsorción en medio ácido en presencia de etanol

Se utilizó carbón activado encapsulado secado previamente a 200 °C por 24 h en una estufa. Se empleó una relación masa-volumen de 2 g L<sup>-1</sup>. La concentración inicial de Diazepam y Sulpirida fue de 250 mg L<sup>-1</sup>. Se monitoreó la concentración en el lapso de 0 a 20 minutos para la cinética y para la isoterma se estudió en el intervalo de concentración de 25-250 mg L<sup>-1</sup> para ambas sustancias. Las muestras fueron termostatazadas a 37 °C y con un tiempo de equilibrio de 20 minutos. La preparación de las disoluciones acuosas fue la siguiente: se preparó una disolución stock triturando 10 tabletas de Numencial tomado el equivalente a 62.5 mg de Diazepam y Sulpirida agregándolas a una disolución de 250 mL de HCl 0.03 N con un valor de pH 1.6 en presencia de etanol al 50%.

Se construyó una curva de calibración en el mismo intervalo de concentración (ver Fig. 2.2B).



**Figura 2.2** Curvas de calibración obtenidas por HPLC de Diazepam y Sulpirida en medio ácido pH 1.6 (A) y adicionalmente en presencia de etanol (B, C).

Para separar la disolución en equilibrio se emplearon filtros Minisart®-RC/SRP 0.45 µm. Las condiciones cromatográficas para la cuantificación se dan en la sección 2.2.2.

La cantidad adsorbida se calculó mediante:

$$a = \frac{V(C_0 - C_f)}{m} \quad (2.12)$$

donde **a** es la cantidad adsorbida (mg g<sup>-1</sup>), **V** es el volumen (L) en contacto con el adsorbente y **m** es la masa del adsorbente (g). **C<sub>0</sub>** y **C<sub>f</sub>** son las concentraciones inicial y final de las disoluciones, respectivamente.

Las ecuaciones de regresión para cada curva de calibración utilizadas en los cálculos de concentración en equilibrio y su respectivo coeficiente de correlación se muestran en la tabla 2.1

**Tabla 2.1** Ecuación de regresión y coeficiente de correlación para curvas de calibración obtenidas por HPLC.

Condiciones	Principio activo	Ecuación	R <sup>2</sup>
Numencial en medio ácido	Diazepam	A= 0.003C - 0.007	0.9822
	Sulpirida	A= 0.0002C - 0.014	0.9686
Numencial en medio ácido-etanol	Diazepam	A= 69.6C + 24.7	0.9995
	Sulpirida	A= 22.7C + 55.2	0.9994
Valium y Ekilid en medio ácido-etanol	Diazepam	A= 78.4C + 5.9	0.9991
	Sulpirida	A= 7.6C + 12.8	0.9998

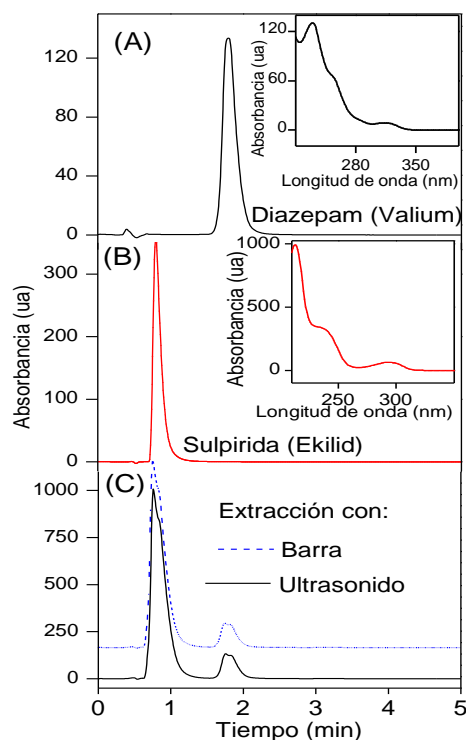
## CAPITULO III

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Extracción de principios activos

El principal objetivo de la extracción es eliminar los excipientes que acompañan a los principios activos en un medicamento, gracias a sus diferencias de solubilidad en el disolvente elegido y en el método de agitación utilizado. Este procedimiento se realiza con el fin de no acarrear sustancias extrañas al principio activo o la muestra sujeta a análisis y así obtener un mayor porcentaje de recuperación de la sustancia analito.

En la figura 3.1C se muestran los cromatogramas obtenidos después de la extracción con barra magnética y en digestor ultrasónico del preparado farmacéutico Numencial. Así mismo se presentan los cromatogramas individuales de Diazepam (Valium) (Fig. 3.1A) y Sulpirida (Ekilid) (Fig. 3.1B) con tiempo de retención de 1.7 min y 0.76 min, respectivamente.



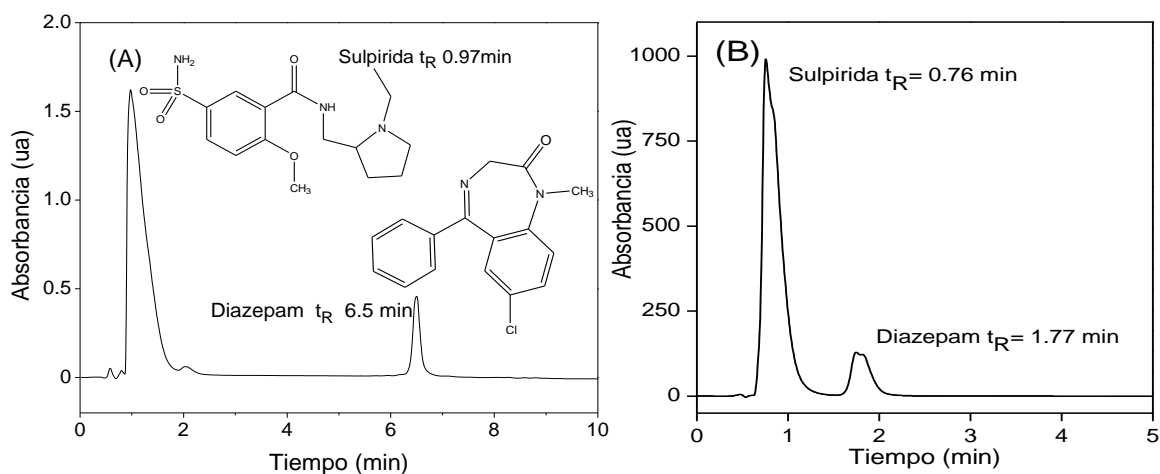
**Figura 3.1** Cromatogramas de (A) Diazepam, (B) Sulpirida y (C) Numencial después de la extracción de los principios activos por agitación con barra por ultrasonido. Las condiciones cromatográficas en régimen isocrático se presentan en la sección 2.2.2.

Para comprobar la idoneidad del sistema cromatográfico se estimó el número de platos teóricos, el factor de asimetría, el factor de capacidad, la selectividad y la resolución entre ambos picos. En la tabla 3.1 se muestran los valores de los parámetros antes mencionados. Estos valores muestran que el método utilizado presenta satisfactoria resolución y suficiente selectividad. El valor de N comparado con el de la ficha técnica de la columna (73300) es menor cuando se evaluó por el pico de Diazepam.

**Tabla 3.1** Parámetros del análisis cromatográfico en régimen isocrático en la Figura 3.1C.

<b>Parámetro</b>	<b>Diazepam</b>	<b>Sulpirida</b>	
Factor de capacidad k	2.8	0.7	
Factor de asimetría FA	0.92	0.14	
Número de platos teóricos N ( $m^{-1}$ )			60100
Selectividad $\alpha$			4.3
Resolución R			2.4

El cromatograma de una disolución acuosa de Numencial en medio ácido a pH 1.6 y las respectivas fórmulas de Diazepam y Sulpirida se presenta en la figura 3.2A y con la adición de 50% de etanol, en 3.2B. En estas figuras se observa diferencia significativa en el tiempo de retención para Diazepam y similar para Sulpirida, así como también se observa que los picos obtenidos en la figura 3.2A son esbeltos, mientras que en la siguiente, el pico de Diazepam se ensanchó. Esto puede atribuirse al método cromatográfico utilizado ya que en el primero se usó un método de gradiente y en el segundo fue isocrático.



**Figura 3.2** Cromatogramas DAD-HPLC de (A) una disolución acuosa de Numencial en medio ácido pH 1.6 y (B) una disolución acuosa de Numencial en medio ácido en presencia de etanol. Condiciones cromatográficas para (A) en régimen gradiente en sección 2.2.1 y para (B) en régimen isocrático en sección 2.2.2.

Los porcentajes de recuperación de Diazepam y Sulpirida mediante los procesos de extracción que se realizaron al preparado farmacéutico Numencial se muestran en la tabla 3.2, los cuales reflejan un porcentaje de extracción por agitación con barra mayor que por digestor ultrasónico con una diferencia mayor al 30 % para Diazepam e igual para Sulpirida.

**Tabla 3.2** Extracción de principios activos a partir de Numencial.

Método de agitación	Diazepam, (mg L <sup>-1</sup> )	Sulpirida, (mg L <sup>-1</sup> )	% Recuperado	
			Diazepam	Sulpirida
Barra magnética	24.2	490.4	97	98
Digestor ultrasónico	14.4	489.3	58	98

### 3.2 Validación

Todo método analítico deberá validarse, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados obtenidos son confiables.

Para validar el método desarrollado para el análisis de Diazepam y Sulpirida contenidos en los preparados farmacéuticos Valium y Ekilid, respectivamente; se emplearon los siguientes parámetros: linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad

y robustez. La validación se refiere a los extractos obtenidos mediante agitación con barra y para la separación de Diazepam y Sulpirida en régimen isocrático.

### 3.2.1 Linealidad

Como se muestra en la tabla 3.3, la prueba  $t$  para un nivel de confianza del 95% y  $n-2$  grados de libertad indican que estadísticamente hay proporcionalidad entre la concentración y la respuesta analítica dado a que si  $t_{exp}$  es mayor que  $t_{tabla}$  se rechaza la hipótesis nula la cual dice que “no existe correlación entre X e Y “ y por lo tanto sí existe correlación lineal significativa para el intervalo comprendido entre 10-50 mg L<sup>-1</sup> para Diazepam y 50-1000 mg L<sup>-1</sup> para Sulpirida. También muestra que los coeficientes de correlación y coeficientes de determinación ( $r$ ) y ( $r^2$ ) son  $\geq 0.99$ .

Todo lo anterior indica que el modelo lineal propuesto permite afirmar que el método es lineal en el intervalo de concentración evaluado para ambas sustancias y que los errores sistemáticos no afectan la linealidad.

**Tabla 3.3** Parámetros estadísticos de linealidad.

Parámetro	Diazepam, intervalo 10-50 (mg L <sup>-1</sup> )	Sulpirida, intervalo 50-1000 (mg L <sup>-1</sup> )
Pendiente b	78.4	7.6
Intercepto a	5.9	12.8
Coefficiente de determinación $r^2$	0.9976	0.9997
$t_{exp}$	182.5	163.3
$t_{tabla}$	2.1	2.1
Test de Student de la pendiente	4.3	5.0
Intervalo de confianza	69.3 ; 87.6	2.8 ; 18.1

### 3.2.2 Precisión

Los resultados de la precisión del método se muestran en la tabla 3.4, en la cual se presenta la desviación estándar relativa (RSD) calculada a partir de la desviación estándar S utilizando las ecuaciones 2.5 y 2.6 para  $n-1$  grados de libertad con un intervalo de confianza del 95% (ver ec. 2.7).



**Tabla 3.4** Parámetros para evaluar la precisión del método cromatográfico.

Parámetro	Diazepam	Sulpirida
Número de datos	6	6
Media $\bar{X}$	24.5	470.1
Desviación estándar S	0.40	0.65
% RSD	1.6	0.14
Intervalo de confianza de la media (mg)	23.7 ; 24.6	469.5 ; 470.8

Se obtuvo una RSD < 2% para ambas sustancias, por lo tanto se cumple la normativa fijada por la USP para este parámetro, como se mencionó en la sección 2.3.2.

### 3.2.3 Exactitud

El método analítico se considera exacto si se obtienen porcentajes de recuperación entre un 98 y 102%, y si el coeficiente de variación total para la recuperación es  $\leq 2\%$ . La tabla 3.5 muestra el porcentaje de recuperación y el valor calculado de  $t$  con  $n-1$  grados de libertad y un intervalo de confianza del 95%. En las disoluciones para Diazepam y Sulpirida el porcentaje de recuperación media fue superior al 98.0% y para la prueba  $t$  de Student, se puede apreciar que el valor calculado es menor que el tabulado; por tanto, se acepta la hipótesis nula y se afirma que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los datos y el 100%.

**Tabla 3.5** Prueba  $t$  de Student y porcentaje de recuperación de Diazepam y Sulpirida.

Parámetro	Diazepam	Sulpirida
% Recuperación	99.7	98.2
S	1.87	1.62
RSD	1.88	1.63
$t_{\text{exp}}$	0.44	1.02
$t_{\text{tabla}}$	2.04	2.04

### 3.2.4 Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Se estimaron los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) utilizando las ecs. 2.9 y 2.10 para los compuestos Diazepam y Sulpirida. Los valores de LOD y LOQ respectivamente se resumen en la tabla 3.6.

**Tabla 3.6** Determinación de la sensibilidad del método para Diazepam y Sulpirida.

Variable	Diazepam	Sulpirida
Ecuación de regresión	$Y = 78.44x - 7.86$	$Y = 7.63x + 8.19$
$Y_{bl}$	45.3	23.8
$S_{bl}$	1.3	8.5
Límite de detección LOD	0.9 mg L <sup>-1</sup>	3.6 mg L <sup>-1</sup>
Límite de cuantificación LOQ	1.7 mg L <sup>-1</sup>	4.8 mg L <sup>-1</sup>

Estos valores sirven para comprobar que el equipo posee una sensibilidad tal que permite cuantificar los analitos con el método empleado en disoluciones de concentración de 1.7 mg L<sup>-1</sup> para Diazepam y 4.8 mg L<sup>-1</sup> para Sulpirida. Así mismo permite detectarlos en disoluciones a una concentración de 0.9 mg L<sup>-1</sup> y 3.6 mg L<sup>-1</sup> para Diazepam y Sulpirida, respectivamente.

### 3.2.5 Robustez

La robustez de la metodología se estableció realizando pequeñas variaciones en los siguientes parámetros: temperatura, concentración de fase móvil y cambio de equipo. Un método es robusto si ante la presencia de estas modificaciones en las condiciones analíticas, éste no se ve afectado y es capaz de proporcionar resultados confiables, precisos y sin diferencia significativa en los resultados del análisis. En la Tabla 3.7 se reportan los parámetros cromatográficos obtenidos con las variaciones mencionadas.

**Tabla 3.7** Comparación de parámetros cromatográficos de ansiolíticos.

Parámetro	Régimen gradiente, 40 °C, Equipo Beckman		Régimen isocrático, 20 °C, Equipo Agilent	
	Diazepam	Sulpirida	Diazepam	Sulpirida
Factor de asimetría FA	1.4	0.8	0.9	0.1
Factor de capacidad k	10	0.6	2.8	0.7
Selectividad $\alpha$			15	4.3
Resolución R			12	2.4

En los datos obtenidos se observa que básicamente el régimen y la temperatura afectan el factor de asimetría, el factor de capacidad, la selectividad y la resolución. Debido a que el principal objetivo es la cuantificación de las sustancias, los cambios efectuados al método no deberían presentar variaciones significativas en los porcentajes de recuperación para ambas sustancias. En la tabla 3.8 se muestran los porcentajes de recuperación cuantificados por dos equipos diferentes con concentraciones iniciales de 25 mg L<sup>-1</sup> para Diazepam y 500 mg L<sup>-1</sup> para Sulpirida.

**Tabla 3.8** Porcentajes de recuperación de los ansiolíticos en distinto equipo HPLC por el método de agitación con barra.

Equipo utilizado	Diazepam, (mg L <sup>-1</sup> )	Sulpirida, (mg L <sup>-1</sup> )	% Recuperado	
			Diazepam	Sulpirida
Beckman (gradiente)	24.2	490.4	97	98
Agilent (isocrático)	22.9	475.8	91	95

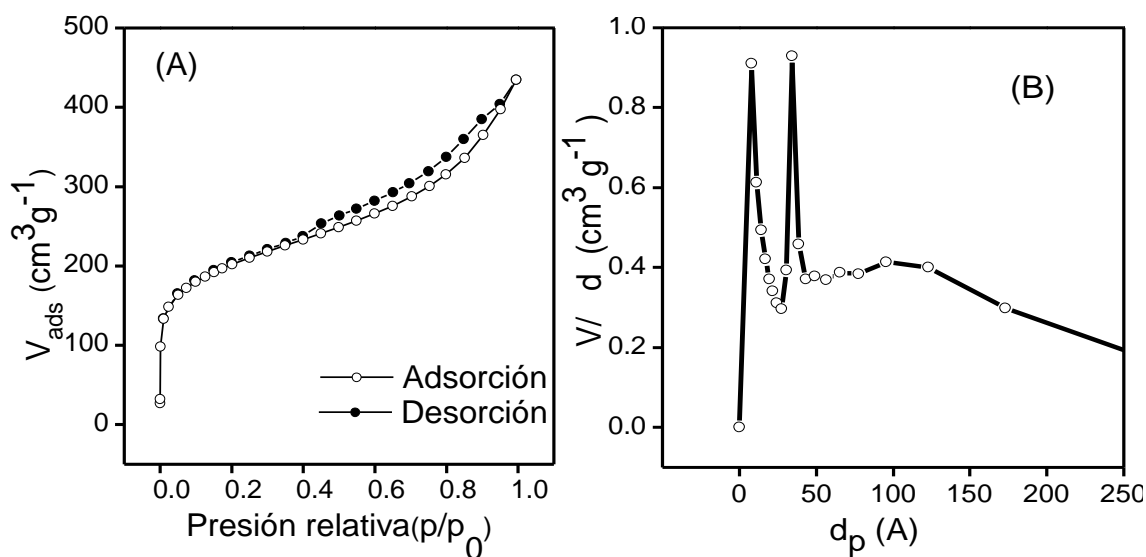
Los resultados de la cuantificación de ambas sustancias en 2 equipos, a dos temperaturas y regímenes diferentes muestran que la metodología de extracción propuesta es robusta. Además, es selectiva, lineal, precisa y exacta. Por lo tanto, es confiable para la cuantificación de los principios activos de Diazepam y Sulpirida en estudios de degradación, cinética y adsorción de los fármacos.

### 3.3 Adsorción

#### 3.3.1 Caracterización textural del carbón encapsulado

La caracterización textural de un adsorbente considera la determinación de la superficie específica la cual representa el área que el material posee por cada gramo del sólido y la porosidad, es decir, la existencia de poros o cavidades en el sólido.

La Figura 3.3 muestra la isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno a 77 K y la distribución de tamaño de poro del carbón encapsulado comercial. En la tabla 3.9 se presentan los parámetros obtenidos de superficie específica, el diámetro medio de poro, punto de carga cero y el tamaño de partícula del carbón encapsulado comercial usado en esta tesis. Los resultados mostraron que el carbón es un sólido neutro ( $\text{pH}_{\text{pzc}} 7.5$ ) y no nanoparticulado ( $d_p 53 \mu\text{m}$ ).



**Figura 3.3** (A) Isotherma de adsorción-desorción de  $\text{N}_2$  a 77 K del carbón encapsulado comercial, (B) Distribución de tamaño de poro evaluado empleando el método BJH.

La isoterma mostrada en la Figura 3.3A presenta un tipo II (clasificación Brunauer, Deming, Deming y Teller, BDDT) el cual es característico de procesos de adsorción en sólidos no porosos o microporosos, con formación de multicapa descrita por la ecuación de Brunauer-Emmett-Teller (BET), con ascenso del volumen adsorbido en la región media de la isoterma [21].

Debido al tamaño de poro promedio (Tabla 3.9), se considera que el sólido está constituido por mesoporos y la distribución de tamaño de poro es bimodal (Fig. 3.3B). Se observa que la muestra presenta un lazo de histéresis tipo H4 (clasificación IUPAC), el cual se asocia a poros estrechos en forma de rendija y se caracteriza por tener además de mesoporos, microporos típicos de los carbones activados [22]. La curva de distribución en la figura 3.3B calculada por el método Barrett, Joyner, Halenda (BJH) evidencia una distribución bimodal centrada en 0.8 nm (microporos) y en 3.4 nm (mesoporos).

**Tabla 3.9** Caracterización textural del adsorbente.

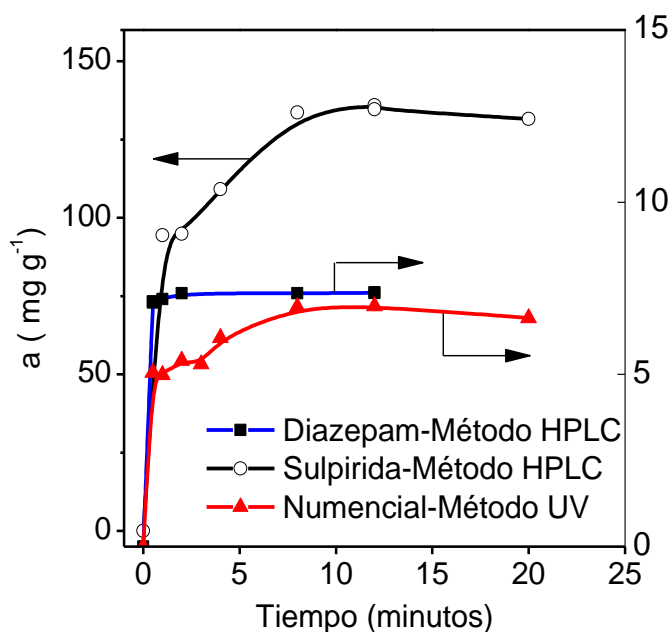
<b>Material</b>	$S_{\text{BET}}$ , ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ )	Diámetro promedio de poro $\bar{d}_p$ , (nm)	$\text{pH}_{\text{pzc}}$	Tamaño de partícula, (mm)
<b>Carbón activado encapsulado</b>	672	4	7.5	0.053

### 3.3.2 Curvas cinéticas de adsorción en medio ácido

En la curva cinética de adsorción se espera tener el tiempo en el cual la distribución del soluto alcanza el equilibrio en la fase volumétrica y adsorbida. Dicho con otras palabras, en términos de farmacocinética, con qué rapidez se alcanza la máxima eficacia (máxima adsorción). La Figura 3.4 muestra las respectivas curvas cinéticas de adsorción de Diazepam y Sulpirida en medio ácido a pH 1.6. Se observa que el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio es de 20 minutos. Cada gramo de carbón habrá capturado entonces sólo  $7 \text{ mg g}^{-1}$  de Diazepam y  $130 \text{ mg g}^{-1}$  de Sulpirida; por lo tanto, para contrarrestar los efectos toxicológicos que estas sustancias causan en dosis elevadas es necesario administrar dosis consecutivas de carbón activado, con la finalidad de disminuir la absorción de los fármacos en el intestino.

Los datos experimentales de curvas cinéticas de adsorción se ajustaron mejor al modelo de Lagergren (*pseudo*-primer orden), dado a que la cantidad adsorbida en el equilibrio calculada teóricamente con este modelo corresponde a la obtenida experimentalmente.

En la tabla 3.10 se muestran las respectivas constantes de velocidad en las cuales se observa que Sulpirida ( $k_1 = 1.0 \text{ min}^{-1}$ ) alcanza más rápidamente el equilibrio de adsorción que Diazepam ( $k_1 = 6.9 \text{ min}^{-1}$ ).



**Figura 3.4** Curvas cinéticas de adsorción sobre carbón activado encapsulado, de Diazepam, Sulpirida y Numencial en medio ácido a 37 °C empleando una relación m/V de 6.7 g L<sup>-1</sup>.

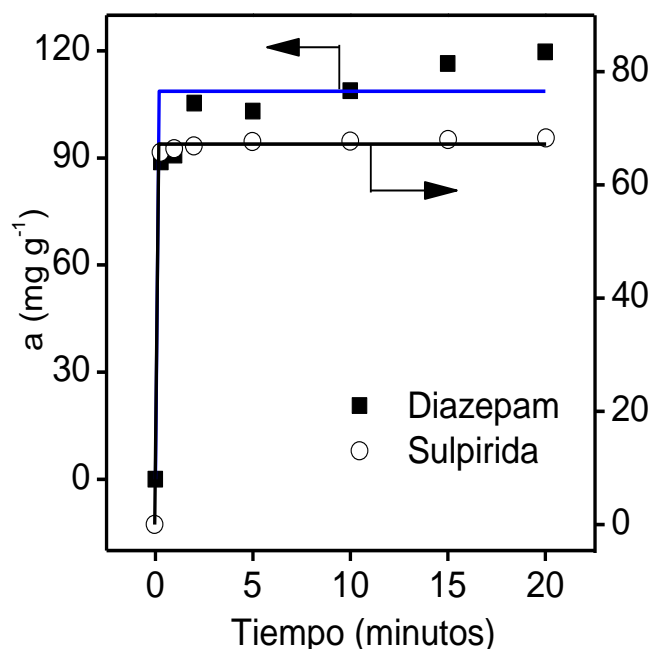
**Tabla 3.10** Constantes de velocidad de adsorción de *pseudo*-primer orden de los principios activos.

Sustancia	Constante de <i>pseudo</i> -primer orden aplicando la ecuación de Lagergren, (min <sup>-1</sup> )	
	Medio ácido	Medio ácido- etanol
Diazepam	$k_1 = 6.9$	$k_1 = 6.7$
Sulpirida	$k_1 = 1.0$	$k_1 = 1.4$

### 3.3.3 Curvas cinéticas de adsorción en medio ácido en presencia de etanol

Dentro de la fatalidad de una intoxicación aguda medicamentosa está la combinación de fármacos ansiolíticos con la ingesta de alcohol, dado a que el alcohol es un agente que potencia los efectos producidos por dichas drogas. En la figura 3.5 se presentan las curvas cinéticas de adsorción en medio ácido en presencia de etanol de Diazepam y Sulpirida sobre el adsorbente carbonáceo

encapsulado a una temperatura de 37 °C empleando una concentración inicial de 250 mg L<sup>-1</sup>.



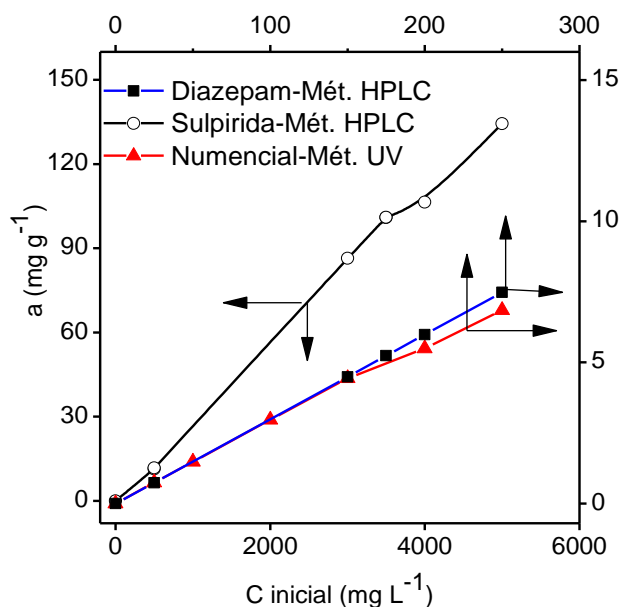
**Figura 3.5** Curvas cinéticas de adsorción sobre carbón activado encapsulado de Diazepam y Sulpirida en medio ácido en presencia de etanol. T 37 °C, relación m/V 2 g L<sup>-1</sup>, Concentración inicial: 250 mg L<sup>-1</sup> de cada compuesto. Símbolos: datos experimentales. Línea ajuste a la ecuación de Lagergren.

Se observa un incremento de la cantidad adsorbida por el adsorbente con el transcurso del tiempo. Así mismo, en comparación con el gráfico de la figura 3.4 no existe diferencia significativa en el tiempo en el cual los fármacos alcanzan el equilibrio de adsorción con el adsorbente carbonáceo. Los datos experimentales de las curvas cinéticas de adsorción para ambos compuestos se ajustaron también empleando el modelo no lineal de Lagergren (*pseudo*-primer orden). En la tabla 3.10 se presentan las constantes de velocidad para ambos compuestos mostrando una vez más que Sulpirida ( $k_1= 1.4 \text{ min}^{-1}$ ) se adsorbe más rápidamente que Diazepam ( $k_1= 6.7 \text{ min}^{-1}$ ). La notable diferencia en presencia de etanol es la magnitud de Diazepam adsorbido en equilibrio; aproximadamente 115 mg g<sup>-1</sup>, cuando en ausencia fue 7 mg g<sup>-1</sup>. Este resultado es relevante porque si bien el alcohol potencia el efecto de las drogas, también el alcohol permite un eficaz desempeño detoxificante del carbón. El efecto sobre Sulpirida es contrario, ya que

sin y con presencia de alcohol las cantidades adsorbidas son de  $130 \text{ mg g}^{-1}$  y  $70 \text{ mg g}^{-1}$  respectivamente, observándose una disminución en el efecto detoxificante del adsorbente para este principio activo.

### 3.3.4 Isotermas de adsorción en medio ácido

La adsorción es un proceso fisicoquímico mediante el cual las moléculas de una sustancia son retenidas en la superficie de un material sólido con propiedades específicas. El estudio de adsorción de Diazepam y Sulpirida sobre el adsorbente carbonáceo comercial en medio ácido a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  después de un tiempo de equilibrio de 20 minutos se representa en la figura 3.6. Los datos experimentales fueron ajustados a la ecuación de Henry, la cual hace referencia a que la cantidad adsorbida será proporcional a la concentración que se tenga del soluto en disolución. Las constantes obtenidas para ambos ansiolíticos se muestran en la tabla 3.11.



**Figura 3.6** Isotermas de adsorción de Numencial, Sulpirida y Diazepam en medio ácido a una temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  empleando una relación m/V de  $6.67 \text{ g L}^{-1}$ .

Se observa que el carbón no llega a saturarse. Esto puede atribuirse a que la concentración fijada como máxima ( $5000 \text{ mg L}^{-1}$ ) es insuficiente para saturar al adsorbente.



**Tabla 3.11** Constantes de adsorción en medio ácido sin y en presencia de etanol de Diazepam y Sulpirida.

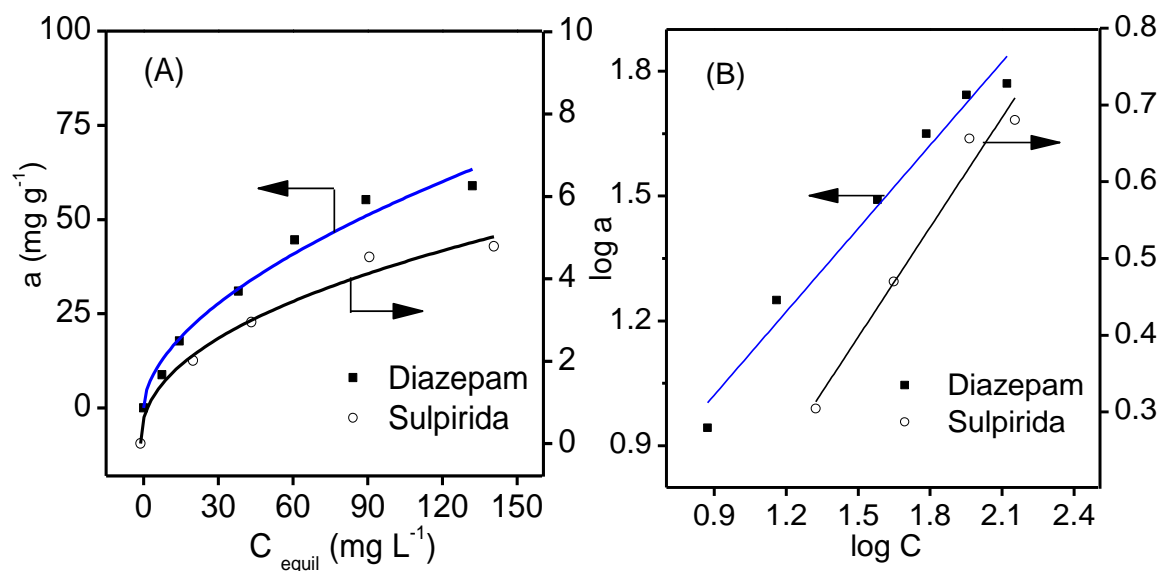
Sustancia	Constante de Henry, ( $L\ g^{-1}$ )		Constante de Freundlich, ( $L\ g^{-1}$ ) <sup>n</sup> medio ácido-EtOH
	Medio ácido	Medio ácido-EtOH	
Diazepam	$k_H = 0.03$	$k_H = 0.06$	$k_F = 0.42$
Sulpirida	$k_H = 0.03$	$k_H = 0.03$	$k_F = 0.69$

Para la construcción de las curvas cinéticas (fig. 3.5) e isothermas de adsorción (fig. 3.6) la cuantificación de Diazepam y Sulpirida fue realizada por dos metodologías: por cromatografía HPLC y por espectrofotometría UV-VIS. Ambos métodos analíticos permiten conocer la concentración de una sustancia mediante la absorbancia a una longitud de onda determinada, sin embargo existe una diferencia significativa entre ambos métodos. El uso de cromatografía HPLC-DAD permite monitorear la sustancia a diferentes longitudes de onda, dando como resultado el espectro de cada una de las muestras de interés, facilitando el análisis cuantitativo de los compuestos en forma individual. La espectrofotometría UV-VIS proporciona únicamente un solo dato de absorbancia de la banda seleccionada, sin importar los componentes que estén presentes. Es importante conocer lo que se desea analizar para poder elegir el detector adecuado que permita obtener un mejor resultado.

### 3.3.5 Isothermas de adsorción en medio ácido en presencia de etanol

Los datos experimentales de la isoterma de adsorción del carbón activado encapsulado en contacto con los fármacos se graficaron en la figura 3.7 la cual muestra las isothermas de adsorción de Diazepam y Sulpirida en presencia de etanol y HCl a una temperatura de 37 °C después de un tiempo de equilibrio de 20 minutos. Los datos experimentales fueron correlacionados al ajuste teórico de Henry y al modelo de Freundlich, siendo este modelo el que mejor describió el comportamiento de adsorción de las sustancias. Esta ecuación se aplica para relacionar la concentración de un soluto en la superficie de un adsorbente, en la que se asume que la superficie del adsorbente es energéticamente heterogénea, conformada por grupos de sitios de adsorción de energías características.

Las constantes de Henry obtenidas para ambos ansiolíticos se muestran en la tabla 3.11 en donde se observa un incremento de las constantes de adsorción para ambos ansiolíticos en presencia de etanol. En ausencia de etanol la  $k_H$  es igual para ambos compuestos; en cambio en presencia de alcohol la constante  $k_H$  (Diazepam) es mayor que la  $k_H$  (Sulpirida).



**Figura 3.7** Isotermas de adsorción sobre carbón activado de Diazepam y Sulpirida (A) en medio ácido en presencia de etanol, tiempo de equilibrio 20 min, con relación m/V de 2 g L<sup>-1</sup> a una temperatura de 37 °C. Símbolos: datos experimentales (B). Línea ajuste a la ecuación de Freundlich.

Se observa una diferencia clara entre las isotermas de adsorción obtenidas en las figuras 3.6 y 3.7, ya que en medio ácido el adsorbente no se satura y se obtienen isotermas en la región de Henry, mientras que en presencia de etanol se observa una adsorción mayor no proporcional a la concentración, por lo tanto se comienza a observar la formación de la meseta; es decir, los sitios activos del adsorbente empiezan a llenarse por los adsorbatos, tanto del ansiolítico como del etanol.

El etanol favorece la interacción de las moléculas de las sustancias poco solubles y conjuntamente con el medio ácido se favorece la adsorción de los compuestos ya que el carbón es anfótero y a un pH ácido se carga positivamente lo que hace que interaccione rápidamente con las moléculas del fármaco.

Dadas las cantidades adsorbidas y las constantes de Henry y Freundlich se puede decir que el principio activo Diazepam presenta una adsorción más favorable en comparación con el ansiolítico Sulpirida. Esta situación se presenta debido a las propiedades fisicoquímicas de ambos compuestos como se discutirá en la siguiente sección.

### **3.4 Correlaciones estructura-retención cromatográfica-adsorción**

El comportamiento tanto cromatográfico como de adsorción estudiado en esta tesis depende de las características fisicoquímicas de las sustancias investigadas como son: peso molecular, coeficiente de partición, constante de disociación, polarizabilidad, formación de puentes de hidrógeno, área superficial hidrofóbica y la polaridad de las moléculas. En esta sección se darán a conocer dichas propiedades así como la correlación que existe entre ellas en cuanto a la retención cromatográfica y a la adsorción sobre carbón activado encapsulado.

#### **3.4.1 Descriptores del Diazepam y la Sulpirida**

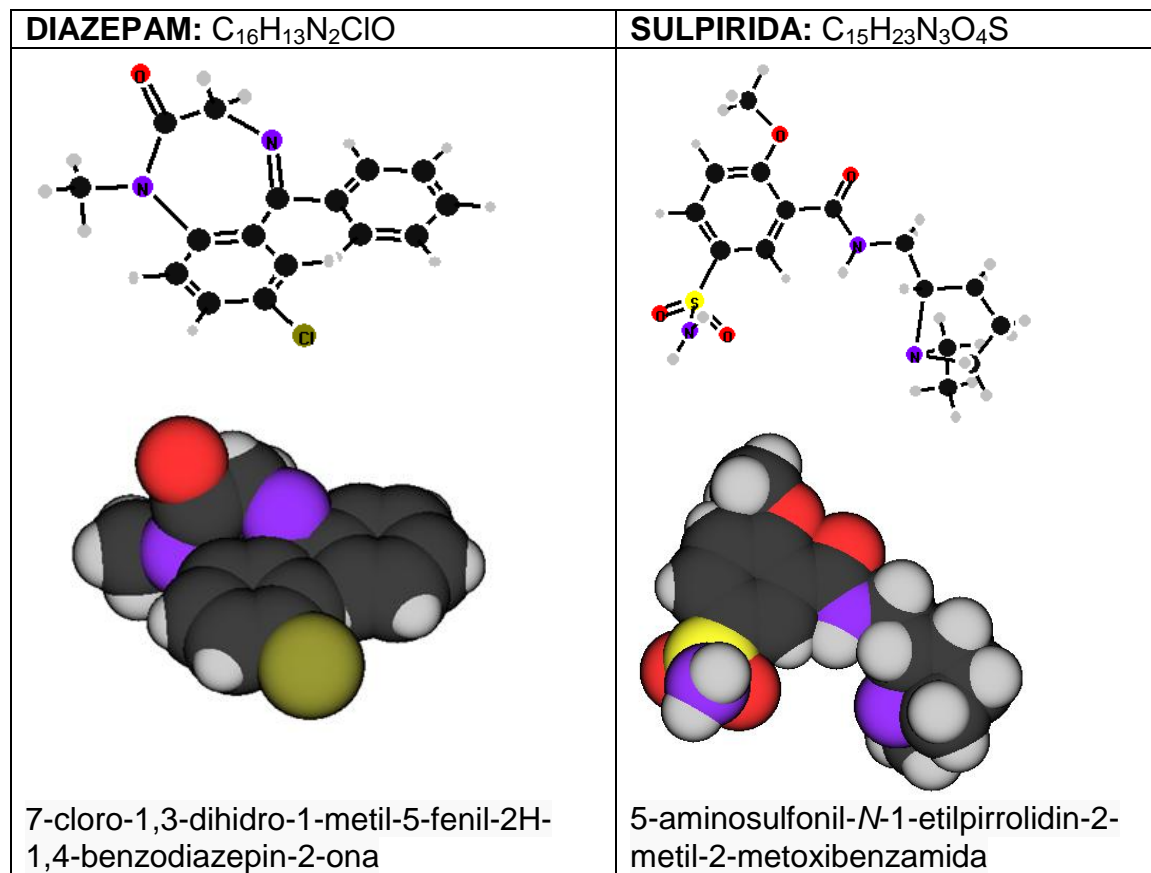
Diazepam y Sulpirida son moléculas polares compuestas principalmente por grupos amino, éter, sulfonilo, carbonilo y un halogenuro. En las tablas 3.12 y 3.13 se muestran las estructuras químicas de ambos ansiolíticos, su nombre establecido por la IUPAC y algunas de las propiedades fisicoquímicas de cada uno.

**Tabla 3.12** Propiedades fisicoquímicas involucradas en la retención cromatográfica y en la adsorción de los psicofármacos.

Propiedades	Diazepam	Sulpirida
<sup>2</sup> Peso molecular, g mol <sup>-1</sup>	284.74	341.43
<sup>1</sup> Área molar, cm <sup>2</sup> mol <sup>-1</sup>	17.2 x 10 <sup>9</sup>	23.4 x 10 <sup>9</sup>
<sup>2</sup> Área molecular, nm <sup>2</sup>	1.75	3.72
<sup>1</sup> Solubilidad en agua, mg L <sup>-1</sup> (25 °C)	50	2280
<sup>2</sup> Punto de fusión, °C	126	178
<sup>1</sup> log P	4.18	0.44
<sup>1</sup> pK <sub>a</sub>	3.4	9.1
<sup>1</sup> Polarizabilidad, Å <sup>3</sup>	29.4	36.2
<sup>2</sup> Polaridad, MPa <sup>0.5</sup>	6.3	8.4
<sup>2</sup> Enlaces de hidrógeno, MPa <sup>0.5</sup>	8.0	12.8
<sup>2</sup> Superficie hidrofóbica, %	74	53
<sup>2</sup> Energía de Interacción dipolo, kJ mol <sup>-1</sup>	-13.8	-68.6

1: experimental, 2: calculada por software

**Tabla 3.13** Estructuras espaciales de Diazepam y Sulpirida en conformación de mínima energía.



### **3.4.2 Correlaciones polaridad-orden de elución**

En la retención cromatográfica un factor importante a considerar es la polaridad de una molécula, teniendo en cuenta tanto la interacción con la fase estacionaria, como con la fase móvil ya que ésta última debe ser capaz de permitir la retención de las moléculas para después eluirlas. En los cromatogramas presentados en la sección 3.1 se observa que el primer compuesto en eluir es Sulpirida y posteriormente Diazepam. Esto se puede explicar con la polaridad de la molécula, ya que la fase estacionaria utilizada en el análisis fue “fase reversa”.

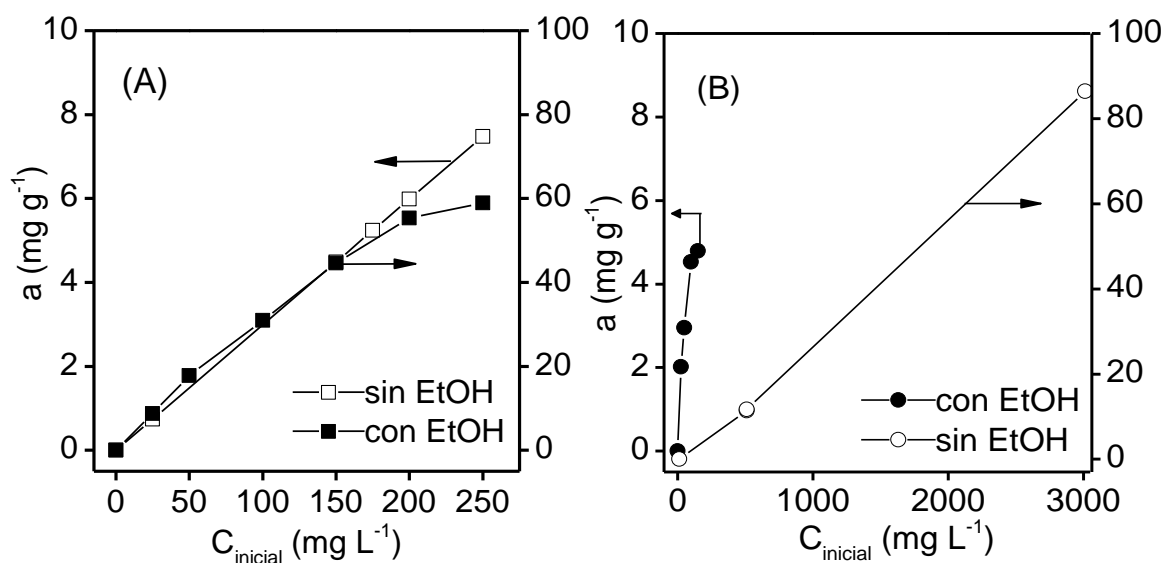
En la tabla 3.12 se observa que la polaridad de Sulpirida ( $8.4 \text{ MPa}^{0.5}$ ) es mayor en comparación con la de la molécula de Diazepam ( $6.3 \text{ MPa}^{0.5}$ ); situación atribuida principalmente a la presencia de grupos electronegativos fuertes como el sulfonilo, el carbonilo y los amino presentes en la molécula de Sulpirida. La característica de polaridad es congruente con los valores de  $\log P$  calculados: 0.44 para Sulpirida y 4.18 para Diazepam, ya que  $\log P$  es el coeficiente de reparto entre dos disolventes inmiscibles e indica la relación del carácter hidrofílico e hidrofóbico de una sustancia. Altos valores relativos de  $\log P$  indican mayor contenido del sustrato en el disolvente hidrofóbico (frecuentemente 1-octanol). La formación de enlaces de hidrógeno también parece jugar un papel importante en la elución, ya que la fase móvil utilizada favorece la interacción con Sulpirida mediante la formación de puentes de hidrógeno.

### **3.4.3 Correlaciones tamaño molecular-tamaño de poro-adsorción**

Existen diversos factores que intervienen en la adsorción de una sustancia. Entre las principales se encuentran las interacciones moleculares adsorbato-adsorbente, el tamaño molecular de las sustancias a adsorber y el tamaño de poro del adsorbente, en este caso el carbón activado encapsulado. El diámetro promedio de poro del carbón activado empleado en esta tesis es de 4 nm correspondiente al tamaño de mesoporos. Este tamaño permite difundir a los ansiolíticos debido a que su tamaño molecular no supera los 4 nm, ya que suponiendo idealmente una

geometría molecular cuadrada, el diámetro sería aproximadamente 1.3 nm y 1.9 nm para Diazepam y Sulpirida, respectivamente.

La adsorción puede estar relacionada tanto con el área molecular como con la polaridad de las moléculas. Para observar este efecto, las isotermas de adsorción de Diazepam y Sulpirida contenidos en mezcla en el medicamento Numencial se evaluaron en forma individual. En la figura 3.8 se observa que Diazepam se adsorbe en mayor grado que Sulpirida en ausencia y en presencia de etanol. Así mismo, las cantidades adsorbidas individualmente de cada sustancia se favorecieron en presencia de etanol. La mayor polaridad de Sulpirida y su menor superficie hidrofóbica explica que la interacción con un adsorbente carbonáceo hidrófobo sea menor que la del Diazepam. Esto también puede atribuirse a la elevada formación de enlaces de hidrógeno que la molécula de Sulpirida presenta y que favorece la interacción con el medio acuoso.



**Figura 3.8** Isotermas de adsorción individuales de (A) Diazepam y (B) Sulpirida contenidos en Numencial, relación m/V  $6.7 \text{ g L}^{-1}$  y  $2 \text{ g L}^{-1}$  en medio ácido con y sin presencia de etanol, respectivamente a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , tiempo de equilibrio 20 minutos sobre carbón activado encapsulado.

De los resultados de adsorción de los componentes del Numencial como disolución binaria se observa que el etanol favoreció significativamente la adsorción de Diazepam ya que sin y con etanol la cantidad adsorbida fue de 7 mg

$\text{g}^{-1}$  y  $60 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente. Este fenómeno puede atribuirse a la mayor polarizabilidad de la Sulpirida, la cual al desplazarse a la fase acuosa, libera sitios activos superficiales que pueden interaccionar con las moléculas de Diazepam. Además la superficie del carbón activado presenta una carga positiva ya que  $\text{pH } 1.0 < \text{pH}_{\text{pzc}} 7.5$ . Esto favorece las interacciones con los grupos electronegativos de la molécula de Diazepam aumentando significativamente su retención sobre la superficie del carbón encapsulado.

## CONCLUSIONES

### Análisis cromatográfico

- Los resultados obtenidos muestran que el método cromatográfico propuesto es, lineal, selectivo, preciso y exacto.
- La extracción de Diazepam fue más efectiva por agitación con barra (98%) que por digestor ultrasónico (60%). Para el fármaco Sulpirida los porcentajes de recuperación por ambos métodos fueron similares.

### Estudios de adsorción

- En medio ácido en presencia y ausencia de etanol, Sulpirida se adsorbe más rápidamente que Diazepam.
- En medio ácido y una concentración de  $250 \text{ mg L}^{-1}$ , el tiempo requerido para actuar fue de 20 minutos. Cada gramo de carbón habrá capturado entonces sólo  $7 \text{ mg g}^{-1}$  de Diazepam y  $130 \text{ mg g}^{-1}$  de Sulpirida.
- En presencia de etanol la cantidad adsorbida de Diazepam aumentó significativamente a  $115 \text{ mg g}^{-1}$ . Por lo tanto se observa que el alcohol permite un mayor desempeño detoxificante del carbón.
- En medio ácido, la adsorción transcurre sin saturación del carbón, mientras que en presencia de etanol el adsorbente llega a la saturación.
- La dosis utilizada para contrarrestar una intoxicación por Diazepam ( $1 \text{ g/kg}$ ), se reduce a  $0.7 \text{ g/kg}$  y en presencia de etanol a  $0.05 \text{ g/kg}$  de carbón activado.
- El tiempo en el que se alcanza el equilibrio de adsorción es muy corto, por lo cual el uso de carbón activado puede ser administrado en dosis consecutivas menores a las utilizadas actualmente y no necesariamente en solución.
- Al utilizar dosis bajas de carbón activado en intoxicaciones por Diazepam se reduce el riesgo de complicaciones como la broncoaspiración.



## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Barceló L.D., López M., Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes, (2011) 12-18  
<http://www.unizar.es/fnca/varios/panel/15.pdf>
  
- [2] Savransky N., Goldin L., Pharmaceuticals in the Water A look at an emerging and pressing issue, Senior Essay, 98 (2000) 8-10.
  
- [3] Romar R., Hallan restos de antidepresivos y ansiolíticos en el agua de Galicia, La Voz de Galicia SA, (2012) 2141.
  
- [4] Fick J., Lindberg R.H., Tysklind M., Larsson D.G., Predicted critical environmental concentrations for 500 pharmaceuticals, Regul. Toxicol. Pharm. 58 (2010) 516-523.
  
- [5] Bisen J.R., Montalbán S.R., Investigación y desarrollo de nuevos fármacos ansiolíticos, Congreso virtual de psiquiatría, (2000) 20.
  
- [6] Lorenzo-Velázquez B., Moreno A., Lizasoain I., Leza J.C., Moro M.A., Portolés A., Farmacología Básica y Clínica, Medica Panamericana, Buenos Aires, 18ª, (2008) 275-291.
  
- [7] <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00829>  
Página de internet consultada en el mes de noviembre del año 2014.
  
- [8] Brunton L., Lazo Y.S., Parker K.L., Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la Terapéutica, Mc Graw Hill, Madrid, 12ª, (2012) 76-87.
  
- [9] [http://www.farmaciazamora.com.mx/plm/productos/ekilid\\_50\\_capsulas.htm](http://www.farmaciazamora.com.mx/plm/productos/ekilid_50_capsulas.htm)  
Libro electrónico: Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, PLM 2012  
Página de internet consultada en el mes de octubre del año 2014.

- [10] Quattrocchi O.A., Andrizzi S.I., Laba R.F., Introducción a la HPLC Aplicación y práctica, Artes Gráficas Farro SA, (1992) 301-327.
- [11] Álvarez A., Trujillo González M., Desarrollo y validación de un método analítico indicativo de estabilidad por HPLC para la cuantificación de Rosuvastatina cálcica, Colomb. Cienc. Quím. Farm. 43 (2014) 69-72.
- [12] Berzas J.J., Castañeda G., Pinilla M.J., Determination of Diazepam and associated compounds in pharmaceutical preparations, Fresenius J. Anal. Chem. 364 (1999) 570-575.
- [13] Sruthi A., Texaswi P., Thanuja N., Sudheer D., Vivek P., Simple RP-HPLC method for estimation of diazepam in tablet dosage form, J. Pharm. Res. 6 (2013) 140-144.
- [14] Babu V.R., Sharma P.K., Analytical method development and validation for simultaneous estimation of Imipramine and Diazepam in tablet dosage form by RP-HPLC, Int. J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 5 (2013) 249-253.
- [15] Eiichi M., Tomomi G., Hisao O., Hisayuki K., Simultaneous Analysis of Seven Benzodiazepines in Dietary Supplements as Adulterants Using High Performance Liquid Chromatography and its Application to an Identification System for Diazepam, J. Health Sci. 51 (2005) 278-283.
- [16] Dalmazzo R., Intoxicación por ingesta de medicamentos, Med. Clin. Condes 20 (2009) 878-882.
- [17] <http://growlandia.com/marihuana/analisis-de-sustancias-adictivas-mas-usadas-en-el-mundo/>  
Página de internet consultada en el mes de octubre de 2014.

- [18] Carson H.J., Classes of drugs and their prevalence in multiple drug intoxication in suicides and accidents, Legal Medicine 10 (2008) 92-95.
- [19] Karim A., Ivatts S., Dargan P., Jones A., How feasible is it to conform to the European guidelines on administration of activated charcoal within one hour of an overdose? Emerg. Med. J. 18 (2001) 390-392.
- [20] <http://blog.casapia.com/los-beneficios-del-carbon-activado-que-es-y-como-se-usa/>  
Página de internet consultada en el mes de noviembre de 2014.
- [21] Martín-Martínez J.M., Adsorción física de gases y vapores por carbones, Secretariado de publicaciones de la Universidad de Alicante 1990.
- [22] Rouquerol F., Rouquerol J., Sing K., Adsorption by Powders & Porous Solids Principles Methodology and Applications, Academic Press, (1999) 439-444