



**Universidad  
Norbert Wiener**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA  
ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE FARMACIA  
Y BIOQUIMICA**

**DETERMINACION DE UNA TÉCNICA SELECTIVA POR CROMATOGRAFÍA  
EN CAPA FINA PARA IDENTIFICACIÓN DE BENZODIAZEPINAS. DICIEMBRE  
2017**

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Presentado por:

Br.: LAURA MONICA JIMENEZ MARTINEZ

Br. : YESSICA RODRIGUEZ GARIZA

Asesor:

Q.F. Mg José LLahuilla Quea

Lima – Perú

2018

## **DEDICATORIA**

A mi padre por creer en mí, por haberme enseñado el camino para poder crecer, emprender y volar, pero sobre todo para levantarme ante la adversidad.

A mi madre, que ha sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos, valores y ayudarme a salir adelante en los momentos más difíciles.

A mis hermanos Magdalena y Augusto y a mis sobrinos por ser parte de mi vida y apoyarme incondicionalmente en todo momento de mi vida.

A Billy por estar siempre a mi lado enseñándome a valorar las cosas, la perseverancia y el esfuerzo sin límites cuando te propones alcanzar un sueño.

Agradezco a Dios por la vida, la dicha de lograr mi meta y tenerlos a mi lado siempre juntos.

Br. Laura Mónica Jiménez Martínez.

## **DEDICATORIA**

A mis familiares que me han apoyado cada etapa de mi vida, en especial a mis padres y hermanos que me han apoyado y acompañado día a día.

A mi madre, por su apoyo y estar siempre a mi lado todos estos años, dándome sus enseñanzas y amor a Dios.

A mi padre por sus consejos y ejemplo de perseverancia, me ha enseñado a valorar la vida.

A mi querida hija por ser el motor y motivo de mi superación.

A mi esposo por apoyarme y ayudarme en todos estos años, le agradezco infinitamente.

Br. Yessica Rodriguez Gariza.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por guiarnos día a día y a todos los que tuvimos la oportunidad de compartir, conocernos durante los años de estudios y permitir llegar a esta importante etapa de nuestras vidas.

A nuestras familias por ser nuestro motor y motivo de superación. A nuestro asesor Mg. LLahuilla Quea José Antonio por compartir sus experiencias y conocimientos en la elaboración del presente trabajo.

A nuestro jurado a la Dra. Juana Chávez Flores por su aporte, disponibilidad y sugerencias en el presente trabajo, también al Q.F. Manuel Marín Bravo y al Q.F. Toxicólogo Jesús Víctor Lizano Gutiérrez.

A todas las personas que de una u otra manera nos orientaron y apoyaron en la elaboración de la presente investigación, al Q.F. Toxicólogo César Augusto Canales Martínez, a todos ellos nuestro profundo agradecimiento.

Br. Laura Mónica Jiménez Martínez.

Br. Yessica Rodriguez Gariza.

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMEN</b>	
<b>SUMMARY</b>	
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
1.1. Planteamiento del problema	2
1.2. Formulación del problema	3
1.3. Justificación	3
1.4. Objetivos	4
1.4.1 Objetivo general	4
1.4.2 Objetivos específicos	4
1.5. Variables	4
1. Variable independiente	4
2. Variable dependiente	4
3. Variable interviniente	4
1.6. Hipótesis	5
1. Hipótesis general	5
2. Hipótesis específica	5
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	<b>6</b>
2.1. Antecedentes de investigación	6
2.1.1 Antecedentes internacionales	6
2.1.2 Antecedentes nacionales	7
2.2. Bases teóricas	8
2.2.1 Definición de Benzodiazepinas	8
2.2.2 Propiedades fisicoquímicas de la Benzodiazepinas	10
2.2.3 Tipo de Benzodiazepinas.	10
2.2.4. Farmacología	12
2.2.5 Farmacodinamia	14
2.2.6 Farmacocinética	15
2.2.7 Diazepam	18

2.2.8 Alprazolam	22
2.3. Cromatografía de capa fina	24
<b>III. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>25</b>
3.1. Tipo de investigación	25
3.2. Población y Muestra	25
3.3. Técnica Operatoria	25
3.3.1 Recolección de muestras	25
3.4. Material de laboratorio, reactivos. solventes y equipos	25
3.4.1. Materiales	25
3.4.2. Reactivos y solventes	26
3.4.3. Equipos	26
3.5. Procedimiento	27
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>30</b>
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>38</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	<b>39</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>40</b>
<b>IX. ANEXOS</b>	<b>43</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Reactivos para la identificación de Benzodiazepinas, Alprazolam y Diazepam	31
<b>Tabla 2.</b> Identificación de Benzodiazepinas con el reactivo de Dragendorff.	32
<b>Tabla 3.</b> Comparación de los Rf de Alprazolam y Diazepam presentes en la muestra de orina de los pacientes voluntarios con el estándar de Fenitoína	33
<b>Tabla 4.</b> Identificación de Benzodiazepinas con el reactivo de Iodoplatinato	34
<b>Tabla 5.</b> Muestras de orina analizadas con benzodiazepinas y otras sustancias de personas voluntarias sanas.	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Estructura química del Diazepam	18
<b>Figura 2.</b> Estructura química del Alprazolam	22
<b>Figura 3.</b> Reacción de dragendorff con Diazepam	30
<b>Figura 4.</b> Reacción de dragendorff con Alprazolam	30
<b>Figura 5.</b> Reacción de drangerdoff con Fenobarbital	30

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>Anexo 1.</b> Preparación de material de vidrio y reactivos químicos en el laboratorio de Toxicología Universidad Norbert Wiener	43
<b>Anexo 2.</b> Preparación de los reactivos, de los equipos y las placas para la determinación de Benzodiazepinas en el laboratorio de Toxicología de la Universidad Mayor de San Marcos	43
<b>Anexo 3.</b> Secado de Placas cromatográficas con Silicagel G	44
<b>Anexo 4.</b> Muestras de orina con Diazepam y Alprazolam	44
<b>Anexo 5.</b> Proceso de extracción de la muestra de orina de metabolitos benzodiazepínicos (Diazepam y Alprazolam) de personas voluntarias sanas	45
<b>Anexo 6.</b> Siembra de las placas cromatograficas con los estándares secundarios de Diazepam y Alprazolam	45
<b>Anexo 7.</b> Preparacion del sistema solvente Metanol:Acetona (1:1 V/V)	46
<b>Anexo 8.</b> Revelado físico de las Benzodiazepinas usando UV	46
<b>Anexo 9.</b> Revelador químico dragendorff usado para la identificación de Benzodiazepinas	47
<b>Anexo 10.</b> Comparación de los Rf de las Benzodiazepinas (Alprazolam y Diazepam) con la Fenitoina	47

## RESUMEN

El consumo de Benzodiazepinas se encuentra relacionado a los aspectos médico-legales porque está asociado a actos delictivos como hurto, delitos contra la integridad sexual, dopajes, y desde el punto de vista clínico legal a la dependencia. **Objetivo:** Determinar una técnica selectiva por Cromatografía en Capa Fina para identificar Benzodiazepinas. **Método:** Se empleo la cromatografía en capa fina como una técnica selectiva de identificación de Benzodiazepinas, para ello se recolectaron muestras de orina de 26 personas voluntarias sanas que previamente se les había administrado Benzodiazepinas. El análisis se realizó en el laboratorio de toxicología de la Universidad Norbert Wiener y UNMSM. **Resultado:** La cromatografía en capa fina dio positivo para Benzodiazepinas y otras sustancias (Fenobarbital y Fenitoina) en 80% de las muestras de orina analizadas, se sugiere utilizar la técnica de certeza como es la cromatografía de gases con espectrometría de masa. **Conclusión:** Se determinó que la técnica de Cromatografía en Capa Fina es una técnica altamente sensible pero no es específica para Benzodiazepinas.

**Palabras clave:** Cromatografía en Capa Fina, Benzodiazepinas, técnica altamente sensible, Alprazolam, Diazepam

## SUMMARY

The consumption of Benzodiazepines is related to the medico-legal aspects because it is associated with criminal acts such as theft, crimes against sexual integrity, doping, and from the clinical legal point of view to dependence. **Objective:** To determine a selective technique by Thin Layer Chromatography to identify Benzodiazepines. **Method:** Thin layer chromatography was used as a selective technique for the identification of Benzodiazepines, for them urine samples were collected from 26 healthy volunteers who had previously been administered Benzodiazepines. The analysis was carried out in the toxicology laboratory of the Norbert Wiener University and UMSM. **Result:** Thin layer chromatography tested positive for Benzodiazepines and other substances (Phenobarbital and Phenytoin) in 80% of the urine sample analyzed, it is suggested to use the certainty technique such as gas chromatography with mass spectrometry. **Conclusion:** It was determined that the Thin Layer Chromatography technique is a highly sensitive technique but it is not specific for Benzodiazepines.

**Key words:** Thin Layer Chromatography, Benzodiazepines, highly sensitive technique, Alprazolam, Diazepam

## GLOSARIO

**Adsorción:** Es un proceso por el cual átomos, iones o moléculas de gases, líquidos o sólidos disueltos son atrapados o retenidos en una superficie.

**Screening:** Es el examen analítico o screening constituye la fase para la confirmación del compuesto a analizar, que tiene como objetivo identificar los analitos de interés.

**Viabilidad:** Es la cualidad de viable (que tiene probabilidades de llevarse a cabo o de concretarse gracias a sus circunstancias o características).

**Sensibilidad:** Es una afección adquirida de evolución crónica caracterizada por la presencia de síntomas de variada intensidad que aparecen aun ante la exposición a bajos niveles de sustancias químicas e involucran a varios órganos o sistemas.

**Especificidad:** Es tanto del tipo de reacción que catalizan, como del sustrato involucrado en la reacción.

**Validación:** Es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.

**Método:** Es un modo, manera o forma de realizar algo de forma sistemática, organizada y/o estructurada.

**Técnica:** Es la ciencia que desarrolla y mejora métodos e instrumentos para obtener información sobre la composición y naturaleza química de la materia.

**Extracción:** Es la técnica de separación de un compuesto a partir de una mezcla sólida o líquida, aprovechando las diferencias de solubilidad de los componentes de la mezcla en un disolvente adecuado.

## I. INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se logró determinar que la técnica de cromatografía en capa fina es una técnica sensible pero no es específica para Benzodiazepinas, porque da resultados positivos con otras sustancias.

Se evaluaron los diferentes solventes orgánicos referidos en el trabajo de investigación que muestran resultados óptimos con reactivos químicos y reveladores en la identificación de estas sustancias.

La cromatografía en capa fina (CCF) es un método físico - químico que permite identificar diversas sustancias y metabolitos en un fluido biológico como la sangre, orina, humor vítreo, en la cual se emplea una fase móvil y una fase estacionaria, empleando también reactivos reveladores lo cual representa de mucha utilidad en el campo clínico y forense. Tiene como finalidad el diagnóstico de la ingesta o abuso del consumo de drogas, entre ellas las Benzodiazepinas, en el campo clínico y toxicológico y forense.

La administración de Benzodiazepinas puede realizarse por diferentes vías, la cual puede representar un uso y abuso del mismo, incluso llegar a una dependencia o síndrome de abstinencia, donde los pacientes lo emplean principalmente como tranquilizante o ansiolítico. Desde el punto de vista forense o legal, son empleados por personas que administran dichas sustancias para provocar disminución de conciencia mediante el dopaje, ya sea para el hurto en personas de sexo masculino, o para delitos contra la integridad sexual en mujeres.

En otras oportunidades es empleado además en secuestros u otras acciones delictivas. La persona pierde o disminuye el nivel de conciencia, afectando su voluntad y sometándose a las intenciones de los sujetos agresores. Estos efectos están asociados a la disminución de la serotonina por medio de efectos gabaérgicos.

Frente a ello, el laboratorio analítico permite identificar sustancias o metabolitos presentes en un fluido, donde los métodos inmunoquímicos, la cromatografía en capa fina, la espectrometría de masas, entre otros permiten identificar la sustancia materia de investigación. Cuando se está asociado a hechos forenses, la investigación permite identificar a la sustancia y asociarlo si esta estuviera comprometida a un hecho

delictivo, donde la autoridad se pronunciará mediante el resultado analítico si se está frente a un culpable de un hecho o delito.

El desarrollo de técnicas analíticas de sensibilidad, selectividad, especificidad para identificar en nuestro caso Benzodiazepinas necesita de técnicas continuas, renovadas y de equipos especializados para confirmar esta prueba, donde es fundamental tener patrones o estándar referentes de la sustancia investigada.

## **1.1 Planteamiento del Problema.**

Las Benzodiazepinas (BZD) son fármacos depresores del sistema nervioso central, que pueden producir somnolencia, sedación, hipnosis y sueño profundo, tienen acción tranquilizante, ansiolítica, miorrelajante y anticonvulsivante, por lo cual precisa de una receta médica para ser dispensado. Es empleado concomitantemente con bebidas alcohólicas para producir disminución del nivel de conciencia y cometer hechos delictivos como dopaje y delito de violación sexual.<sup>1</sup>

El Ministerio Público y la Policía Nacional del Perú son las entidades autorizadas para emitir un dictamen pericial toxicológico, que consiste en un examen químico toxicológico sobre un fluido biológico u otra muestra a fin de identificar sustancias químicas; donde generalmente para el caso de Benzodiazepinas, indican como método analítico a la cromatografía de capa fina, lo cual sería de mayor importancia, la identificación del tipo de Benzodiazepinas, además de la concentración para tener una real aproximación del tiempo de administración del tipo de Benzodiazepina y determinar si la administración de la Benzodiazepina en un individuo se hubiera producido antes, durante, o después de haberse cometido un hecho delictivo, al estar dicha sustancia comprometida en un hecho delictivo.<sup>2</sup>

Nuestro trabajo de investigación pretendió encontrar un método altamente selectivo, que identifique Benzodiazepinas por el método de cromatografía de capa fina, que muestre repetibilidad y que los resultados no sean generalizados, para evitar errores de interpretación.

## **1.2 Formulación del problema.**

### **Problema general**

La Cromatografía en Capa Fina es una técnica selectiva para identificar Benzodiazepinas.

### **Problemas específicos**

1. ¿Es la Cromatografía en Capa Fina una técnica selectiva para identificar Alprazolam?
2. ¿Es la Cromatografía en Capa Fina una técnica selectiva para identificar Diazepam?

## **1.3 Justificación.**

Las Benzodiazepinas son sustancias que actúan deprimiendo el Sistema Nervioso Central, cuando son administradas con otros depresores como el alcohol etílico u otro generan sinergismo, lo cual se utiliza últimamente para cometer actos delictivos en perjuicio de la sociedad.

El llamado “pepeo” es el sinergismo de potenciación entre el alcohol etílico y la Benzodiazepina es una acción que se produce cuando se administra alcohol más otro depresor del sistema nervioso central que puede producir somnolencia, letargia o estupor, que incluso puede llegar al coma o a la muerte por depresión de los receptores GABA a nivel del centro cardio respiratorio. En los diferentes análisis es preciso identificar el tipo de Benzodiazepina para asociar su tiempo de vida media (corta, intermedia o prolongada), y el tiempo aproximado de administración conociendo su toxicocinética.

El impacto social, indica que estos hechos delictivos quedan impunes, cuando no se puede demostrar la existencia de la Benzodiazepina en una muestra biológica; al no existir un método selectivo y específico que identifique el tipo de Benzodiazepinas.

Al no tener técnicas validadas que muestren selectividad, especificidad para la identificación de Benzodiazepinas la Cromatografía en Capa Fina (CCF), que se usa

para su identificación no asegura que la sustancia determinada sea la mencionada, por lo que no se puede concluir el análisis.

El presente trabajo busca realizar ensayos, empleando diferentes fases móviles y reactivos reveladores, para poder determinar la selectividad de este método y poder dar un aporte a las autoridades para una correcta administración de justicia, es por ello que se justifica el presente estudio.

## **1.4 Objetivos.**

### **1.4.1 Objetivo general.**

Determinar una técnica selectiva por Cromatografía en Capa Fina para identificar Benzodiazepinas.

### **1.4.2 Objetivos específicos:**

1. Determinar una técnica selectiva por Cromatografía en Capa Fina para identificar Alprazolam.
2. Determinar una técnica selectiva por Cromatografía en Capa Fina para identificar Diazepam.
3. Determinar una técnica selectiva por Cromatografía en Capa Fina para identificar otras sustancias químicas (Fenitoina y Fenobarbital).

## **1.5 Variables.**

### **1. Variable independiente**

Muestras de orina de personas voluntarias con ingesta de Benzodiazepinas.

### **2. Variable dependiente**

Cantidad mínima detectable de Benzodiazepinas.

### **3. Variable interviniente**

Detección e identificación de Benzodiazepinas (Alprazolam y Diazepam) en orina.

## **1.6. Hipótesis.**

### **1. Hipótesis general**

La cromatografía de capa fina es una técnica selectiva para la identificación de Benzodiazepinas (Alprazolam y Diazepam).

### **2. Hipótesis específica**

La cromatografía de capa fina es una técnica selectiva para identificar Alprazolam.

La cromatografía de capa fina es una técnica selectiva para identificar Diazepam.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes de la Investigación.

#### 2.1.1 Antecedentes Internacionales.

Fonseca G. Ecuador (2016)<sup>3</sup>, en su tesis "**Determinación de Benzodiazepinas en muestras de orina, mediante el método de cromatografía en capa fina que ingresan de las diferentes casas asistenciales de salud de la Provincia de Chimborazo al laboratorio de química forense del departamento de criminalística de la policía judicial de Chimborazo durante el periodo junio - septiembre del 2012**". **Objetivo:** Determinar la presencia de Benzodiazepinas en muestras de orina, mediante el método de cromatografía en capa fina, de las personas que ingresan de las diferentes Casas Asistenciales de Salud de la provincia de Chimborazo al Laboratorio de Química Forense del Departamento de Criminalística de la Policía Judicial de Chimborazo. **Método:** Se trabajó con diversos métodos los cuales son los más utilizados para la determinación de la presencia de metabolitos en las muestras de orina; como es la purificación o separación del tóxico por extracción y su determinación a través la cromatografía en capa fina, se comparó la validez actual y la viabilidad en cuanto a sensibilidad y especificidad de la CCF y la LUV con el Ensayo Inmuno enzimático Heterogéneo (ELISA). Se recolectaron un total de 124 muestras de orina de pacientes farmacodependientes. **Resultado:** Al realizar las determinaciones para cocaína y Benzodiazepinas (Clonazepam, Alprazolam y Diazepam) por CCF, LUV y ELISA se obtuvo 88 positivos por ELISA (71%) y 12 por CCF ni por LUV. **Conclusión:** Se determinó la presencia de Benzodiazepinas en muestras de orina, con un RF de 0,81 y mediante el método de cromatografía en capa fina, de las personas que ingresan de las diferentes Casas Asistenciales de Salud de la provincia de Chimborazo al Laboratorio de Química Forense del Departamento de Criminalística de la Policía Judicial de Chimborazo.

Vargas E. Bolivia (2010)<sup>4</sup>, en la Tesis "**Optimización de un método de extracción e identificación de metabolitos benzodiazepínicos (Alprazolam y**

**Diazepam) en muestras de orina”. Objetivo:** Optimizar un método de extracción e identificación de metabolitos benzodiazepínicos en muestras de orina para su aplicación práctica. **Método:** Se optimizó un método de extracción e identificación de metabolitos benzodiazepínicos en muestras de orina, considerando el Alprazolam y Diazepam en pacientes del hospital de psiquiatría Caja Nacional de Salud, pacientes del hospital de clínicas de la unidad de psiquiatría de la ciudad de la Paz y ocasionales haciendo un total de 32 muestras. **Resultado:** Se logró obtener un 75 % de muestras positivas (13 para Diazepam y 11 para Alprazolam). **Conclusión:** Se logró optimizar el método de identificación de metabolitos benzodiazepínicos el cual es un método práctico, sencillo y confiable para extraer e identificar los metabolitos benzodiazepínicos y estadísticamente aceptable con grado de error de 5%.

### 2.1.2 Antecedentes Nacionales.

Román H. Trujillo (2013)<sup>5</sup>, en la tesis, “**Identificación de Benzodiazepinas en situaciones delictivas investigadas por la dirección territorial de policía (DIRTEPOL) La Libertad, enero 2012 – diciembre 2013**” **Objetivo:** Identificar Benzodiazepinas en las diversas muestras obtenidas por dirección territorial de policía DIRTEPOL. **Método:** Se evaluaron 161 muestras para la detección de analitos y metabolitos de las sustancias mediante cromatografía en capa fina. **Resultado:** En el año 2012 se dio 43,84% para Benzodiazepinas positivo y en el año 2013 se dio 44,32% para benzodiazepinas positivo. En el año 2012 se dio el 9,59% para Alprazolam; 15,07% para Diazepam; 12,33% para Bromazepam y 6,85% para Clonazepam, mientras que para el año 2013 el 3,41% para Alprazolam; 20,46% para Diazepam; 13,64% para Bromazepam y 6,81% para Clonazepam. **Conclusión:** Se identificó Benzodiazepinas en muestras de sangre y orina detectando sus metabolitos y Rf de 0,82 de cada muestra de Benzodiazepinas con la cromatografía en capa fina en situaciones delictivas investigadas por la DIRTEPOL

Apaza J, Velásquez A. Lima (2018)<sup>6</sup>, en la tesis “**Validación de una técnica analítica por cromatografía en capa fina para la identificación de metabolitos**

**de Alprazolam, Diazepam y Clonazepam en muestras de orina en pacientes adultos del hospital dos de mayo en el año 2017”.** **Objetivo:** Validar una técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de Alprazolam, Diazepam y Clonazepam en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo en el año 2017. **Método:** Es de tipo observacional, descriptiva, cualitativo, al analizarse la causa y efecto que generarán las variables propuestas en el presente estudio. Las muestras analizadas fueron de 60 muestras de orina, de pacientes adultos voluntarios con medicación de Benzodiazepinas en el Hospital Dos de Mayo. Se identificaron metabolitos de Alprazolam, Diazepam y Clonazepam en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo. **Resultado:** Los diferentes ensayos permitieron identificar a las Benzodiazepinas mediante el empleo de fases móviles y reactivos reveladores. **Conclusión:** Se logró validar una técnica analítica por cromatografía en capa fina, para identificar metabolitos de Alprazolam, Diazepam y Clonazepam con un Rf de 0,81 en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo en el año 2017.

## **2.2. Bases teóricas.**

### **2.2.1 Definición de Benzodiazepinas.**

Las Benzodiazepinas son fármacos hipnótico-sedantes que pueden crear dependencia; incluyen una gran variedad de fármacos similares estructuralmente, tales como Alprazolam, Clordiazepóxido, Diazepam, Lorazepam, Oxazepam y Triazolam. Las concentraciones séricas terapéuticas y los niveles tóxicos de cada Benzodiazepina son diferentes. Además, los consumidores habituales de Benzodiazepinas, sobre todo los adictos a ellas pueden tolerar dosis mucho mayores que las personas que no las consumen habitualmente.<sup>7</sup>

Debido a la gran variación de las tolerancias individuales y de los niveles tóxicos asociados a cada Benzodiazepina, los inmunoanálisis toxicológicos de suero son útiles principalmente para establecer la presencia del fármaco. Para determinar el tipo y la concentración de Benzodiazepina es preciso un método químico alternativo como una técnica selectiva por cromatografía en capa fina. Al poder

determinar el tipo de Benzodiazepina ingerida, será más fácil decidir el tratamiento más eficaz para la intoxicación por Benzodiazepinas. Para la detección de las Benzodiazepinas en la orina puede utilizarse como indicador de consumo de Benzodiazepinas, el análisis DRI Serum Tox para Benzodiazepinas es muy importante en situaciones de emergencia en las que sea difícil obtener una muestra de orina. Hay muchas técnicas convencionales, como la Cromatografía de Gases, la Cromatografía de Gas Líquido y la Cromatografía Líquida de alta Performance, que pueden emplearse para determinar la presencia de drogas en fluidos biológicos.<sup>7</sup>

Los inmunoanálisis, basados en el reconocimiento específico de drogas mediante el anticuerpo correspondiente, pueden utilizarse para situaciones en las que haya que analizar un gran número de muestras. El análisis DRI Serum Tox para Benzodiazepinas es un enzimoimmunoanálisis homogéneo que utiliza reactivos líquidos listos para su uso.

El análisis utiliza anticuerpos específicos que detectan la mayoría de las Benzodiazepinas y sus metabolitos en suero. Se basa en la competición entre un fármaco marcado con la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y el fármaco de la muestra por un número fijo de lugares de unión de anticuerpos específicos.<sup>7</sup>

Los primeros pasos en la preparación de Benzodiazepinas consistieron principalmente en la variación de la sustitución en C5. El resultado es la sustitución del benceno por un núcleo piridínico, llegando así al Bromazepam (38) del que es conocida su actividad como potente ansiolítico y relajante muscular; y la introducción en dicha posición de un Ciclohexenilo, originando Tetrazepam (39) que actúa de manera semejante al anterior. La introducción de un pirrol dio lugar a 40 que inhibe la replicación del VIH.<sup>8</sup>

Según estudios consideran a este tipo de compuestos como “estructuras privilegiadas”, ya que demuestran tener una gran potencialidad al introducir ligeras modificaciones estructurales. Esto se ha podido comprobar, por ejemplo, al observar que presentan afinidad por el receptor de la colecistoquinina (CCK) y que, modificando ligeramente la estructura, también por los receptores gástricos y benzodiazepínicos específicos centrales. Además, el mismo esqueleto estructural

también funciona como antagonista de la neuroquinina-1, como inhibidor enzimático de secretrasa o farnesil transferasa y como ligandos de canal iónico o moduladores rectificadores de potasio.<sup>8</sup>

### **2.2.2 Propiedades fisicoquímicas de la Benzodiazepinas.**

La mayoría de las Benzodiazepinas derivan de un mismo núcleo, la 1-4 Benzodiazepina; a partir de la cual y mediante sustituciones se han sintetizado los distintos derivados que existen en la actualidad. Desde el punto de vista fisicoquímico, son sustancias liposolubles que cristalizan con facilidad, tienen carácter básico y se alteran con la luz.; la introducción de átomos halogenados en posiciones 7,2 y 6 aumentan su potencia, mientras que en la 8 y 9 la disminuyen. El anillo en posición 5 es imprescindible para la actividad farmacológica, ya que todas las Benzodiazepinas, que deprimen el SNC tienen el sustituyente en dicha posición. El Diazepam es un compuesto básico, con un pKa de 3,4 y se encuentra casi totalmente bajo forma no ionizada (99 %) a pH fisiológico de 7,4, pudiendo de esta manera atravesar fácilmente las membranas celulares. El Midazolam se caracteriza porque posee una estructura química que se modifica con el pH; así, a un pH < 4 es hidrosoluble, y al pH fisiológico es una droga altamente liposoluble. La hidrosolubilidad le confiere la característica de ser una droga estable en solución ideal para la administración en la anestesia intravenosa, mientras que la liposolubilidad en el organismo le confiere la propiedad de poder atravesar libremente las membranas celulares y ejercer rápidamente sus efectos. La utilización de las Benzodiazepinas en la práctica clínica está condicionada por los distintos parámetros farmacocinéticos y propiedades fisicoquímicas que dan lugar, por ejemplo, a que unas accedan antes al SNC y se utilicen por vía IV en la inducción anestésica, ejemplo Midazolam; o que otros preparados se empleen más como sedantes por vía oral la noche anterior a la intervención.<sup>9</sup>

### **2.2.3 Tipo de Benzodiazepinas.**

Actualmente éstas se encuentran entre los medicamentos más recetados en el mundo, lo que ha dado lugar a la fabricación de una serie de derivados. El número de los benzodiazepínicos llega a más de 20, pese a que en los últimos tiempos no

se han sintetizado nuevas sustancias. Las acciones de estos compuestos son todas acciones centrales; es decir, su sitio de acción es el SNC.<sup>9,10</sup>

También se utiliza en el tratamiento de la ansiedad que acompaña a ciertos tipos de depresión y esquizofrenia. Los agentes de acción prolongada, como el Clonazepam, el Lorazepam y el Diazepam, son preferibles en los pacientes con ansiedad que pueden requerir tratamiento durante largos períodos. Los efectos ansiolíticos de las Benzodiazepinas son menos susceptibles de generar tolerancia que los efectos sedantes e hipnóticos.<sup>11</sup>

La tolerancia, es decir, la disminución de la respuesta a las dosis repetidas del fármaco ocurre cuando la administración se produce durante más de 1 o 2 semanas. Hay tolerancia cruzada entre los agentes de este grupo y el etanol. Se ha observado que la tolerancia se asocia con un descenso en la densidad de los receptores GABA. En los trastornos de angustia, el Alprazolam es eficaz para el tratamiento a corto y largo plazo, aunque puede causar reacciones de abstinencia en aproximadamente el 30% de los casos.<sup>11,12</sup>

Comúnmente, todas comparten propiedades ansiolíticas, hipnóticas, anticonvulsivas y miorelajantes; muchas de las Benzodiazepinas tienen una acción predominante sobre algunas de las acciones mencionadas, lo que permite su clasificación de acuerdo con las mismas.

### **1. Benzodiazepinas de acción prolongada.**

Todos los fármacos del grupo poseen una vida media de 24 horas o más, y la biotransformación de estos compuestos da lugar a formación de metabolitos activos. Se incluyen al Clonazepam, Cloracepato y Diazepam.

### **2. Benzodiazepinas de acción intermedia.**

Los compuestos tienen una vida media que oscila entre 5 a 24 horas. Su biotransformación da lugar a una parte activa y otra inactiva. Los fármacos que pertenecen al grupo son Alprazolam, Lorazepam, Bromazepam y Temazepam.

### **3. Benzodiazepinas de acción corta.**

Los medicamentos del grupo tienen una vida media menor de cinco horas y en su biotransformación no existe formación de metabolitos activos y son Triazolam, Midazolam y Oxacepam.

#### **2.2.4 Farmacología.**

Las Benzodiazepinas producen ansiólisis, sedación, hipnosis, efectos anticonvulsivantes y miorrelajantes central, la diferencia entre ellas no son sustancias, pero a la vista de su eficacia relativa para algunos de estos efectos y de sus propiedades cinéticas, algunas pueden tener una indicación más clara en una determinada circunstancia clínica.

Acción ansiolítica: La región más sensible a la acción de las Benzodiazepinas es el sistema límbico y dentro de él, el hipocampo y la amígdala. Deprimen tanto la actividad neuronal basal como su capacidad de respuesta frente a la estimulación eléctrica, esta se diferencia de la ejercida por barbitúricos y otros hipnóticos, los cuales ejercen su acción más generalizada en la formación reticular, dado el papel que el hipocampo, el septo y la amígdala desempeñan en la ansiedad, se puede relacionar la actividad ansiolítica con la acción depresora ejercida selectivamente a este nivel, tal acción farmacológica se debe a su capacidad de incrementar la actividad inhibitoria del GABA.

Acción Miorrelajante: El Diazepam y otras Benzodiazepinas producen relajación de la musculatura esquelética en estados diatónicos, discinéticos, hipertónicos y espásticos. La acción que ejerce sobre el SNC (no en la placa motriz ni en el músculo) a varios niveles: a) en la propia médula espinal, donde facilita fenómenos de inhibición presináptica; b) en la formación reticular activadora descendente del tronco del encéfalo; c) en los ganglios basales, d) en el cerebelo.

Acción Anticonvulsivante y antiepiléptica: Su acción anticonvulsivante se estima frente a convulsiones provocadas por agentes tóxicos (toxinas bacterianas y fármacos proconvulsivantes tipo Cardiazol), como en las convulsiones febriles, el síndrome de abstinencia a alcohol y barbitúricos, algunas son eficaces en

determinados tipos de epilepsia, la acción anticonvulsivante requiere por lo general altas concentraciones cerebrales.<sup>12</sup>

Acción hipnótica: Disminuyen el tiempo que tarda la persona en dormirse; facilitan el permanecer dormido y aumentan el umbral para despertarse (es decir que se necesita un estímulo mayor para que pase del sueño a la vigilia). Así, proporcionan una menor cantidad de despertares. Reducen los terrores nocturnos y las pesadillas (porque disminuye la etapa 4 del sueño). Con respecto al tiempo global del sueño, lo aumenta.

#### **2.2.4.1 Mecanismo de acción molecular.**

Las Benzodiazepinas se fijan de manera específica a un sitio específico localizado en el complejo molecular del receptor  $GABA_A$ ; como resultado de esta interacción, sobreviene una modulación alostérica en el complejo que permite una mayor influencia de GABA sobre su sitio específico de interacción, aumentando la probabilidad de abertura del canal del  $Cl^-$  en respuesta al GABA. A este receptor no solo se fijan las Benzodiazepinas clásicas, también lo hacen moléculas no Benzodiazepínicas como Ciclopirrolonas (Zopidona, Eszopidona), Imidazopiridinas (Zolpidem), Pirazolopiridinas (Zaleplón),  $\beta$ -carbolinas (Abecarnilo), etc.

#### **2.2.4.2 Receptor $GABA_A$ .**

Es parte de receptores asociados a canales iónicos. Es una proteína pentamérica transmembrana, en la que las cinco subunidades se asocian conformando en su centro un canal iónico permeable al  $Cl^-$ . Son siete tipos de subunidades de cada una de las cuales existen varios subtipos ( $\alpha_{1-4}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\rho_{1-3}$ ) lo que confiere al receptor GABA, una extraordinaria diversidad estructural; el conocido funcional de este fenómeno es la provisión de receptores que se diferencian en la cinética de apertura del canal, en la afinidad por el GABA, en la localización subcelular y regional, etc, desde el punto de vista farmacológico, esta diversidad de receptores brinda la posibilidad de diseñar moléculas con afinidad diferencial por los diferentes subtipos de receptores, lo que les conferiría un perfil farmacológico particular. La unión del GABA tiene lugar en la subunidad  $\beta$ ,

mientras que las Benzodiazepinas lo hacen en la interfase entre las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$ . Los receptores que contienen las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  o  $\alpha_5$ , en combinación con cualquiera de las subunidades  $\beta$  y la  $\gamma_2$ , se caracterizan porque son sensibles a la modulación por benzodiazepinas. La subunidad  $\gamma_2$  interactúa con proteínas de anclaje sináptico, por lo que los receptores de localización sináptica contienen esta subunidad. La subunidad  $\alpha$  y  $\beta_3$  con una subunidad  $\delta$  forma receptores de localización extra y perisináptica, que son muy sensibles a la modulación por etanol; la combinación más abundante (60%) es la  $\alpha_1 \beta_2 \gamma_2$ . Se localiza en numerosas regiones cerebrales, y su densidad es mayor en corteza cerebral, hipocampo, pálido, estriado, tálamo, bulbo olfatorio y cerebelo. Su similitud por benzodiazepinas clásicas, ciclo y por el antagonista Flumazenilo es muy elevada.<sup>12</sup>

### **2.2.5 Farmacodinamia.**

Los efectos tóxicos y terapéuticos de los fármacos se deben a sus interacciones con las moléculas del paciente. La mayor parte de los fármacos actúa al vincularse con macromoléculas específicas, de tal manera que se alteran las actividades bioquímicas o biofísicas de las macromoléculas; el término receptor: el componente de una célula o un organismo que interactúa con un fármaco e inicia la cadena de fenómenos que precipita los efectos observados de un medicamento. Los receptores se han convertido en el centro de investigación de los efectos farmacológicos y sus mecanismos de acción (farmacodinámica). El significado de receptor, extendido a la endocrinología, inmunología y biología molecular, ha sido esencial para explicar muchos aspectos de la regulación biológica. Hoy se han aislado y caracterizado con detalle muchos receptores para fármacos, lo que ha abierto la posibilidad de comprender con exactitud las bases moleculares de la acción farmacológica.<sup>13</sup>

Las Benzodiazepinas favorecen la transmisión gabaérgica e inhiben el recambio de ciertos neurotransmisores como son noradrenalina, serotonina, acetilcolina y dopamina, lo que ocasiona su efecto ansiolítico y sedativo.

Las Benzodiazepinas profesan su acción mediante la interacción con receptores en el SNC: hipocampo, cerebelo, ganglios basales, hipotálamo, médula espinal. El

terminante principal de la ocupación de esos receptores es la concentración del fármaco en el plasma sistémico.<sup>10</sup>

### **2.2.6 Farmacocinética.**

Las Benzodiazepinas se absorben bien por vía oral, con diferencias en la rapidez según el grado de liposolubilidad, el equilibrio entre el plasma y el cerebro se alcanza rápidamente debido a su liposolubilidad y atraviesan bien la barrera hematoencefálica, por lo que, en dosis única, el comienzo del efecto y el  $t_{m\acute{a}x}$  dependen fundamentalmente de la velocidad de absorción. La totalidad de las benzodiazepinas por vía intramuscular, en especial el Clordiazepóxido y el Diazepam, presentan una absorción errática y lenta, por concentrarse en el tejido adiposo; las que mejor se absorben son el Lorazepam y el Midazolam.<sup>12</sup>

Las Benzodiazepinas se acoplan al sitio II de la albúmina humana, y la fracción libre es independiente de la concentración plasmática total. La unión a proteínas no tiene influencia directa sobre la actividad clínica, excepto en la insuficiencia renal y en quemados, las Benzodiazepinas sufren un proceso de distribución desde el comportamiento central hacia compartimentos periféricos (músculo o grasa), siguiendo un modelo bicompartimental. Los de elevada liposolubilidad, como el Midazolam o el Diazepam, presentan una fase inicial de distribución muy rápida y, tras una dosis única intravenosa, las concentraciones plasmáticas pueden caer hasta 10 veces durante los primeros 30 min. En el tema de Benzodiazepinas muy liposolubles, y por vía intravenosa, la  $t_{1/2}$  de eliminación no se relacione con la duración del efecto tras una dosis única, se puede dar incluso de que la duración de un determinado efecto sea menor para una con semivida más larga que otra.<sup>12</sup>

La asimilación es muy compleja, las reacciones metabólicas principales son inicialmente las de oxidación por oxidasas mixtas microsómicas hepáticas (N-desalquilación e hidroxilación) son pocas (Nitrazepam, Flunitrazepam y Clonazepam) son metabolizadas por un tercer mecanismo, la nitrorreducción; estos procesos son dependientes del CYP3A4, aquellas Benzodiazepinas que carecen de grupos alquilo y que ya están hidroxiladas, sufren conjugación con el ácido glucurónico o con sulfato. Las vías oxidativas provocan cambios moleculares relativamente pequeños, originando metabolitos intermedios activos,

de los que enfatiza el N- desmetildiazepam o Nordiazepam por tres razones: la continuidad con que aparece como metabolito de otras Benzodiazepinas a concentraciones elevadas, su larga semivida (36-96 h) y su elevada afinidad y actividad biológica. Por lo tanto, los derivados conjugados son inactivos y se excretan por la orina. La oxidación es una vía denominada “susceptible”, ya que puede ser alterada por factores como la edad, la enfermedad hepática o los inhibidores metabólicos (Cimetidina, Estrógenos, Disulfiram, Omeprazol, etc.) entre otros. Es preferible utilizar las Benzodiazepinas que se metabolizan directamente mediante conjugación (Lorazepam, Oxazepam y Temazepam). La clasificación se ha establecido según el valor de la  $t_{1/2}$  de eliminación y la de los metabolitos activos, también depende del tiempo durante el cual la concentración del fármaco ésta por encima de un valor umbral, y está condicionado por el fenómeno de redistribución.<sup>12</sup>

### **Indicaciones generales.**

Están indicadas en enfermedades orgánicas donde la ansiedad es un componente o importante factor etiológico como las alteraciones psiconeuróticas que cursan con ansiedad, insomnio, tensión emocional. Se utilizan en alteraciones neuromusculares, en las que el Diazepam es el medicamento más indicado. Además, alivia las contracturas musculares, el dolor discal de las lesiones de la columna y tétanos.

También son prescritas para la abstinencia alcohólica aguda, el Diazepam es el agente de elección ya que controla el insomnio y la agitación. Incluso son útiles para evitar o controlar el síndrome de abstinencia alcohólica (delirium tremens). Las Benzodiazepinas son útiles en todo tipo de convulsiones, en la medicación preanestésica y en anestesiología combinadas con otras sustancias.

### **Sobredosificación.**

El Flumazenil es el antídoto de elección en caso de sobredosis por Benzodiazepinas. Es un antagonista de los receptores fisiológicos de las Benzodiazepinas. Actúa desplazando de dichos receptores a las Benzodiazepinas debido a su afinidad por estos receptores. El Flumazenil se administra por vía

intravenosa, su vida media es de 53 minutos. La dosis de ataque es 0,2 a 0,3 mg intravenosa cada minuto, hasta la recuperación de la conciencia o dosis total de 2 mg. El fármaco se presenta en ampollitas de 0,5 y de 1 mg. Los efectos colaterales relacionados con el uso del medicamento son náuseas, vómito, mareos, agitación y confusión.<sup>14</sup>

Toxicidad aguda por sobredosis. Las Benzodiazepinas, usadas con frecuencia para fines suicidas, tienen como ventaja, su margen de seguridad amplio, por lo que rara vez son mortales aun a altas dosis, a menos que se tomen con otras sustancias depresoras del SNC (alcohol), que pueden causar depresión respiratoria severa.<sup>14</sup>

### **Reacciones Adversas.**

Las reacciones adversas incluyen: sedación y somnolencia, ataxia, disartria, incoordinación motora e incapacidad de coordinar movimientos finos o de responder verbal o motóricamente a estímulos que requieren una respuesta rápida; alteran la capacidad para conducir vehículos, producen amnesia anterógrada, las más potentes como el Lorazepam, tienen un potencial más elevado, también producen conducta agresiva u hostil, por desinhibición o nerviosismo antes de que se establezca el efecto ansiolítico o sedante.

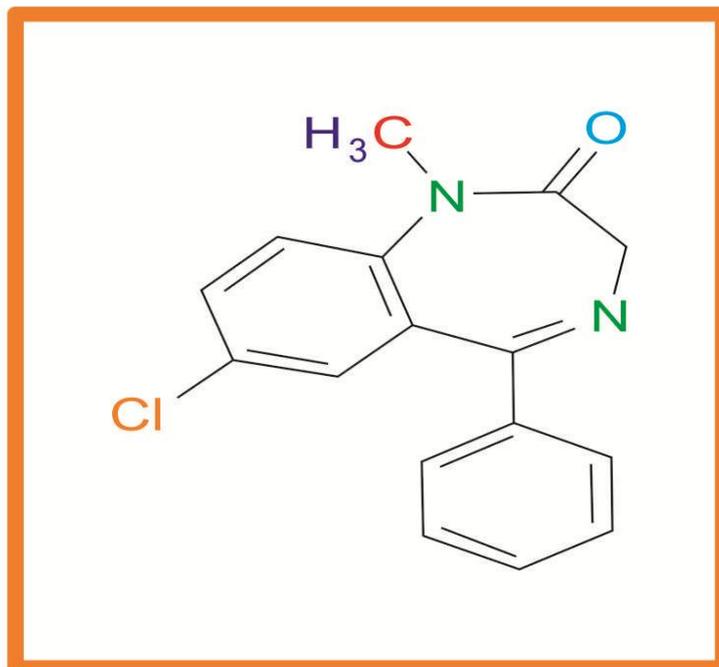
Por vía intravenosa rápida pueden desencadenar hipotensión y depresión respiratoria, pero el peligro aumenta si se asocian a otros depresores del SNC: alcohol, anestésicos u opiáceos. En el caso de intoxicación se administrará Flumazenil, la dosis de 0,2 – 4 mg. En la interacción de carácter farmacodinámico son frecuentes cuando se asocia Benzodiazepinas a otros psicofármacos y son objeto de abuso. La sensación de euforia, como los de depresión pueden ser potenciados por el alcohol, los barbitúricos, los opioides, los antihistamínicos sedantes, etc. La Cimetidina, el Disulfiram y el alcohol inhiben el metabolismo oxidativo, pero no el de conjugación. La Fenitoína y el Fenobarbital inducen el metabolismo del Diazepam.<sup>12</sup>

### **Contraindicaciones.**

Están contraindicadas en pacientes con insuficiencia respiratoria, insuficiencia hepática, glaucoma de ángulo estrecho, durante el embarazo y lactancia.<sup>13</sup>

## 2.2.7 Diazepam.

El Diazepam contiene no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de  $C_{16}H_{13}ClN_2O$ , calculando con respecto a la sustancia seca.



**Figura 1.** Estructura química de Diazepam.<sup>15</sup>

Formula

$C_{16}H_{13}ClN_2O = 284,74$

2H-1,4-Benzodiazepin-2-one, 7-chloro-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-.

7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona [439-14-5].<sup>15</sup>

### 2.2.7.1 Indicaciones.

Ansiedad, insomnio (alivio de síntomas por corto tiempo), medicación pre-anestésica (sedación), procedimientos endoscopios y cardioversión (sedación y amnesia anterógrada). Crisis convulsivas (tratamiento y coadyuvante) y estado epiléptico. Espasmos musculares, tétanos. Abstinencia alcohólica (alivio de síntomas agudos).

### **2.2.7.2 Dosificación.**

Dosis Adultos: Ansiedad: Vía oral 2 a 10 mg C/6 a 12 h. alternativamente en casos moderados 2 a 5 mg intramuscular/intravenosa y en severos 5 a 10 mg intramuscular/intravenosa de acuerdo con la gravedad de los síntomas, se puede repetir en 3 a 4 h. Medicación preanestésica, procedimientos endoscópicos: Intramuscular/ intravenosa, lenta 5 a 10 mg, según necesidad. Coadyuvante para los estados convulsivos: Vía oral 2 a 10 mg C/ 6 a 12 h. estado epiléptico. Crisis convulsivas severas y recurrentes: Intravenosa 5 a 10 mg repetidos C/10 a 15 min hasta alcanzar una dosis máxima de 30 mg.

Puede administrarse con extrema cautela otro ciclo en 2 a 4 h. Coadyuvante para el alivio del espasmo músculo esquelético, tétanos: Vía oral 2 a 10 mg C/ 6 a 8 h, alternativamente 5 a 10 mg intramuscular/intravenosas iniciales, seguidos de 5 a 10 mg intramuscular/intravenosa en 3 a 4 h. En caso de tétanos puede requerirse dosis mayores. Tratamiento del síndrome de abstinencia alcohólica agudo: Vía oral 10 mg C/ 6 a 8 h el 1<sup>er</sup> día, después reducir a 5 mg vía oral C/ 6 a 8 h según sea necesario. Si se presenta agitación aguda, temblores o para prevenir el delirium tremens y las alucinaciones, 10 mg intramuscular/intravenosa inicialmente, seguidos de 5 a 10 mg en 3 a 4 h.

### **2.2.7.3 Toxicocinética.**

Absorción completa en el TGI, el Diazepam se encuentra entre las Benzodiazepinas que se absorben más rápidamente. Su absorción es lenta y errática después de la administración intramuscular. Se distribuye ampliamente en el organismo. Se une a proteínas plasmáticas en 98,5 a 98,9%.

Al dosificar dosis repetidas de Benzodiazepinas de vida media larga se produce acumulación del compuesto inalterado o de metabolitos activos. Los metabolitos en la sangre son el Demoxepam(L) Nordiazepam(L) y en orina el Oxacepam y Nordiazepam, glucoronidación. El estado de equilibrio se alcanza en 5 a 14 días. La exclusión del fármaco es lenta pudiendo durar por semanas. Su tiempo de vida media es de 30 a 56 horas. Metabolismo hepático a metabolitos activos. Logran

encontrarse en orina incluso hasta 96 horas. Excreción renal sólo una pequeña parte en las heces.<sup>13,14</sup>

#### **2.2.7.4 Precauciones.**

Embarazo: Atraviesa la barrera placentaria, evitar su uso en el primer trimestre (riesgo de teratogenicidad); el uso crónico puede producir síndrome de abstinencia y, cerca del parto, flacidez y depresión del neonato.

Lactancia: Se distribuye en leche materna, puede producir somnolencia, dificultades en la alimentación y pérdida de peso en el niño.

Pediatría y Geriátrica: Son más sensibles a sus efectos, especialmente los neonatos (metabolismo lento y riesgo de acumulación); reducir la dosis.

Insuficiencia renal: No se necesita ajustar dosificación. Insuficiencia hepática: se prolongan los efectos depresores (aumenta su vida media).

Glaucoma de ángulo cerrado: Puede tener efecto colinérgico. Pacientes debilitados, hipoalbuminemia: reducir las dosis. Insuficiencia respiratoria y EPOC: Puede agravarse la hipoventilación.

Intoxicación alcohólica aguda, dependencia de drogas, psicosis: Por predisposición a la dependencia. Historia de epilepsia o crisis. Convulsivas: La iniciación o supresión brusca puede aumentar la frecuencia y severidad de las crisis.

#### **2.2.7.5 Contraindicaciones.**

Hipersensibilidad al Diazepam.

#### **2.2.7.6 Reacciones adversas frecuentes.**

Somnolencia, fatiga, ataxia, enrojecimiento dolor en el lugar de la inyección. Poco frecuente: depresión neurológica, cefalea, confusión, mareo, dolor abdominal, estreñimiento o diarrea, visión borrosa, cambios en la libido, retención urinaria, sequedad de la boca, aumento de secreciones bronquiales, depresión respiratoria, bradicardia, alucinaciones, nerviosismo, insomnio, rash, disfunción hepática.<sup>14,16</sup>

La discontinuidad abrupta: (dosis altas por periodos prolongados), irritabilidad, nerviosismo, hasta convulsiones, delirio y paranoia, sudoración, dolor abdominal,

náusea y vómito, hipersensibilidad, dolor, fotofobia y taquicardia. La administración intramuscular puede producir en algunos casos tromboflebitis (debido a su solvente el propilenglicol).<sup>16</sup>

#### **2.2.7.7 Tratamiento de sobredosis.**

Medidas generales. Administrar Flumazenil y continuar con el tratamiento de soporte y sintomático.

#### **2.2.7.8 Interacciones Medicamentosas.**

Alcohol y depresores del SNC: Se incrementan los efectos depresores del SNC.

Fentanilo: Riesgo de hipotensión y depresión respiratoria.

Carbamazepina: Disminución de las concentraciones séricas de ambos fármacos.

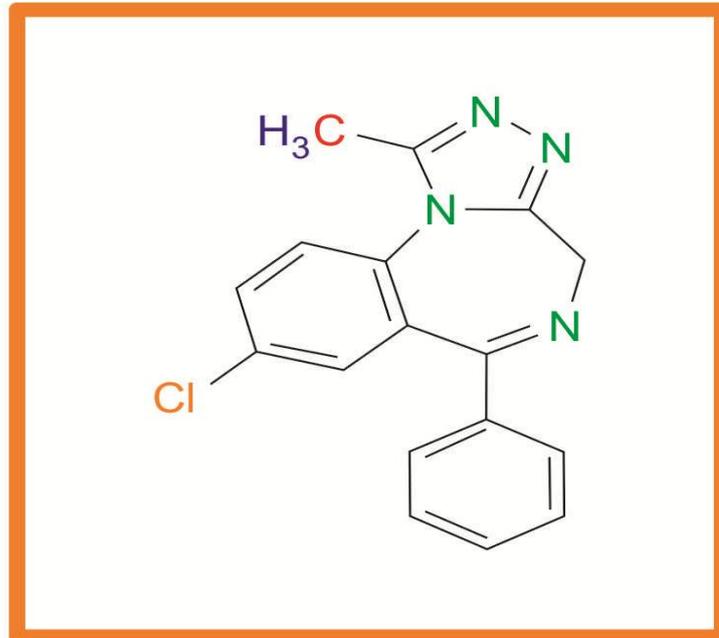
Cimetidina, anticonceptivos, Eritromicina, Isoniazida, Omeprazol: Prolongan los efectos del Diazepam.

Antihipertensivos: Potencian los efectos hipotensores. Levo dopa: Disminución del efecto del anti parkinsoniano. Rifampicina: Disminuye concentraciones plasmáticas del Diazepam, ajustar la dosis.

Zidovudina: Incremento de la toxicidad del antiviral.<sup>14</sup>

### 2.2.8 Alprazolam.

El Alprazolam contiene no menos de 98,0% y no más de 102,0% de  $C_{17}H_{13}ClN_4$ .



**Figura 2.** Estructura química de Alprazolam.<sup>15</sup>

FORMULA

$C_{17}H_{13}ClN_4 = 308,8$

4H[1,2,4]Triazolo[4,3 - $\alpha$ ][1,4]benzodiazepine,8-chloro-1-methyl-6-phenyl-;  
8-Cloro-1-metil-6-fenil-4H-s-triazolo [4,3-  $\alpha$ ][1,4]benzodiazepina [28981-97-  
7].<sup>15</sup>

#### 2.2.8.1 Indicaciones.

Ansiedad, trastorno de pánico.

#### 2.2.8.2 Dosis.

Ansiedad. Adultos: Vía oral 0,25 a 0,50mg C/ 8 h, de acuerdo con la severidad de los síntomas. La dosis puede incrementarse en intervalos de 4 días hasta alcanzar un máximo de 4mg. Trastorno de pánico. Adultos: Vía oral, inicialmente 0,5mg 3 veces/día, la dosis puede incrementarse en 1mg C/3 a 4 días. Dosis máxima 10mg/día.

### **2.2.8.3 Toxicocinética.**

Muestra una biodisponibilidad entre el 72 y 94%. Se absorbe bien después de dosificar por vía oral; S-e distribuye ampliamente por el organismo. Se une a proteínas plasmáticas en un 68 a 74%. La vida media es de 12 horas. Al dosificar dosis repetidas de Benzodiazepinas de vida corta o intermedia el grado de acumulación del compuesto es mínimo; el estado de equilibrio se alcanza por lo general en 2 a 3 días. Al terminar la terapia, la eliminación del fármaco es rápida. Los metabolitos que se forman en la orina son  $\alpha$ - Hidroxialprazolam 5-Clorobenzofenona 4-Hidroxialprazolam 2-(3-Hidroximetil-5-metiltriazol) -5-Clorobenzofenona.

Las concentraciones son subclínicas a las 24 horas y vuelven a cero en alrededor de 4 días o menos. Su metabolismo es exclusivamente hepático y su excreción es por vía renal.

### **2.2.8.4 Precauciones.**

Embarazo: Atraviesan la placenta y al igual que las demás Benzodiazepinas está asociado a un aumento del riesgo de malformaciones congénitas, síntomas de abstinencia y flacidez al nacer. No se han establecido los daños potenciales en seres humanos por lo que debe administrarse con suma precaución especialmente durante el primer trimestre de embarazo, evaluándose el riesgo-beneficio.

Lactancia: Se excretan por la leche materna. Geriátrica: los pacientes geriátricos son más sensibles a los efectos de las Benzodiazepinas; evaluar función renal. Insuficiencia hepática y renal: riesgo de acumulación, prescribir con cautela.

### **2.2.8.5 Contraindicaciones.**

Neurológicos: Somnolencia, ataxia, fatiga, confusión, disartria, debilidad, vértigo. Alteraciones de la conducta, apatía, tristeza. Episodios paradójicos de ira, hostilidad, manía o hipomanía. Rápido desarrollo de tolerancia y dependencia. Síndrome de retirada severo. Otros. Sequedad de boca.<sup>17</sup>

### **2.3. Cromatografía de capa fina.**

Método físico que permite separar sustancias a través de una capa delgada o estacionaria a base de sílica gel G y fase móvil, basada en la visualización de manchas empleando Ultravioleta o haciendo uso de reactivos reveladores <sup>14,16</sup>.

Son métodos de separación de múltiples etapas en los que los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases, una estacionaria y la otra móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido absorbido sobre un sólido o un gel. La estacionaria puede estar empacada en una placa, extendida como una capa, distribuida como película o aplicada mediante otras técnicas. La fase móvil puede ser gaseosa o líquida o un fluido supercrítico. Esta separación puede basarse en adsorción, distribución de masa (partición) o intercambio iónico, o puede basarse en diferencias entre las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, tales como tamaño, masa o volumen.

Los tipos de cromatografía útiles en el análisis cualitativo y cuantitativo que se emplean en los procedimientos cromatográficos de la USP son: cromatografía en columna, de gases, en papel, en capa delgada (incluyendo la cromatografía en capa delgada de alta resolución) y de líquidos presurizados (llamada cromatografía líquida de alta presión o alta resolución).<sup>18</sup>

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. Tipo de investigación.**

Descriptivo, observacional, transversal y experimental.

#### **3.2. Población y muestra.**

La población está constituida por muestras de orina de 26 personas voluntarias sanas que acuden a las boticas pequeñas, entre ellos hombres y mujeres de 20 a 35 años.

Las muestras estuvieron representadas por la orina de personas que previamente hubieron consumido Benzodiazepinas y que mostraron predisposición y autorización para la toma de muestra.

#### **3.3. Técnica Operatoria.**

##### **3.3.1 Recolección de muestras.**

Se obtuvieron las muestras de orina de 26 personas hombres y mujeres, se recolecto la primera orina de la mañana en un frasco estéril de 50 mL, debidamente rotulada a la que se le administraron Alprazolam o Diazepam, previo consentimiento informado, para buscar su identificación por el método de cromatografía de capa fina.

La muestra de orina fue procesada con una solución ácida y luego con una solución alcalina para poder extraer a través de una fase etérea hasta la obtención de cristales.

#### **3.4. Material de laboratorio, reactivos, solventes y equipos.**

##### **3.4.1. Materiales:**

- Placas cromatográficas de silicagel G 60 de 10 x 20 cm
- Probetas de vidrio tipo A de 200 mL
- Fiolas con tapa esmerilada de vidrio tipo A de 100 mL
- Vasos de precipitación 250 mL y 500 mL
- Baguetas

- Pipetas terminales vidrio tipo A de 1 mL y 5 mL
- Capilares de vidrio
- Frasco vial de vidrio con tapa de jebe
- Embudos de vidrio de vástago largo
- Papel filtro Watman
- Embudos de decantación con tapa esmerilada de 100mL
- Papel tornasol (acidez-alcalinidad)
- Esprayador – pulverizador

### **3.4.2. Reactivos y solventes:**

- Éter dietílico Q.P.
- Amoniaco Q.P.
- Cloroformo Q.P.
- Acetona Q.P.
- Trietanolamina al 1%
- Vainillina (en medio sulfúrico)
- Agua destilada
- Reactivo de Dragendorff
- Hidróxido de Sodio al 5%
- Revelador de Iodoplatinato
- Ácido Sulfúrico Q.P.
- Ácido Clorhídrico 10%
- Estándar de Alprazolam Q.P.
- Estándar de Diazepam Q.P.

### **3.4.3. Equipos:**

- Lámpara Ultra Violeta Visible (UV-Vis) marca Polaris Cientific.
- Campana extractora resistente a ácido perclórico marca Labconco.
- Balanza analítica marca Mettler Toledo.
- Preparador de placas Merck.
- Cooler de 10 Litros marca Basa.
- Equipo Soxhlet marca Pirex.

- Cubas cromatográficas con tapa de 10 x 25 x 25 marca Pirex.
- Plancha calentadora de placas cromatográficas marca Merck.
- Estufa de 50L marca Memmert.

### **3.5. Procedimiento.**

#### **3.5.1 Procesamiento y obtención del Extracto Seco.**

El procesamiento se inicia con la toma de muestra de orina en personas con ingesta previa de Benzodiazepina (Alprazolam y Diazepam), luego se llevó la muestra a un pH alcalino (9-10) empleando hidróxido de amonio al 30% y se hizo una extracción líquido – líquido en una pera de decantación con éter etílico entre 15-20 mL, se homogenizó la muestra agitando suavemente y se dejó en reposo por espacio de 20 minutos hasta que se formó dos fases claramente definidas (fase acuosa y fase orgánica), lo que permite que los analitos puedan migrar a la fase orgánica.

Se vertió la fase acuosa en un beacker y la fase orgánica fue depositada a un beacker, se evapora hasta 5mL y luego se deposita en un frasco vial de vidrio, la cual fue rotulada como fracción alcalina.

#### **3.5.2 Preparación de placas y método de siembra.**

Las placas se prepararon con sílica gel G empleándose 30 g de sílica gel y 80 mL de agua, luego se agitó y se prepararon las placas dejando secar a temperatura ambiente, para que el agente adsorbente puede activarse, dejando las placas en reposo por 24 horas o calentándolas durante 20-30 minutos a 105-110 °C. El espesor de la placa debe tener en promedio de 0,2 mm.

Las muestras problemas por examinar se disolvieron, en un disolvente orgánico no polar que tenga un punto de ebullición lo suficientemente bajo para que se evapore después de la aplicación. Sin embargo, se emplearon disolventes polares como fase móvil; el Cloroformo, o la mezcla Cloroformo: Metanol (1:1 v/v); Metanol: Acetona (1:1 v/v); n-propanol: Acetona (1:1 v/v), entre otros, que presentaron buena respuesta. Frecuentemente se emplean, disoluciones al 1%, de manera que al aplicar 2  $\mu$ L resulte en la carga 20  $\mu$ g de producto sólido, donde muchos reactivos de revelado lleguen a detectar 0,1  $\mu$ g de sustancia.<sup>19</sup>

Se sembraron las muestras y los estándares de Alprazolam y Diazepam a 1 cm de la base empleando capilares sobre las placas cromatográficas de 10 cm x 20 cm. Se colocaron las placas cromatográficas en los medios (fase móvil) y fueron retirados al alcanzar un recorrido de aproximadamente 80%; se secaron una parte a temperatura ambiente y otra se secaron en la campana extractora. Luego se visualiza el recorrido de las manchas y se mide su RF.

### **3.5.3 Fases móviles en Cromatografía en capa fina para ensayo.**

Se emplearon las siguientes fases:

- Ciclo hexano: Tolueno: Dietilamina (75:15:10 v/v/v)
- Cloroformo: Metanol (90:10 v/v)
- Acetato de Etilo y Cloroformo (1:1 v/v)
- Metanol: Acetona: Trietanolamina (1:1:0,05 v/v/v)
- Cloroformo: Acetona (4:1 v/v)
- Metanol: Acetona (1:1 v/v)
- Metanol: Amoniaco (100:1.5 v/v)
- n-propanol: Acetona (1:1 v/v)

### **3.5.4 Revelado e identificación de Benzodiazepinas.**

Las Benzodiazepinas fueron identificadas empleando la luz Ultravioleta –UV y/o mediante el empleo de reactivos químicos reveladores para la visualización de manchas, considerándose el Rf (factor de retención), para compararlos con los estándares.

Se utilizó la lámpara de luz ultravioleta – UV a una longitud de onda de 254 nm, donde se observaron manchas fluorescentes de color violeta o blanquecinos sobre un fondo blanco.

Para la identificación de Benzodiazepinas (Alprazolam y Diazepam) se ensayó con diversas fases móviles de acuerdo con su polaridad y diferentes reactivos de identificación que muestren selectividad sobre ellas de acuerdo a una amplia búsqueda de información bibliográfica de manuales de toxicología, guías, papers, y consulta a los expertos toxicólogos.<sup>20</sup>

### **3.5.5 Reactivos empleados en el ensayo:**

DRAGENDORFF: Se considera POSITIVO frente a la presencia de manchas de color naranja.

Pulverizado con Ácido Clorhídrico al 10%, encima de la placa aspersada con dragendorff, intensifica el color.

IODOPLATINATO: Se considera positivo frente a la presencia de manchas grisáceas, violeta, azul violeta, gris violeta o marrones.

### **3.5.6 Preparación de Reactivos.**

#### **Reactivo de dragendorff.**

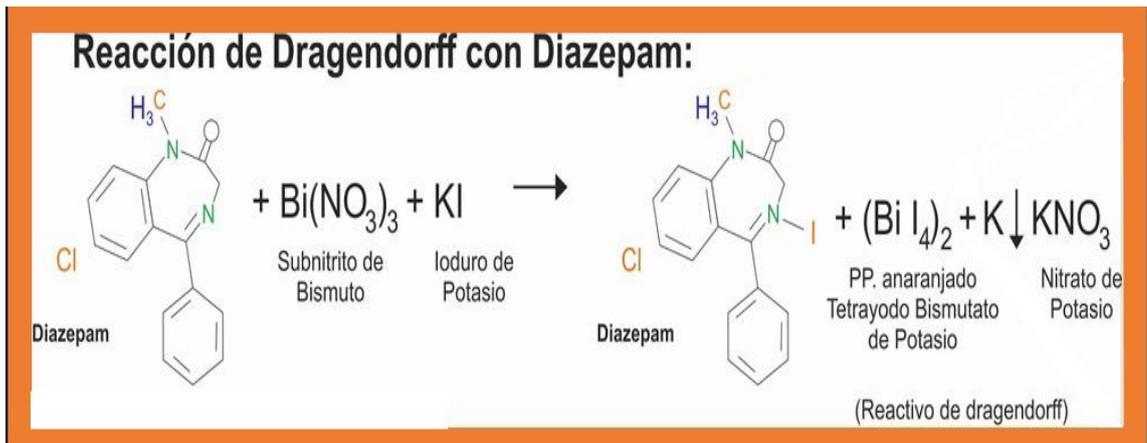
Solución 1: Disolver 2 g de Subnitrato de Bismuto en 25 mL de Ácido Acético concentrado (glacial) y añadir 100 mL de agua destilada.

Solución 2: Disolver 40 g de ioduro de potasio en 100 mL de agua destilada.

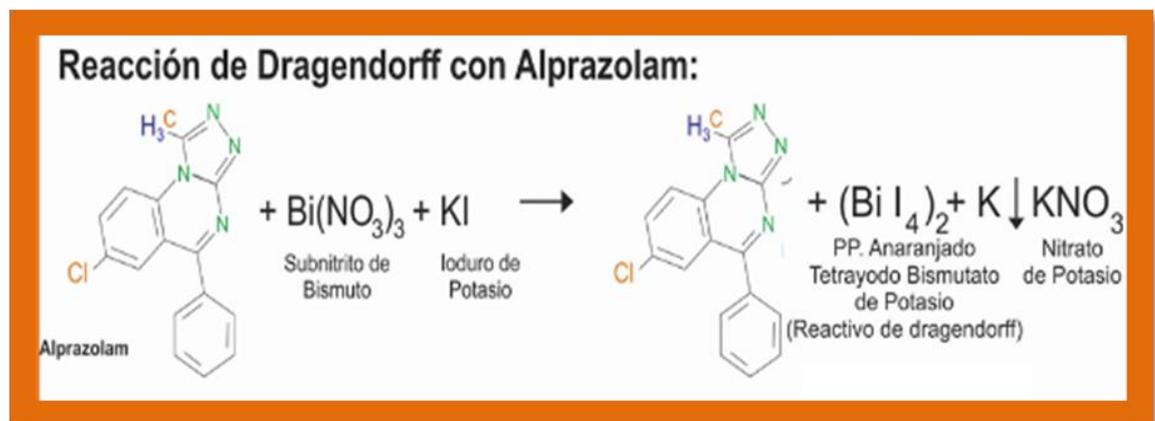
Mezclar 10 mL de la solución 1, 10 mL de la solución 2, 20 mL de Ácido Acético concentrado (glacial) y 100 mL de agua destilada para obtener el reactivo de Dragendorff (precipitado color naranja).

#### **Reactivo de Iodoplatinato.**

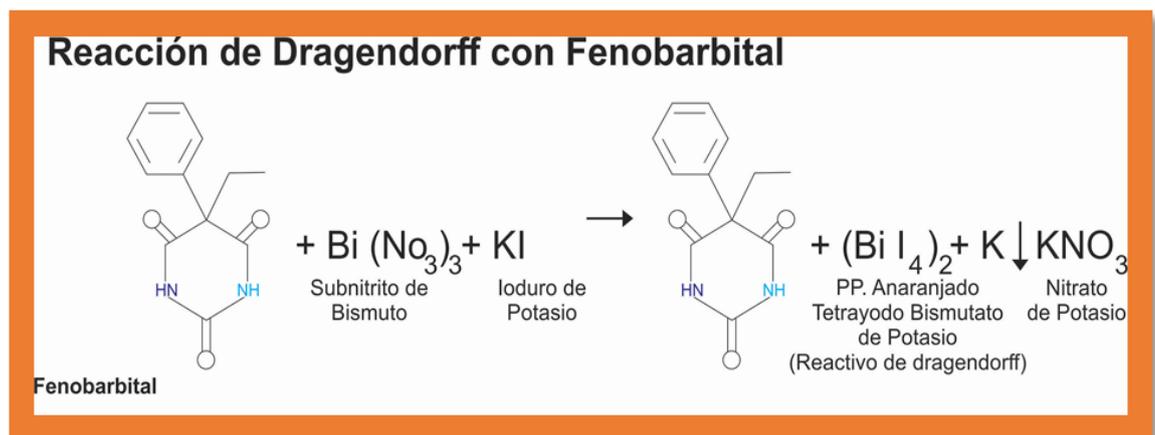
Disolver 0,25 g de cloruro platínico y 5 g de Ioduro potásico en agua destilada hasta obtener 100 mL; añadir 2 mL de Ácido clorhídrico concentrado a la solución resultante. Cuando la placa se pulveriza con el reactivo, el Fenobarbital aparece como una mancha anaranjada.



**Figura 3.** Reacción de dragendorff con Diazepam.<sup>21</sup>



**Figura 4.** Reacción de dragendorff con Alprazolam.<sup>21</sup>



**Figura 5.** Reacción de dragendorff con Fenobarbital.<sup>21</sup>

#### IV. RESULTADOS

**Tabla 1.** Reactivos para la identificación de Benzodiazepinas, Alprazolam y Diazepam.

Revelador	ALPRAZOLAM	DIAZEPAM	FENITOINA	BLANCO
Dragendorff	+	+	+	-
Iodoplatinato	+	+	+	-

**Leyenda:** (+) Presencia, (-) Ausencia.

En la **tabla 1**, se observa que los reactivos para la identificación de Benzodiazepinas Alprazolam y Diazepam, que en el ensayo general de identificación de Benzodiazepinas con los reactivos utilizados, se obtuvo como resultado POSITIVO con el reactivo de Dragendorff y Iodoplatinato la cual consistió en el desarrollo de la muestra problema de Diazepam en orina, más la muestra de estándar, más el blanco que nos dio un mismo Rf de 0,8 usando el mismo revelador dragendorff dio las mismas manchas color naranjas produciéndose la misma coloración al revelador UV y a la misma zona de recorrido lo cual demuestra que la cromatografía en capa fina es una técnica sensible pero no es específica, porque da resultados positivos con otras sustancias y con el mismo revelador y conllevando a un resultado erróneo.

**Tabla 2.** Identificación de Benzodiazepinas con el reactivo de Dragendorff.

REACTIVO	ALPRAZOLAM	DIAZEPAM	FENITOINA	BLANCO
Dragendorff	+	+	+	-

**Leyenda:** (+) Presencia, (-) Ausencia.

En **la tabla 2**, se observa la identificación de Benzodiazepinas con el reactivo de dragendorff, que nos dio POSITIVO con todas las sustancias utilizadas en la cual el desarrollo de la muestra problema de Alprazolam en orina, más la muestra de estándar, más el blanco que nos dio un mismo RF de 0,8 usando el mismo revelador dragendorff dan las mismas manchas color naranjas produciéndose la misma coloración al revelador UV y a la misma zona de recorrido lo cual demuestra que la cromatografía en capa fina es una técnica sensible pero no es específica, porque da resultados positivos con otras sustancias y con el mismo revelador y conllevando a un resultado erróneo.

**Tabla 3.** Comparación de los Rf de Alprazolam y Diazepam presentes en la muestra de orina de los pacientes voluntarios con el estándar de Fenitoína.

REACTIVO	ALPRAZOLAM	DIAZEPAM	FENITOINA	BLANCO
RF	0,833	0,84	0,80	-
Dragendorff	+	+	+	-
Color	naranja	naranja	naranja	-

**Leyenda:** (+) Presencia, (-) Ausencia, Rf (Frente de Referencia promedio según Usp 40 = 0,80).

En la **tabla 3**, se observa que en todos los casos la reacción de color es la misma con el reactivo de dragendorff, así mismo se observa que hay diferentes Rf, siendo los óptimos los correspondientes para Alprazolam y Diazepam y el desarrollo de la muestra problema de Alprazolam en orina, más la muestra de estándar, más blanco y comparados con el estándar de Fenitoína, la muestra Q.P de Fenitoína, nos dio un mismo RF de 0,8 usando el mismo revelador dragendorff dan las mismas manchas color naranjas produciéndose la misma coloración al revelador UV lo cual demuestra que la cromatografía en capa fina es una técnica sensible pero no es específica, porque da resultados positivos con otras sustancias y con el mismo revelador y conllevando a un resultado erróneo.

**Tabla 4.** Identificación de Benzodiazepinas con el reactivo de Iodoplatinato.

REACTIVO	ALPRAZOLAM	DIAZEPAM	FENITOINA	BLANCO
IODOPLATINATO	+	+	+	-

**Leyenda:** (+) Presencia, (-) Ausencia.

En la **tabla 4**, se observa que las Benzodiazepinas y Fenitoína dan resultado positivo con el reactivo de Iodoplatinato en el desarrollo de la muestra problema de Diazepam en orina, más la muestra de estándar, más blanco y comparados con el estándar de Fenitoína, la muestra Q.P de Fenitoína, nos dan las mismas manchas color grises produciéndose la misma coloración al revelador UV lo cual demuestra que la cromatografía en capa fina es una técnica sensible pero no es específica, porque da resultados positivos con otras sustancias y con el mismo revelador y conllevando a un resultado erróneo.

Los resultados nos indican que los reactivos reveladores utilizados son altamente sensibles, pero no son específicos, por lo cual la técnica de Cromatografía en Capa Fina es una técnica altamente sensible pero no es específica para Benzodiazepinas

**Tabla 5.** Muestras de orina analizadas con Benzodiazepinas y otras sustancias de personas voluntarias sanas.

N° MUESTRAS DE ORINA	DIAZE PAM	ALPRA ZOLAM	FENI TOINA	FENO BARBITAL
M1	+	+	+	+
M2	+	+	+	+
M3	+	+	+	+
M4	+	+	+	+
M5	+	+	+	+
M6	+	+	+	+
M7	+	+	+	+
M8	+	+	+	+
M9	+	+	+	+
M10	+	+	+	+
M11	-	-	-	-
M12	+	+	+	+
M13	+	+	+	+
M14	-	-	-	-
M15	+	+	+	+
M16	+	+	+	+
M17	+	+	+	+
M18	-	-	-	-
M19	+	+	+	+
M20	-	-	-	-
M21	+	+	+	+
M22	+	+	+	+
M23	-	-	-	-
M24	+	+	+	+
M25	+	+	+	+
M26	+	+	+	+

**Leyenda:** (+) Presencia, (-) Ausencia.

En la **tabla 5**, se observa que la cromatografía en capa fina dio positivo para Benzodiazepinas (Diazepam y Alprazolam) y otras sustancias (Fenitoína y Fenobarbital) en 80% de las muestras de orina analizadas de personas voluntarias sanas; los resultados nos indican que el 80% =20,8 dio positivo y el 20%=5,2 dio negativo de las muestras de orina analizadas lo cual nos confirma que la técnica de Cromatografía en Capa Fina es una técnica altamente sensible pero no es específica para Benzodiazepinas.

## V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizó la determinación de una técnica selectiva para la determinación de Benzodiazepinas relacionadas al aspecto médico legal. Las Benzodiazepinas son fármacos de gran uso masivo por la población por los cuales son administrados en pequeñas dosis para aliviar diversas patologías del sistema nervioso y a nivel toxicológico son usadas para fines nocivas que atenten a la salud (dopaje) y el mal manejo de estas sustancias dan lugar a intoxicaciones que pueden ocasionar la muerte, sedantes, tranquilizantes para lo cual se busca determinar una técnica selectiva y ser usadas en la determinación de Benzodiazepinas.<sup>22</sup>

En las tablas analizadas el Rf nos da un resultado similar como es 0,8 comparado con otras tesis tiene similitud. En el test de Cochran también cumplió con el criterio de aceptación, es decir, las concentraciones son homogéneas y el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados con un coeficiente de correlación r, cuyo valor fue 0,89497 y un coeficiente de determinación r<sup>2</sup> que fue 0,88997. Ambos coeficientes cumplen con los criterios establecidos para estos parámetros (r >0,89 y r<sup>2</sup> >0,89) con ello se demuestra que el sistema cumple con los requisitos de linealidad dentro del rango de trabajo y que la variabilidad del área es por la variable independiente, es decir, la concentración.<sup>13</sup>

Según Linares en su estudio de identificación de metabolitos de Benzodiazepinas encontró su RF 0,89 en muestra de orina tanto en hombres como mujeres lo cual confirma lo que queremos demostrar con nuestro trabajo que la cromatografía en capa fina no es una técnica selectiva y específica para la determinación de Benzodiazepinas, es una técnica altamente sensible pero no es específica, porque da resultados positivos con otras sustancias; así mismo se observó que el Diazepam y el Alprazolam reacciona con diversos reactivos utilizados al revelar sustancias diferentes; finalmente se puede indicar que la cromatografía en capa fina es solo una técnica presuntiva de identificación.<sup>23</sup>

Fonseca en su estudio de determinación de Benzodiazepinas en muestra de orina mediante el método de cromatografía en capa fina nos da su Rf de 0,89 confirmándonos lo que hicimos en nuestro trabajo.<sup>3</sup>

Se verificó que la cromatografía en capa fina no es una técnica selectiva y específica para la determinación de Benzodiazepinas, es una técnica altamente sensible pero no es específica, porque da resultados positivos con otras sustancias; así mismo se observó que el Diazepam y el Alprazolam reacciona con diversos reactivos utilizados al revelar sustancias diferentes; finalmente se puede indicar que la cromatografía en capa fina es solo una técnica presuntiva de identificación para estas sustancias.<sup>14</sup>

Vargas en su estudio optimización de un método de extracción e identificación de metabolitos benzodiazepínicos da como resultado de su RF 0,8.<sup>4</sup>

En todos los revelados con el reactivo de dragendorff que contienen Subnitrato de Bismuto va a reaccionar con los grupos funcionales aminos va a reaccionar con su estructura química en especial con nitrógeno forman complejos coloreado dando un color naranja, los cuales evidencia la presencia de la estructura química que corresponden a las Benzodiazepinas sin embargo esta formación es de coloración no necesariamente da reacción positiva con Benzodiazepinas, sino que también pueden reaccionar con barbitúricos que se puede evidenciar en la figura es por ello que probablemente esta metodología no es específica para Benzodiazepinas en la reacción de coloración porque se da el complejo coloreado Nitrato de Bismuto más el anillo grupo amino Bismuto.<sup>22</sup>

En la última tabla, se observa que la cromatografía en capa fina dio positivo para Benzodiazepinas (Diazepam y Alprazolam) y otras sustancias (Fenitoína y Fenobarbital) en 80% de las muestras de orina analizadas de personas voluntarias sanas Los resultados nos indican que el 80% = 20,8 dio positivo y el 20% = 5,2 dio negativo de las muestras de orina analizadas según los resultados obtenidos de la cromatografía nos confirma que la técnica de Cromatografía en Capa Fina es una técnica altamente sensible pero no es específica para Benzodiazepinas porque da resultados positivos con otras sustancias. Se recomienda que para tener la seguridad del resultado se debe utilizar una técnica de certeza como es la cromatografía de gases con espectrometría de masa, ya que la Cromatografía en Capa Fina es una técnica presuntiva.

Luego del análisis se verifico que la cromatografía en capa fina no es una técnica selectiva y específica para la determinación de Benzodiazepinas, es una técnica altamente sensible pero no es específica, porque da resultados positivos con otras sustancias; así mismo se observó que el Diazepam y el Alprazolam reacciona con diversos reactivos utilizados al revelar sustancias diferentes; finalmente se puede indicar que la cromatografía en capa fina es solo una técnica presuntiva de identificación para estas sustancias.<sup>14</sup>

## **VI. CONCLUSIONES**

La Cromatografía en Capa Fina no es una técnica selectiva para identificar Benzodiazepinas en muestras de orina en personas expuestas al medicamento.

La Cromatografía en Capa Fina no es una técnica selectiva para identificar Alprazolam en muestras de orina en personas expuestas al medicamento.

La Cromatografía en Capa Fina no es una técnica selectiva para identificar Diazepam en muestras de orina en personas expuestas al medicamento.

Se determinó que la Cromatografía en Capa Fina no es una técnica selectiva para identificar otras sustancias químicas, debido a la coexistencia de resultados falsos positivos como el Fenobarbital y Fenitoina.

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Los exámenes químicos toxicológicos deben de realizarse por métodos sensibilidad y especificidad evidenciada, que permita obtener resultados de confiabilidad.
2. La cromatografía en capa fina no debe ser utilizada para concluir un análisis debido a que por no ser sensible y específica puede conllevar a un error, lo cual puede originar tomar decisiones equivocadas para realizar un tratamiento, para dar un veredicto u otras de gran importancia en la sociedad.
3. La cromatografía de capa fina se puede utilizar para realizar un screening presuntivo para luego confirmar con un método que sea selectivo y específico.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Depresores del sistema nervioso central (SNC) de prescripción médica. [Internet]. 2018 [Citado el 20 de noviembre del 2018]. Disponible en: <https://www.drugabuse.gov/.../depresores-del-sistema-nervioso-central-snc-de-prescrip>.
2. Peritos - Ministerio. [Internet]. 2018 [Citado el 01 de diciembre del 2018]. Disponible en: [https://www.mpfn.gob.pe/escuela/contenido/.../4197\\_2.\\_curso\\_mp\\_15\\_dr\\_ballop](https://www.mpfn.gob.pe/escuela/contenido/.../4197_2._curso_mp_15_dr_ballop)
3. Fonseca G. Determinación de Benzodiazepinas en muestras de orina, mediante el método de cromatografía en capa fina que ingresan de las diferentes casas asistenciales de salud de la provincia de Chimborazo al laboratorio de química forense del departamento de criminalística de la policía judicial de Chimborazo durante el periodo junio- noviembre del 2012, Tesina de grado previo a la obtención del Título de Licenciado en Laboratorio Clínico e Histopatológico. Universidad de Chimborazo. 2017
4. Vargas E. Optimización de un método de extracción e identificación de metabolitos Benzodiazepínicos (Alprazolam y Diazepam) en muestras de orina. Tesis para optar el título de licenciatura en bioquímica – farmacia. Universidad Nacional Siglo XX. La Paz Bolivia. 2013.
5. Román H. Identificación de Benzodiazepinas en situaciones delictivas investigadas por la dirección territorial de policía (DIRTEPOL) La Libertad, enero 2012 – diciembre 2013. Tesis para optar el título profesional de químico farmacéutico. Universidad de Trujillo. 2015.
6. Apaza J, Velásquez A. Validación de una técnica analítica por cromatografía en capa fina para la identificación de metabolitos de Alprazolam, Diazepam y Clonazepam en muestras de orina en pacientes adultos del hospital dos de mayo en el año 2017. Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico. Universidad Inca Garcilaso De La Vega. 2018.
7. Análisis DRI Serum Tox para Benzodiazepinas, Thermo Fisher Scientific EEUU. [Internet]. 2014 [Citado el 22 de noviembre del 2018]. Disponible en: <https://static.thermoscientific.com/images/D20539~.pdf>

8. Hsu C, *et al.* Inhibición de la replicación del VIH en infecciones agudas y crónicas in vitro por un antagonista de Tat. *Ciencia*. 1991 20 de diciembre; 254 (5039): 1799–1802
9. Horton A, *et al.* Una síntesis concisa y eficiente de benzimidazo [1,2- c] quinazolinas a través de N -arilaciones intramoleculares catalizadas por CuI *Rev.* 2003; 103: 893-930.
10. Aguilar J, *et al.* Tratado de anestesia y reanimación. Ed Aran Ediciones España. 2012
11. Harvey Ch. Farmacología. 5a ed. México Editorial. McGraw Hill. 2012.
12. Flórez J. Farmacología Humana. 4a ed. Barcelona. Editorial Masson-Salvat Medicina 2011.
13. Micó A, *et al.* Benzodiazepinas y Drogodependencias. Dpto. Neurociencias. Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz. España.
14. Benzodiazepinas. Dossier. España. Colegio de Farmacéuticos de Ciudad Real, COFCR. 2017.
15. Farmacopea Española. 40-NF 35. VOL 1 -PAG.1-2762. [Internet]. 2017 [Citado el 22 de noviembre del 2018]. Disponible en:  
<https://es.a3p.org/USP-Pharmacopeial-40-1-en-proceso-de-revisión-de/>
16. Katzung B. Farmacología Básica y Clínica. 12a. ed. México. Editorial Mc Graw Hill. 2013
17. Guía Farmacoterapéutica. Trastornos del estado de ánimo: Depresión y Ansiedad. [Internet]. 2017 [Citado el 22 de noviembre del 2018]. Disponible en:  
<https://botplusweb.portalfarma.com/Documentos/2009/2/11/37502.pdf>
18. Cromatografía en capa fina. Instituto de Biotecnología. [Internet]. 2017 [Citado el 28 de noviembre del 2018]. Disponible en:  
<http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Cromatografia.pdf>
19. Cromatografía de Capa Fina [Internet]. 2017 [Citado el 10 de octubre del 2018]. Disponible en:  
<http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/Thin.htm>
20. Benzodiazepinas. [Internet]. 2017 [Citado el 02 de agosto del 2018]. Disponible en: <http://www.librosdeanestesia.com/guiafarmacos/Alprazolam.htm>
21. Valsecia M, Malgor L. Farmacología de las Benzodiazepinas y de la transmisión gabaérgica, Psicofarmacología. España. Facultad de Medicina. Universidad Nacional del Nordeste. 2018

22. Aguilar J, *et al.* Tratado de anestesia y reanimación, Ed Aran Ediciones, España, 2012.
23. Goodman & Gilman. Las Bases farmacológicas de la terapéutica. 10a Ed. México Editorial McGraw Hill. 2015.
24. Harvey R, *et al.* Farmacología. 2a ed. Editorial. McGraw Hill. México. 2012.
25. Clarke E, *et al.* Clarke's Isolation and Identification of Drugs. 2nd Edition. EEUU Editorial Advisory Board. Michigan .2011.
26. Linares M. Identificación de metabolitos de Benzodiazepinas en orina mediante las técnicas de inmunoensayo y gc/ms Tesis de grado. Universidad Nacional Autónoma de México. 2013.
27. Cristea A. Tratado de farmacologie, Editura Medicală, Bucuresti, 54-65.2012.
28. Wall P. Cromatografía de capa fina: un enfoque práctico moderno, cromatografía RSC monografías, Royal Society of Chemistry. Londres. 2016.
29. Farmacopea Europea. 7a ed. Consejo de Europa. Estrasburgo.4. 2017
30. Pelander A, *et al.* Detección de medicamentos básicos en muestras de orina de 2 ml mediante cromatografía de capa sobrepresionada de doble placa y comparación con gas cromatografía-espectrometría de masas.2013.
31. Poole F. Cromatografía de capa fina en Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 3rd ed (eds A.C. Moffat, D. Osselton y B. Widdop), Pharmaceutical Press. Londres, págs. 392-424. 2014.
32. Schütz H. Benzodiazepinas II. Un manual. Datos básicos, métodos analíticos, farmacocinética y Literatura completa, Springer-Verlag. Berlín. 2014.
33. La Asociación Internacional de Toxicólogos Forenses (TIAFT) / Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) Valores de Rf cromatográficos de capa fina de sustancias toxicológicamente relevantes en muestras estandarizadas Systems. 2nd ed. VCH, Weinheim. 2013.
34. Volf K. Detección de 1,4-benzodiazepinas y benzofenonas con un grupo amino secundario por conversión térmica y diazotación y pulverización con reactivo Bratton-Marshall. J Planar Chromatogr,11, 132-6. 2014.

## IX. ANEXOS

**Anexo 1.** Preparación de material de vidrio y reactivos químicos en el laboratorio de Toxicología Universidad Norbert Wiener.



En el **anexo 1**, se observa a las tesistas preparando los materiales y los reactivos.

**Anexo 2.** Preparación de los reactivos, de los equipos y las placas para la determinación de Benzodiazepinas en el laboratorio de Toxicología de la Universidad Mayor de San Marcos.



En el **anexo 2**, se observa a las tesistas preparando los reactivos, los equipos y las placas para la determinación de Benzodiazepinas.

### Anexo 3. Secado de Placas cromatografías con Silicagel G.



En el **anexo 3**, se observa la preparación de las placas de silicagel G de medidas de 10x20cm, luego se las llevo para su secado al horno o a temperatura de ambiente.

### Anexo 4. Muestras de orina con Diazepam y Alprazolam.



En la **anexo 4**, se observa la recolección de la muestra de orina de pacientes voluntarios que ingerieron Benzodiazepinas (Alprazolam o Diazepam).

**Anexo 5.** Proceso de extracción de la muestra de orina de metabolitos Benzodiacepinicos (Diazepam y Alprazolam) de personas voluntarias.



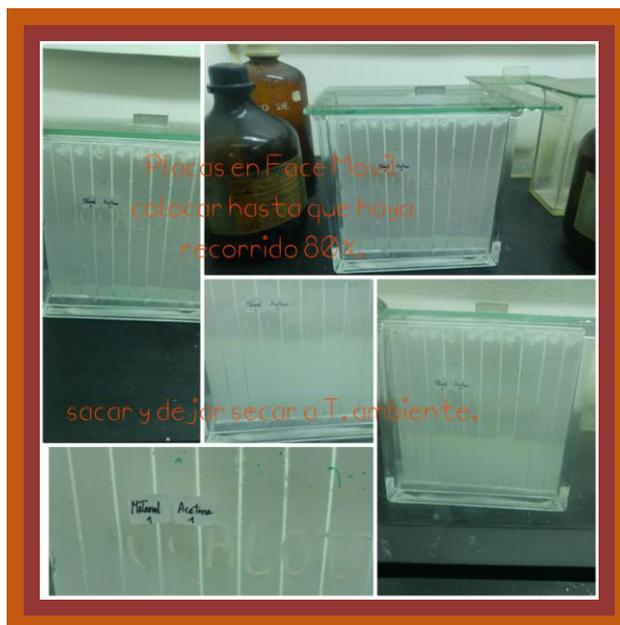
En el **anexo 5** , se observó el proceso de extracción para ello se utilizó la pera de decantación, a la cual se añadió la muestra de orina con Diazepam o Alprazolam, luego se añadió eter etílico entre 15-20 mL, se homogenizó la muestra y se dejó en reposo por 20 minutos y luego la separación de fases acuosa y orgánica.

**Anexo 6.** Siembra de las placas cromatográficas con los Estándares Secundarios de Diazepam y Alprazolam.



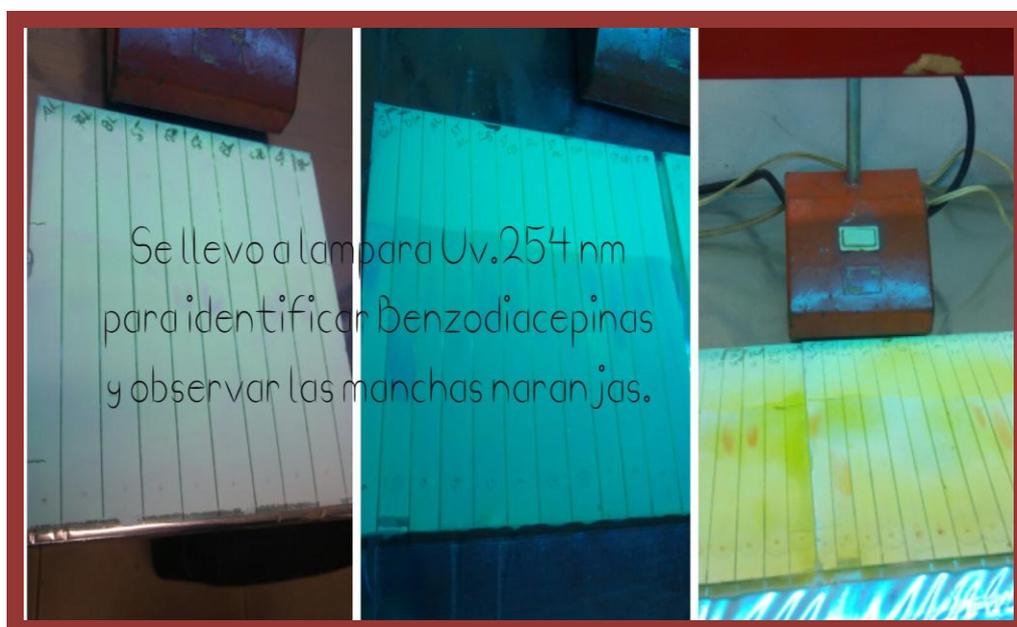
En el **anexo 6**, se observa el sembrado de los estándares secundarios de Alprazolam y Diazepam, sembrado de la muestra problema de Alprazolam y Diazepam, sembrado de Fenobarbital Q.P, Fenitoina y el blanco.

**Anexo 7.** Preparación del sistema solvente Metanol: Acetona (1:1 V/V).



En el **anexo 7**, se observa la preparación del sistema solvente: Metanol: Acetona (1:1 v/v), luego se visualiza el recorrido de las muestras.

**Anexo 8.** Revelado físico de las Benzodiazepinas usando UV.



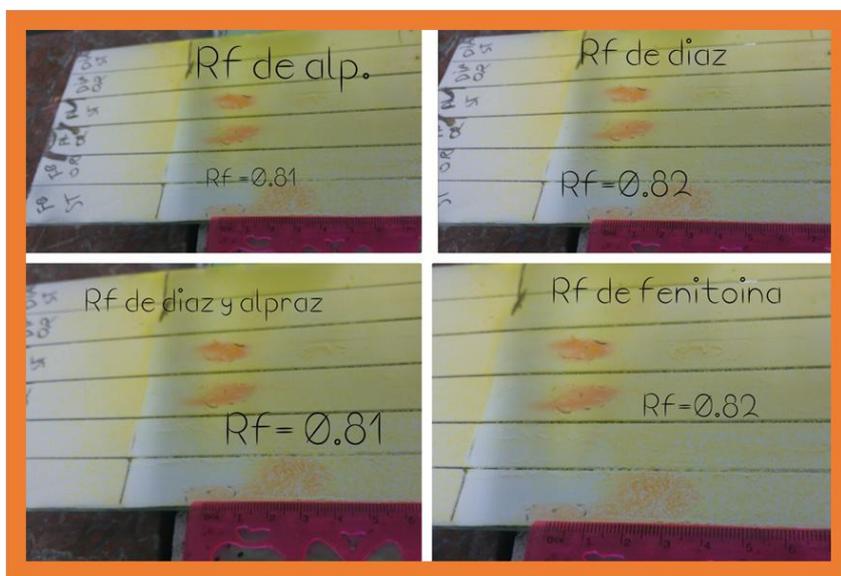
En el **anexo 8**, se observó que luego de llevar las placas a la lámpara UV a 254 nm, se pudo identificar el recorrido de las Benzodiazepinas y Fenitoína

**Anexo 9.** Revelador químico dragendorff usado para la identificación de Benzodiazepinas.



En el **anexo 9**, se observa el recorrido de las Benzodiazepinas luego de usar el revelador dragendorff la cual dio manchas de color naranja para luego medir su Rf que en promedio fue 0,8.

**Anexo 10.** Comparación de los Rf de las Benzodiazepinas (Alprazolam y Diazepam) con Fenitoina.



En el **anexo 10**, se observa la visualización de manchas naranjas dandonos positivo y la medida del Rf de las Benzodiazepinas (Alprazolam y Diazepam) que nos dio un promedio de 0,8 en comparación con la Fenitoina que también tuvo un Rf de 0,81 en promedio lo cual nos confirma que la cromatografía en capa fina es una técnica altamente sensible pero específica para Benzodiazepinas.

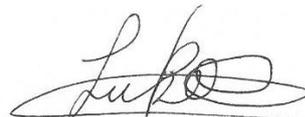
## ANEXO 11. MATRIZ DE CONSISTENCIA

<u>TITULO</u>	<u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	<u>OBJETIVOS</u>	<u>HIPOTESIS</u>	<u>VARIABLES</u>
<p><b>TITULO</b></p> <p>Determinación de una técnica selectiva por cromatografía en capa fina para identificación de Benzodiazepinas diciembre 2017.</p>	<p><b>PROBLEMA GENERAL</b></p> <p>La Cromatografía en Capa Fina es una técnica selectiva para identificar Benzodiazepinas.</p>	<p><b>OBJETIVO GENERAL</b></p> <p>Determinar una técnica selectiva por Cromatografía en Capa Fina para identificar Benzodiazepinas.</p>	<p><b>HIPOTESIS GENERAL</b></p> <p>La cromatografía de capa fina es una técnica selectiva para la identificación de Benzodiazepinas (Alprazolam y Diazepam).</p>	<p><b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b></p> <p>Muestras de orina de personas voluntarias con ingesta de Benzodiazepinas.</p>
	<p><b>PROBLEMA ESPECIFICO</b></p> <p>1. ¿Es la Cromatografía en Capa Fina una técnica selectiva para identificar Alprazolam?</p> <p>2. ¿Es la Cromatografía en Capa Fina una técnica selectiva para identificar Diazepam?</p>	<p><b>OBJETIVOS ESPECIFICOS</b></p> <p>1.-Determinar una técnica selectiva por Cromatografía en Capa Fina para identificar Alprazolam.</p> <p>2.- Determinar una técnica selectiva por Cromatografía en Capa Fina para identificar Diazepam.</p> <p>3.-Determinar una técnica selectiva por Cromatografía en Capa Fina para identificar otras sustancias químicas.</p>	<p><b>HIPOTESIS ESPECIFICA</b></p> <p>La cromatografía de capa fina es una técnica selectiva para identificar Alprazolam.</p> <p>La cromatografía de capa fina es una técnica selectiva para identificar Diazepam.</p>	<p><b>VARIABLE DEPENDIENTE</b></p> <p>Cantidad mínima detectable de Benzodiazepinas.</p>

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, *Ines birmani Paracueri Maldonado* .....

identificada con DNI...*47559481*..... de .....Años, autorizó mediante mi firma el consentimiento para la administración de benzodicepinas (diazepam o alprazolam), para la extracción de una muestra biológica de orina, para el examen químico cumpliendo estrictamente con las indicaciones adecuadas, la cual he sido informado.



Lima, 05 de diciembre de 2017.

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Yo, *Ines birmani Paracueri Maldonado* .....

identificada con DNI...*47559481*..... de .....Años, autorizó mediante mi firma el consentimiento para la administración de benzodiazepinas (diazepam o alprazolam), para la extracción de una muestra biológica de orina, para el examen químico cumpliendo estrictamente con las indicaciones adecuadas, la cual he sido informado.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Lupko' with a stylized flourish at the end.

Lima, 05 de diciembre de 2017.