



**Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Farmacia  
Programa de Magíster en Ciencias Farmacéuticas**

**DETERMINACIÓN DE LAMOTRIGINA EN SANGRE,  
POR UN MÉTODO BASADO EN UN ANÁLISIS DE  
RIESGO: UN APOORTE AL TRATAMIENTO  
FARMACOLÓGICO DE PACIENTES CON EPILEPSIA**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Farmacéuticas

**POR: MILENKA LLIFEN ALBORNOZ PIERATTINI**

Profesor Guía: MSc. Sigrid Mennickent C.  
Prof. Co-Guía: MSc. Marta de Diego G.  
Dpto. de Farmacia, Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción

**Septiembre, 2021  
Concepción, Chile**

## AUTORIZACION DE PUBLICACION

Quien suscribe, MILENKA LLIFEN ALBORNOZ PIERATTINI, RUT: 16979642-4, alumna del Programa de Magister en Ciencias Farmacéuticas, de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Concepción, declara ser autora de la tesis **DETERMINACIÓN DE LAMOTRIGINA EN SANGRE, POR UN MÉTODO BASADO EN UN ANÁLISIS DE RIESGO: UN APORTE AL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE PACIENTES CON EPILEPSIA** y conceder derecho de publicación, comunicación al público y reproducción de esa obra, en forma total o parcial en cualquier medio y bajo cualquier forma del mismo, a la Universidad de Concepción, Chile, para formar parte de la colección material o digital de cualquiera de las Bibliotecas de la Universidad de Concepción y del Repositorio UDEC. Esta autorización es de forma libre y gratuita, y considera la reproducción de la obra con fines académicos y de difusión tanto nacional como internacionalmente.

Asimismo, quien suscribe declara que dicha obra no infringe derechos de autor de terceros.



.....  
(MILENKA LLIFEN ALBORNOZ PIERATTINI)

## DEDICATORIA

*Para la familia que me formó*

*Y especialmente para la familia que formé*

*Para ti Isabella de mi vida.*



## RESUMEN

La Epilepsia es una condición neurológica caracterizada por "crisis de epilepsia" recurrentes y no provocadas por desencadenantes inmediatos identificables. La epilepsia es un síntoma de una alteración neurológica. Produce consecuencias psicosociales en las personas afectadas.

Existen numerosos medicamentos anticonvulsivantes entre ellos la Lamotrigina (LTG).

La LTG es un compuesto de tipo feniltiazina derivada de los antimetabolitos del ácido fólico, es importante determinar los niveles de LTG en sangre para asegurar una adecuada efectividad e inocuidad del tratamiento.

Se desarrolló un método bioanalítico para la determinación de LTG en suero humano por cromatografía de líquidos y se implementó un análisis de riesgo para aumentar su robustez. Se determinaron los parámetros críticos del método (CMP) y los atributos analíticos críticos (CAA) mediante diagrama de Ishikawa, de todos los CMPs y CAAs se escogieron algunos y se sometieron a una matriz de riesgo que dio como resultado que el pH de la fase móvil y el porcentaje de modificador orgánico de la fase móvil presentan un alto riesgo y la velocidad de flujo un riesgo medio para los CAA evaluados (área de pico, tiempo de retención, factor de asimetría y platos teóricos); se optimizaron éstos parámetros mediante un diseño de experimento Box-Behnken y se obtuvo los siguientes valores óptimos para desarrollar el método: pH de fase móvil 6,4, porcentaje de modificador orgánico de la fase móvil 30 y velocidad de flujo de 1 mL/min.

Finalmente se validó el método según las normas de la *Food and Drugs Administration* (FDA), demostrando que el método es lineal en el intervalo de concentraciones de 1 - 40 µg/mL y que cumple con todos los requisitos exigidos por la FDA en cuanto a selectividad, exactitud, precisión, recuperación y límite de cuantificación y detección.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1Epilepsia.....	1
1.2Clasificación de las crisis epilépticas .....	1
1.3Incidencia y prevalencia de la epilepsia.....	5
1.4Tratamiento farmacológico para la epilepsia.....	6
1.4.Lamotrigina .....	9
1.4.1 Mecanismo de acción .....	10
1.4.2.Farmacocinética .....	10
1.4.3.Uso clínico .....	11
1.5.Métodos analíticos para la determinación de Lamotrigina .....	12
1.6.Cromatografía.....	12
1.7.Cromatografía líquida de alta resolución con detector UV .....	13
1.7.1.Detector UV/VIS .....	14
1.8.Validación de método bioanalítico.....	15
1.8.1.Exactitud.....	15
1.8.2.Precisión.....	16
1.8.3.Recuperación.....	16
1.8.4.Selectividad .....	17
1.8.5.Sensibilidad Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) .....	17
1.9.Calidad analítica por DISEÑO (AQbD) .....	17

2.	HIPOTESIS .....	21
3.	OBJETIVOS .....	22
	3.1.Objetivos generales .....	22
	3.2.Objetivos específicos.....	22
4.	MATERIALES.....	23
	4.1.Reactivos y solventes.....	23
	4.2.Estándares.....	23
	4.3.Materiales y equipos.....	23
5.	METODOLOGÍA .....	25
	5.1.Preparación de estándares .....	25
	5.2.Selección de la Longitud de onda de trabajo ( $\lambda$ ).....	25
	5.3.Desarrollo de método analítico por HPLC basado en AQbD .....	25
	5.3.1. Definición del perfil analítico del método (ATP) .....	26
	5.3.2. Selección de Parámetros críticos del método (CMP) y atributos analíticos críticos (CAA) para el método analítico .....	26
	5.3.3. Realización de la Matriz de Riesgo para el método analítico ....	26
	5.3.4. Diseño de experimento para la optimización del método analítico .....	27
	5.4.Diseño de experimento para optimización de extracción de LTG.....	27
	5.5Obtención de suero humano.....	28
	5.6Extracción de suero humano .....	28
	5.7Preparación Tampón para fase móvil .....	28
	5.8Preparación de fase móvil.....	28
	5.9Fortificación de las muestras .....	29

5.10	Protocolo de extracción de muestras.....	29
5.11	Validación del método bioanalítico.....	30
5.11.1	Selectividad.....	31
5.11.2	Curva de calibración y límite de cuantificación y límite de detección .....	31
5.11.3	Precisión.....	32
5.11.4	Exactitud y recuperación.....	33
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
6.1.	Selección de Longitud de onda.....	34
6.2.	Desarrollo de método analítico basado en AQbD.....	34
6.2.1.	Definición del perfil analítico del método (ATP).....	34
6.2.2.	Selección de Parámetros críticos del método (CMP) y atributos analíticos críticos (CAA) para método analítico.....	36
6.2.3.	Realización de la Matriz de riesgo para método analítico.....	37
6.2.4.	Diseño de experimento para optimización del método analítico.....	40
6.3.	Diseño de experimento para optimización de extracción.....	55
6.4.	Validación del método bioanalítico.....	56
6.4.1	Selectividad.....	56
6.4.2.	Límite de cuantificación.....	57
6.4.3.	Curva de calibración.....	59
6.4.4.	Límite de detección.....	61
6.4.5.	Precisión.....	62
6.4.6.	Exactitud.....	64
6.4.7.	Recuperación.....	64

7.	CONCLUSIONES .....	66
8.	GLOSARIO .....	67
9.	BILBIOGRAFÍA .....	68
10.	ANEXO.....	75
10.1.	Anexo 1 .....	75





## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 6.1 : Perfil analítico del método.....	35
Tabla 6.2: Matriz de análisis de riesgo .....	38
Tabla 6.3: Tabla de ponderación de Severidad del fallo para el método analítico....	39
Tabla 6.4: Tabla de ponderación de Ocurrencia del fallo para el método analítico.	39
Tabla 6.5: Tabla de ponderación de Detección del fallo para el método analítico....	40
Tabla 6.6: Matriz de diseño para la optimización del método cromatográfico. ....	41
Tabla 6.7: Análisis ANOVA para área de pico .....	44
Tabla 6.8: Análisis ANOVA para tiempo de retención .....	45
Tabla 6.9: Análisis ANOVA para factor de asimetría. ....	46
Tabla 6.10: Análisis ANOVA para platos teórico .....	47
Tabla 6.11: Optimización de respuestas múltiples .....	53
Tabla 6.12: Optimización para extracción de LTG en suero.....	55
Tabla 6.13: Áreas obtenidas para concentración de 1 µg/mL. ....	59
Tabla 6.14: Test Fisher para comparar curva en matriz y en solvente. ....	61
Tabla 6.15: Repetibilidad en términos de % C.V .....	62
Tabla 6.16: Precisión intermedia en términos de % C.V.....	63
Tabla 6.17 Exactitud.....	64
Tabla 6.18: Recuperación.....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Línea de tiempo para fármacos antiepilépticos(Elza Márcia Targas Yacubian et al,2014).....	8
Figura 1.2: Estructura química de Lamotrigina. ....	10
Figura 1.3: Esquema típico para un detector UV/Vis (Veronica R, Meyer, 2010). ...	14
Figura 5.1:Procedimiento de extracción de LTG y estándar interno desde suero fortificado. ....	30
Figura 6.1 Diagrama de Ishikawa que muestra la relación causa-efecto de los potenciales CMPs y CAAs del método. ....	36
Figura 6.2: Diagrama de Pareto para interacciones que afectan variable área de pico. ....	45
Figura 6.3: Diagrama de Pareto para interacciones que afectan tiempo de retención. ....	46
Figura 6.4: Diagrama de Pareto para interacciones que afectan significativamente la respuesta factor de asimetría. ....	47
Figura 6.5: Diagrama de Pareto para interacciones que afectan significativamente la respuesta platos teóricos.....	48
Figura 6.6: Gráficos superficie respuesta para la representación de la influencia de los factores velocidad de flujo, % de modificador orgánica y pH de fase móvil para área de pico.....	49
Figura 6.7: Gráficos superficie respuesta para la representación de la influencia de los factores velocidad de flujo, % de modificador orgánico y pH de fase móvil para tiempo de retención. ....	50
Figura 6.8: Gráficos superficie respuesta para la representación de la influencia de los factores velocidad de flujo, % de modificador orgánico y pH de fase móvil para área de factor de asimetría.....	51

Figura 6.9: Gráficos superficie respuesta para la representación de la influencia de los factores velocidad de flujo, % de modificador orgánico y pH de fase móvil para platos teóricos. ....	52
Figura 6.10: Gráficos superficie respuesta para la optimización de respuestas múltiples. ....	54
Figura 6.11: Cromatograma de suero sin fortificar.....	56
Figura 6.12: Cromatograma de suero fortificado con concentración 1 µg/mL .....	57
Figura 6.13: Cromatograma para suero fortificado concentración 1 µg/mL.....	58
Figura 6.14: Cromatograma para suero fortificado concentración 3 µg/mL.....	58
Figura 6.15: Cromatograma para suero fortificado concentración 5 µg/mL.....	58
Figura 6.16: Curva de calibración en solvente.....	60
Figura 6.17: Curva de calibración en matriz .....	60
Figura 6.18: Cromatograma para concentración de LTG 0,09 µg/mL .....	62



## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 5.1: Coeficiente de variación.....	32
Ecuación 5.2 : Porcentaje de recuperación .....	33
Ecuación 6.1: Factor de asimetría. ....	40
Ecuación 6.2: Número de platos teóricos .....	41



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Epilepsia

Según la definición de la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE), esta es una alteración que ocurre en la corteza cerebral que se caracteriza por la predisposición a tener crisis de epilepsia y también a sus consecuencias tanto psicosociales como neurológicas (ILAE,2005). Para definir la Epilepsia como tal se requiere la presencia de a lo menos 1 crisis en la cual se desconoce el desencadenante, sin embargo en el año 2014 se dio una nueva definición clínica operativa de la epilepsia, en la cual se explicita que deben ocurrir a lo menos 2 crisis no provocadas (o reflejas) con más de 24 horas entre la ocurrencia de ellas o 1 crisis no provocada (o refleja) y la posibilidad de tener otras crisis similares después de 2 crisis no provocadas (correspondiente aproximadamente al 75% o más en pacientes con lesión cortical cerebral). (MINSAL 2014, Guía clínica AUGE Epilepsia adultos; Robert S. Fisher et al 2014).

## 1.2 Clasificación de las crisis epilépticas

Las crisis epilépticas se dividen en dos grupos principalmente según la ILAE : las crisis epilépticas generalizadas y las crisis focales (Penry, 1981; MINSAL 2014, Guía clínica AUGE Epilepsia adultos; Robert S. Fisher et al 2017)

Crisis epilépticas generalizadas: Se originan en un punto cerebral y se propagan rápidamente por la red neuronal, su manifestación clínica indica compromiso simultáneo de ambos hemisferios cerebrales incluyendo estructuras subcorticales y corticales. Dentro de las crisis epilépticas generalizadas se encuentran las siguientes

(Allan H. Ropper ,2019; MINSAL 2014, Guía clínica AUGE Epilepsia adultos; Robert S. Fisher et al 2014) :

1. Ausencia o Petit mal: La principal característica es que se manifiestan episodios de desconexión los cuales duran segundos y se presentan en niños los que quedan inmóviles, con la vista fija, inconsciente, no reactivos a estímulos, no provocan decaimiento post crisis, sin embargo, existen ausencias atípicas en las que el paciente demora más tiempo en recuperar la conciencia.
2. Crisis Tónico-clónicas: El individuo cae inconsciente al suelo, rígido, luego de unos segundos convulsiona todo el cuerpo, elimina saliva por la boca, la crisis dura entre 1 – 5 minutos donde finalmente queda en estado de sopor profundo.
3. Crisis Tónicas: De breve duración donde el paciente cae al suelo y su cuerpo queda rígido.
4. Crisis Atónicas: Se pierde en forma brusca la fuerza, son típicas del inicio de la niñez y a éstas se les asocia un alto riesgo de lesiones físicas debido a los traumatismos post caídas, duran pocos segundos y la recuperación de conciencia es rápida.
5. Crisis Mioclónicas: Sacudidas o espasmos del cuerpo en un músculo o grupo de músculos y son de breve duración, suelen provocar movimientos anormales en ambos lados del cuerpo.
6. Crisis Clónicas: Crisis convulsivas generalizadas, caracterizadas por movimientos repetitivos, sin fase tónica inicial, se observan principalmente en recién nacidos.

Crisis Focales: Aquellas en que los cambios clínicos y los síntomas o signos indican activación de una parte precisa de un hemisferio cerebral, se subclasifican en tres:

1. Crisis Focal Simple
2. Crisis Focal Compleja
3. Crisis Focal secundariamente generalizada

1. Crisis Focal Simple: Se conserva la conciencia, por lo que el paciente es capaz de describir posteriormente la crisis, ésta se subclasifica en:
  - a) Crisis con signos motores: Se originan en la corteza motora de un hemisferio y se dividen en :
    - Motora focal sin progresión
    - Motora focal con progresión
    - Versiva
    - Postural
    - Fonatoria
  - b) Crisis con síntomas sensoriales
    - Crisis con síntomas visuales
    - Crisis con síntomas auditivos
    - Crisis con síntomas olfatorios
    - Crisis con síntomas gustatorios
    - Crisis con síntomas vertiginosos
  - c) Crisis con síntomas o signos autonómicos: Sensaciones abdominales, trastornos del ritmo cardiaco, pilo erección, dilatación pupilar, entre otros.
  - d) Crisis con síntomas psíquicos.
  
2. Crisis focales complejas: El paciente no es capaz de recordar, estas crisis se asocian frecuentemente a automatismos seguidos de periodos de confusión y/o amnesia.
  
3. Crisis focales secundariamente generalizadas: Las crisis focales (simple o compleja) puede evolucionar hacia una crisis convulsiva tónico-clónica generalizada, un paciente puede presentar diferentes tipos de crisis.

Síndromes epilépticos: Se habla de síndromes cuando existe un trastorno epiléptico con un conjunto de síntomas y signos característicos, como la edad de aparición de crisis, tipo de crisis, hallazgos mediante electroencefalograma (EEG), hallazgos en

la neuroradiología, respuesta a tratamiento y pronósticos a largo plazo. A continuación se describen los síndromes epilépticos más frecuentes:

1. Epilepsia Rolándica benigna: Síndrome epiléptico benigno, se presenta entre los 3-13 años de edad, representan alrededor de un 15% de las epilepsias de niños, las crisis comprometen un lado del rostro, lengua, dificultad para tragar saliva y hablar. Se presentan entre 1 a 2 horas luego de iniciarse el sueño o momentos antes de despertar, en la mayoría de los casos se presentan pocas crisis.
- 2- Ausencia o Petit mal: Se presentan entre los 3-11 años de edad, constituyen entre un 5-10% de los síndromes epilépticos en niños. Se caracterizan por episodios de desconexión, mirada fija, leve parpadeo. Se repiten muchas veces al día y tiene un excelente pronóstico.
- 3- Epilepsia mioclónica juvenil: Abarca cerca del 7% de los casos de epilepsia, presentándose alrededor del inicio de la pubertad, las crisis son matinales y coexisten sacudidas mioclónicas del despertar, se asocian crisis tónico-clónicas generalizadas cuando existe privación de sueño; también pueden existir ausencias o crisis fotosensibles. Responde bien a los fármacos antiepilépticos pero se recae al suspenderlos.
- 4- Síndrome de West: No es de gran frecuencia pero tiene una alta severidad, posee una triada clásica que se compone por espasmos, atraso o detención en el desarrollo psicomotor y un patrón eléctrico anormal en el EEG conocido por el nombre de hipsarritmia.
- 5- Síndrome de Lennox Gastaut: Infrecuente pero de alta severidad, caracterizado por crisis de difícil control, retardo mental y patrón en EEG de espiga onda lenta.



- 6- Epilepsia del lóbulo temporal: Es la epilepsia focal más frecuente, las crisis tienen origen en las estructuras profundas del lóbulo temporal. Se producen principalmente crisis focales complejas, pueden aparecer automatismos y la posibilidad de generalización secundaria con la aparición de una crisis tónico-clónica, suele ser de difícil control con fármacos antiepilépticos y tiene una buena respuesta a tratamiento quirúrgico.
- 7- Epilepsia del lóbulo frontal: Las crisis frontales pueden ser nocturnas, crisis parciales complejas, crisis con giros de cabezas u ojos, automatismos bilaterales complejos, etc. Es de difícil diagnóstico.

### **1.3 Incidencia y prevalencia de la epilepsia**

La incidencia hace referencia a los casos nuevos en un tiempo y espacio definidos, usualmente presentada como tasa ajustada a 100.000 habitantes/año. Puede referirse a la población general o a grupos especiales (infancia, ancianos, mujeres, etc.). En cuanto a la incidencia de la epilepsia en toda la población, esta afecta aproximadamente a 50 millones de personas en el mundo. Es difícil obtener datos exactos de incidencia por la dificultad de hacer un diagnóstico correcto. (MacDonald BK OC, Sander JW et al 2000; Bell GS, Sander JW,2001).

En Chile se ha reportado una incidencia de 114 por 100.000 habitantes por año. En relación a la incidencia acumulativa, que es el riesgo individual de desarrollar epilepsia en un tiempo determinado, en nuestro país se desconoce esa información. En países europeos es del 2% al 4% (MINSAL 2014, Guía clínica AUGE Epilepsia adultos).

La prevalencia es el conjunto de enfermos de un espacio y tiempo determinados, generalmente se presenta como tasa ajustada a 1.000 habitantes. A nivel mundial la prevalencia de epilepsia activa se estima en 5 a 10 casos por 1.000, en Chile los

datos de prevalencia son de 7 a 10.8 por 1.000 habitantes. (Placencia, 2004; Chiofalo N, 1979; MINSAL 2014, Guía clínica AUGE Epilepsia adultos).

#### **1.4 Tratamiento farmacológico para la epilepsia**

El tratamiento farmacológico tiene como objetivo alcanzar la total ausencia de las crisis. El uso de fármacos antiepilépticos (FAE) debe ser personalizado, según el tipo de crisis, síndrome epiléptico, uso de otros fármacos en el adulto, entre otros.

En alrededor de 2/3 de todos los pacientes con epilepsia las crisis logran ser controladas por completo, en cerca del 20-25% se reduce de manera importante la frecuencia y gravedad de las crisis. Es de gran utilidad conocer las características de los fármacos antiepilépticos y las interacciones entre ellos así como conocer las reacciones adversas entre los FAEs y otro tipo de fármacos.

Existen ciertos fármacos que tienen una mayor eficacia para ciertos tipos de crisis, por esto es necesario emplear el más apropiado a dosis óptimas para diferentes tipos de crisis. El tratamiento farmacológico debe iniciarse después de una segunda crisis no provocada y después de la primera crisis no provocada sólo si existe lesión en la neuroimagen, existe déficit neurológico, el EEG muestra actividad epiléptica inequívoca o si el riesgo de otra crisis es inaceptable. (Elinor Ben Menachem, 2014)

En un comienzo debe administrarse un fármaco en monoterapia, y se aumentan las dosis hasta que se hayan garantizado las concentraciones terapéuticas sostenidas. Si con el primer FAE no se logra el control total de la crisis pero sí algún grado de eficacia, entonces se debe agregar un segundo FAE hasta que éste logre total control de la crisis, cuando ya se logra que el paciente tenga ausencia de crisis se procede a retirar el primer fármaco de manera paulatina. La politerapia de 2 FAE debe usarse sólo cuando el tratamiento en monoterapia no ha dado resultado en el control de la crisis, en los casos más refractarios, se requieren más de dos fármacos para controlar las crisis (Deckers CL, Genton P, Sills GJ et al,2010; Beghi E, Gatti G, Tonini C, et al, 2003).

En el año 2008 una subcomisión de la ILAE elaboró una guía para el monitoreo de niveles terapéuticos, en la cual se dice que los rangos de referencia usados por los laboratorios, no son rangos terapéuticos, si no que corresponden a los niveles plasmáticos de FAE en los que se logra el control de las crisis epilépticas.

En cuanto a los niveles del rango de referencia, el límite inferior corresponde al valor en el que es poco probable que se produzca una respuesta terapéutica, el límite superior corresponde al valor en el que existe una alta probabilidad de toxicidad.

Este rango puede ser de utilidad para guiar el tratamiento, sin embargo, las dosis efectivas de los FAE se deben basar en criterios clínicos individuales para cada paciente ya que algunos pacientes pueden alcanzar efectos terapéuticos exitosos con concentraciones plasmáticas fuera de los rangos de referencia o pueden no presentar efectos adversos al incluso sobrepasar los límites tóxicos y otros pacientes pueden presentar síntomas de toxicidad con niveles inferiores a sus concentraciones plasmáticas a lo largo del día denominados niveles de valle, en contraposición a los momentos de concentración máxima del fármaco a lo largo del día. Por lo tanto, las concentraciones encontradas dentro del rango de referencia no son necesariamente terapéuticas, efectivas u óptimas (Elza Márcia Targas Yacubian et al, 2014; Panayiotopoulos CP, 2011).

Los FAE pueden ser clasificados en tres generaciones (Figura 1.1) (Brodie MJ, 2010).

- Primera generación: Está comprendida por aquellos fármacos que fueron comercializados entre los años 1857-1958, entre ellos se incluyen bromuro de potasio, fenobarbital y varias moléculas derivadas de la estructura de los barbitúricos, tales como la fenitoína, la primidona, la trimetadona y la etosuximida.
- Segunda generación: Aquí se incluyen fármacos tales como, carbamazepina, valproato de sodio (ácido valproico) y los benzodiazepínicos, que fueron introducidos entre 1960 y 1975.

- Tercera generación: Entre ellos se encuentra progabida, la gabapentina, la vigabatrina y la tiagabina, lamotrigina y el topiramato.

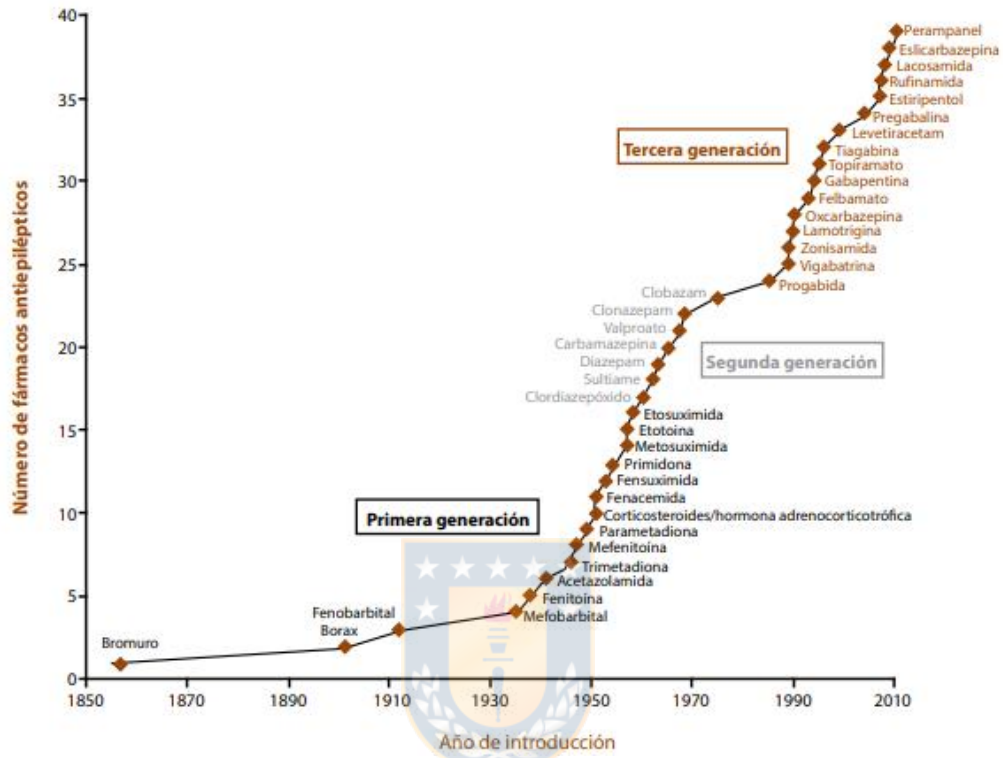
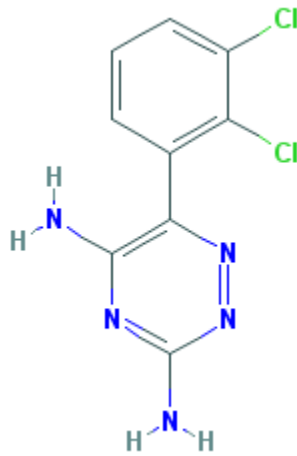


Figura 1.1: Línea de tiempo para fármacos antiepilépticos(Elza Márcia Targas Yacubian et al,2014).

#### 1.4. Lamotrigina

La Lamotrigina (LTG) es un fármaco anticonvulsivante que pertenece al grupo de los nuevos antiepilépticos, corresponde a un compuesto de tipo feniltriazina derivada de los antimetabolitos del ácido fólico, pero su actividad antifólica es muy escasa. Tiene un espectro relativamente amplio, estudios en animales demuestran que la LTG previene crisis epilépticas que se desencadenan por electroshock máximo y por pentilentetrazol con una potencia similar a la de la carbamazepina y de la fenitoína, es eficaz sobre las descargas electroencefalográficas inducidas eléctricamente, mostrando una acción tanto en crisis parciales simples como en complejas; en el modelo kindling, que es un modelo de crisis parciales complejas, también evidencia una reducción significativa en el número de respuestas, y en modelos experimentales de crisis de ausencia, se ha observado que tiene una respuesta eficaz en algunos casos e ineficaz en otros. De los estudios en animales se puede inferir que la LTG tiene un amplio espectro, lo que lleva a suponer que tiene múltiples mecanismos de acción. Está indicada en la especie humana como terapia para pacientes mayores de 2 años frente a crisis parciales, crisis tónico-clónicas generalizadas, ausencias típicas y atípicas, mioclonías y crisis atónicas, también está indicada para el proceso de conversión a monoterapia farmacológica en personas de al menos 16 años de edad con convulsiones parciales y que reciben tratamiento con carbamazepina, fenitoína, fenobarbital, primidona o valproato como fármaco antiepiléptico único (Florez et al.,1997;Elza Márcia Targas Yacubian et al,2014; Gilliam FG et al, 2011).

La fórmula química de la LTG es 6-(2,3-diclorofenil)-1,2,4-triazino-3,5-diamina y la fórmula molecular es  $C_9H_7Cl_2N_5$ , su estructura química se observa en la Figura 1.2, su peso molecular es de 256.09 g/mol, posee un pKa de 5,7, su solubilidad en agua es de 0,48 g/L y su log P (coeficiente de partición) de 1,93 (PubChem 2021; Moffat, Osselton, & Widdop,2011).



**Figura 1.2: Estructura química de Lamotrigina.**

#### **1.4.1. Mecanismo de acción**

Su principal mecanismo de acción es la inhibición de los canales de sodio y de las descargas de alta frecuencia; también actúa sobre los canales de calcio inhibiendo la liberación de neurotransmisores excitatorios como el ácido glutámico en el sistema nervioso central.

#### **1.4.2. Farmacocinética**

Se absorbe en forma rápida y completa por vía oral, su unión a proteínas es de 55 % y se elimina principalmente por glucuronidación hepática. Este mecanismo puede ser afectado por otros antiepilépticos. No tiene metabolitos activos. Su semivida de eliminación es prolongada (unas 24 horas en monoterapia), pero disminuye a 15 horas cuando se asocia a Fenitoína y aumenta a 60 horas si se utiliza junto con el Valproato de sodio, siendo de 24 horas cuando se asocia a un inductor más Valproato. La LTG no influye sobre el metabolismo de otros antiepilépticos, pero sus niveles séricos son reducidos a más de la mitad por fenitoína, carbamazepina, fenobarbital y primidona, y aumentados a más del doble por el valproato. Las

concentraciones plasmáticas habituales en seres humanos para LTG son de 2-20 µg/mL (Gskpro; productos – Lacmital, 2021)

### **1.4.3. Uso clínico**

Eficacia: La LTG posee un espectro de acción amplio siendo efectiva en crisis parciales y generalizadas. Su eficacia como fármaco coadyuvante o en monoterapia en pacientes con crisis parciales ha sido ampliamente demostrada. Es también efectiva en epilepsias idiopáticas generalizadas tales como las ausencias y la epilepsia juvenil mioclónica, y se utiliza también en el tratamiento del síndrome de Lennox-Gastaut.

Efecto adversos: Las reacciones adversas más frecuentes son diplopía, mareo, ataxia, cefalea, cansancio y somnolencia, es mejor tolerada en monoterapia que en politerapia, por lo que algunos de estos efectos secundarios pueden deberse a interacciones farmacodinámicas con otros antiepilépticos. Inicialmente, las reacciones adversas más frecuente fueron los exantemas, pero su frecuencia ha disminuido al instaurar más lentamente el tratamiento; también se han descrito alteraciones cutáneas graves, como dermatitis exfoliativa y síndrome de Stevens-Johnson con una frecuencia de 1:1.000 en adultos y de 1:100 en niños, que es mayor que con otros antiepilépticos, como carbamazepina (1:10.000); aunque esta frecuencia basada en el pequeño número de pacientes incluidos en los ensayos clínicos debe confirmarse. También se han descrito casos aislados de insuficiencia hepática. Se han observado cuadros fatales de insuficiencia de múltiples órganos, incluyendo coagulación intravascular diseminada, han sido observados pero el rol de la LTG en estos cuadros no ha sido aclarado (Campos & Kanner, 2004).

### **1.5. Métodos analíticos para la determinación de Lamotrigina**

Para la determinación de Lamotrigina se han reportado diferentes métodos analíticos, algunos de ellos, voltamperometría (Olga Domínguez Renedo et al. 2005), electroforesis capilar/ionización acoplado espectrometría de masas (Jack Zheng 2004), espectrofotometría (Hassan Heidari, 2020), cromatografía líquida en capa fina de alta resolución (HPTLC) (Kuldeep M. Patil, 2005) sin embargo la técnica analítica más utilizada es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) tanto en líquidos biológicos como en productos farmacéuticos; algunos de ellos: LTG en plasma humano con ésta técnica acoplada a espectrometría de masas, en saliva HPLC con detector DAD, suero humano HPLC acoplado a espectrometría de masas, en comprimidos HPLC con detector UV, entre otros (Ashok Kumar et al, 2017; Sandra Ventura et al, 2017; Rosa Sabença et al, 2020; Siyao Jin et al, 2019; J. Emami, 2005).

En el presente trabajo se realizará la determinación de LTG mediante la técnica de Cromatografía líquida de alta resolución con detector UV basado en la calidad analítica por diseño o en inglés Analytical Quality by Design (AQbD) tomándose como referencia un método ya desarrollado para implementarla (Elizabeth Greiner-Sosanko, 2017), la principal ventaja del desarrollo de métodos analíticos basados en AQbD es la robustez del método, en el cual la probabilidad de errores impredecibles es menor ya que se procede a hacer una evaluación crítica de los riesgos potenciales en el fallo del método y la evaluación de los principales efectos de interacción de los parámetros del mismo para obtener rendimientos de trabajos óptimos.

### **1.6. Cromatografía**

La cromatografía es la técnica analítica más utilizada para la separación y determinación de compuestos químicos. La base de ésta técnica se centra en las diferencias de velocidades de migración de los componentes de una muestra, éstos son arrastrados por una fase móvil (FM) la cual puede estar en estado gaseosa,



líquida o ser un fluido supercrítico (dependiendo del tipo de cromatografía utilizada) a través de una fase estacionaria (FE) la cual se encuentra fija al interior de una columna o sobre una superficie plana.

La cromatografía puede dividirse en dos, cromatografía en columna y cromatografía plana (Skoog, 2014; Mark F. Vitha 2016).

### **1.7. Cromatografía líquida de alta resolución con detector UV**

La cromatografía líquida de alta resolución es la técnica analítica más utilizada para la determinación de fármacos, esto debido a que posee una gran versatilidad, es rápida y no sólo es un método cualitativo si no que tiene excelentes resultados de manera cuantitativa. Es utilizada para separar y determinar analitos tanto en muestras orgánicas, inorgánicas y biológicas, y se aplica en muchos laboratorios tanto químicos, farmacéuticos o bioquímicos. Para la separación se combina una fase móvil (FM) líquida y una fase estacionaria (FE), la muestra es arrastrada a través de la fase móvil la cual es un líquido que se encuentra presurizado con el fin de obtener velocidades de flujo satisfactorias, la FM se hace pasar a través de la FE (columna analítica que posee micropartículas porosas que tienen diámetros que van de los 3 a los 10  $\mu\text{m}$ ) en donde los componentes de la muestra son retenidos a distintas velocidades dependiendo de la afinidad de los analitos por esta, produciéndose la separación analítica.

La separación cromatográfica se logra visualizar gracias a la función del detector, el cual es el encargado de captar una señal eléctrica y transmitirla al sistema de adquisición de datos. El detector ideal debería:

- Ser sensible a todos los analitos o registrar solo los de interés.
- No debe verse afectado por cambios de temperatura o por la composición de la FM.
- Se deben poder monitorear pequeñas cantidades del compuesto analizado.

- No debe contribuir al ensanchamiento de banda.
- Deben ser fáciles de manipular y robustos.

Es por esto que existen variados tipos de detectores que cumplen con las características requeridas por el analista. Considerando que la mayoría de los medicamentos poseen grupos que absorben al ultravioleta, el detector UV es el más utilizado para su determinación. En este trabajo se utilizó este detector ya que la molécula de LTG posee grupos cromóforos que absorben al UV (Guillermina, M., & Quiroga, P,2013, Mark F. Vitha 2016)

### 1.7.1. Detector UV/VIS

Es el tipo de detector más utilizado (figura 1.3), ya que es bastante sensible, tiene un amplio rango lineal, y no se ve afectado por las fluctuaciones de temperatura. Puede realizar registros de compuestos que absorben energía en el rango de longitudes de onda ultravioleta y luz visible.

Un detector UV mide la absorbancia del compuesto eluido, la fase móvil seleccionada debe cumplir el requisito de transparencia óptica en la longitud de onda seleccionada.

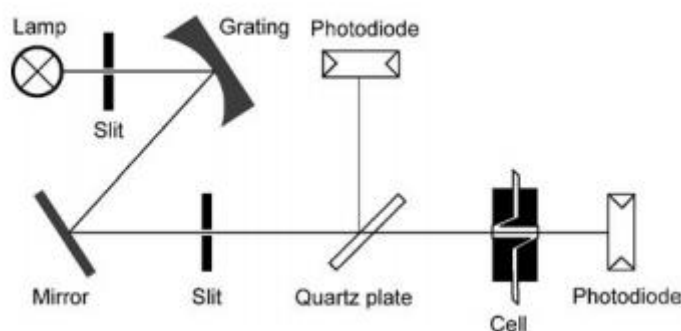


Figura 1.3: Esquema típico para un detector UV/Vis (Veronica R, Meyer, 2010).

La longitud de onda seleccionada para el análisis se coloca en el camino óptico mediante una rejilla, una placa de cuarzo que se encuentra frente a la celda del detector refleja solo una pequeña fracción de la luz sobre el fotodiodo de referencia. Este fotodiodo permite eliminar las fluctuaciones de la luz que puedan ocurrir. La geometría de la celda del detector permite que cualquier refracción o fluctuación conduzca a un mínimo ruido de línea de base. (Skoog, 2014; Veronica R. Meyer, 2010).

Se pueden utilizar dos tipos de lámparas:

- Lámparas de deuterio: emiten un espectro UV continuo (hasta aproximadamente 340 nm hasta los 600 nm.
- Lámparas de tungsteno: emiten en los rangos de longitudes de onda de 340-850 nm.



## **1.8. Validación de método bioanalítico**

La validación de un método bioanalítico incluye los procedimientos mediante los cuales se demuestra que un método en particular que es utilizado para la medición cuantitativa de un analito (o más de un analito) en una matriz biológica determinada, tal como sangre, plasma, suero u orina, es robusto, confiable, reproducible y cumple con los requisitos para las aplicaciones analíticas que se encuentra previsto para éste método. Algunos de los parámetros fundamentales para la realización de una validación bioanalítica son: exactitud, precisión, recuperación, linealidad, selectividad, y límites de detección (LOD y LOQ).(FDA, 2018 “Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation.”).

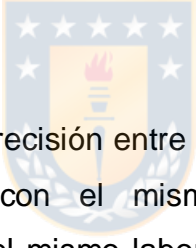
### **1.8.1. Exactitud**

La exactitud de un método bioanalítico tiene relación con la cercanía de los valores experimentales obtenidos respecto a valores verdaderos del analito. La forma de

determinarla es mediante la repetición del análisis de muestras las cuales contienen cantidades conocidas del analito. Es recomendable realizar un mínimo de 3 concentraciones dentro del rango a utilizar. Los resultados que se obtienen para exactitud deben cumplir con  $\pm 20\%$  para la concentración correspondiente al límite de cuantificación y  $\pm 15\%$  para el resto de las concentraciones.

### 1.8.2. Precisión

La precisión de un método bioanalítico muestra la dispersión de los datos cuando es aplicado el mismo procedimiento repetidas veces para una misma muestra. La precisión debe ser determinada por lo menos en 3 niveles distintos de concentración, los resultados deben cumplir  $\pm 20\%$  para el %C.V correspondiente al límite de cuantificación y  $\pm 15\%$  para el %C.V correspondiente al resto de las concentraciones.

- 
- 1.8.2.1. **Repetibilidad:** Precisión entre los resultados de una medición que son obtenidos con el mismo método y bajo las mismas condiciones, en el mismo laboratorio, por un mismo analista y en un mismo día.
  - 1.8.2.2. **Precisión intermedia:** Precisión entre los resultados de una medición que son obtenidos con el mismo método pero habitualmente en días diferentes.

### 1.8.3. Recuperación

La recuperación es la cantidad obtenida para una determinada concentración de analito añadido y luego extraído de la matriz biológica que logra ser leído por el equipo, comparado con la cantidad obtenida para la misma concentración de analito añadida a un blanco después del proceso de extracción. El valor de la recuperación no debe superar el 100% para la determinación. Se deben realizar experimentos en tres niveles de concentraciones (bajo, medio y alto).

#### **1.8.4. Selectividad**

La selectividad del método es la capacidad del método para poder cuantificar el analito de manera inequívoca en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra. Para la determinación, se deben realizar análisis de muestras blancos en la matriz biológica apropiada (plasma, orina u otra matriz). Debe asegurarse al nivel más bajo de cuantificación.

#### **1.8.5. Sensibilidad (límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ))**

El límite de detección corresponde a la concentración más baja de analito que pueda ser detectable por el método, aunque no necesariamente cuantificable lo detectado en una muestra en condiciones establecidas y expresado en unidades de concentración. El límite de cuantificación corresponde a la concentración más baja de analito que pueda ser determinada con precisión y exactitud en condiciones establecidas expresados igualmente en unidades de concentración

#### **1.9. Calidad analítica por DISEÑO (AQbD)**

La calidad por diseño se define como el “enfoque sistemático que comienza con objetivos previamente definidos y que enfatiza la comprensión de los productos y de los procesos, y el control del proceso basándose en el rigor científico y en la gestión de riesgos para la calidad” (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios “Guía de Normas de correcta fabricación de medicamentos de uso humano y veterinario, anexo 15”). Hasta el año 2007 este enfoque era sólo aplicado al proceso productivo de fármacos a partir de la fase de desarrollo, sin embargo, Borman fue quien por primera vez indica que existe la posibilidad de llevar este enfoque al desarrollo y validación de métodos analíticos (Borman,2007).

La Calidad analítica por diseño (AQbD) enfatiza la comprensión del método y su desempeño a través de la gestión de riesgos.

El principal objetivo de AQbD es reducir las variaciones en las mediciones controlando varios factores que pueden afectar el rendimiento del método y su robustez (A.S. Rathore, 2016). El diseño de experimentos (DOE) es una parte fundamental para el desarrollo integral de AQbD, en el cual se incluye la generación de modelos matemáticos y representaciones gráficas las cuales muestran las correlaciones entre los factores involucrados y sus respuestas. Si bien los DOE en métodos analíticos se han utilizado desde hace mucho tiempo, la inclusión de estos en la AQbD ha traído una revolución en la industria farmacéutica (A.S. Rathore, H. Winkle, 2009). Se requiere establecer un espacio de diseño integral en función de lo que es la filosofía DOE, en el cual se buscan las condiciones óptimas que pueden proporcionar el nivel deseado de rendimiento de un método, en éste caso para HPLC.

La implementación de ésta metodología permite encontrar las condiciones óptimas de separación cromatográfica con el fin de obtener métodos robustos y de esta manera disminuir los posibles problemas que pueden aparecer con el uso rutinario del método analítico.

Este novedoso enfoque se encuentra diseñado para cumplir consistentemente con los criterios de deseabilidad de desempeño; es decir, logrando una separación eficiente de los analitos y cumpliendo con las normas y requisitos establecidos por la FDA para la validación de métodos bioanalíticos. Para esto se deben cumplir 5 pasos (E. Rozet, et al. (2013):

1. Definir el perfil analítico del método (ATP): se deben definir las características de calidad del método, para lograr la separación deseada y cumplir con los requisitos establecidos para la validación analítica por la FDA, en éste paso se deben establecer los parámetros críticos del método (CMP) que son aquellos parámetros que requieren ser controlados ya que pueden afectar tanto de manera positiva como negativa al método (en HPLC, velocidad de flujo, pH de la fase móvil, entre otros) y los atributos analíticos críticos (CAA) los cuales corresponden a los parámetros tradicionalmente utilizados para el desarrollo del método según la técnica analítica escogida (en HPLC, área de

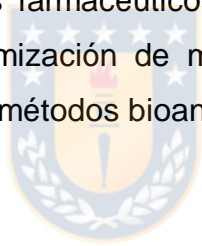
pico, número de platos teóricos, entre otros) ; con el fin de cumplir con este objetivo se debe realizar un diagrama de Ishikawa (causa-efecto) el cual es una herramienta fundamental para la mejora continua enfocada en la calidad, en éste se muestra todos los posibles factores que pudiesen afectar el desarrollo del método analítico y la raíz de éstos, eligiendo cada analista los que cree pudiesen afectar si desarrollo de acuerdo a sus objetivos planteados en el ATP. Es importante entender que los CMPs y CAAs influyen directamente en la calidad del método analítico y por tanto deben priorizarse, la priorización se lleva a cabo mediante una evaluación de riesgos a través de la gestión de riesgos de calidad (QRM) mediante la asignación de la severidad del riesgo, la ocurrencia y la detectabilidad que se asocia a cada variable de entrada, esto se hace mediante una matriz de estimación de riesgo (MER) y un análisis de modo y efecto de la falla (AMEF), las cuales ayudan a identificar y consecutivamente clasificar el potencial riesgo asociado a cada CMP para cada CAA. Finalmente de las muchas variables de entrada se escogen aquellas que poseen un alto riesgo para el desarrollo óptimo del método las cuales serán las variables a optimizar mediante un diseño de experimento o también llamado cribado de factores.

2. Realizar diseños de experimentos basados en los CMP y CAA seleccionados para optimizarlos, esto se realiza mediante un software computarizado, el cual entrega un número de experimentos sugeridos los cuales permiten encontrar una estrategia de control sobre los CMP otorgando las condiciones óptimas (o deseables) dentro del espacio de diseño.
3. Caracterizar las condiciones óptimas obtenidas a través del DOE mediante diversas herramientas entregadas por el software tales como gráficos y análisis estadísticos.

4. Validar los resultados obtenidos para la optimización del método analítico verificando si con las condiciones optimizadas se desarrolla un método robusto.
  
5. Controlar si mediante la optimización realizada se cumple con los objetivos planteados en el ATP.

Se realizó una extensa búsqueda bibliográfica sobre la validación de un método bioanalítico para determinación de LTG en suero utilizando AQBd, no se encontraron estudios de este tipo.

El enfoque basado en análisis de riesgos se desarrolló en un inicio para métodos aplicados al análisis de productos farmacéuticos, pero gracias a su utilidad y las ventajas que presenta en la optimización de métodos, se puede aplicar a otros objetivos como lo es en el caso de métodos bioanalíticos.





## 2. HIPOTESIS

“El método analítico desarrollado permite determinar la concentración de Lamotrigina en sangre venosa (suero), de manera robusta”



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivos generales**

- Desarrollar y validar un método cromatográfico para determinar concentraciones de Lamotrigina en sangre venosa aplicando calidad analítica por diseño (AQbD).

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Establecer y validar procedimientos de extracción y purificación de muestras, desde sangre venosa (suero), para cuantificar Lamotrigina, aplicando optimización basado en diseños de experimentos.
- Desarrollar y validar un método analítico por HPLC/UV para cuantificar Lamotrigina en sangre venosa (suero), aplicando optimización mediante AQbD.

## 4. MATERIALES

### 4.1. Reactivos y solventes

- Acetato de etilo grado pro-análisis, Merck.
- Acetonitrilo (ACN) grado HPLC, Merck.
- Ácido ortofosfórico ( $H_3PO_4$ ) grado p.a Merck.
- Agua bidestilada.
- Fosfato de potasio ( $K_2HPO_4$ ), Merck.
- Hidróxido de sodio (NaOH), grado p.a Merck.
- Metanol (MeOH), grado HPLC, Merck.
- Soluciones de calibración pH 4.0 - 7.0 - 10.0 Hanna Instruments INC.



### 4.2. Estándares

- Cloranfenicol, Sigma Aldrich.
- Lamotrigina, pureza 98%, Toronto Research Chemicals Inc.

### 4.3. Materiales y equipos

- Balanza analítica Chyo JK-180.
- Centrífuga Janetzki T30.
- Columna HPLC C18 ( $5\ \mu m$ ) 150 x 4,6 mm, Perkin Elmer.
- Equipo HPLC/UV Modelo Merck Hitachi.

- Espectrofotómetro UV Jasco
- Filtro de membrana Whatman, de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.
- Freezer Whirpool.
- Material volumétrico clase A.
- Micropipetas Brand.
- Microjeringa de 100  $\mu\text{L}$  Hamilton.
- pHmetro Oakton pH 510, Series.
- Refrigerador Daewoo.
- Sistema de filtración al vacío de fase móvil, Supelco Inc.
- Sistema de evaporación con nitrógeno, Glass Blowing Concentrator.
- Sistema de purificación de agua Simplicity® Merck.
- Ultrasonido Branson 1200.
- Vortex Mixer, modelo VM-1000, Digisystem.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Preparación de estándares

Se prepararon soluciones stock con los estándares de referencia de Lamotrigina y el estándar interno (SI) de Cloranfenicol (CFL) de concentraciones 1 mg/mL en metanol, éstas se porcionaron y finalmente se almacenaron en congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente fueron diluídas a las siguientes concentraciones de trabajo:

- Lamotrigina (LTG) 200  $\mu\text{g/mL}$  en MeOH.
- Cloranfenicol (CFL) 200  $\mu\text{g/mL}$  en MeOH.

### 5.2. Selección de la Longitud de onda de trabajo ( $\lambda$ )

Para la elección de la  $\lambda$  adecuada para la cuantificación de LTG se obtuvo el espectrograma para cada uno de los compuestos (LTG y CLF) a una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  a través de un espectrofotómetro, y se estableció la longitud de onda en la cual se encuentra la absorbancia máxima para LTG y se determinó la absorbancia del SI a esta longitud de onda.

### 5.3. Desarrollo de método analítico por HPLC basado en AQbD

Para el diseño de experimento basado en análisis de riesgo y para la validación del método; se realizaron distintas pruebas en base al diseño de experimento resultante del análisis de riesgo en busca de las condiciones óptimas y con el menor error posible para la determinación de LTG en suero humano.

### **5.3.1. Definición del perfil analítico del método (ATP)**

Se definió el perfil analítico del método (ATP) el cual incluye todos los atributos necesarios para garantizar las características de calidad y el propósito del método analítico. Para esto se utilizaron los parámetros más importantes de una validación bioanalítica según las directrices de la FDA en la guía para validación de métodos bioanalíticos.

### **5.3.2. Selección de Parámetros críticos del método (CMP) y atributos analíticos críticos (CAA) para el método analítico**

Para iniciar el plan de evaluación de riesgos se construyó un diagrama de Ishikawa o de espina de pez para determinar los riesgos potenciales y sus raíces correspondientes que podrían afectar el desempeño del método, a continuación se seleccionan los CMP y CAA con el fin de construir la matriz de riesgo y priorizar los potenciales riesgos.

### **5.3.3. Realización de la Matriz de Riesgo para el método analítico**

Una vez obtenidos los CMP y CAA del método analítico se realizó la matriz de riesgo con el fin de priorizar los riesgos, para esto se analizó cada CMP seleccionado (fase móvil, pH de la fase móvil, volumen de inyección, largo de columna, tiempo de uso columna y velocidad de flujo) y se comparó el efecto de cada uno de ellos sobre los CAA (área del pico, tiempo de retención, factor de asimetría, número de platos teóricos), la causa y los controles, se determinó la severidad, ocurrencia y detectabilidad de cada CMP sobre los CAA y finalmente se realizó la priorización del riesgo obteniéndose cuales son los parámetros críticos del método que son potencialmente más riesgosos para la obtención de un método analítico robusto.

#### **5.3.4. Diseño de experimento para la optimización del método analítico**

Según los resultados de la evaluación de riesgos sólo los factores de alto riesgo fueron seleccionados como los CMP para los estudios de optimización del método. Para ello se utilizó un diseño experimental Box-Behnken (BBD) de tres factores y tres niveles; bajo (-1), medio (0) y alto (+1) para la optimización de la fase móvil, el pH de la fase móvil y la velocidad del flujo. Se obtuvo un total de 15 corridas experimentales, incluyendo puntos centrales (0), (0), (0). Se aplicó el diseño BBD ya que es un diseño que necesita de al menos tres factores o más y es sumamente eficiente en cuanto al número de ensayos, no incluye como tratamiento a los vértices de la región experimental.

Se utilizó un estándar de LTG de concentración 20 µg/mL para ejecutar todas los análisis del diseño de experimento y así se obtuvo el área del pico, tiempo de retención, factor de asimetría y número de platos teóricos para cada corrida.

Una vez obtenidos los resultados experimentales se procedió a la optimización de cada parámetro en el cual se analizaron gráficos de contorno para cada interacción, gráficos de superficie-respuesta para cada interacción y finalmente se realizó la optimización de múltiples respuestas con el fin de obtener la deseabilidad óptima para cada uno de los CAA.

#### **5.4. Diseño de experimento para optimización de extracción de LTG**

Con el fin de optimizar la extracción líquido - líquido de LTG en suero humano y al mismo tiempo optimizar la cantidad de solvente en dicha extracción, se realizó un diseño de experimento Box-Behnken de tres factores y tres niveles niveles; bajo (-1), medio (0) y alto (+1) para volumen de NaOH (mL), volumen de Acetato de etilo (mL) y volumen de suero humano (mL), analizando la respuesta porcentaje de recuperación de LTG desde el suero.

Se utilizó un estándar de concentración 20 µg/mL para ejecutar todas los análisis del diseño de experimento.

### **5.5 Obtención de suero humano**

El suero humano se obtuvo a partir de la donación de sangre venosa de voluntarios sanos los cuales debieron estar sin tratamiento farmacológico alguno y previa firma de consentimiento informado (Ver anexo 10.1).

### **5.6 Extracción de suero humano**

La sangre venosa extraída de voluntarios en ayuno, se recibió en tubos Falcon de 15 mL, éstos se incubaron en estufa a 37°C por 10 minutos. A continuación el coágulo formado se soltó mediante pequeños golpes con la palma de la mano, los tubos Falcon fueron centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos. Finalmente se recuperó el suero y se congeló a -20°C para el trabajo posterior.

### **5.7 Preparación Tampón para fase móvil**

Para el tampón de fosfato, se pesaron 17,01 g de fosfato de potasio que se llevaron a un matraz aforado de 250 mL con agua ultrapura, 50 mL de estos se llevaron a un matraz de 200 mL y se le agregó 16,4 mL de NaOH 0,2 M, finalmente se llevó a aforo con agua ultrapura y se ajustó a pH 6,5 con ácido ortofosfórico mediante un pHmetro.

### **5.8 Preparación de fase móvil**

Para la preparación de la fase móvil se mezcló Tampón/H<sub>2</sub>O/ACN (1:69:30 v/v) respectivamente, a continuación se filtró a través de un filtro de membrana de 0.45 µm. La FM se preparó y se almacenó en frascos de vidrio para fase móvil debidamente etiquetados.



### **5.9 Fortificación de las muestras**

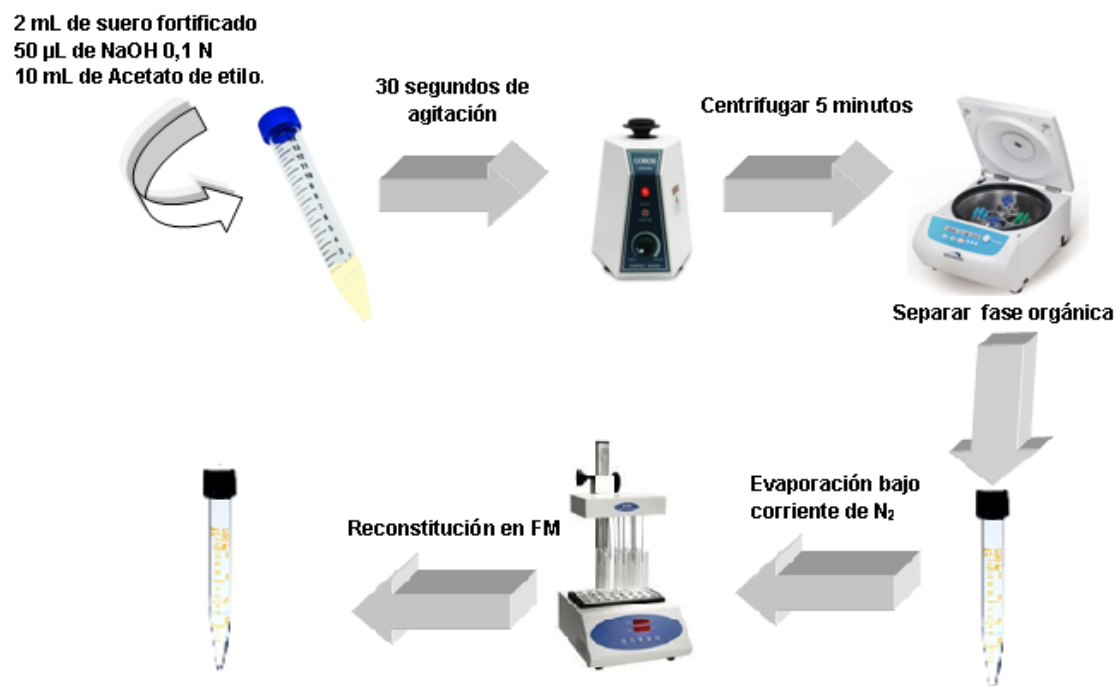
Desde la solución stock de LTG 200 µg/mL, se tomaron diferentes alícuotas de 25, 125, 250, 500 y 1000 µL para las distintas concentraciones necesarias para la curva de calibración, se colocó cada alícuota en matraces de 5 mL, donde se agregó el estándar interno CFL a una concentración de 5 µg/mL, finalmente se aforó con suero y se dejó reposar a temperatura ambiente para ser procesadas.

### **5.10 Protocolo de extracción de muestras**

A las muestras de suero se les fortificó con estándar de LTG y estándar interno CFL, para obtener la concentración deseada.

El protocolo de extracción fue el siguiente: Se extrajo una alícuota de 2 mL de suero fortificado, se trasladó a un tubo Falcon® de 20 mL y se agregó 50 µL de NaOH 0,1 N y 10 mL de Acetato de etilo.

Se sometió a agitación mediante agitador vórtex por 30 segundos y posterior centrifugación por 5 minutos a 2500 rpm, a continuación, la fase orgánica se transfirió a un tubo de vidrio apto para evaporar bajo corriente de nitrógeno a 40°C sobre una placa calefactora y se reconstituyó en fase móvil (figura 5.1).



**Figura 5.1: Procedimiento de extracción de LTG y estándar interno desde suero fortificado.**

### 5.11 Validación del método bioanalítico

La determinación y validación del método se realizó mediante las directrices de la FDA, 2018 “Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation”.

Los análisis de las muestras fueron realizados bajo las condiciones obtenidas con la optimización del método analítico basado en AQbD:

- Velocidad de flujo de 1,0 mL/min.
- El tiempo total de adquisición de datos se estableció en 10 minutos.
- La longitud de onda de 306 nm.
- Volumen de inyección de 20 µL.
- Fase móvil Tampón/H<sub>2</sub>O/ACN (1:69:30 v/v).
- Estándar interno Cloranfenicol.

Los parámetros analizados fueron los siguientes:

### **5.11.1 Selectividad**

Para asegurar que el método es selectivo tanto para LTG como el estándar interno CFL, se realizaron 6 inyecciones de suero humano sin fortificar (blanco) y una inyección de suero fortificado a una concentración de 1 µg/mL, cada muestra fue tratada mediante el procedimiento de extracción establecido y se compararon los cromatogramas resultantes con el fin de verificar que no existan picos en los tiempos de retención de ambos medicamentos que pudiesen interferir en la determinación.

### **5.11.2 Curva de calibración y límite de cuantificación y límite de detección**

Según las directrices de la FDA para validación de métodos bioanalíticos el punto de menor concentración en la curva de calibración se puede aceptar como el límite de cuantificación, para esto se deben realizar 5 determinaciones de la concentración más pequeña de la curva de calibración y realizar los cálculos tanto de la exactitud como la precisión.

La determinación del límite de cuantificación se realizó probando concentraciones bajas las que debían cumplir con las siguientes condiciones:

- El pico del analito debe ser reproducible, identificable y discreto con una precisión del 20% y una exactitud del 80-120%.
- La respuesta del analito deber ser a lo menos 5 veces mayor comparada con la respuesta del blanco.

Para la realización se debieron medir 3 muestras de suero fortificado con las siguientes concentraciones: 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL. Para poder medir el % C.V cada muestra fue inyectada en triplicado.

Una vez obtenido el límite de cuantificación, se aumentaron los puntos para obtener un total de 5 puntos para la curva de calibración, el rango fue seleccionado según las concentraciones reportadas en bibliografía para LTG en suero: 1 µg/mL – 5 µg/mL – 10 µg/mL – 20 µg/mL - 40 µg/mL, la cual fue realizada en matriz y en solvente para posteriormente comparar si las pendientes de ambas curvas son iguales.

Para el límite de detección se escogieron concentraciones más bajas que el límite de detección hasta encontrar la menor concentración a la que se pudo ver un pico en el tiempo de retención correspondiente a LTG, éste no se debe cuantificar.

### 5.11.3 Precisión

Para determinar la precisión se realizaron 5 determinaciones por concentración, se recomiendan un mínimo de 3 concentraciones dentro del rango de concentración esperadas.

Se debe expresar matemáticamente como % C.V. Para calcularla se utiliza la siguiente ecuación:

$$\% C.V = \frac{SD * 100}{X}$$

#### Ecuación 5.1: Coeficiente de variación

Donde SD es desviación estándar y X promedio.

#### 5.11.3.1 Repetibilidad

Para estudiar la precisión una de las pruebas realizadas fue el estudio de repetibilidad. Para éste estudio se utilizaron 4 muestras de suero fortificado en las siguientes concentraciones 1 µg/mL – 5 µg/mL - 10 µg/mL – 40 µg/mL. Cada

muestra se analizó por quintuplicado, luego del análisis se calculó el promedio, la desviación estándar y el % C.V de los datos obtenidos.

#### **5.11.3.2 Precisión intermedia**

Para la precisión intermedia se prepararon 4 muestras de suero fortificado en las siguientes concentraciones 1 µg/mL – 5 µg/mL - 10 µg/mL – 40 µg/mL.

Cada muestra se analizó por quintuplicado durante 5 días seguidos, después de analizadas las muestras se calculó el promedio, la desviación estándar y el % C.V de los datos obtenidos.

#### **5.11.4 Exactitud y recuperación**

Para determinar la exactitud y recuperación se utilizaron las muestras de suero fortificado utilizadas para determinar repetibilidad en las siguientes concentraciones 1 µg/mL – 5 µg/mL - 10 µg/mL – 40 µg/mL. Una vez obtenidos los resultados el porcentaje de recuperación se calcula según la siguiente ecuación:

$$R = \frac{x}{X} * 100$$

#### **Ecuación 5.2 : Porcentaje de recuperación**

Donde x: valor promedio.

X: valor verdadero.

En cuanto a la recuperación el resultado obtenido se comparó con la cantidad obtenida para la misma concentración de analito añadida a un blanco después del proceso de extracción y la exactitud se comparó con la concentración teórica.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1. Selección de Longitud de onda**

Para la selección de la longitud de onda de trabajo se realizó un espectrograma con el fin de encontrar la longitud de onda de máxima absorbancia para la LTG, escogiéndose la longitud de onda de 306 nm.

### **6.2. Desarrollo de método analítico basado en AQbD**

#### **6.2.1. Definición del perfil analítico del método (ATP)**

Se construyó el perfil analítico del método de tal manera de determinar los indicadores del comportamiento del método analítico, que son los parámetros utilizados para una validación bioanalítica según la FDA se observan en la tabla 6.1 que se presenta a continuación:



<b>PERFIL ANALÍTICO DEL MÉTODO (ATP)</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>
<b>MUESTRA</b>	Lamotrigina en suero.	La determinación de Lamotrigina en suero es un aporte para pacientes con Epilepsia
<b>TÉCNICA ANALÍTICA</b>	HPLC-UV.	Es la técnica analítica más utilizada en productos farmacéuticos, tiene un alta precisión, rápida y se necesitan pequeños volúmenes de muestra.
<b>SELECTIVIDAD</b>	Diferenciar y cuantificar al analito en presencia de otros compuestos.	El blanco de la matriz debe estar libre de interferencias en los tiempos de retención del analito y del estándar interno.
<b>SENSIBILIDAD</b>	Determinar límite de cuantificación y detección.	Se debe determinar la menor concentración de analito que se puede detectar y cuantificar con precisión y exactitud.
<b>PRECISIÓN</b>	Determinar repetibilidad, precisión intermedia.	Se realiza para determinar la cercanía de las medidas individuales de un analito cuando el procedimiento es aplicado repetidamente.
<b>EXACTITUD</b>	Comparar los resultados obtenidos para muestras que son extraídas de la matriz con la concentración teórica.	Se hace para ver la cercanía de los valores de los resultados promedio de pruebas obtenidas respecto a valores verdaderos del analito.
<b>RECUPERACIÓN</b>	Comparar los resultados para muestras que son extraídas de la matriz, con los estándares que representan el 100%	Se realiza para ver la eficacia de extracción del método analítico dentro de los límites variabilidad.

**Tabla 6.1 : Perfil analítico del método**

### 6.2.2. Selección de Parámetros críticos del método (CMP) y atributos analíticos críticos (CAA) para método analítico

Para la selección de CMPs y CCAs del método se realizó un diagrama de Ishikawa en el cual se seleccionaron los distintos factores que podrían afectar de una manera u otra el método analítico, para poder seleccionar los principales factores responsables de la variabilidad del método los cuales se visualizan en la figura 6.1.

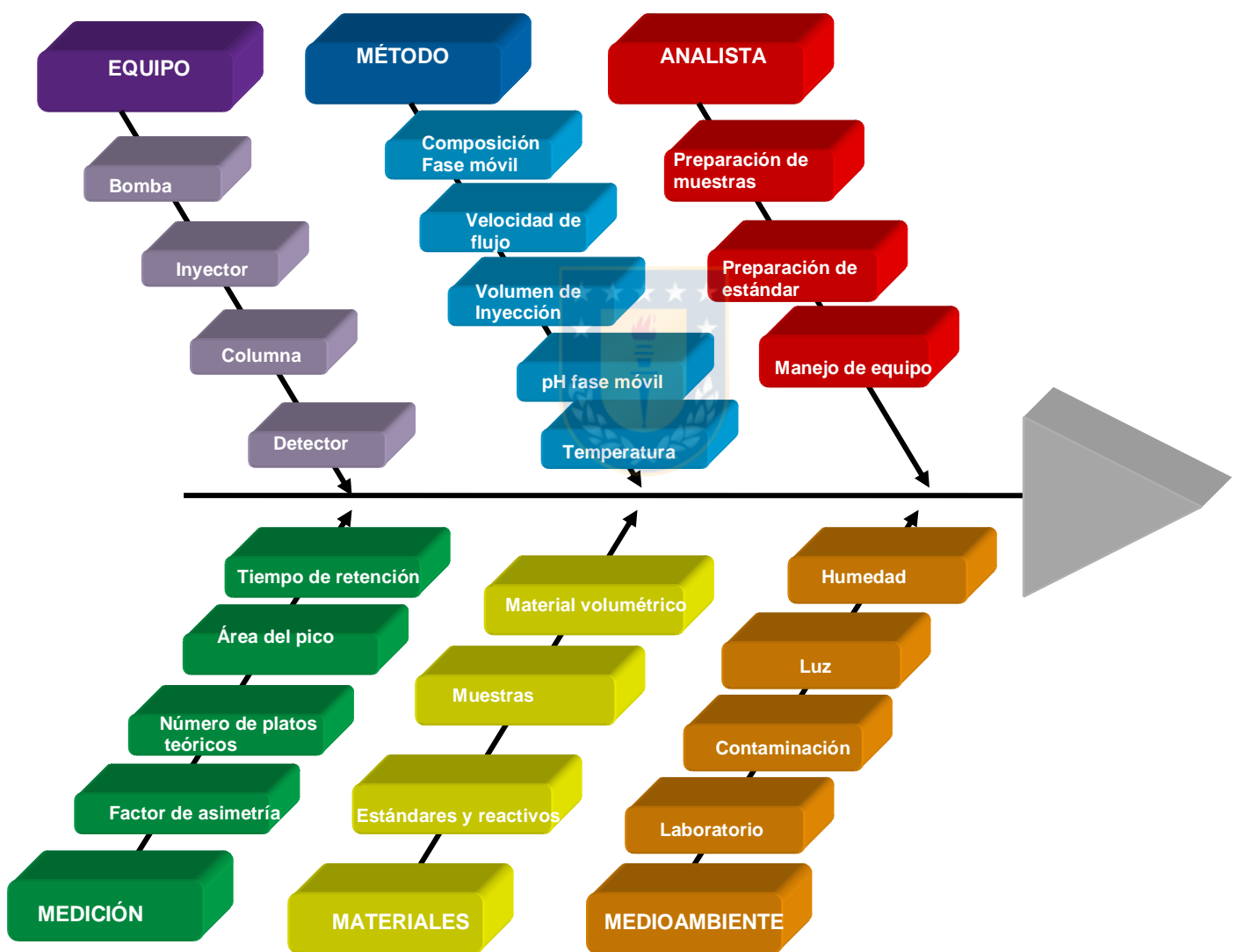


Figura 6.1 Diagrama de Ishikawa que muestra la relación causa-efecto de los potenciales CMPs y CAAs del método.



### 6.2.3. Realización de la Matriz de riesgo para método analítico

A partir del diagrama de Ishikawa de causa-efecto se seleccionaron los parámetros críticos del método que fueron, porcentaje de modificador orgánico de la fase móvil, pH de la fase móvil, volumen de inyección, largo de la columna, tiempo de uso de la columna y velocidad de flujo.

También seleccionaron los atributos analíticos críticos que fueron área del pico, tiempo de retención, factor de asimetría y número de platos teóricos.

Los CMP y CAA fueron analizados en una matriz de riesgo con priorización de riesgo (NPR) en el cual se analizó el efecto, la causa y los controles de cada CMP sobre los CAA seleccionados, a cada uno se le otorgó un valor de severidad (S), ocurrencia (O) y detección (D), para el cálculo de la priorización del riesgos se multiplicó  $S \times O \times D$  y como resultado se obtuvo que para largo de columna, tiempo de la columna y volumen de inyección el riesgo es bajo; para la velocidad del flujo se obtuvo un riesgo medio y finalmente para el porcentaje de modificador orgánico de fase móvil y el pH de la fase móvil un riesgo alto (tabla 6.2).

Para cuantificar la severidad se realizó una tabla de ponderación de severidad evaluando la gravedad del fallo desde muy baja a muy alta, otorgándoseles valores desde el 1 – 10 respectivamente (tabla 6.3).

Para la ocurrencia la tabla de ponderación evaluó la frecuencia del fallo, desde muy baja a muy alta con valores que van desde el 1 al 10 respectivamente donde 1 no asocia ningún fallo de éste tipo en métodos analíticos y 10 en que el fallo es frecuente (tabla 6.4)


En cuanto a la detección se evaluó la detectabilidad del fallo en el método, desde muy alta hasta improbable, siendo muy alta fácilmente detectable e improbable cuando el fallo no puede detectarse, otorgándoseles valores desde 1 hasta 10 respectivamente (tabla 6.5).

PARÁMETROS CRÍTICOS DEL MÉTODO	MATRIZ DE RIESGO							
	Modo de fallo	Efecto (atributo analítico crítico mayormente afectado)	S	Causa	O	Controles	D	NPR
Porcentaje de modificador orgánico de fase móvil	Composición de fase móvil	Área del pico	10	Composición de la fase móvil no es la óptima (proporción del solvente orgánico)	6	Preparar la fase móvil en los porcentajes adecuados de su composición	7	420
		Factor de asimetría						
		Tiempo de retención						
pH de fase móvil	Valor del pH al que se encuentra fase móvil no óptimo	Tiempo de retención	8	Error en la preparación de la fase móvil	5	Medir el pH de fase móvil mediante pHmetro	4	160
		Factor de asimetría						
Volumen de inyección	Menor cantidad de muestra	Área del pico	5	Cantidad de muestra a inyectar en el equipo no es suficiente para la correcta cuantificación del analito	2	Asegurarse que el volumen de muestra inyectado en el HPLC es el adecuado	1	10
Largo de la columna	Tiempos de análisis elevados	Tiempo de retención	5	Al ser columnas muy largas el tiempo de retención también aumenta	1	Asegurarse que el largo de la columna escogida es el óptimo	1	5
Tiempo de la columna	Errores en la cuantificación del analito	Área del pico N° de platos teóricos	5	Cuando se tienen columnas antiguas el área del pico disminuye por lo que al cuantificar el analito conlleva un error	1	No utilizar columnas cromatográficas demasiado antiguas	1	5
Velocidad del flujo	Velocidades muy altas o muy bajas	Tiempo de retención	8	Al tener velocidades de flujo altas o bajas existe una relación directa en el tiempo de retención y también una mayor probabilidad de obtener un factor de asimetría alto lo que conlleva un error en la cuantificación del analito	2	Verificar la velocidad del flujo a utilizar en el HPLC	2	32
		Factor de asimetría N° de platos teóricos						

Tabla 6.2: Matriz de análisis de riesgo

<b>SEVERIDAD</b>		
<b>Gravedad</b>	<b>Criterio</b>	<b>Valor</b>
Muy baja	Es poco razonable esperar que este fallo de pequeña importancia origine un efecto real en el método analítico.	1
Baja	El tipo de fallo provocaría un pequeño efecto en el método analítico, el cual es fácil de subsanar.	2-3
Moderada	El fallo produce un efecto real en el método analítico.	4-6
Alta	El fallo puede ser crítico y el efecto sobre el método analítico causa problemas en su robustez.	7-8
Muy alta	El fallo es potencialmente muy crítico y causa un efecto en la robustez del método analítico.	9-10

**Tabla 6.3: Tabla de ponderación de Severidad del fallo para el método analítico.**



<b>OCURRENCIA</b>		
<b>Frecuencia</b>	<b>Criterio</b>	<b>Valor</b>
Muy baja	Ningún fallo se asocia a métodos analíticos casi idénticos, ni se ha dado nunca en el pasado.	1
Baja	Fallos aislados en métodos analíticos similares, es razonablemente esperable en el método aunque poco probable.	2-3
Moderada	El fallo se aprecia ocasionalmente en métodos similares, probablemente estará presente algunas veces en el método analítico.	4-6
Alta	El fallo se ha presentado con cierta frecuencia en el pasado en métodos similares provocando problemas en el método analítico.	7-8
Muy alta	El fallo es prácticamente inevitable, es seguro que se producirá frecuentemente.	9-10

**Tabla 6.4: Tabla de ponderación de Ocurrencia del fallo para el método analítico.**

DETECCIÓN		
Detectabilidad	Criterio	Valor
Muy Alta	El fallo es obvio, es muy improbable que no sea detectado.	1
Alta	El fallo aunque es obvio y fácilmente detectable podría en alguna ocasión escapar a un control.	2-3
Mediana	El fallo es detectable, probablemente se detecte en el método analítico.	4-6
Pequeña	El fallo resulta difícil de detectar con los controles establecidos.	7-8
Improbable	El fallo no puede detectarse.	9-10

**Tabla 6.5: Tabla de ponderación de Detección del fallo para el método analítico.**

#### 6.2.4. Diseño de experimento para optimización del método analítico

Mediante la matriz de riesgo se obtuvo los parámetros críticos del método que son un riesgo para que el método analítico sea robusto y confiable, éstos fueron el porcentaje de modificador orgánico de la fase móvil y el pH, sin embargo, la velocidad del flujo, a pesar de tener un riesgo medio, se incluyó para los estudios de optimización.

Se realizó un diseño experimental BBD con el software STATGRAPHICS Centurion® donde se obtuvieron 15 corridas de experimentos para optimizar los CMPs después de realizados los experimentos se obtuvieron los resultados para área del pico (A), tiempo de retención (Tr) y se calculó el factor de asimetría (T) y el número de platos teóricos (N) (Tabla 6.6) ya que son parámetros que no entrega directamente el equipo.

Para el cálculo de factor de asimetría se utilizó la siguiente ecuación:

$$T = \frac{(w_{0,05})}{2f}$$

**Ecuación 6.1: Factor de asimetría.**

Dónde  $w$  0,05 corresponde al ancho en el 5% de altura de pico y  $f$  es la distancia del máximo del pico hasta el borde inicial del pico al 5% de altura.

Para el cálculo del número de platos teóricos se utilizó la siguiente ecuación:

$$N = 5,54 \left( \frac{Tr}{w_{1/2}} \right)^2$$

### Ecuación 6.2: Número de platos teóricos

Dónde  $Tr$  corresponde al tiempo de retención y  $W_{1/2}$  corresponde al ancho del pico a media altura.

Corridas	CMP			CAA			
	pH de FM	Velocidad de Flujo (mL/min)	Porcentaje de modificador orgánico (%)	Área del pico (mAu)	Tiempo de retención (min)	Factor de asimetría	Platos teóricos
1	6,50	1,0	32,5	30535	5,067	1,25	9610
2	6,25	1,1	32,5	27459	4,594	1,15	10232
3	6,00	1,1	35,0	26853	5,332	1,07	10101
4	6,25	1,1	32,5	30734	4,429	1,11	9560
5	6,00	1,1	30,0	28367	4,896	1,19	10654
6	6,00	1,0	32,5	26598	4,265	1,25	11325
7	6,25	1,0	35,0	30827	3,832	1,01	9876
8	6,00	1,2	32,5	27314	4,253	1,04	9634
9	6,50	1,1	30,0	27144	4,973	1,15	10722
10	6,25	1,2	30,0	30258	4,78	1,02	9560
11	6,25	1,0	30,0	26229	5,231	1,22	11002
12	6,25	1,2	35,0	30253	4,068	1,06	10267
13	6,50	1,1	35,0	27476	4,599	1,14	10326
14	6,25	1,1	32,5	27468	4,467	1,15	10472
15	6,50	1,2	32,5	27495	4,586	1,17	10354

**Tabla 6.6: Matriz de diseño para la optimización del método cromatográfico.**

Se realizó el análisis de varianza ANOVA en el cual se aprueba o rechaza la hipótesis nula de que las medias de dos o más poblaciones son iguales, de ser rechazada se acepta la hipótesis alterna de que las medias de dos o más poblaciones son distintas, para esto se debe evaluar el valor obtenido de p (probabilidad que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula), si el valor de p es menor que el nivel de significancia (0,05) se concluye que a lo menos una de las medias evaluadas es distinta.

El test R-cuadrado representa la medida estadística de la cercanía de los datos con respecto a la línea de regresión ajustada (representa la ecuación de regresión matemática de los datos), además se realizó el test estadístico Durbin-Watson el cual es utilizado para evaluar la presencia de autocorrelación, lo que evalúa si los errores de las observaciones adyacentes están correlacionados quiere decir que la regresión de los mínimos cuadrados puede subestimar el error estándar de los coeficientes, lo que conllevaría a que los predictores parezcan significativos, cuando en realidad no lo son (Miller,2002).

Los resultados obtenidos para cada respuesta son los siguientes:

### **Área de pico**

Se encontró que ninguno de los efectos dio como resultado un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%, por lo que no hay ninguna interacción que sea de carácter significativo para la respuesta área de pico, lo que se muestra gráficamente en el diagrama de Pareto de la figura 6.2 (página 44).

En cuanto al estadístico R-cuadrado indica que el modelo ajustado explica un 53,4922% de la variabilidad en la respuesta área de pico.

El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si existe alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en

el archivo, como el valor-P es mayor que 5,0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%. (tabla 6.7, página 43).

### **Tiempo de retención**

Para la respuesta tiempo de retención la tabla ANOVA muestra que para los efectos evaluados no existe un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%, por lo que no hay ninguna interacción que sea de carácter significativo para la respuesta tiempo de retención, esto se ve en el diagrama de Pareto de la figura 6.3 (página 45).

El valor de R-cuadrado es 60,2373% lo que indica que el modelo ajustado explica ese porcentaje de variabilidad para la respuesta.

Para el estadístico de Durbin-Watson (DW) se obtuvo que el valor-P es mayor que 5,0%, indicando que no existe autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0% (tabla 6.8, página 44).

### **Factor de asimetría**

En cuanto al resultado ANOVA para factor de asimetría se encontró que hay 5 efectos que poseen un valor-P menor que 0,05 indicando que existen interacciones de carácter significativo para la variable respuesta factor de asimetría, las cuales se pueden visualizar en el diagrama de Pareto en la figura 6.4(página 46).

En cuanto a R-cuadrado se obtuvo un valor de 94,2807% lo que indica que el modelo ajustado explica ese porcentaje de variabilidad para la respuesta. Para el estadístico de Durbin-Watson (DW) se obtuvo que el valor-P es mayor que 5,0%, indicando que no existe autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0% (tabla 6.9, página 45).

## Platos teóricos

Finalmente para la respuesta platos teóricos con el análisis ANOVA se encuentra que existe un efecto que es significativo para éste parámetro, lo que se puede ver en el diagrama de Pareto en la figura 6.5 (página 47).

Para R-cuadrado se obtiene un valor de 83,0549% y para el estadístico de Durbin-Watson (DW) se obtiene que el valor-P es mayor que 5,0%, indicando que no existe autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0% (tabla 6.10, página 46).

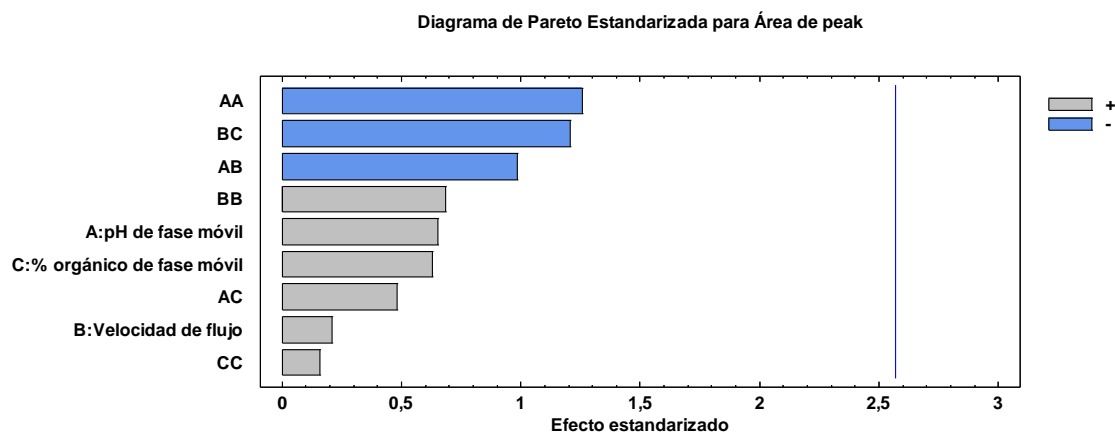
**Análisis de Varianza para Área de peak**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:pH de fase móvil	1,54704E6	1	1,54704E6	0,42	0,5438
B:Velocidad de flujo	159895,	1	159895,	0,04	0,8425
C:% orgánico de fase móvil	1,45437E6	1	1,45437E6	0,40	0,5557
AA	5,76885E6	1	5,76885E6	1,58	0,2643
AB	3,52688E6	1	3,52688E6	0,97	0,3708
AC	851929,	1	851929,	0,23	0,6495
BB	1,71633E6	1	1,71633E6	0,47	0,5234
BC	5,2969E6	1	5,2969E6	1,45	0,2823
CC	90192,3	1	90192,3	0,02	0,8813
Error total	1,82567E7	5	3,65134E6		
Total (corr.)	3,92551E7	14			

R-cuadrada = 53,4922 por ciento  
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 0,0 por ciento  
Error estándar del est. = 1910,85  
Error absoluto medio = 868,478  
Estadístico Durbin-Watson = 2,52565 (P=0,8271)  
Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,295585

**Tabla 6.7: Análisis ANOVA para área de pico**





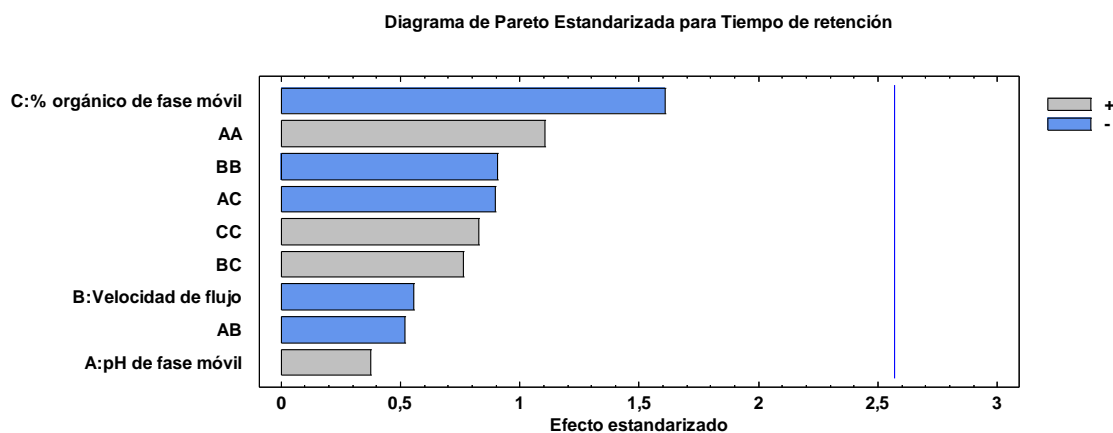
**Figura 6.2: Diagrama de Pareto para interacciones que afectan variable área de pico.**

**Análisis de Varianza para Tiempo de retención**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:pH de fase móvil	0,0286801	1	0,0286801	0,14	0,7225
B:Velocidad de flujo	0,062658	1	0,062658	0,31	0,6026
C:% orgánico de fase móvil	0,5248	1	0,5248	2,58	0,1689
AA	0,248003	1	0,248003	1,22	0,3195
AB	0,0549903	1	0,0549903	0,27	0,6251
AC	0,164025	1	0,164025	0,81	0,4101
BB	0,167647	1	0,167647	0,83	0,4053
BC	0,117992	1	0,117992	0,58	0,4804
CC	0,139203	1	0,139203	0,69	0,4455
Error total	1,01579	5	0,203159		
Total (corr.)	2,55464	14			

R-cuadrada = 60,2373 por ciento  
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 0,0 por ciento  
Error estándar del est. = 0,450731  
Error absoluto medio = 0,217544  
Estadístico Durbin-Watson = 1,44549 (P=0,0848)  
Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,259215

**Tabla 6.8: Análisis ANOVA para tiempo de retención**



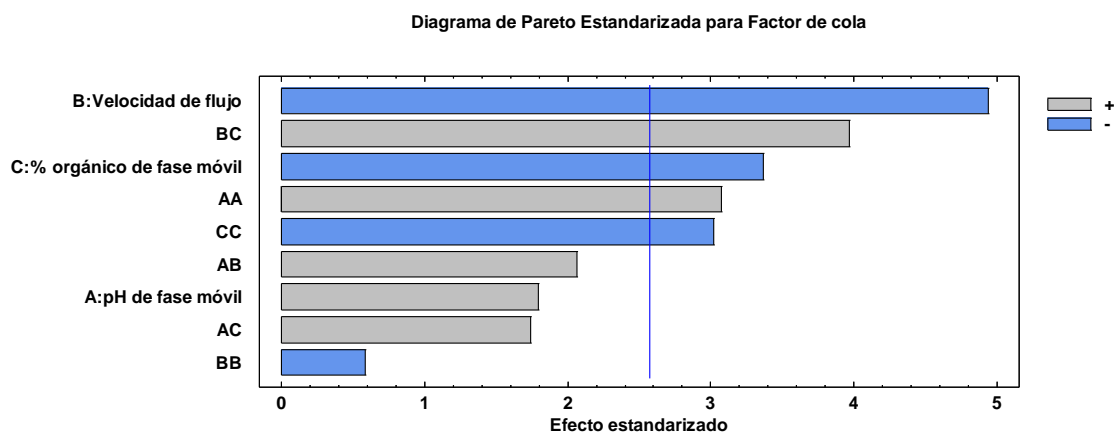
**Figura 6.3: Diagrama de Pareto para interacciones que afectan tiempo de retención.**

**Análisis de Varianza para Factor de cola**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:pH de fase móvil	0,0032	1	0,0032	3,22	0,1326
B:Velocidad de flujo	0,0242	1	0,0242	24,36	0,0043
C:% orgánico de fase móvil	0,01125	1	0,01125	11,33	0,0200
AA	0,00938526	1	0,00938526	9,45	0,0277
AB	0,004225	1	0,004225	4,25	0,0941
AC	0,003025	1	0,003025	3,05	0,1414
BB	0,000339103	1	0,000339103	0,34	0,5844
BC	0,015625	1	0,015625	15,73	0,0107
CC	0,00907756	1	0,00907756	9,14	0,0293
Error total	0,00496667	5	0,000993333		
Total (corr.)	0,08684	14			

R-cuadrada = 94,2807 por ciento  
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 83,9859 por ciento  
Error estándar del est. = 0,0315172  
Error absoluto medio = 0,0162222  
Estadístico Durbin-Watson = 2,16667 (P=0,5672)  
Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,103747

**Tabla 6.9: Análisis ANOVA para factor de asimetría.**



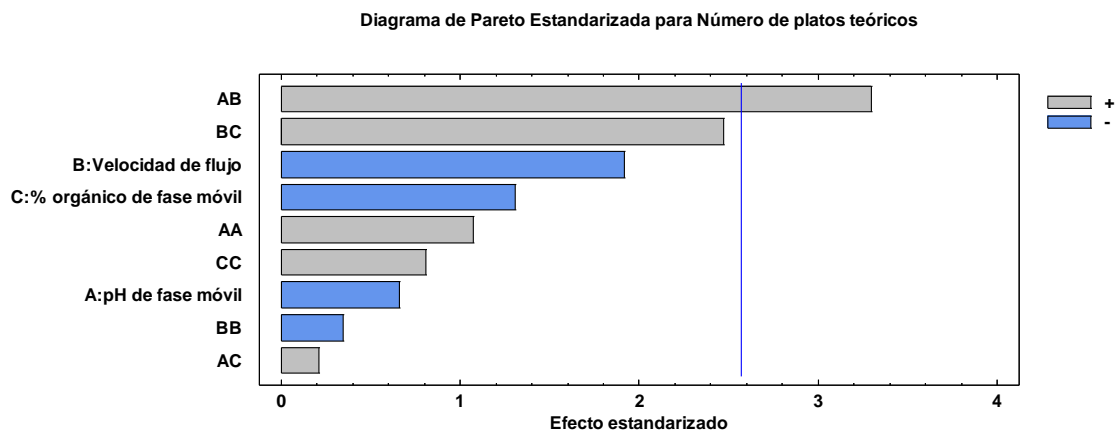
**Figura 6.4: Diagrama de Pareto para interacciones que afectan significativamente la respuesta factor de asimetría.**

**Análisis de Varianza para Número de platos teóricos**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:pH de fase móvil	59858,0	1	59858,0	0,44	0,5385
B:Velocidad de flujo	504008,	1	504008,	3,67	0,1137
C:% orgánico de fase móvil	233928,	1	233928,	1,70	0,2489
AA	158785,	1	158785,	1,16	0,3316
AB	1,49451E6	1	1,49451E6	10,87	0,0215
AC	6162,25	1	6162,25	0,04	0,8407
BB	16636,7	1	16636,7	0,12	0,7421
BC	839972,	1	839972,	6,11	0,0564
CC	89137,4	1	89137,4	0,65	0,4572
Error total	687354,	5	137471,		
Total (corr.)	4,08909E6	14			

R-cuadrada = 83,1905 por ciento  
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 52,9335 por ciento  
Error estándar del est. = 370,77  
Error absoluto medio = 173,267  
Estadístico Durbin-Watson = 2,26762 (P=0,6493)  
Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,257006

**Tabla 6.10: Análisis ANOVA para platos teórico**



|

**Figura 6.5: Diagrama de Pareto para interacciones que afectan significativamente la respuesta platos teóricos.**

Los gráficos de superficie respuesta que se muestran en las figuras 6.6 - 6.9, son gráficos de malla tridimensional los cuales se utilizan para establecer valores de respuesta y condiciones operativas deseables (óptimas), estos solo pueden mostrar dos variables a la vez por lo que el resto de las variables estudiadas se mantienen a un nivel constante que es la que no se encuentra incluida en el gráfico. En este caso se tienen 3 variables por lo que una se deja constante, el efecto cuadrático de las ecuaciones obtenidas mediante la optimización para cada respuesta causa la estimación de la superficie de respuesta al exhibir la curvatura que se visualiza en cada gráfico los cuales se muestran a continuación.

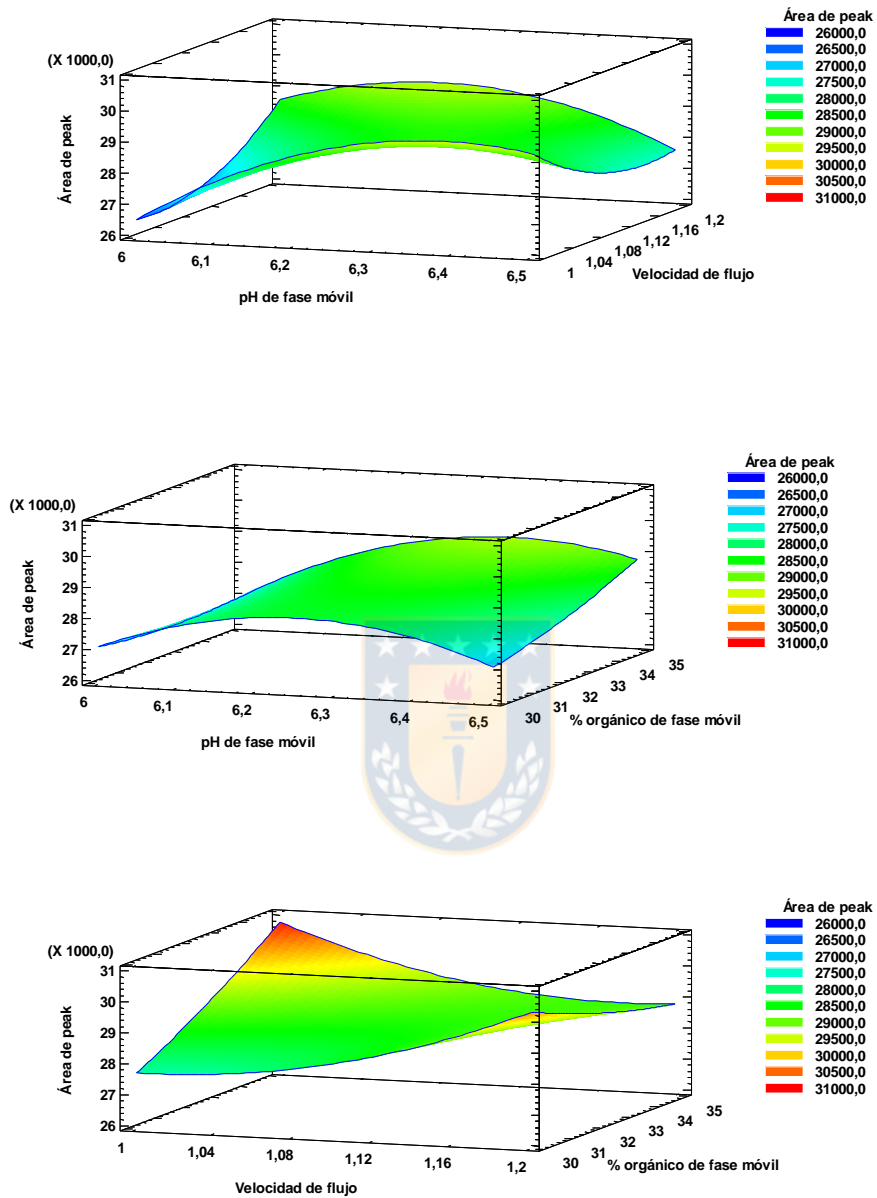
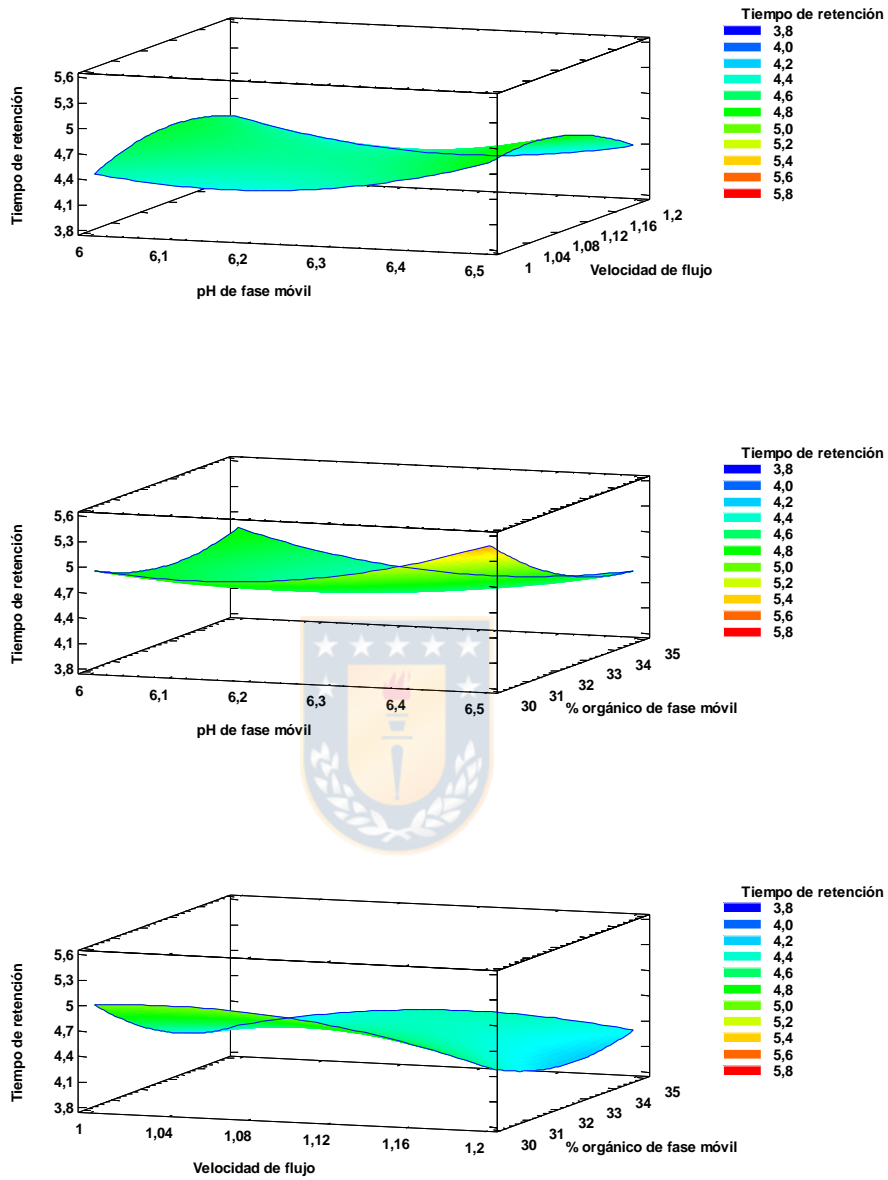
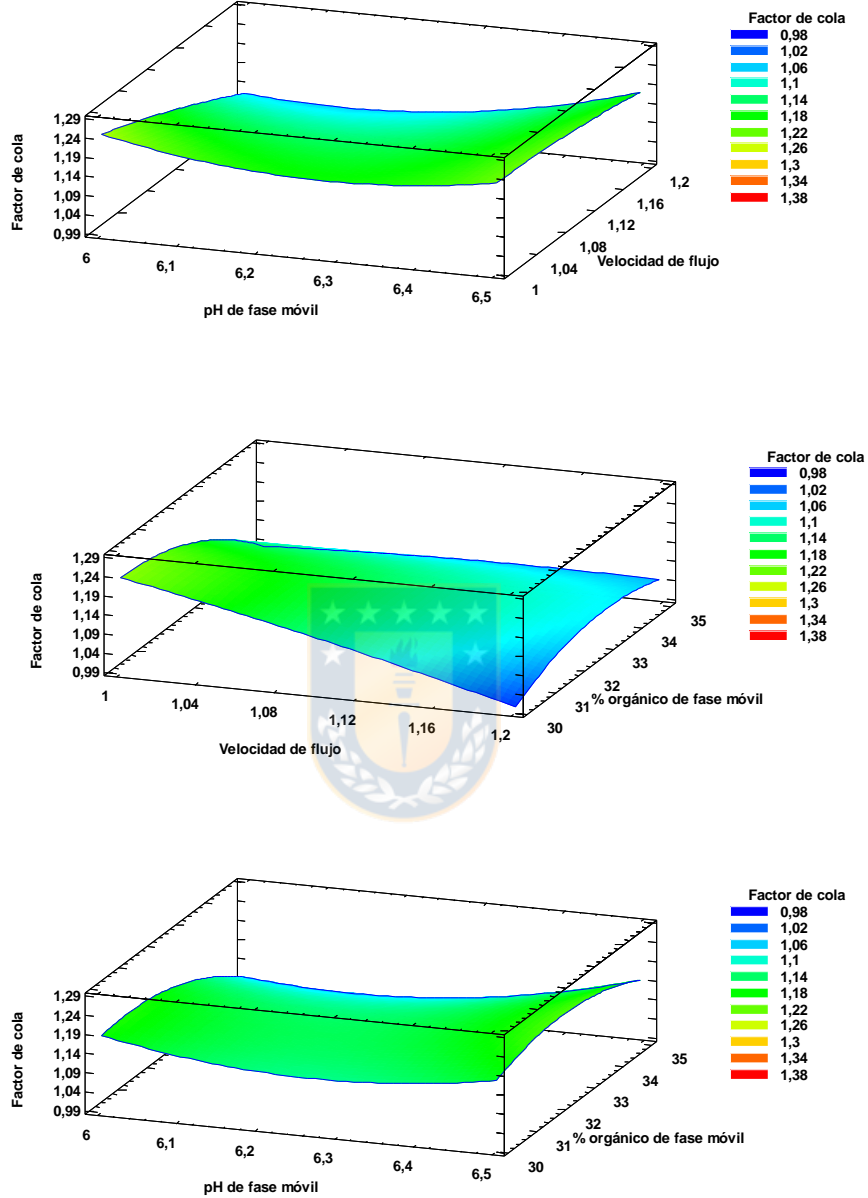


Figura 6.6: Gráficos superficie respuesta para la representación de la influencia de los factores velocidad de flujo, % de modificador orgánica y pH de fase móvil para área de pico.



**Figura 6.7:** Gráficos superficie respuesta para la representación de la influencia de los factores velocidad de flujo, % de modificador orgánico y pH de fase móvil para tiempo de retención.



**Figura 6.8:** Gráficos superficie respuesta para la representación de la influencia de los factores velocidad de flujo, % de modificador orgánico y pH de fase móvil para área de factor de asimetría.

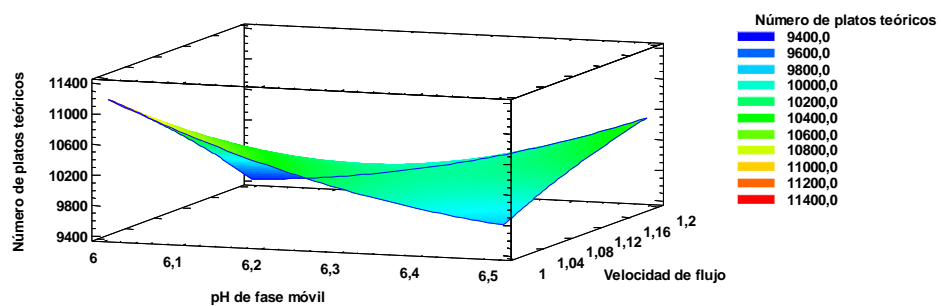
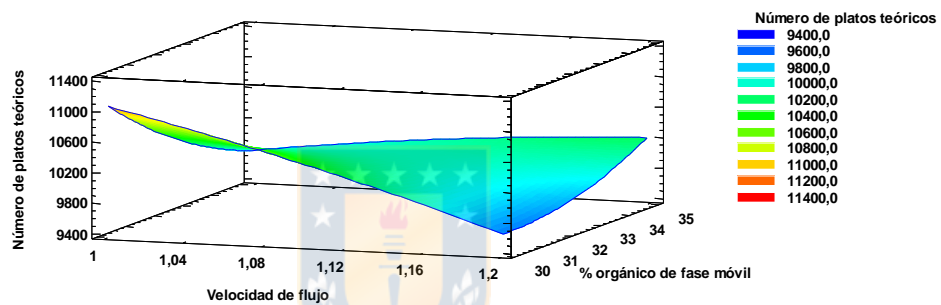
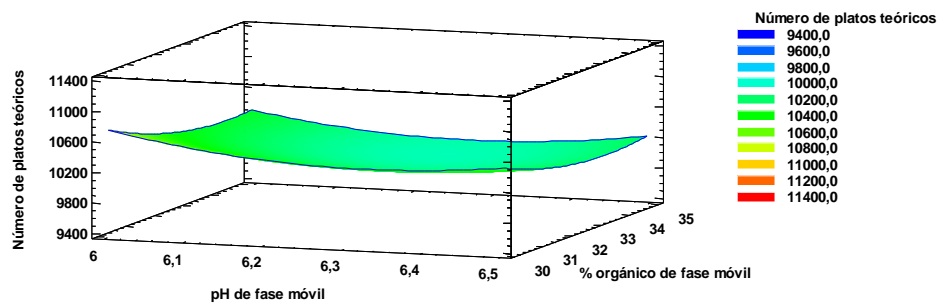


Figura 6.9: Gráficos superficie respuesta para la representación de la influencia de los factores velocidad de flujo, % de modificador orgánico y pH de fase móvil para platos teóricos.



Finalmente se realizó la optimización de respuestas múltiples, procedimiento que ayuda a determinar la combinación de los factores experimentales que simultáneamente optimiza varias respuestas, obteniéndose los gráficos superficie respuesta de la figura 6.10, los valores óptimos obtenidos se muestran en la tabla 6.11.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
pH de fase móvil	6	6,5	6,36
Velocidad de flujo	1	1,2	1
% orgánico de fase móvil	30	35	30

**Tabla 6.11: Optimización de respuestas múltiples**



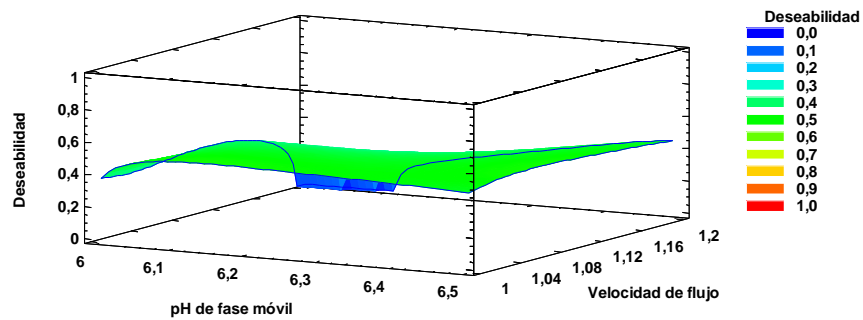
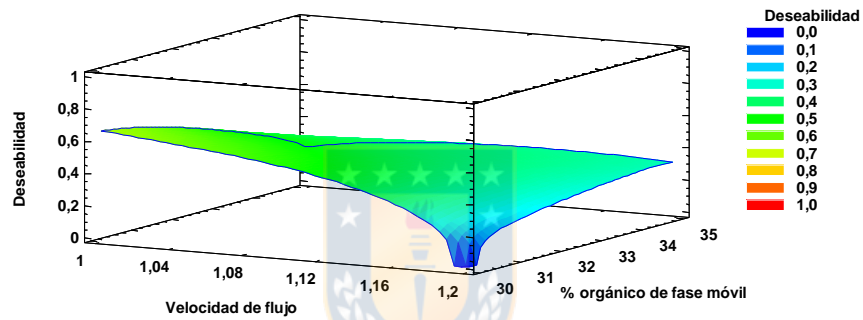
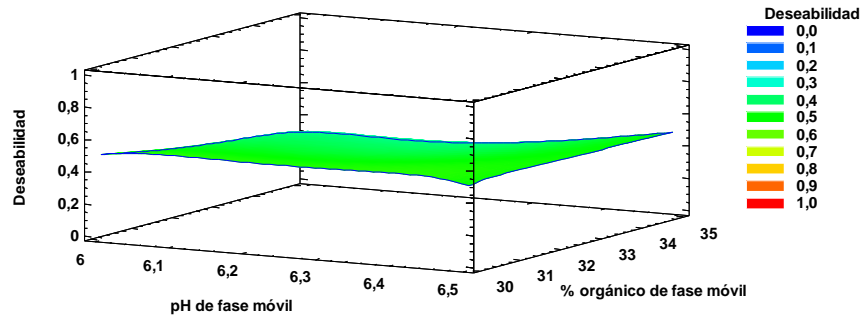


Figura 6.10: Gráficos superficie respuesta para la optimización de respuestas múltiples.

El valor entregado por el software para pH de fase móvil se aproximó a 6,4, utilizándose finalmente los siguientes valores:

- pH de fase móvil: 6,4
- Velocidad de flujo: 1 mL/min
- % orgánico de fase móvil: 30

### 6.3. Diseño de experimento para optimización de extracción

Se utilizó un diseño de experimento BBD, en el cual, luego de realizar las 15 corridas de experimentos sugeridos, se encontraron como el óptimo deseable para la extracción de LTG en suero humano los parámetros que se muestran en la siguiente tabla.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
NaOH	50	100	50,2
Acetato de etilo	2	10	10
Suero	1,5	2	1,97

**Tabla 6.12: Optimización para extracción de LTG en suero.**

Los valores entregados por el software fueron aproximados para NaOH 50  $\mu$ L, Acetato de etilo 10 mL y Suero 2 mL.

## 6.4. Validación del método bioanalítico

### 6.4.1 Selectividad

Luego de la realización de las 6 inyecciones de suero sin fortificar (blanco) y 1 inyección de suero fortificado a una concentración de 1  $\mu\text{g/mL}$  se puede ver que no existe ningún compuesto del suero que eluye al mismo tiempo de retención que LTG, alrededor de los 4 minutos y su estándar interno CFL alrededor de los 8 minutos. Todo esto indica la presencia de LTG y su diferenciación de cualquier otro componente que se encuentre en la matriz biológica. A continuación se muestran los cromatogramas de suero sin fortificar y fortificado a 1  $\mu\text{g/mL}$ .

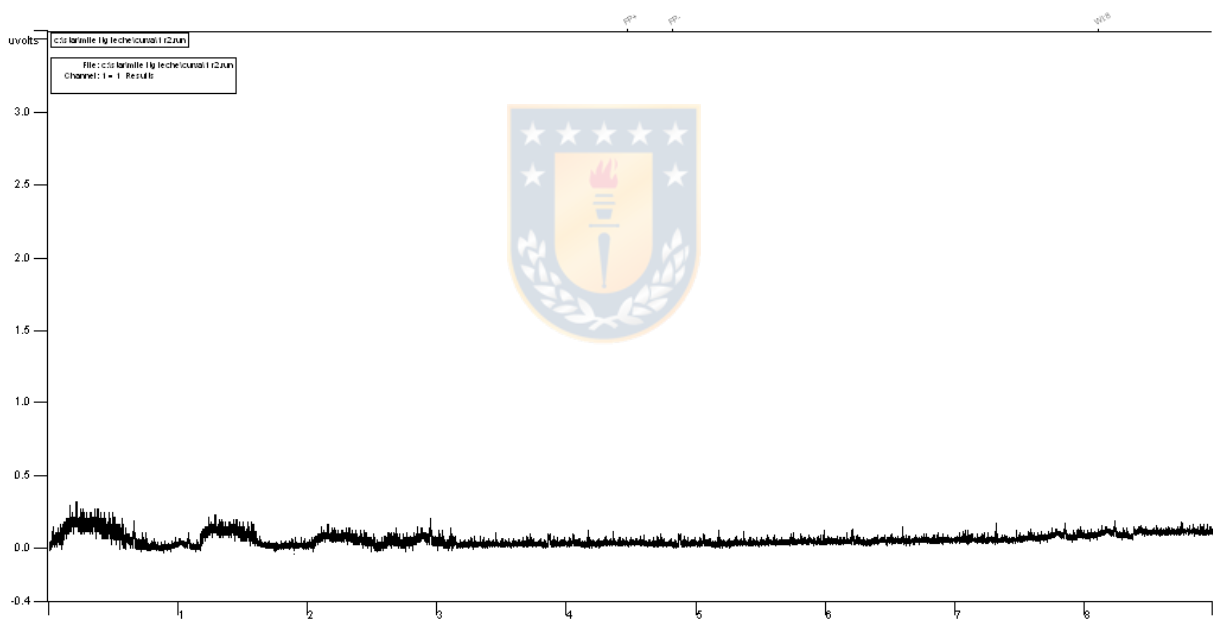
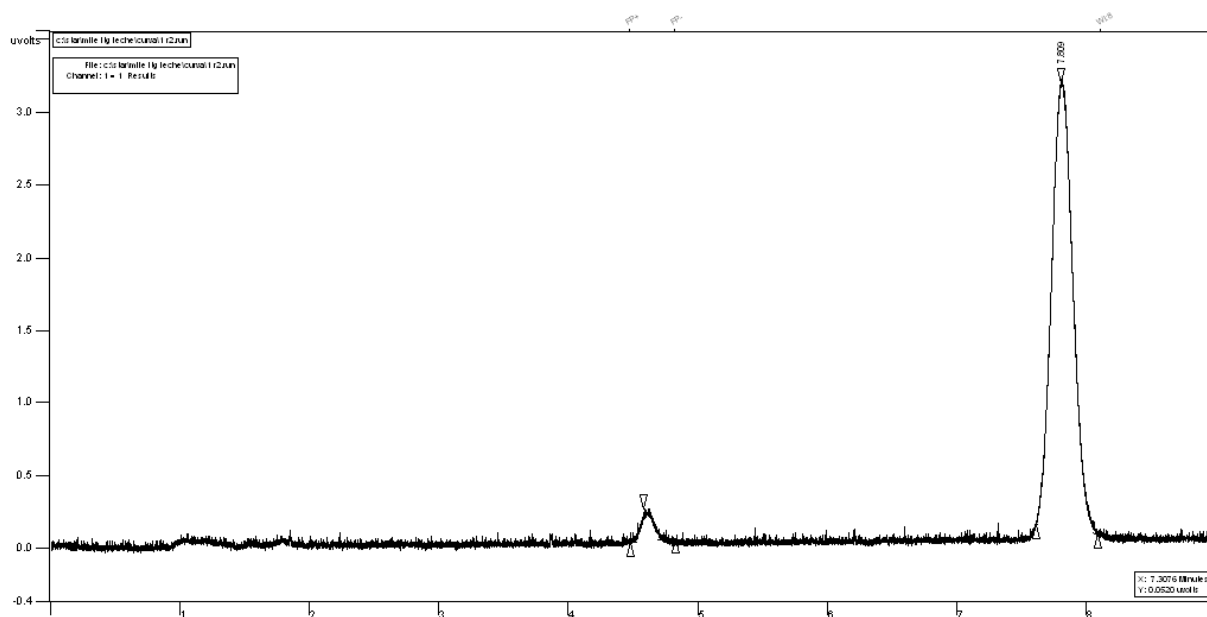


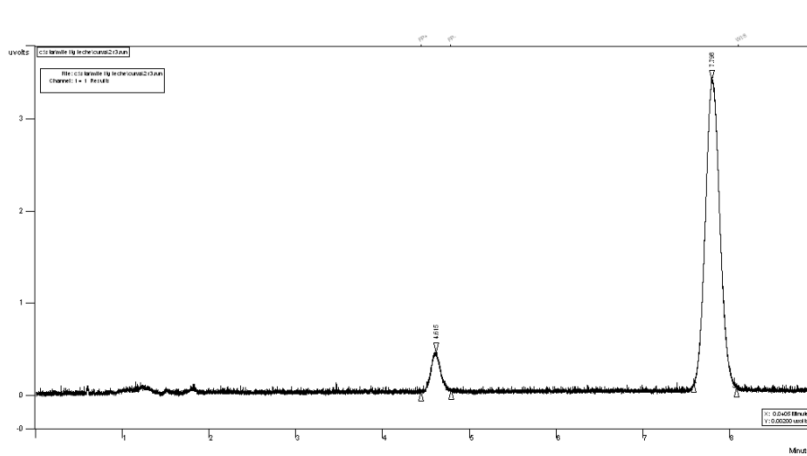
Figura 6.11: Cromatograma de suero sin fortificar.



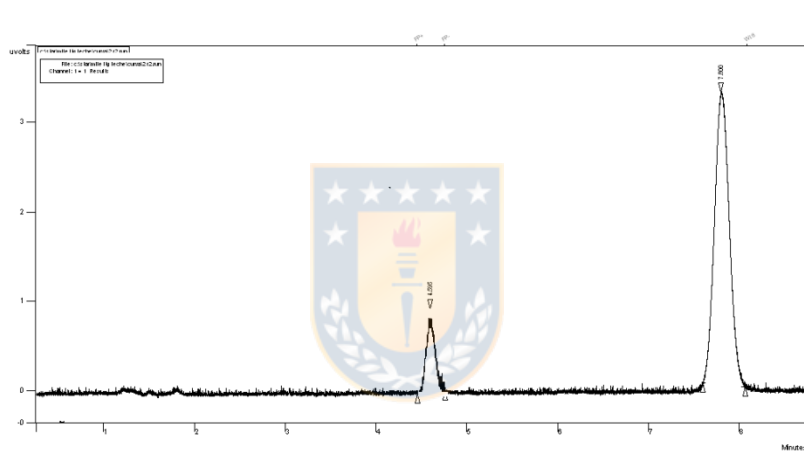
**Figura 6.12: Cromatograma de suero fortificado con concentración 1 µg/mL**

#### 6.4.2. Límite de cuantificación

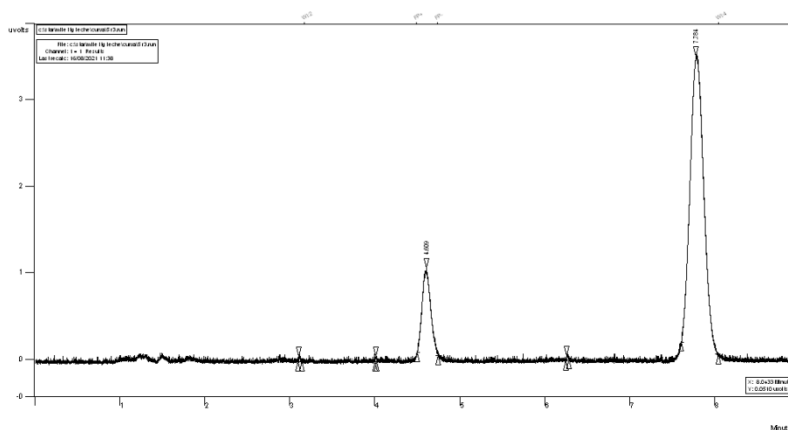
Los límites de cuantificación se obtuvieron desde las muestras de suero humano fortificado a concentraciones: 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL (figura 6.13 – 6.15). La muestra de concentración 1 µg/mL se determinó como el límite más bajo de cuantificación, esto ya que se pudo visualizar un pico discreto, reproducible e identificable, con una altura mayor a 5 veces la línea base y un %RSD de 2,29 de las áreas medidas por triplicado (tabla 6.13).



**Figura 6.13: Cromatograma para suero fortificado concentración 1 µg/mL.**



**Figura 6.14: Cromatograma para suero fortificado concentración 3 µg/mL.**



**Figura 6.15: Cromatograma para suero fortificado concentración 5 µg/mL.**

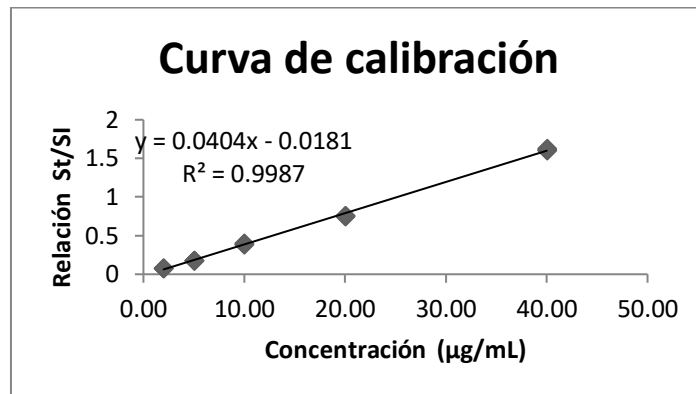
Muestra Concentración (1 µg/mL)	Áreas	Promedio	C.V (%)
1	2922	2990	2,29
2	2990		
3	3059		

**Tabla 6.13: Áreas obtenidas para concentración de 1 µg/mL.**

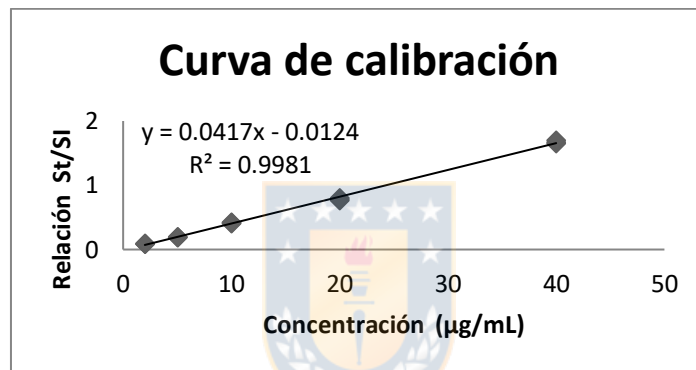
### 6.4.3. Curva de calibración

Una vez determinado el límite de cuantificación de concentración 1 µg/mL valor que es más bajo que la concentración mínima de LTG reportado (2µg/mL), se preparó la curva de calibración, en la cual se incluyeron 5 puntos, siendo el punto más bajo el límite de cuantificación de concentración 1 µg/mL. A continuación se muestran las curvas de calibración tanto para el estándar en solvente como para el suero fortificado, en ellas se muestra la relación entre la respuesta obtenida (relación área LTG / área SI) y la concentración de LTG (figura 6.16, 6.17).

Por otro lado la guía de validación para métodos bioanalíticos de la FDA hace referencia a que el límite más bajo de cuantificación no debe poseer una desviación mayor al 20% del valor nominal y no debe tener una desviación mayor al 15% del valor nominal en el resto de los puntos y que además a lo menos 4 de 6 puntos de la curva deben cumplir este criterio. Ese criterio se analizó y se determinó que cumple lo que se observa en el apartado de exactitud y recuperación.



**Figura 6.16: Curva de calibración en solvente**



**Figura 6.17: Curva de calibración en matriz**

En las curvas de calibración tanto en matriz como en solvente se observa que existe una correlación lineal entre la concentración de LTG y la Relación (área LTG / área CFL), esto se corrobora con la ecuación de regresión lineal la cual posee un coeficiente de determinación ( $r^2$ )  $\geq 0.998$  para ambas curvas, lo que indica que ambas curvas son adecuadas para la determinación de LTG en suero.

Posteriormente se compararon las pendientes de ambas curvas de calibración mediante el test Fisher ( $\alpha=0,05$ ) con el software STATGRAPHICS Centurion®. La comparación muestra que ambas curvas son iguales con un  $p = 0,953243$  (tabla 6.14).



Comparación de Desviaciones Estándar		
	<i>Relacion ST/SI ST</i>	<i>Realcion ST/SI matriz</i>
Desviación Estándar	0,621278	0,640962
Varianza	0,385987	0,410833
G1	4	4

Razón de Varianzas= 0,939523

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de Relacion ST/SI ST: [0,372228, 1,78528]

Desviación Estándar de Realcion ST/SI matriz: [0,384022, 1,84184]

Razones de Varianzas: [0,0978209, 9,02367]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 < \sigma_2$

F = 0,939523 valor-P = 0,953243

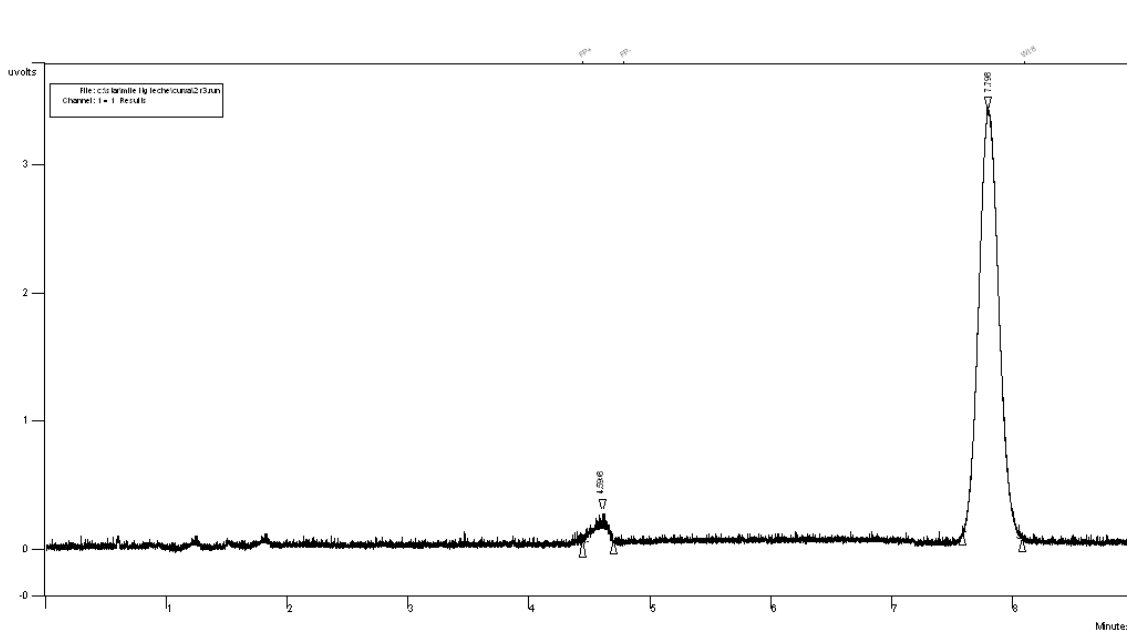
No se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

**Tabla 6.14: Test Fisher para comparar curva en matriz y en solvente.**

#### 6.4.4. Límite de detección



Como el límite de detección corresponde a la menor concentración del analito que el método puede detectar sin necesariamente cuantificar lo detectado, se encontró que la concentración mínima detectable es de 0,09  $\mu\text{g/mL}$  donde se puede ver un ligero pico alrededor de los 4 minutos, además la FDA establece que éste debe tener una altura 3 veces mayor a la línea base lo cual se cumple, a continuación se muestra el cromatograma obtenido.



**Figura 6.18: Cromatograma para concentración de LTG 0,09 µg/mL**



## 6.4.5. Precisión

### 6.4.5.1. Repetibilidad

Para la evaluación de repetibilidad a concentraciones de 1 µg/mL – 5 µg/mL - 10 µg/mL – 40 µg/mL, analizadas en igual condiciones se muestran los resultados en términos de % C.V en la siguiente tabla:

Concentración (µg/mL)	C.V (%)
1	0,01
5	0,05
10	0,04
40	0,32

**Tabla 6.15: Repetibilidad en términos de % C.V**

Los valores obtenidos son menores a lo que propone la FDA (valores menores al 15%) por lo que se demuestra que el método analítico es preciso en inyecciones consecutivas.

#### 6.4.5.2. Precisión intermedia

Los resultados para la precisión intermedia se muestran en términos de % C.V en la siguiente tabla:

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	C.V (%)
1	0,68
5	0,04
10	0,24
40	0,66

**Tabla 6.16: Precisión intermedia en términos de % C.V**

Estos valores son menores a los que exige la FDA (menor al 15%), lo que demuestra que el método bioanalítico es preciso en todo el rango de concentraciones que fueron medidas.

#### 6.4.6. Exactitud

Para la determinación de exactitud los datos utilizados son los mismos que los ocupados para evaluar la repetibilidad a concentraciones 1 µg/mL – 5 µg/mL - 10 µg/mL – 40 µg/mL de suero fortificado (tabla 6.17).

<b>Muestras</b>	<b>1 (µg/mL)</b>	<b>5 (µg/mL)</b>	<b>10 (µg/mL)</b>	<b>40 (µg/mL)</b>
Muestra 1	0,97	4,27	9,74	43,75
Muestra 2	0,98	4,46	9,56	43,85
Muestra 3	0,97	4,51	9,56	44,77
Muestra 4	0,96	4,24	9,64	41,20
Muestra 5	0,98	4,12	9,47	46,34
Promedio	0,97	4,32	9,59	43,98
<b>Exactitud (%)</b>	<b>97,70</b>	<b>86,52</b>	<b>95,99</b>	<b>109,9</b>

**Tabla 6.17 Exactitud**

Para la exactitud los resultados indican un 97,70% de exactitud para la menor concentración de 1 µg/mL la cual no debe superar el ± 20% de la concentración teórica y para las concentraciones de 5, 10 y 40 µg/mL se encuentra dentro del margen de ± 15%, por lo tanto en términos de exactitud las concentraciones se encuentran dentro de los márgenes que establece establece la guía de la FDA.

#### 6.4.7. Recuperación

Para la determinación de recuperación los datos utilizados son los mismos que los ocupados para evaluar la repetibilidad a concentraciones 1 µg/mL – 5 µg/mL - 10 µg/mL – 40 µg/mL de suero fortificado (tabla 6.18).

<b>Muestras</b>	<b>1</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>5</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>10</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>40</b> <b>(µg/mL)</b>
Muestra área estándar	3154	6246	11534	38987
Muestra 1	2929	5434	10879	37956
Muestra 2	3018	5435	11751	36784
Muestra 3	3118	5408	10538	36573
Muestra 4	2945	5318	10394	38698
Muestra 5	3306	5421	11748	38984
Promedio	3063	5403	11062	37799
<b>Recuperación (%)</b>	<b>97,12</b>	<b>86,50</b>	<b>95,90</b>	<b>96,95</b>

**Tabla 6.18: Recuperación**

En cuanto a los resultados para recuperación no existe una exigencia de un porcentaje definitivo de recuperación, pero según lo recomendado se fijó como mínimo un 80 % y como máximo un 100 % cumpliendo así con las exigencias fijadas, cumpliéndose así con las exigencias fijadas.



## 7. CONCLUSIONES

- Se optimizó la extracción de Lamotrigina y su estándar interno desde el suero mediante diseños de experimentos para de ésta manera optimizar no tan sólo los solventes utilizados en el proceso de extracción si no también el porcentaje de recuperación desde la matriz biológica.
- El método validado es lineal, exacto, preciso, con una selectividad adecuada, con niveles de límites de detección y cuantificación adecuados, y con una recuperación de LTG en suero humano dentro de los valores establecidos.
- Se desarrolló y validó un método analítico por HPLC/UV para cuantificar Lamotrigina en sangre venosa (suero), aplicando optimización mediante AqBD. Resultando ser una herramienta interesante de implementar debido a los resultados obtenidos. Si bien el diseño de experimentos es una herramienta que está presente en muchas metodologías analíticas, la implementación de la gestión de riesgos le otorga un valor muy elevado ya que gracias al análisis de riesgo se puede trabajar en base a todos los factores que pudiesen influir en la metodología analítica y a estos realizar una priorización de los riesgos tomando en cuenta siempre los parámetros que le otorgan la robustez al método. Es por esto que muchos laboratorios farmacéuticos están implementando esta metodología para así prever riesgos que pudiesen afectar al resultado de sus análisis.

## 8. GLOSARIO

ACN: Acetonitrilo

ANOVA: análisis de varianza

AQbD: Calidad analítica por diseño

ATP: Perfil analítico del método

BBD: Box-Behnken

C.V: Coeficiente de variación

CAA: Atributos analíticos críticos

CFL: Cloranfenicol

CMP: Parámetros críticos del método

FDA: Food and Drugs administration

FE: Fase estacionaria

FM: Fase móvil

H<sub>2</sub>O: Agua

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

ILAE: Liga internacional contra la epilepsia

LLOD: Límite de detección

LLOQ: Límite de cuantificación

LTG: Lamotrigina

N: Numero de platos teoricos

SD: Desviación estándar

SI: Estándar interno

T: Factor de asimetría

Tr: Tiempo de retención

UV: Ultravioleta

Vis: Visible

$\lambda$ : Longitud de onda



## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. A.S. Rathore (2016), Quality by Design (QbD)-Based Process Development for Purification of a Biotherapeutic, Trends Biotechnol.34, 358-370.
2. A.S. Rathore, H. Winkle (2009), Quality by design for biopharmaceuticals, Nat. Biotechnol.27,26-34.
3. Allan H. Ropper, Martin A. Samuels, Joshua P. Klein, Sashank Prasad (2019) Adams and Victor's Principles of Neurology (11va ed.) McGraw-Hill Education.
4. Ashok Kumar, Maya Dutt Joshi, Akanksha Gupta, Sanjay Gurule, Rupesh Kumar, Rahul Kaushik, Nishant Chaudhary, Aditya Pundhir, Manisha Rastogi, 2017, Development and validation of analytical method for the estimation of lamotrigine in human plasma.  
<https://doi.org/10.20959/wjpps20178-9967>
5. Beghi E, Gatti G, Tonini C, et al. Tratamiento agregado versus monoterapia en pacientes con epilepsia parcial que fallan a 1 FAE: un estudio multicéntrico, randomizado, controlado. Epilepsy Res 2003;57:1-13.
6. Bell GS, Sander JW. The epidemiology of epilepsy: the size of the problem. Seizure. 2001; 10(4):306-314.
7. Blume WT, Luders HO, Mizrahi E, et al. Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology. Epilepsia 2001;42:1212–1218.



8. Brodie MJ. Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure* 2010;19(10):650-5)
9. Campos & Kanner, 2004, *Epilepsias: Diagnóstico y Tratamiento*
10. Chiofalo N , Kirschbaum A, Fuentes A, Cordero ML, Madsen J. Prevalence of epilepsy in children of Melipilla, Chile. *Epilepsia* 1979; 20:261-266.
11. Deckers CL, Genton P, Sills GJ et al. Current limitations of antiepileptic drug therapy: a conference review. *Epilepsy Res.* 2003; 53(1-2):1-17.
12. E. Rozet, P. Lebrun, P. Hubert, Design Spaces for analytical methods, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 42 (2013) 157-167.
13. Elinor Ben Menachem. "Manejo medico de la epilepsia refractaria- Practica de tratamiento con fármacos nuevos". *Epilepsia*, 55 (Suppl 1) : 3-8, 2014.
14. Elizabeth Greiner-Sosanko, Darla R. Lower, Mohamed A. Virji and Matthew D. Krasowski, 2017, Simultaneous determination of lamotrigine, zonisamide, and carbamazepine in human plasma by high-performance liquid chromatography. <https://doi.org/10.1002/bmc.753>
15. Elza Márcia Targas Yacubian Guilca Contreras-Cacedo Loreto Ríos-Pohl. (2014) *Tratamiento Farmacológico de las Epilepsias*, ALADE.
16. FDA. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. (2018). *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*.

17. Gilliam FG, Gidal BE. Lamotrigine. In: Wyllie E (ed.). The treatment of epilepsy. Principles and practice. 5. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2011. p. 704-9.
18. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario Anexo 15: Cualificación y validación. <https://www.aemps.gob.es/industria/inspeccionNCF/guiaNCF/docs/anexos/anexo-15.pdf>
19. Guillermina, M., & Quiroga, P. (2013). *Análisis farmacéutico*. Buenos Aires: Editorial de la Universidad de la Plata.
20. Gskpro, Lamictal, consultado 08-2021  
<https://gskpro.com/es-uy/productos/lamictal/prescribiendo/>
21. HassanHeidari, Chiman Mammostafaei, 2020, Spectrophotometric determination of lamotrigine in plasma samples: Ultrasound-assisted emulsification-microextraction based on a hydrophobic deep eutectic solvent followed by back-extraction.  
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119098>
22. Jack Zheng, Michael W. Jann, Yuen Yi Hon, Shahab A. Shamsi, 2004, Development of capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry for the determination of lamotrigine in human plasma.  
<https://doi.org/10.1002/elps.200305823>

- 23.** Jawad S, Yuen WC, Peck AW, Hamilton MJ, Oxley JR, Richens A. Lamotrigine: single-dose pharmacokinetics and initial 1 week experience in refractory epilepsy. *Epilepsy Res.* 1987 194–201.
- 24.** J. Emami, N. Ghassami, F. Ahmadi, 2005, Development and validation of a new HPLC method for determination of lamotrigine and related compounds in tablet formulations.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.07.045>
- 25.** Kuldeep M. Patil, Subhash L. Bodhanka, 2005, High-performance thin-layer chromatographic determination of lamotrigine in serum.  
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.06.029>
- 26.** MacDonald BK, Cockerell OC, Sander JW et al. The incidence and lifetime prevalence of neurological disorders in a prospective community-based study in the UK. *Brain.* 2000; 123(4):665- 676.
- 27.** Mark F. Vitha, *Chromatography; principles and instrumentation.* John Wiley & Sons, 2016.
- 28.** Matar KM, Nicholls PJ, Bawazir SA, Al-Hassan MI, Tekle A. A rapid liquid chromatographic method for the determination of lamotrigine in plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 1998;17:525–31.
- 29.** MINSAL (2014) Guía clínica AUGE Epilepsia adultos.
- 30.** MINSAL, 2008 Guía Clínica Epilepsia en el Niño.

- 31.** Moffat, A. C., Osselton, M. D., & Widdop, B. (2011). Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material (4th ed.). United Kingdom: Pharmaceutical Press.
- 32.** Olga Domínguez Renedo, M. Encarnación Burgoa Calvo, M. Julia Arcos Martíne, 2005, Optimization of the experimental parameters in the determination of lamotrigine by adsorptive stripping voltammetry.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.06.010>
- 33.** Pubchem, Lamotrigine, consultado 10.08.2021  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3878>
- 34.** Robert S. Fisher, Carlos Acevedo, Alexis Arzimanoglou, Alicia Bogacz, . Helen Cross, Christian E. Elger, Jerome Engel Jr, Lars Forsgren (2014) Definición clínica práctica de la epilepsia.  
<https://doi: 10.1111/epi.12550>
- 35.** Robert S. Fisher, J. Helen Cross, Jacqueline A. French, Norimichi Higurashi, Edouard Hirsch, Floor E. Jansen, Lieven Lagae, Solomon L. Moshe, Jukka Peltola, Eliane Roulet Perez, Ingrid E. Scheffer, and Sameer M. Zuber (2017) Clasificación operacional de los tipos de crisis por la Liga Internacional contra la Epilepsia: Documento - Posición de la Comisión para Clasificación y Terminología de la ILAE.  
<https://doi: 10.1111/epi.13670>

- 36.** Rosa Sabença, Joana Bicker, Rui Silva, Andreia Carona, Ana Silva, Isabel Santana, Francisco Sales, Amílcar Falcão, Ana Fortuna, 2020, Development and application of an HPLC-DAD technique for human plasma concentration monitoring of perampanel and lamotrigine in drug-resistant epileptic patients.  
<https://doi.org/10.1016/j.ichromb.2020.122491>
- 37.** Sandra Ventura, Márcio Rodrigues, Sarah Pousinho a , Amílcar Falcão, Gilberto Alves, 2017, Determination of lamotrigine in human plasma and saliva using microextraction by packed sorbent and high performance liquid chromatography–diode array detection: An innovative bioanalytical tool for therapeutic drug monitoring.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2016.09.007>
- 38.** Siyao Jin, Qing Zhao, Dongjie Zhang, Zhigang Zhao & Shenghui Mei, 2019, Development and validation of an improved HPLC-UV method for simultaneous determination of lamotrigine and oxcarbazepine and its active metabolite 10,11-dihydro-10-hydroxycarbazepine in human blood plasma and comparison with an UHPLC-MS/MS method.  
<https://doi.org/10.1186/s40543-019-0198-9>
- 39.** Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2014). Principios de análisis instrumental (9na ed.).
- 40.** Springer-Verlag, 2011. p. 30-5, Anti-epileptic drug prophylactic treatment. In: Panayiotopoulos CP (ed.). Principles of therapy in the epilepsies. London.: Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists (3rd ed.).
- 41.** Veronica R. Meyer (2010), Practical High-Performance Liquid Chromatography (5th ed.)

42. Watson, D. G. (2012). *Pharmaceutical Analysis for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists* (3rd ed.).



## 10. ANEXO

### 10.1. Anexo 1

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO E INFORMACIÓN PARA EL VOLUNTARIO PROYECTO

Este documento tiene por finalidad entregar toda la información necesaria para que el donante de muestras de sangre venosa, tenga toda la información necesaria para decidir si desea participar de la investigación.

Con el fin de llevar a cabo proyecto de investigación “Determinación de Lamotrigina en sangre, por un método basado en un análisis de riesgo: un aporte al tratamiento farmacológico de pacientes con epilepsia” un grupo de investigadores de la Universidad de Concepción está estudiando las concentraciones de Lamotrigina en suero humano.

Para lograr el objetivo planteado en la investigación, se debe validar la metodología analítica para cuantificar el Lamotrigina en la matriz biológica sangre.

En el proceso de la validación bioanalítica las muestras de sangre venosa se deben fortificar con el fármaco de estudio.

Si usted, una vez leído y explicado el consentimiento informado, acepta participar en el estudio donando sangre venosa, se le tomará una muestra de sangre (10 mL) (equivalente a 2 cucharaditas de té normales) en el Laboratorio de Bioquímica Clínica de la Universidad de Concepción, toma de muestra exenta de costo.

La participación es voluntaria y los datos obtenidos no serán utilizados en otro proyecto ni por personas ajenas a éste. Las muestras no se utilizarán para otros fines, y se eliminarán apenas termine el estudio, siguiendo las normas de Bioseguridad y Manejo de Residuos Biológicos estipulados por la Universidad de Concepción.

Los resultados obtenidos en este estudio serán publicados en revistas, conferencias científicas, para ampliar el conocimiento en estos temas, lo que genera nuevo conocimiento de utilidad para el mundo científico y la salud humana.

El presente consentimiento será firmado en dos ejemplares, quedando uno a disposición del proyecto de investigación, y otro en poder del donante voluntario de muestra de sangre venosa.

Después de leer este consentimiento y aclarar mis dudas, mi decisión es:

**Deseo participar:** SI NO

Nombre: \_\_\_\_\_

—

Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Firma solicitante consentimiento:

\_\_\_\_\_

**Contactos:** Srta. Milenka Albornoz Pierattini, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción. Fono: 2204523, E-mail: [milealbornoz@udec.cl](mailto:milealbornoz@udec.cl). Prof. Sigrid Mennickent, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Fono: 2204523, E-mail: [smennick@udec.cl](mailto:smennick@udec.cl)