



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

**“Determinación cuantitativa de Topiramato en sangre venosa, sangre de cordón umbilical y leche materna”**

Tesis para optar al grado de Magíster en  
Ciencias Farmacéuticas

CRISTINA MABEL CIFUENTES GONZÁLEZ  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2016

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

## RESUMEN

El Topiramato es un anticonvulsivante de nueva generación, ampliamente utilizado en diferentes tipos de epilepsias, síndromes epilépticos y otras patologías como la cefalea o la obesidad. En mujeres con epilepsia deben implementarse planes de natalidad que permitan la mejor selección del fármaco anticonvulsivante, ya que en varios de ellos está descritas una alta tasa de malformaciones congénitas.

En el caso de mujeres embarazadas es recomendable monitorear los niveles plasmáticos o séricos de los fármacos antiepilépticos, ya que se considera que los cambios fisiológicos de la paciente (aumento de peso, disminución del tono y la motilidad gástrica, vómitos, aumento del volumen plasmático en un 40 a 50% o disminución de las proteínas plasmáticas) pueden alterar la farmacocinética de los medicamentos. No se recomienda la suspensión, el cambio de dosis o de tipo de antiepiléptico durante el embarazo únicamente por consideraciones del efecto teratogénico del fármaco. Tampoco se aconseja suspender la lactancia materna. En este contexto, se considera que, además del monitoreo de las concentraciones de los fármacos en sangre de la madre, sería útil cuantificar los niveles de éstos en sangre fetal y en leche materna, para determinar qué cantidad de la dosis administrada a la madre pasa al bebé en gestación y/o al lactante.

Durante este trabajo de Tesis se desarrollaron y validaron metodologías por cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos (HPLC/DAD) y cromatografía en capa fina de alta eficiencia (HPTLC), las que demostraron ser precisas, exactas, sensibles y selectivas para la determinación cuantitativa del fármaco en sangre venosa, sangre de cordón umbilical y leche materna. Estos resultados permiten entregar una herramienta válida y efectiva, que a futuro pueda ser utilizada para relacionar la cantidad de Topiramato encontrada en sangre de la madre y en cordón umbilical, así como las cantidades presentes en leche materna, con las presentes en sangre fetal y del bebé, respectivamente, sin tener que extraer sangre del feto ni del lactante.

## INDICE

	Página
Resumen	1
Índice de abreviaturas	3 – 4
Índice de tablas	5 – 6
Índice de figuras	6 – 8
Marco teórico	9 – 30
Objetivos	31
Hipótesis	31
Metodología	32 – 46
Resultados y discusión	47 - 71
Conclusiones	72
Bibliografía	73 – 79
Agradecimientos	80
Anexo 1: Consentimiento informado e información al paciente	81- 82



## INDICE DE ABREVIATURAS

LICE	Liga Internacional Contra la Epilepsia.
EEG	Electroencefalograma.
GABA	Ácido gama aminobutírico.
NMDA	Receptor de glutamato N-metil-D-aspartato.
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución.
DAD	Detector de arreglo de diodos.
HPLC/UV	Cromatografía líquida con detector ultravioleta.
HPLC/F	Cromatografía líquida con detector de fluorescencia.
HPLC/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas.
HPLC/MS-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (en tándem).
FPIA	Inmunoensayo de polarización fluorescente.
LC	Cromatografía líquida.
HPTLC	Cromatografía en capa fina de alta eficiencia.
ICH	Conferencia Internacional de Armonización
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación

R	Resolución
RSD	Desviación estándar relativa
ANOVA	Análisis de varianza con un factor
N	Platos teóricos
T	Factor de cola
Rf	Factor de retardo



## INDICE DE TABLAS

Página

Tabla N°1:	Parámetros seleccionados para la optimización de la derivatización en las matrices biológicas sangre venosa y sangre de cordón umbilical.	39
Tabla N°2:	Parámetros seleccionados para la optimización cromatográfica de las matrices biológicas sangre venosa y sangre de cordón umbilical.	41
Tabla N°3:	Estudio de estabilidad para el fármaco Topiramato en sangre venosa y de cordón umbilical en diferentes condiciones de almacenamiento.	52
Tabla N°4:	Valores óptimos para la respuesta “Altura” y “Pureza” del pico cromatográfico.	54
Tabla N°5:	Estudio de precisión para el fármaco Topiramato en la matriz sangre venosa.	61
Tabla N°6:	Estudio de exactitud para el fármaco Topiramato en la matriz sangre venosa.	62
Tabla N°7:	Estudio de precisión para el fármaco Topiramato en la matriz sangre de cordón umbilical.	65

Tabla N°8:	Estudio de exactitud para el fármaco Topiramato en la matriz sangre de cordón umbilical.	66
Tabla N°9:	Estudio de precisión para el fármaco Topiramato en la matriz leche materna.	70
Tabla N°10:	Estudio de exactitud para el fármaco Topiramato en la matriz leche materna.	71

## INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura N°1:	Estructura química del fármaco Topiramato.	23
Figura N°2:	Esquema de la extracción y derivatización para Topiramato con cloruro de dabsilo como agente derivatizante.	37
Figura N°3:	Carta de Pareto para la optimización de la derivatización en sangre venosa y sangre de cordón umbilical.	49
Figura N°4:	Gráfico de efectos principales para la optimización de la derivatización en sangre venosa y sangre de cordón umbilical.	50

Figura N°5:	Superficie de respuesta para la optimización de la derivatización con cloruro de dabsilo.	50
Figura N°6	Carta de Pareto para la optimización cromatográfica de la respuesta analizada Altura del pico cromatográfico.	53
Figura N°7:	Carta de Pareto para la optimización cromatográfica de la respuesta analizada Pureza del pico cromatográfico.	54
Figura N°8:	Superficie de respuesta para la optimización de los parámetros cromatográficos para la respuesta altura.	55
Figura N°9:	Superficie de respuesta para la optimización de los parámetros cromatográficos para la respuesta pureza.	55
Figura N°10	Espectrograma de Topiramato. Longitud de onda de máxima absorción, $\lambda_{max}$ : 258 nm.	57
Figura N°11	Gráfico de Linealidad para topiramato en la matriz sangre venosa.	58
Figura N°12	Cromatograma para sangre venosa blanco.	59
Figura N°13	Cromatograma para Topiramato (TPM) 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y su estándar interno Amiodarona (AMD).	60

Figura N°14	Gráfico de Linealidad para topiramato en la matriz sangre de cordón umbilical.	63
Figura N°15	Cromatograma para sangre de cordón umbilical blanco	64
Figura N°16	Selección de la proporción de la fase móvil para la matriz leche materna	67
Figura N°17	Espectrograma del Topiramato derivatizado con Ninhidrina. Longitud de onda de trabajo seleccionada $\lambda_{trabajo}$ : 326 nm	68
Figura N°18	Gráfico de Linealidad para topiramato en la matriz leche materna	69
Figura N°19	Densitograma para Topiramato y su estándar interno Clorpromazina.	70

## MARCO TEORICO

### EPILEPSIA

La epilepsia es una condición crónica recurrente, caracterizada por la aparición de dos o más crisis no provocadas, independientemente del tipo de ellas o edad del afectado y excluye a todos aquellos casos en los cuales hay una causa sintomática demostrada, como por ejemplo, una hipoglicemia en un diabético<sup>1-3</sup>.

Las convulsiones son episodios breves de contracciones musculares que pueden afectar a una parte del cuerpo (convulsiones parciales) o a su totalidad (convulsiones generalizadas) las que son acompañadas la mayoría de las veces por pérdida de conciencia y del control de los esfínteres. Éstas se deben a descargas eléctricas excesivas de grupos de células cerebrales que dependen de la zona del cerebro donde comienzan las descargas, así como de su propagación<sup>4</sup>. No todas las epilepsias cursan con convulsiones.

Se estima que la epilepsia afecta a 50 millones de personas en el mundo<sup>5</sup>. En Chile los datos de prevalencia son de 17 por cada mil habitantes y la incidencia de 114 por cien mil habitantes por año<sup>1</sup>. En Latinoamérica y el Caribe la incidencia es de alrededor de 5 millones, mayor que la existente en los países desarrollados. Es más común incluso que la enfermedad de Parkinson. Entre los factores que podrían influir se pueden mencionar: desnutrición, infecciones del sistema nervioso central, complicaciones del embarazo, parto y accidentes<sup>3</sup>.

La epilepsia tiene una distribución bimodal, siendo mayor en las dos primeras décadas de la vida y luego a partir de la sexta década. La mortalidad es dos a tres veces mayor que la población general y se cree que afecta al menos a 50 millones de personas en el mundo. Es así como se debe enfatizar en la importancia de mantener una estrecha relación entre los profesionales de la salud y los pacientes, para que puedan alcanzar una mejor calidad de vida<sup>1, 3</sup>.

La epilepsia representa un 0,5% de la carga mundial de morbilidad, una medida basada en el tiempo que combina los años de vida perdidos debido a la mortalidad prematura con el tiempo vivido en situaciones en las que la salud no es plena<sup>4</sup>.

Al menos un 60% de los pacientes no son diagnosticados o no reciben el tratamiento pese a ser altamente efectivo. Esto puede deberse a dificultades geográficas, culturales, económicas, falta de especialistas o de conocimientos adecuados sobre la epilepsia<sup>3</sup>.

La mayoría de los estudios ratifican el criterio de que el pronóstico de las epilepsias depende largamente de la etiología de las crisis y de la condición clínica del paciente, más que del tipo de crisis o del tratamiento instituido. Los síntomas y signos pueden ser muy variados e incluyen alteraciones de conciencia, fenómenos motores, sensitivos, visuales, auditivos, autonómicos emocionales, y tantos síntomas y signos como funciones tiene la corteza cerebral. Una característica importante de las crisis, es que éstas son siempre similares (estereotipadas) y de aparición súbita. Las crisis epilépticas o convulsivas no son modificadas por la voluntad.

Respecto a la etiología de la epilepsia, el tipo más frecuente y que afecta a 6 de cada 10 personas diagnosticadas es la epilepsia idiopática, es decir, sin causa identificable. Dentro de las causas conocidas se encuentran: daño cerebral por lesiones prenatales o perinatales, malformaciones congénitas o cerebrales asociadas, traumatismo craneoencefálico grave, accidente cerebrovascular, infecciones cerebrales (meningitis y encefalitis), neurocisticercosis, síndromes genéticos y tumores cerebrales<sup>2</sup>.

La epilepsia se asocia a cambios de rutina de vida por parte de los pacientes, sus familias y amigos, e importantes costos económicos y sociales. Esto debido a que posee implicancias intelectuales, psicosociales y económicas; su diagnóstico, tratamiento precoz y correcto impacta tanto en los indicadores de salud como en los años de vida saludables<sup>1, 3, 5</sup>.

En los pacientes epilépticos, otras condiciones patológicas pueden anteceder a la presentación de ésta, diagnosticarse en el mismo momento en que se diagnostica la epilepsia o presentarse durante el curso de la enfermedad. También tienden a

padecer más problemas físicos, tales como fracturas y hematomas y mayores tasas de enfermedades y problemas psicosociales. Adicionalmente, las personas con epilepsia presentan mayor prevalencia a presentar condiciones crónicas que la población general. Estas comorbilidades pueden afectar significativamente el curso de la epilepsia y su tratamiento y los fármacos antiepilépticos también pueden alterar estas condiciones asociadas. Entre las comorbilidades más comunes en adultos, se encuentran las de etiología neurológica<sup>5-8</sup>.

La importancia de conocer esta información, no solo implica la planificación de actividades sanitarias, sino también de un manejo integral del paciente, permitiendo lograr un mejor control de su enfermedad, aumentar la adherencia a su terapia y finalmente llegar a una mejor calidad de vida para los pacientes<sup>3, 9</sup>.

Desde hace un tiempo comenzaron a considerarse estos datos epidemiológicos de comorbilidades asociadas a la epilepsia. La prevalencia de éstas es de alrededor de un 80% tanto en pacientes pediátricos como en adultos<sup>6, 9</sup>.

La alta tasa de psicopatologías en pacientes con epilepsia, interfiere en el desarrollo, evolución y manejo de la enfermedad, tratamiento farmacológico y psicosocial de los pacientes y sus familias. En los niños, las dificultades asociadas a la epilepsia afectan las habilidades para seguir los trayectos de su desarrollo emocional y social. Puede producirse un impacto directo sobre las funciones ejecutivas, en los procesos inhibitorios importantes para dominar tareas, desatención e hiperactividad. También pueden ocurrir efectos de la epilepsia sobre las experiencias vitales y la capacidad de afrontarlas<sup>7, 9</sup>.

Existe evidencia que factores no asociados a la epilepsia juegan un rol importante en los problemas de salud mental. Se observa una relación entre psicopatología, funcionamiento familiar y calidad de vida relacionada con la salud<sup>3, 9</sup>.

Si se trata adecuadamente, el 70% a 80% de las personas afectadas podrían tener una vida normal. La meta del tratamiento es la reducción del número y severidad de la crisis, provocando la menor cantidad de efectos colaterales posibles<sup>1, 5</sup>.

## **CLASIFICACIÓN DE LAS CRISIS CONVULSIVAS**

La Liga Internacional Contra la Epilepsia (LICE), en las dos últimas décadas ha realizado importantes contribuciones para establecer clasificaciones de crisis convulsivas, tipos de epilepsia y síndromes epilépticos. La inclusión del concepto de síndromes epilépticos ha sido uno de los grandes aportes de la clasificación<sup>3</sup>.

Se habla de síndromes epilépticos cuando existe un trastorno epiléptico (asociación de un tipo o varios tipos de crisis) con un conjunto de síntomas y signos característicos, tales como la edad de aparición de las crisis, tipo de crisis, hallazgos de electroencefalograma (EEG), neuroradiología, respuesta al tratamiento y pronóstico a largo plazo. Poder clasificar una epilepsia como un síndrome epiléptico determinado, permite muchas veces establecer la medicación a utilizar y la respuesta esperada al tratamiento. Ejemplos de síndromes epilépticos son la epilepsia parcial rolándica benigna y la epilepsia de ausencia, entre los benignos; así como el síndrome de Lennox-Gastaut y el síndrome de West entre los de mal pronóstico<sup>2, 3</sup>.

En cuanto a la enfermedad epiléptica, la LICE la define como una patología con una única, específica y bien definida etiología. La clasificación semiológica (ictal) de las crisis convulsivas es, según la LICE y otras entidades, la que permite una mejor comunicación entre profesionales y aporta datos como instrumento para realizar estudios farmacológicos o epidemiológicos. Además permite llegar a una adecuada clasificación sindrómica, ya que lateraliza y localiza el área epileptógena y visualiza la propagación de las crisis<sup>3</sup>.

Se considera que la semiología (la sintomatología) de una crisis epiléptica se produce porque las descargas epilépticas afectan a una de las siguientes áreas, produciendo 4 grandes grupos de crisis epilépticas<sup>2, 3</sup>:

1. Auras: Consisten en sensaciones anormales de naturaleza epiléptica que no producen manifestaciones objetivas, aunque a veces se observa al paciente teniendo una reacción anormal a la sensación. Las auras son breves (segundos generalmente, raramente minutos), y pueden ocurrir de forma aislada o precediendo a otros tipos de crisis. Dependiendo del tipo de sensación existen las auras visuales, auditivas, somato-sensoriales, olfatorias, gustativas, psíquicas, entre otras.

2. Crisis dialépticas: Son aquellas en que la principal manifestación ictal es la alteración de la conciencia, definida ésta como alteración parcial o total de la capacidad de respuesta y de interacción con el entorno, no causada por alteraciones motoras. Son acompañadas por amnesia total o por lo menos parcial para el episodio.
3. Crisis motoras: Son crisis que se manifiestan sobre todo por movimientos anormales, donde se distinguen las crisis motoras simples y las crisis motoras complejas.
  - a. Crisis motoras simples: caracterizadas por movimientos elementales, similares a los que se evocan por estimulación eléctrica de áreas motoras primarias.
  - b. Crisis motoras complejas: caracterizadas por movimientos relativamente complejos, que en ocasiones simulan movimientos voluntarios pero que aparecen en situaciones inapropiadas. Éstas incluyen movimientos de dedos, manos, lengua y labios y movimientos anormales del tronco y extremidades.
4. Crisis autonómicas: Son aquellas crisis cuya principal sintomatología son manifestaciones autonómicas que se pueden documentar de forma objetiva (por ejemplo, taquicardia, rubor facial, piloerección, etc.). Generalmente van acompañadas de otros tipos de crisis.
5. Crisis especiales: Se incluyen en este grupo una serie de crisis epilépticas que no pueden clasificarse adecuadamente en los grupos anteriores.
  - a. Crisis atónicas: se caracterizan por una pérdida del tono postural que puede producir caídas. Se pueden observar en crisis generalizadas o focales.
  - b. Crisis hipomotoras: se caracterizan por una detención o evidente disminución de la actividad espontánea del paciente. Este término se

utiliza en recién nacidos, lactantes, o pacientes en los que no es posible averiguar la causa de la inmovilidad.

- c. Crisis aquinéticas: son aquellas caracterizadas por la incapacidad del paciente para realizar movimientos voluntarios. Para clasificar una crisis como aquinética, el paciente debe estar consciente e intentar realizar el movimiento sin éxito.
- d. Crisis mioclónicas negativas: consisten en interrupciones breves (30 a 40 milisegundos) del tono muscular debidas a descargas epilépticas.
- e. Crisis afásicas: son aquellas en que el paciente presenta una afasia global, de expresión o de comprensión. En éstas el paciente debe estar consciente durante la crisis.

Después de realizar al paciente un registro con electroencefalograma, resonancia magnética y una interconsulta con psiquiatría, la clasificación será diferente ya que definirá el tipo de crisis, la etiología y condiciones relacionadas junto con la zona del cerebro afectada<sup>1,3</sup>.

## **TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA EPILEPSIA**

El objetivo del tratamiento de la epilepsia es lograr la ausencia de crisis, idealmente sin, o con el mínimo de efectos colaterales. Debe considerarse la tolerabilidad y efectos adversos a largo plazo, al considerar el primer fármaco<sup>1</sup>.

El uso de fármacos antiepilépticos debe ser personalizado, de acuerdo con el tipo de crisis, síndrome epiléptico, uso de otros fármacos en el adulto, comorbilidades asociadas, estilo de vida, preferencias personales y/o la relación con su familia y sus cuidadores<sup>1,3</sup>.

Las pautas de tratamiento indican que, luego del diagnóstico, se debe iniciar con monoterapia y de forma progresiva (titulación)<sup>1</sup>. Si el tratamiento fracasa (el fármaco es mal tolerado a dosis bajas o falla en controlar la enfermedad), debe intentarse con otro fármaco en monoterapia realizando un traslape (alcanzar progresivamente

dosis terapéuticas del segundo fármaco, antes de comenzar a reducir el primero). Finalmente si no hay éxito terapéutico (es bien tolerado, pero no se eliminan completamente las convulsiones), se sugiere biterapia y/o combinaciones de fármacos antiepilépticos<sup>1,3</sup>.

Con respecto al pronóstico, este puede englobar un amplio número de conceptos. En primer lugar debe entenderse el control de las crisis, como el predictor más obvio de la respuesta al tratamiento. Luego se habla de remisión a largo plazo, recurrencia y la posibilidad de suspender con éxito la medicación. Sin embargo se pueden tomar en cuenta otros aspectos como la morbilidad, mortalidad, comorbilidad con otras patologías y la posibilidad de un desarrollo psicomotor normal. Dicho pronóstico ha sido modificado significativamente en los últimos años, no solo por el mejor conocimiento de las epilepsias, sino por el manejo con fármacos antiepilépticos que llevan a la disminución importante en la frecuencia y severidad de las crisis, lo que produce un impacto significativo en la calidad de vida del paciente<sup>3</sup>.

La adherencia al tratamiento debe ser óptima tomando en cuenta los siguientes aspectos: Educar a los pacientes y su familia en relación a los objetivos de tratamiento, indicar esquemas terapéuticos de la forma más sencilla posible, establecer la mejor relación entre el equipo tratante, los pacientes y el entorno familiar y considerar los efectos colaterales de los fármacos en relación a la actividad laboral o educacional del paciente<sup>1</sup>.

Aproximadamente dos tercios de los pacientes epilépticos tratados, entrarán en remisión total. Los antecedentes que existen en literatura sobre una sola crisis son controversiales, sin embargo, hay consenso en que si se ha producido la repetición de una crisis en un periodo de tiempo relativamente corto, se debe iniciar un tratamiento anticonvulsivante<sup>1</sup>.

Al cabo de 2 a 5 años de tratamiento exitoso, el/los fármacos solo podrán retirarse en un 60% de los adultos sin que se produzcan recidivas. En los niños existe una alta tasa de recidiva si se retira el tratamiento farmacológico, por lo que en este periodo no se aconseja retirar la medicación<sup>4</sup>.

Es recomendable monitorear los niveles plasmáticos o séricos de los fármacos antiepilépticos. Esta medición se realiza ya que a veces se necesitan los valores de

las concentraciones alcanzadas por el fármaco, para adecuar la terapia a cada paciente. Si después del monitoreo, el paciente tiene niveles plasmáticos o séricos en el límite alto, no tiene efectos adversos y persisten las crisis, puede aumentarse la dosis en forma cuidadosa. El monitoreo de concentraciones en suero o plasma se considera importante cuando ocurren cambios en el paciente y éstos pueden alterar la farmacocinética<sup>1</sup>. Éstos se solicitan cuando:

- Se sospecha de mala adherencia terapéutica
- Se sospecha toxicidad farmacológica
- Existe necesidad de ajustar la dosis del fármaco
- Existen interacciones con otros fármacos y
- En condiciones específicas como un status epiléptico, el embarazo y/o comorbilidad médica severa.

Este monitoreo es independiente de la clase de antiepiléptico que utilice el paciente<sup>1, 3, 10, 11</sup>.

Los fármacos antiepilépticos o anticonvulsivantes se pueden clasificar en clásicos y nueva clase de antiepilépticos (o de segunda generación). Dentro de los clásicos están la carbamazepina, el fenobarbital y el ácido valproico o valproato y en los nuevos antiepilépticos se encuentran la lamotrigina, el topiramato, el levetiracetam, la pregabalina, entre otros<sup>2, 3, 12</sup>.

También se pueden clasificar según su mecanismo de acción en: bloqueadores de canales de sodio voltaje-dependientes, que actúan en el metabolismo del GABA (ácido gama aminobutírico) y fármacos con múltiples mecanismos de acción<sup>2</sup>.

#### 1.- Fármacos que bloquean canales de sodio voltaje-dependientes:

Estos fármacos disminuyen la activación neuronal, una vez que ha comenzado el potencial de acción, lo cual previene la potenciación post-tetánica, que consiste en una gran respuesta de una neurona post sináptica a un potencial de acción aferente después de una exposición de alta frecuencia (tetánica). Las neuronas que experimentan una potenciación post-tetánica, pueden ser responsables de la diseminación eléctrica anormal después de ser expuestas a estimulación rápida, repetitiva. Esta acción se puede correlacionar con la rápida

diseminación de la actividad eléctrica de un foco circunscrito a otras áreas corticales.

Los principales representantes de este grupo son: la carbamazepina, la fenitoína, la lamotrigina y la oxcarbazepina.

### 2.- Fármacos que afectan el metabolismo del GABA:

El ácido gama aminobutírico o GABA, es un neurotransmisor que ejerce una inhibición post-sináptica, ampliamente distribuido en el sistema nervioso central. El complejo de receptores GABA, tiene sitios de unión a GABA, a benzodiazepinas y a fenobarbital. El incremento del tono GABAérgico, se asocia a un efecto anticonvulsivante.

Los fármacos con actividad GABAérgica son: el fenobarbital, las benzodiazepinas, la tiagabina, la gabapentina y la vigabatrina.

### 3.- Fármacos con múltiples mecanismos de acción:

El valproato de sodio bloquea canales de sodio voltaje-dependientes, y, al parecer, aumenta la síntesis de GABA además de bloquear las corrientes de calcio. El felbamato bloquea el receptor aminoacídico excitatorio de NMDA (N-metil-D-aspartato) y aumenta la función del GABA. El topiramato bloquea canales de sodio voltaje-dependientes, aumenta la actividad del GABA y antagoniza al receptor de glutamato-NMDA.

## **TRATAMIENTO DE LA EPILEPSIA EN LA MUJER**

En los últimos años se ha hecho cada vez más relevante la necesidad de dar una atención médica adecuada a la mujer con epilepsia que va más allá de un simple control de las crisis. Se estima que más de un 25% de los pacientes con epilepsia son mujeres en edad fértil, porcentaje que revela por sí solo la importancia de considerar en forma especial las dificultades y desafíos adicionales que presenta este grupo de pacientes. Las mujeres con epilepsia tienen una fertilidad reducida, comparada con mujeres no epilépticas sanas; esto probablemente debido a causas multifactoriales como el efecto directo de las crisis sobre el hipotálamo y la glándula

pituitaria, la presión social, enfermedades endocrinas o disminución de la libido<sup>13, 14</sup>.

El tratamiento antiepiléptico de mujeres con epilepsia debe considerar aspectos como planes de embarazo (concepción o anticoncepción), el embarazo, la lactancia y la menopausia, para permitir decisiones y elecciones adecuadas. Además, debe hacerse hincapié en la adherencia al tratamiento y control frecuente, el riesgo de muerte y a veces mal pronóstico fetal, así como los riesgos que incluye el cuidar de un hijo (privación de sueño). Con respecto a la privación de sueño en mujeres epilépticas embarazadas, ésta puede provocar molestias físicas, movimientos del feto y nicturia. El estrés también puede contribuir a un mal dormir y aumentar la probabilidad de crisis epilépticas<sup>1, 3, 13-16</sup>.

El número de crisis epilépticas no aumenta con el embarazo en mujeres sin privación de sueño que se adhieren bien a la terapia<sup>13</sup>. Tampoco aumenta el riesgo de convulsiones con el trabajo de parto. A pesar de estos datos, hay evidencias de un mayor número de complicaciones en mujeres epilépticas que toman medicamentos antiepilépticos durante el embarazo, tales como pre-eclampsia, metrorragia, anemia, hiperemesis gravídica y parto prematuro<sup>13, 14</sup>.

Todo esto se debe a que en la mujer se produce una reducción de la eficiencia de los anticonceptivos hormonales<sup>1, 13</sup> y en el embarazo existe un cambio en la fisiología de la mujer, lo que lleva a reducción de los niveles plasmáticos de los antiepilépticos y a un aumento del riesgo de crisis convulsivas en este periodo<sup>14, 15</sup>. Durante el embarazo los niveles plasmáticos de los antiepilépticos tienden a disminuir debido a varias razones, como: aumento de peso propiamente tal, disminución del tono y la motilidad gástrica, vómitos, aumento del volumen plasmático en un 40 a 50%, disminución de las proteínas plasmáticas, cambios en la farmacocinética debido a efectos sobre las enzimas del sistema P<sub>450</sub>, entre otros<sup>8, 10, 13-15</sup>. El efecto del embarazo en la frecuencia de las crisis es variable e impredecible entre pacientes; aproximadamente el 20 a 30% de las pacientes tienen un aumento en la frecuencia de las crisis<sup>13, 15</sup>.

Aun así, más del 90% de las mujeres epilépticas tienen embarazos normales, y la mayoría tiene recién nacidos sanos. Sin embargo, la tasa de muerte neonatal y

perinatal es 3 veces mayor, y los neonatos tienen un mayor riesgo de bajo peso de nacimiento, prematuridad y menor puntaje de Apgar. Varios estudios sugieren que la epilepsia materna es un factor de riesgo de menor inteligencia en la niñez.

Si una paciente ha estado libre de convulsiones por al menos 2 años, podría disminuir y eliminar la terapia antiepiléptica. Si no se puede eliminar ésta, se debe usar la menor dosis necesaria para controlar las convulsiones<sup>3, 13, 17</sup>.

Las convulsiones tónico clónicas generalizadas pueden causar hipoxia y acidosis en la madre y el feto. Luego puede ocurrir una hemorragia intracraneana fetal, abortos y mortinatos. Las convulsiones pueden causar traumas que conllevan a un mayor riesgo de infección, parto prematuro, e inclusive muerte fetal. El desprendimiento de placenta ocurre en un 1 a 5% de los traumas menores y en un 20 a 50% de los traumas mayores<sup>13, 17</sup>.

Hay poca información acerca de los riesgos fetales de los nuevos antiepilépticos. La mejor terapia debe establecerse previo al embarazo, ideando esquemas orientados a disminuir la exposición fetal al fármaco, como disminuir la dosis y aumentar la frecuencia, o prescribir presentaciones de liberación prolongada.

En general, en relación a los medicamentos antiepilépticos, no hay información que sugiera diferencias entre ellos con respecto a la teratogenicidad o riesgos de resultados adversos<sup>10, 18</sup>. Muchos de estos medicamentos se asocian a dimorfismos, tales como hipoplasia de las uñas y de las falanges distales, hipertelorismo, “facie anticonvulsivante” (puente nasal ancho o deprimido, nariz pequeña con fosas nasales antevertidas, labio superior grande e hipoplasia maxilar), espina bífida y anencefalia<sup>2, 13, 19</sup>. El número creciente de mujeres en tratamiento con los llamados nuevos fármacos antiepilépticos, como Topiramato, merece especial atención ya que existirán, mayores probabilidades de que haya embarazos con mujeres expuestas a estos medicamentos<sup>16, 18</sup>. Adicionalmente, se debe considerar que los antiepilépticos de esta clase, son utilizados en el tratamiento de otras patologías como desórdenes bipolares, dolor neuropático, desorden de ansiedad generalizada, migraña o tratamiento del sobrepeso u obesidad<sup>15</sup>.

El antiepiléptico más apropiado será determinado por el conocimiento del tipo de crisis y el síndrome epiléptico que padece la paciente<sup>14</sup>. Es importante aconsejar a la paciente no suspender el tratamiento en caso de un diagnóstico inesperado de embarazo, ya que la suspensión brusca de la terapia puede precipitar la reaparición de crisis o de un estado epiléptico convulsivo<sup>1, 20</sup>. No se recomienda la suspensión, el cambio de dosis o de tipo de antiepiléptico durante el embarazo únicamente por consideraciones del efecto teratogénico del fármaco. Tampoco se aconseja suspender la lactancia materna<sup>20</sup>. El fármaco deberá administrarse en monoterapia (ya que la politerapia aumenta los riesgos de efectos teratogénicos), a la menor dosis posible y a los menores niveles plasmáticos útiles<sup>1, 13, 14, 19</sup>.

Por todas las razones anteriores, se recomienda efectuar un control clínico y niveles plasmáticos o séricos del fármaco en el momento del diagnóstico, al principio de cada trimestre y al inicio del último mes de embarazo<sup>10, 11, 14, 15, 21</sup>. La información de la farmacocinética durante el embarazo y la lactancia materna se considera un requisito para el uso óptimo del fármaco en estas situaciones. La sola disminución de los niveles plasmáticos no constituye una indicación para modificar la dosis y debe utilizarse como una medida de seguimiento clínico. En el caso de realizar modificaciones en la dosis del fármaco antiepiléptico, es recomendable efectuarlas en el tercer trimestre del embarazo. Para Topiramato, existe poca información sobre pacientes en tratamiento embarazadas y nodrizas<sup>14, 16</sup>.

Existe poca información acerca de los riesgos fetales de los nuevos antiepilépticos (lamotrigina, gabapentina, felbamato, levetiracetam, topiramato). Dado que no hay acuerdo sobre qué terapia antiepiléptica es la menos teratogénica, debe usarse aquella que detenga las crisis<sup>3, 15, 22, 23</sup>.

Está recomendada la suplementación con ácido fólico durante el embarazo a toda mujer, especialmente a mujeres en tratamiento de epilepsia, ya que esta vitamina disminuye el riesgo de defectos del tubo neural en el recién nacido, asociada a déficit de ácido fólico, y la mayoría de los medicamentos antiepilépticos producen disminución de éste. Se debe suplementar con esta vitamina a toda mujer usuaria de fármacos antiepilépticos que se embarace. Si el embarazo es planificado, el ácido fólico debe indicarse al menos 6 meses antes del inicio de éste<sup>1, 13, 14, 18, 19</sup>.

Otro factor a considerar es que existe relación entre los fármacos antiepilépticos y la reducción de la densidad mineral del hueso. Hay variados estudios que sugieren que los antiepilépticos pueden producir hipocalcemia, disminución de niveles de vitamina D biológicamente activos y reducción de la densidad mineral ósea. Estos datos son poco conocidos por el personal de salud, por lo que generalmente no se evalúa rutinariamente este factor o no se da profilácticamente suplementos de calcio o vitamina D. Si se considera que el tratamiento antiepiléptico con frecuencia es crónico, este puede asociarse significativamente a disminución de la masa ósea y riesgo de fracturas<sup>24-27</sup>. Además, los pacientes con epilepsia tienen factores de tipo físico y ambiental que los predisponen a tener enfermedad ósea como son: poco ejercicio, pobre ingesta de calcio en la dieta y una exposición ocasional a la luz solar. Por otra parte, las caídas frecuentes por crisis también los predisponen a un mayor riesgo de fracturas<sup>28</sup>.

Existe variada evidencia que sugiere que los antiepilépticos producen efectos negativos en la densidad mineral ósea a través de diferentes mecanismos; y si se trata de una mujer embarazada, esto puede repercutir directamente en ellas, ya que las necesidades nutricionales del feto asociadas al embarazo, pueden llevar a una mayor desmineralización, comparado con otros estadios de la vida<sup>24, 25, 28</sup>. Aunque la infancia y la adolescencia son periodos críticos en la mineralización ósea, ésta llega a un pico máximo entre la segunda y tercera década. La densidad mineral ósea lograda al final de la adolescencia determina de manera importante el riesgo de fracturas patológicas y desarrollo de osteoporosis en etapas más tardías de la vida. Al ser la osteoporosis más común en mujeres que en hombres, éstas pueden ser particularmente vulnerables a los efectos de los antiepilépticos en la salud ósea<sup>28</sup>.

En relación a la lactancia, ésta se recomienda dado todos los beneficios que ofrece, como una buena nutrición y protección inmunológica. A todas las madres con tratamiento antiepiléptico se les debe estimular a dar lactancia materna<sup>1, 20, 21, 29</sup>. Sin embargo, hay que estar atento a la aparición de irritabilidad, problemas en la alimentación o ganancia ponderal, así como cualquier otra anomalía en el lactante, la que podría deberse a la utilización de terapia antiepiléptica de la madre<sup>13</sup>.

<sup>16, 20, 23, 29</sup>. Además, se debe considerar que prácticamente todos los fármacos antiepilépticos pasan a la leche materna por difusión simple, por lo que su grado de unión a proteínas determinará su mayor o menor porcentaje de paso.

Para determinar la seguridad de un fármaco en el infante se deben considerar datos como concentración del fármaco en leche, peso del infante y el volumen de leche ingerido, por ejemplo, en 24 horas. Por otra parte, para cualquier fármaco que sea administrado al infante por cualquier vía (incluida la leche materna) se debe evaluar la capacidad del organismo de metabolizarlo y excretarlo por la orina o heces. Algunos compuestos que aparecen en concentraciones bajas en leche materna, pueden no ser excretados y ser acumulados por el lactante hasta generar efectos adversos o toxicidad<sup>30-31</sup>.

La cantidad de antiepiléptico transferida a la leche materna, suele ser mucho menor que la dada vía placentaria en el embarazo<sup>15, 16, 20, 32</sup>.

Por lo tanto, es muy importante medir concentraciones de estos fármacos, en este caso de Topiramato, tanto en sangre de las mujeres embarazadas en tratamiento con él, como en sus cordones umbilicales y leche materna, para determinar si las concentraciones encontradas en cada matriz, están dentro del rango terapéutico del medicamento, y no se encuentren bajo o sobre estos niveles, pudiendo causar intoxicaciones o problemas en la madre, el feto y/o lactante, ya que el objetivo de medir la cantidad de fármaco encontrada en sangre de la madre y en cordón umbilical, así como las cantidades presentes en leche materna, es relacionarlas con las presentes en sangre fetal y del bebé, respectivamente, sin tener que extraer sangre del feto y/o lactante<sup>16, 18</sup>. Hay poca información sobre niveles encontrados en sangre de cordón umbilical o leche materna para Topiramato. En éstos, se utiliza la relación entre la sangre venosa materna y el cordón umbilical o la leche materna (Radio C:P o Radio M:P), para relacionar las cantidades de fármaco encontradas en cada matriz. Esto junto con la observación del infante/lactante entrega información acerca si los efectos adversos observados son debidos al fármaco o no y ayuda también a relacionar la distribución del fármaco a estas matrices biológicas. La monitorización de fármacos antiepilépticos en el embarazo y lactancia, reflejan la importancia de la prevención en la etapa de gestación, que se puede realizar

utilizando metodologías precisas, exactas, sensibles y selectivas para la determinación de concentraciones plasmáticas o séricas de estos fármacos. Además, se mejora la adherencia a terapia de la paciente y su calidad de vida, entregando datos concretos para demostrar que su bebé se encuentra en buenas condiciones y no está siendo afectado por su tratamiento antiepiléptico.

## TOPIRAMATO

El Topiramato es un fármaco antiepiléptico perteneciente a la clase de los nuevos antiepilépticos. Es utilizado por su efecto anticonvulsivante y además se describen otros usos como profilaxis de migraña, tratamiento de dependencia alcohólica y tratamiento de la obesidad<sup>33</sup>.

En la Figura N°1 se observa la estructura química del fármaco, correspondiente a un derivado de fructopiranososa sustituida por un grupo sulfamato, estructuralmente diferente a otros fármacos de su clase. Es un polvo blanco cristalino, soluble en acetona, alcohol, cloroformo y dimetil-sulfóxido; posee un pKa de 11,09 y un log P de 0,13<sup>33-36</sup>.

No absorbe al espectro UV ni al visible. Por esta razón necesita de técnicas adecuadas y sensibles, que permitan su cuantificación<sup>33</sup>.

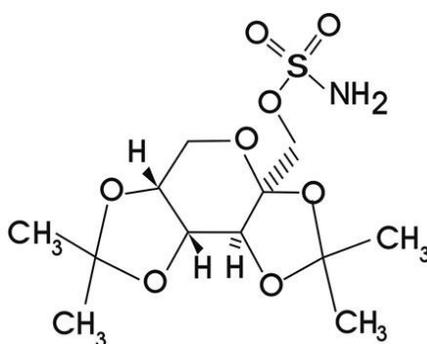


Figura N°1: Estructura química del fármaco Topiramato.

Respecto a su farmacocinética, después de la administración oral se absorbe rápidamente y exhibe una cinética lineal proporcional a la dosis, posee una alta

biodisponibilidad (80%-95%), obteniéndose niveles en plasma a las 2-3 horas de la administración<sup>33</sup>. Los alimentos no parecen afectar la absorción o la biodisponibilidad. Topiramato presenta una baja unión a proteínas (9-17%) y su volumen de distribución es de 0,6 a 0,8 L/Kg. Atraviesa la placenta y es distribuido en la leche materna. La mayor vía de eliminación es la vía renal. Una pequeña proporción es metabolizada por mecanismos de hidrólisis, hidroxilación y glucuronidación. La proporción metabolizada aumenta de forma importante en pacientes que estén en tratamiento con fármacos inductores enzimáticos. Se han identificado seis metabolitos de Topiramato, los que abarcan menos del 5% de la dosis total administrada y ninguno posee actividad farmacológica. La vida media de eliminación en plasma es de 20 a 30 horas. Las dosis usualmente administradas para el tratamiento de la epilepsia van de 200 a 400 mg. En Chile solo se encuentran disponibles comprimidos recubiertos de liberación inmediata de 25, 50 o 100 mg <sup>1, 3, 18, 33-35</sup>.

Las concentraciones del fármaco son generalmente altas en personas con efectos colaterales como anorexia, pérdida de peso, confusión, ansiedad o depresión. Por esto se debe monitorear al paciente, buscando efectos colaterales, y así realizar el ajuste de dosis respectivo<sup>16, 33</sup>.

En el caso del embarazo, al encontrarse aumentado el flujo de sangre a nivel renal, aumenta el clearance renal de Topiramato y disminuyen sus concentraciones séricas. Las concentraciones de Topiramato en sangre encontradas en el embarazo, se reducen entre un 30 a 40%, por lo que se recomienda el monitoreo de sus concentraciones séricas o plasmáticas. Adicionalmente, datos preliminares indican un aumento del riesgo de malformaciones congénitas con la utilización de este fármaco. También ha sido asociado a disminución de peso del recién nacido<sup>15, 16</sup>.

Aunque no existen estudios suficientes en seres humanos, el Topiramato ha demostrado ser teratogénico y embriotóxico en ratas y conejos, en dosis 0,2 a 2 veces, respectivamente, la dosis recomendada en seres humanos. Se han informado casos de hipospadías en niños expuestos a Topiramato en el útero y de

fisura de paladar y labio fisurado recientemente; sin embargo, no se ha establecido una relación entre estos hallazgos y el fármaco<sup>33-35, 37-40</sup>.

Topiramato debe usarse en el embarazo solo cuando los beneficios de la madre, superen los posibles riesgos para el feto. Topiramato se ha distribuido a leche materna en estudios en ratas, y algunos otros estudios han concluido que también se distribuye extensamente en leche materna humana<sup>20</sup>. Debido a la posibilidad de efectos adversos graves en los lactantes, debe evaluarse el riesgo del niño/beneficio de la madre para determinar si se suspende o se continúa con la administración del fármaco a la madre durante la lactancia<sup>20, 41</sup>.

Diferentes metodologías han sido reportadas en bibliografía para determinación de Topiramato en líquidos biológicos. No se encontraron métodos por HPLC/DAD para cuantificación de Topiramato en ninguna de las matrices de estudio; en el caso de la leche materna, existen solo inmunoensayos<sup>16, 32</sup>.

Los métodos analíticos encontrados para determinación de Topiramato en sangre<sup>38</sup> fueron cromatografía de gas<sup>43-46</sup>, cromatografía líquida de alta eficiencia con detección UV (HPLC-UV)<sup>47</sup>, por fluorescencia (HPLC-F)<sup>48-50</sup>, y masa (HPLC-MS, HPLC-MS/MS)<sup>51-57</sup>, inmunoensayos<sup>32, 53</sup> y electroforesis capilar<sup>58</sup>.

Para cordón umbilical, el método encontrado fue desarrollado con un inmunoensayo de fluorescencia (FPIA)<sup>16, 32</sup>.

Muchos de estos métodos, necesitan gran volumen de muestra, usan una corrida cromatográfica prolongada, altos volúmenes de inyección y poseen baja sensibilidad. Se hace necesario entonces, el desarrollo de métodos analíticos simples, específicos, rápidos y sensibles para la cuantificación de Topiramato en muestras biológicas.

## **CROMATOGRAFIA LIQUIDA CON DETECTOR DE ARREGLO DE DIODOS**

La cromatografía con detector DAD (Detector de Arreglo de Diodos) permite obtener cromatogramas a diferentes longitudes de onda en una misma corrida. Después de la corrida se puede obtener cualquier cromatograma y también puede obtenerse el espectro UV a cualquier tiempo de retención. LC/DAD provee, por lo tanto, mayor

información de la composición de una muestra que la que se puede obtener desde una corrida a una sola longitud de onda. Examinando el espectro UV de cada pico por separado, se puede evaluar la pureza de éstos y se puede seleccionar la longitud de onda óptima para el método final<sup>59</sup>. Para estudios de fármacos en matrices biológicas, la pureza de los picos es importante de determinar para asegurar una adecuada separación entre el compuesto original y sus metabolitos, así como otros interferentes.

Como se mencionó anteriormente, el Topiramato no absorbe al espectro UV ni visible, por lo tanto, no se puede determinar directamente con un detector DAD. Para cuantificar el fármaco, se puede realizar la derivatización de la molécula. El proceso de derivatización consiste en una transformación química del analito, con el objetivo de posibilitar o mejorar su detección y su separación cromatográfica. Para la cromatografía líquida, el objetivo de la derivatización se centra en facilitar la detección, además de mejorar la estabilidad, la resolución, la simetría del pico y aumentar o disminuir el tiempo de retención de los analitos. En el caso de la derivatización por absorción UV-Visible, se introduce un grupo cromóforo en los analitos de interés para incrementar su detectabilidad basado en la absorción UV-Visible. En general se utilizan reactivos que originan productos con una elevada absorbancia a 254 nm, longitud de onda usualmente utilizada en detectores fotométricos simples.

Por otro lado, dentro de las desventajas se incluyen la necesidad de garantizar una completa reacción del reactivo derivatizante y la posibilidad de interferencia con la separación por exceso de reactivo, el medio de reacción o la producción de diferentes derivados de un componente<sup>60, 61</sup>.

## **CROMATOGRAFIA LIQUIDA EN CAPA FINA DE ALTA RESOLUCION**

En relación a HPTLC, una de sus principales ventajas es su flexibilidad, utilizada en diferentes áreas de la química, farmacia, análisis de alimentos, entre otras. Otra característica es que separa las muestras de forma simultánea en la misma placa, lo que la diferencia de otras técnicas en donde las muestras se trabajan

secuencialmente. Esto permite que la cromatografía se realice en poco tiempo y que se ocupe una menor cantidad de fase móvil que en HPLC, lo que implica además una ventaja medioambiental. Para la elección de los solventes que formarán parte de la fase móvil, se elegirán aquellos que permitan obtener la mejor separación, definición y resolución de los picos; además se buscará que sean compatibles con el medio ambiente. Una placa de 10 x 20 cm permite sembrar 33 pistas, es decir, alrededor de 27 muestras diferentes, además de los estándares respectivos. Es capaz de detectar cantidades pequeñas como nanogramos (usando detector UV) y picogramos (con detector de fluorescencia). Así se realiza un análisis rápido y de bajo costo, manteniendo una adecuada selectividad, resolución y reproducibilidad<sup>62</sup>.

Para el fármaco Topiramato no se encuentran metodologías descritas por HPTLC para determinación en líquidos biológicos. Además de las ventajas señaladas, se debe considerar que en el caso de la leche materna, ésta es una matriz compleja compuesta por agua, proteínas (caseína, proteínas del suero e inmunoglobulinas), carbohidratos (lactosa), lípidos, vitaminas (lipo e hidrosolubles), minerales y otras sustancias como hormonas y enzimas<sup>63</sup>. Es por esta razón que HPTLC ofrece la ventaja de una fase estacionaria descartable (placas de sílica gel), por ser un sistema abierto, sin riesgo de dañar la columna cromatográfica como en el caso de HPLC. Por lo tanto, se seleccionó esta metodología para la determinación de Topiramato en leche materna en el presente trabajo.

## **VALIDACIÓN ANALÍTICA EN LÍQUIDOS BIOLÓGICOS**

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. El objetivo de la validación es demostrar que el procedimiento es apto para el propósito indicado y así obtener métodos confiables y reproducibles<sup>64-67</sup>.

La ICH, Conferencia Internacional de Armonización de requerimientos técnicos para el registro de medicamentos humanos, tiene diferentes directrices divididas en

cuatro categorías y códigos de tema: Directrices de calidad, de seguridad, de eficacia y multidisciplinarias. Dentro de las directrices de calidad, la Guía Q2 (R1), está enfocada en la validación de procedimientos analíticos. Esta guía fue utilizada para las validaciones analíticas realizadas en esta tesis, ya que contiene especificaciones para validaciones en líquidos biológicos<sup>68</sup>.

Entre de las características analíticas principales en una validación se encuentran:

- Intervalo o rango: es la amplitud entre los niveles superior e inferior del analito (incluidos estos niveles). Para líquidos biológicos se pueden tomar como referencia los valores del fármaco encontrados en la matriz de estudio para establecer un rango de trabajo.
- Linealidad: es la capacidad para obtener resultados proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado. Se utilizan un mínimo de cinco puntos de datos para una evaluación adecuada.
- Límite de detección (LOD): es la menor cantidad de analítico que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones del experimento indicadas. Las pruebas confirman que la cantidad de analito se encuentran por debajo o por encima de un nivel. Según las normas ICH, el límite de detección se puede determinar por la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas a través de la ecuación:

$$\text{Límite de detección (LOD)} = \frac{3,3 \sigma}{m}$$

Donde  $\sigma$ : desviación estándar de la respuesta

m: pendiente de la curva de calibración

- Límite de cuantificación (LOQ): es la menor cantidad de analito en una muestra que puede determinarse con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones del experimento establecidas. Al igual que en el límite de detección se puede utilizar la siguiente ecuación:

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ)} = \frac{10 \sigma}{m}$$

Donde  $\sigma$ : desviación estándar de la respuesta

m: pendiente de la curva de calibración

- Selectividad o especificidad: es la capacidad de evaluar de forma inequívoca al analito en presencia de los componentes cuya presencia cabría esperar, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. Las sustancias potencialmente interferentes en una matriz biológica incluyen componentes de la matriz, metabolitos, productos de descomposición y medicación concomitante u otros xenobióticos. En general, se demuestra selectividad por la Resolución (R) de dos componentes que eluyen uno cerca del otro con un valor mayor a 1,5. La fórmula para el parámetro Resolución se define a continuación:

$$R = \frac{2 [(t_R)_B - (t_R)_A]}{w_A + w_B}$$

Donde:  $(t_R)$ : tiempo de retención de los picos cromatográficos.

w: ancho de los picos cromatográficos medidos en su base.

- Exactitud: es el porcentaje del analito recuperado o la diferencia entre el valor obtenido y el valor real evaluado estadísticamente. Existen variadas formas de determinarla: probar un estándar de referencia, realizar una adición estándar (muestra con cantidad de analito conocida, de elección para análisis de formas farmacéuticas), comparar el método a validar con un método de referencia (reconocido como exacto) u obtener la concentración real del analito desde la ecuación de la recta obtenida en el ensayo de diferentes concentraciones iniciales de éste. Se recomienda un mínimo de tres concentraciones en el rango seleccionado. Se expresa como porcentaje de recuperación (%).
- Precisión: es la expresión del grado de coincidencia entre los resultados de las muestras individuales de una muestra homogénea. Ésta se evalúa mediante el intervalo o rango especificado en el método. Se expresa como desviación estándar relativa (RSD). Dentro del parámetro precisión se encuentran:

- Repetibilidad: es la coincidencia de resultados dentro de un periodo corto obtenidos por el mismo analista con la misma instrumentación.
- Precisión intermedia: es la coincidencia en los resultados del mismo laboratorio, pero en días y/o analistas distintos para responder a diferentes condiciones analíticas.
- Reproducibilidad: es la coincidencia en los resultados entre distintos laboratorios.



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Desarrollar y validar métodos cromatográficos para determinar concentraciones de Topiramato en sangre venosa, sangre de cordón umbilical y leche materna.

### **Objetivos específicos**

1. Establecer y validar procedimientos de extracción y purificación de muestras, desde cada matriz de estudio, para cuantificar Topiramato.
2. Determinar estabilidad de Topiramato en sangre venosa (suero) y sangre de cordón umbilical (suero).
3. Desarrollar y validar un método analítico por HPLC/DAD para cuantificar Topiramato en sangre venosa (suero) y sangre de cordón umbilical (suero).
4. Desarrollar y validar un método analítico por HPTLC para cuantificar Topiramato en leche materna.

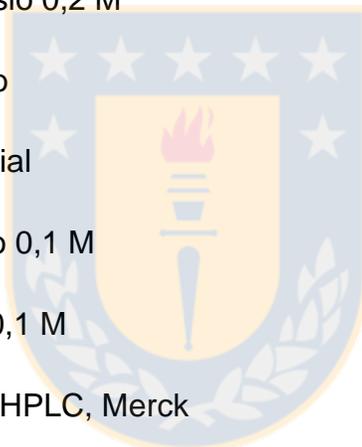
### **HIPÓTESIS**

“Los métodos analíticos desarrollados son precisos, exactos, sensibles y selectivos para la determinación cuantitativa de Topiramato en sangre venosa, sangre de cordón umbilical y leche materna”.

## METODOLOGÍA

### 1. Reactivos y solventes

- Cloruro de dabsilo, Merck
- Ninhidrina, Merck
- Ácido bórico
- Cloruro de potasio
- Glicina
- Hidróxido de potasio 0,2 M
- Acetato de amonio
- Ácido acético glacial
- Hidróxido de sodio 0,1 M
- Ácido clorhídrico 0,1 M
- Acetonitrilo grado HPLC, Merck
- Diclorometano grado pro-análisis, Merck
- N-hexano grado pro-análisis, Merck
- Metanol grado pro-análisis, Merck
- Tolueno grado pro-análisis, Merck
- Etanol grado pro-análisis, Merck
- Acetato de etilo grado pro-análisis, Merck
- Agua bidestilada



## 2. Estándares

- Topiramato, Toronto Research Chemicals Inc.
- Amiodarona, Sigma Aldrich
- Clorpromazina, Sigma Aldrich

## 3. Materiales y equipos

- Material volumétrico clase A
- Equipo HPLC/DAD Modelo Flexar Plus, Perkin Elmer
- Columna HPLC Purospher® RP-18e (5 µm), LiChroCART®
- Precolumna LiCrospher® 100 RP-18e (5 µm), LiChroCART®
- Sistema de filtración de solventes, Supelco Inc.
- Filtro de solventes para HPLC 0,45 µm
- Jeringa para HPLC, Perkin Elmer 100 µL
- Sembrador semiautomático LINOMAT 5, Camag
- TLC Scanner 3, Camag
- Reprostar 3, Camag
- Chromatogram Immersion Device III, Camag
- Placas HPTLC sílica gel 60 F<sub>254</sub> 20x10 cm y 10x10 cm, Merck
- Jeringa 100 µL Hamilton-Bonaduz, Camag
- Estufa de secado Modelo FDL 115, Binder®
- Balanza analítica Chyo JK-180
- Refrigerador Daewoo

- Freezer Whirpool
- Centrífuga Janetzki T30
- Sistema de evaporación con nitrógeno, Glass Blowing Concentrator
- Baño de agua
- pHmetro Oakton pH 510, Series
- Vortex Mixer modelo VM-1000, Digisystem
- Ultrasonido Branson 1200

#### **4. Obtención de muestras**

- La sangre venosa fue obtenida de voluntarios sanos, previa firma de consentimiento informado (Ver Anexo 1).
- La sangre de cordón umbilical fue obtenida de cordones de pacientes sanas, sin tratamiento farmacológico crónico (solo los fármacos que pudieran haber sido utilizados en el parto, desde el Hospital Guillermo Grant Benavente).
- La leche materna fue obtenida de una voluntaria sana, previa firma de consentimiento informado (Ver Anexo 1).

#### **5. Preparación de estándares**

- a. Preparación del estándar de Topiramato: Se preparó una solución estándar de Topiramato de 200 µg/mL en metanol (solución madre). La solución fue almacenada en refrigerador a una temperatura entre  $8 \pm 2$  °C hasta su posterior uso. A partir de ésta, se prepararon soluciones intermedias, de las cuales se obtuvieron las soluciones de trabajo para las diferentes matrices por dilución con metanol:

- Sangre venosa: 2 – 5 – 10 - 20 y 40  $\mu\text{g/mL}$ .
- Sangre de cordón umbilical: 1,6 – 2,0 – 5,0 – 10,0 – 20,0 – 30,0 – 40,0 y 50,0  $\mu\text{g/mL}$ .
- Leche materna: 1,2 – 1,4 – 2,0 – 5,0 – 10,0 – 20,0 – 30,0 – 40,0 y 50,0  $\mu\text{g/mL}$ .

- b. Preparación del estándar de Amiodarona: La solución del estándar interno Amiodarona fue preparada en metanol a una concentración de 1 mg/mL, la que posteriormente se utilizó para obtener una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ . Esta última fue utilizada para las determinaciones cromatográficas por HPLC/DAD y se almacenó bajo idénticas condiciones de almacenamiento que Topiramato.
- c. Preparación del estándar de Clorpromazina: La solución del estándar interno Clorpromazina fue preparada en etanol a una concentración de 1 mg/mL, la que posteriormente se utilizó para obtener una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$ . Esta última fue utilizada para las determinaciones cromatográficas por HPTLC y se almacenó bajo idénticas condiciones de almacenamiento que Topiramato.

## **6. Preparación de soluciones buffer**

- a. Buffer borato: Para la preparación del buffer borato, se pesaron 0,625 g de ácido bórico y 0,750 g de cloruro de potasio, los que se llevaron a un matraz aforado de 100 mL con agua destilada, y se ajustó a pH 6,0 con hidróxido de potasio 0,2 N.
- b. Buffer acetato: Para la preparación del buffer acetato, se pesaron 0,077 g de acetato de amonio los que se llevaron a un matraz aforado de 500 mL con agua destilada, y se ajustó a pH 6,6 con ácido acético glacial.

## 7. Extracción

### a. Separación del suero desde sangre venosa total

Luego de extraída la sangre de donantes voluntarios sanos, sin medicamento, se incubó en estufa a 37°C por 10 minutos. Se soltó el coágulo mediante golpe mano con mano y se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos. Finalmente se recuperó el suero y se congeló a -20°C para el trabajo posterior.

### b. Separación del suero desde sangre de cordón umbilical total

Luego de extraída la sangre de cordón umbilical, de mujeres parturientas sanas, se procesó de igual forma que con la sangre venosa total, congelándose para el trabajo posterior.

### c. Extracción de Topiramato desde suero recargado (de sangre venosa y de sangre de cordón umbilical)

A 1 mL de suero (recargado con estándar de Topiramato) se agregó 5 mL de diclorometano y 100 µL de estándar interno amiodarona (10 µg/mL). Se sometió a agitación con vórtex por 30 segundos y posterior centrifugación por 5 minutos a 3000 rpm. Luego se transfirió la fase orgánica (5 mL) a un tubo para evaporar bajo corriente de nitrógeno a 30°C sobre placa calefactora. Luego cada tubo fue sometido a derivatización con cloruro de dabsilo.

En la figura N°2 se muestra un esquema general del proceso de extracción y derivatización para Topiramato. El proceso de derivatización se explica en el punto 8.



Figura N°2: Esquema de la extracción y derivatización para Topiramato con cloruro de dabsilo como agente derivatizante.

#### d. Extracción de Topiramato desde leche materna recargada

A 2 mL de leche materna (recargada con estándar de Topiramato) se le agregó 150 µL de estándar interno clorpromazina (50 µg/mL). Se sometió a agitación con vórtex por 1 minuto y se le agregó 100 µL de NaOH 0,1 M. Se sometió nuevamente a agitación con vórtex y se agregó 10 mL de n-hexano. El tubo se colocó en baño de ultrasonido por 10 minutos y vórtex por 30 segundos. Luego se centrifugó por 5 minutos a 3000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Al nuevo tubo se adicionó 200 µL HCl 0,1 M y 100 µL de metanol. Se agitó con vórtex por 1 minuto y se separó la fase acuosa en tubo Eppendorf. Cada tubo se preparó previo a su siembra en el sistema cromatográfico.

## 8. Derivatización

### a. Derivatización de las muestras de sangre venosa y sangre de cordón umbilical con cloruro de dabsilo.

Al residuo obtenido de la extracción en cada matriz, se agregó 125  $\mu\text{L}$  de cloruro de dabsilo de concentración 6 mg/mL, 25  $\mu\text{L}$  de buffer borato pH 6,0 y 100  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo. La reacción se realizó sumergiendo los tubos en un baño de agua a 80°C por 15 minutos. La reacción se detuvo agregando 10  $\mu\text{L}$  de glicina de concentración 4 mg/mL. Los derivados obtenidos se transfirieron a tubos Eppendorf y se congelaron a -20°C para su posterior análisis.

### b. Optimización de la derivatización en muestras de sangre venosa y sangre de cordón umbilical

Se probaron diferentes condiciones para la derivatización a un pool de extracciones de estándar de Topiramato de concentración 20  $\mu\text{g/mL}$ . Se utilizaron datos bibliográficos para realizar la derivatización con dabsilo, y se identificaron como puntos críticos la concentración del agente derivatizante, el pH de la reacción y la temperatura de la reacción. En la Tabla N°1 se muestran los puntos críticos con los valores en el límite bajo y alto seleccionados, además de la respuesta a evaluar en la optimización.

Tabla N° 1: Parámetros seleccionados para la optimización de la derivatización en las matrices biológicas sangre venosa y sangre de cordón umbilical.

Parámetros	Bajo	Alto
A: Concentración de dabsilo	0,5 mg/mL	6 mg/mL
B: pH del buffer	6,0	10,0
C: temperatura de reacción	50 °C	80 °C
Respuesta	Área del pico cromatográfico	

Se realizó un diseño de experimentos (Central composite design: 2<sup>3</sup> + star) de 3 factores, 2 bloques, el cual consideró como variables las mencionadas anteriormente. Se realizaron todas las derivatizaciones cuantificándose por LC/DAD en triplicado para obtener un promedio de cada bloque. Los resultados fueron analizados estadísticamente con ayuda del Software STATGRAPHICS® del que se obtuvieron las mejores condiciones para la derivatización del fármaco Topiramato evaluando como respuesta el área del pico cromatográfico. Todas las determinaciones se realizaron con un grado de confianza del 95%.

Previo a la optimización se establecieron los parámetros cromatográficos: fase móvil acetonitrilo: buffer acetato (60:40 v/v), flujo de la fase móvil de 1 mL/min y longitud de onda máxima de 254 nm.

## 9. Estudios de estabilidad de topiramato en matriz sangre venosa y sangre de cordón umbilical

Para evaluar la estabilidad de las muestras de Topiramato extraídas desde cada matriz, en condiciones normales de almacenamiento, se procedió de la siguiente manera:

- Se realizaron 6 extracciones y derivatizaciones con estándar de Topiramato de concentración conocida a 3 niveles: 2 µg/mL – 20 µg/mL y 40 µg/mL.
- Estas soluciones se sometieron a 3 condiciones de almacenamiento: refrigeración, temperatura ambiente protegida de la luz y temperatura ambiente sin protección de la luz.
- Las mediciones para cada almacenamiento se realizaron a los 0, 1, 4, 7, 11 y 15 días.
- Se analizaron las muestras de cada condición de almacenamiento por duplicado cada día de medición. Se consideró como valor de comparación el día 0.

## 10. Cromatografía

### a. Cromatografía líquida/DAD (HPLC/DAD)

#### **Optimización de los parámetros cromatográficos del método por LC/DAD para las muestras de sangre venosa y sangre de cordón umbilical.**

Para la optimización de los parámetros cromatográficos se realizó un diseño de experimentos (3-level factorial design: 3<sup>3</sup>) de 3 factores, 3 bloques seleccionando como factores el flujo de la fase móvil, el pH de la fase acuosa de la fase móvil y la temperatura de la columna.

Un pool de extracciones de estándar de Topiramato de concentración 20 µg/mL se sometió a las diferentes condiciones de cuantificación utilizando el Software STATGRAPHICS ® para su posterior análisis. Como respuesta se analizó la altura del pico cromatográfico y la pureza. En la Tabla N°2 se muestran los puntos críticos con los valores en el límite bajo y alto seleccionados, además de las respuestas a evaluar en la optimización.

Tabla N° 2: Parámetros seleccionados para la optimización cromatográfica de las matrices biológicas sangre venosa y sangre de cordón umbilical.

Parámetros	Bajo	Alto
A: Flujo de la fase móvil	0,5 mL/min	1 mL/min
B: pH de la fase acuosa	6,2	6,6
C: temperatura de la columna	25 °C	40 °C
Respuesta 1:	Altura del pico cromatográfico	
Respuesta 2:	Pureza	

#### **b. Cromatografía en capa fina de alta eficiencia HPTLC**

La cromatografía para las muestras de leche materna se realizó en placas de HPTLC sílica gel F<sub>254</sub>, las cuales fueron previamente lavadas con metanol y activadas a 120°C por 20 minutos. Se utilizaron cámaras de desarrollo horizontal CAMAG de 20 x 10 cm y 10 x 10 cm, dependiendo de las placas utilizadas.

Para sembrar se utilizó el equipo sembrador semiautomático LINOMAT 5, sembrando en bandas. Se emplearon los siguientes parámetros en el proceso de desarrollo de la metodología:

- Tamaño de placa: 100 (placa 10 x 10 cm), 200 (placa 20 x 10 cm) según correspondió
- Ancho de banda: 8 mm
- Espacio entre bandas: 12,1 mm

Se utilizó una mezcla de tolueno: etanol (25:10 v/v) como fase móvil. La corrida fue de 8 cm. Se realizó una derivatización post-columna sumergiendo la placa desarrollada en ninhidrina al 1% en etanol con ayuda del equipo de inmersión Chromatogram Immersion Device III. La detección y cuantificación se realizó con un espectrofotodensitómetro Scanner 3 CAMAG, a una longitud de onda de 326 nm.

## 11. Validación métodos analíticos

La validación se realizó usando como referencia la Guía ICH de Validación Analítica<sup>65</sup>.

### HPLC/DAD:

#### Matriz sangre venosa:

- a) Rango y linealidad:** El rango fue seleccionado según los datos obtenidos de bibliografía respecto a las concentraciones encontradas en plasma y en suero humano del fármaco Topiramato<sup>8, 12, 50, 53, 55, 57</sup>. El rango seleccionado fue: 2,0 µg/mL – 40,0 µg/mL. Para la linealidad se seleccionaron cinco puntos dentro del rango: 2,0-5,0-10,0-20,0-40,0 µg/mL. Cada concentración se preparó y se inyectó en triplicado. Se utilizó un gráfico relacionando las áreas obtenidas de topiramato y su estándar interno vs concentración de

topiramato, para obtener el valor de correlación lineal de los datos. Además, se realizó un estudio estadístico mediante análisis de varianza (ANOVA) para corroborar la relación lineal de los datos.

- b) Selectividad:** Para determinar la selectividad se utilizó su estándar interno Amiodarona. También se hicieron pruebas en la matriz sin fármaco. Además se probaron diferentes estándares de antiepilépticos considerando que la combinación de éstos puede darse en el tratamiento farmacológico. Se utilizó el valor de Resolución (R) como parámetro indicativo de selectividad.
- c) Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ):** Para el límite de detección y cuantificación se seleccionaron tres concentraciones bajo el rango de trabajo: 1,50 – 1,75 y 2,00 µg/mL. Se prepararon tres extracciones y derivatizaciones de cada concentración las que se inyectaron por triplicado. Para calcular el límite de detección y cuantificación se utilizó la fórmula basada en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente (Normas ICH).
- d) Precisión:** Para la precisión se seleccionó el valor inferior, intermedio y superior del rango seleccionado y se prepararon 3 réplicas de cada nivel en la matriz biológica suero (adición del estándar Topiramato en la matriz), inyectándose en el sistema cromatográfico por triplicado. Los datos se procesaron para obtener la repetibilidad (intra-ensayo) y la precisión intermedia (inter-ensayo), realizando en este caso el mismo ensayo de repetibilidad durante tres días. Los resultados se expresaron como desviación estándar relativa.
- e) Exactitud:** Para la exactitud se seleccionó el valor inferior, intermedio y superior del rango seleccionado y se prepararon 3 réplicas de cada nivel en la matriz biológica suero (adición del estándar Topiramato en la matriz), inyectándose en el sistema cromatográfico por triplicado. Los valores

obtenidos se procesaron y se obtuvo el porcentaje de recuperación del fármaco desde la ecuación de la recta.

### **Matriz sangre de cordón umbilical:**

- a) Rango y linealidad:** El rango fue seleccionado según los datos obtenidos de bibliografía respecto a concentraciones encontradas en sangre de cordón umbilical del fármaco Topiramato. El rango seleccionado fue: 1,6 µg/mL – 50,0 µg/mL. Para la linealidad se seleccionaron ocho puntos dentro del rango: 1,6-2,0-5,0-10,0-20,0-30,0-40,0-50,0 µg/mL. Cada concentración se preparó y se inyectó por triplicado. Se utilizó un gráfico relacionando las áreas obtenidas de topiramato y su estándar interno vs concentración de topiramato, para obtener el valor de correlación lineal de los datos. Además, se realizó un estudio estadístico mediante análisis de varianza (ANOVA) para corroborar la relación lineal de los datos.
- b) Selectividad:** La selectividad se determinó al igual que en la matriz sangre venosa.
- c) Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ):** Para el límite de detección y cuantificación se seleccionaron tres concentraciones bajo el rango de trabajo: 1,50 – 1,55 y 1,60 µg/mL. Se prepararon tres extracciones y derivatizaciones de cada concentración las que se inyectaron por triplicado. Para calcular el límite de detección y cuantificación se utilizó la fórmula basada en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente (Normas ICH).
- d) Precisión:** Para la precisión se procedió de igual forma que en la matriz sangre venosa.
- e) Exactitud:** Para la exactitud se procedió de igual forma que en la matriz sangre venosa.

## HPTLC

La validación de la metodología analítica para la matriz leche materna, se realizó por la técnica de HPTLC.

- a) Rango y linealidad:** El rango fue seleccionado según los datos obtenidos de bibliografía respecto a las concentraciones encontradas en leche materna. El rango seleccionado fue: 1,2 µg/mL – 50,0 µg/mL. Para la linealidad se seleccionaron nueve puntos dentro del rango: 1,2-1,4-2,0-5,0-10,0-20,0-30,0-40,0-50,0 µg/mL. Cada concentración se preparó y se sembró por triplicado. Se utilizó un gráfico relacionando las áreas obtenidas de topiramato y su estándar interno vs concentración de topiramato, para obtener el valor de correlación lineal de los datos. Además, se realizó un estudio estadístico mediante análisis de varianza (ANOVA) para corroborar la relación lineal de los datos.
- b) Selectividad:** Se realizaron pruebas con estándares de fenitoína y carbamazepina a una concentración de 1 mg/mL. Se probaron estos fármacos ya que podrían ser encontrados en tratamiento concomitante con Topiramato. Para determinar la selectividad se utilizó el estándar interno Clorpromazina, y se utilizó el valor de Resolución (R) como parámetro indicativo de selectividad. Además, se hicieron pruebas en la matriz sin fármaco y se probaron diferentes estándares de antiepilépticos considerando que la combinación de éstos puede darse en el tratamiento farmacológico.

- c) Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ):** Para el límite de detección y cuantificación se seleccionaron tres concentraciones bajo el rango de trabajo: 1,0 – 1,1 y 1,2 µg/mL. Se prepararon tres extracciones de cada concentración las que se sembraron por triplicado. Para calcular el límite de detección y cuantificación se utilizó la fórmula basada en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente (Normas ICH).
- d) Precisión:** Para la precisión se procedió de igual forma que en la matriz sangre venosa.
- e) Exactitud:** Para la exactitud se procedió de igual forma que en la matriz sangre venosa.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Extracción

#### a. Extracción desde sangre venosa y cordón umbilical recargada con estándar de Topiramato

Se tomaron como referencia las extracciones líquido/líquido de otras metodologías en las que se determina Topiramato en suero o plasma<sup>47, 49, 50, 56</sup>. En varias de ellas se utiliza cloroformo o diclorometano como solvente de extracción. Se decidió utilizar diclorometano como solvente de extracción, lo que junto con la derivatización posterior obtuvo buenos resultados cromatográficos.

#### b. Extracción desde leche materna recargada con estándar de Topiramato

Para leche materna se describen metodologías de extracción en fase sólida para Topiramato<sup>16</sup>. Se utilizó como referencia otro método de extracción líquido/líquido en leche materna para tramadol<sup>69</sup>. La ventaja de utilización de esta metodología es que se utiliza la leche materna directamente sin un pre-tratamiento de la matriz. La metodología fue adaptada y utilizada para extracción de Topiramato en leche materna.

### 2. Derivatización

#### a. Pruebas de detención de la reacción de derivatización con cloruro de dabsilo para muestras de sangre venosa y sangre de cordón umbilical.

Se realizaron pruebas para determinar el término de la reacción de derivatización con hielo o con adición de glicina. Se prepararon seis extracciones y derivatizaciones variando el método de término de la reacción,

donde 3 se sometieron a hielo por 30 minutos y las otras 3 con adición de glicina.

Las áreas de los picos cromatográficos para adición de glicina fueron mayores que para la detención con hielo. Éstas fueron analizadas estadísticamente por t-student con un 95% de confianza, encontrándose una diferencia significativa en la detención de la reacción por adición de glicina. Esto debido a que la glicina reacciona con el agente derivatizante que no se unió al fármaco. Así, se evita la interferencia por exceso de cloruro de dabsilo en la cromatografía.

Además, se realizaron pruebas con dabsilo como blanco y glicina como blanco, las que poseen un tiempo de retención similar, y no llegan a interferir con el pico cromatográfico del fármaco.

Por lo tanto se seleccionó para el término de la reacción de derivatización la adición de glicina, ya que es un método rápido y no interfiere con la determinación del fármaco Topiramato.

Luego de las pruebas y la selección de glicina como término de la reacción de derivatización, se realizaron pruebas para seleccionar la cantidad de glicina a agregar. Se realizaron pruebas en concentraciones de 2,0 µg/mL y 20 µg/mL de topiramato para el término de la reacción con 10 – 30 y 45 µL de glicina.

A medida que se aumenta la cantidad de glicina agregada, en ambas concentraciones de topiramato, se observa una disminución del área del pico cromatográfico, por lo que se seleccionó la menor cantidad de glicina a agregar. Esto podría explicarse ya que a mayor cantidad de glicina agregada, podrá estar disponible para reaccionar con dabsilo, impidiendo que el fármaco topiramato reaccione.

Finalmente, se seleccionó para el término de la reacción la adición de glicina en cantidad de 10  $\mu$ L.

**b. Optimización de la derivatización con cloruro de dabsilo para muestras de sangre venosa y sangre de cordón umbilical**

La carta de Pareto en la Figura N° 3, muestra que las variables estadísticamente significativas fueron: pH del buffer y la temperatura de la reacción. La variable no significativa fue la concentración de cloruro de dabsilo. Además, la variable BC (interacción pH del buffer y temperatura de reacción) también fue significativa.

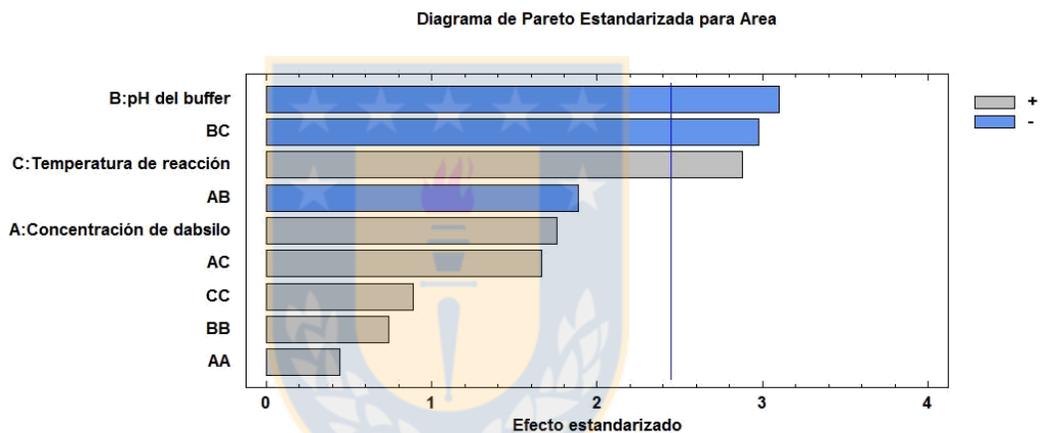
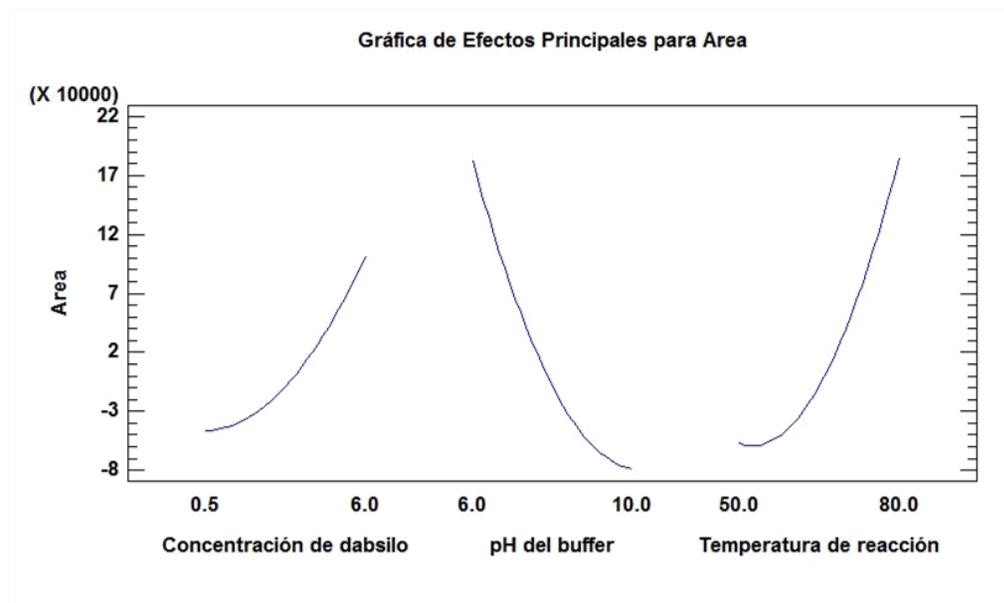


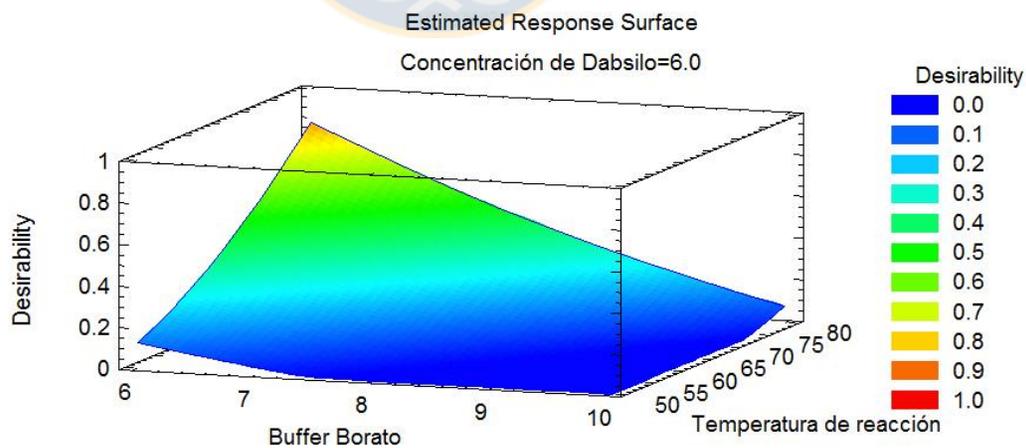
Figura N° 3: Carta de Pareto para la optimización de la derivatización en sangre venosa y sangre de cordón umbilical.

En la Figura N°4, se puede observar que a mayor concentración de cloruro de dabsilo y a mayor temperatura de reacción, se obtiene una mayor área del pico cromatográfico. Para el parámetro pH del buffer a menor pH se obtiene mayor área.



**Figura N°4:** Gráfico de efectos principales para la optimización de la derivatización en sangre venosa y sangre de cordón umbilical.

En la Figura N°5, se observa la misma relación a una concentración de cloruro de dabsilo de 6,0 mg/mL, se obtiene mayor área del pico cromatográfico a menor pH del buffer y mayor temperatura.



**Figura N° 5:** Superficie de respuesta para la optimización de la derivatización con cloruro de dabsilo.

El análisis de los valores obtenidos, tanto por el Gráfico de Efectos Principales de la Figura N°4, como por el Diagrama de Superficie de Respuesta que se presenta en la Figura N°5, arrojó como mejores parámetros según el diseño seleccionado:

- Concentración de dabsilo: 6,0 mg/mL
- pH buffer borato: 6,0
- Temperatura de reacción: 80°C

Por lo tanto, se utilizaron estos parámetros para realizar las posteriores derivatizaciones.

### **3. Estudio de estabilidad de las muestras de sangre venosa y sangre de cordón umbilical**

Los resultados se resumen en la Tabla N°3.



**Tabla N° 3:** Estudio de estabilidad para el fármaco Topiramato en sangre venosa y de cordón umbilical en diferentes condiciones de almacenamiento.

Almacenamiento: entre 2°C-8°C						
Concentración (µg/mL)	t cero (%)	Día 1 (%)	Día 4 (%)	Día 7 (%)	Día 11 (%)	Día 15 (%)
2	100	99,4	99,4	94,5	91,9	90,6
20	100	98,7	93,0	95,3	93,8	90,8
40	100	99,8	97,2	95,1	94,4	91,7
Almacenamiento: Temperatura ambiente, protegida de la luz						
Concentración (µg/mL)	t cero (%)	Día 1 (%)	Día 4 (%)	Día 7 (%)	Día 11 (%)	Día 15 (%)
2	100	97,3	93,9	97,5	96,1	87,9
20	100	93,0	94,1	90,4	89,4	89,9
40	100	97,5	96,2	96,0	85,2	84,5
Almacenamiento: Temperatura ambiente, sin protección de la luz						
Concentración (µg/mL)	t cero (%)	Día 1 (%)	Día 4 (%)	Día 7 (%)	Día 11 (%)	Día 15 (%)
2	100	99,7	95,1	99,9	85,4	86,5
20	100	94,7	98,9	97,7	102,8	99,5
40	100	97,9	101,8	100,9	96,0	103,3

Con los valores obtenidos se puede observar una buena estabilidad de las muestras almacenadas en condiciones de refrigeración, según parámetros aceptables para líquidos biológicos (valor límite un 10% de degradación)<sup>64</sup>. Las muestras a temperatura ambiente presentan

inestabilidad en las determinaciones realizadas, posiblemente por degradación del fármaco dabsilado (unido al agente derivatizante) o del dabsilo presente en el tubo analizado que no reaccionó con el fármaco.

#### 4. Cromatografía

##### a. Cromatografía líquida LC/DAD

##### Optimización de los parámetros cromatográficos del método por LC/DAD para las muestras de sangre venosa y sangre de cordón umbilical

En la Figura N°6 y Figura N°7 se observan las cartas de Pareto obtenidas para el parámetro analizado Altura y Pureza respectivamente. Para el parámetro altura, no se encontraron variables significativas. Para pureza, las variables significativas son pH de la fase móvil, temperatura de la columna y la interacción de las variables pH de la fase móvil y flujo de la fase móvil. Las respuestas fueron analizadas maximizando el valor altura y minimizando el valor pureza.

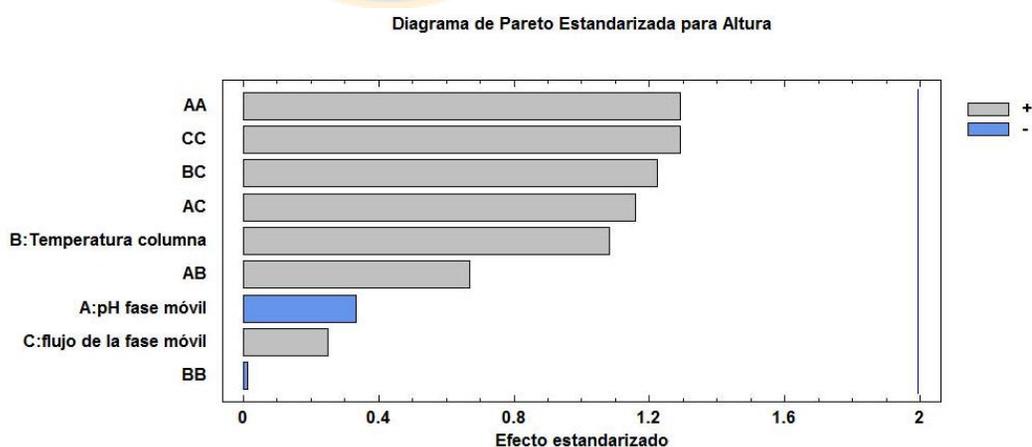
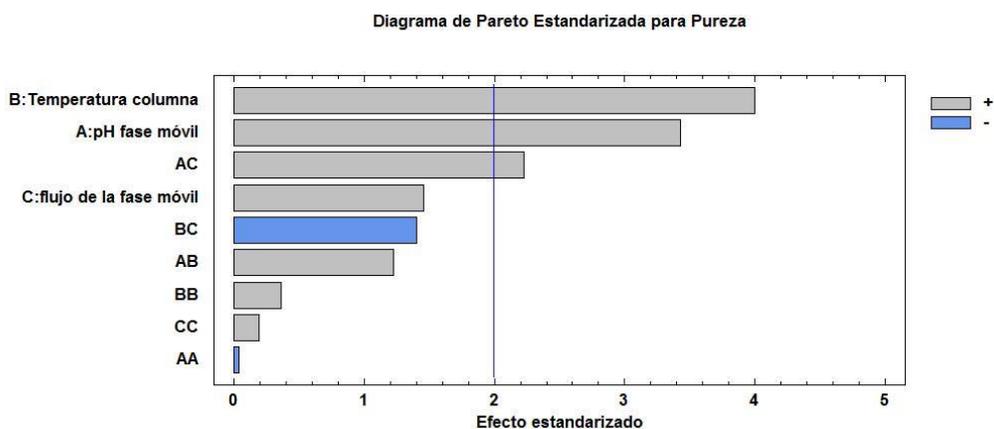


Figura N°6: Carta de Pareto para la optimización cromatográfica de la respuesta analizada Altura del pico cromatográfico.



**Figura N°7:** Carta de Pareto para la optimización cromatográfica de la respuesta analizada Pureza del pico cromatográfico.

Según cada respuesta analizada, se obtuvieron diferentes valores óptimos del diseño, los que se resumen en la Tabla 4.

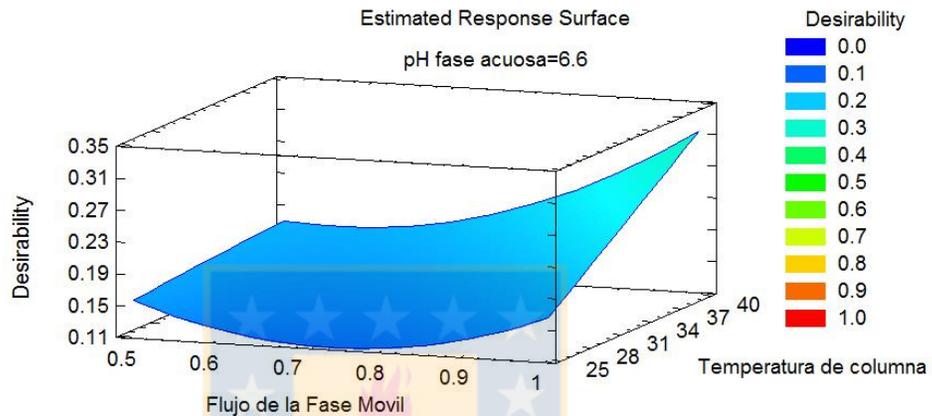
**Tabla N° 4:** Valores óptimos para la respuesta “Altura” y “Pureza” del pico cromatográfico.

	Altura del pico cromatográfico	Pureza del pico cromatográfico
Flujo de la fase móvil	1 mL/min	0,5 mL/min
pH de la fase móvil	6,6	6,6
Temperatura de la columna	40°C	25°C

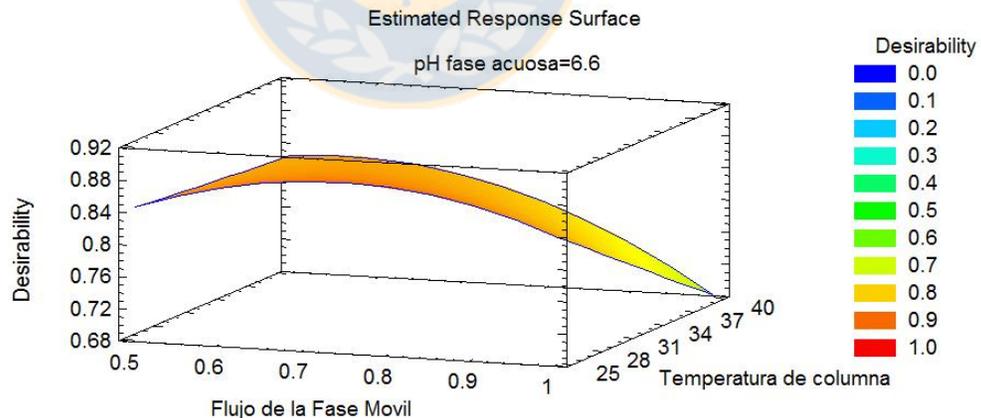
Según las respuestas encontradas, se seleccionaron como parámetros cromatográficos finales:

- Flujo de la fase móvil: 1,0 mL/min
- pH de la fase móvil: 6,6
- Temperatura de la columna: 32,5 °C

En la Figura N°8, se observa el diagrama de superficie de respuesta para la altura, en donde con pH 6,6, la mayor respuesta se observa al aumentar la temperatura de la columna y el flujo de la fase móvil. Por otra parte, en la Figura N°9 se observa el diagrama de superficie de respuesta para pureza, donde con pH 6,6, la mejor respuesta se observa a menor temperatura de la columna y un flujo entre 0,5 y 0,8 mL/min de fase móvil.



**Figura N°8:** Superficie de respuesta para la optimización de los parámetros cromatográficos para la respuesta altura.



**Figura N°9:** Superficie de respuesta para la optimización de los parámetros cromatográficos para la respuesta pureza.

De los tres parámetros analizados, para la temperatura de la columna se seleccionó un valor intermedio entre ambos valores óptimos. A pesar de que en la respuesta pureza se obtienen mejores resultados disminuyendo el flujo

de la fase móvil, se prefirió aumentar el flujo para obtener un cromatograma en un menor tiempo.

La sumatoria de ambas variables seleccionadas, altura y pureza, dio como resultado cromatogramas con platos teóricos (N) entre 3817 y 4017 y un factor de cola (T) entre 0.95 y 1.04, respectivamente. Además, la resolución obtenida dio un promedio de 5.21 en las determinaciones del diseño de experimento.

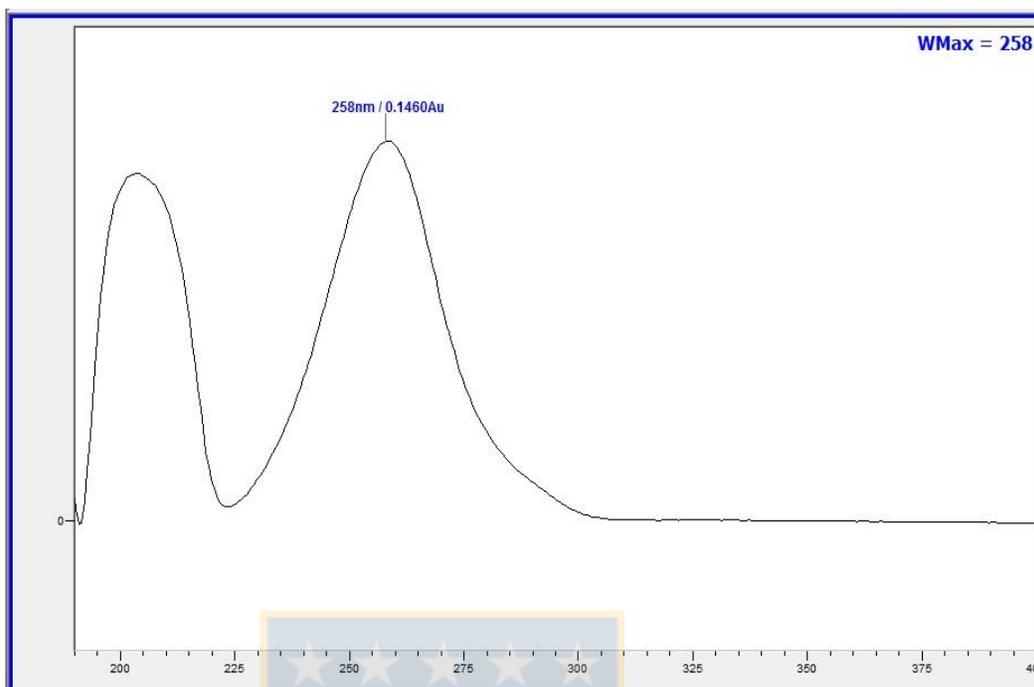
Por todo lo expuesto anteriormente, es que se utilizaron las variables seleccionadas para los análisis posteriores.

#### **b. Selección de la fase móvil**

Para la selección de la fase móvil se hizo una revisión bibliográfica considerando las condiciones experimentales del laboratorio, el detector utilizado y la posibilidad de acceso a los diferentes solventes. Se comenzó el estudio con fase móvil acetonitrilo (100%) y adicionando buffer acetato (2 mM a pH 6,6) en forma creciente para observar su efecto en la separación cromatográfica: 90:10 v/v, 80:20 v/v, 70:30 v/v y 60:40 v/v. Se seleccionó este último donde se observa una buena separación del pico cromatográfico de Topiramato del pico del agente derivatizante cloruro de dabsilo con una adecuada forma del pico cromatográfico:  $N = 3655$  y  $T = 1,08$ .

#### **c. Selección de la longitud de onda de trabajo**

La longitud de onda de trabajo para Topiramato en muestras de sangre venosa y sangre de cordón umbilical se determinó en 258 nm luego de un barrido espectral entre 190 y 400 nm. La Figura N°10 muestra el barrido obtenido con el detector DAD.



**Figura N° 10:** Espectrograma de Topiramato. Longitud de onda de máxima absorción,  $\lambda_{\text{max}}$ : 258 nm.

#### **d. Selección del estándar interno**

Para la selección del estándar interno, se probaron diferentes estándares a una concentración de 1 mg/mL: Propanolol, Furosemida, Levodopa, Fluoxetina, Piroxicam, Ciclobenzaprina, Enalapril, Clorpromazina, Metronidazol, Loperamida, Nitrofurantoína y Amiodarona.

Para los estándares de fármacos que se probaron, los tiempos de retención se encontraron cercanos a los picos cromatográficos de cloruro de dabsilo y de glicina, o se traslapaban con éstos. Los tiempos de retención estuvieron en el rango de 0,76 a 1,2 minutos, respectivamente.

Se seleccionó como estándar interno el fármaco Amiodarona el que posee un tiempo de retención posterior al pico cromatográfico de Topiramato.

#### e. Parámetros de validación para la matriz: sangre venosa.

Los parámetros fueron validados según las normas ICH<sup>65</sup>.

- **Rango:** El rango de trabajo para la cuantificación de Topiramato en muestras de sangre venosa fue de 2,0 a 40,0 µg/mL.
- **Linealidad:** Para linealidad, en la Figura N°11 se muestra el gráfico de razón de áreas Topiramato/Estándar interno vs Concentración de Topiramato. Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,995 y un coeficiente de determinación de 0,991, respectivamente.

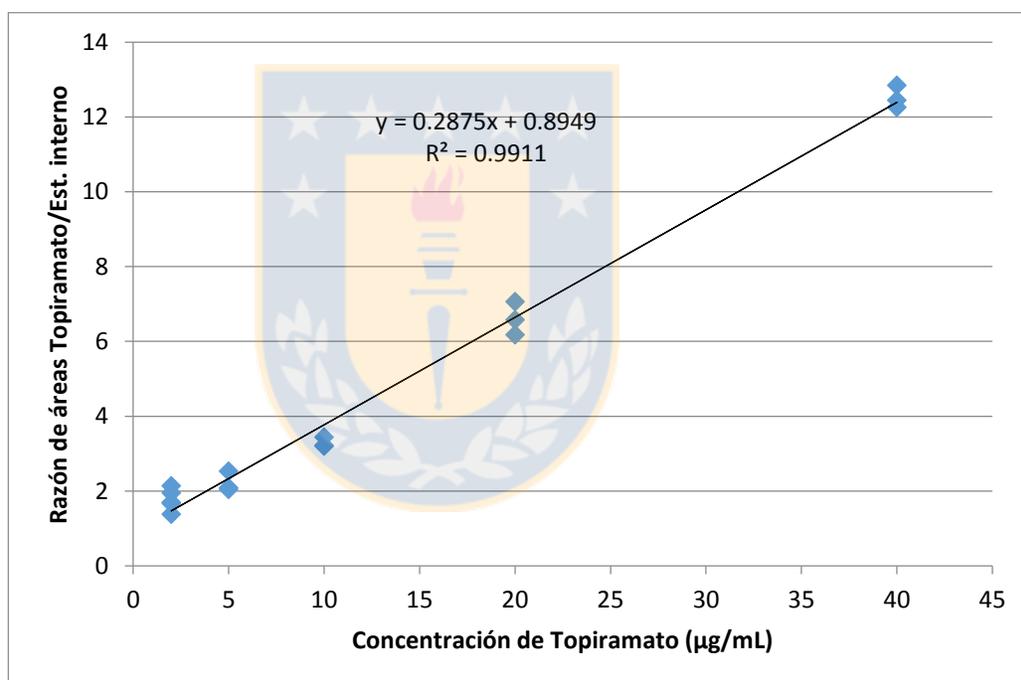


Figura N° 11: Gráfico de Linealidad para topiramato en la matriz sangre venosa.

Se realizó un análisis estadístico ANOVA para corroborar la relación lineal. La concentración de Topiramato y el área del pico cromatográfico están relacionadas linealmente con un  $p < 0,005$ . El método es lineal en el rango seleccionado para sangre venosa.

- **Selectividad:** Para el parámetro selectividad se realizaron pruebas en matriz blanco. En la Figura N°12 se observa el cromatograma de sangre venosa blanco. La matriz fue sometida al proceso de extracción y derivatización. No se observan mayores interferentes en la matriz.

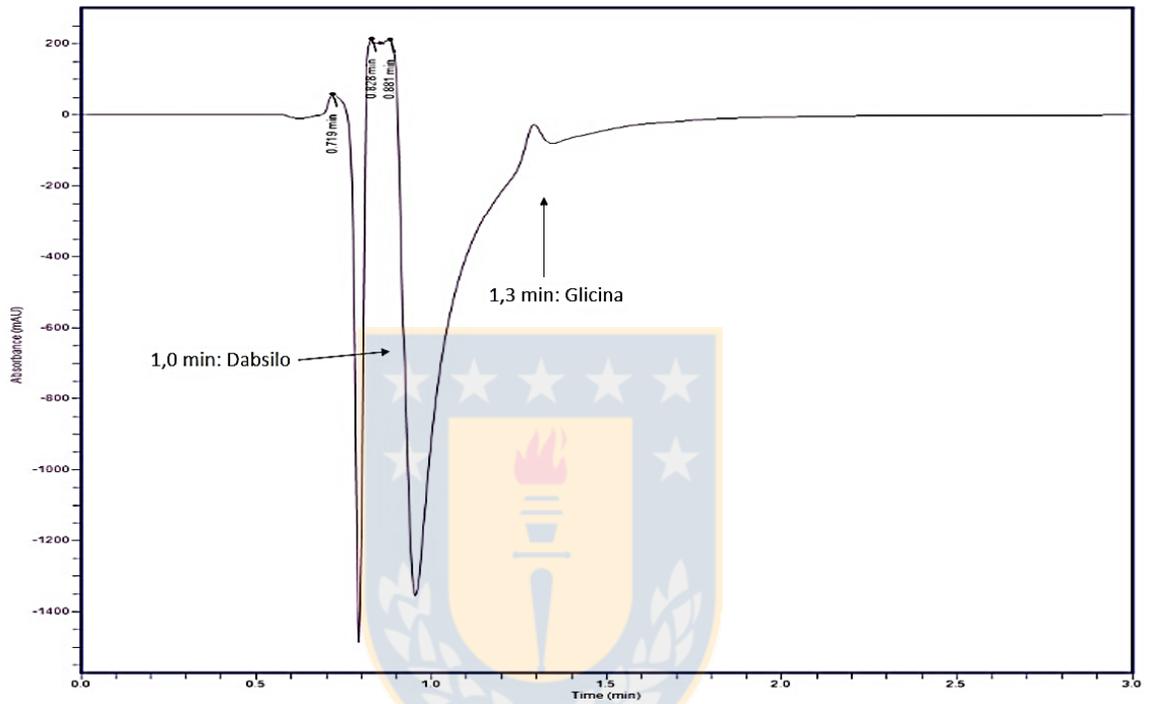


Figura N°12: Cromatograma para sangre venosa blanco.

En el cromatograma se puede observar un pico negativo correspondiente a cloruro de dabsilo. Luego en el minuto 1,3 se observa un pico correspondiente a glicina.

Las pruebas realizadas con fenitoína y carbamazepina muestran un tiempo de retención similar a cloruro de dabsilo, por lo que en esta metodología no es posible cuantificar dichos fármacos en la matriz, aunque si estuvieran presentes en el tratamiento farmacológico no producirían interferencias para Topiramato y su estándar interno.

Para la selectividad se utilizó el estándar interno Amiodarona, lo que dio un valor de  $R_s = 5,06$ . En la Figura N°13 se muestra el

cromatograma para Topiramato y su estándar interno Amiodarona (10  $\mu\text{g/mL}$ ) para una concentración de Topiramato de 20  $\mu\text{g/mL}$ .

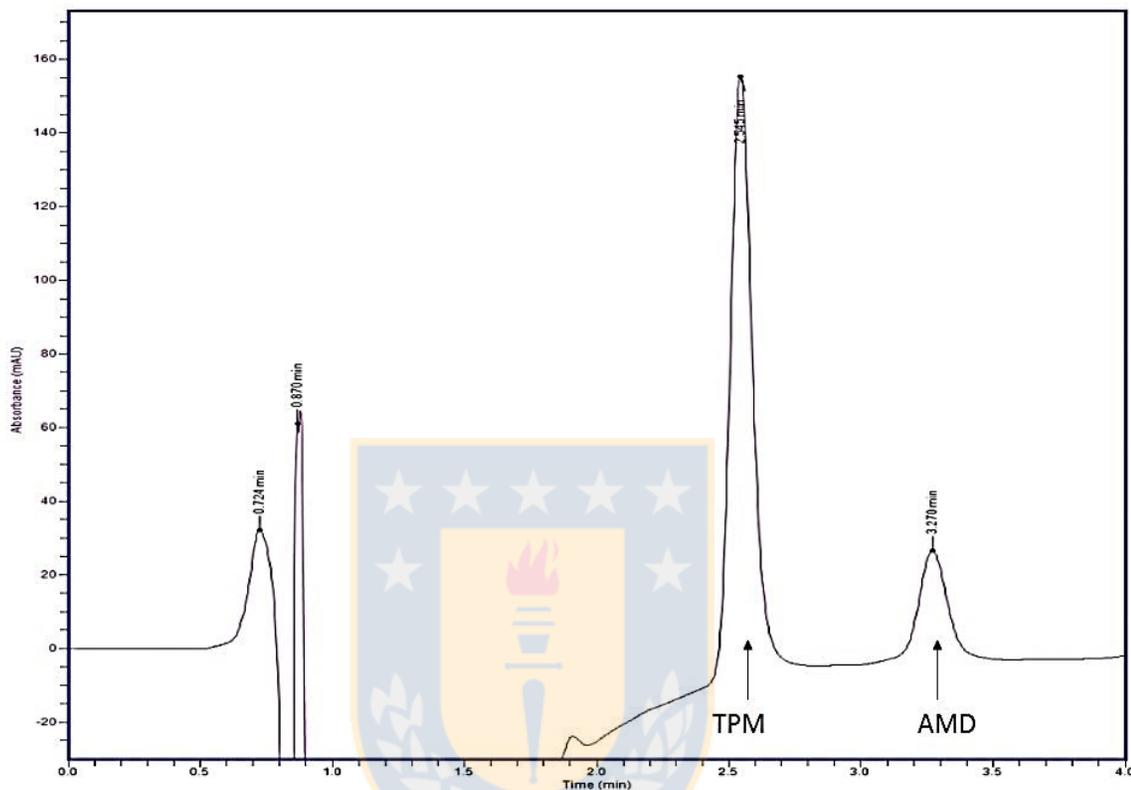


Figura N° 13: Cromatograma para Topiramato (TPM) 20  $\mu\text{g/mL}$  y su estándar interno Amiodarona (AMD).

Con los parámetros seleccionados se obtuvo una corrida cromatográfica de 3 a 4 minutos. A diferencia de otros métodos descritos en sangre venosa para Topiramato, una corrida de 3 a 4 minutos representa una ventaja frente a otras metodologías validadas con mayores tiempos de retención, por GC<sup>45, 46</sup>, HPLC-UV<sup>47</sup> o HPLC/MS-MS<sup>51, 53, 55, 56</sup>.

- **Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ):** La cuantificación de tres soluciones de Topiramato de cada concentración, por triplicado, dio como resultado un límite de detección

de 0,44 µg/mL y un límite de cuantificación de 1,34 µg/mL, respectivamente. Los valores obtenidos permiten cuantificar muestras en sangre venosa con alta sensibilidad, considerando las concentraciones plasmáticas y séricas descritas en bibliografía para el fármaco Topiramato.

- **Precisión:** Los valores obtenidos se muestran en la Tabla N° 5.

Tabla N° 5: Estudio de precisión para el fármaco Topiramato en la matriz sangre venosa.

Concentración (µg/mL)	RSD Intra-ensayo Repetibilidad	RSD Inter-ensayo Precisión intermedia
2,0	0,85	1,52
10,0	0,64	1,86
40,0	1,22	0,57

Para la precisión en líquidos biológicos, el valor esperado no debe exceder el 15% de la desviación estándar relativa excepto para el límite inferior de cuantificación, donde no debe exceder el 20%<sup>64</sup>.

Los valores de precisión obtenidos se encuentran dentro de los rangos establecidos para matrices biológicas con un RSD menor a 1,86, respectivamente.

- **Exactitud:** Los valores obtenidos se muestran en la Tabla N° 6.

Tabla N° 6: Estudio de exactitud para el fármaco Topiramato en la matriz sangre venosa.

Intra-ensayo			
Concentración real (µg/mL)	Concentración medida (µg/mL)	Recuperación (%)	RSD
2,0	1,91 ± 0,33	94,95	0,35
10,0	11,10 ± 0,04	110,96	0,05
40,0	39,71 ± 0,03	99,26	0,03
Inter-ensayo			
Concentración real (µg/mL)	Concentración medida (µg/mL)	Recuperación (%)	RSD
2,0	1,91 ± 0,01	93,01	0,28
10,0	11,41 ± 0,01	109,83	0,03
40,0	39,79 ± 0,01	99,29	0,01

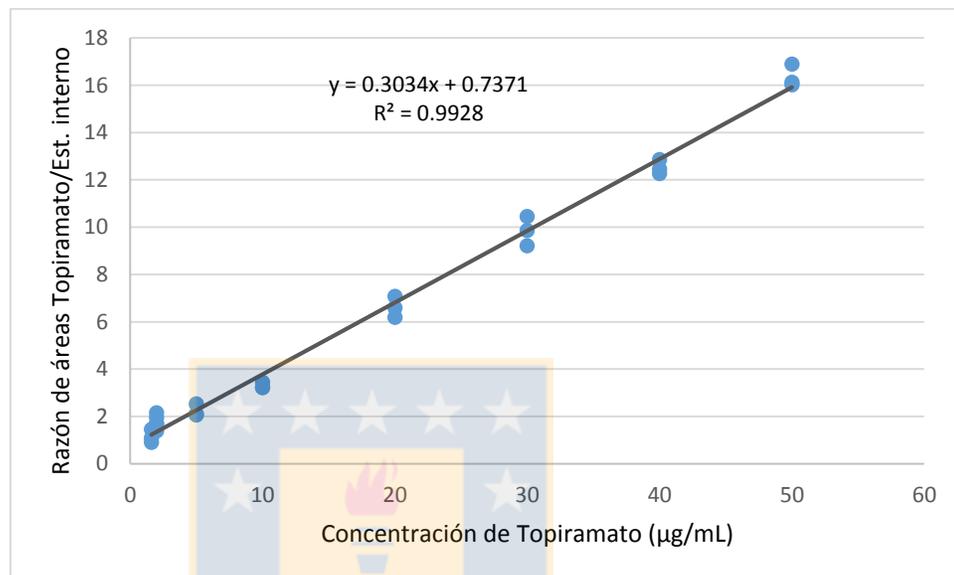
Para la exactitud, los porcentajes de recuperación deben encontrarse dentro del 15% del valor nominal, excepto en el límite inferior de cuantificación donde no debe desviarse más de un 20%<sup>64</sup>.

Los valores de exactitud obtenidos se encuentran dentro de los rangos establecidos para matrices biológicas con un RSD inferior a 0,35. El porcentaje de recuperación del fármaco desde la matriz se encuentra entre 93 y 110%, respectivamente.

**f. Parámetros de validación para la matriz: sangre de cordón umbilical**

- **Rango:** El rango de trabajo para la cuantificación de Topiramato en muestras de sangre de cordón umbilical fue de 1,6 a 50 µg/mL. La diferencia de rango fue determinada por las características de cada matriz y la revisión bibliográfica realizada. Los estudios fueron hechos por separado para cada matriz, a pesar de que ambas corresponden a sangre, ya que cada una posee diferentes características y pueden poseer interferentes propios.

- **Linealidad:** En la Figura N°14, se observa el gráfico de razón de áreas de Topiramato y su estándar interno versus la concentración de Topiramato. Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,996 y un coeficiente de determinación de 0,993, respectivamente.



**Figura N°14:** Gráfico de Linealidad para topiramato en la matriz sangre de cordón umbilical.

Se realizó un análisis estadístico ANOVA para corroborar la relación lineal. La concentración de Topiramato y el área del pico cromatográfico están relacionadas linealmente con un  $p < 0,005$ . El método es lineal en el rango seleccionado.

- **Selectividad:** Para el parámetro selectividad se realizaron pruebas en matriz blanco. En la Figura N°15 se observa el cromatograma de sangre de cordón umbilical blanco. La matriz fue sometida al proceso de extracción y derivatización. No se observan mayores interferentes en la matriz. Pudieran encontrarse en la matriz sustancias como hormonas y otras administradas en el parto, pero no fue posible en este estudio acceder a estándares de éstos.

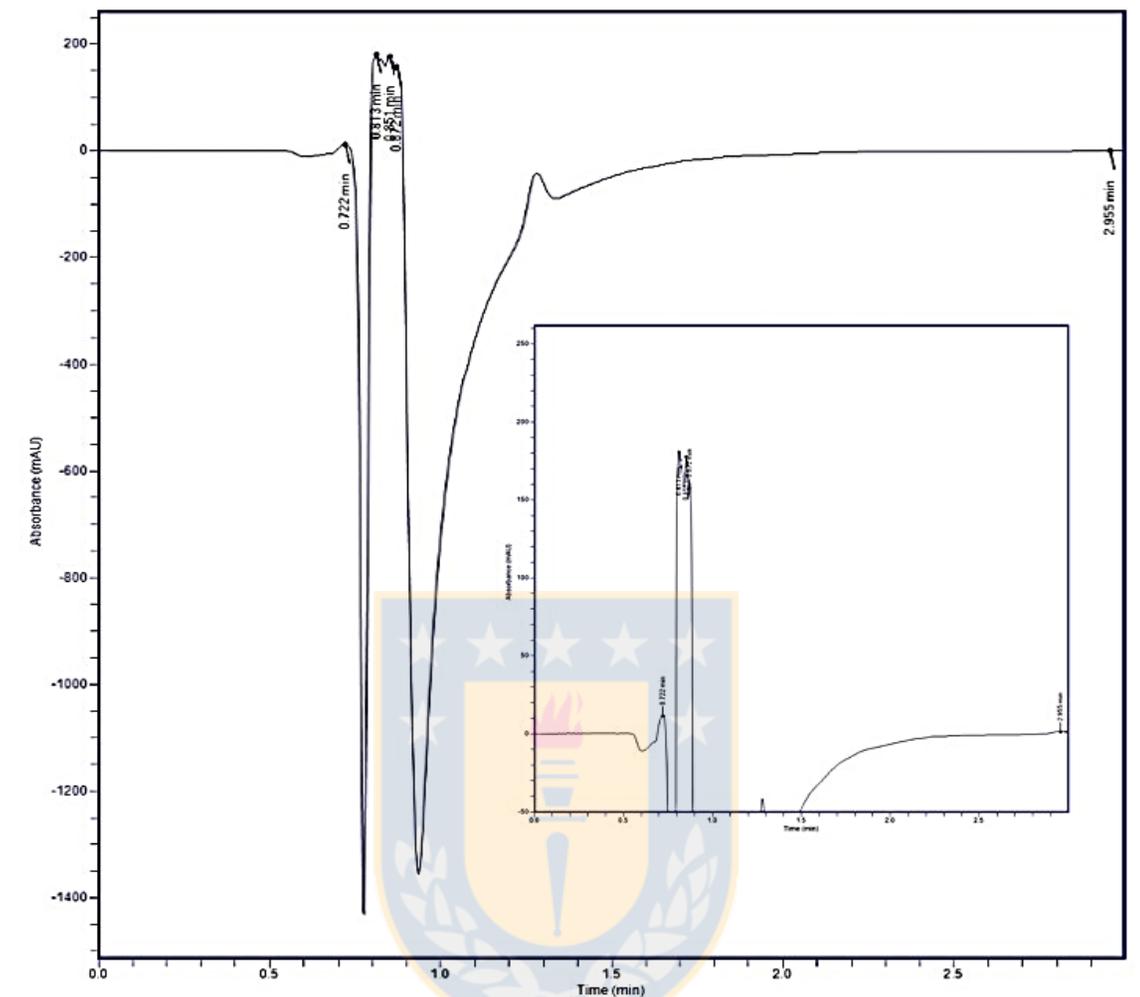


Figura N°15: Cromatograma para sangre de cordón umbilical blanco.

Al igual que en la matriz sangre venosa, en el cromatograma se puede observar un pico negativo correspondiente a cloruro de dabsilo y otro a 1,3 minutos, correspondiente a glicina.

- **Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ):** La cuantificación de tres soluciones de Topiramato de cada concentración, por triplicado, dio como resultado un límite de detección de 0,39  $\mu\text{g/mL}$  y un límite de cuantificación de 1,18  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Los valores obtenidos permiten cuantificar muestras en sangre de cordón

umbilical, considerando las concentraciones descritas en bibliografía para el fármaco.

Los valores de límite de detección y cuantificación en ambas matrices (sangre venosa y sangre de cordón umbilical) son similares, pero se realizan en diferentes estudios por la selección del rango justificado anteriormente.

- **Precisión:** Los valores obtenidos se muestran en la Tabla N° 7.

Tabla N° 7: Estudio de precisión para el fármaco Topiramato en la matriz sangre de cordón umbilical.

Concentración µg/mL	RSD Intra-ensayo Repetibilidad	RSD Inter-ensayo Precisión intermedia
1,6	3,44	3,38
20,0	1,86	3,58
50,0	0,33	3,73

En comparación con los valores obtenidos en sangre venosa, en este estudio las desviaciones estándares relativas son mayores. Esto pudiera ser explicado por la diferente constitución de las matrices.

Los valores de precisión obtenidos se encuentran dentro de los rangos establecidos para matrices biológicas<sup>64</sup> con un RSD menor a 3,73.

- **Exactitud:** Los valores obtenidos se muestran en la Tabla N° 8.

**Tabla N° 8:** Estudio de exactitud para el fármaco Topiramato en la matriz sangre de cordón umbilical.

Intra-ensayo			
Concentración real (µg/mL)	Concentración medida (µg/mL)	Recuperación (%)	RSD
1,6	1,69 ± 0,05	105,73	0,11
20	19,30 ± 0,02	96,49	0,11
50	49,60 ± 0,01	99,19	0,04
Inter-ensayo			
Concentración real (µg/mL)	Concentración medida (µg/mL)	Recuperación (%)	RSD
1,6	1,67 ± 0,04	104,51	0,03
20	19,88 ± 0,02	99,42	0,04
50	50,04 ± 0,01	100,09	0,04

Los valores de exactitud obtenidos se encuentran dentro de los rangos establecidos para matrices biológicas<sup>64</sup>. El porcentaje de recuperación del fármaco desde la matriz se encuentra entre un 96 y 105%.

## 5. Cromatografía en capa fina de alta eficiencia HPTLC

Como se mencionó anteriormente, la leche materna posee diferentes componentes, los que pueden tapar o dañar fase estacionaria de la columna cromatográfica, a pesar de su procesamiento y extracción del fármaco desde la matriz. Es por esto que se utilizó la técnica de HPTLC para la validación del fármaco Topiramato en leche materna. La fase estacionaria es descartable, lo que no daña ni afecta al equipo y permite la cuantificación con buena selectividad y sensibilidad.

### a. Selección de la fase móvil

Se ensayaron diferentes proporciones de fase móvil tolueno: etanol (v/v). En la Figura N°16 se muestran los picos cromatográficos para Topiramato en las diferentes proporciones de fase móvil. Se

seleccionó la proporción 25:10 (v/v) por la mejor ubicación del Rf en la placa cromatográfica.

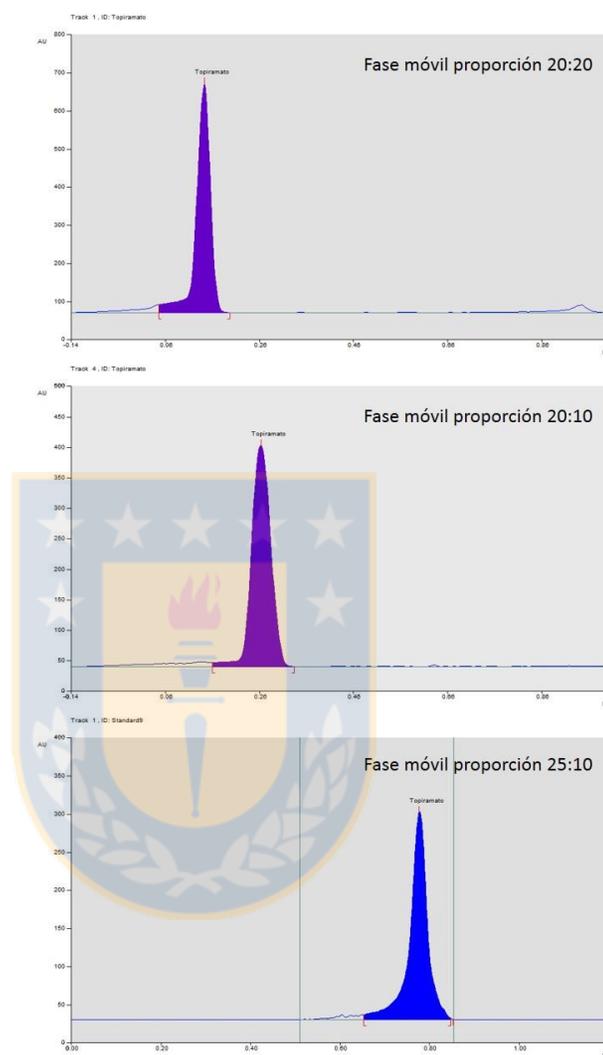


Figura N°16: Selección de la proporción de la fase móvil para la matriz leche materna.

**b. Selección de la longitud de onda de trabajo**

La longitud de onda de trabajo para Topiramato en la matriz leche materna, fue seleccionada en 326 nm luego de un barrido espectral entre 200 y 700 nm. La Figura N°17 muestra el barrido obtenido del

topiramato derivado, obtenido de la placa sumergida en ninhidrina como agente derivatizante.

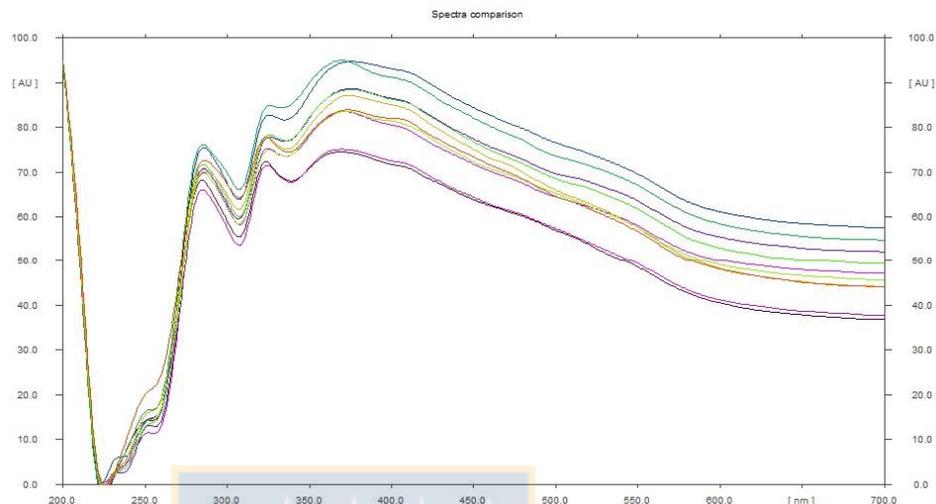


Figura N°17: Espectrograma del Topiramato derivatizado con Ninhidrina. Longitud de onda de trabajo seleccionada  $\lambda_{\text{trabajo}}$ : 326 nm.

### c. Selección del estándar interno

Para la selección del estándar interno, se probaron diferentes estándares a una concentración de 1 mg/mL: Metoclopramida, Amiodarona, Ciclobenzaprina y Clorpromazina. Los fármacos fueron descartados por diferentes razones: no se mueve de la siembra, se va con el frente de solvente o el pico obtenido es asimétrico.

Finalmente se utilizó como estándar interno el fármaco clorpromazina a una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$ .

### d. Parámetros de validación para la matriz leche materna

- **Rango**: El rango de trabajo para la cuantificación de Topiramato en la matriz leche materna fue de 1,2 a 50  $\mu\text{g/mL}$ . Existe poca información sobre valores y metodologías validadas para Topiramato leche materna y el rango fue seleccionado según los datos bibliográficos.

- **Linealidad:** Para la linealidad se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,991 y un coeficiente de determinación de 0,983, respectivamente. En la Figura N°18 se observa el gráfico de linealidad para Topiramato en leche materna para los 8 puntos descritos en la metodología.

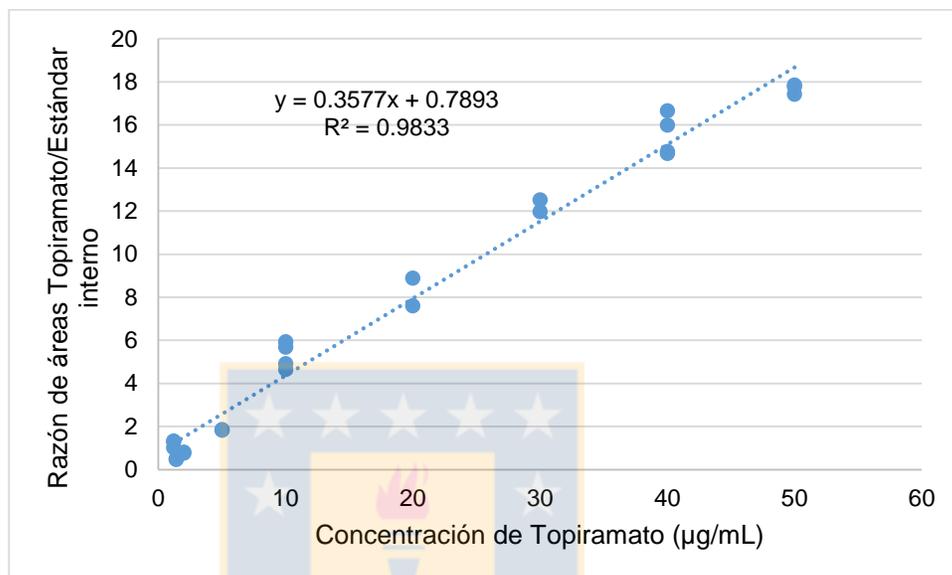
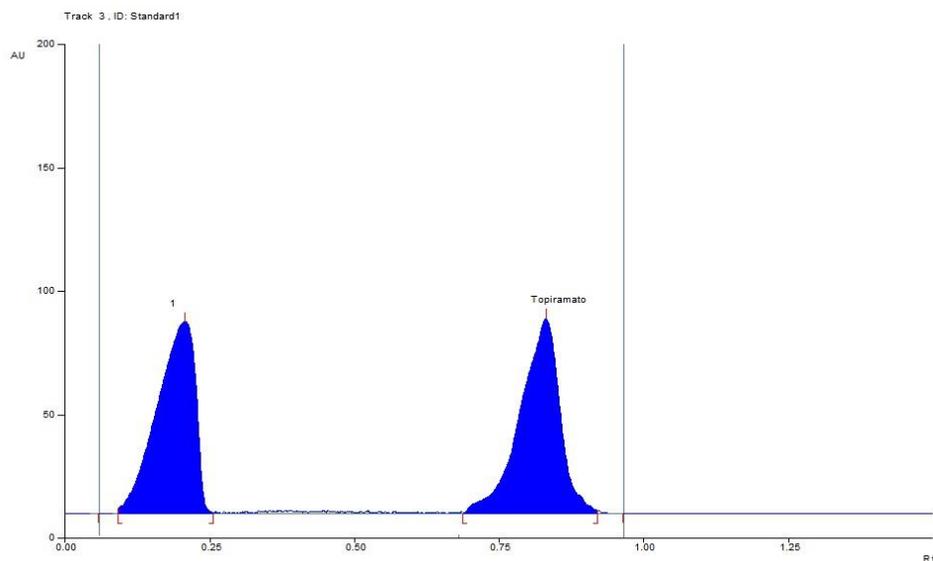


Figura N° 18: Gráfico de Linealidad para topiramato en la matriz leche materna.

Se realizó un análisis estadístico ANOVA para corroborar la relación lineal. La concentración de Topiramato y el área del pico cromatográfico están relacionadas linealmente con un  $p < 0,005$ . El método es lineal en el rango entre 1,2 a 50 µg/mL.

- **Selectividad:** Para la selectividad al igual que en las matrices anteriores, se ensayaron estándares de Fenitoína y Carbamazepina a concentración de 1 mg/mL. Ambos fármacos se van con el frente de solvente, por lo que no es posible cuantificarlos junto al fármaco topiramato en esta metodología.

Finalmente la selectividad se prueba con el estándar interno clorpromazina, dando un valor  $R_s = 5.2$ . En la Figura N°19 se presenta el densitograma para Topiramato (20 µg/mL) y su estándar interno.



**Figura N°19:** Densitograma para Topiramato y su estándar interno Clorpromazina.

Al igual que en las matrices anteriores, se realizaron pruebas en matriz blanco. La matriz presentó niveles de ruido que no afectan la cuantificación del fármaco.

- **Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ):** El límite de detección fue de 0,34  $\mu\text{g/mL}$  y el límite de cuantificación fue de 1,04  $\mu\text{g/mL}$ . Con estos valores de límite de detección y cuantificación es posible realizar mediciones en la matriz leche materna, con un buen nivel de sensibilidad.
- **Precisión:** Los valores obtenidos para precisión se resumen en la Tabla 9.

**Tabla N° 9:** Estudio de precisión para el fármaco Topiramato en la matriz leche materna.

Concentración $\mu\text{g/mL}$	RSD Intra-ensayo Repetibilidad	RSD Inter-ensayo Precisión intermedia
1,2	3,04	3,46
10,0	3,10	1,81
50,0	3,14	4,10

Los valores de RSD obtenidos, son superiores en comparación a las otras dos matrices, sin embargo, se encuentran dentro de los rangos establecidos para matrices biológicas<sup>64</sup>.

- **Exactitud:** Los valores obtenidos para el parámetro exactitud se resumen en la Tabla N° 10.

Tabla N°10: Estudio de exactitud para el fármaco Topiramato en la matriz leche materna.

Intra-ensayo			
Concentración real (µg/mL)	Concentración medida (µg/mL)	Recuperación (%)	RSD
1,2	1,34 ± 0,07	109,51	0,41
10,0	10,40 ± 0.01	101,65	0,01
50,0	49,96 ± 0.03	101,97	0,04
Inter-ensayo			
Concentración real (µg/mL)	Concentración medida (µg/mL)	Recuperación (%)	RSD
1,2	1,35 ± 0,50	105,14	0,30
10,0	11,21 ± 0,09	108,47	0,08
50,0	50,93 ± 0,05	101,90	0,04

Los valores de exactitud obtenidos se encuentran dentro de los rangos establecidos para matrices biológicas<sup>64</sup>.

## CONCLUSIONES

Se estableció para cada matriz biológica (sangre venosa, sangre de cordón umbilical y leche materna) los procedimientos de extracción, derivatización y cuantificación para el fármaco Topiramato.

En relación a la estabilidad, las muestras extraídas y derivatizadas del fármaco Topiramato para la matriz sangre venosa y sangre de cordón umbilical, son estables dentro del rango de 15 días a temperatura entre 2 y 6°C, respectivamente.

Para cada matriz se validó su metodología según las normas ICH utilizando las técnicas de HPLC/DAD y HPTLC.

Las metodologías fueron selectivas, precisas, exactas y sensibles para la cuantificación del fármaco Topiramato en sangre venosa, sangre de cordón umbilical y leche materna. Éstas se encontrarán disponibles para su posterior uso en estudios de determinación de las concentraciones del fármaco en mujeres embarazadas, sus bebés/lactantes y se podrán correlacionar sin necesidad de la extracción de sangre del bebé/lactante.

## BIBLIOGRAFÍA:

1. Guía Clínica Epilepsia en el Adulto [Internet] Gobierno de Chile, Ministerio de Salud. Serie Guías Clínicas Minsal Disponible en: <http://web.minsal.cl/portal/url/item/95542bbbc250eeb8e04001011f01678c.pdf> Acceso 24-03-2014; 2009.
2. Epilepsias, Tipos de Epilepsias [Internet] Disponible en: <http://www.ligaepilepsia.cl/epilepsias/tipos-de-epilepsia> Acceso 10-03-2014; 2014.
3. Campos M, Kanner, A. Epilepsias. Diagnóstico y Tratamiento. Santiago, Chile: Editorial Mediterráneo; 2004. 895 p.
4. Epilepsia [Internet] World Health Organization -OMS-; Octubre 2012. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/es/> Acceso: 25-01-2015.
5. Epilepsia [Internet] World Health Organization -OMS-. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/es/> Acceso: 21-03-2014; 2013.
6. Jeldres E, Devilat, M., Peralta, S., et al. Comorbilidad en niños con epilepsia. Revista Chilena de Epilepsia. 2010; 2: 19-28.
7. Garcia A, Blanco, R., Ballesteros, R., et al. Influencia de la comorbilidad médica y neuropsiquiátrica en la evolución de la epilepsia infantil. Anales de Pediatría (Barc). 2014; Article in Press <http://dx.doi.org/10.1016/j.anpedi.2014.02.016>
8. Karceski S. Don't Get Fooled by Misleading Serum Levels of Antiepileptic Medications [Internet] Disponible en: <http://columbiaepilepsy.org/docs/patients/PN0805Epilepsy.pdf> Acceso 08-04-2014.
9. Krauskopf V, De la Barra, F. Trastornos Psiquiátricos en los pacientes con epilepsia. Revista Médica Clínica las Condes. 2013; 24 (6): 979-85.
10. St. Louis E. Monitoring Antiepileptic Drugs: A Level-Headed Approach. Current Neuropharmacology. 2009; 7 (2): 115-9.

11. Aldaz A, Ferriols, R., Aumente, D., et al. Monitorización farmacocinética de antiepilépticos. *Farmacia Hospitalaria*. 2011; 35 (6): 326-39.
12. Krasowski M. Antiepileptic drugs: Therapeutic Drug Monitoring of the Newer Generation Drugs. *Clinical Laboratory News*. 2013; 39 (6).
13. Pennell P. Pregnancy in the Woman with Epilepsy: Maternal and Fetal Outcomes. *Seminars in Neurology*. 2002; 22 (3): 299-307.
14. Legros B, Bottin, P., De Borchgrave, V., et al. Therapeutic issues in women with epilepsy. *Acta Neurologica Belgica*. 2003;103: 135-9.
15. Reimers A, Brodtkorb, E. Second-generation antiepileptic drugs and pregnancy: a guide for clinicians. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2012; 12 (6):707-17.
16. Öhman I, Vitols, S., Luef, G., et al. Topiramate Kinetics during Delivery, Lactation, and in the Neonate: Preliminary Observations. *Epilepsia (International League Against Epilepsy)*. 2002; 43 (10): 1157-60.
17. Chang JP, R. Tratamiento antiepiléptico durante el embarazo. *Neuroeje*. 2011; 24 (2): 27-32.
18. Öhman I, Vitols, S., Tomson, T. Pharmacokinetics of Gabapentin during Delivery, in the Neonatal Period, and Lactation: Does a Fetal Accumulation Occur during Pregnancy? *Epilepsia (International League Against Epilepsy)*. 2005; 46 (10): 1621-4.
19. Yerby M. Clinical Care of Pregnant Women with Epilepsy: Neural Tube Defects and Folic Acid Supplementation. *Epilepsia (International League Against Epilepsy)*. 2003; 44 (Suppl. 3): 33-40.
20. Chen L, Liu, F., Yoshida, S., et al. Is breast-feeding of infants advisable for epileptic mothers taking antiepileptic drugs? *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 2010; 64: 460-8.
21. Sethi N, Wasterlain, A., Harden, C. Pregnancy and epilepsy- When you're managing both. *The Journal of Family Practice*. 2010; 59 (12): 675-9.
22. Sánchez O, López, G. Manejo de fármacos durante el embarazo. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. 2011; 35: 107-13.
23. Rebordosa C, Aguilera, C. Seguridad de los fármacos antiepilépticos durante el embarazo. *Medicina Clínica (Barcelona)*. 2004; 122 (17): 675-6.

24. Ali I, Schuh, L, Barkley, G., et al. Antiepileptic drugs and reduced bone mineral density *Epilepsy & Behavior*. 2004; 5: 296-300.
25. Pack A, Morrel, M. Epilepsy and bone health in adults. *Epilepsy & Behavior*. 2004; 5: S24-S9.
26. Pack A. Bone health in people with epilepsy: Is it impaired and what are the risk factors? *Seizure (British Epilepsy Association)*. 2008; 17: 181-6.
27. Heo K, Rhee, Y., Lee, HW., et al. The effect of topiramate monotherapy on bone mineral density and markers of bone and mineral metabolism in premenopausal women with epilepsy. *Epilepsia (International League Against Epilepsy)*. 2011; 52 (10): 1884-9.
28. Gutiérrez A, Velásquez, A., Herrera, D. Enfermedad ósea asociada al uso de antiepilépticos: La buscan los neurólogos? *Acta Neurológica Colombiana*. 2008; 24: 174-82.
29. Davanzo R, Dal Bo, S., Bua, J., et al Antiepileptic drugs and breastfeeding. *Italian Journal of Pediatrics*. 2013; 39 (50): 1-11.
30. Lawrence R., Lawrence Robert., Breastfeeding: A Guide for the Medical Profession. Elsevier Health Sciences, Octava Edición, USA, 2015, 992 p.
31. Wambach K., Riordan J. Breastfeeding and Human Lactation. Jones & Barlett Publishers, Quinta Edición, 2014, 936 p.
32. Kaneko S, Sato, T., Suzuki, K. The Levels of Anticonvulsants in Breast Milk. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1979; Letters to the Editors: 624-7.
33. Perucca E. A Pharmacological and Clinical Review on Topiramate, a New Antiepileptic Drug. *Pharmacological Research*. 1997; 35 (4): 241-55.
34. Mc Evoy, G. AHFS 2012: American Society of Health System of Pharmacists, Bethesda, 2012, 3822 p.
35. Moffat, A., Osselton, M., Widdop, B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 4° Edición, Pharmaceutical Press, Londres, 2011, Volumen 2, 2609 p.
36. Drug Bank [Internet] Topiramate. Disponible en: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00273> Acceso 16-05-2016.

37. Topamax (topiramate): Label change risk for development of cleft lip and/or cleft palate in newborns [Internet] Disponible en: <http://www.fda.gov/safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm245777.htm> Acceso 24-01-15; 2014.
38. FDA Drug Safety Podcast for Healthcare Professionals: Risk of oral clefts in children born to mothers taking Topamax (topiramate) [Internet] Disponible en: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/DrugSafetyPodcast/ucm245877.htm> Acceso: 24-01-2015; 2013.
39. Hunt SR, A. Smithson, W. et al Topiramate in pregnancy. Preliminary experience from the UK Epilepsy and Pregnancy Register. *Neurology* 2008; 71: 272-6.
40. Margulis A, Mitchell, A., Gilboa, S., et al. Use of Topiramate in pregnancy and risk of oral clefts. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2012; 207: 292: 405.e 1-7.
41. Pennell P. Antiepileptic drug pharmacokinetics during pregnancy and lactation. *Neurology* 2003; 61 (Suppl. 2): S35-S41.
42. Costa Pinto E, Danielli, M., Mendes, L., et al. Topiramate: A review of analytical approaches for biological matrices. *Biomedical Chromatography*. 2014; 29: 1461-72.
43. Hahn R, Kreutz, O., Antunes, M., et al. Determinação Simultânea de Topiramato, Carbamazepina, Fenitoína e Fenobarbital em Plasma Empregando Cromatografia a Gás com Detector de Nitrogênio e Fósforo *Química Nova*. 2013; 36 (5): 720-4.
44. Malakova J, Brozmanova, H., Vorisek, V., et al. A Capillary GC Method Using Nitrogen Phosphorus Detection for Determination of Topiramate in Patients with Epilepsy. *Chromatographia*. 2007; 66 (5/6): 363-7.
45. Tang P, Miles, M., Glauser, T., et al. An Improved Gas Chromatography Assay for Topiramate Monitoring in Pediatric Patients. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2000; 22 (2): 195-201.
46. Wolf C, Crooks, R., Poklis, A. Rapid Gas Chromatography Procedure for the Determination of Topiramate in Serum. *Journal of Analytical Toxicology*. 2000; 24: 661-3.

47. Bahrami G, Mirzaeei, Sh., Mohammadi, B., et al. High Performance liquid chromatographic determination of Topiramate in human serum using UV detection. *Journal of Chromatography B*. 2005; 822: 322-5.
48. Bahrami G, Mohammadi, B. A novel high sensitivity HPLC assay for topiramate, using 4-chloro-7-nitrobenzofurazan as pre-column fluorescence derivatizing agent. *Journal of Chromatography B*. 2007; 850: 400-4.
49. Bahrami G, Mirzaeei, Sh., Kiani, A. Sensitive analytical method for Topiramate in human serum by HPLC with pre-column fluorescent derivatization and its application in human pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B*. 2004; 813: 175-80.
50. Mercolini L, Mandrioli, R., Amore, M., et al. Simultaneous HPLC-F analysis of three recent antiepileptic drugs in human plasma. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*. 2010; 53: 62-7.
51. Britzi M, Soback, S., Isoherranen, N., et al. Analysis of Topiramate and Its Metabolites in Plasma and Urine of Healthy Subjects and Patients with Epilepsy by use of a Novel Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Assay Therapeutic Drug Monitoring. 2003; 25 (3): 314-22.
52. Mohammadi B, Tammari, E., Fakhri, S., et al. Applicability of LC-MS/MS to optimize derivatization of topiramate with FMOC-Cl using reacted/intact drug ratio. *Journal of Chromatography B*. 2013; 928: 32-6.
53. Christensen J, Hojskov, C., Poulsen, J. Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Assay for Topiramate Analysis in Plasma and Cerebrospinal Fluid: Validation and Comparison With Fluorescence-Polarization Immunoassay. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2002; 24 (5): 658-64.
54. Matar K. Therapeutic drug monitoring of Topiramate by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2010; 411: 729-34.
55. Contin M, Riva, R., Albani, F., et al. Simple and rapid liquid chromatographic-turbo ion spray mass spectrometric determination of topiramate in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2001; 761: 133-7.

56. Chen S, Carvey, P. Validation of liquid-liquid extraction followed by flow-injection negative ion electrospray mass spectrometry assay to Topiramate in human plasma. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 2001; 15: 159-63.
57. Kuchekar S, Kundlik, M., Zaware, B. Rapid and Specific Approach for Direct Measurement of Topiramate in Human Plasma by LC-MS/MS: Application for Bioequivalence Study. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine*. 2010; 2 (5): 107-12.
58. Mandrioli R, Musenga, A., Kenndler, E., et al. Determination of Topiramate in human plasma by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*. 2010; 53: 1319-23.
59. Advantages of Photodiode Array [Internet] Acceso 11-05-2016. Disponible en: [http://www.hwe.oita-u.ac.jp/kiki/ronnbunn/paper\\_choi.pdf](http://www.hwe.oita-u.ac.jp/kiki/ronnbunn/paper_choi.pdf)
60. Valcárcel M., Gómez A., Técnicas analíticas de separación, Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba, Editorial Reverté, Barcelona, 1988, 780p.
61. Derivatización [Internet] Acceso 15-05-2016, Disponible en: [http://www.cromlab.es/REAC\\_DER\\_Principal.htm](http://www.cromlab.es/REAC_DER_Principal.htm)
62. Bimal N, Singh, B. High Performance Thin Layer Chromatography: Application in Pharmaceutical Science. *Pharm Tech Medica*. 2013; 2 (4): 323-33.
63. Leche humana: Composición, beneficios y comparación con la leche de vaca [Internet] Acceso 15-05-2016. Disponible en: <http://www.unicef.cl/lactancia/docs/mod01/Mod%201beneficios%20manual.pdf>
64. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics [Internet] Acceso 10-05-2016. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf>
65. USP: Validation of Compendial Procedures [Internet] Acceso 10-05-2016. Disponible en: <https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c1225.pdf>
66. International Conference on Harmonization: Validation of Analytical Procedures [Internet] Acceso 10-05-2016. Disponible en:

[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)

67. Validación de métodos analíticos [Internet] Acceso 10-05-2016. Disponible en: [http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13\\_Modulo\\_VALIDACION\\_de\\_Metodos\\_Fisicoqcos.pdf](http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACION_de_Metodos_Fisicoqcos.pdf)
68. International Conference on Harmonization [Internet] Acceso 10-05-2016. Disponible en: <http://www.ich.org/products/guidelines.html>
70. Kmetec, V., Roskar, R. HPLC determination of tramadol in human breast milk. J Pharm Biomed Anal 2003; 32: 1061-1066



## **AGRADECIMIENTOS**

- Convenio de Desempeño Vida Saludable UCO 1201, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Laboratorio de Toxicología, Servicio Médico Legal, Concepción, Chile.



## CONSENTIMIENTO INFORMADO E INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

### PROYECTO “Determinación cuantitativa de topiramato en sangre venosa, sangre de cordón umbilical y leche materna”.

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

Con el fin de “Determinar concentraciones de Topiramato en sangre y leche materna de pacientes epilépticas embarazadas y nodrizas, como herramienta para estudios de evaluación de riesgo de daño fetal”, un grupo de investigadores de la Universidad de Concepción está estudiando las concentraciones que Topiramato alcanza en sangre y leche materna.

En que consiste/procedimientos a realizar: Para lograr el objetivo planteado, se deben validar las metodologías para cuantificar el fármaco Topiramato en cada matriz (sangre o leche materna), y así en la etapa terminal del proyecto determinar las concentraciones en pacientes epilépticas embarazadas y nodrizas en tratamiento con Topiramato.

En la validación de las metodologías, las muestras de sangre venosa o leche materna “blancos”, es decir, que no contienen Topiramato, se recargarán con estándar del fármaco. Las muestras con sangre recargada o leche materna recargada, son requeridas para completar la validación de las metodologías. Al inicio del estudio se les invitará a participar de éste.

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.

Si usted, una vez leído y explicado el consentimiento informado, acepta participar en el estudio donando leche materna, se le proporcionará un saca leche (exento de costo) para extraer la leche materna. El volumen de leche será de aproximadamente 200 mL (una taza de té normal). Los investigadores retirarán esta muestra desde su domicilio o, si lo prefiere, usted la podrá llevar a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, para lo que se le entregará un recipiente adecuado y se le explicará cómo proceder. No se tomará ninguna muestra de su hijo(a).

Su participación es voluntaria y no tiene costo.

Su participación en el estudio está prácticamente libre de riesgos, sin embargo, si algo le ocurriese como consecuencia de la toma de muestra de sangre o de leche materna, o en su desplazamiento hacia o desde el Laboratorio de Bioquímica Clínica de la Universidad con motivo de estos procedimientos, todas sus atenciones serán solventadas por el proyecto, derivándolo(a) a la instancia de salud que corresponda.

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. Como las muestras solo se utilizarán como “blanco” para recargar estándares puros del fármaco Topiramato, sólo

tendrán resultados referentes a la validación de la metodología. Las muestras obtenidas no serán bajo ninguna circunstancia, congeladas o utilizadas para otro fin que no sea el descrito en este proyecto. El estudio se realizará en base a los lineamientos de las Buenas Prácticas Clínicas.

Los resultados obtenidos en este estudio serán publicados en revistas y 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 o leche materna.

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

**Deseo participar:** SI NO

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

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

Firma solicitante consentimiento: \_\_\_\_\_

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

