



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA CUANTIFICAR
LEVETIRACETAM EN PLASMA Y SU APLICACIÓN EN UN ESTUDIO DE
BIODISPONIBILIDAD EN POBLACIÓN MEXICANA**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**



PRESENTA

ENRIQUE SEGUNDO MARTÍNEZ

MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: JUAN MANUEL RODRÍGUEZ

VOCAL: Profesor: MARIA DE LOURDES BEATRIZ MAYET CRUZ

SECRETARIO: Profesor: LUIS JESÚS GARCÍA AGUIRRE

1er. SUPLENTE: Profesor: KENNETH RUBIO CARRASCO

2° SUPLENTE: Profesor: ROBERTO CAÑAS ALONSO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INVESTIGACIÓN FARMACOLOGICA Y BIOFARMACEUTICA S.A. DE C.V.

ASESOR DEL TEMA: LUIS JESÚS GARCÍA AGUIRRE

SUPERVISOR TÉCNICO: ARACELI SALAZAR PEREYRA

SUSTENTANTE: ENRIQUE SEGUNDO MARTÍNEZ

AGRADECIMIENTOS.

Difícil agradecer de manera escrita a tantas personas que de formas tan diversas han apoyado para lograr el cumplimiento de este trabajo, ya que seguro omitiría algún nombre.

A mis padres, quien me han educado y formado, lo cual estaré eternamente agradecido y espero algún día transmitir todo lo que me proporcionaron. Jamás tendré las palabras para agradecerles tanto.

A mi hermana, mi compañía eterna, mi consejera y mi ejemplo a seguir.

A mi tío José Luis Martínez quien siempre ha inculcado la unión familiar y una mentalidad de superación personal. Y a toda mi familia quienes son los cimientos de mi vida.

Al M. en F. Luis Jesús García y la M. en F. Liz Medina por permitir ganarme la oportunidad de trabajar con ellos y ser los constructores de este trabajo.

A la M. en C. Araceli Salazar, quien fue la parte intelectual de este trabajo y quien me enseñó a aplicar los conocimientos de mi educación, pero sobre todo por ser una gran profesional y amiga.

Al todo los miembros del jurado por su tiempo y paciencia para la revisión de este trabajo.

A mis amigos en IFaB, quienes me apoyan, me regañan y me aconsejan. Y a todos mis amigos de la facultad, me es complicado enlistar nombres, ya que todos han sido importantes y no quiero olvidar a alguno. Gracias por todo...

INDICE

INDICE DE TABLAS.	9
INDICE DE FIGURAS.	10
ABREVIATURAS.....	11
1.0. RESUMEN.	13
2.0. OBJETIVOS.	15
3.0. INTRODUCCIÓN.	16
3.1. Epilepsia	16
3.1.1. Clasificación	16
3.1.2. Diagnóstico y tratamiento.....	18
3.2. Levetiracetam	19
3.2.1. Farmacodinamia.....	19
3.2.2. Farmacocinética.....	20
3.2.2.1. Absorción y distribución.....	20
3.2.2.2. Metabolismo	21
3.2.2.3. Eliminación	21
3.2.3. Indicaciones terapéuticas.....	21
3.2.4. Dosis y vías de administración.....	22
3.2.5. Contraindicaciones.....	22
3.2.6. Reacciones secundarias	22
3.3. Cromatografía.....	23
3.3.1. Clasificación	23
3.3.2. Clasificación de la cromatografía de líquidos	24
3.3.3. Principales componentes instrumentales del sistema cromatográfico .	25
3.4. Métodos para cuantificar levetiracetam en plasma.	29

3.5. Cuantificación de fármacos en fluidos biológicos	30
3.6. Extracción de fármacos en fluidos biológicos	31
3.6.1. Precipitación de proteínas	31
3.6.2. Extracción liquido-liquido.....	34
3.6.3. Extracción en fase sólida.	34
3.6.4. Extracción por membranas de filtración.	36
3.6.4.1. Diálisis.	37
3.6.4.2. Ultrafiltración.....	37
3.7. Validación de métodos analíticos	38
4.0. PARTE EXPERIMENTAL.....	40
4.1. Material, equipos e instrumentos.	40
4.1.1. Material.	40
4.1.2. Equipos e instrumentos.....	41
4.1.3. Reactivos y disolventes.....	42
4.1.4. Matriz biológica.	42
4.1.5. Sustancia de referencia.....	42
4.2. Preparación de soluciones.....	43
4.3. Optimización del método analítico.	45
4.3.1. Condiciones cromatográficas.	45
4.3.2. Método de extracción.	46
4.4. Validación del método analítico.	48
4.4.1. Preparación de la curva de calibración y puntos de control.	48
4.4.2. Linealidad.....	49
4.4.3. Precisión del método.....	50
4.4.3.1. Repetibilidad.....	50

4.4.3.2. Reproducibilidad.....	51
4.4.4. Exactitud.	51
4.4.5. Recobro.....	52
4.4.6. Límite inferior de cuantificación (LIC) y límite de detección (LD).	52
4.4.7. Selectividad.....	53
4.4.8. Estabilidad.....	53
4.4.8.1. Estabilidad a temperatura ambiente y refrigeración.	54
4.4.8.2. Estabilidad ciclos congelación-descongelación.	54
4.4.8.3. Estabilidad muestra procesada.	55
4.4.8.4. Estabilidad muestra evaporada.	55
4.4.8.5. Estabilidad a largo plazo.....	55
4.4.9. Tolerancia del método.....	56
4.4.9.1. Prueba de integridad de la dilución (concentración dentro de la curva de calibración).	56
4.4.9.2. Prueba de integridad de la dilución (concentración por encima de la curva de calibración).	56
4.5. Etapa clínica.	57
4.5.1. Criterios de inclusión.	58
4.5.2. Criterios de exclusión.	58
4.5.3. Retiro de voluntarios.	59
4.5.4. Tratamiento.	59
4.5.5. Análisis de las muestras plasmáticas.....	60
4.6. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos.....	61
4.6.1. Cálculo de parámetros farmacocinéticos.	61
5.0. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.	63
5.1. Optimización del método analítico.	63

5.1.1. Condiciones cromatográficas.	63
5.1.2. Método de extracción.	64
5.2. Resultados de la validación del método analítico.	66
5.2.1. Selectividad.	66
5.2.2. Linealidad.	67
5.2.3. Precisión.	69
5.2.3.1. Repetibilidad.	69
5.2.3.2. Reproducibilidad y exactitud.	70
5.2.4. Recobro.	72
5.2.5. Límite de detección (LD) y límite inferior de cuantificación (LIC).	73
5.2.6. Estabilidad.	75
5.2.6.1. Ciclos de congelación-descongelación.	75
5.2.6.2. Estabilidad a temperatura ambiente y refrigeración.	78
5.2.6.3. Estabilidad de la muestra procesada.	81
5.2.6.4. Estabilidad de la muestra evaporada.	83
5.2.6.5. Estabilidad a largo plazo.	84
5.2.7. Tolerancia del método.	85
5.2.7.1. Prueba de integridad de la dilución (concentración dentro de la curva de calibración).	85
5.2.7.2. Prueba de integridad de la dilución (concentración por encima de la curva de calibración).	86
5.3. Etapa clínica.	87
5.3.1. Estadística demográfica descriptiva.	87
5.3.2. Estadística descriptiva de los datos de concentración plasmática promedio de levetiracetam con respecto al tiempo.	88

5.3.3. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos de levetiracetam.....	90
6.0. CONCLUSIONES.....	91
7.0 ANEXOS.	92
7.1. Anexo I. Datos demográficos de los participantes en el estudio.....	92
7.2. Anexo II. Concentraciones plasmáticas de levetiracetam para cada voluntario en los diferentes tiempos de muestreo.....	93
7.3. Anexo III. Graficas de concentración plasmática en escala normal y escala semilogarítmica con respecto al tiempo por cada voluntario.	97
7.4. Anexo IV. Parámetros farmacocinéticos de levetiracetam obtenidos por cada voluntario.	122
8.0. BIBLIOGRAFÍA.	123

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Clasificación de las convulsiones epilépticas	17
Tabla 2. Métodos para cuantificar levetiracetam en plasma	29
Tabla 3. Métodos utilizados para la precipitación de proteínas	33
Tabla 4. Ejemplos de absorbentes para extracción en fase sólida.....	36
Tabla 5. Preparación de la curva de calibración y puntos de control	49
Tabla 6. Preparación de puntos control en solución.....	52
Tabla 7. Condiciones cromatográficas finales.	64
Tabla 8. Linealidad del método (concentración recuperada en $\mu\text{g/mL}$).....	67
Tabla 9. Parámetros de linealidad del método.	68
Tabla 10. Repetibilidad del método analítico.....	69
Tabla 11. Reproducibilidad del método analítico.....	70
Tabla 12. Recobro del método analítico.....	72
Tabla 13. Evaluación del límite de detección y límite inferior de cuantificación.....	73
Tabla 14. Estabilidad del primer ciclo congelación-descongelación.....	75
Tabla 15. Estabilidad del segundo ciclo congelación-descongelación.	76
Tabla 16. Estabilidad del tercer ciclo congelación-descongelación.....	77
Tabla 17. Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente 24 h.	78
Tabla 18. Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente 48h.	79
Tabla 19. Estabilidad de la muestra en refrigeración 24 h.	80
Tabla 20. Estabilidad de la muestra en refrigeración 48 h.	81
Tabla 21. Estabilidad de la muestra procesada 72 h.....	82
Tabla 22. Estabilidad de la muestra evaporada 96 h	83
Tabla 23. Estabilidad a largo plazo 284 días.....	84
Tabla 24. Integridad de dilución (dentro de la curva de calibración)	85
Tabla 25. Integridad de dilución (por encima de la curva de calibración).....	86
Tabla 26. Estadística descriptiva de las variables demográficas.....	87
Tabla 27. Estadística descriptiva de los datos de concentración plasmática promedio con respecto al tiempo.	88
Tabla 28. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos de levetiracetam.....	90

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura de levetiracetam.....	19
Figura 2. Componentes de un sistema cromatográfico.	26
Figura 3. Detector de onda variable o espectrofotométrico.....	28
Figura 4. Evaluación de métodos de extracción.....	47
Figura 5. Diagrama de extracción.	65
Figura 6. Selectividad del método y selectividad para fármacos de uso común....	66
Figura 7. Linealidad del método analítico.....	68
Figura 8. Límite de detección y límite inferior de cuantificación.	74
Figura 9. Concentración plasmática promedio de levetiracetam con respecto al tiempo (escala normal).....	89
Figura 10. Concentración plasmática promedio de levetiracetam con respecto al tiempo (escala semilogarítmica).....	89

ABREVIATURAS.

$ABC_{0-\text{Inf}}$	Área bajo la curva de la concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo infinito
ABC_{0-t}	Área bajo la curva de la concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo t
ACN	Acetonitrilo
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
cm	Centímetros
C_{max}	Concentración plasmática máxima
C_p	Concentración plasmática
CPDA	Anticoagulante compuesto por citratos, fosfatos, dextrosa y adenina
CV	Coefficiente de variación
ρ	Densidad
DE	Desviación estándar
EE	Error estándar
FAE	Fármaco antiepiléptico
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
°C	Grados Celsius
g	Gramos
GABA	Ácido γ -amino butírico
h	Horas
HPLC-ESI-MS/MS	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización de electro spray
IMC	Índice de masa corporal
K_e	Constante de eliminación
kg	Kilogramos
LD	Límite de detección
LIC	Límite inferior de cuantificación
M	Molar

m ²	Metros cuadrados
Max	Máximo
MeOH	Metanol
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrometros
µM	Micromolar
mg	Miligramos
min	Minutos
Min	Mínimo
mM	Milimolar
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercurio
N	Tamaño de la muestra
nm	Nanómetro
pI	Punto isoeléctrico
r	Coefficiente de correlación lineal
rpm	Revoluciones por minuto
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
t _{1/2}	Vida media de eliminación
TEA	Trietilamina
T _{max}	Tiempo transcurrido desde la administración hasta que se produce la concentración plasmática máxima
TMR	Tiempo medio de residencia
USP	Farmacopea de los Estados Unidos de América
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Detector de ultravioleta
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

1.0. RESUMEN.

En este trabajo se presenta la optimización de un método analítico para cuantificar levetiracetam en plasma humano mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Se han reportado diferentes técnicas de extracción por precipitación de proteínas, líquido-líquido y en fase sólida para extraer levetiracetam del plasma. Bajo estos antecedentes, se optimiza la extracción por precipitación de proteínas para las condiciones del laboratorio en un rango de concentración de 0.6 a 60.0 µg/mL.

La separación del analito se realizó con una columna Pursuit C18 de 150 x 4.6 mm y 5 µm de tamaño de partícula, fase móvil de solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.01 M, pH 3.1 : acetonitrilo (95:5 v/v) y detección por ultravioleta a 210 nm de longitud de onda.

El método se validó en base a la NOM-177-SSA1-1998 que establece las pruebas y procedimientos que deben realizarse para demostrar la intercambiabilidad de los medicamentos genéricos. Los parámetros determinados fueron: selectividad, linealidad, precisión evaluada como repetibilidad y reproducibilidad, exactitud, límite inferior de cuantificación (LIC), límite de detección (LD), recobro, tolerancia y estabilidad de la muestra en condiciones de ciclos congelación-descongelación, temperatura ambiente, refrigeración, congelación a -70°C a largo plazo, muestra evaporada y muestra procesada. El método analítico demostró ser confiable para su aplicación un estudio de biodisponibilidad.

Se realizó un estudio de biodisponibilidad en población mexicana en 25 voluntarios clínicamente sanos (13 hombres y 12 mujeres). Los parámetros farmacocinéticos calculados fueron: ABC_{0-t} ($h \cdot \mu g/mL$), $ABC_{0-\infty}$ ($h \cdot \mu g/mL$), $t_{1/2}$ (h), t_{max} (h), C_{max} ($\mu g/mL$) y Ke (h^{-1}), después de la administración de una dosis oral única de 1000 mg de levetiracetam, tomando muestras predosis (tiempo cero) y a las 0.167, 0.333, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 17, 22 y 36 horas después de la administración. De estas muestras se obtuvo el plasma mediante centrifugación y se conservaron a -70 °C hasta ser analizadas de acuerdo al método analítico optimizado.

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos en población mexicana fueron: $ABC_{0-t} = 274.12 \pm 41.42$ $h \cdot \mu g/mL$, $ABC_{0-\infty} = 287.23 \pm 41.21$ $h \cdot \mu g/mL$, $t_{1/2} = 6.69 \pm 1.10$ h, $t_{max} = 0.90 \pm 0.52$ h, $C_{max} = 40.43 \pm 8.19$ $\mu g/mL$ y $Ke = 106 \pm 0.018$ (h^{-1}).

2.0. OBJETIVOS.

El presente trabajo consistió en optimizar y validar una metodología analítica para cuantificar levetiracetam en plasma y aplicarla en un estudio de biodisponibilidad.

Los objetivos del trabajo fueron:

- Optimizar y validar el método analítico mediante CLAR con detección de ultravioleta.
- Aplicar el método analítico en un estudio de biodisponibilidad en población mexicana.

3.0. INTRODUCCIÓN.

3.1. Epilepsia.^(1,2,3)

La epilepsia es una de las más antiguas enfermedades conocidas por la humanidad, se trata de un trastorno neurológico crónico caracterizado por recurrentes convulsiones epilépticas. Estas convulsiones son manifestaciones clínicas que incluyen los síntomas y signos de una anormal, excesiva e hipersincrónica descarga neuronal en el cerebro. La epilepsia puede ser genética o puede ser el resultado de una serie de daños cerebrales, como traumatismos craneoencefálicos, derrame cerebral, malformaciones vasculares o malformaciones cerebrales congénitas.

3.1.1. Clasificación.⁽²⁾

Las crisis epilépticas se han clasificado en convulsiones parciales, cuando la alteración cerebral subyacente se localiza en un hemisferio y en convulsiones generalizadas, en las que la alteración cerebral subyacente es bilateral. Las manifestaciones conductuales en las crisis convulsivas dependen de las funciones que se ejerzan normalmente en el sitio donde se originen las convulsiones.

De esta clasificación surgen subclasificaciones, las cuales son útiles para determinar el tratamiento con el fármaco antiepiléptico (FAE) más apropiado y seguro para cada paciente.

Tabla 1. Clasificación de las convulsiones epilépticas. ⁽⁴⁾

Tipo de convulsión	Características	Fármacos anticonvulsivos convencionales	Fármacos de reciente desarrollo
Convulsiones parciales			
Parciales simples	Diversas manifestaciones que dependen de la región de la corteza activada por la crisis convulsiva (por ejemplo; si la corteza motora representa al pulgar izquierdo, se producen sacudidas en dicho dedo) que duran de 20 a 60 segundos, el aspecto clave es la conservación del conocimiento	carbamazepina, fenitoina, valproato.	gabapentina, lamotrigina, levetiracetam, tiagabina, topiramato, zonisamida.
Parciales complejas	Pérdida de conocimiento que dura de 30 segundos a 2 minutos, en muchos casos aunadas de movimientos propositivos, como chasquear los labios y agitar la mano	carbamazepina, fenitoina, valproato.	gabapentina, lamotrigina, levetiracetam, tiagabina, topiramato, zonisamida.
Parciales con convulsiones tonicoclónicas generalizadas de manera secundaria	La convulsión parcial simple o compleja, evoluciona hasta una convulsión tonicoclónica, con pérdida del conocimiento y contracciones sostenidas (tónicas) de los músculos de todo el cuerpo, a lo que siguen periodos de contracción muscular alternada con periodos de relajación (clónicas) que duran 1 o 2 minutos	carbamazepina, fenobarbital, fenitoina, pirimidona, valproato.	gabapentina, lamotrigina, levetiracetam, tiagabina, topiramato, zonisamida.
Convulsiones generalizadas			
Crisis de ausencia	Inicio repentino de pérdida del conocimiento, aunado a mirada fija e interrupción de las actividades que se estaban realizando y que dura de manera característica 30 segundos	etosuximida, valproato.	lamotrigina
Convulsiones mioclónicas	Contracción muscular breve de tipo choque eléctrico, ya sea restringida a una extremidad o generalizada	valproato	lamotrigina, topiramato.
Convulsiones tonicoclónicas	Pérdida del conocimiento y contracciones sostenidas (tónicas) de los músculos de todo el cuerpo, a lo que siguen periodos de contracción muscular alternada con periodos de relajación (clónicas) que duran 1 o 2 minutos, solo que no está precedida de una convulsión parcial	carbamazepina, fenobarbital, fenitoina, pirimidona, valproato.	lamotrigina, topiramato

3.1.2. Diagnóstico y tratamiento.^(3,5)

El factor más importante para tratar la epilepsia es el diagnóstico preciso del tipo de convulsión que se presenta. Una vez determinado, se establece el tratamiento, el cual se basará en los siguientes aspectos generales del fármaco:

- a) Características farmacocinéticas.
- b) Variedad farmacoterapéutica.
- c) Efectos secundarios y anomalías congénitas.

Aunque el interés por desarrollar fármacos antiepilépticos ha sido constante, es en las últimas dos décadas en las que se ha buscado considerablemente extender la variedad de fármacos que puedan asegurar mejores tratamientos.

Actualmente, a pesar de la variedad de fármacos antiepilépticos (FAE) que cada vez cuentan con mejores condiciones tanto de eficacia como de tolerabilidad, alrededor del 30% de los pacientes con epilepsia no han logrado el control de sus crisis en forma adecuada. Levetiracetam es un nuevo FAE de estructura similar al piracetam, pero con diferentes propiedades farmacológicas. El perfil farmacocinético de dicho medicamento se aproxima mucho a las características del antiepiléptico ideal: buena biodisponibilidad, cinética lineal, rápida adquisición de valores estables, mínima unión a proteínas y mínimo metabolismo.⁽³⁾

Este fármaco fue aprobado por primera vez en EUA como tratamiento adyuvante para las crisis de inicio parcial (Noviembre 1999). Sin embargo, posteriormente se aprobó como tratamiento adyuvante para crisis generalizadas tónico-clónicas primarias y para crisis mioclónicas de la epilepsia mioclónica juvenil, y años más adelante, mediante un ensayo de monoterapia comparativa, fue aprobado en la Unión Europea para su uso como monoterapia inicial.⁽³⁾

3.2. Levetiracetam.⁽⁶⁾

Levetiracetam es un fármaco antiepiléptico (específicamente anticonvulsivante), lleva por nombre químico: (S)- α -etil-2-oxo-1-pirrolodina acetamida (Figura 1), con un único enantiomero *R*- α -etil-2-oxo-pirrolodina acetamida. Su fórmula molecular es $C_8H_{14}N_2O_2$ y tiene un peso molecular de 170.21 (g/mol).

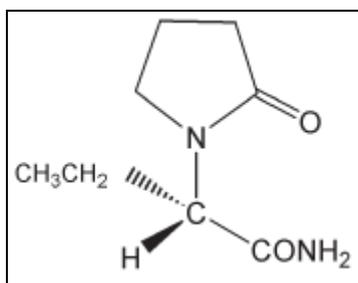


Figura 1. Estructura de levetiracetam.

Se trata de un polvo blanco, cristalino, con ligero olor y sabor amargo, muy soluble en agua (104 g/100 mL), cloroformo (65.3 g/100mL) y metanol (53.6 g/100mL), soluble en etanol (16.5 g/100mL), muy poco soluble en acetonitrilo (5.7 g/100mL) y prácticamente insoluble en n-hexano.

3.2.1. Farmacodinamia.^(7,8)

El mecanismo de acción de levetiracetam está todavía por dilucidar, pero parece ser diferente de los mecanismos de acción de los antiepilépticos comunes. Los estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que levetiracetam, no altera la neurotransmisión normal y las características básicas de la célula.

Estudios *in vitro* muestran que levetiracetam afecta los niveles intraneuronales de Ca^{2+} mediante la inhibición parcial de las corrientes de Ca^{2+} tipo N, y reduciendo la liberación de Ca^{2+} de la reserva intraneuronal. Además, invierte parcialmente la

reducción de corrientes dependientes de GABA y glicina inducidas por zinc y β -carbolinas.

Por otra parte, estudios *in vivo* en modelos con ratones muestran que levetiracetam se une a un punto específico en el tejido cerebral. Este punto de unión específico es la proteína 2A de las vesículas sinápticas, el cual parece estar involucrado en la fusión de vesículas y en la exocitosis de neurotransmisores.

3.2.2. Farmacocinética.

3.2.2.1. Absorción y distribución. ⁽⁹⁾

Levetiracetam se absorbe rápidamente después de su administración oral. La biodisponibilidad oral absoluta es cercana al 100%. Los niveles máximos plasmáticos (C_{max}) se alcanzan a las 1.3 horas después de su administración. Los valores normales plasmáticos (C_{max}) después de una dosis única de 1000 mg y de una dosis repetida de 1000 mg dos veces al día son del 31 y 43 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Los alimentos no afectan su grado de absorción pero disminuyen la C_{max} en un 20%. Levetiracetam presenta una farmacocinética lineal en el rango de dosis de 500 mg a 5000 mg. Tanto levetiracetam como su metabolito principal presentan una unión a proteínas plasmáticas inferior al 10%, por lo tanto es poco probable que se presenten interacciones clínicamente significativas con otros fármacos a través de la competencia por sitios de unión a proteínas. El volumen de distribución del levetiracetam es aproximadamente de 0.5 a 0.7 L/kg, valor cercano al volumen total del agua corporal.

3.2.2.2. Metabolismo.⁽⁹⁾

Levetiracetam no es metabolizado extensamente en humanos. Su principal vía metabólica es la hidrólisis enzimática del grupo acetamida, que produce el metabolito ácido carboxílico (24% de la dosis) y no es dependiente de ninguna isoenzima del citocromo P450 del hígado. La hidrólisis de levetiracetam se produce por acción de serinas, pero no de la colinesterasa y enzimas carboxilesterasa. El metabolito principal es inactivo de acuerdo a los estudios realizados en modelos animales. Dos metabolitos menores han sido identificados como el producto de la hidroxilación del 2-oxo-anillo de pirrolodina (2% de la dosis) y la apertura del anillo 2-oxo-pirrolodina en la posición 5 (1% de la dosis). No hay interconversión enantiomérica de levetiracetam o de su metabolito principal.

3.2.2.3. Eliminación.⁽⁹⁾

La vida media plasmática de levetiracetam en adultos es de 7 ± 1 horas y no es afectado por la dosis administrada o por la administración repetida. Es eliminado de la circulación sistémica por excreción renal como fármaco inalterado que representa el 66% de la dosis administrada. El aclaramiento corporal total es de 0.96 mL/min/kg y el aclaramiento renal es de 0.6 mL/min/kg; sin embargo se ve reducido en pacientes con insuficiencia renal. El mecanismo de excreción es la filtración glomerular con subsiguiente reabsorción tubular parcial. En el caso del principal metabolito, este es excretado por filtración glomerular y secreción tubular activa con un aclaramiento renal de 4 mL/min/kg.

3.2.3. Indicaciones terapéuticas.⁽⁶⁾

Levetiracetam está indicado como monoterapia en el tratamiento de las crisis de inicio parcial con o sin generalización secundaria en pacientes mayores de 16 años con un nuevo diagnóstico de epilepsia.

Está indicado como terapia concomitante:

- En el tratamiento de las crisis de inicio parcial con o sin generalización secundaria en adultos y en niños mayores de 4 años con epilepsia.
- En el tratamiento de las crisis mioclónicas en adultos y adolescentes mayores de 12 años con epilepsia mioclónica juvenil.
- En el tratamiento de las crisis tónico-clónicas generalizadas primarias en adultos y adolescentes mayores de 12 años con epilepsia generalizada idiopática.

3.2.4. Dosis y vías de administración. ⁽⁹⁾

El tratamiento debe iniciarse con una dosis de 1000 mg una vez al día. La dosis diaria puede ajustarse en incrementos de 1000 mg cada 2 semanas hasta un máximo recomendado de dosis diaria de 3000 mg. La vía de administración puede ser oral mediante tabletas o solución oral, o vía intravenosa.

3.2.5. Contraindicaciones. ⁽⁹⁾

No debe ser administrado a pacientes con hipersensibilidad, a otros derivados de la pirrolidona o a cualquiera de sus excipientes, en cualquier presentación.

3.2.6. Reacciones secundarias. ⁽⁹⁾

Se puede presentar somnolencia, fatiga, dificultad de coordinación, anomalías de comportamiento, síntomas psicóticos, alucinaciones, agresividad, agitación, enojo, ansiedad, apatía, despersonalización, depresión, labilidad emocional, hostilidad, irritabilidad, tendencia suicida. En pacientes pediátricos puede ocasionar somnolencia, fatiga y alteraciones del comportamiento.

3.3. Cromatografía.^(10,11)

La cromatografía es una técnica usada para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los compuestos se distribuyen en dos fases: una de las cuales es estacionaria y que puede ser un sólido, gel o líquido retenido sobre un sólido, y la otra fase es móvil la cual puede ser líquido, gas o fluido supercrítico.

3.3.1. Clasificación.^(10,11)

La cromatografía se clasifica con base en distintas características como son:

1) Fundamento de proceso cromatográfico:

- Naturaleza de la fase móvil. Si esta es un gas se denomina cromatografía de gases, si es un líquido cromatografía de líquidos.
- Naturaleza de la fase estacionaria. Si la fase estacionaria es un sólido, la móvil puede ser líquido, gas o fluido supercrítico y de manera análoga si la fase estacionaria es líquida la móvil podrá ser líquido, gas o fluido supercrítico.
- El fenómeno que ocurre dentro de la columna. En donde puede haber interacción directa o indirecta del analito con la fase estacionaria siendo así que se tiene modalidades de reparto, intercambio iónico, afinidad, interacciones hidrofóbicas, par iónico, micelar y exclusión molecular.

2) Forma de realizar el proceso (dispositivo experimental):

- Plana. Consiste en un adsorbente sólido distribuido sobre una superficie plana que presenta cierta capilaridad la cual permite que la fase móvil pase entre las partículas y se presente la separación.

- Columna. Consiste en un soporte sólido adsorbente dentro de un tubo a través del cual se hace pasar la fase móvil por lo que la elución de solutos puede llevarse a cabo por gravedad o presión positiva.

3.3.2. Clasificación de la cromatografía de líquidos. ^(10,12)

- Cromatografía líquido-sólido (adsorción). En donde se usa una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar.
- Cromatografía líquido-líquido (partición). En esta modalidad las moléculas del soluto se distribuyen entre dos líquidos, uno es la fase móvil y el otro la fase estacionaria.
- Cromatografía de fase ligada. Donde se reemplaza el tipo de unión de la fase estacionaria a su soporte para lograr una unión química perdurable, para ello se usan materiales altamente hidrofóbicos e hidrofílicos (octadecilo, octilo, hexilo, butilo, ciano, amino, fenilo, nitro, etc).
- Cromatografía de intercambio iónico. Donde se emplean rellenos en los cuales la partícula está constituida por un polímero o silica gel unidos a un grupo funcional aniónico o catiónico.
- Cromatografía de exclusión molecular. Donde se emplean materiales de porosidad controlada que funcionan como tamiz o filtro y separa a las moléculas según un orden decreciente de tamaño molecular.
- Cromatografía de afinidad. Donde la interacción de los solutos con la fase estacionaria es debida a interacciones tipo llave-cerradura muy selectiva.

3.3.3. Principales componentes instrumentales del sistema cromatográfico.^(10,13,14)

El sistema cromatográfico (Figura 2) está constituido por:

a) **Bomba:**

Es la encargada de impulsar la fase móvil proveniente del recipiente con disolvente hacia el inyector y desde ahí hacia la columna; el flujo de trabajo puede ser muy variable, ya que hay bombas capaces de entregar volúmenes del orden de los $\mu\text{L}/\text{min}$ hasta los de mL/min .

En general hay dos tipos de bombas: las de pistón (bombas reciprocantes) y las de desplazamiento continuo, siendo las primeras las de uso más difundido.

Los materiales de los que están construidas deben ser resistentes al ataque químico y desgaste mecánico, es así que los materiales con los que se construyen son acero inoxidable, zafiro, rubí y teflón.

b) **Inyector:**

Es el dispositivo que permite introducir la muestra que se encuentra en solución sin interrumpir el flujo de solvente a través del sistema, sus características son:

- De fácil operación.
- Inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones.
- Preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema.
- No provoca diluciones importantes en la muestra.

Los tipos básicos son:

- Inyectores automáticos.
- Válvulas de intercambio.

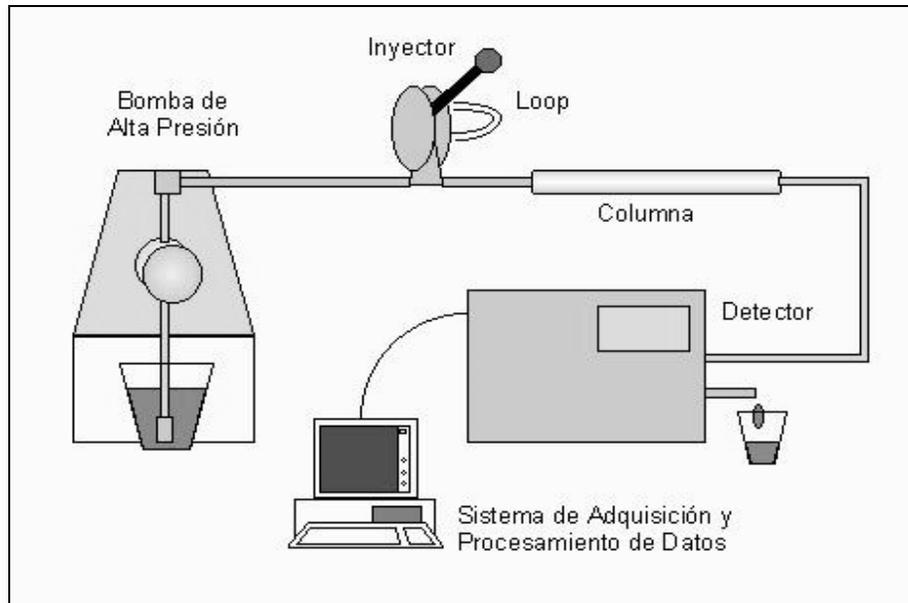


Figura 2. Componentes de un sistema cromatográfico.

c) Sistema de detección:

El detector es un sistema que permite ubicar y procesar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna y debe reunir características como tener un amplio rango dinámico de respuesta, poseer respuesta lineal, no contribuir al ensanchamiento de banda, responder a todos los solutos, sensibilidad apropiada, no verse afectado por cambios de temperatura, poseer buena relación señal ruido, no ser destructivo, tener una constante de tiempo baja.

El detector ultravioleta es selectivo y es el más empleado por poseer un rango lineal y buena sensibilidad que permite detectar analitos en el orden de nanogramos y puede emplearse con gradientes de solventes. El detector ultravioleta opera en el rango de 190 a 350 nm y en algunos equipos se puede extender a la zona visible del espectro (350 a 700 nm) recibiendo así el nombre de detector UV-Visible.

Existen dos tipos de detectores ultravioleta: los de longitud de onda fija y los de longitud de onda variable.

El primero como su nombre lo indica, opera a longitudes de onda prefijadas determinadas por las líneas de emisión de la lámpara, habitualmente de mercurio, en donde la longitud de onda comúnmente trabajada es de 254 nm, pero también se usan 313, 334 y 365 nm; la lámpara funciona como monocromador y para eliminar las longitudes de onda no deseadas se utilizan filtros de interferencia (Figura 3).

El detector de longitud de onda variable es un espectrofotómetro en el cual se reemplaza el compartimiento de cubetas por una celda de flujo. Este detector permite seleccionar libremente la longitud de onda de trabajo con lo cual se puede elegir la longitud de onda de máxima absorción del analito para así poder aumentar la sensibilidad de la medición. Para esto se necesita una lámpara de emisión continua de deuterio o xenón; la luz emitida por la lámpara se enfoca en un monocromador para que la luz monocromática se dirija hacia la celda de medida y de ahí hacia el fotomultiplicador.

Dentro de estos detectores se tiene al denominado arreglo de fotodiodos, en donde la celda se ilumina con luz blanca (no monocromática) y la luz que emerge de la celda llega a una red de difracción y de ahí es dispersada hacia un elemento fotosensible que son los fotodiodos, los cuales consiguen medir la luz transmitida en todo el espectro de absorción del analito de interés en tiempo real, de ahí su importancia.

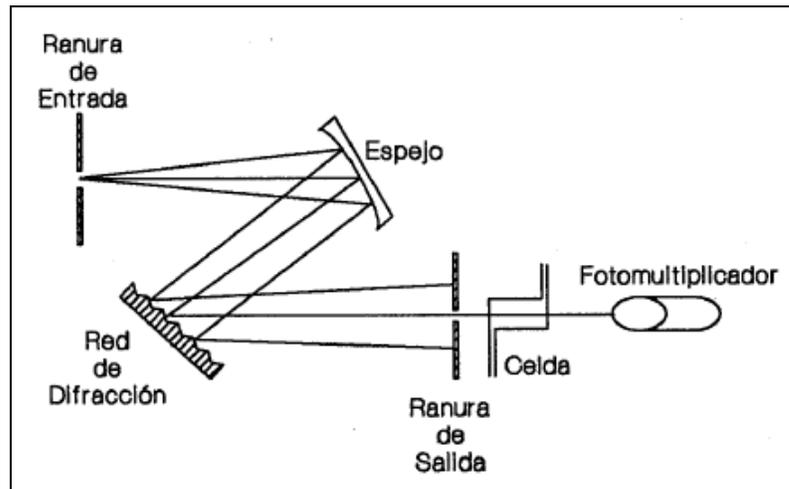


Figura 3. Detector de onda variable o espectrofotométrico.

3.4. Métodos para cuantificar levetiracetam en plasma.

Tabla 2. Métodos para cuantificar levetiracetam en plasma

Tipo de extracción	Columna	Fase móvil / Flujo	Instrumento de detección	Rango ($\mu\text{g/mL}$)	Matriz biológica	Ref.
Precipitación de proteínas con ácido perclórico (0.33 M) y extracción líquido-líquido con ciclohexano	Thermo Hypercarb (C18), 150 x 4.6 mm, 5 μm	Gradiente de elución, el cual consiste de H_3PO_4 al 0.423% y ACN. El gradiente comienza con 5% de ACN y se eleva en 8 min al 30% de ACN. Flujo: 1.0 mL/min	UV 205 nm	1.0–75.0	Plasma	15
Extracción en fase sólida con cartuchos C18. Elución con una mezcla H_2O y MeOH (1:5 v/v)	Spherisorb 3ODS2 (C18), 150 x 4.6 mm, 5 μm	Gradiente de elución, el cual consiste de H_2O : ACN. El gradiente comienza con 6% de ACN y se eleva en 5 min a 20% de ACN, incrementa a 40% de ACN en 6 min, se mantiene hasta los 10 min y disminuye a 6% a los 15 min Flujo: 1.0 mL/min	Arreglo de diodos 205 nm	2.5 – 29.7	Plasma	16
Extracción en fase sólida con cartuchos Oasis HLB. Elución con 500 μL de MeOH	Teknokroma Tracer Excel 120 ODS-B (C18), 100 x 4.6 mm, 3 μm	Solución amortiguadora de KH_2PO_4 0.01 M con 0.6% de TEA : ACN (90:10 v/v) Flujo: 1.2 mL/min	Arreglo de diodos 205 nm	0.53 – 107.0	Plasma	17
Precipitación de proteínas con MeOH	Synergi Hydro-RP (C-18), 150 x 40 mm, 4 μm	Solución amortiguadora de KH_2PO_4 0.05M pH 4.5 : ACN (94:6 v/v) Flujo: 1.5 mL/min	UV-Vis a 205 nm	4.0 – 80.0	Plasma	18
Precipitación de proteínas con ACN	Supelco LC-18-DB, 33 x 3.0 mm, 3 μm	Solución amortiguadora de acetato de amonio 0.015M : MeOH (97:3 v/v) con ácido acético al 0.1%	HPLC-ESI-MS/MS (modo positivo)	1.0 a 50.0	Plasma Suero Saliva	19
Extracción en fase sólida con cartuchos Oasis HLB. Elución con 500 μL de MeOH	Symmetry C18, 50 x 3.9 mm, 5 μm	MeOH : H_2O : Acido fórmico (97:3:0.25, v/v/v) Flujo: 0.2 mL/min	HPLC-ESI-MS/MS (modo positivo)	1.0 – 40.0	Plasma	20

3.5. Cuantificación de fármacos en fluidos biológicos. ^(21,22,23)

En las diferentes áreas de la química existen diversos propósitos para la cuantificación de moléculas en fluidos biológicos, tales como: monitoreo de fármacos, toxicología forense, toxicología del deporte, estudios preclínicos de fase I, estudios de bioequivalencia, estudios de farmacodinamia y farmacocinética, descubrimiento de nuevos fármacos, etc.

La selección del fluido biológico depende de muchos factores, como el tipo de absorción, distribución y eliminación del fármaco, el grado de unión a algún componente endógeno (tejidos, proteínas, eritrocitos), complejidad de la matriz biológica, facilidad para la extracción, propiedades fisicoquímicas de la molécula, concentración en la muestra, tipo de detección del método analítico, entre otras.

La orina, sangre y plasma son los fluidos más comunes para la cuantificación de fármacos, sin embargo se puede lograr en otros como el fluido cerebro espinal, saliva, bilis, heces fecales.

Sangre: Es un tejido fluido con aspecto líquido viscoso que constituye el medio interno que relaciona a todo el organismo en un promedio del 8% del peso corporal, formado por una fase líquida plasmática y elementos formes (serie blanca, roja y plaquetaria). Es el fluido más complejo para la cuantificación de fármacos pero es muy útil cuando la molécula presenta alta permeabilidad a las membranas o afinidad a ellas. Generalmente su limpieza y extracción consiste en una simple centrifugación.

Plasma y suero: El plasma es la fracción líquida de la sangre que contiene gran cantidad de iones, moléculas inorgánicas y moléculas orgánicas que transitan a varias partes del cuerpo o ayudan al transporte de otras sustancias. Es muy estable y su condición depende mucho del individuo. El plasma es el principal fluido para la cuantificación de fármacos en torrente sanguíneo. El suero tiene la

misma composición que el plasma, exceptuando el fibrinógeno y los factores de coagulación II, V, y VIII, y porque aumenta el contenido de serotonina por la degradación de las plaquetas durante la coagulación. Estos fluidos pueden ser usados aun cuando el fármaco se una a proteínas.

Orina: Líquido de aspecto claro, color amarillo y con olor característico, formado por agua, sustancias orgánicas como la urea, el ácido úrico, el ácido hipúrico (benzoilaminoacético), creatinina, purinas y amoniacó, y sustancias inorgánicas como cloruros, sulfatos y fosfatos de sodio, potasio, magnesio y calcio. A diferencia de los anteriores está libre de proteínas y lípidos, sin embargo presenta muchas variaciones en su composición y pH entre individuos. Es útil para la cuantificación de fármacos cuando estos son solubles en agua y se excretan por vía urinaria. Tiene la desventaja que no se puede controlar el volumen de orina, por lo cual es necesario considerar este volumen para que la cuantificación sea expresada en términos de cantidad excretada y no de concentración.

3.6. Extracción de fármacos en fluidos biológicos. ^(21,24,25,26)

Las técnicas más utilizadas para la extracción de fármacos en fluidos biológicos son: precipitación de proteínas, extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida y extracción por membranas de filtración (diálisis y ultrafiltración).

3.6.1. Precipitación de proteínas.

Los métodos de precipitación deben ser rápidos, no agresivos, escalables y relativamente económicos, y se llevan a cabo mediante la perturbación del pH, fuerza iónica y temperatura del medio en el que se encuentran disueltas.

Efecto de las concentraciones salinas.

La solubilidad de una proteína en solución es una función sensible a las concentraciones de las sales disueltas. Dicha concentración se expresa como fuerza iónica, en la cual también se considera el tipo de iones. La precipitación por sales es una consecuencia primaria de la competencia entre los iones de la sal que se han añadido y los demás solutos disueltos por las moléculas de solvatación, por lo que haciendo un ajuste en la concentración de una sal en una disolución, pueden eliminarse muchas proteínas indeseables y eliminar el precipitado por filtración o ultracentrifugación. El sulfato de amonio ha permanecido como el reactivo más empleado, gracias a que posee una alta solubilidad y la densidad de una solución saturada (4.1 M) a 25°C ($\rho = 1.235 \text{ g/mL}$) no es tan elevada como la de otras soluciones salinas precipitantes.

Efecto de los disolventes orgánicos.

Los disolventes orgánicos como la acetona y el etanol, son buenos precipitantes de proteínas debido a su baja constante dieléctrica que provoca la disminución del poder de solvatación de las disoluciones acuosas respecto a los iones disueltos, entre ellos los de las proteínas. La disminución de la constante dieléctrica por los disolventes orgánicos aumenta también las diferencias en el efecto de la precipitación por sales, de modo que ambas técnicas pueden combinarse efectivamente.

Efecto del pH.

Las proteínas son menos solubles a su punto isoeléctrico (pI), donde no son portadores de carga neta, y por lo tanto permanecen inmóviles en un campo eléctrico, de modo que al ajustar el pH de una mezcla de proteínas al pI de la proteína que se desee precipitar, disminuirá selectivamente su solubilidad.

En la práctica, esta técnica se combina con la precipitación por sales y así las proteínas se precipitan con mayor eficiencia mediante la sal en la proximidad de su pl.

En la tabla 3 se presenta un resumen de los métodos para extraer fármacos mediante precipitación de proteínas y una breve descripción de las ventajas y desventajas de dichas técnicas.

Tabla 3. Métodos utilizados para la precipitación de proteínas.⁽²¹⁾

Método de precipitación	Comentarios
Calentamiento 90°C por 5-15 min.	Poco eficiente, descomposición de la muestra, no sirve para analitos termolábiles.
Ciclos congelación-descongelación	Poco eficiente, consume mucho tiempo.
Saturación con (NH ₄) ₂ SO ₄	Moderadamente eficiente, grandes cantidades de sales en el sobrenadante, pH final de 7.
Ácido metafosfórico	Excelente eficiencia, debe almacenarse en frío, pH final menor a 3, probable descomposición del analito.
Ácido perclórico	Excelente eficiencia, debe almacenarse a frío, pH final menor a 3, probable descomposición del analito. La mayoría de los compuestos básicos se extraen exitosamente.
Ácido tricloroacético	Excelente eficiencia, debe almacenarse a frío, dificultad de remover el reactivo de las muestras.
Etanol	Se requieren de dos volúmenes para completar la precipitación. Recomendado para fármacos inestables a pH bajo.
Acetonitrilo	Se requieren de 1.5 volúmenes para completar la precipitación, recomendado para análisis en CLAR.

3.6.2. Extracción líquido-líquido.

Consiste en la partición de la muestra entre dos fases inmiscibles (acuosa y orgánica). La eficiencia de la extracción depende de la afinidad de la molécula por el disolvente de extracción, la relación entre las fases y el número de extracciones.

El empleo de modificaciones del pH con ácidos o bases en la fase acuosa puede incrementar la afinidad de las moléculas por alguna fase, también puede favorecerse la afinidad mediante la formación de un par iónico con solutos ionizables, formación de complejos lipofílicos con iones metálicos o mediante la adición de sales neutras para disminuir la solubilidad de los compuestos orgánicos en la fase acuosa.

Este tipo de extracción tiene la ventaja de ser simple y de que existe una gran cantidad de disolventes orgánicos con alta pureza que amplían la gama de solubilidad y selectividad. Tiene las desventajas de que pueden formarse emulsiones al momento de realizar la agitación, pérdida del analito durante las extracciones, concentración de la muestra debido a la evaporación del disolvente orgánico.

3.6.3. Extracción en fase sólida.

Hoy en día la extracción en fase sólida es una de las herramientas más utilizadas para la extracción de fármacos en fluidos biológicos. Consiste en el uso de cartuchos empacados con fuertes absorbentes con mecanismos de retención similares a los de una columna de cromatografía de líquidos.

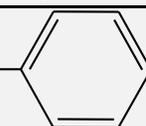
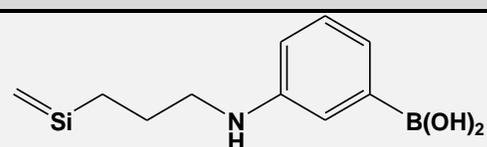
Un cartucho normalmente consiste en un tubo de polipropileno conteniendo cerca de 50-500 mg de adsorbente, 40-60 mm de tamaño de partícula, establecidos en el tubo a través de dos filtros. En general, los procedimientos para la extracción en fase sólida se dividen en cuatro pasos:

- 1) Activación de adsorbente con un disolvente para dejar libres los sitios activos.
- 2) Introducción de la muestra. La retención se produce con la interacción del analito y las interferencias de la matriz con la fase adsorbente del cartucho.
- 3) Limpieza del cartucho para eliminar las interferencias de la matriz pero no al analito, el que se encuentra retenido.
- 4) Elución del analito con un disolvente que posea la fuerza de elución adecuada.

Actualmente un gran número de adsorbentes están disponibles comercialmente. En general, el material de los adsorbentes es similar a los utilizados en cromatografía de líquidos. Así, el carbón activado, alúmina, gel de sílice, silicato magnesio (florisil), aglutinantes químicos, polímeros, entre muchos otros, son utilizados ampliamente para la extracción en fase sólida.

En la tabla 4 se presentan algunos ejemplos de adsorbentes:

Tabla 4. Ejemplos de absorbentes para extracción en fase sólida. ⁽²⁶⁾

No polares		
C18	Octadecilsilano	= Si – (CH ₂) ₁₇ – CH ₃
C8	Octilsilano	= Si – (CH ₂) ₇ – CH ₃
Ph	Fenilsilano	= Si – 
Polares		
FL	Florosil	MgO ₃ Si
AL	Alumina	Al ₂ O ₃
Si	Silica	= Si – OH
Trampa iónica		
PRS	Sulfonilpropilsilano	= Si – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – SO ₃ ⁻ +Na
DEA	Dietilaminopropilsilano	= Si – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – N (CH ₂ – CH ₃) ₂
CBA	Carboximetilsilano	= Si – CH ₂ – CH ₂ – COOH
Covalente		
PBA	Ácido fenilborónico	

Entre las ventajas de la extracción en fase sólida son: el poco consumo de disolventes, no se forman emulsiones, alta selectividad, posibilidad de automatización. Las desventajas pueden ser el alto costo de los cartuchos, obstrucciones de los cartuchos por componentes sólidos de la matriz y requiere instalaciones y equipos especializados.

3.6.4. Extracción por membranas de filtración.

Esta técnica usa una membrana que es una barrera selectiva entre dos fases, la separación se logra por la capacidad de transporte de la membrana, ya sea por

velocidad de difusión o por el tamaño de las moléculas con respecto a la matriz biológica. Las membranas pueden ser clasificadas en función de la estructura y mecanismo de separación. La estructura puede ser porosa o no porosa, simétrica o asimétrica. Y en cuanto a los mecanismos de permeabilidad pueden ser por diferencia de concentración o diferencia de presión.

3.6.4.1. Diálisis.

Este método de extracción se lleva a cabo por difusión de las moléculas como resultado de un gradiente de concentración. Se utiliza principalmente para la separación de moléculas de bajo peso molecular de moléculas de alto peso molecular. Se obtiene una mayor recuperación en función del tiempo cuando la membrana posee una gran superficie, una capa delgada, y baja tortuosidad. El mayor inconveniente de esta técnica es que con el tiempo el gradiente de concentración y el flujo disminuyen hasta que llegan a un equilibrio, es lenta y tiene bajos porcentajes de recobro.

3.6.4.2. Ultrafiltración.

Consiste en la separación de las moléculas por tamaño situadas en una membrana a la cual se le aplica un gradiente de presión. La ultrafiltración ha sido ampliamente utilizada para la eliminación de proteínas y otras macromoléculas. Tiene la ventaja de que es una técnica sencilla, las membranas se consiguen de manera comercial y no tiene problemas de dilución de la muestra ni de intercambio de disolventes. Un problema común es la obstrucción de la membrana por moléculas que no pueden atravesarla, causando resistencia adicional a la transferencia de masa, además pueden existir interacciones no deseables de las moléculas con las membranas.

3.7. Validación de métodos analíticos.⁽²⁷⁾

La validación de un método analítico es un procedimiento mediante el cual se documenta la evidencia experimental que demuestra que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado, en este caso, el propósito es la cuantificación de un fármaco en plasma.

La validación se lleva a cabo mediante una serie de pruebas que evalúan parámetros esenciales que aseguran el desempeño del método bajo distintas condiciones.

En México, la Norma Oficial Mexicana (NOM-177-SSA1-1998) establece los criterios y requisitos que deben observarse para la validación de un método analítico y su aplicación en la realización de pruebas para demostrar la intercambiabilidad de los medicamentos genéricos.

Los criterios generales para validar un método analítico son:

Linealidad: Capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra.

Precisión: Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad: Precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.

Reproducibilidad: Precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas.

Exactitud: Concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Estabilidad de la muestra: Propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.

Límite inferior de cuantificación: Concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.

Límite de detección: Mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas.

Recuperación absoluta: Eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.

Selectividad: Capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

Tolerancia: Capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.

4.0. PARTE EXPERIMENTAL.

La parte experimental consiste en dos fases:

- 1) Optimización y validación del método analítico por CLAR para cuantificar levetiracetam en plasma.
- 2) Aplicación del método en un estudio de biodisponibilidad con voluntarios sanos de nacionalidad Mexicana.

4.1. Material, equipos e instrumentos.

4.1.1. Material.

- Naves de pesado.
- Espátula de cromo-níquel.
- Guantes de nitrilo.
- Matraces volumétricos calibrados de 10, 50 y 1000 mL.
- Pipetas volumétricas calibradas de 5 mL.
- Propipeta.
- Membrana de filtración (0.2 micras de tamaño de poro).
- Frasco de vidrio con tapón rosca de 100, 1000 y 2000 mL.
- Puntas de volumen variable para repetidora Combitip®, Marca Eppendorf.
- Vasos de precipitados de vidrio 100, 200, 250 y 1000 mL.
- Probeta graduada de 1000 mL.
- Microtubos de 2 mL.
- Insertos de propileno.
- Viales para automuestreador del sistema cromatográfico.
- Barra magnética de agitación.

4.1.2. Equipos e instrumentos.

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, que consta de:
 - Modulo de Separación modelo 2690D.
 - Detector de UV marca Waters modelo 486.
 - Empower® versión 5.0, Software para procesamiento de resultados.
- Balanza granataria marca Ohaus modelo Adventurer PRO.
- Balanza analítica marca Ohaus modelo EP214C.
- Agitador vórtex marca Thermolyne, modelo Maxi Mix II.
- Ultracongelador marca REVCO modelo ULT2186-5-A36.
- Sistema de purificación de agua marca Barnstead, modelo Nanopure Diamond.
- Pipeta repetidora electrónica marca Eppendorf modelo Repeater Plus.
- Micropipeta volumen variable 100-1000 µL, marca Hirschmann Laborgerate modelo Hirschmann Labopette.
- Micropipeta volumen fijo 200 µL marca Hirschmann Laborgerate, modelo Hirschmann Labopette.
- Refrigerador Torrey R-16.
- Centrífuga Hettich Rotanta 460R.
- Centrífuga Eppendorf 5424.
- Centrífuga Centra CL5.
- Potenciómetro Oakton Serie pH 510.
- Parrilla con agitación magnética.
- Baño ultrasónico Marca Branson, modelo 3510R-MT.
- Columna Cromatográfica: Pursuit C18 de 150 x 4.6 mm, 5 µm de tamaño de partícula.

4.1.3. Reactivos y disolventes.

- Agua grado cromatográfico, obtenida del sistema de purificación marca Branstead, modelo Nanopure Diamond.
- Fosfato monobásico de sodio, J.T. Baker, grado reactivo.
- Acetonitrilo, Mallinckrodt, grado cromatográfico.
- Metanol, J.T. Baker, grado cromatográfico.
- Diclorometano (CH_2Cl_2), J.T. Baker, grado cromatográfico.
- Ácido fosfórico concentrado (H_3PO_4), J.T. Baker, grado reactivo.

4.1.4. Matriz biológica.

El fluido biológico para la optimización del método, validación y estudio de biodisponibilidad (blancos, curvas de calibración y puntos control) fue plasma humano fresco con CPDA como anticoagulante, proveniente de voluntarios sanos del Instituto Nacional de Cardiología, el cual contó la documentación que amparó su bioseguridad. El plasma fue almacenado en congelación a -70°C .

4.1.5. Sustancia de referencia.

- Levetiracetam. Estándar secundario, TEVA, lote: 25270LV109008AJc2, Pureza: 100.1%. Caducidad 01-12-2010.

4.2. Preparación de soluciones.

- Solución amortiguadora de fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) 10 mM, pH: 3.1.

Se pesó 1.36 g de fosfato de sodio monobásico y se transfirieron a un matraz volumétrico de 1000 mL, se disolvió con agua grado cromatográfico y se llevó a volumen con el mismo disolvente. Posteriormente se ajustó el pH con ácido fosfórico (H_3PO_4) concentrado.

- Solución de referencia de levetiracetam 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Se pesó con exactitud 12 mg del estándar secundario de levetiracetam y se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó a volumen con agua grado cromatográfico.

- Solución de referencia de levetiracetam 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Utilizando una pipeta volumétrica, se transfirieron 5 mL de la solución de referencia de levetiracetam de concentración 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó a volumen con agua grado cromatográfico.

- Solución de referencia de levetiracetam 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Utilizando una pipeta volumétrica, se transfirieron 5 mL de la solución de referencia de levetiracetam de concentración 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a un matraz volumétrico de 50 mL y se llevó a volumen con agua grado cromatográfico.

- Solución de referencia de levetiracetam 2000 µg/mL para la prueba de integridad de la dilución.

Se pesó con exactitud 20 mg del estándar secundario de levetiracetam y se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó a volumen con agua grado cromatográfico.

- Solución para evaluar la adecuabilidad del sistema. Levetiracetam 30 µg/mL.

Utilizando una pipeta volumétrica, se transfirieron 10 mL de la solución de referencia de levetiracetam de concentración 60 µg/mL a un matraz volumétrico de 20 mL y se llevó a volumen con fase móvil (solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.01M pH 3.1 : ACN 95:5 v/v)

- Solución de reconstitución (Fase móvil). Solución amortiguadora de fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) 10 mM, pH: 3.1 : ACN (95:5 v/v).

Utilizando una pipeta volumétrica, se transfirieron 5 mL de ACN grado cromatográfico a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a volumen con solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.01M pH 3.1.

4.3. Optimización del método analítico.

Para establecer las condiciones ideales para la cuantificación del analito de interés en la matriz biológica, se comenzó con una profunda revisión bibliográfica⁽¹⁰⁻¹⁵⁾, principiando con la búsqueda de las propiedades fisicoquímicas que impacten para el análisis y separación del analito, posteriormente se consultaron trabajos publicados en donde hayan realizado determinaciones de levetiracetam en plasma, el sistema de detección en el cual se cuantificó, las condiciones del mismo y el método de extracción en matriz biológica. Después se eligió el intervalo de concentración al cual se cuantificaría en base a las dosis de los preparados farmacéuticos existentes y en particular para este trabajo, a la dosis que se administraría para el estudio de biodisponibilidad (tabletas de 1000 mg).

4.3.1. Condiciones cromatográficas.

Condiciones del detector.

Se utilizó un detector ultravioleta (UV-VIS) a 210 nm de longitud de onda, dato obtenido de la revisión bibliográfica.⁽¹⁰⁻¹²⁾

Columna cromatográfica.

Se utilizó la columna Pursuit C18 de 150 mm de longitud por 4.6 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula.

Fase móvil.

Se probó la solución amortiguadora de fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) 10 mM : ACN, modificando la proporción de acetonitrilo en un rango de 5 a 50%.

También se modificó el pH de la solución de fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) 10 mM en un rango de 2.6 a 4.5 unidades.

La elección de la fase móvil se realizó en base a aquella que proporcionara mejor resolución del pico de levetiracetam respecto a las interferencias endógenas provenientes de la matriz biológica y del frente de reactivos, así como de aquella que proporcionara un tiempo de retención razonable para el análisis de una gran cantidad de muestras.

Velocidad de flujo.

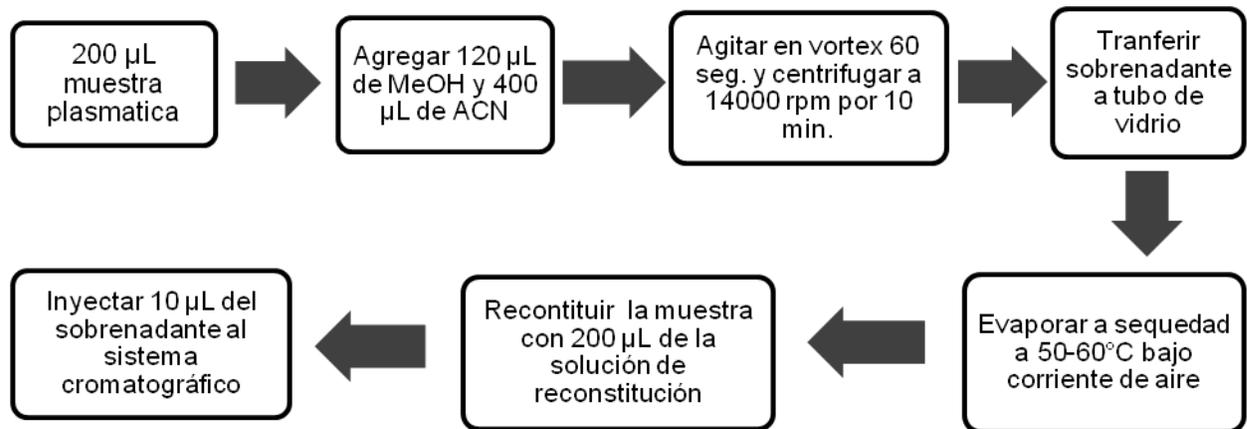
Se evaluaron velocidades de flujo de 1.0, 1.2 y 1.5 mL/min. La elección de este parámetro se realizó en base al que proporcionara mayor resolución del pico de levetiracetam respecto a interferencias endógenas, así como aquel que no provocara un cambio elevado de la presión del sistema cromatográfico.

4.3.2. Método de extracción.

Para la extracción de levetiracetam de plasma humano, en la bibliografía se reportan diferentes técnicas de extracción, entre ellas el método más sencillo, rápido y con un alto porcentaje de recobro es la precipitación de proteínas⁽¹¹⁾, por lo que en el presente trabajo se decidió optimizar dicha técnica.

Para extraer levetiracetam del plasma se probaron dos distintas técnicas mediante precipitación de proteínas (Figura 4). En el primer método (Método 1) se llevó a cabo mediante la precipitación de proteínas con una mezcla de MeOH:ACN y en el segundo (Método 2) mediante la precipitación de proteínas con ACN y posteriormente una extracción líquido-líquido con CH_2Cl_2 .

Método 1. Precipitación de proteínas.



Método 2. Precipitación de proteínas / Extracción líquido-líquido

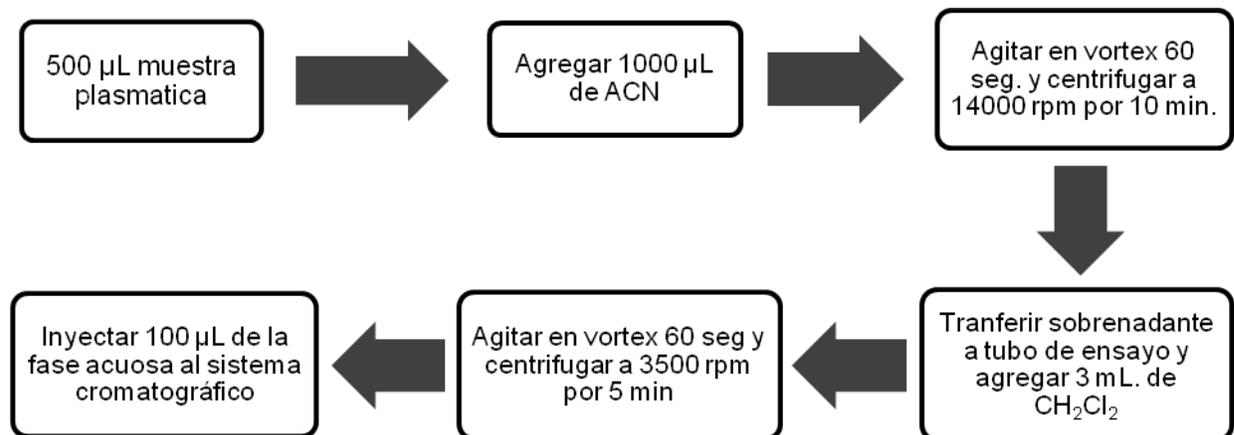


Figura 4. Evaluación de métodos de extracción.

4.4. Validación del método analítico.

Una vez establecidas las condiciones óptimas del método analítico, éste se validó siguiendo las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, del apartado que se refiere a la validación de métodos analíticos para el análisis químico de muestras biológicas en pruebas de bioequivalencia.

Al inicio de cada corrida analítica se evaluó la adecuabilidad del sistema y la selectividad del mismo. Para la adecuabilidad del sistema se realizaron seis inyecciones consecutivas de una solución de 30 µg/mL de levetiracetam. El sistema se consideró estable cuando el coeficiente de variación de la respuesta y del tiempo de retención del pico de levetiracetam fue menor al 2%, así como una simetría promedio del pico de levetiracetam menor a 2.0 y platos teóricos promedio de la columna mayor a 2000. La selectividad se evaluó inyectando un blanco de reactivos y uno de plasma, los cuales se analizaron por el método de extracción elegido a las condiciones cromatográficas establecidas. En ninguno de los casos se debían presentar interferencias con el pico de interés.

4.4.1. Preparación de la curva de calibración y puntos de control.

Se prepararon cada uno de los puntos de la curva de calibración y puntos control tal como se indica en la tabla 5, utilizando pipeta repetidora electrónica y puntas Combitip® de diferentes volúmenes. Se tomaron las alícuotas correspondientes, se depositaron en microtubos de 2 mL, se completó el volumen a 1 mL con una mezcla de plasma libre de fármaco y se agitó en vórtex por 30 segundos.

Tabla 5. Preparación de la curva de calibración y puntos de control

Volumen levetiracetam (1200 µg/mL) µL	Volumen levetiracetam (600 µg/mL) µL	Volumen levetiracetam (60 µg/mL) µL	H ₂ O µL	Plasma µL	Concentración levetiracetam (µg/mL)
50	-	-	-	950	60**
45	-	-	5	950	54
40	-	-	10	950	48*
30	-	-	20	950	36
25	-	-	25	950	30*
-	40	-	10	950	24
-	20	-	30	950	12
-	10	-	40	950	6
-	-	30	20	950	1.8*
-	-	20	30	950	1.2
-	-	10	40	950	0.6***
-	-	5	45	950	0.3****

*Puntos control.

** Limite superior de cuantificación.

*** Limite inferior de cuantificación.

**** Limite de detección.

4.4.2. Linealidad.

Se prepararon cinco curvas de calibración a partir de pesadas independientes en cinco días diferentes, contemplando las concentraciones de 0.6, 1.2, 6, 12, 24, 36, 54 y 60 µg/mL, tal y como se describe en la tabla 5 y posteriormente se procesaron de acuerdo al método de extracción optimizado.

La relación entre la respuesta cromatográfica con respecto a la concentración en cada curva de calibración, fue ajustado a través de una regresión lineal por mínimos cuadrados de la ecuación $y = mx + b$, con ponderación $1/x^2$, donde la variable “y” es el área de levetiracetam obtenida para la concentración nominal. Se consideró que el método cumplía con este parámetro, si al realizar el ajuste en cada una de las cinco curvas se obtenía un coeficiente de correlación mayor o igual a 0.99 y la desviación porcentual de la concentración recuperada (interpolada) con respecto a la nominal (adicionada) era menor o igual al $\pm 15\%$ en todos los puntos que constituyen la curva de calibración, a excepción del límite de cuantificación cuya desviación no debía ser mayor al $\pm 20\%$.

4.4.3. Precisión del método.

La precisión del método se evaluó como repetibilidad y reproducibilidad.

4.4.3.1. Repetibilidad.

A partir de una solución de referencia se prepararon y cuantificaron por sextuplicado, muestras plasmáticas con levetiracetam a una concentración de 1.8, 30 y 48 $\mu\text{g/mL}$ (puntos control) y se procesaron con el método de extracción optimizado, estas muestras no pertenecen a la curva, pero se encuentran dentro del intervalo de concentraciones establecido. Con los resultados obtenidos se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada para las seis determinaciones de cada nivel. El coeficiente de variación de cada muestra no debió ser mayor al $\pm 15\%$ respecto a la concentración nominal.

4.4.3.2. Reproducibilidad.

Para evaluar la reproducibilidad entre días se preparó una curva de calibración con muestras plasmáticas con levetiracetam a una concentración de 1.8, 30 y 48 µg/mL (puntos de control) por sextuplicado, durante tres días diferentes, empleando cada día una solución de referencia preparada recientemente.

Se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los puntos de control de calidad (concentración recuperada), para cada día. El coeficiente de variación global no debería ser mayor al ±15% en cada nivel de concentración.

4.4.4. Exactitud.

La exactitud se evaluó a partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, determinando la desviación absoluta del valor promedio de las concentraciones obtenidas en cada nivel, con respecto a la concentración nominal de la muestra. El valor promedio en cada nivel de concentración de los puntos control durante las pruebas realizadas para evaluar repetibilidad y reproducibilidad, debieron estar dentro del ±15% de su valor nominal correspondiente, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Desv. Abs.} = \frac{(\text{Concentración nominal} - \text{Concentración recuperada})}{\text{Concentración nominal}}$$

4.4.5. Recobro.

Se prepararon por sextuplicado los puntos control de levetiracetam en plasma (1.8, 30 y 48 $\mu\text{g/mL}$), se compararon sus respuestas cromatográficas (área de pico) promedio obtenidas después de aplicar la técnica de extracción en el fluido biológico contra la respuesta obtenida en muestras en solución preparadas a concentraciones equivalentes (tabla 6), las cuales no fueron sometidas al proceso de extracción.

Tabla 6. Preparación de puntos control en solución.

μL de levetiracetam 1200 $\mu\text{g/mL}$	μL de levetiracetam 60 $\mu\text{g/mL}$	Aforo con solución de reconstitución (mL)	Concentración levetiracetam ($\mu\text{g/mL}$)
40	-	1.0	48
25	-	1.0	30
-	30	1.0	1.8

El recobro no necesariamente debería ser del 100%, pero debió ser constante en los niveles de concentración evaluados. Los valores promedio individuales no deberían desviarse del promedio total en más del 15%.

4.4.6. Límite inferior de cuantificación (LIC) y límite de detección (LD).

Para el límite inferior de cuantificación inferior se prepararon por sextuplicado, muestras de levetiracetam en plasma a la concentración más baja del intervalo de la curva de calibración (0.6 $\mu\text{g/mL}$), las cuales fueron procesadas con el método de extracción establecido. Se calculó el coeficiente de variación y el porcentaje de

desviación absoluta. El promedio de estas muestras no debió desviarse más del $\pm 20\%$ del valor nominal, con un CV $< 20\%$.

El límite de detección es la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica se distingue del nivel del ruido (aproximadamente tres veces mayor). Se prepararon por sextuplicado, muestras de levetiracetam en plasma a la concentración de $0.3 \mu\text{g/mL}$, las cuales fueron procesadas con el método de extracción establecido.

4.4.7. Selectividad.

La selectividad del método fue determinada analizando las muestras de plasma provenientes de seis voluntarios sanos diferentes (de forma individual y en mezcla) sometiéndolas por duplicado al método de extracción. Se consideró que el método analítico era selectivo si en las seis muestras plasmáticas no se presentaba interferencia alguna en el tiempo de retención de levetiracetam.

También se evaluó la selectividad del método en muestras plasmáticas conteniendo fármacos de uso común como ácido salicílico ($250 \mu\text{g/mL}$), naproxeno ($50 \mu\text{g/mL}$), paracetamol ($20 \mu\text{g/mL}$), anticoagulante (heparina 143 unidades USP), y muestras plasmáticas hemolizadas y lipémicas.

4.4.8. Estabilidad.

Se realizó esta prueba para determinar el efecto de los cambios de temperatura sobre la estabilidad del analito (ciclos congelación-descongelación), así como de las condiciones de temperatura y tiempo en las que el compuesto permanece estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, evaluando la concentración recuperada del compuesto por analizar en la matriz biológica.

Se consideró que las muestras de levetiracetam en plasma son estables si no presentan coeficientes de variación mayores al 15% con respecto a las concentraciones interpoladas en la condición evaluada y una diferencia no mayor al 15% con respecto a los valores de referencia (muestras recién preparadas).

Se evaluó la estabilidad de levetiracetam en plasma bajo las siguientes condiciones:

4.4.8.1. Estabilidad a temperatura ambiente y refrigeración.

Para evaluar la estabilidad de levetiracetam en plasma almacenada a temperatura ambiente (23-24°C) y en refrigeración (2-3°C), se prepararon series de muestras de 1.8, 30 y 48 µg/mL (puntos control) de levetiracetam en plasma, las cuales fueron almacenadas a temperatura ambiente y en refrigeración durante 24 y 48h. Las muestras se procesaron a las 24 y 48 horas con el método de extracción establecido y fueron comparadas contra muestras de reciente preparación para cada tiempo evaluado.

4.4.8.2. Estabilidad ciclos congelación-descongelación.

Se prepararon tres series de muestras plasmáticas correspondientes a los puntos de control (1.8, 30 y 48 µg/mL) de levetiracetam y se almacenaron en el ultracongelador (-70°C) dejando las muestras un periodo mínimo de 12 horas a -70°C entre cada ciclo. Se procesó una serie cada día con el fin de evaluar tres ciclos de congelación-descongelación con el método de extracción establecido y se compararon contra muestras preparadas recientemente para cada ciclo.

4.4.8.3. Estabilidad muestra procesada.

Para determinar la estabilidad de la muestra procesada, se prepararon por sextuplicado los puntos de control (1.8, 30 y 48 µg/mL) de levetiracetam en plasma, las cuales se sometieron al procedimiento de extracción y se inyectaron al sistema cromatográfico. Las muestras se almacenaron en el automuestreador y se inyectaron de nuevo a las 24, 48 y 72 horas después de su preparación y fueron comparadas contra muestras preparadas recientemente para cada tiempo evaluado.

4.4.8.4. Estabilidad muestra evaporada.

Para determinar la estabilidad de la muestra evaporada se preparó una serie de muestras de 1.8, 30 y 48 µg/mL (puntos control) de levetiracetam en plasma, la cual se sometió al procedimiento de extracción establecido sin aplicar el paso de reconstitución. Las muestras procesadas permanecieron evaporadas y se almacenaron en refrigeración (2 - 3 °C) durante 96 horas, posteriormente a dicho periodo se reconstituyeron e inyectaron; estas fueron comparadas contra muestras control preparadas el mismo día.

4.4.8.5. Estabilidad a largo plazo.

Para evaluar la estabilidad en plasma de levetiracetam a largo plazo se prepararon series de muestras de 1.8, 30 y 48 µg/mL (puntos control), las cuales fueron almacenadas en el ultracongelador a -70 °C por 284 días. Cumplido el lapso de tiempo se procesaron las muestras con el método de extracción establecido y fueron comparadas contra muestras preparadas el mismo día en que se evaluó dicha prueba.

4.4.9. Tolerancia del método.

La tolerancia evalúa la capacidad del método analítico para obtener resultados confiables ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo que proporcionan una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.

Se evaluaron las siguientes condiciones:

4.4.9.1. Prueba de integridad de la dilución (concentración dentro de la curva de calibración).

Se evaluó la capacidad del método para cuantificar muestras empleando una dilución 1:2 de la muestra. La prueba se realizó cuantificando una muestra de 48 µg/mL de levetiracetam por sextuplicado, en donde se emplearon 100 µL de la muestra (mitad de la muestra establecida por el método de extracción elegido) y se completó el volumen con 100 µL de mezcla de plasma libre de fármaco y se sometió a las condiciones establecidas para la extracción. Se consideró que la prueba era aceptable si la diferencia de concentraciones entre las muestras extraídas con el volumen normal y la concentración calculada empleando la mitad del volumen y multiplicando por un factor de dilución de 2 no excedía el 15% del promedio del valor nominal.

4.4.9.2. Prueba de integridad de la dilución (concentración por encima de la curva de calibración).

Se realizó esta prueba para el caso en el que durante el estudio se presentaran muestras que superen el límite superior de la curva de calibración, para ello se prepararon por sextuplicado muestras del analito en plasma con una concentración de (100 µg/mL). Se aplicó el proceso de extracción empleando la

mitad de la muestra establecida en la metodología elegida (100 μ L) y completando el volumen a 200 μ L con mezcla plasma libre de fármaco y posteriormente se determinó la concentración del analito. La concentración interpolada y multiplicada por un factor de dilución de 2 no debía desviarse más del $\pm 15\%$ con respecto al valor nominal con un CV menor o igual al $\pm 15\%$.

4.5. Etapa clínica.

La etapa clínica del estudio se realizó en el área clínica del centro de Investigación Farmacológica y Biofarmacéutica S.A. de C.V (IFaB). Se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos señalados en la Ley General de Salud y el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Todos los sujetos participaron de manera voluntaria en el estudio para lo cual firmaron una carta de aceptación y una carta de consentimiento donde fueron informados de la naturaleza y fines del estudio, de los efectos secundarios del fármaco y las indicaciones a seguir durante la realización del mismo.

Las muestras plasmáticas fueron obtenidas de voluntarios sanos de nacionalidad mexicana clínicamente sanos, a los cuales se les realizaron las siguientes pruebas:

- Hematología: hemoglobina, hematocrito, cuenta total de glóbulos blancos con diferencial y cuenta de plaquetas.
- Química sanguínea de 24 elementos
- Marcadores para hepatitis B y C.
- Detección de VIH.
- Examen general de orina.
- Prueba de abuso de drogas.
- Prueba cualitativa de embarazo (si aplica).
- Electrocardiograma.

En el estudio participaron 25 voluntarios sanos de nacionalidad mexicana (13 hombres y 12 mujeres), a los que se les administró una tableta en dosis única de 1000 mg de levetiracetam (KEPPRA®).⁽²⁸⁾

4.5.1. Criterios de inclusión.

- La participación de los sujetos en el estudio de levetiracetam fue de manera voluntaria.
- Se incluyeron solamente voluntarios sanos de nacionalidad mexicana, de entre 18 a 40 años de edad.
- El índice de masa corporal de los voluntarios sanos estuvo entre 18 a 27 kg/m².
- Cada voluntario contaba con un buen estado de salud determinado por los resultados de una historia clínica completa realizada por médicos capacitados y los estudios de laboratorio realizados en laboratorios clínicos certificados.
- Los límites de variación permitidos dentro de la normalidad en la visita de selección fueron: tensión arterial (sentado) de 90 a 130 mmHg la sistólica y de 60 a 90 mmHg la diastólica, frecuencia cardíaca entre 55 y 100 latidos por minuto y frecuencia respiratoria entre 14 y 20 respiraciones por minuto.

4.5.2. Criterios de exclusión.

- Se eliminó del estudio a todo aquel voluntario que no cumplió con los criterios de inclusión propuestos.
- A los individuos que se les encontró alguna alteración en sus signos vitales registrados en la selección de voluntarios se les excluyó del estudio.
- No se incluyeron los sujetos que mostraron antecedentes de drogadicción o de abuso de fármacos.

- Los sujetos que revelaron resultados positivos a la prueba de embarazo.
- Voluntarios que se encontraran bajo medicación.
- Voluntarios que fueron hospitalizados por cualquier problema durante los cuatro meses previos al inicio del estudio.
- Voluntarios que hayan recibido fármacos en investigación dos meses antes del presente estudio.
- Sujetos que donaron o perdieron 450 mL o más de sangre dentro de los 2 meses previos al inicio del estudio.

4.5.3. Retiro de voluntarios.

Los sujetos podían ser retirados del estudio por no cumplir con el protocolo o en opinión del médico por razones médicas (eventos adversos), estos sujetos no podrían ser reemplazados. Cualquier sujeto era libre de dejar de participar en el estudio si así lo deseaba en cualquier momento.

En caso del retiro de algún voluntario, todos los datos y muestras para biodisponibilidad, debían ser enviados a la valoración analítica y anexar la razón del porqué se retiró del estudio.

4.5.4. Tratamiento.

A cada voluntario se le administró una tableta de 1000 mg de levetiracetam (KEPPRA®, lote: ZHK419, caducidad: Julio 2011)⁽²⁸⁾ en dosis única, cuya ingesta se llevó a cabo con 250 mL de agua purificada. Previo a la administración, los voluntarios permanecieron en ayuno de 10 horas.

Las muestras sanguíneas, fueron recolectadas y procesadas para obtener el plasma, antes de la administración (predosis) y a las 0.167, 0.333, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 17, 22 y 36 horas (18 muestras), después de la

administración del medicamento. Las muestras se conservaron en el ultracongelador a -70 °C hasta ser analizadas de acuerdo al método analítico validado.

4.5.5. Análisis de las muestras plasmáticas.

Se realizó el análisis de 450 muestras correspondientes a 25 voluntarios, las cuales fueron procesadas y cuantificadas utilizando el método de cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de ultravioleta previamente optimizado y validado.

Durante cada corrida analítica se evaluó la adecuabilidad del sistema cromatográfico realizando seis inyecciones consecutivas de la solución de 30 µg/mL de levetiracetam.

Cada día de análisis se comprobó que no existieran interferencias en el pico de interés con la matriz biológica utilizada (blanco de plasma), al igual que el blanco de reactivos (solución de reconstitución).

Las muestras del estudio se analizaron junto con una curva de calibración y puntos control por duplicado (intercalados proporcionalmente en toda la corrida analítica) con una concentración de 1.8, 30 y 48 µg/mL. Para evaluar la validez de la corrida analítica se debió demostrar la consistencia de las curvas de calibración con respecto a la pendiente y al coeficiente de correlación en cada día de análisis y los puntos control debieron cumplir con los criterios de precisión y exactitud establecidos en la validación del método.

4.6. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos.

Los parámetros farmacocinéticos fueron determinados a través de métodos no compartimentales (modelo independiente), considerando los siguientes aspectos:

4.6.1. Cálculo de parámetros farmacocinéticos.

C_{max}: Concentración plasmática máxima obtenida de manera gráfica, a partir del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo.

T_{max}: Tiempo transcurrido desde la administración hasta que se produce la concentración plasmática máxima, obtenido de manera gráfica a partir del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo.

ABC_{0-t}: Área bajo la curva de la concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo t (último tiempo de muestreo) calculada por el método trapezoidal.

El procedimiento para el cálculo de este parámetro se describe en la siguiente fórmula:

$$ABC_{0-t} = \sum_{i=1}^n \frac{(C_i + C_{i-1})(t_i - t_{i-1})}{2}$$

Donde:

n= número de tiempos de muestreo utilizados en el perfil plasmático.

t_i= tiempo en que se realiza la i-ésima toma de muestra

C_i= Concentración obtenida en el i-ésimo tiempo de muestreo.

ABC_{0-inf}: Área bajo la curva de la concentración plasmática desde la administración al tiempo extrapolado al infinito.

$$ABC_{0-\text{inf}} = ABC_{0-t} + \frac{C_p \text{ última}}{K_e}$$

Donde:

$C_p \text{ última}$ = Última concentración plasmática cuantificable

K_e = Constante de eliminación

K_e : Constante de eliminación, se estima a partir de la porción lineal terminal del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo (en escala semilogarítmica).

Vida media de eliminación:

$$t_{1/2} = \frac{\text{Ln}2}{K_e}$$

$TMR_{0-\text{inf}}$: Tiempo medio de residencia extrapolado a tiempo infinito

$$TMR_{0-\text{inf}} = \frac{ABCM_{0-\text{inf}}}{ABC_{0-\text{inf}}}$$

Donde:

$ABC_{0-\text{inf}}$ = Área bajo la curva de concentración de fármaco a tiempo infinito

$ABCM_{0-\text{inf}}$ = Área bajo la curva del primer momento a tiempo infinito

$ABCM_{0-\text{inf}}$: Área bajo la curva del primer momento de tiempo cero a tiempo infinito

$$ABCM_{0-\text{inf}} = ABCM_t^0 + \frac{t_{\text{ultimo}} C_p \text{ ultimo}}{K_e} + \frac{C_p}{K_e^2}$$

$$ABCM_{0-\text{inf}} = \sum_{i=1}^n \frac{(t_{i-1} C_{i-1} + t_i C_i)(t_i - t_{i-1})}{2} + \frac{t_{\text{ultimo}} C_p \text{ ultimo}}{K_e} + \frac{C_p}{K_e^2}$$

5.0. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

5.1. Optimización del método analítico.

Las condiciones ideales para la optimización del método analítico se realizaron en base a los siguientes criterios:

- Sensibilidad.
- Resolución entre el pico de levetiracetam e interferencias de la matriz biológica.
- Simetría de los picos.
- Eficiencia de la columna en la separación de los compuestos.
- Tiempo de retención del analito, para tener una corrida breve.

5.1.1. Condiciones cromatográficas.

Se utilizó un detector UV-Vis marca Waters, modelo 486 a una longitud de onda de 210 nm. Una columna cromatográfica Pursuit C18 150 mm x 4.6 mm y 5 µm de tamaño de partícula. A estas condiciones se obtuvo la sensibilidad para cuantificar el analito de interés en plasma, picos con simetría de 1.1 en promedio y resolución mayor a 1.5 para la integración adecuada del pico del levetiracetam respecto a interferencias endógenas.

Fase móvil y velocidad de flujo.

Se evaluaron distintas proporciones de fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) 10 mM : ACN en la fase móvil; la proporción de 95:5 v/v es la que presentó la mejor separación del pico de levetiracetam con respecto a interferencias endógenas del plasma (selectividad), tiempo de retención de 7.2 min y simetría de 1.1 en promedio. Se determinó que existe una gran dependencia al pH para las

interferencias endógenas de plasma, específicamente para una pequeña interferencia plasmática que se retiene aproximadamente a los 6.5 min, causando conflictos de integración con el analito de interés. El problema se resolvió evaluando cambios pequeños de pH, siendo el valor de pH de 3.1 el óptimo en términos de resolución ($R_s \geq 1.5$). Valores por arriba o por debajo de 0.5 unidades de pH provocaron conflictos de integración; sin embargo, el uso de la solución amortiguadora de fosfato de sodio aseguró que el pH se mantuviera sin variaciones que causaran las alteraciones mencionadas. Con respecto a la velocidad de flujo el valor de 1.2 mL/min. es el que proporcionó la mejor separación y tiempos de retención razonables para el análisis de un gran número de muestras.

Por lo tanto al final de la optimización, las condiciones cromatográficas elegidas (Tabla 7) para la cuantificación de levetiracetam en plasma fueron las siguientes:

Tabla 7. Condiciones cromatográficas finales.

Detector	UV-Vis
Longitud de onda	210 nm
Columna	Pursuit C18, 150 x 4.6 mm, 5 μ m.
Fase móvil	Solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.01 M, pH 3.1 : Acetonitrilo (95:5 v/v)
Velocidad de flujo	1.2 mL/min
Volumen de inyección	10 μ L
Temperatura columna	45°C
Tiempo de retención aproximado	Levetiracetam 6.7 – 7.7 minutos

5.1.2. Método de extracción.

Se evaluaron dos técnicas de extracción de levetiracetam del plasma humano, el criterio para la elección de la técnica fue la cantidad recuperada (% Recobro)

después del proceso de extracción comparada contra muestras a concentraciones equivalentes en solución y la selectividad del método para la cuantificación de levetiracetam. Con el método 1 (precipitación de proteínas con MeOH:ACN) se obtuvo un recobro promedio del 90.0%, mientras que para el método 2 (precipitación de proteínas con ACN y extracción liquido-liquido con CH₂Cl₂) se obtuvo un recobro promedio del 35%. En cuanto la selectividad, el método 1 presentó un perfil cromatográfico que permitió la correcta integración del pico de levetiracetam. Por lo tanto el método 1 se eligió como técnica de extracción para la cuantificación de levetiracetam en plasma.

A continuación (Figura 5) se presenta el diagrama detallado para la extracción del analito de interés:

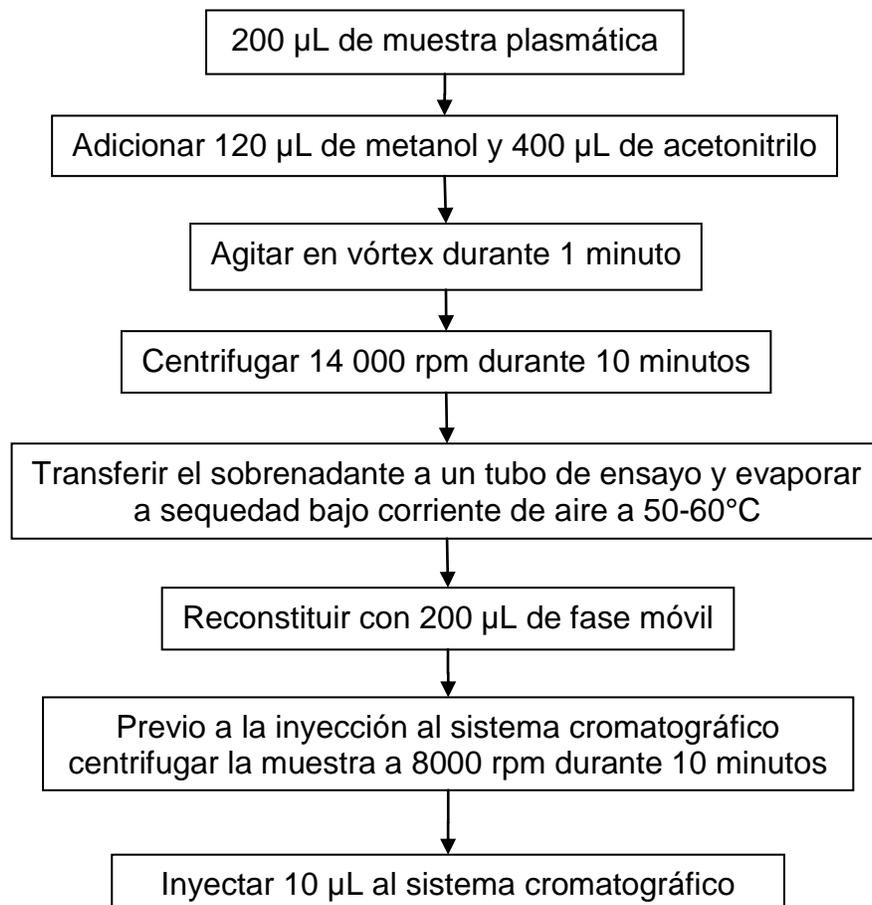


Figura 5. Diagrama de extracción.

5.2. Resultados de la validación del método analítico.

5.2.1. Selectividad.

La selectividad del método fue determinada, analizando muestras plasmáticas provenientes de seis voluntarios sanos (individuales y en mezcla) así como muestras conteniendo fármacos de uso común, como ácido salicílico (250 µg/mL), naproxeno (50 µg/mL), paracetamol (20 µg/mL) y el anticoagulante (Heparina 143 unidades USP). Se evaluó también la posible interferencia de muestras hemolizadas y lipémicas. Las sustancias evaluadas no mostraron interferencias con los picos de interés (Figura 6).

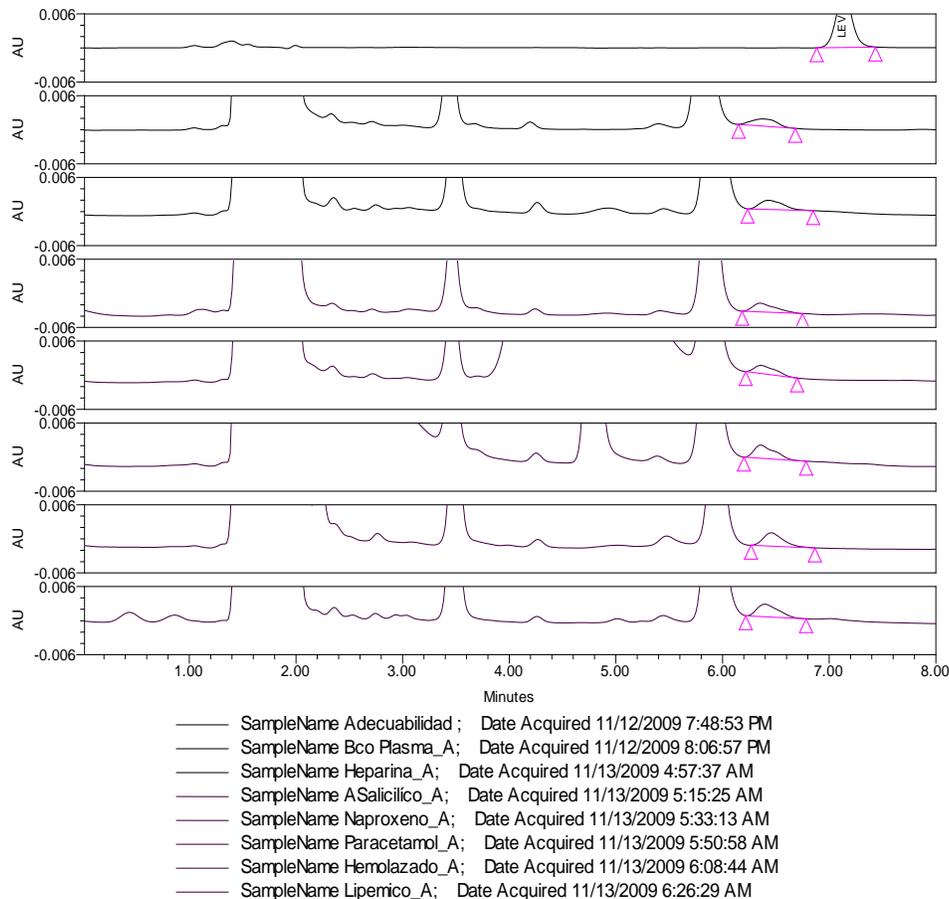


Figura 6. Selectividad del método y selectividad para fármacos de uso común.

Una vez que se demostró la selectividad del método al plasma proveniente de los seis individuos, tanto de las muestras individuales como a una pequeña mezcla de ellos en partes iguales, se realizó la mezcla en la misma proporción de todo el volumen de plasma de cada voluntario, resultando en total 1100 mL, el cual se usó durante toda la validación.

5.2.2. Linealidad.

En la tabla 8 se muestra los resultados de la prueba de linealidad para las cinco curvas de calibración en plasma. La relación entre la respuesta cromatográfica con respecto a la concentración en cada curva de calibración fue ajustado a través de una regresión lineal por mínimos cuadrados a la ecuación $y = mx + b$, con ponderación $1/x^2$, donde la variable “y” es la respuesta analítica (área de levetiracetam) obtenida para su respectiva concentración nominal “x” de levetiracetam (Figura 7).

Tabla 8. Linealidad del método (concentración recuperada en $\mu\text{g/mL}$).

Conc. Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	0.6	1.2	6	12	24	36	54	60
Curva 1	0.610	1.158	6.018	12.025	23.761	35.943	54.627	60.751
Curva 2	0.600	1.208	5.846	11.576	23.593	38.789	55.923	57.479
Curva 3	0.609	1.176	5.828	10.915	25.865	37.265	50.927	64.109
Curva 4	0.603	1.195	5.869	11.873	23.604	36.225	54.641	61.817
Curva 5	0.589	1.245	6.068	12.047	23.377	35.000	53.288	62.010
Promedio	0.602	1.196	5.926	11.687	24.040	36.644	53.881	61.233
DE	0.008	0.033	0.109	0.471	1.029	1.445	1.896	2.426
CV (%)	1.406	2.769	1.846	4.029	4.282	3.944	3.519	3.962
Desv. Abs. (%)	0.367	0.300	1.237	2.607	0.167	1.790	0.220	2.055

Tabla 9. Parámetros de linealidad del método.

Curva	Pendiente	Ordenada	r
1	7603.086	-819.016	0.9998
2	7723.932	-1213.956	0.9990
3	7264.183	-1095.580	0.9978
4	7852.860	-905.618	0.9998
5	7743.711	-1730.783	0.9996
Promedio	7637.554		
DE	226.760		
CV (%)	2.969		

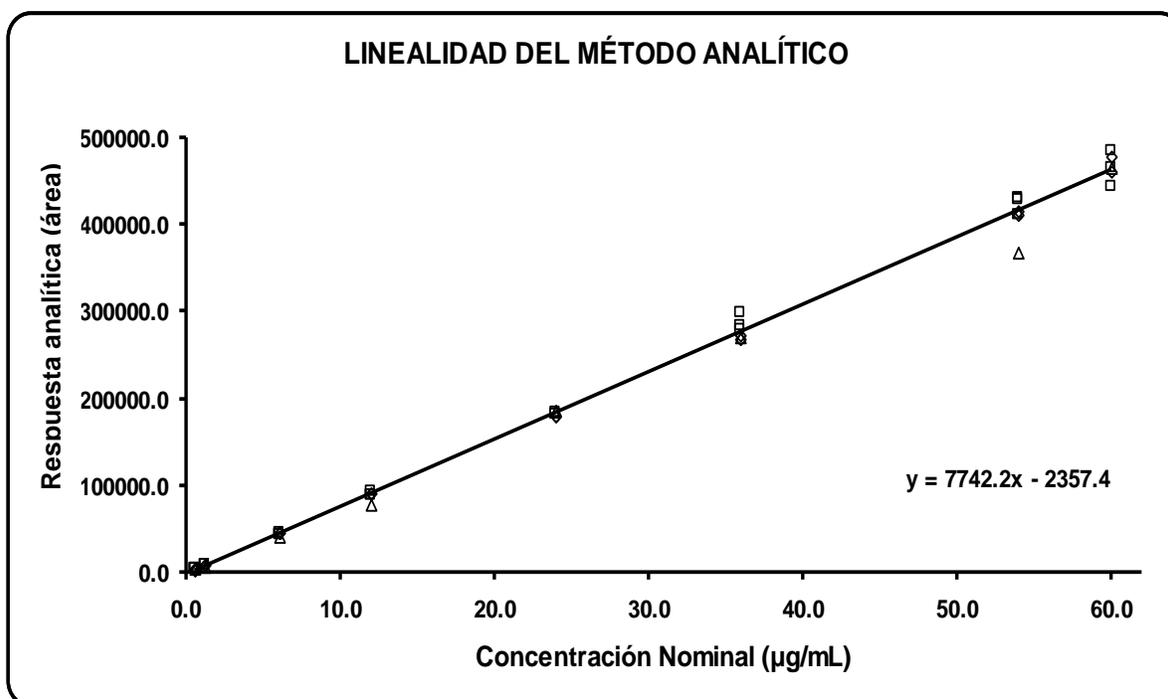


Figura 7. Linealidad del método analítico.

El método demostró ser lineal en el intervalo de concentraciones de 0.6 a 60 $\mu\text{g/mL}$; todos los valores de "r" obtenidos fueron mayores a 0.99 (Tabla 9). En cada punto de la curva de calibración se dio cumplimiento a los criterios

establecidos para precisión y exactitud, es decir CV% y desviación absoluta porcentual menor o igual al 15% respectivamente y 20% para el límite de cuantificación (Tabla 8).

5.2.3. Precisión.

5.2.3.1. Repetibilidad.

En la tabla 10 se presentan los resultados correspondientes a la repetibilidad, en los cuales se puede observar que el coeficiente de variación en cada uno de los niveles de concentración evaluados fue menor o igual que 3.731%, mientras que la desviación absoluta (Desv. Abs %) fue menor o igual que 2.611%.

Tabla 10. Repetibilidad del método analítico.

Muestra	Control bajo (1.8 µg/mL)	Control medio (30 µg/mL)	Control alto (48 µg/mL)
1	1.779	28.835	49.670
2	1.728	29.133	49.347
3	1.685	28.656	45.111
4	1.758	29.472	48.503
5	1.781	30.228	50.072
6	1.787	29.267	47.943
Promedio	1.753	29.265	48.441
DE	0.040	0.556	1.807
C V (%)	2.266	1.898	3.731
Desv. Abs. (%)	2.611	2.449	0.919

5.2.3.2. Reproducibilidad y exactitud.

Tabla 11. Reproducibilidad del método analítico.

Día	Concentración recuperada		
	Control bajo (1.8 µg/mL)	Control medio (30 µg/mL)	Control alto (48 µg/mL)
Día 1	1.779	28.835	49.670
	1.728	29.133	49.347
	1.685	28.656	45.111
	1.758	29.472	48.503
	1.781	30.228	50.072
	1.787	29.267	47.943
Día 2	1.543	33.671	48.329
	1.945	27.022	48.065
	1.480	29.986	46.501
	1.549	30.018	45.947
	1.545	29.774	46.157
	1.512	29.580	47.967
Día 3	2.001	31.448	51.307
	1.797	30.557	48.455
	1.888	31.259	50.572
	1.769	30.178	49.486
	1.762	30.854	49.250
	1.920	31.103	50.190
Promedio	1.735	30.058	48.493
DE	0.155	1.399	1.705
CV (%)	8.955	4.654	3.516
Desv. Abs. (%)	3.750	0.193	1.027

En base a los resultados (Tabla 11) se observa que el coeficiente de variación entre los diferentes días de trabajo fue de 3.516 a 8.955%, mientras que la desviación absoluta porcentual fue igual o menor a 3.750% en las diferentes concentraciones evaluadas.

De acuerdo con los resultados generados, el método fue repetible, reproducible y exacto entre días al cumplir con los criterios de un coeficiente de variación y una desviación absoluta % no mayores al 15% para la concentración plasmática promedio.

5.2.4. Recobro.

El recobro del método analítico para cuantificar levetiracetam en plasma (Tabla 12) fue constante en las concentraciones evaluadas (muestras control), dando como resultado un recobro global del 90.890% y una desviación de los promedios individuales con respecto al global, menor al 15%.

Tabla 12. Recobro del método analítico.

Nivel de concentración	Áreas		Recobro	% Desv.
	Sistema	Método		
Control bajo (1.8 µg/mL)	11932	10702		
	11646	13806		
	11735	10216		
	12373	10751		
	11567	10722		
	11632	10465		
Promedio	11814	11110	94.042	3.469
Control medio (30 µg/mL)	257737	258857		
	254255	207501		
	257336	230397		
	252423	230643		
	251382	228760		
	254845	227262		
Promedio	254663	230570	90.539	0.385
Control alto (48 µg/mL)	421428	372073		
	404495	370037		
	406167	357954		
	417820	353675		
	408107	355301		
	414910	369283		
Promedio	412155	363054	88.087	3.084
Promedio Global			90.890	

5.2.5. Límite de detección (LD) y límite inferior de cuantificación (LIC).

La sensibilidad del método fue determinada a partir de la concentración mínima cuantificable o límite inferior de cuantificación (LIC) y del límite de detección (LD). En la tabla 13 se muestran los resultados.

Tabla 13. Evaluación del límite de detección (LD) y límite inferior de cuantificación (LIC).

Muestra	Concentración recuperada	
	Límite de detección (0.3 µg/mL)	Límite inferior de cuantificación (0.6 µg/mL)
1	0.317	0.583
2	0.330	0.549
3	0.313	0.586
4	0.291	0.551
5	0.304	0.547
6	0.331	0.554
Promedio	0.314	0.562
DE	0.015	0.018
CV (%)	4.894	3.180
Desv. Abs. (%)	4.778	6.389

Para el método analítico se determinó la concentración de 0.6 µg/mL como el límite inferior de cuantificación (CV%= 3.180 y Desv. Abs%= 6.389).

Al presentar una relación de señal ruido de 3.23 se estableció como límite de detección la concentración de 0.3 µg/mL (CV%= 4.894 y Desv. Abs%= 4.778).

En la figura 8 se muestra el cromatograma característico de las muestras pertenecientes al límite de cuantificación y de detección.

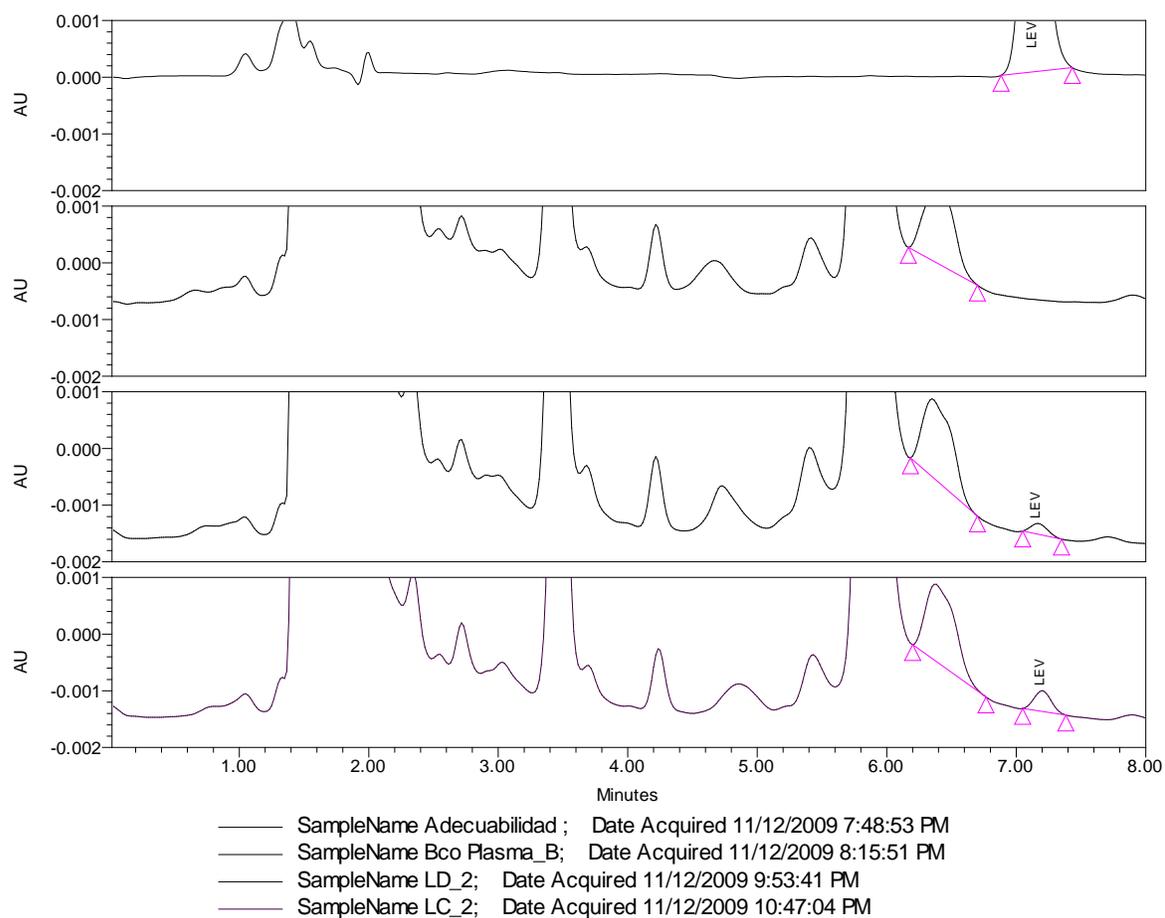


Figura 8. Límite de detección y límite inferior de cuantificación.

5.2.6. Estabilidad.

5.2.6.1. Ciclos de congelación-descongelación.

En la tabla 14, 15 y 16 se muestran los resultados del análisis de las muestras plasmáticas después de ser sometidas a los tres ciclos de congelación-descongelación ya descritos.

Tabla 14. Estabilidad del primer ciclo congelación-descongelación.

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (1.8 µg/mL)	Control medio (30 µg/mL)	Control alto (48 µg/mL)
1	1.543	33.671	48.329
2	1.945	27.022	48.065
3	1.480	29.986	46.501
4	1.549	30.018	45.947
5	1.545	29.774	46.157
6	1.512	29.580	47.967
Promedio	1.596	30.009	47.161
DE	0.173	2.125	1.072
CV (%)	10.852	7.080	2.274
Concentraciones plasmáticas después del ciclo 1			
1	1.738	28.840	45.501
2	1.723	28.386	43.791
3	1.689	28.563	48.169
4	1.765	29.581	44.932
5	1.671	28.679	46.614
6	1.668	29.059	44.806
Promedio	1.709	28.851	45.636
DE	0.039	0.425	1.548
CV (%)	2.296	1.475	3.392
Desv. Abs. (%)	7.103	3.856	3.235

Tabla 15. Estabilidad del segundo ciclo congelación-descongelación.

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (1.8 µg/mL)	Control medio (30 µg/mL)	Control alto (48 µg/mL)
1	2.001	31.448	51.307
2	1.797	30.557	48.455
3	1.888	31.259	50.572
4	1.769	30.178	49.486
5	1.762	30.854	49.250
6	1.920	31.103	50.190
Promedio	1.856	30.900	49.877
DE	0.096	0.471	1.019
CV (%)	5.169	1.526	2.043
Concentraciones plasmáticas después del ciclo 2			
1	1.914	31.720	50.501
2	1.893	32.093	51.651
3	1.880	31.532	51.712
4	1.958	30.960	49.433
5	1.970	32.562	50.929
6	1.929	32.642	50.272
Promedio	1.924	31.918	50.750
DE	0.035	0.644	0.871
CV (%)	1.844	2.019	1.717
Desv. Abs. (%)	3.654	3.296	1.750

Tabla 16. Estabilidad del tercer ciclo congelación-descongelación.

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (1.8 µg/mL)	Control medio (30 µg/mL)	Control alto (48 µg/mL)
1	1.704	32.964	46.536
2	1.732	29.340	47.381
3	1.664	29.775	46.206
4	1.789	29.013	46.718
5	1.713	29.613	47.444
6	1.699	29.965	45.112
Promedio	1.717	30.112	46.566
DE	0.042	1.437	0.861
CV (%)	2.433	4.772	1.848
Concentraciones plasmáticas después del ciclo 3			
1	1.792	31.453	48.199
2	1.824	31.152	48.130
3	1.838	29.518	48.086
4	1.882	29.148	49.125
5	1.718	29.817	49.164
6	1.925	30.456	48.151
Promedio	1.830	30.257	48.476
DE	0.072	0.921	0.519
CV (%)	3.927	3.044	1.071
Desv. Abs. (%)	6.582	0.484	4.101

Como se observa la prueba cumple con los tres ciclos de congelación-descongelación a los que se sometió las muestras plasmáticas de levetiracetam, al presentar coeficientes de variación menores al 15% y una diferencia no mayor al 15% con respecto al valor de referencia (muestras recién preparadas) por lo que se puede concluir que las muestras plasmáticas conteniendo levetiracetam son estables después de tres ciclos congelación-descongelación a -70°C.

5.2.6.2. Estabilidad a temperatura ambiente y refrigeración.

En las siguientes tablas se muestran los resultados del análisis de las muestras sometidas a estabilidad en condiciones de temperatura ambiente y refrigeración. Se observa que las muestras almacenadas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C) y en refrigeración (2-3°C) son estables durante 48 horas, ya que para todos los puntos control presentan una desviación absoluta menor a 15% con respecto al valor de muestras control de calidad recién preparadas.

Tabla 17. Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente 24 h.

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (1.8 µg/mL)	Control medio (30 µg/mL)	Control alto (48 µg/mL)
1	1.543	33.671	48.329
2	1.945	27.022	48.065
3	1.480	29.986	46.501
4	1.549	30.018	45.947
5	1.545	29.774	46.157
6	1.512	29.580	47.967
Promedio	1.596	30.009	47.161
DE	0.173	2.125	1.072
CV (%)	10.852	7.080	2.274
Concentraciones plasmáticas después de 24 h			
1	2.442*	29.387	45.805
2	1.721	28.194	48.296
3	1.726	29.203	44.054
4	1.742	30.546	45.823
5	1.749	29.149	47.888
6	1.769	28.508	47.576
Promedio	1.741	29.165	46.574
DE	0.019	0.816	1.625
CV (%)	1.102	2.799	3.489
Desv. Abs. (%)	9.133	2.813	1.245

* Valor que excede el 15% de su concentración nominal y que no fue tomado en cuenta para los cálculos

Tabla 18. Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente 48h.

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (1.8 µg/mL)	Control medio (30 µg/mL)	Control alto (48 µg/mL)
1	2.001	31.448	51.307
2	1.797	30.557	48.455
3	1.888	31.259	50.572
4	1.769	30.178	49.486
5	1.762	30.854	49.250
6	1.920	31.103	50.190
Promedio	1.856	30.900	49.877
DE	0.096	0.471	1.019
CV (%)	5.169	1.526	2.043
Concentraciones plasmáticas después de 48 h			
1	1.917	32.466	52.537
2	1.915	31.789	50.750
3	2.072*	32.169	52.259
4	1.902	32.608	51.219
5	1.970	32.118	52.156
6	2.023	32.219	50.660
Promedio	1.945	32.228	51.597
DE	0.051	0.286	0.821
CV (%)	2.601	0.888	1.592
Desv. Abs. (%)	4.807	4.299	3.449

* Valor que excede el 15% de su concentración nominal y que no fue tomado en cuenta para los cálculos.

Tabla 19. Estabilidad de la muestra en refrigeración 24 h.

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (1.8 µg/mL)	Control medio (30 µg/mL)	Control alto (48 µg/mL)
1	1.543	33.671	48.329
2	1.945	27.022	48.065
3	1.480	29.986	46.501
4	1.549	30.018	45.947
5	1.545	29.774	46.157
6	1.512	29.580	47.967
Promedio	1.596	30.009	47.161
DE	0.173	2.125	1.072
CV (%)	10.852	7.080	2.274
Concentraciones plasmáticas después de 24 h			
1	1.697	28.809	47.718
2	1.622	28.114	47.393
3	1.644	28.938	44.336
4	1.687	28.880	41.833
5	1.682	28.945	47.869
6	1.731	30.478	46.754
Promedio	1.677	29.027	45.984
DE	0.039	0.778	2.412
CV (%)	2.318	2.679	5.245
Desv. Abs. (%)	5.108	3.270	2.496

Tabla 20. Estabilidad de la muestra en refrigeración 48 h.

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (1.8 µg/mL)	Control medio (30 µg/mL)	Control alto (48 µg/mL)
1	2.001	31.448	51.307
2	1.797	30.557	48.455
3	1.888	31.259	50.572
4	1.769	30.178	49.486
5	1.762	30.854	49.250
6	1.920	31.103	50.190
Promedio	1.856	30.900	49.877
DE	0.096	0.471	1.019
CV (%)	5.169	1.526	2.043
Concentraciones plasmáticas después de 48 h			
1	1.951	32.192	50.607
2	1.836	32.312	51.684
3	1.816	31.184	51.928
4	1.868	31.285	50.514
5	2.024	31.453	51.737
6	1.850	31.641	49.981
Promedio	1.891	31.678	51.075
DE	0.080	0.473	0.808
CV (%)	4.241	1.492	1.583
Desv. Abs. (%)	1.868	2.518	2.403

5.2.6.3. Estabilidad de la muestra procesada.

Las muestras procesadas permanecieron en el automuestreador a 15°C y fueron inyectadas a las 24, 48 y 72 horas posteriores a su procesamiento, estas fueron comparadas con muestras control de reciente preparación en cada día de análisis de estabilidad de la muestra procesada. Se presentan solo los resultados para las muestras correspondientes a 72 horas después del procesamiento.

En base a los resultados de la tabla 21, se observa que levetiracetam es estable en la solución de inyección durante 72 horas después de su preparación.

Tabla 21. Estabilidad de la muestra procesada 72 h.

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (1.8 µg/mL)	Control medio (30 µg/mL)	Control alto (48 µg/mL)
1	1.704	32.964	46.536
2	1.732	29.340	47.381
3	1.664	29.775	46.206
4	1.789	29.013	46.718
5	1.713	29.613	47.444
6	1.699	29.965	45.112
Promedio	1.717	30.112	46.566
DE	0.042	1.437	0.861
CV (%)	2.433	4.772	1.848
Concentraciones plasmáticas después de 72 h			
1	1.791	34.081	48.739
2	1.692	28.705	46.576
3	1.672	30.585	47.205
4	1.675	28.285	47.385
5	1.547	29.098	48.728
6	1.833	28.662	50.356
Promedio	1.702	29.903	48.165
DE	0.101	2.198	1.379
CV (%)	5.925	7.351	2.862
Desv. Abs. (%)	0.883	0.694	3.433

5.2.6.4. Estabilidad de la muestra evaporada.

Los resultados se presentan en la tabla 22, en la cual se puede observar que levetiracetam es estable después de 96 horas a partir de su evaporación.

Tabla 22. Estabilidad de la muestra evaporada 96 h

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (1.8 µg/mL)	Control medio (30 µg/mL)	Control alto (48 µg/mL)
1	1.704	32.964	46.536
2	1.732	29.340	47.381
3	1.664	29.775	46.206
4	1.789	29.013	46.718
5	1.713	29.613	47.444
6	1.699	29.965	45.112
Promedio	1.717	30.112	46.566
DE	0.042	1.437	0.861
CV (%)	2.433	4.772	1.848
Concentraciones plasmáticas después de 96 h			
1	1.727	27.716	49.033
2	1.535	29.149	45.833
3	1.549	28.865	43.290
4	1.515*	27.825	47.023
5	1.625	27.390	44.348
6	1.579	27.784	45.912
Promedio	1.588	28.122	45.907
DE	0.078	0.709	2.015
CV (%)	4.912	2.519	4.389
Desv. Abs. (%)	7.485	6.609	1.417

5.2.6.5. Estabilidad a largo plazo.

Los resultados se presentan en la tabla 23, se observa que las muestras plasmáticas de levetiracetam son estables después de 284 días almacenadas a -70°C .

Tabla 23. Estabilidad a largo plazo 284 días.

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (1.8 $\mu\text{g/mL}$)	Control medio (30 $\mu\text{g/mL}$)	Control alto (48 $\mu\text{g/mL}$)
1	1.727	28.999	48.398
2	1.765	29.686	47.605
3	1.896	29.805	47.438
4	1.760	31.054	47.156
5	1.804	28.199	52.941
6	1.862	29.561	48.714
Promedio	1.802	29.551	48.709
DE	0.065	0.946	2.157
CV (%)	3.613	3.201	4.427
Concentraciones plasmáticas después de 284 días			
1	1.800	30.088	47.986
2	1.829	29.698	49.853
3	1.828	31.062	48.286
4	1.786	30.580	48.693
5	1.836	30.005	47.866
6	1.821	31.456	53.739
Promedio	1.817	30.482	49.404
DE	0.019	0.677	2.242
CV (%)	1.071	2.221	4.537
Desv. Abs. (%)	0.795	3.150	1.427

5.2.7. Tolerancia del método.**5.2.7.1. Prueba de integridad de la dilución (concentración dentro de la curva de calibración).**

El objetivo de esta prueba consistió en evaluar la capacidad del método para cuantificar muestras empleando una dilución 1:2 en casos de no contar con la cantidad suficiente de muestra (200 µL), con la limitante que la concentración interpolada (sin aplicar el factor de dilución) no debe estar debajo del límite de cuantificación (0.6 µg/mL).

Tabla 24. Integridad de dilución (concentración dentro de la curva de calibración).

Levetiracetam (valor nominal de 48.0 µg/mL)	
Muestra	Concentración interpolada considerando el factor de dilución de 2
1	49.315
2	43.027
3	49.061
4	46.402
5	43.736
6	49.067
Promedio	46.768
DE	2.841
CV (%)	6.074
Desv. Abs. (%)	2.567

Los resultados demuestran que es posible en caso de no contar con la cantidad de muestra suficiente, tomar una cantidad menor de ella y completar a 200 µL con plasma libre de fármaco sin que el resultado se vea afectado.

5.2.7.2. Prueba de integridad de la dilución (concentración por encima de la curva de calibración).

El objetivo de esta prueba consistió en evaluar la capacidad del método para cuantificar muestras empleando una dilución 1:2 en casos de que alguna muestra exceda la concentración del punto más alto de la curva de calibración (60 µg/ml), ya que no es permitido extrapolar concentraciones, debido a que fuera del rango no está demostrada la linealidad del método.

Tabla 25. Integridad de dilución (concentración por encima de la curva de calibración)

Levetiracetam (valor nominal de 100.0 µg/mL)	
Muestra	Concentración interpolada considerando el factor de dilución de 2
1	101.520
2	96.386
3	94.807
4	97.251
5	97.138
6	98.139
Promedio	97.540
DE	2.247
CV (%)	2.304
Desv. Abs. (%)	2.460

Los resultados muestran que en caso de que alguna muestra presentara concentración por encima del punto más alto de la curva de calibración, se podría utilizar un volumen de 100 µL y añadir 100 µL de plasma libre de fármaco para procesarla ya que el valor que se genera cumple con los parámetros de exactitud establecidos.

Los resultados demuestran que se podría realizar una dilución 1:2 sin afectar la precisión y exactitud al cuantificar levetiracetam en muestras plasmáticas.

5.3. Etapa clínica.

En el estudio participaron 25 voluntarios (12 mujeres y 13 hombres) de nacionalidad mexicana clínicamente sanos demostrado a través de exámenes de laboratorio.

5.3.1. Estadística demográfica descriptiva.

A partir de los datos demográficos de los individuos que participaron en el estudio se calcularon los siguientes parámetros: media, desviación estándar, error estándar, mediana, máximo y coeficiente de variación (Tabla 26). Los datos demográficos individuales se encuentran en el anexo I.

Tabla 26. Estadística descriptiva de las variables demográficas.

Variable	Genero	N	Media	DE	EE	Min.	Mediana	Max.	CV%
Edad (años)	Hombres	13	25.31	5.59	1.55	18.00	24.00	36.00	22.08
	Mujeres	12	27.42	5.53	1.60	18.00	28.00	37.00	20.19
	Global	25	26.32	5.55	1.11	18.00	25.00	37.00	21.09
Peso (kg)	Hombres	13	66.57	8.70	2.41	51.30	65.50	85.80	13.06
	Mujeres	12	57.22	6.78	1.96	46.50	60.00	74.80	11.85
	Global	25	62.08	9.03	1.81	46.50	62.45	85.80	14.55
Talla (cm)	Hombres	13	169.54	7.99	2.22	159.00	168.00	181.00	4.71
	Mujeres	12	154.42	3.50	1.01	149.00	155.00	168.00	2.27
	Global	25	162.28	9.85	1.97	149.00	160.00	181.00	6.07
IMC (kg/m ²)	Hombres	13	23.13	2.18	0.60	19.55	23.19	27.06	9.44
	Mujeres	12	23.96	2.40	0.69	20.03	24.97	27.38	10.03
	Global	25	23.53	2.28	0.46	19.55	23.42	27.38	9.70

5.3.2. Estadística descriptiva de los datos de concentración plasmática promedio de levetiracetam con respecto al tiempo.

A continuación se presentan los valores promedio y las graficas promedio en escala normal y semilogarítmica de la concentración plasmática en cada tiempo de muestreo. Los datos de concentración plasmática y las gráficas de las concentraciones plasmáticas en escala normal y semilogarítmica correspondientes a cada individuo se muestran en el anexo II y anexo III respectivamente.

Tabla 27. Estadística descriptiva de los datos de concentración plasmática promedio con respecto al tiempo.

Tiempo (h)	N	Media (µg/mL)	DE (µg/mL)	EE (µg/mL)	Min. (µg/mL)	Mediana (µg/mL)	Max. (µg/mL)	CV%
0	25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-
0.167	25	1.36	1.74	0.35	0.00	0.00	5.52	128.08
0.333	25	16.52	14.48	2.90	0.67	12.19	47.27	87.65
0.5	25	27.45	13.40	2.68	2.60	28.74	49.81	48.81
0.75	25	34.95	11.20	2.24	11.77	34.71	59.72	32.04
1	25	32.02	8.66	1.73	12.19	30.98	51.48	27.05
1.25	25	30.10	7.38	1.48	14.81	29.47	47.33	24.53
1.5	25	28.86	6.91	1.38	18.12	28.54	41.94	23.95
1.75	25	27.3	5.87	1.17	17.36	27.61	38.83	21.52
2	25	26.44	5.59	1.12	17.99	26.07	37.53	21.16
3	25	23.61	4.45	0.89	16.62	23.1	32.84	18.87
4	25	21.23	3.89	0.78	15.01	20.68	29.43	18.32
6	25	16.93	2.95	0.59	12.23	17.02	23.46	17.42
9	25	11.78	1.89	0.38	8.57	11.78	15.31	16.05
12	25	8.16	1.35	0.27	5.51	8.13	11.28	16.54
17	25	4.52	0.75	0.15	3.18	4.31	6.68	16.6
22	25	2.72	0.55	0.11	2.08	2.66	4.63	20.37
36	25	0.59	0.47	0.09	NC	0.70	1.35	80.79

NC: No cuantificable

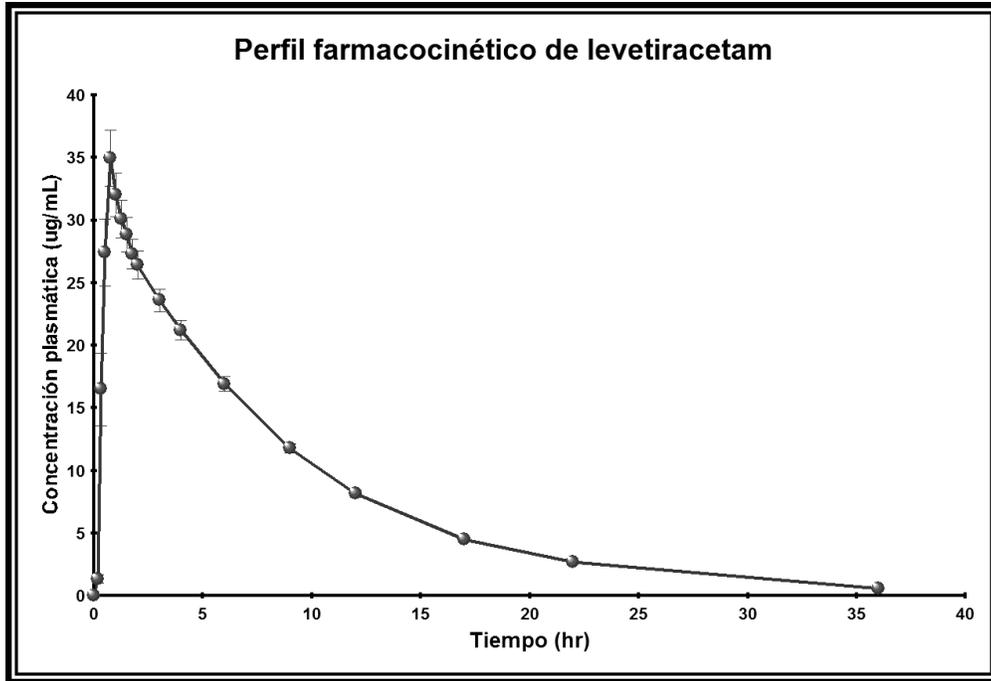


Figura 9. Concentración plasmática promedio de levetiracetam con respecto al tiempo (escala normal).

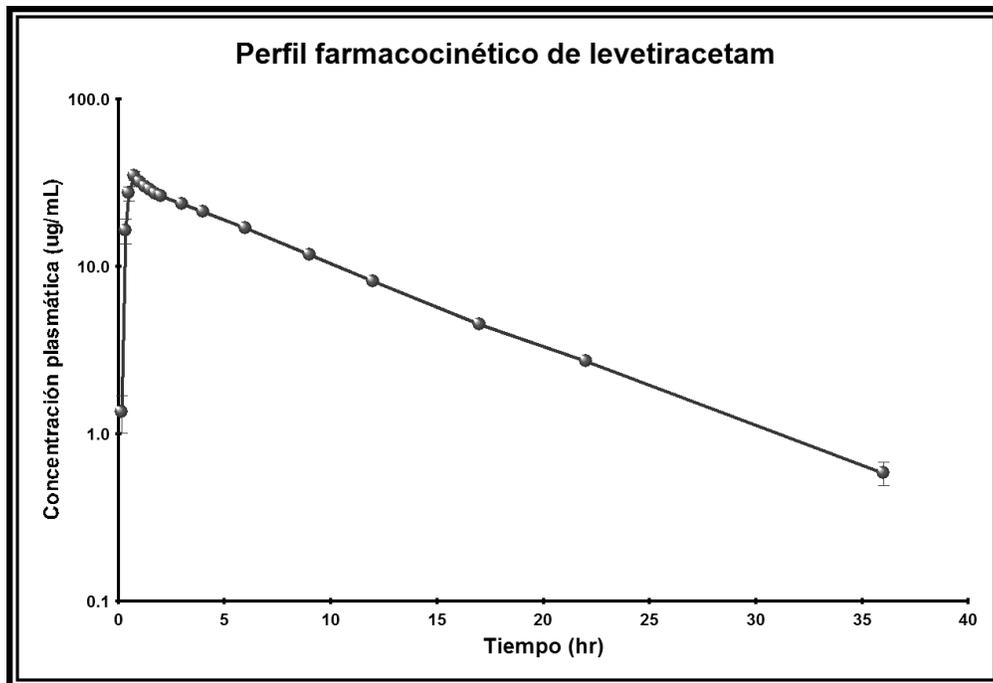


Figura 10. Concentración plasmática promedio de levetiracetam con respecto al tiempo (escala semilogarítmica).

5.3.3. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos de levetiracetam.

En la tabla 28 se muestran los datos farmacocinéticos promedio determinados. Los datos correspondientes a cada individuo se presentan en el anexo IV.

Tabla 28. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos de levetiracetam.

Variable	N	Media	DE	EE	Min.	Mediana	Max.	CV%
T_{max} (h)	25	0.900	0.520	0.100	0.500	0.750	3.000	57.27
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	25	40.430	8.190	1.640	26.700	40.030	59.720	20.26
ABC_{0-t} ($\text{h}\cdot\mu\text{g/mL}$)	25	274.120	41.420	8.280	205.410	266.700	368.480	15.11
ABC_{0-inf} ($\text{h}\cdot\mu\text{g/mL}$)	25	287.230	41.210	8.240	224.010	281.890	382.470	14.35
K_e (h^{-1})	25	0.106	0.018	0.004	0.0780	0.101	0.137	16.76
$t_{1/2}$ (h)	25	6.690	1.100	0.220	5.060	6.840	8.910	16.44
TMR_{0-inf} (h)	25	9.260	1.000	0.200	7.690	9.270	10.830	10.81

6.0. CONCLUSIONES.

Se optimizó un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar levetiracetam en plasma humano, el cual es rápido y sencillo. Se validó el método en base a la Norma Oficial Mexicana (NOM-177-SSA1-1998) “que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, así como los requisitos que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen estas pruebas”. El método demostró ser lineal, preciso y exacto en el rango de 0.6 - 60.0 $\mu\text{g/mL}$ y con una recuperación en plasma del 90.89% en promedio. Se demostró que las muestras de levetiracetam en plasma son estables a temperatura ambiente (23 °C) y refrigeración (2-3 °C) hasta por 48 horas, almacenadas a -70 °C por 284 días, después de ser sometidas a tres ciclos congelación-descongelación y como muestra procesada y evaporada por 72 y 96 horas respectivamente.

Por lo tanto el método es confiable para la cuantificación de levetiracetam en plasma y puede ser aplicado en algún estudio de biodisponibilidad o bioequivalencia.

El método se aplicó en un estudio de biodisponibilidad con 25 voluntarios de nacionalidad mexicana. Se obtuvieron los siguiente parámetros farmacocinéticos: $ABC_{0-t} = 274.12 \pm 41.42 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$, $ABC_{0-\infty} = 287.23 \pm 41.21 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$, $t_{1/2} = 6.69 \pm 1.10 \text{ h}$, $t_{\text{max}} = 0.90 \pm 0.52 \text{ h}$, $C_{\text{max}} = 40.43 \pm 8.19 \mu\text{g/mL}$ y $K_e = 0.106 \pm 0.018 \text{ (h}^{-1}\text{)}$.

7.0 ANEXOS.**7.1. Anexo I. Datos demográficos de los participantes en el estudio.**

Voluntario	Sexo	Edad (años)	Peso (kg)	Talla (cm)	IMC (kg/m²)
1	Mujer	25	60.5	156	24.86
2	Mujer	25	56.4	149	25.40
3	Mujer	37	63.8	156	26.22
4	Mujer	20	51.9	150	23.07
5	Hombre	24	59.0	159	23.34
6	Hombre	23	71.0	169	24.86
7	Mujer	28	64.0	158	25.64
8	Mujer	30	47.5	154	20.03
9	Mujer	26	67.5	157	27.38
10	Hombre	25	66.6	179	20.79
11	Hombre	32	65.5	167	23.49
12	Mujer	31	50.7	151	22.24
13	Hombre	21	60.1	161	23.19
14	Hombre	20	64.8	168	22.96
15	Mujer	24	57.2	161	22.07
16	Hombre	28	78.0	179	24.34
17	Hombre	21	63.4	168	22.46
18	Hombre	18	70.0	178	22.09
19	Mujer	31	60.6	154	25.55
20	Hombre	30	85.8	181	26.19
21	Mujer	34	60.0	155	24.97
22	Mujer	18	46.5	152	20.13
23	Hombre	31	68.4	159	27.06
24	Hombre	36	61.5	174	20.31
25	Hombre	20	51.3	162	19.55

7.2. Anexo II. Concentraciones plasmáticas de levetiracetam para cada voluntario en los diferentes tiempos de muestreo.

Tiempo nominal (horas)	Vol.1 (µg/mL)	Vol. 2 (µg/mL)	Vol. 3 (µg/mL)	Vol. 4 (µg/mL)	Vol. 5 (µg/mL)	Vol. 6 (µg/mL)	Vol. 7 (µg/mL)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.05
0.33	7.30	1.47	1.74	0.91	0.67	0.99	30.03
0.5	24.72	10.38	6.36	2.60	19.99	3.63	41.09
0.75	40.43	22.43	18.60	15.49	31.82	11.77	46.54
1	35.27	32.83	21.83	27.31	34.57	12.19	40.57
1.25	30.21	29.47	35.74	32.10	30.53	14.81	35.69
1.5	29.02	27.15	31.37	34.94	29.08	18.12	33.41
1.75	28.04	28.87	29.48	34.29	27.80	17.36	31.93
2	27.52	31.76	26.04	31.78	26.07	20.99	31.67
3	25.48	26.01	23.10	27.71	23.20	26.70	28.04
4	23.09	24.37	19.92	24.89	20.68	22.07	25.61
6	18.43	19.82	16.70	19.45	16.62	18.17	19.85
9	12.91	13.08	12.54	12.35	12.62	13.45	14.32
12	8.69	9.07	9.17	8.22	8.53	9.15	9.74
17	4.16	4.66	5.54	4.26	5.11	5.45	5.19
22	2.29	2.43	3.49	2.08	3.21	3.12	3.20
36	NC	NC	0.95	NC	1.07	1.12	0.89

NC: No cuantificable

Tiempo nominal (horas)	Vol. 8 (µg/mL)	Vol. 9 (µg/mL)	Vol. 10 (µg/mL)	Vol. 11 (µg/mL)	Vol. 12 (µg/mL)	Vol. 13 (µg/mL)	Vol. 14 (µg/mL)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.17	0.00	3.71	0.00	0.77	3.05	0.00	0.00
0.33	8.99	24.65	19.29	16.52	39.24	1.46	10.12
0.5	32.28	31.03	31.29	28.74	43.11	45.40	18.98
0.75	55.87	34.33	36.17	46.17	35.10	42.82	28.16
1	51.48	32.26	27.06	32.31	36.89	30.98	27.04
1.25	46.33	29.45	24.07	27.61	38.38	27.30	23.67
1.5	40.37	28.54	23.30	25.29	41.94	26.10	22.94
1.75	37.74	27.61	21.80	23.45	36.51	24.52	22.73
2	37.53	27.20	22.71	22.04	37.09	24.09	22.10
3	32.84	23.68	19.80	20.04	30.21	20.45	19.65
4	29.43	20.73	17.57	18.73	26.94	18.09	18.51
6	23.46	17.41	14.36	14.13	20.85	13.95	14.45
9	15.10	10.85	10.78	9.81	13.86	10.20	10.56
12	9.79	7.20	8.13	6.73	9.90	6.87	7.18
17	5.07	3.96	4.38	4.10	5.19	3.76	4.00
22	2.69	2.16	2.93	2.66	2.80	2.37	2.48
36	0.69	NC	0.93	NC	NC	0.96	0.65

NC: No cuantificable

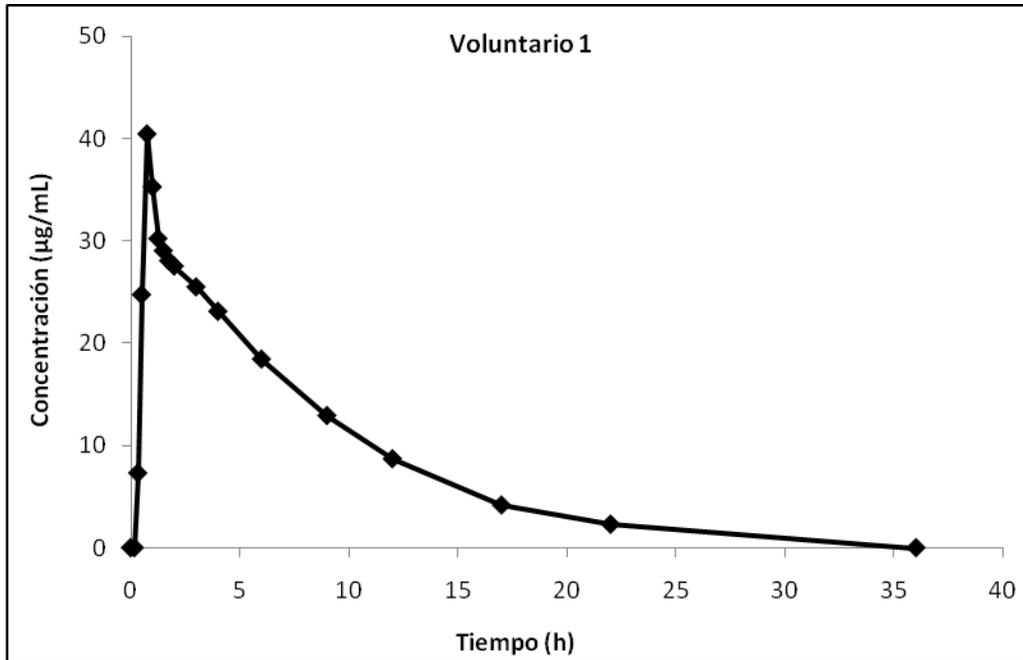
Tiempo nominal (horas)	Vol. 15 (µg/mL)	Vol. 16 (µg/mL)	Vol. 17 (µg/mL)	Vol. 18 (µg/mL)	Vol. 19 (µg/mL)	Vol. 20 (µg/mL)	Vol. 21 (µg/mL)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.17	2.77	2.92	5.52	4.29	0.00	3.17	0.00
0.33	21.21	12.19	43.45	47.27	2.11	33.20	7.09
0.5	30.62	17.65	46.11	49.81	15.19	35.69	28.56
0.75	33.48	33.77	30.09	34.71	34.78	27.19	43.47
1	29.26	26.07	25.40	26.94	30.96	21.57	38.54
1.25	26.33	23.46	23.30	24.62	35.48	21.27	33.31
1.5	25.41	22.31	20.63	22.29	40.03	19.53	34.43
1.75	25.75	20.93	21.02	21.77	32.25	18.68	32.34
2	23.22	20.01	19.37	21.22	29.61	17.99	31.70
3	21.44	18.11	17.91	20.04	24.71	16.62	28.80
4	18.96	16.51	16.64	17.71	22.19	15.01	26.10
6	15.04	14.32	13.06	14.58	17.26	12.23	21.23
9	9.70	10.46	8.84	10.10	12.00	8.57	15.31
12	6.55	7.84	5.51	7.51	7.55	6.35	11.28
17	3.65	4.67	3.18	4.22	3.76	3.97	6.68
22	2.20	3.02	2.18	2.70	2.22	2.49	4.63
36	0.70	0.97	NC	0.67	NC	0.71	1.35

NC: No cuantificable

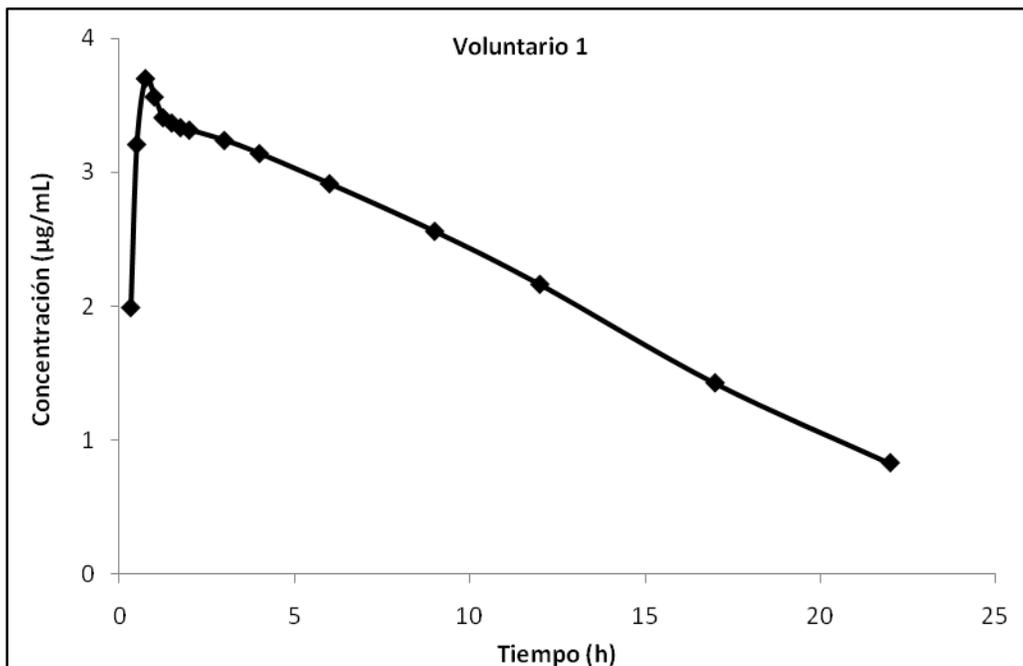
Tiempo nominal (horas)	Vol. 22 (µg/mL)	Vol. 23 (µg/mL)	Vol. 24 (µg/mL)	Vol. 25 (µg/mL)
0	0.00	0.00	0.00	0.00
0.17	0.00	0.88	2.17	3.66
0.33	8.17	18.28	32.20	24.40
0.5	21.12	35.26	40.42	26.13
0.75	33.12	36.24	59.72	41.39
1	50.20	29.51	42.50	37.11
1.25	47.33	26.53	34.72	30.70
1.5	41.17	25.34	30.25	28.66
1.75	38.83	23.83	28.18	26.68
2	35.05	21.08	26.81	26.36
3	31.44	19.38	22.52	22.42
4	27.65	17.95	20.48	20.81
6	20.15	13.50	17.02	17.19
9	13.80	10.28	11.78	11.27
12	9.53	7.33	8.71	7.54
17	4.62	4.31	4.97	4.25
22	2.33	2.59	3.14	2.70
36	NC	0.96	1.02	1.01

NC: No cuantificable

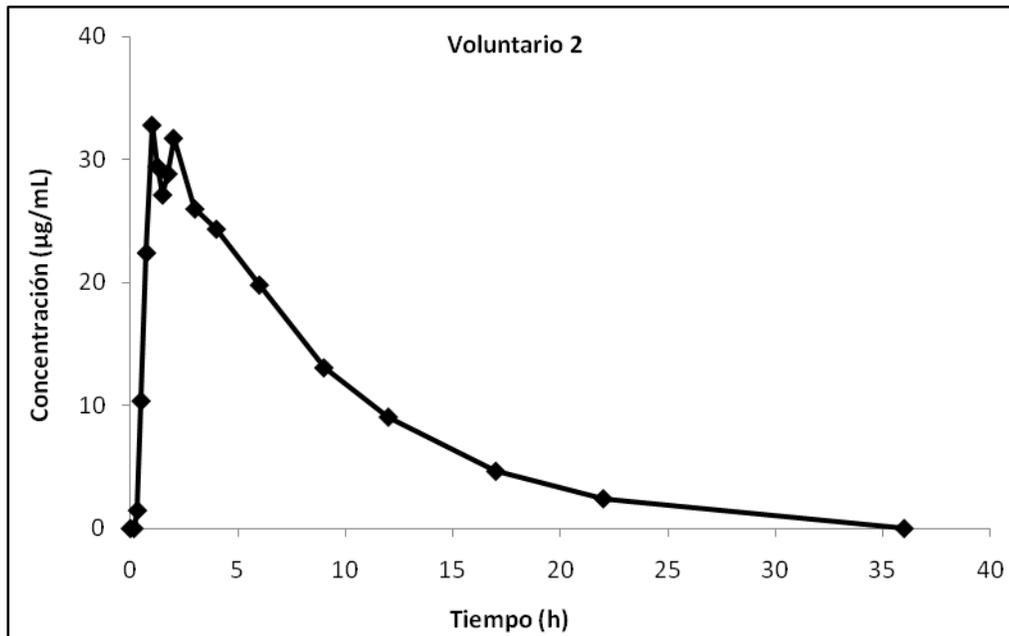
7.3. Anexo III. Graficas de concentración plasmática en escala normal y escala semilogarítmica con respecto al tiempo por cada voluntario.



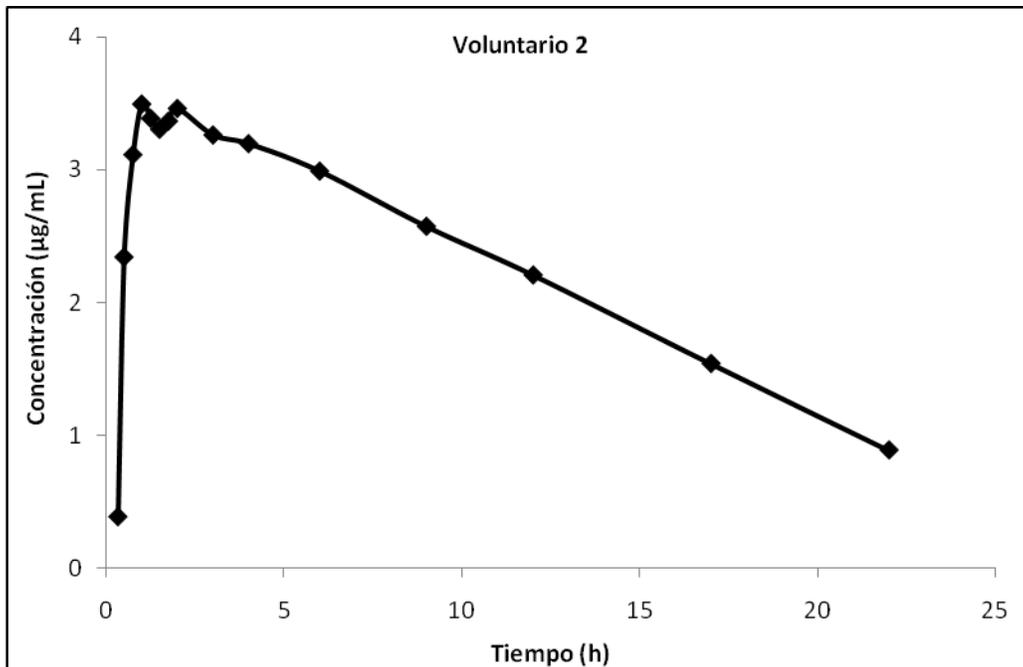
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 1 (escala normal).



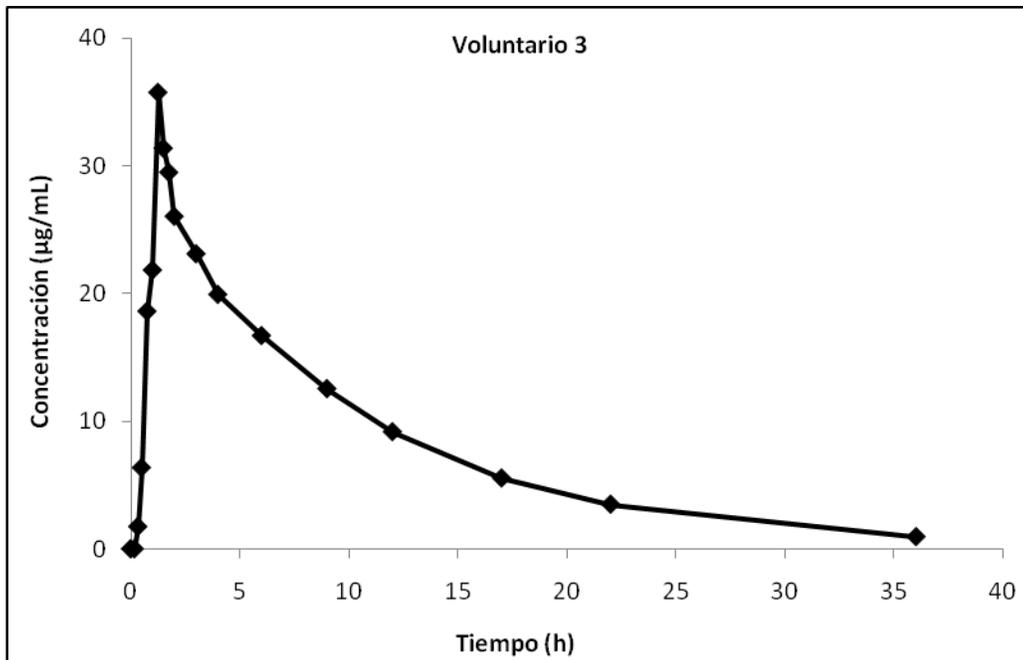
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 1 (semilogarítmica).



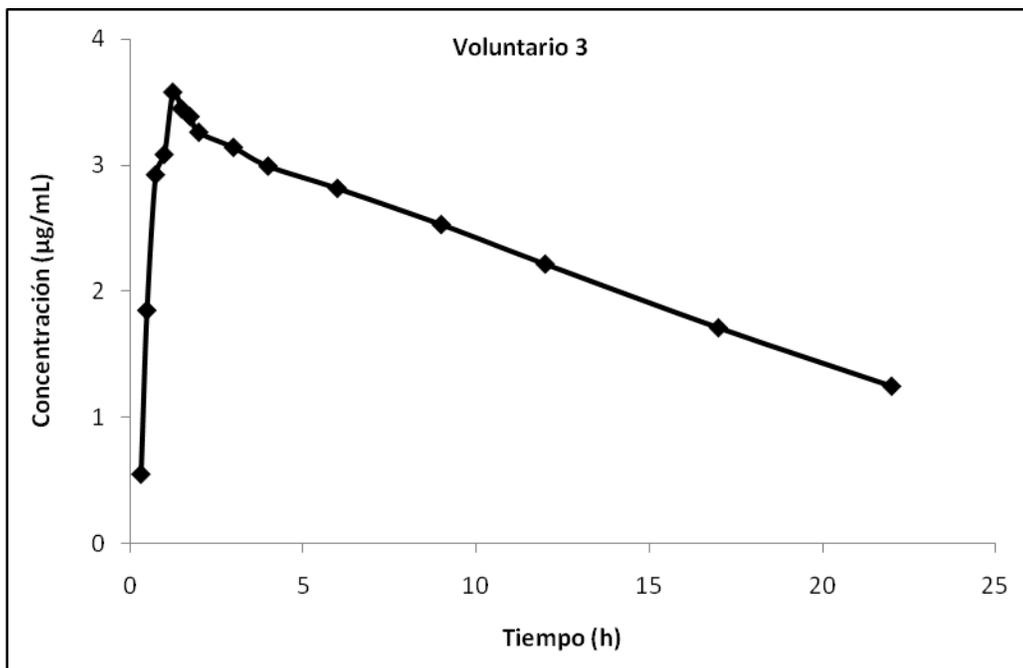
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 2 (escala normal).



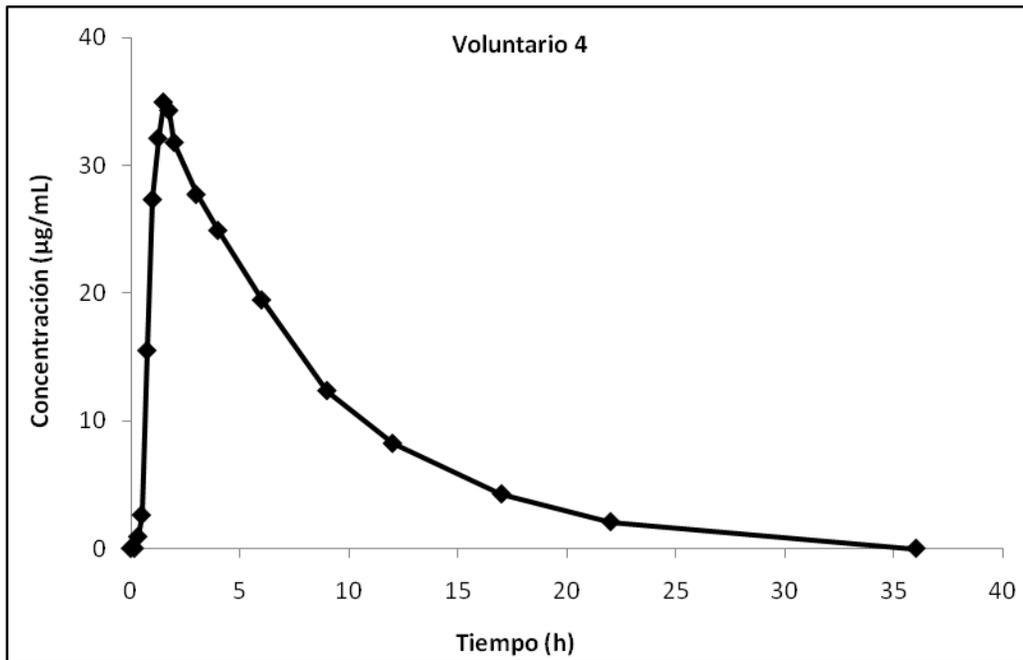
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 2 (semilogarítmica).



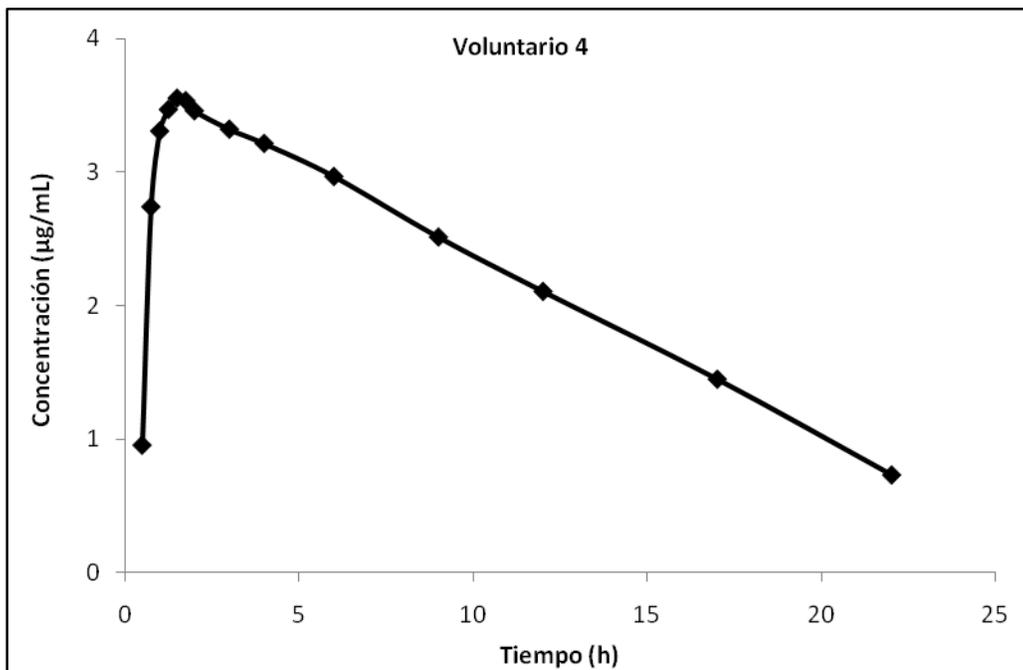
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 3 (escala normal).



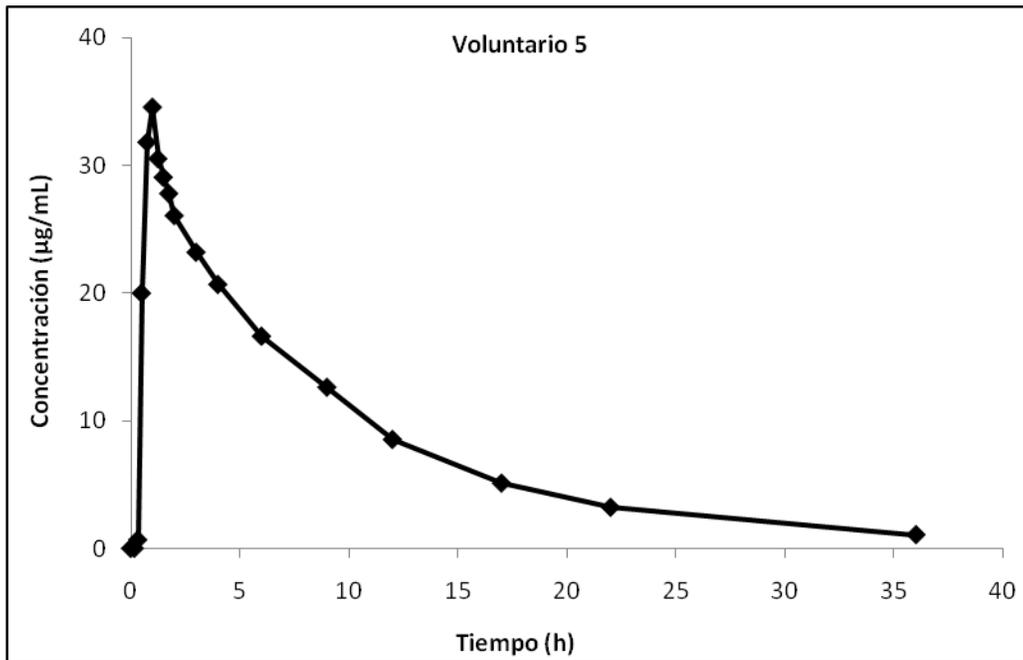
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 3 (semilogarítmica).



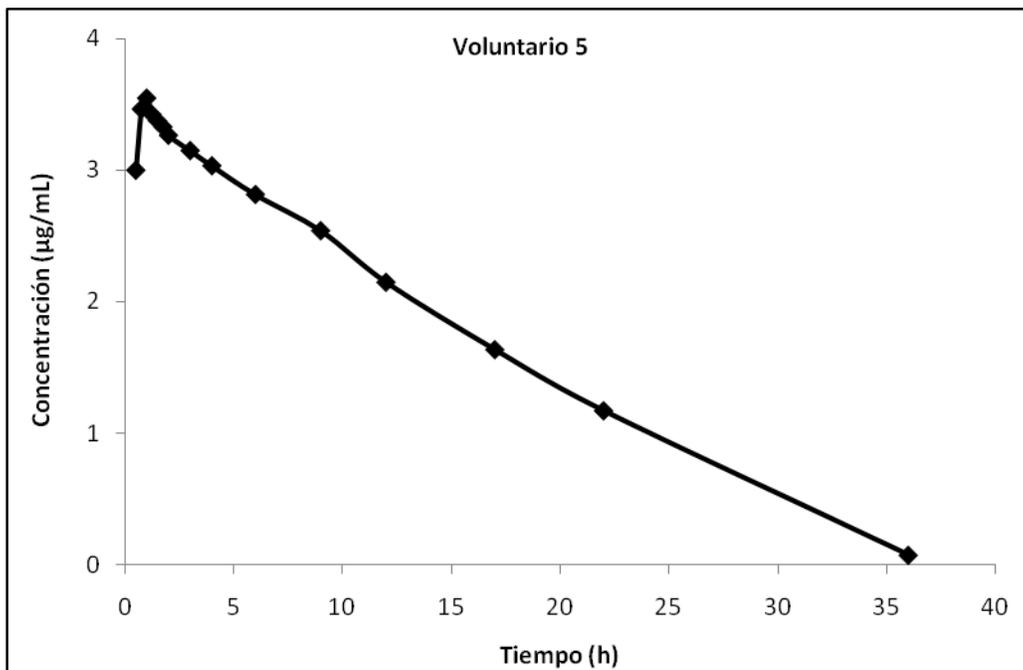
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 4 (escala normal).



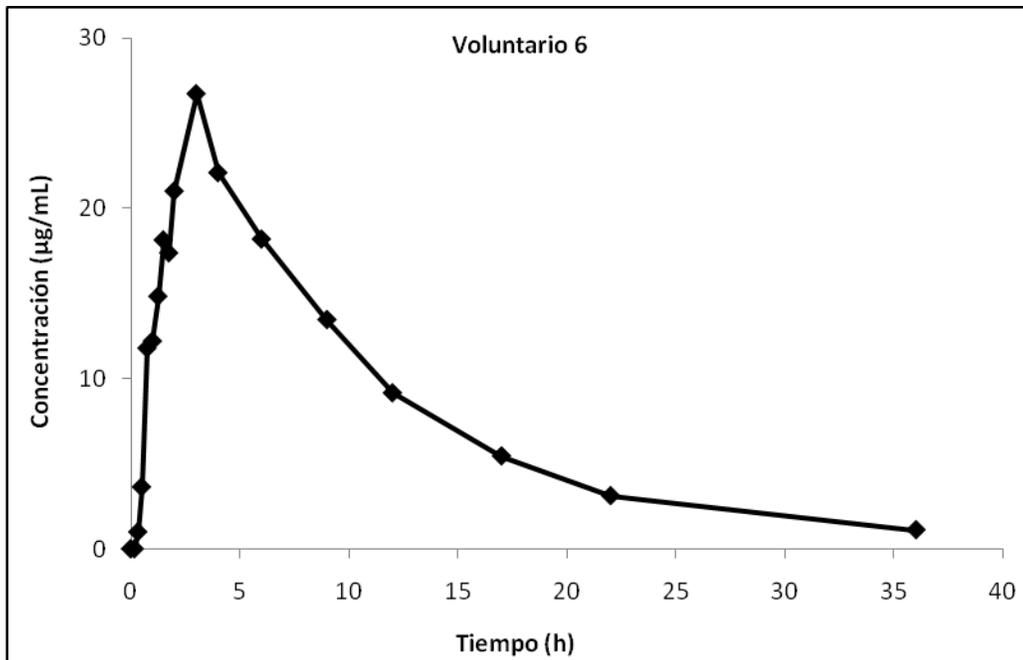
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 4 (semilogarítmica).



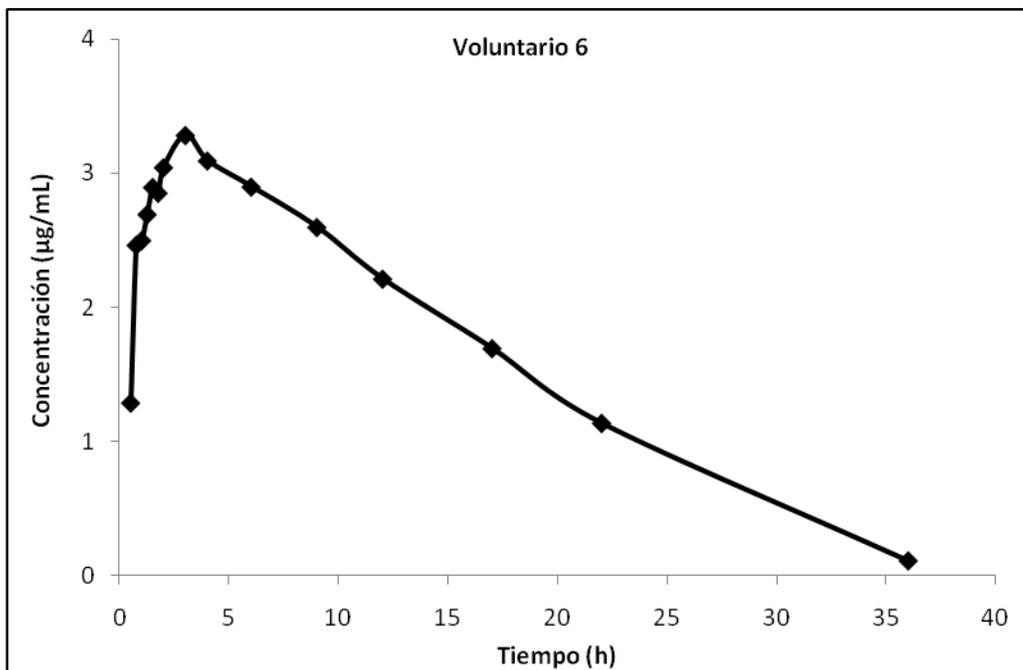
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 5 (escala normal).



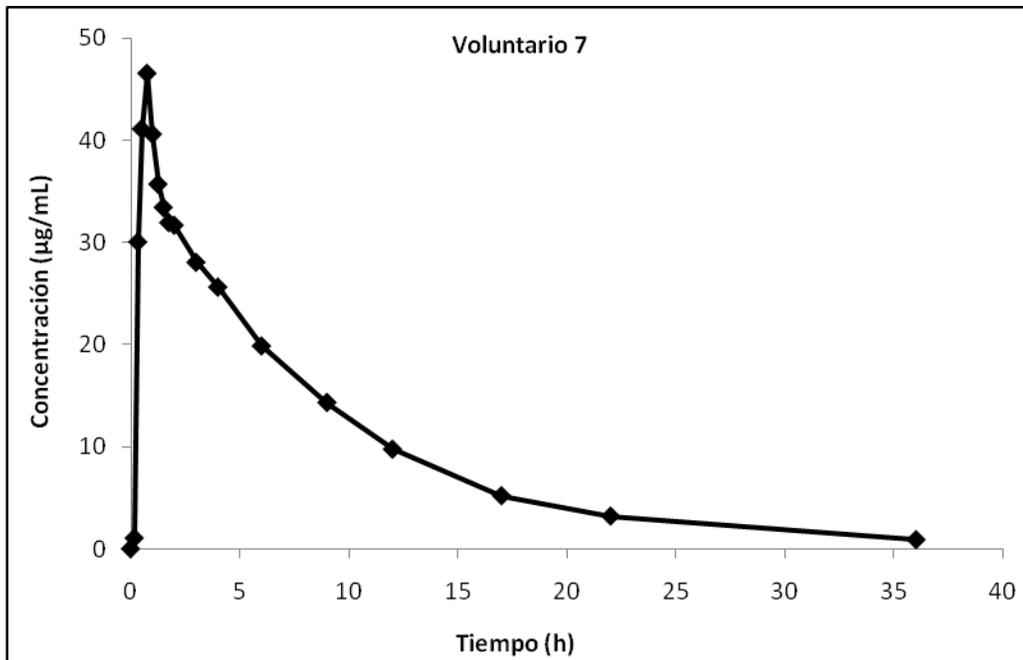
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 5 (semilogarítmica).



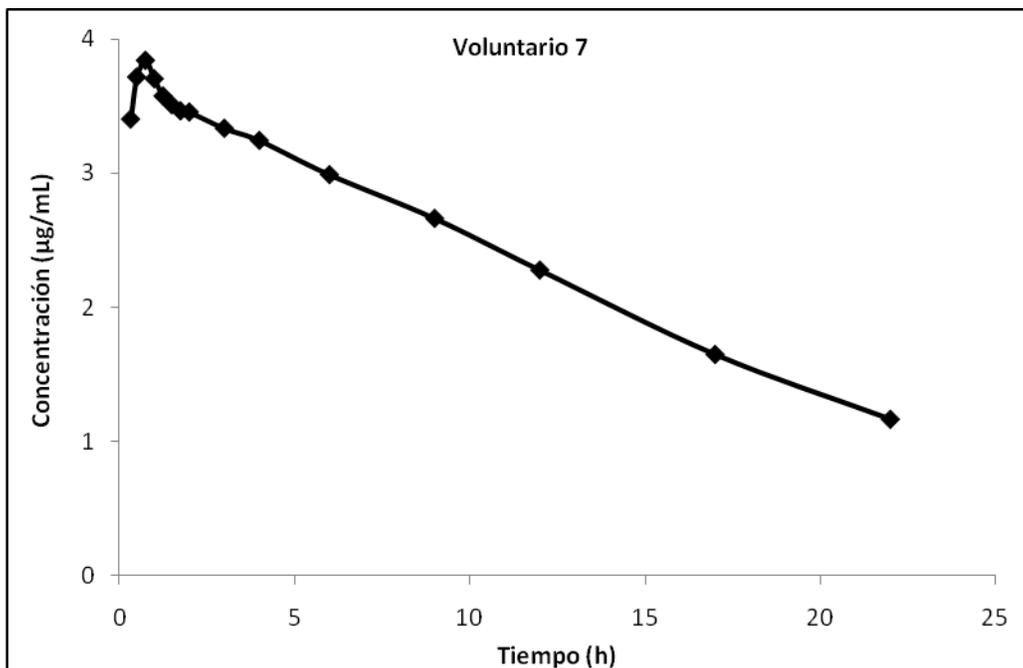
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 6 (escala normal).



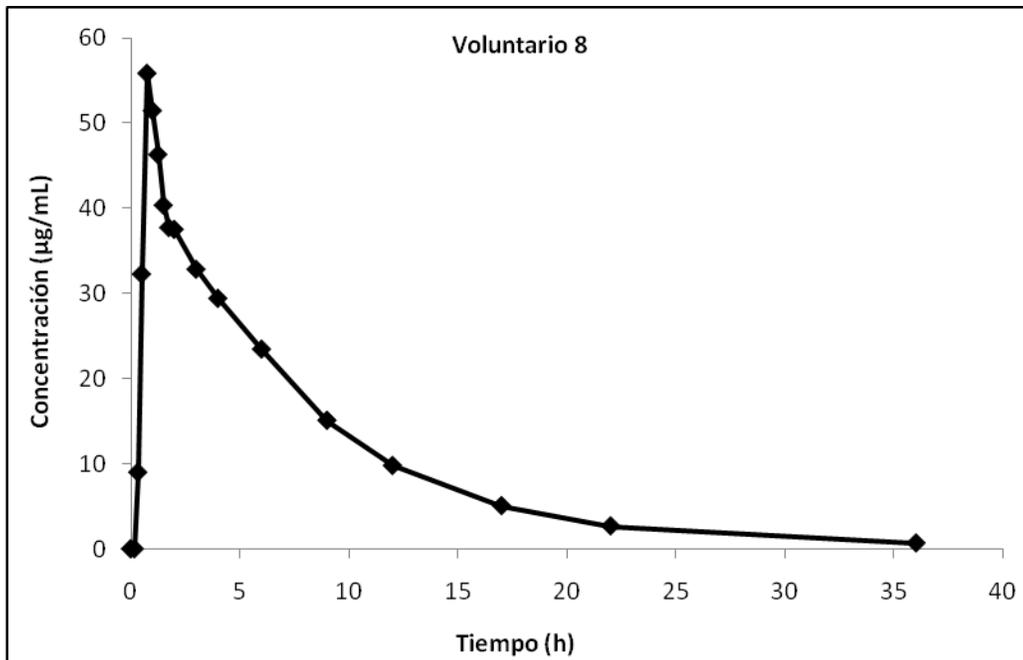
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 6 (semilogarítmica).



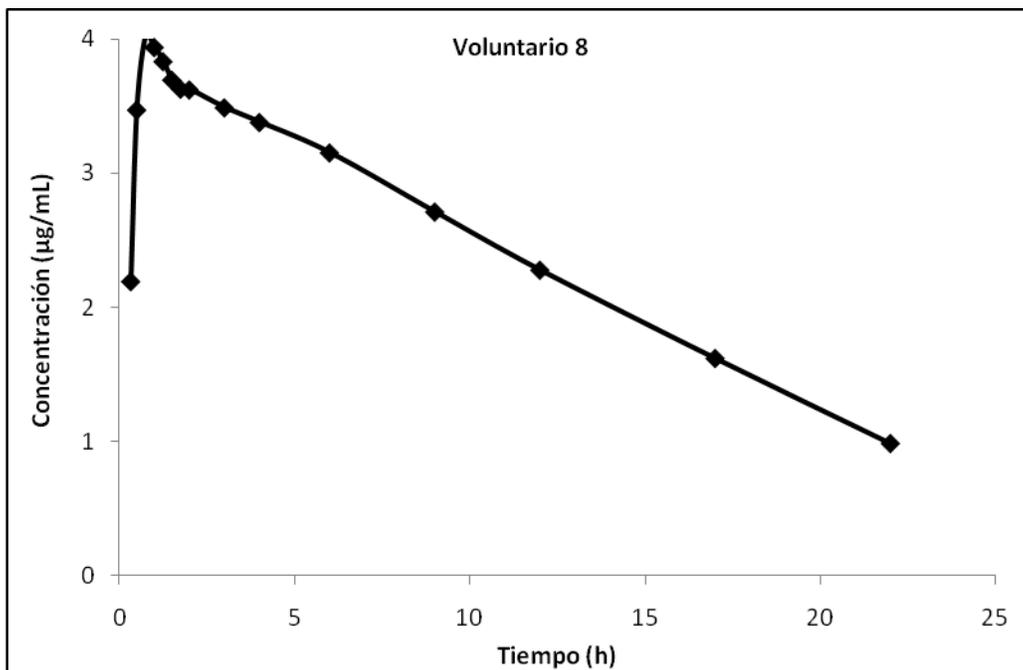
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 7 (escala normal).



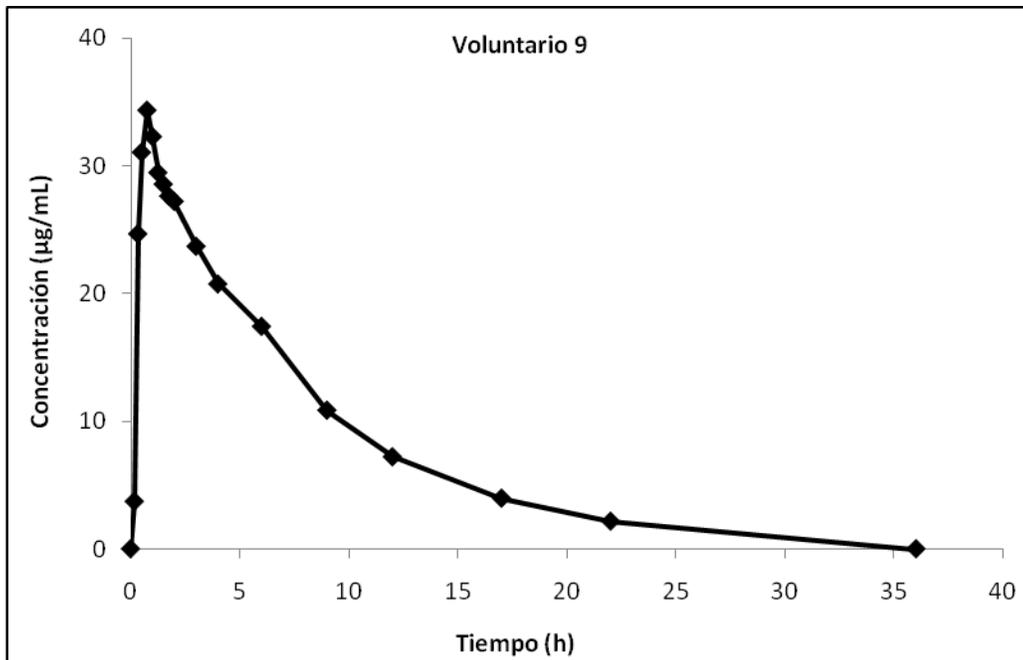
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 7 (semilogarítmica).



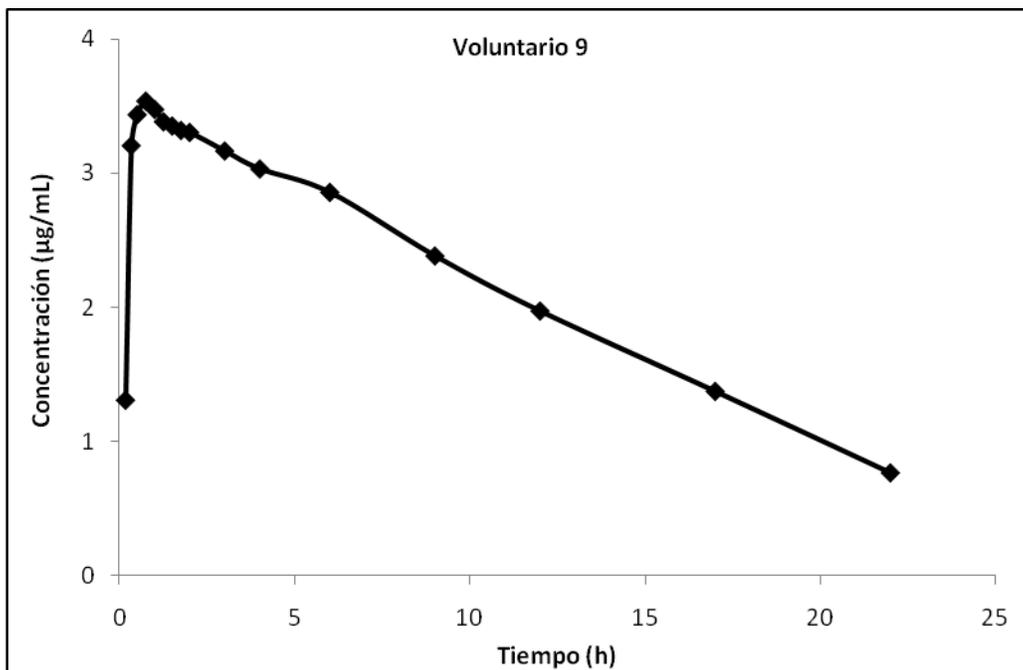
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 8 (escala normal).



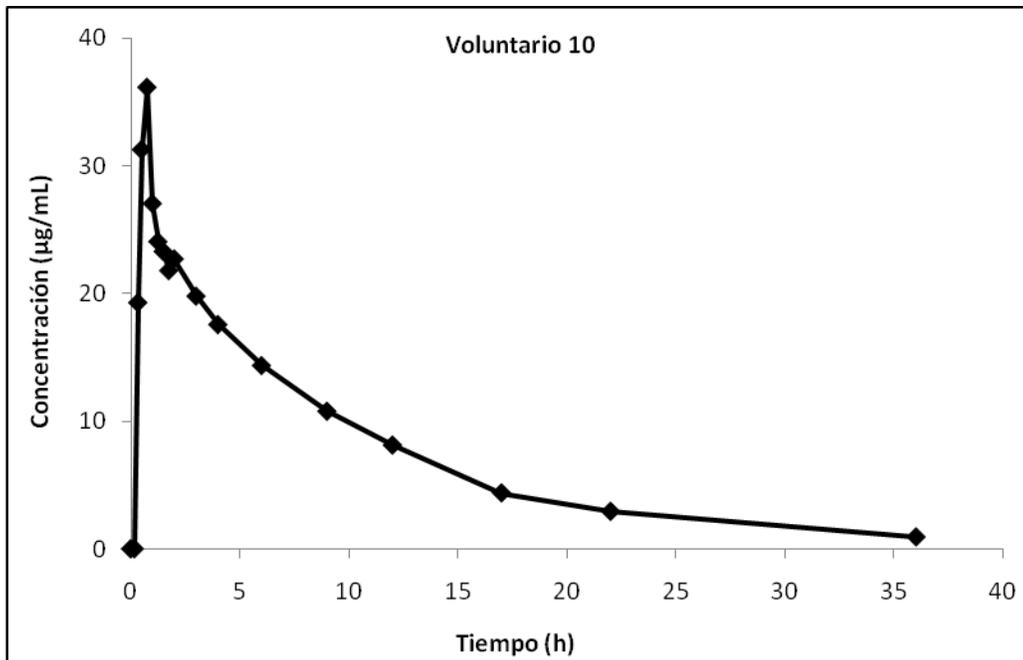
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 8 (semilogarítmica).



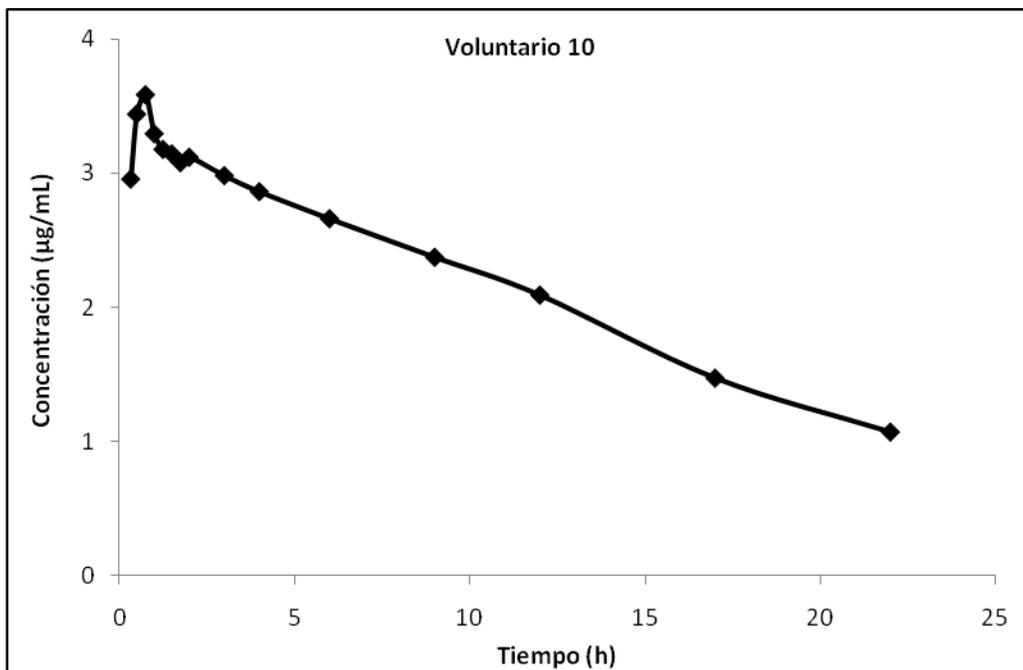
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 9 (escala normal).



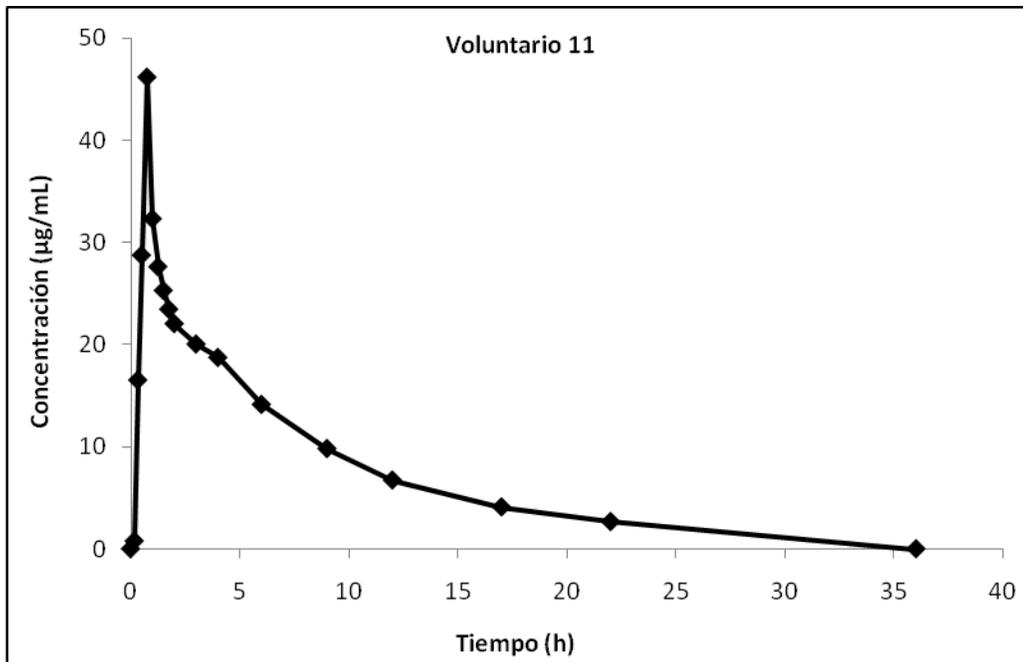
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 9 (semilogarítmica).



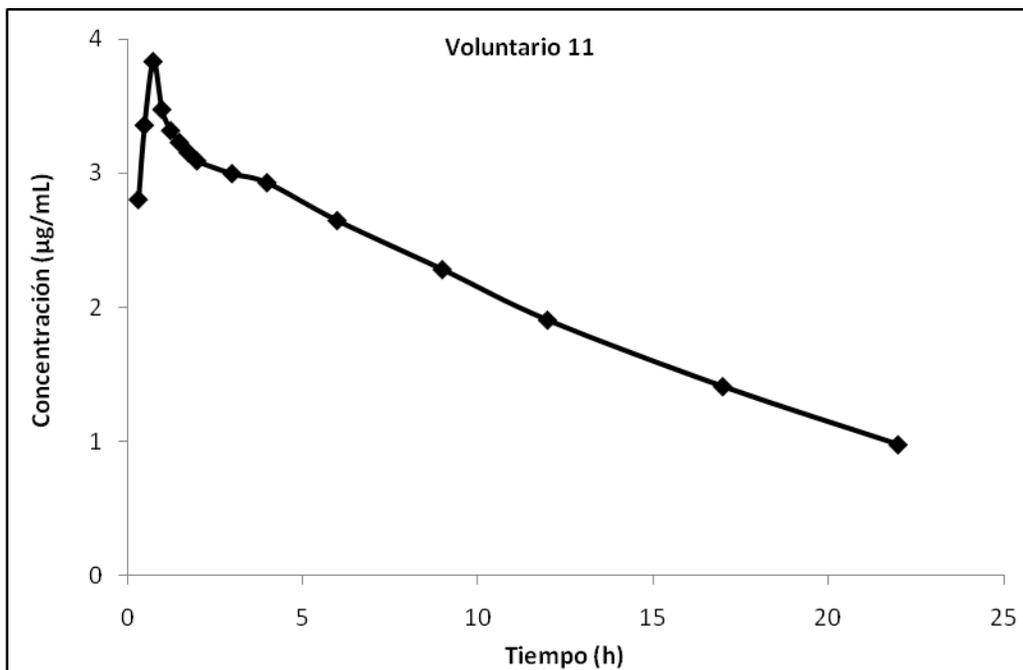
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 10 (escala normal).



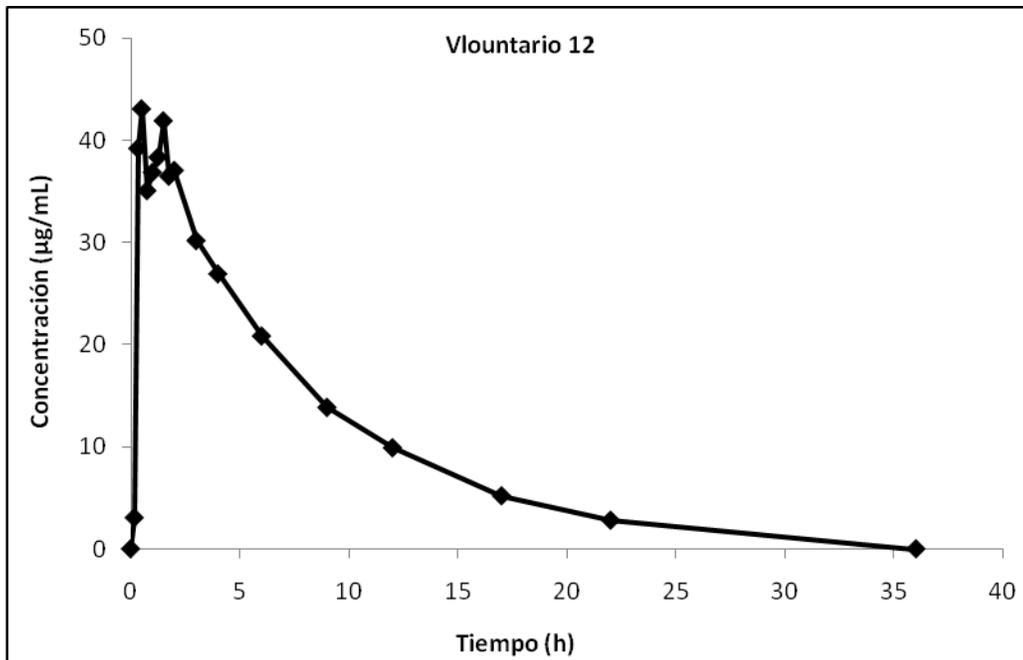
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 10 (semilogarítmica).



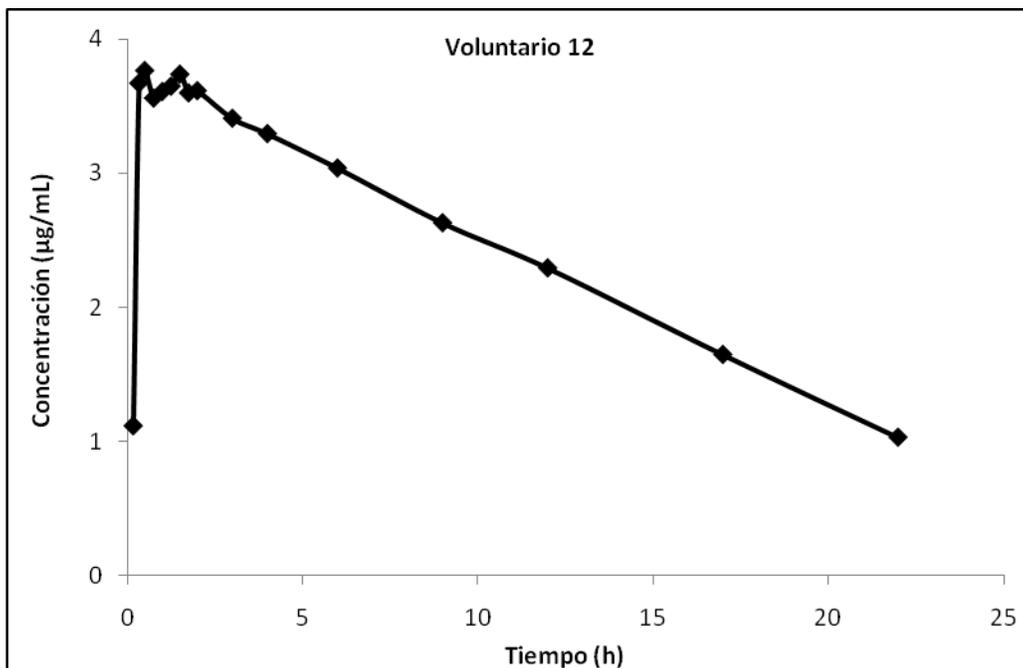
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 11 (escala normal).



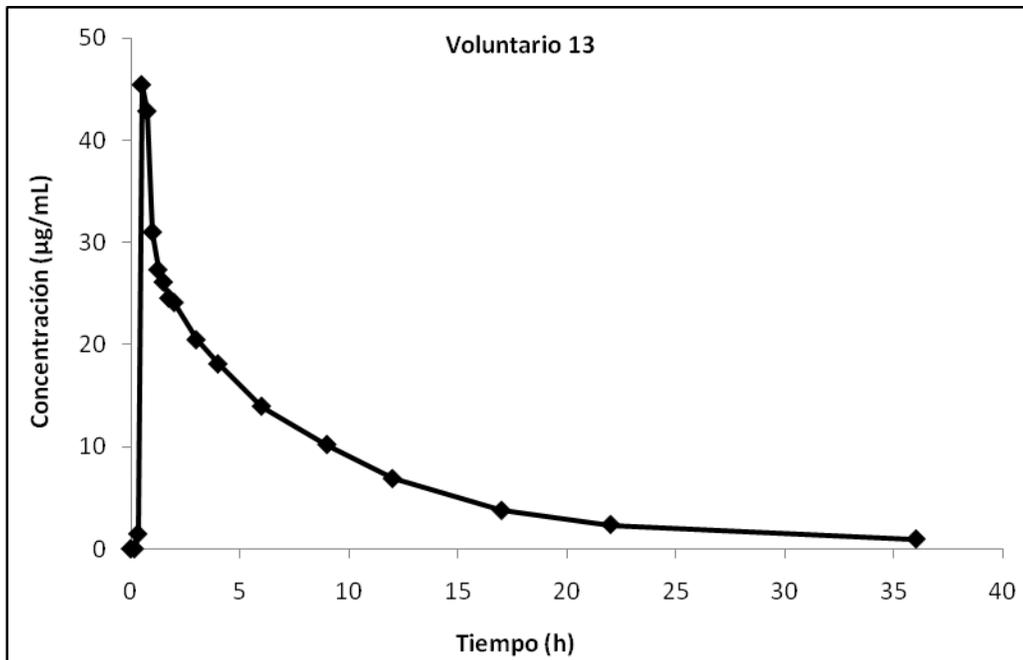
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 11 (semilogarítmica).



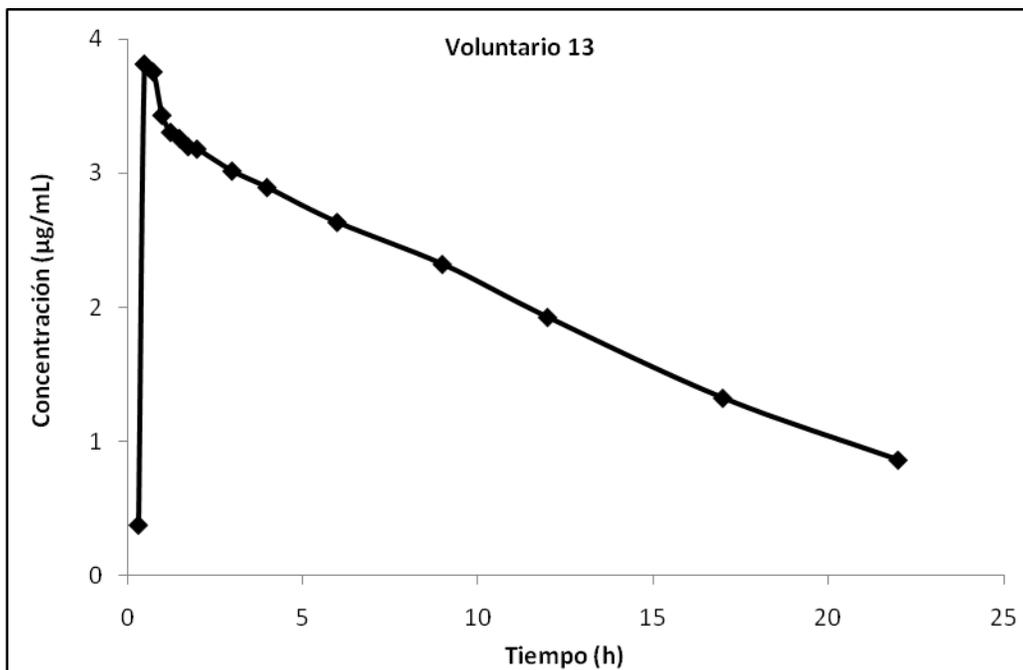
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 12 (escala normal).



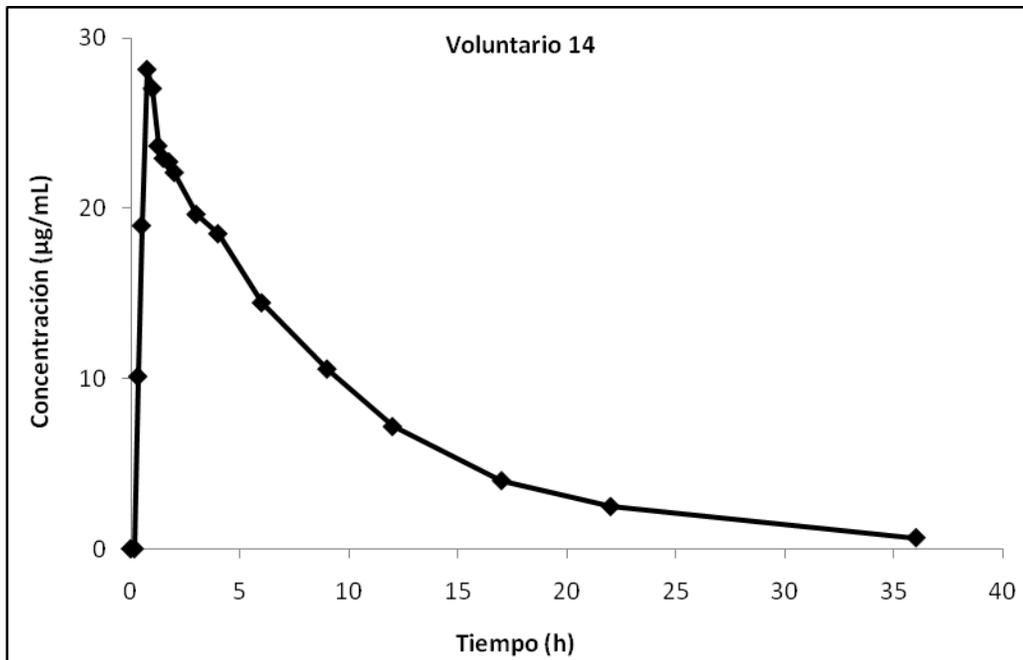
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 12 (semilogarítmica).



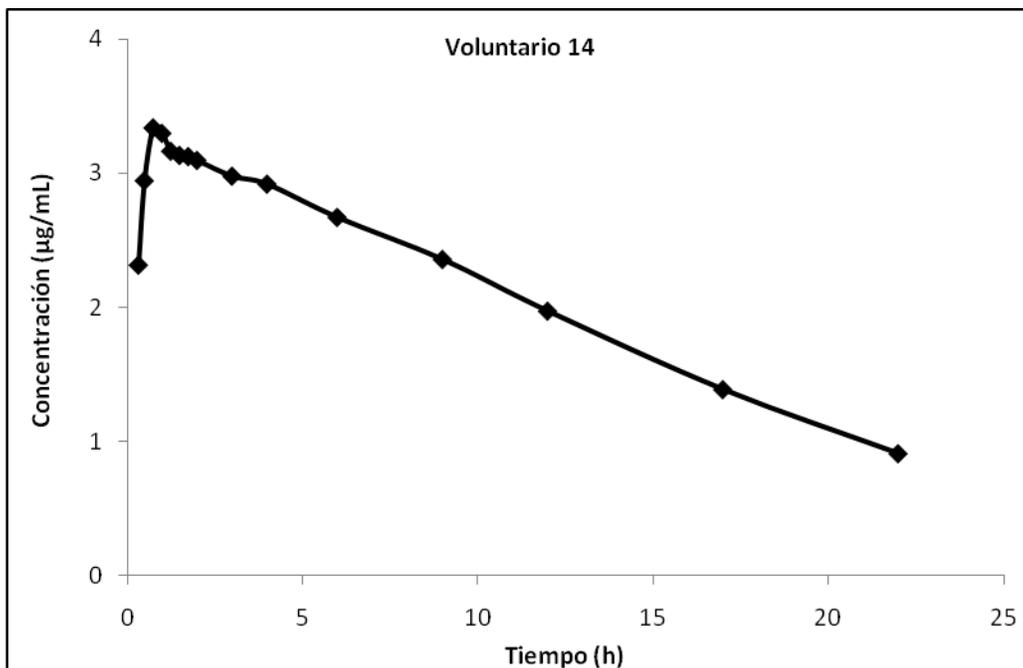
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 13 (escala normal).



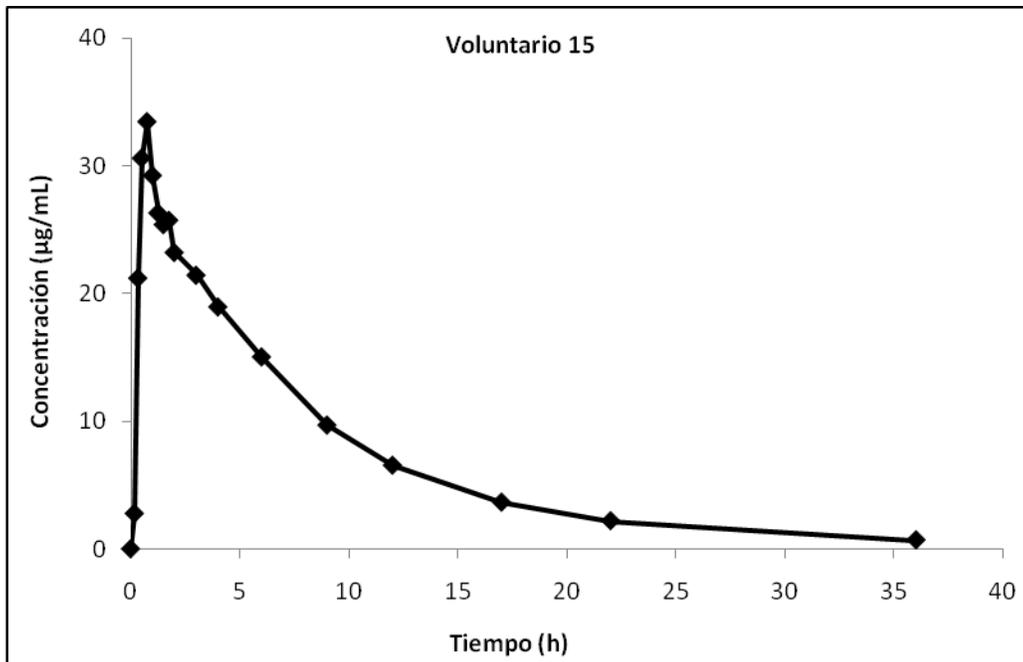
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 13 (semilogarítmica).



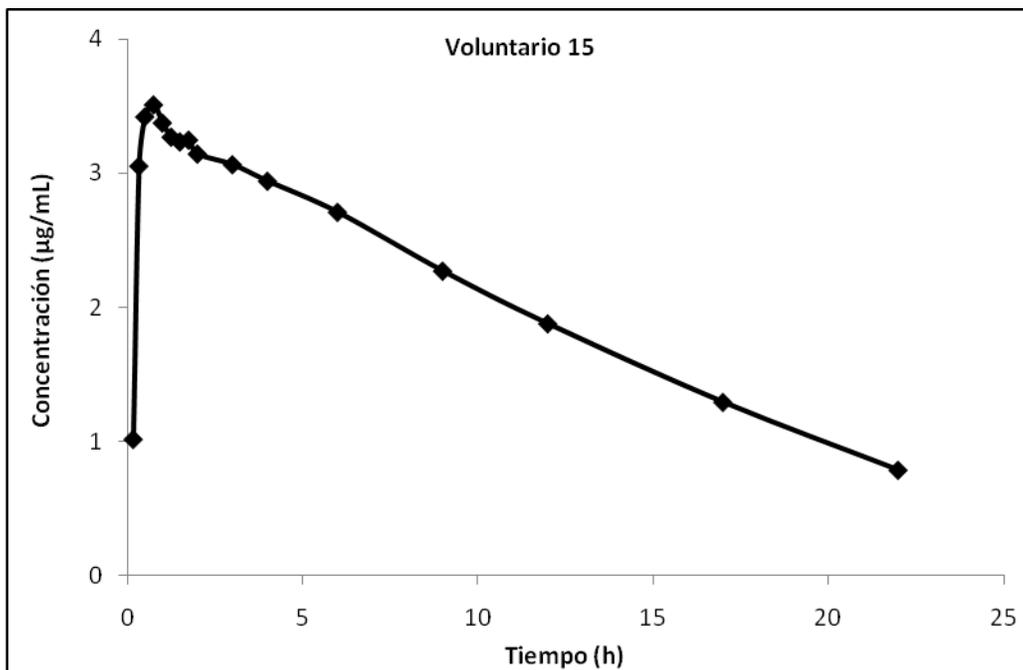
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 14 (escala normal).



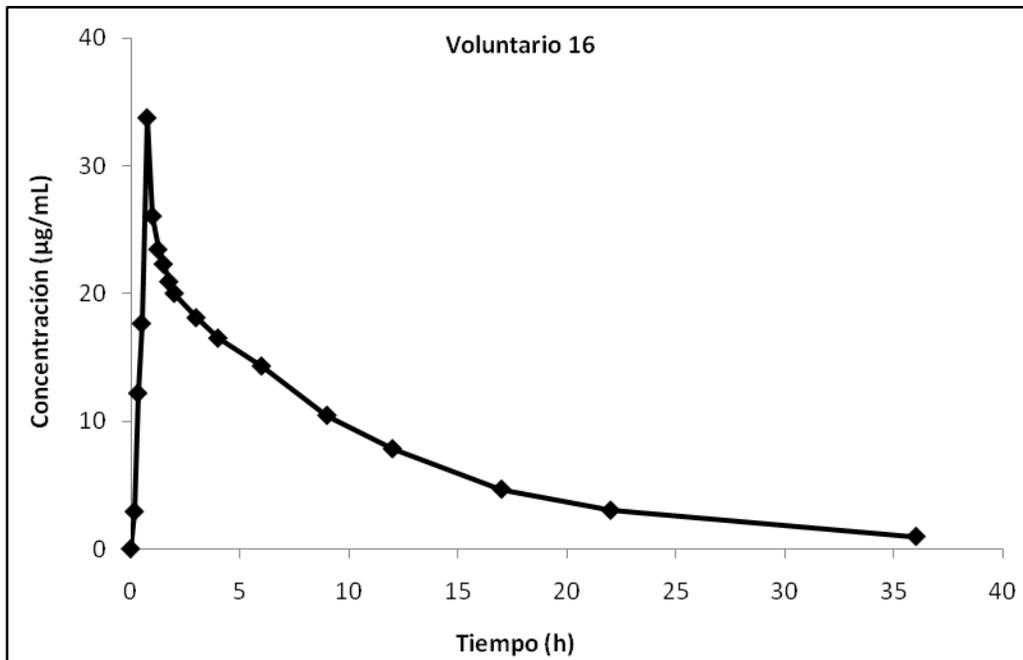
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 14 (semilogarítmica).



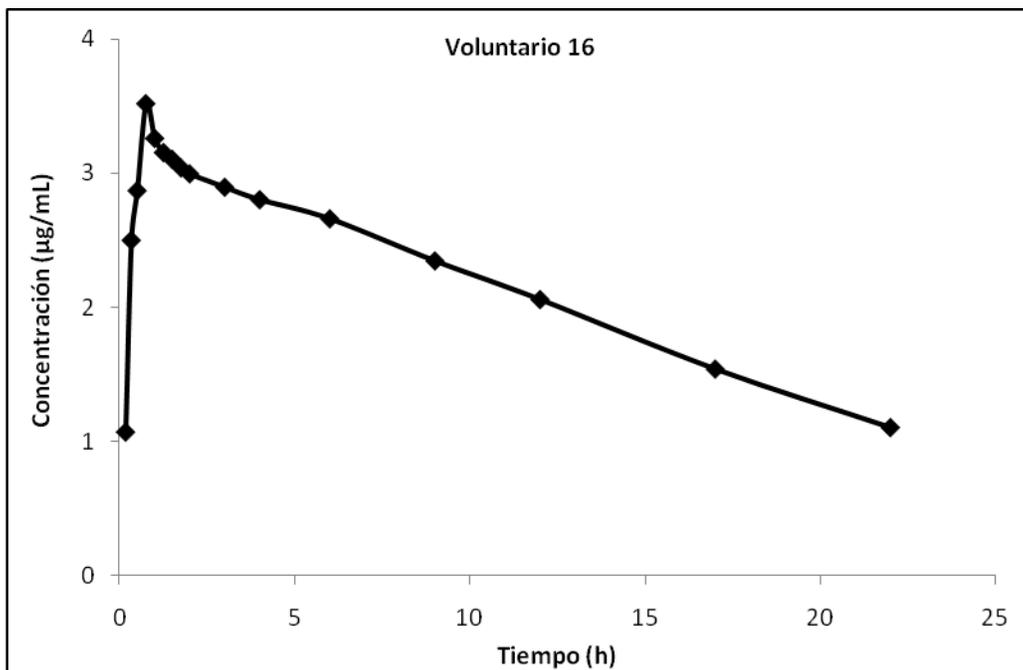
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 15 (escala normal).



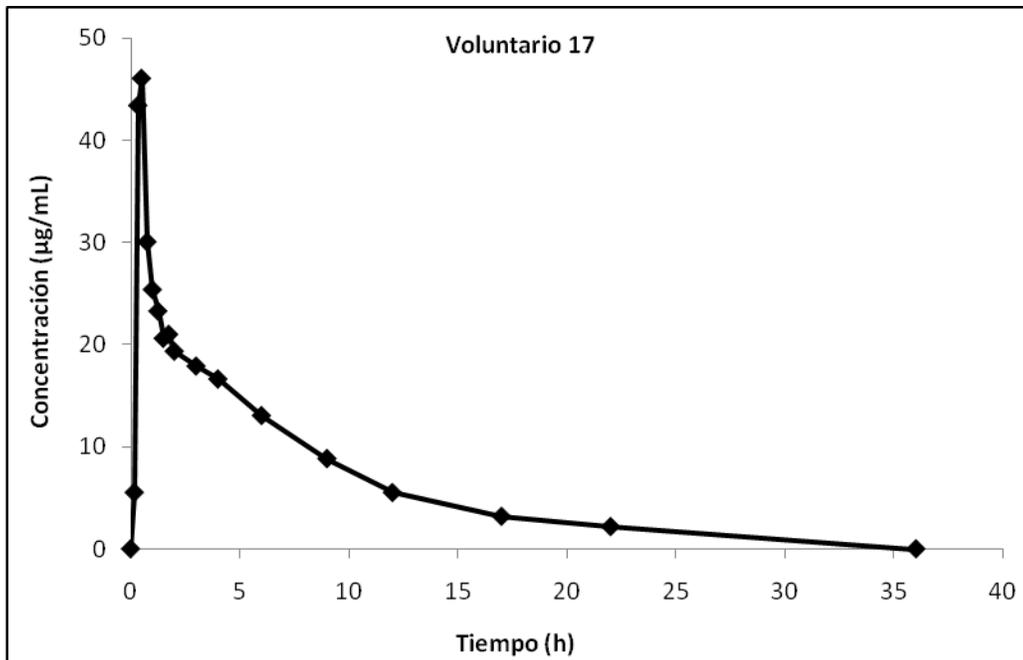
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 15 (semilogarítmica).



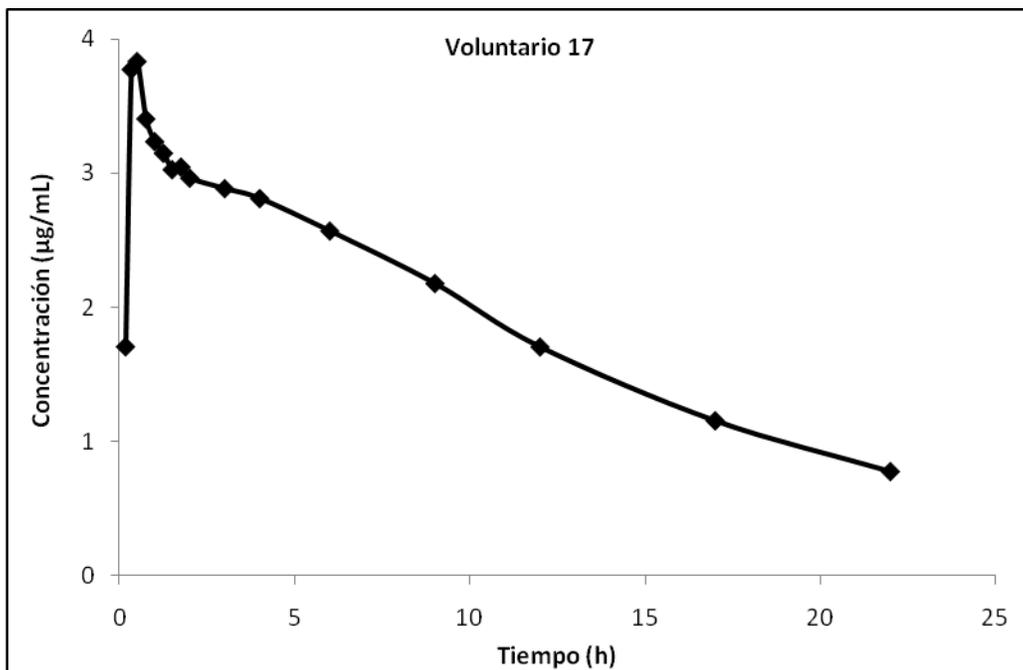
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 16 (escala normal).



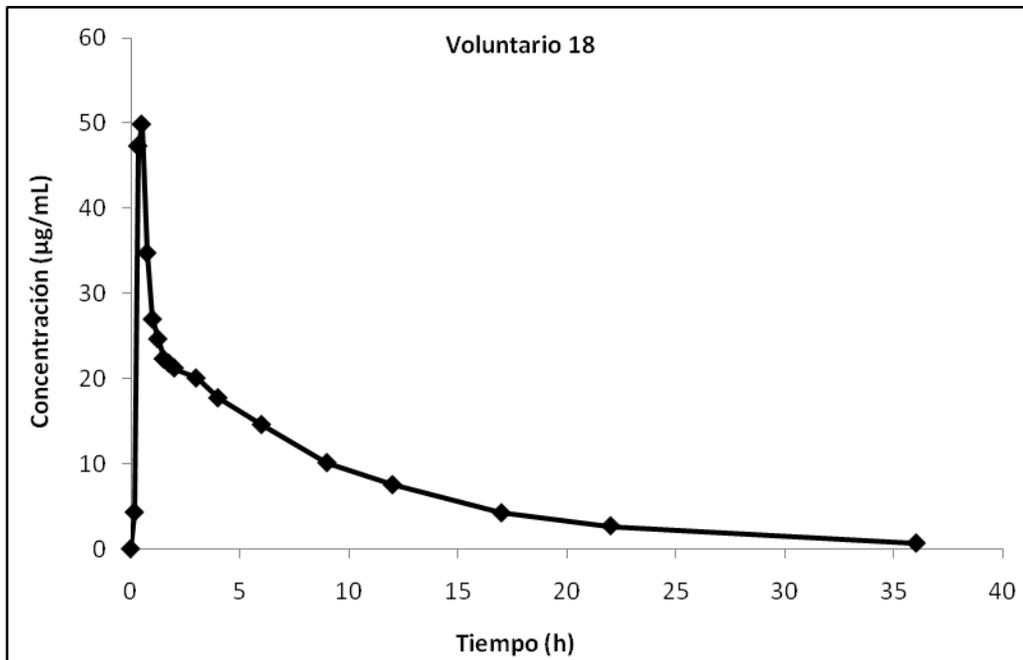
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 16 (semilogarítmica).



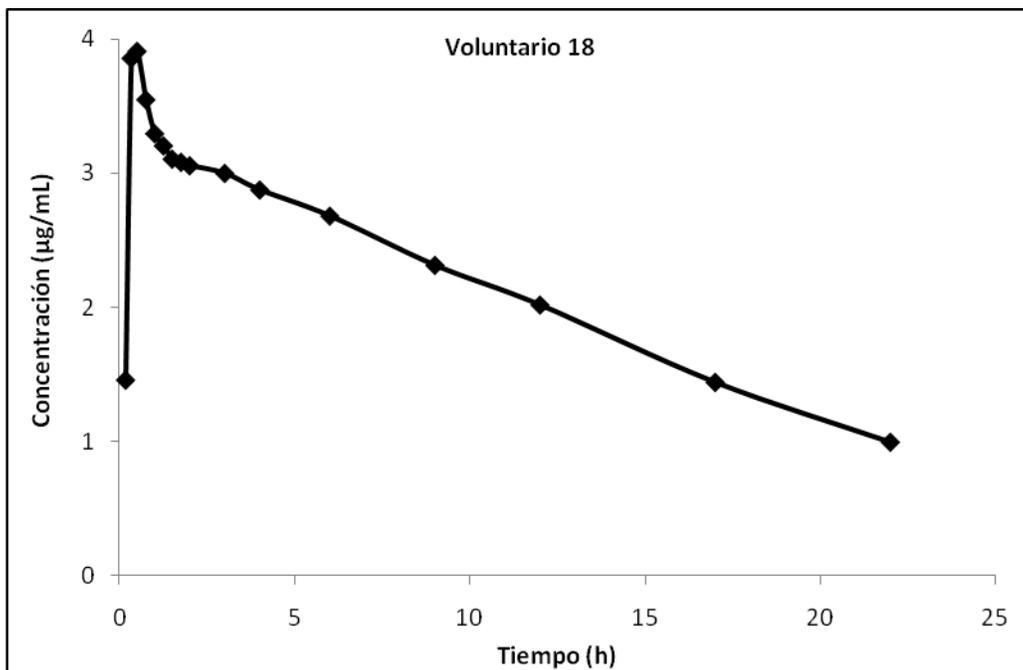
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 17 (escala normal).



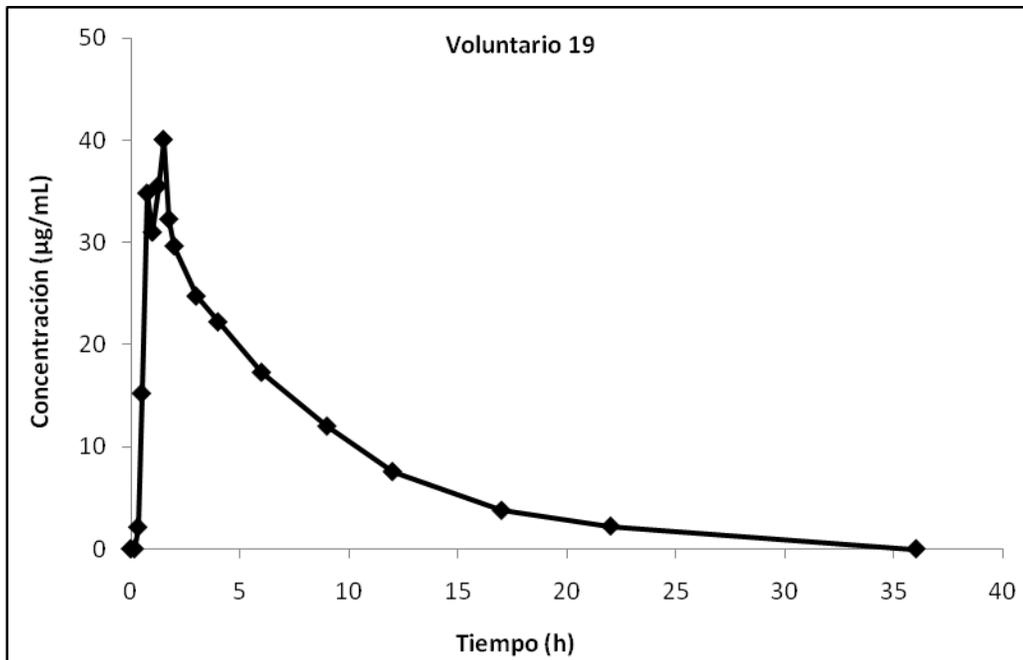
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 17 (semilogarítmica).



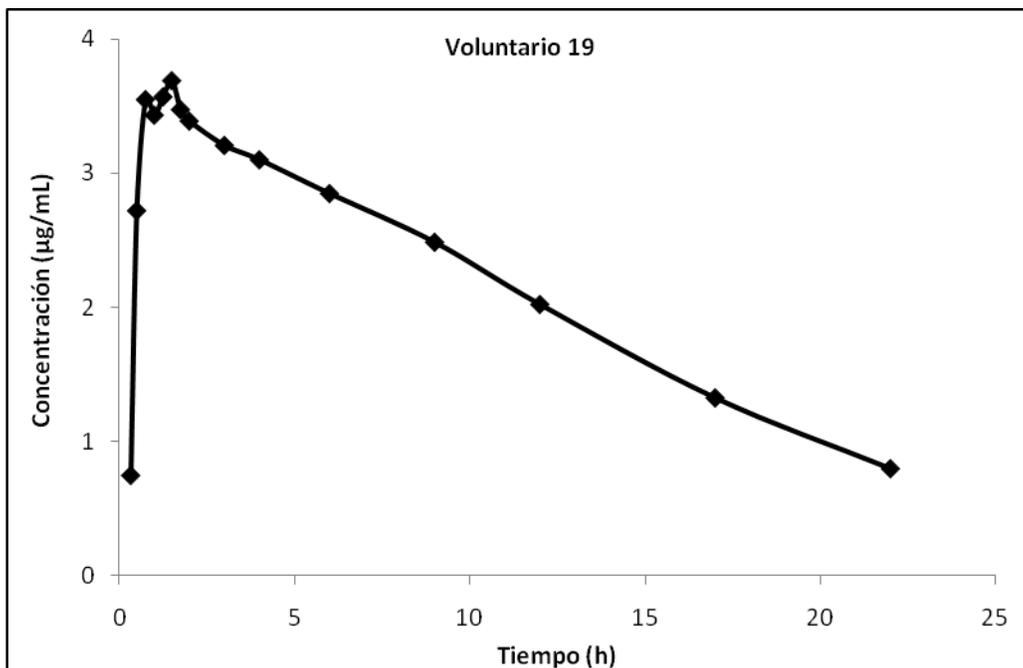
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 18 (escala normal).



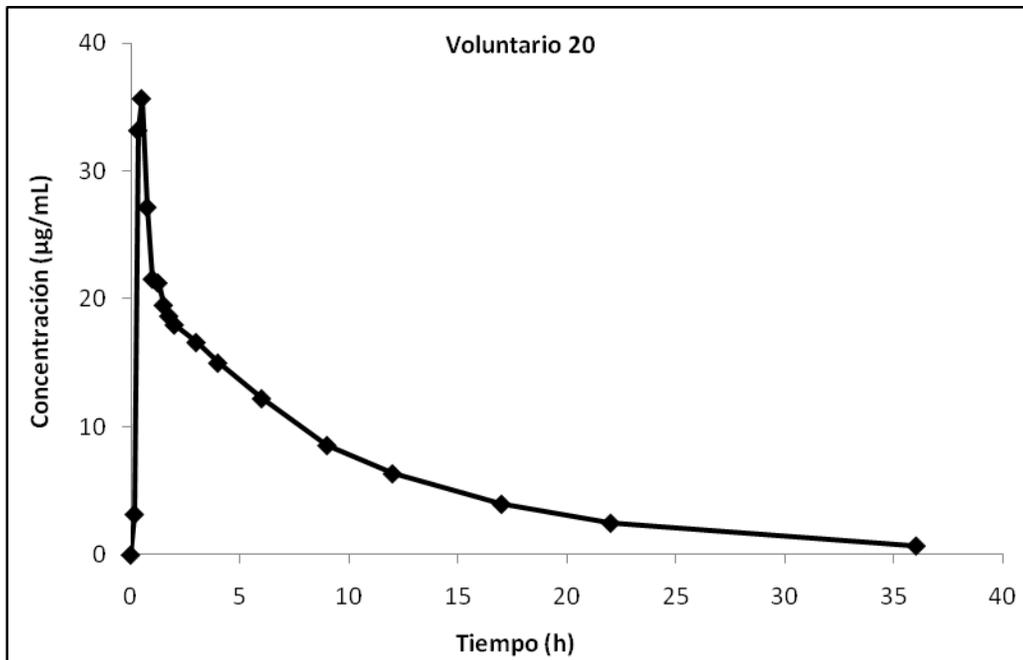
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 18 (semilogarítmica).



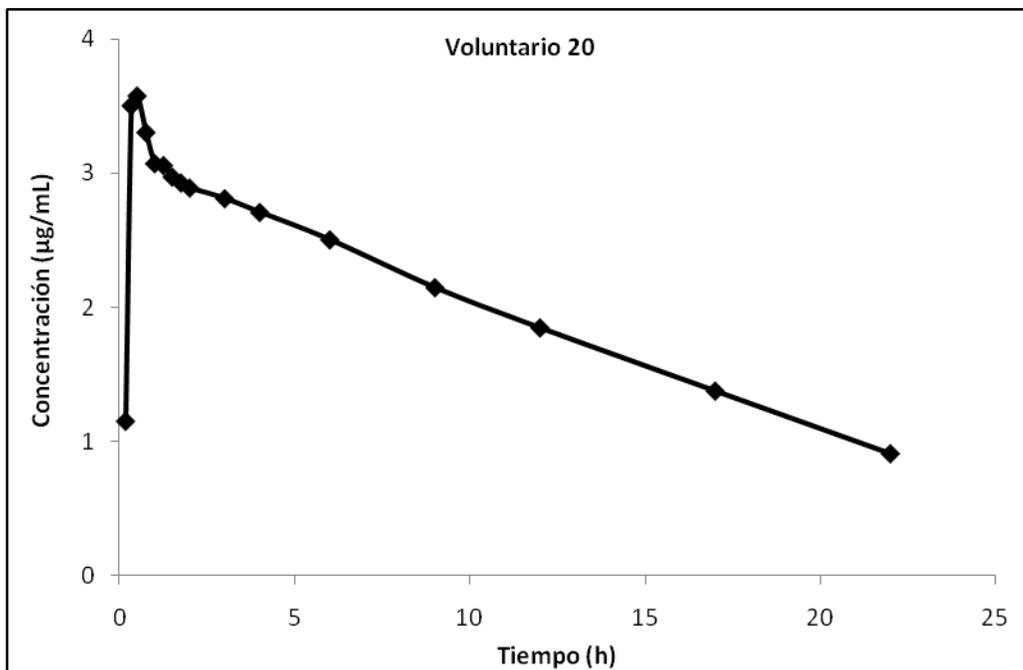
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 19 (escala normal).



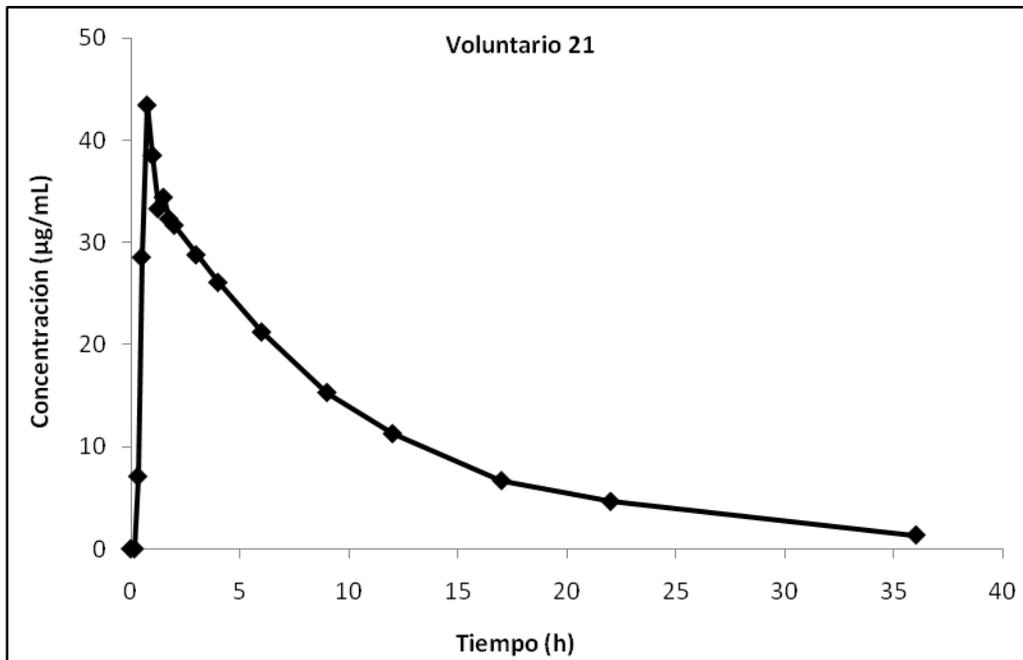
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 19 (semilogarítmica).



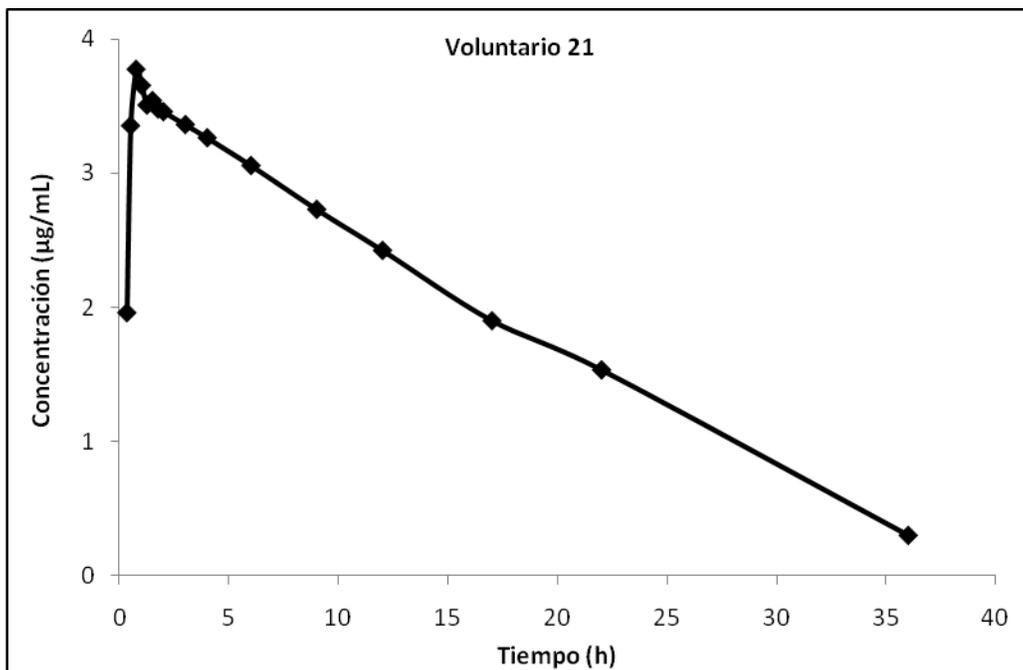
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 20 (escala normal).



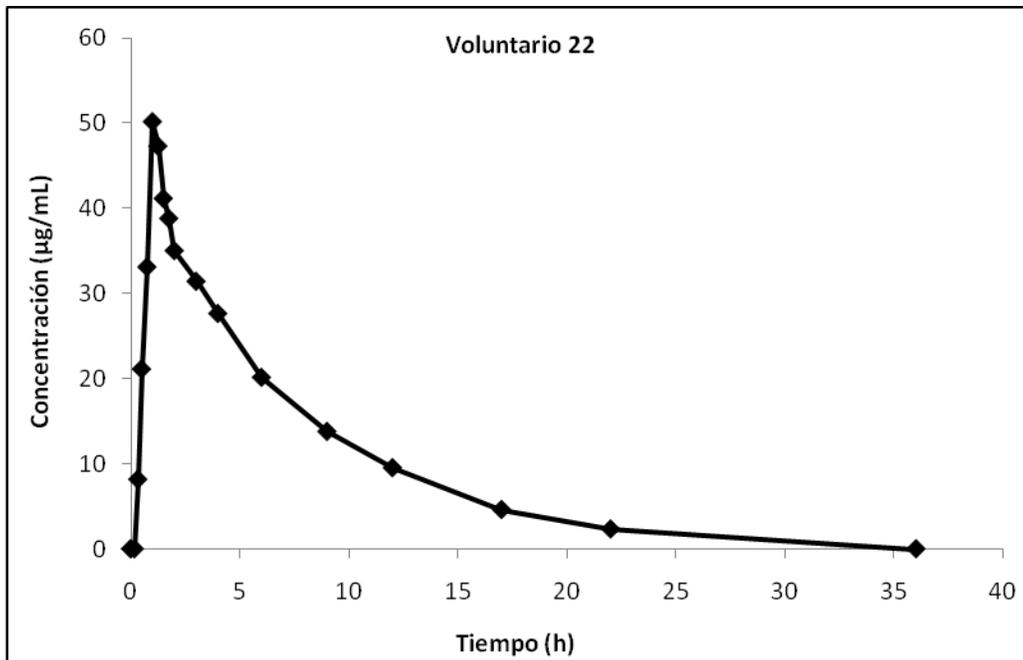
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 20 (semilogarítmica).



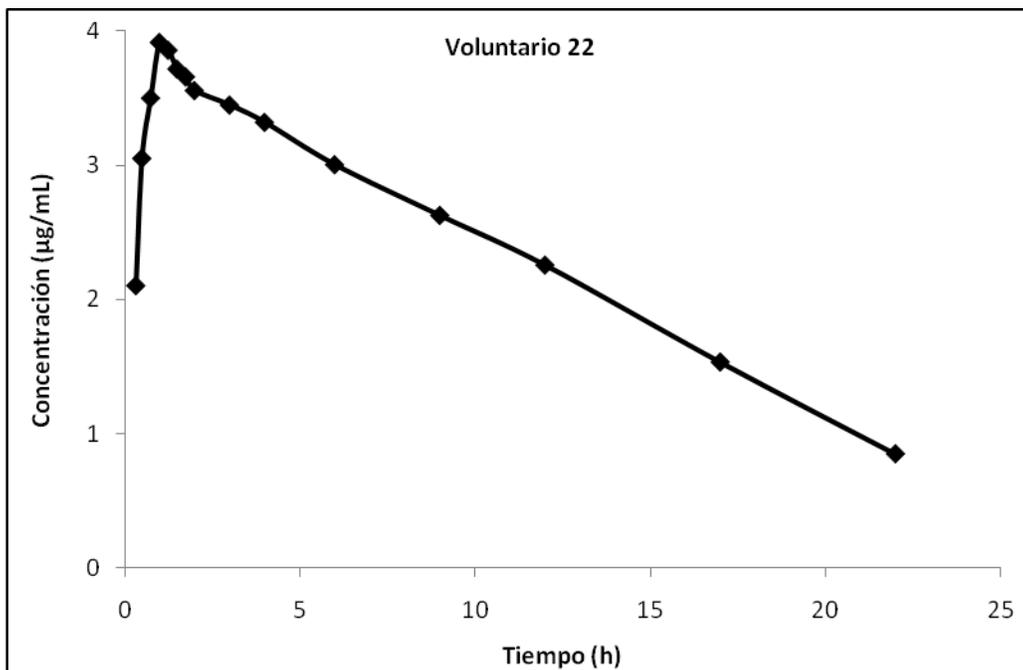
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 21 (escala normal).



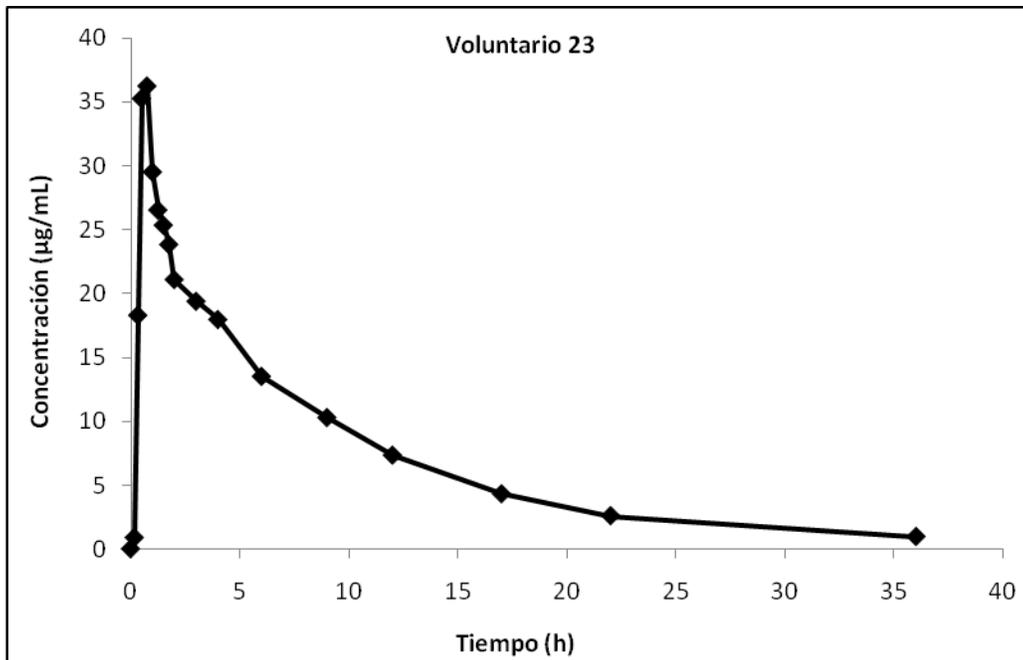
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 21 (semilogarítmica).



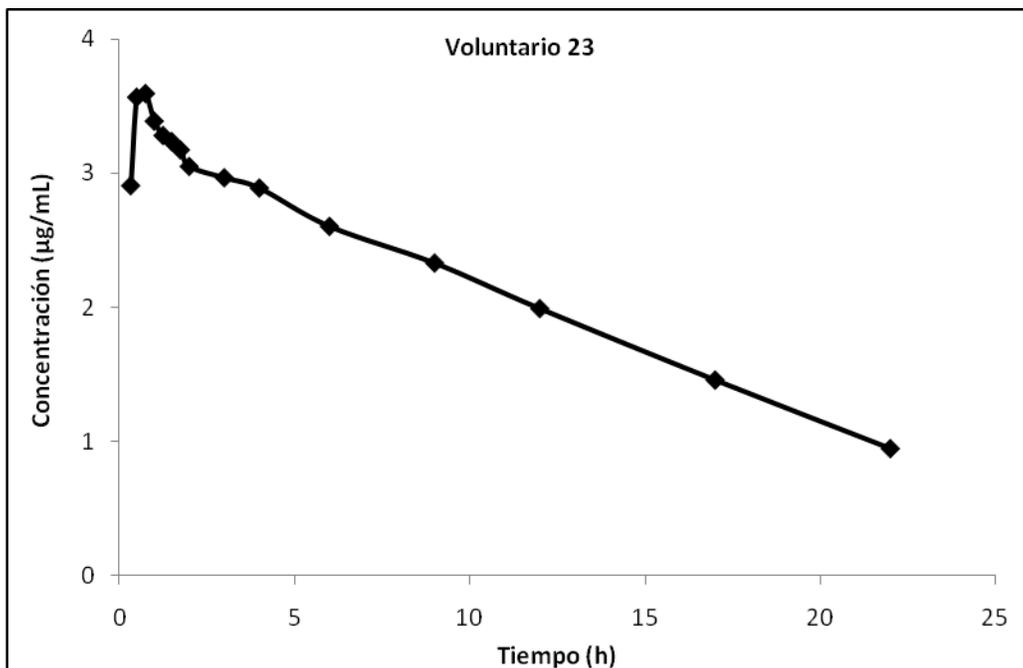
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 22 (escala normal).



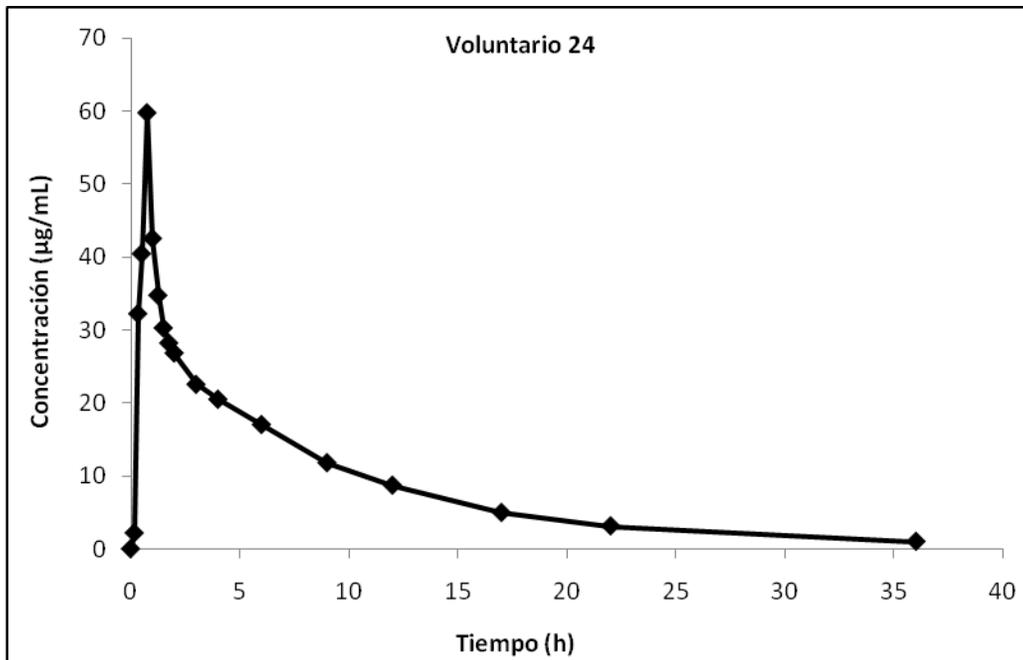
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 22 (semilogarítmica).



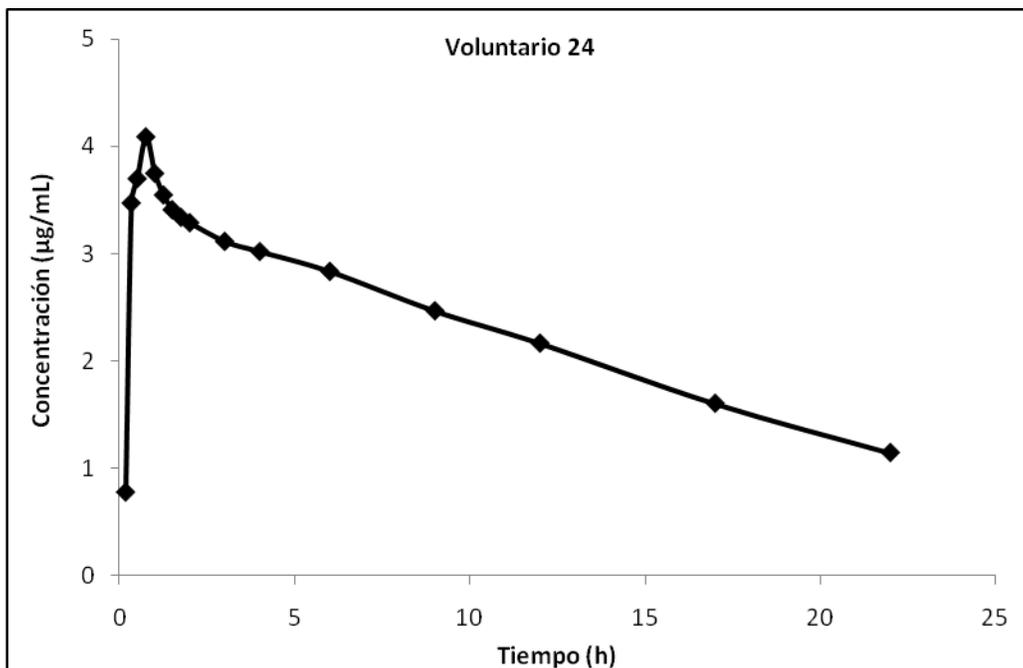
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 23 (escala normal).



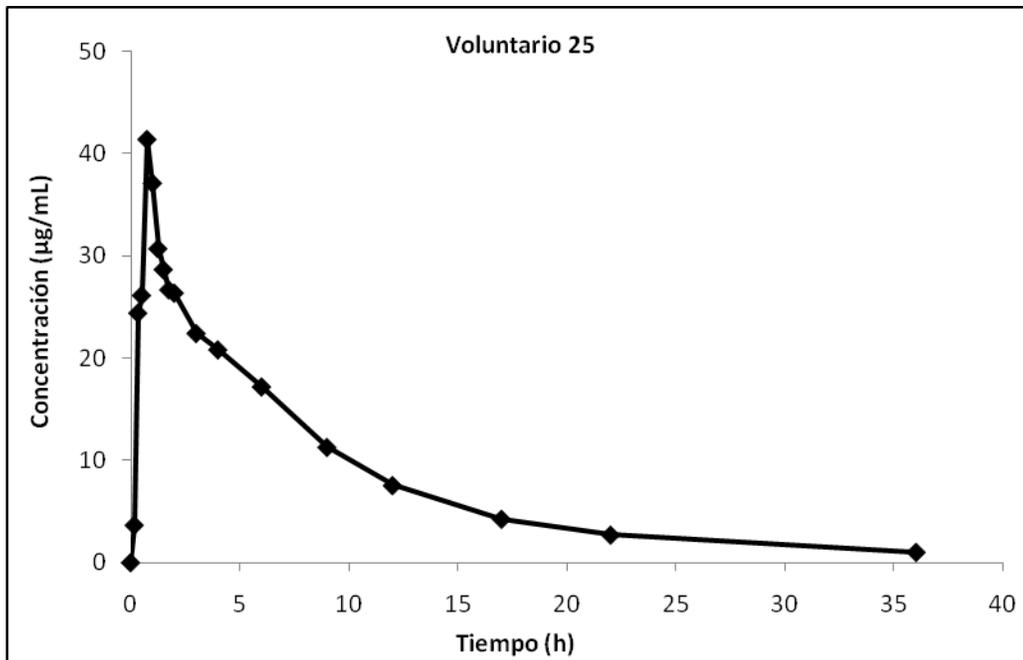
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 23 (semilogarítmica).



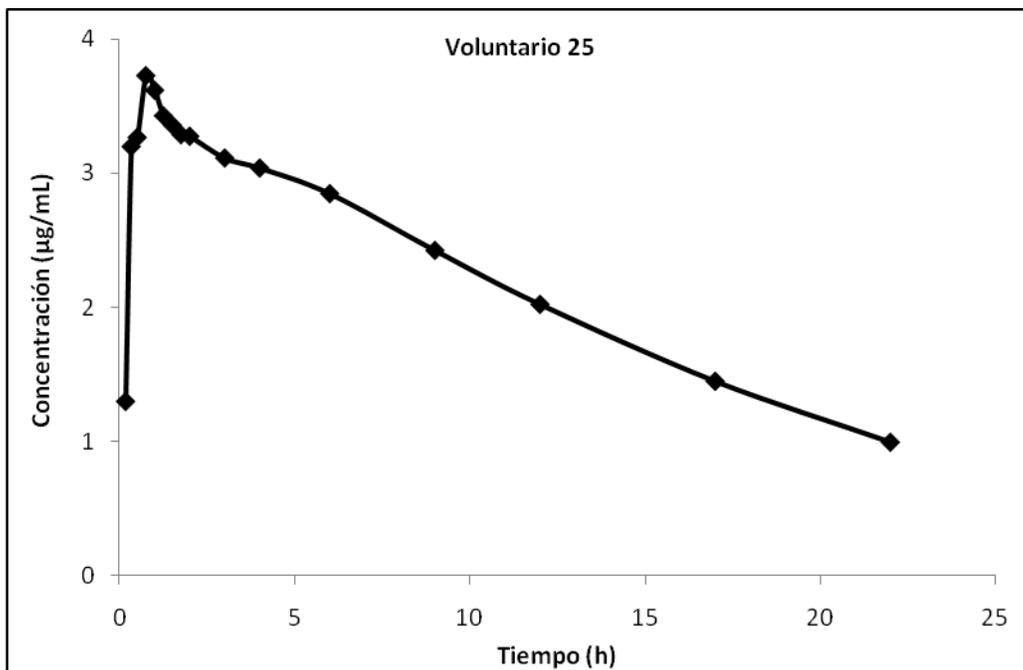
Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 24 (escala normal).



Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 24 (semilogarítmica).



Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 25 (escala normal).



Perfil farmacocinético de levetiracetam voluntario 25 (semilogarítmica).

7.4. Anexo IV. Parámetros farmacocinéticos de levetiracetam obtenidos por cada voluntario.

Voluntario	C_{max} (µg/mL)	ABC_{0-t} (h*µg/mL)	ABC_{0-inf} (h*µg/mL)	Ke (h⁻¹)	T_{max} (h)	t_{1/2} (h)	TMR_{0-inf} (h)
1	40.43	270.76	288.33	0.130	0.75	5.31	8.15
2	32.83	274.52	293.00	0.132	1.00	5.27	8.44
3	35.74	284.61	294.02	0.101	1.25	6.84	10.34
4	34.94	266.70	281.89	0.137	1.50	5.06	8.02
5	34.57	286.29	298.00	0.091	1.00	7.59	10.28
6	26.70	275.36	286.40	0.101	3.00	6.85	10.83
7	46.54	337.38	345.95	0.103	0.75	6.71	8.95
8	55.87	362.51	368.52	0.115	0.75	6.03	8.05
9	34.33	251.18	269.14	0.120	0.75	5.76	8.10
10	36.17	258.55	269.33	0.086	0.75	8.06	10.43
11	46.17	228.33	256.99	0.093	0.75	7.47	9.66
12	43.11	323.27	345.56	0.126	0.50	5.52	8.07
13	45.40	248.47	260.80	0.078	0.50	8.91	10.04
14	28.16	239.51	245.41	0.110	0.75	6.28	9.27
15	33.48	246.17	254.06	0.089	0.75	7.77	9.22
16	33.77	247.06	257.59	0.092	0.75	7.56	10.64
17	46.11	205.41	224.01	0.117	0.50	5.92	8.39
18	49.81	258.24	264.61	0.105	0.50	6.61	9.18
19	40.03	257.12	274.10	0.131	1.50	5.29	7.99
20	35.69	218.17	225.24	0.101	0.50	6.88	9.71
21	43.47	368.48	382.47	0.097	0.75	7.18	10.57
22	50.20	312.18	329.31	0.136	1.00	5.10	7.69
23	36.24	248.62	258.37	0.099	0.75	7.01	9.86
24	59.72	305.26	316.78	0.088	0.75	7.85	9.73
25	41.39	278.82	290.91	0.083	0.75	8.31	9.76

8.0. BIBLIOGRAFÍA.

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION, *Atlas: Epilepsy Care in the World*. Programme for Neurological Diseases and Neuroscience Department of Mental Health and Substance Abuse World Health Organization, Genova, (2005). págs. 8-12.
2. BANERJEE P.N., FILIPPI D., HAUSER W., *The descriptive epidemiology of epilepsya review*. **Epilepsy Res.**, Vol. 85 (2009), No.1, págs. 1– 45.
3. ABOU-KHALIL B., *Levetiracetam in the treatment of epilepsy*. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, Vol. 4 (2008) No.3, págs. 507– 523.
4. MCNAMARA J. O., *Pharmacotherapy of the Epilepsies, on Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basys of Therapeutics*, 11th Edition, USA, 2006, pág. 502.
5. OSUNTOKUN B.O., *Treatment of epilepsy: with special reference to developing countries*, **Prog. Neuropsychopharmacol**, Vol. 3 (1979), págs. 81-94.
6. Rx list, The internet Drug List. <http://www.rxlist.com/keppra-drug.htm>. Consultado Julio de 2010.
7. DE SMEDT T., *et. al.*, *Levetiracetam: The Profile of a Novel Anticonvulsant Drug—Part I: Preclinical Data*. **CNS Drug Reviews**, Vol. 13 (2007), No. 1, págs. 43–56.

8. DE SMEDT T., *et. al.*, *Levetiracetam: The Profile of a Novel Anticonvulsant Drug—Part II: the Clinical Profile of a Novel Anticonvulsant Drug*. **CNS Drug Reviews**, Vol. 13 (2007), No. 1, págs. 57-78.
9. PATSALOS P.N., *Clinical Pharmacokinetics of levetiracetam*. **Clin. Pharmacokinet.**, Vol. 43 (2004), pág. 707-724.
10. QUATTROCCHI, O. A., *Introducción a la HPLC, Aplicación y práctica*. Ed. Merck Publishing Co, Buenos Aires, 1992. págs. 3-57.
11. SECRETARIA DE SALUD, *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. Secretaria de Salud. 9ª Edición, México 2008. Vol I y II, págs. 276, 277, 282-291, 1652-1654, 2427-2434.
12. SNYDER L. R., KIRKLAND J. J., *Introduction to modern Liquid Chromatography*. Ed. John Wiley and Sons ICC, USA, 1979, págs. 15-37, 349-389.
13. BRAITHWAITE A., SMITH F. J., *Chromatographic Methods*. 5th edition, Ed. Kluwer Academic Publishers, London, 1999, págs. 1-8, 258-317
14. RUBINSON J. F. KENNETH R. A., *Química Analítica Contemporánea*. Ed. Prentice Hall, México, 2000, pág. 406.
15. MARTENS-LOBENHOFFER J., BODE-BÖGER S. M., *Determination of levetiracetam in human plasma with minimal sample pretreatment*. **Journal of Chromatography B**, Vol. 819, (2005), págs. 197–200.
16. VERMEIJ T.A., EDELBROEK P.M., *High-performance liquid chromatographic and megabore gas liquid chromatographic determination*

- of levetiracetam (ucb LO59) in human serum after solid-phase extraction. Journal of Chromatography B*, Vol. 662, (1994), págs. 134-139.
17. ZUFÍA L., *et. al.*, *LC method for therapeutic drug monitoring of levetiracetam: Evaluation of the assay performance and validation of its application in the routine area. Clinical Biochemistry*, Vol. 43, (2010), págs. 473–48.
18. CONTIN M., *et. al.*, *Simple and validated HPLC–UV analysis of levetiracetam in deproteinized plasma of patients with epilepsy. Journal of Chromatography B*, Vol. 873, (2008), págs. 129–132.
19. GUO T., *et. al.*, *Determination of levetiracetam in human plasma/serum/saliva by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. Clinica Chimica Acta*, Vol. 375 (2007), págs. 115–118.
20. KAMAL M.M., *Quantification of levetiracetam in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Application to therapeutic drug monitoring. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 48, (2008), págs. 822–828.
21. CHAMBERLAIN J., *The analysis of drugs in biological fluids*. 2^{da} edición, Ed. CRC, USA, 1995, págs. 35-66.
22. GANONG, WILLIAM F., *Fisiología Médica*, 19^a edición, Ed. Manual Moderno, México, 2004, pág. 586.
23. HIGASHIDA, B.Y., *Ciencias de la Salud*, 4^a edición, Ed. McGraw-Hill, México, 2001, págs. 157, 182.
24. VOET D., *Biochemistry*, 3rd edition, Ed. Wiley, USA, 2004, págs. 131-132.

25. BURGESS R., *Protein Precipitation Techniques, on Methods in Enzymology*. **Elsevier Inc**, Volume 463, (2009), págs. 332, 341.
26. QUEIROZ S., COLLINS H., *Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica*. **Quim. Nova**, Vol. 24, (2001), No. 1, págs. 68-76.
27. Norma Oficial Mexicana, NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
28. SECRETARIA DE SALUD, Comisión Federal para la protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), Comisión de Autorización Sanitaria. Relación de Especialidades Farmacéuticas Susceptibles de Incorporarse al Catálogo de Medicamentos Genéricos. Julio de 2009, pág. 38.
29. SPÍNOLA F.A., ALMEIDA S., *Bioequivalence of two formulations of levetiracetam, International journal of clinical pharmacology and therapeutics*. **Int. J. Clin. Pharmacol**, Vol. 46 (2008), págs. 591-596.
30. DEEPAK D.S., *et. al.*, *Determination of levetiracetam in human plasma by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry and its application to bioequivalence studies*. **Rapid Commun Mass Spectrom.**, Vol. 20 (2006), págs. 2539-2547.
31. DONG W. M., *Modern HPLC for Practicing Scientists*. Ed. Wiley Interscience, USA, 2006, págs. 2-7, 16-44, 78-92.