



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas

ESTUDIOS ANALÍTICOS PRELIMINARES PARA LA CARACTERIZACIÓN
FARMACOCINÉTICA DE LIDOCAÍNA Y MONOETILGLICINILIDIDA COMO
POSIBLE HERRAMIENTA EN LA EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN HEPÁTICA EN
PACIENTES CRÍTICOS CON INESTABILIDAD HEMODINÁMICA SOMETIDOS A
HEMOFILTRACIÓN DE ALTO VOLUMEN

Memoria de Título para optar al título de Químico Farmacéutico.

JAVIERA PAZ CARRASCO RIQUELME

Profesor Patrocinante:

Dra. Q.F. María Nella Gai Hernández.
Depto. Ciencias y Tecnología
Farmacéuticas.

Directores:

Q.F. Leslie Escobar Oregón.
Depto. Ciencias y Tecnología
Farmacéuticas.

Pablo Tapia Batalla.
Hospital Clínico Pontificia Universidad
Católica de Chile.

Santiago, Chile

Septiembre 2013

AGRADECIMIENTOS

Primero, quiero agradecer a la profe Nella y Leslie, por acogerme y ayudarme a aprender tantas cosas durante este año y medio de trabajo. Además, a Pablo Tapia, por permitirme ser parte de este proyecto de investigación. Por último, a Leyla Alegría, gracias por tu infinita ayuda y disposición cada vez que lo necesité.

Por otro lado, quisiera agradecer a toda la familia del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, quienes hicieron posible que mi estadía ahí fuera lo más agradable y amena. En especial a la Profe Edda, por estar siempre ahí, preocupada y pendiente de esta nietecita. Profe Javier, gracias por su constante disposición y ayuda para sacar esto adelante, fue un personaje importante durante este tiempo. Profe Olo y Marianita, agradecerles su gran apoyo y hacer lo posible por facilitar lo que estuviese a su alcance. Coni y Álvaro, fueron la compañía esencial y necesaria, sobre todo en este último período. Agradezco que el destino nos haya juntado y forjado esta linda amistad.

A todos mis amigos de la U, quienes durante estos seis años pasaron a ser parte importante de mi vida universitaria, tanto para aquellos con los cuales comparto actualmente, como para aquellos que en algún momento fueron parte importante de mi círculo cercano. Pancha, no bastaron cinco años de clases, sino que tuvimos que seguir juntas en el laboratorio para seguir teniendo lindos recuerdos, pero aún queda mucho más por delante para seguir juntas. Consu, empatía, dedicación y generosidad, son algunas de las muchas cualidades que te hacen una excelente amiga que espero nunca perder. Pablo, fuiste un apoyo fundamental durante todos estos años, mi contención en todo momento, de verdad gracias por estar siempre ahí, por aguantarme cuando lo necesité y cuando no también. Xavier, gracias por toda tu preocupación y apoyo, por ser el gran amigo que eres. Chico, son pocas las personas tan incondicionales como tú lo eres, no puedo estar más agradecida de tener un amigo como tú. Mequetrefes, no puedo evitar nombrarlos, todos ustedes son parte importante de mi reir diario.

Finalmente, pero no menos importante, quiero agradecer a toda mi familia, en especial a mis papás. Sin el apoyo de ustedes, nada de esto sería posible. Podría decir mil veces gracias y aun así no sería suficiente. Solo decirles que los amo y que son lo más importante que tengo.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Resumen	4
Abstract	5
1. Introducción	6
1.1. Metabolismo hepático	6
1.2. Paciente crítico y shock séptico	7
1.3. Hemofiltración de Alto Volumen	8
1.4. Lidocaína como herramienta para evaluar la función hepática en pacientes sometidos a HFAV.	10
2. Hipótesis	14
3. Objetivos	14
4. Metodología	15
5. Resultados y Discusión	20
5.1. Metodología analítica.	20
5.2. Otros ensayos.	37
5.3. Recolección de muestras.	41
5.4. Análisis de las muestras.	42
6. Conclusiones	43
7. Proyecciones	45
Referencias	46

RESUMEN

La sepsis grave es la patología más prevalente en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) del país, representando el 32,5% de los diagnósticos de ingreso, el que puede progresar a shock séptico. De estos individuos, se ha visto que existe un subgrupo que no responde a las medidas convencionales de tratamiento. Sin embargo, en esos pacientes, la Hemofiltración de Alto Volumen (HFAV) ha logrado una buena reanimación hemodinámica y reducción de la tasa de mortalidad.

Lidocaína es un fármaco con alta extracción hepática. La medición en suero de la relación entre la concentración de lidocaína y su principal metabolito obtenido por conversión enzimática en el hígado, monoetilglicinxilidida (MEGX), ha mostrado una buena relación para estimar la función hepática. El ensayo utilizado, para evaluar esto, es conocido como "test de MEGX", el cual podría ser una herramienta para establecer la condición de la función hepática en pacientes críticos. Hasta ahora, existe poca información del efecto en la relación lidocaína/MEGX durante la HFAV.

Objetivo: Desarrollar una metodología analítica que sea sensible, reproducible y fácil de realizar, para cuantificar lidocaína y MEGX en suero sanguíneo humano.

Resultados: La metodología desarrollada consistió en la extracción líquido-líquido de los analitos, utilizando diclorometano como solvente de extracción. La determinación y cuantificación fue mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a detector UV, utilizando una columna Waters YMC Pack Pro C18 250 mm x 4,6 mm, cuya fase móvil consistió en *buffer* fosfato 0,01M:acetonitrilo (88:12 %v/v) ajustado a pH 4,5, con un flujo de 0,8 mL/min y medido a una longitud de onda de 210 nm. Esta metodología cumplió con los parámetros de *performance* cromatográfica. A pesar de realizar ensayos de linealidad, precisión, exactitud, recuperación y estabilidad, la metodología no pudo ser validada ya que mostró gran variabilidad y desviación respecto de los valores teóricos, para alguno de los parámetros.

Conclusión: La metodología desarrollada no es reproducible, siendo el procedimiento de extracción uno de los factores limitantes del proceso.

ABSTRACT

PREVIOUS ANALYSIS FOR THE PHARMACOKINETIC CHARACTERIZATION OF LIDOCAINE AND MONOETHYLGLYCINEXYLIDIDE AS A TOOL IN THE HEPATIC FUNCTION EVALUATION IN CRITICALLY ILL PATIENTS WITH HEMODYNAMIC INSTABILITY ON A HIGH-VOLUME HEMOFILTRATION THERAPY.

Severe sepsis is the most common disease at the Intensive Care Units (ICUs) of our country, which represents 32.5% of admission diagnosis and it could reach a septic shock status. On patients with septic shock, there is a group non-responding to the typical treatment. Despite of that, High-volume hemofiltration (HVHF) has been applied, achieving an adequate hemodynamic reanimation and a lower mortality in this patients.

Lidocaine has a large hepatic extraction degree. Cuantification in human blood serum of concentration of lidocaine and its major metabolite of an hepatic conversion rute, monoethyglycinexylidide (MEGX), has shown a good relation to estimate hepatic function. The assay is known as "MEGX test", which might be a useful tool to determinate hepatic function in critical patients. Nowadays, there is not much information about HFAV on the effect on lidocaine/MEGX rate.

Objective: Develop a sensitive, reproducible and easy method for cuantification of lidocaine and MEGX in a human blood serum matrix.

Results: Developed method consists in a liquid-liquid extraction, using dicloromethane. Determination and cuantification was performed by HPLC-UV, using a Water YMC Pack Pro C18 250 mm x 4.6 mm column, with a movile phase consisting in a (88:12 %v/v) phosphate buffer 0.01M:acetonitrile adjusted at pH 4.5, 0.8 mL/min flow and 210 nm. Despite of good performance analysis, this method cannot be validated because of big variability and deviation of linearity, precision, accuracy and recovery assays.

Conclusion: The developed method is not reproducible. One of the most important limitation is the extraction procedure.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Metabolismo hepático.

En el hígado son transformados la mayoría de los fármacos liposolubles, siendo el principal órgano de metabolismo del organismo. Esto sucede mediante dos etapas: Fase I y Fase II. Las reacciones de Fase I (Ej.: oxidación, hidrólisis, reducción, etc) están principalmente relacionadas con el sistema enzimático citocromo P450; mientras que las reacciones de Fase II (Ej.: conjugación con glucurónido, sulfatos, glutatión, etc) mediadas por enzimas citosólicas del hepatocito. Así se producen metabolitos más solubles en agua, con el objetivo de favorecer su eliminación por el riñón [1]. La capacidad de remover el fármaco desde la sangre ya sea metabolizándolo o eliminándolo se conoce como *clearance*, el que puede o no depender del flujo sanguíneo del órgano.

El flujo sanguíneo hepático promedio para un individuo adulto es 1-1,5 L/min, del cual cerca de 1/3 proviene de la arteria hepática y 2/3 desde la vena porta [1]. Ver Figura nº1. Para un fármaco, el grado de extracción hepática es la razón que existe entre el *clearance* hepático y el flujo sanguíneo del órgano, que puede ser igual a 1 cuando ambos valores son iguales (~1,5 L/min en humanos) [2] y depende de:

- Flujo sanguíneo: refleja el transporte del fármaco al hígado.
- Fracción libre de fármaco en sangre: afecta el acceso del fármaco a las enzimas y la habilidad intrínseca de las enzimas hepáticas para metabolizar un fármaco.
- Clearance intrínseco: es la habilidad del hígado para remover fármacos en ausencia de limitaciones en el flujo y unión a proteínas plasmáticas.

Un fármaco de alto grado de extracción hepática es aquel que es removido desde la sangre por el hígado de forma rápida y extensiva, y su *clearance* depende principalmente del flujo sanguíneo, con una extracción flujo dependiente [2].

1.2. Paciente crítico y shock séptico.

El paciente crítico es aquel que tiene una alteración de la función de uno o más órganos del sistema, lo que puede comprometer su supervivencia en algún momento de su evolución, por lo que requiere un soporte vital y monitorización constante en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) de un centro asistencial.

La sepsis grave es la patología más prevalente en las UCI del país [3], representando el 32,5% de los diagnósticos de ingreso, cuya mortalidad asociada a los 28 días es del 27,4%. Estos resultados coinciden con un estudio previo realizado en Estados Unidos [4] donde se encontró que anualmente existían más de 700.000 casos de sepsis grave, con una mortalidad asociada de 28%.

La sepsis es una expresión de una respuesta inflamatoria sistémica asociada a una infección, la cual puede ser de cualquier tipo y no está necesariamente en la sangre, normalmente cursando una hipotensión asociada. Además, en más del 50% de estos pacientes puede desarrollarse una disfunción hepática asociada a esa condición [2,5]. Si la hipotensión provocada es capaz de ser revertida por la administración de fluidos endovenosos, se habla de una “sepsis grave”, siendo la mayor expresión de la sepsis. Si esta hipotensión no puede ser revertida con dichos fluidos, se habla que el paciente se encuentra cursando un “*shock séptico*” (SS). El *shock* es un deterioro del estado circulatorio caracterizado por una mala perfusión sostenida de los órganos vitales que si no es corregida puede llevar a la muerte, donde la hipoperfusión de tejidos inducida por la sepsis puede generar acidosis láctica, oliguria, trastornos del estado mental, entre otras complicaciones [6].

La sepsis grave y el SS son condiciones asociadas a una elevada morbimortalidad, debido al pequeño margen de error que tienen al momento de elegir una terapia antibiótica inicial [6]. Durante el transcurso de sepsis grave, los pacientes experimentan múltiples incrementos o reducciones en las concentraciones de los diferentes mediadores de la inflamación, tanto en la sangre como en los tejidos [7]. Junto con esto, se puede producir un daño endotelial atribuible a leucocitos polimorfonucleares, prostaglandinas y leucotrienos, provocando un incremento de la permeabilidad capilar.

Así, grandes cantidades de fluidos pueden ser transportados al intersticio y con ello dar lugar a una prolongada acumulación de agua, llevando a un edema intersticial [2].

En una etapa inicial, la sepsis puede manifestarse con un aumento del flujo sanguíneo a ciertos tejidos, constituyendo una fase hiperdinámica, cuyo resultado podría aumentar la eliminación de fármacos al favorecer la irrigación de órganos como el hígado. Asimismo, durante una fase hipodinámica de la sepsis, la eliminación se esperaría que disminuyese. Sin embargo, una disminución de la perfusión en la microcirculación durante la sepsis hiperdinámica, a pesar de un aumento del flujo sanguíneo total, puede resultar en una reducida capacidad de entregar fármacos a los hepatocitos, llevando así a una disminución del clearance de éstos [2].

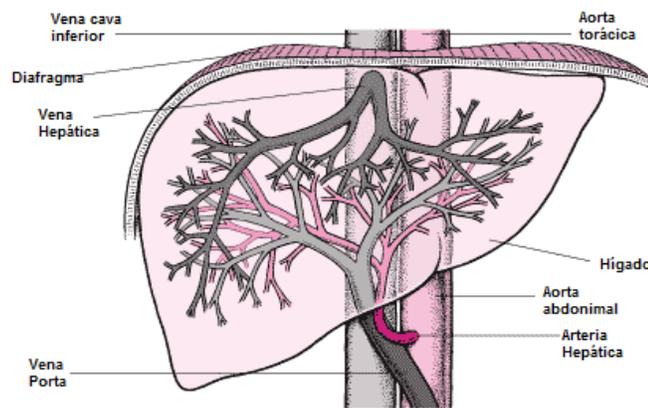


Figura n°1: Esquema del flujo sanguíneo hepático.

1.3. Hemofiltración de Alto volumen.

De los individuos con SS existe un subgrupo que es refractario a medidas convencionales, teniendo una mayor tasa de mortalidad. En la UCI del Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica se ha aplicado con éxito la Hemofiltración de Alto Volumen (HFAV) en esos pacientes, logrando una adecuada reanimación hemodinámica y reducción de la tasa de mortalidad [8,9]. La HFAV consiste en remover de la sangre, entre otros compuestos, las citoquinas pro y anti-inflamatorias asociadas

al trastorno inflamatorio severo que podría conducir a una disfunción orgánica, mediante el paso de la sangre del paciente por un filtro en forma extracorpórea.

El síndrome de disfunción multiorgánica es una alteración fisiológica progresiva de dos o más órganos vitales, luego de una alteración aguda de la homeostasis sistémica al cursar, por ejemplo, trauma severo o sepsis. La HFAV es una herramienta complementaria en la estabilización hemodinámica de pacientes con SS e insuficiencia renal aguda. La hemofiltración, en particular la HFAV, tiene la capacidad de remover gran parte de los mediadores inflamatorios como TNF- α y varias interleuquinas, factor activador de plaquetas y factores del complemento involucrados en la cascada inflamatoria de la sepsis. Por lo tanto, la HFAV no actuaría solamente como una técnica de depuración sanguínea, sino también como un tratamiento inmunomodulador en la sepsis. De esta forma, una dosis de ultrafiltración >50 mL/kg/h o dosis séptica podría ser necesaria para promover la estabilización hemodinámica, mejorar las disfunciones orgánicas e incrementar la posibilidad de supervivencia de estos pacientes [7].

En un estudio previo cuyo propósito fue evaluar el efecto de una sesión de HFAV de 12 horas de duración sobre los requerimientos de norepinefrina y los niveles plasmáticos de lactato arterial en 20 pacientes consecutivos con SS grave hiperdinámico y acidosis láctica [8]. La sesión de HFAV se inició dentro de 6h de haber alcanzado el umbral de gravedad. Los pacientes se considera que responden si al finalizar el periodo de 12 horas de HFAV, los requerimientos de NE y las cifras de lactato arterial se habían reducido, al menos, en un 30%. De los 20 pacientes estudiados, 11 respondieron a la intervención (55%). 72 horas post HFAV, solo un paciente requería infusión de NE (0,1 mg/Kg/min). Por el contrario, en el mismo lapso de tiempo, 4 de los 9 pacientes no respondedores a la HFAV habían muerto en shock refractario y 3 todavía requerían de NE en dosis sobre 0,15 mg/Kg/min. No se encontró ninguna variable que identificara a priori a los pacientes que se podrían beneficiar de una HFAV, siendo el único predictor de supervivencia para este grupo de pacientes fue la respuesta misma a la HFAV.

En este contexto, en pacientes cursando sepsis grave o SS y recibiendo HFAV, resulta necesario disponer de alguna herramienta para estimar cómo cambia la función hepática

de estos pacientes debido a las alteraciones de flujo sanguíneo en ciertos órganos, principalmente el hígado.

1.4. Lidocaína como herramienta para evaluar la función hepática en pacientes sometidos a HFAV.

Se ha planteado estimar la capacidad de metabolización de lidocaína como evaluación de función hepática, midiendo la relación entre lidocaína y su principal metabolito, monoetilglicinxilidida (MEGX) formado por la conversión enzimática hepática [10,11]. Al administrar un bolus intravenoso de lidocaína en dosis subterapéuticas (1 mg/Kg), se cuantifica en suero la cantidad de lidocaína y MEGX formado a los 15 ó 30 minutos post administración, mediante alguna de las metodologías de cuantificación descritas en la literatura.

Desde el punto de vista farmacológico, lidocaína pertenece a la familia de los anestésicos locales, pero además ejerce efectos antiarrítmicos, clasificado como un agente antiarrítmico clase Ib [5,12-14]. Estructuralmente, es una amino-amida cuyo metabolismo principal es por vía hepática (>95%), específicamente por el grupo de enzimas CYP3A [5,15]. MEGX es el metabolito principal de esta ruta de metabolización [5,13], resultado de una N-dealquilación. Ver Figura n°2.

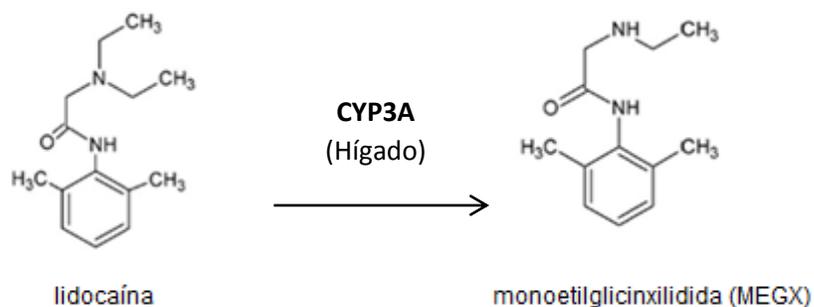


Figura n°2: Estructuras químicas de lidocaína y, su metabolito principal, monoetilglicinxilidida (MEGX).

En adultos, el rango terapéutico aceptado para lidocaína es de 1,5-5,0 µg/mL y con una función hepática normal tiene una vida media de eliminación de 1,5 horas (1-2 horas),

un volumen de distribución central (V_c) es de 0,5 L/Kg y volumen de distribución total (V_t) de 1,5 L/Kg. Una condición anormal de la homeostasis y hemodinamia del organismo, como lo es la sepsis o el SS, pueden cambiar los parámetros farmacocinéticos de lidocaína [5].

El grado de extracción hepática de la lidocaína es alto, cercano al 70%. Debido a esto se espera que el flujo sanguíneo hepático sea un factor predominante sobre el *clearance* de lidocaína [5]. Al presentarse una condición que disminuya el flujo sanguíneo hepático, se espera que exista una disminución del *clearance* asociado a la dependencia que existe entre ambos, pero esto no significa que se modifique la fracción libre de fármaco en la sangre [1].

Referente a lo anterior, estudios muestran que para pacientes críticos existe un descenso en los valores de la concentración de MEGX. Una primera investigación reveló que 9 de 10 pacientes participantes del estudio, que desarrollaron una disfunción multiorgánica sin sepsis, presentaron un agudo descenso en los valores medios de MEGX entre el día 1 y 3, desde 67 a 15 $\mu\text{g/L}$ [16]. Asimismo, otra investigación incluyó 29 pacientes críticos hospitalizados en una unidad de cuidados intensivos quirúrgicos. Los resultados de MEGX que fueron obtenidos el día 4 muestran que la mediana de los valores de MEGX (23 $\mu\text{g/L}$) de los 11 pacientes que fallecieron fueron significativamente más bajos que los correspondientes a los valores de los 17 sobrevivientes (53 $\mu\text{g/L}$) [17]. Es por lo anterior que esta disminución en la concentración de MEGX estaría asociada a un mayor riesgo a desarrollar síndrome de disfunción multiorgánica, así como también parece estar asociado a una mayor respuesta inflamatoria [11].

El alto grado de extracción hepática que posee la lidocaína, y la formación de su metabolito principal MEGX, permitiría usar este test como herramienta para establecer la condición funcional hepática en pacientes críticos. Así, podría ser una herramienta que nos permitiría ver cómo se encuentra un sistema enzimático dependiente del flujo.

1.4.1. Metodologías analíticas.

Existen distintas posibilidades para la determinación y cuantificación de lidocaína y MEGX, tales como cromatografía líquida de alta eficiencia (cuya sigla en inglés es HPLC) con detección ultravioleta o acoplado a espectrometría de masa (LC-MS) y el inmunoensayo de polarización por fluorescencia (cuya sigla en inglés es FPIA). La técnica de FPIA se encuentra disponible para la determinación de MEGX en suero sanguíneo humano. El más encontrado en literatura es el *kit* de la marca Abbott, el cual tiene un límite de detección cercano a 3 µg/L, descrito como fácil de realizar y que permite determinar MEGX en un corto tiempo [18]. A pesar de esto, su principal limitante es su baja selectividad ya que bilirrubina actúa como principal interferente [18], lo cual no se observa en el análisis mediante HPLC-UV [19].

La determinación mediante HPLC-UV posee la capacidad para determinar simultáneamente más de un analito, además de no presentar las interferencias nombradas anteriormente [19]. Aun así, se podría realizar la determinación de MEGX, mediante el acoplamiento de espectrometría de masa a la cromatografía líquida, de modo mejorar la precisión y exactitud de los ensayos, tanto para HPLC-UV como para FPIA, y utiliza un volumen de suero muy pequeño [20]. Las muestras para ser analizadas por HPLC-UV requieren un pre-tratamiento más extenso en tiempo, que las muestras preparadas para FPIA. Estos pre-tratamientos pueden ser realizados principalmente de dos formas, extracción líquido-líquido [21] y extracción por fase sólida [22].

Independiente de la técnica utilizada, este “*test* de MEGX” ha mostrado ser una buena herramienta para obtener importante información sobre la función hepática y la predicción de falla multiorgánica en pacientes críticos [11].

Por lo tanto, se postula que los pacientes críticos desarrollarían una disfunción hepática que estaría asociada a una mala relación entre la demanda metabólica y el flujo sanguíneo del hígado, a pesar de estar aumentado el flujo sanguíneo hepato-esplácnico. Es por lo anterior, que la evaluación del flujo sanguíneo es esencial para comprender cualquier disfunción orgánica en pacientes con *shock* y, por tanto, una alternativa para la evaluación metabólica es por medio del *test* de MEGX, determinando las concentraciones séricas tanto de lidocaína como de su metabolito MEGX. Además, el

uso de HFAV en el tratamiento de pacientes con inestabilidad hemodinámica podría mejorar los parámetros de perfusión hepato-esplácnica, lo que podría comprobarse a través de esta adaptación del *test* de MEGX, el que podría proveer importante información acerca del efecto de la HFAV en este tipo de pacientes sobre el sistema enzimático hepático.

Para esto, resulta necesario desarrollar una metodología analítica que sea sensible, reproducible y fácil de realizar, para poder cuantificar las concentraciones de lidocaína y MEGX, de forma de obtener resultados que ayuden a indicar, y establecer, una relación entre la metabolización de lidocaína y la función hepática de este tipo de pacientes.

2. HIPÓTESIS

Para pacientes críticos sometidos a Hemofiltración de Alto Volumen, se encontrarían alterados los parámetros farmacocinéticos de lidocaína y monoetilglicinxilidida, cuya medición podría ser una de las herramientas para evaluar un mejoramiento de la función hepática en pacientes hemodinámicamente inestables.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL.

Desarrollar una metodología analítica para cuantificar lidocaína y MEGX en suero humano, por HPLC acoplado a detector UV, para estudiar la farmacocinética de lidocaína y su metabolito principal (MEGX) en pacientes sometidos a HFAV.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Desarrollar y optimizar las condiciones cromatográficas para la determinación simultánea de tres analitos: lidocaína, MEGX y trimetoprim.
- Validar la metodología analítica desarrollada.
- Determinar lidocaína y MEGX en suero sanguíneo humano.
- Caracterizar la farmacocinética de ambas sustancias en pacientes críticos.

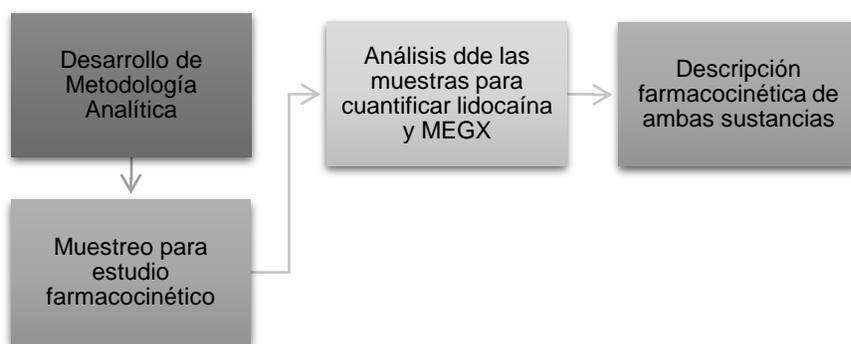
4. METODOLOGÍA

El presente trabajo es parte de un estudio más grande, prospectivo observacional no randomizado, llamado “Evaluación del impacto de la hemofiltración de alto volumen sobre la perfusión hepato-esplácnica en pacientes con inestabilidad hemodinámica: estudio piloto con una perspectiva fisiológica”, realizado por el Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile (HCPUC).

Este estudio constó con el reclutamiento de una muestra de pacientes, quienes cumplieron con ciertos criterios de inclusión. Los investigadores, calcularon un tamaño de muestra de 3 pacientes, considerando los objetivos que se plantearon en el proyecto al que pertenece este estudio.

De acuerdo a los requerimientos del estudio, este trabajo fue diseñado principalmente de cuatro etapas, indicadas en el Esquema n°1.

Esquema n°1. Flujograma para el desarrollo del trabajo.



4.1. Desarrollo de la metodología analítica.

Reactivos.

Los estándares de lidocaína y monoetilglicinxilidida (MEGX), ambos estándares primarios USP, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. El estándar secundario de

trimetoprim fue donado gentilmente por Laboratorios Andrómaco. Las sales, fosfato de potasio dihidrogenado, tetraborato de sodio decahidratado y el acetonitrilo Grado HPLC, fueron adquiridos en Merck Chile.

Equipo y condiciones cromatográficas.

Se utilizó un equipo HPLC Merck Hitachi, con bomba L-6200, acoplado a un detector L4200 UV-Visible e interfase D6000A, con *autosampler* L7250. Programa computacional L7000 HSM para la adquisición de los datos. Para la separación, se utilizó una columna Waters YMC-Pack Pro C18, 250 x 4,6 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5 μm .

La fase móvil consistió en *buffer* fosfato 0,01 M y acetonitrilo (88:12 %v/v) ajustando a pH 4,5 con ácido fosfórico, filtrada en un filtro Millipore® 0.22 μm y sometida a un baño de ultrasonido por 3 min. La longitud de onda de medición fue 210 nm, con un flujo de 0,8 mL/min.

Procedimiento de soluciones.

a) Preparación solución *stock*:

Se preparó una solución stock para lidocaína y para monoetilglicinxilidida (MEGX) de concentración 500 y 100 ppm respectivamente. Se pesó en balanza analítica exactamente una cantidad alrededor de 50 mg para lidocaína y 10 mg para MEGX, se agregó a un matraz volumétrico de vidrio de 100 mL, cada uno en un matraz distinto. Para disolver ambas sustancias se utilizó 1 mL de etanol 95° y se aforó el matraz con agua procesada para HPLC. En el caso del estándar interno, se preparó una solución de trimetoprim de concentración 100 mg/L. Para ello, se pesó en balanza analítica exactamente alrededor de 20 mg de trimetoprim y se pasó a un matraz volumétrico de vidrio de 200 mL. Fue llevado a baño ultrasonido hasta completa disolución de todas las soluciones.

El agua procesada para HPLC se obtuvo filtrando agua destilada en filtro Millipore® 0.22 µm y luego sometida a baño de ultrasonido por 5 minutos.

b) Solución de trabajo:

Considerando como referencia el rango teórico de concentraciones a ser encontradas en las muestras, según la publicación de Piwowarska y cols. [19], cada calibrante se preparó con lidocaína y MEGX. Las soluciones estándares de trabajo para calibrantes se prepararon en matraces volumétricos de 10 mL. En un matraz volumétrico de 10 mL, se realizó una mezcla de lidocaína y MEGX de la siguiente forma: se agregó el volumen previamente calculado de solución estándar para cada calibrante. Se obtuvieron siete soluciones calibrantes que contienen ambos compuestos. La adición de 25 µL del calibrante a 475 µL de suero, dio como resultado una concentración final de la muestra indicada en la Tabla n°1.

Tabla n°1. Concentración de soluciones de trabajo para lidocaína y MEGX.

Calibrante	1	2	3	4	5	6	7
LIDO (mg/L)	10	5,0	2,5	2,0	1,5	1,0	0,5
MEGX (mg/L)	1,0	0,5	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05

La solución de trabajo del estándar interno fue una solución final de trimetoprim 50 ppm. Se tomaron 5 mL de solución *stock* de trimetoprim y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL. Como se utilizó el método de adición estándar para la cuantificación de MEGX, se agregaron 1,7 mL de solución estándar de MEGX al mismo matraz aforado de 10 mL. La adición de 15 µL de solución de estándar interno a 500 µL de muestras de suero, dió como resultado una concentración final de 1,46 ppm de trimetoprim y 0,495 ppm de MEGX aproximadamente, la que fue fija para todas las muestras.

Una vez preparadas, todas las soluciones fueron ser almacenadas en refrigerador a 4°C.

Preparación de la muestra.

Las muestras preparadas fueron sometidas a un proceso de extracción con solvente orgánico de acuerdo a lo siguiente: a 500 μL de suero se le adicionó 15 μL de solución de trabajo de estándar interno (TMP 50 ppm y MEGX 17 ppm) y se agitó en vórtex por 5 segundos. Luego, se agregó 500 μL de una solución saturada de tetraborato de sodio decahidratado y se agitó en vórtex por 5 segundos. Por último, se agregó 3 mL de diclorometano y 300 μL de alcohol isopropílico. Se colocó en agitador rotatorio en velocidad 4 por 15 min y posteriormente se colocó a centrifugar a 4000 rpm por 5 min para luego separar fase orgánica, parte inferior, a un tubo limpio. Fue llevado a sequedad y, finalmente, se reconstituyó con 250 μL de fase móvil y se agitó en vórtex por 30 seg. Del volumen anterior se inyectaron 100 μL . Ver Esquema n°2.

Esquema n°2. Flujograma para el procedimiento de preparación de la muestra.



Validación de la metodología.

Procedimiento basado en las guías para validación de un método bioanalítico de la EMA (*Guideline on bioanalytical method validation*) publicado en julio de 2011 [23], en cuanto a especificidad, linealidad, precisión y exactitud, límite de cuantificación y detección, recuperación de la extracción, estabilidad de las muestras, efecto de los ciclos de congelamiento y descongelamiento.

4.2. Muestreo para estudio farmacocinético.

Protocolo de obtención de la muestra.

Se administraron tres bolus intravenoso de lidocaína en cada paciente, a los -60, 120 y 210 minutos, tomando como referencia de tiempo 0 min el momento de inicio de HEAV. Por lo anterior, se realizarán tres ciclos de toma de muestra, cada uno de 60 minutos. En cada ciclo, se tomaron 8 muestras sanguíneas de 4 mL. Ver Figura n°3.

Manejo de las muestras.

Se realizó un registro de la hora exacta de la extracción de las muestras para cada paciente. Las muestras se dejaron coagular para luego extraer el suero, el que luego fue almacenado a -80°C para su posterior análisis mediante la metodología analítica desarrollada. El procedimiento explicado anteriormente fue implementado mediante un instructivo de extracción y manejo de las muestras, entregado al personal correspondiente del hospital.

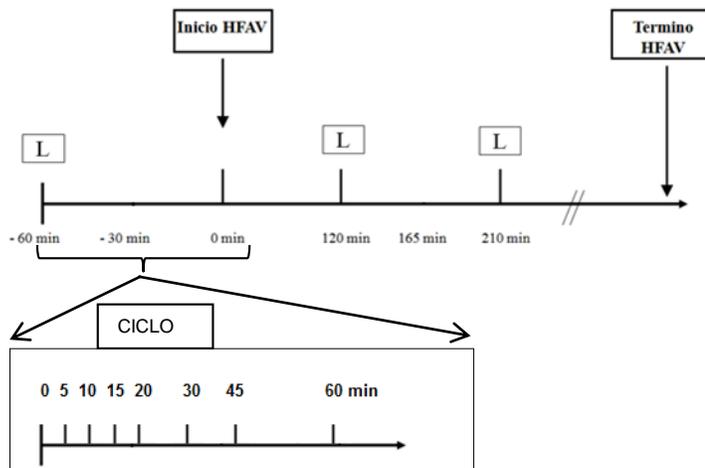


Figura n°3: Esquema del protocolo de administración de lidocaína. El cuadrado con la letra L simboliza la administración del bolus i.v. de lidocaína, lo cual da comienzo a cada ciclo por paciente. El cuadro inferior indica los tiempos a los cuales deben ser tomadas las muestras, donde la correspondiente al tiempo 0 min es tomada antes de la administración de lidocaína.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Metodología analítica.

Desarrollo y optimización de las condiciones cromatográficas.

Para establecer las condiciones cromatográficas iniciales, y sus posibles modificaciones, se realizó una revisión bibliográfica cuyos resultados se encuentran resumidos a continuación en la Tabla n°2.

Tabla n°2. Resumen bibliográfico de las condiciones cromatográficas para determinación simultánea de lidocaína y MEGX por HPLC-UV.

Ref.	Trabajo	Tipo de muestra	Columna	Fase móvil	Flujo (mL/min)	UV (nm)
[24]	Ferrufino, 2011	--	Chromolith RP-18, 100 mm	(35:65) ACN:BF 0.01M pH 7.4	1,3	210
[19]	Piwowarska, 2004	Suero	C8 150 mm	(12:88) ACN:BF 0,015M pH 3,0	0,8	205
[25]	O'neal, 1996	Suero	C8 250 mm	(10:90) ACN: Ac.Fosfórico 0,02M + 0,2mL/L trietilamina	1,7	205(M) 263 (L)
[26]	Chen, 1992	Plasma	C18 300 mm	(14:86) ACN:BF 0,05M pH 4,0	1,3	205
[27]	Kakiuchi,2002	Plasma	TSK gel 250 mm	(10:30:60) ACN:BF 0,05M:MeOH	0,6	210
[28]	Kihara, 1999	Plasma	---	(10:30:60) ACN:MeOH:BF	0,6	210
[29]	Klein, 1994	Plasma	C8 150 mm	(27:73) ACN:BF 0,05M pH 5,8	1,0	210
[30]	Swezey, 1984	Suero	Whatman ODS-35	(51:40:9) ACN:BF 0,5M:Ac.Fosf. pH 4,5	2,0	210

ACN=acetonitrilo, BF=Buffer fosfato, TMP=trimetoprim, MeOH=metanol. Ac=ácido.

El trabajo de referencia para la determinación de los analitos en suero sanguíneo humano para esta investigación fue el de Piwowarska y cols., [19]. Aun así, se decidió hacer una fusión entre el trabajo nombrado anteriormente y el de Ferrufino [24], ya que este último estudio fue realizado en los equipos disponibles en el laboratorio y, por tanto, se acerca más a las condiciones reales de trabajo.

De esta forma, las condiciones cromatográficas iniciales se establecieron a partir de ambos estudios. Ver Tabla n°3.

El primer paso fue la caracterización y comportamiento solo de lidocaína bajo distintas modificaciones de las condiciones mencionadas anteriormente. Para esto, se utilizó una solución de lidocaína inyectable de 20 mg/L, como prueba preliminar previa al uso del estándar primario. Principalmente se evaluaron tres modificaciones importantes: composición de fase móvil, pH de ésta y columna utilizada.

Tabla n°3. Condiciones cromatográficas iniciales.

Condiciones cromatográficas		Referencia
Columna	Waters C8 150 mm	[19]
Fase móvil	(35:65) ACN:BF 0,01M pH 7,4	[24]
Velocidad de Flujo	0,8 mL/min	[19]
Longitud de onda	210 nm	[24]

ACN=acetonitrilo, BF=*Buffer* fosfato.

Los primeros dos cambios apuntaron a la obtención de un tiempo de retención apropiado, que no fuese más extenso que 30 minutos, y producir una forma simétrica y aguda del *peak* cromatográfico.

Las pruebas realizadas en distintas columnas, se evaluaron con el objetivo de generar una óptima separación de los analitos sin generar interferencia de las señales entre ellos.

Estas pruebas iniciales se realizaron en un equipo cromatográfico Merck Hitachi, con bomba L6000A, acoplado a un detector L4200 UV-VIS e integrador D2500, cuya inyección es manual.

a) Cambio en la composición de la fase móvil.

Los resultados muestran que a una mayor proporción de acetonitrilo en la composición de la fase móvil, disminuyó el tiempo de retención de lidocaína en comparación al punto de inicio. Por el contrario, a una mayor composición de *buffer* fosfato en la composición de fase móvil, el tiempo de retención de lidocaína aumentó. Ver Tabla n°4. Esto puede

explicarse dado que, al pH con el que se está trabajando, la lidocaína se encuentra como molécula neutra, estado en el cual es más afín al acetonitrilo, eluyendo más rápido cuando existe mayor proporción de éste.

En el caso de su comportamiento frente a metanol, debido a que existen trabajos que ocupan este solvente como parte de la fase móvil, se eligió su utilización en reemplazo de acetonitrilo, considerando que es un compuesto más polar que acetonitrilo y menos polar que el agua. Aun así, el resultado fue un aumento en gran magnitud del tiempo de retención inclusive habiendo trabajado a un flujo mayor que el resto de las muestras, por lo cual su uso posterior se descartó.

Tabla n°4. Comportamiento de lidocaína en distintas composiciones de fase móvil.

Muestra	1	2	3	4	5*
BF (%)	65	80	50	60	60
ACN (%)	35	20	50	40	--
MeOH (%)	--	--	--	--	40
t _R (min)	8,30	41,58	5,74	16,04	98,48

Donde BF = *buffer* fosfato 0,01M pH 7,4 y cuyo flujo de trabajo fue 0,8 mL/min.

*El flujo utilizado para esta muestra en particular fue de 1,0 mL/min.

b) Cambio en el pH de la fase móvil.

Considerando el tiempo de retención arrojado en la muestra n° 4 de la Tabla n°4, se procedió a evaluar un cambio en el pH de la fase móvil para observar el comportamiento de lidocaína.

Tabla n°5. Comportamiento de lidocaína para distintos valores de pH de la fase móvil, cuya composición fue de (40:60) Acetonitrilo:Buffer fosfato 0,01M y velocidad de flujo utilizado fue de 0,8 mL/min.

	1	2
pH	7,4	5,8
t _R (min)	16,04	4,34

El efecto del cambio del valor de pH para el buffer fosfato tuvo su efecto de modo que a menor valor de pH menor fue el tiempo de retención para lidocaína. Ver Tabla n°5. Esto

se explica debido a que la lidocaína, al ser una base fuerte, para valores de pH menores se encontraría en mayor proporción protonada, lo cual generaría una mejor afinidad por la fase acuosa de la fase móvil, la cual es la parte mayoritaria de ésta, quedando así menos retenida en la columna.

En cuanto a otras modificaciones realizadas, se evaluó el cambio en la concentración de *buffer* fosfato y velocidad de flujo de la fase móvil, pero ninguno de estos generó grandes diferencias en el tiempo de retención de lidocaína.

Los comportamientos descritos anteriormente, se esperó fuesen similares al incluir el otro analito (MEGX) y el estándar interno (trimetoprim), para su determinación simultánea.

c) Cambio en la columna utilizada.

Según el trabajo de Piwowarska y cols., [19], el orden de elución de las tres moléculas es MEGX, trimetoprim y lidocaína respectivamente, de los cuales MEGX es el compuesto con menor concentración de trabajo y de un mayor costo asociado al estándar de este analito, por lo cual fue la última molécula en integrarse al desarrollo de la metodología.

Debido a lo anterior, el segundo paso fue la determinación simultánea de lidocaína con el estándar interno trimetoprim, para así lograr establecer las condiciones cromatográficas cuya separación de señales fuese óptima. De esta forma, se probaron distintas composiciones de la fase móvil y distintos valores de pH, pero para ningún cambio realizado se obtuvieron los resultados esperados, razón por la cual se realizó el primer cambio de columna, pasando a utilizar una columna Chromolith® RP-18 de 100 mm. En esta columna, se hicieron varias pruebas de composición de fase móvil y cambios en valores de pH, cuyos resultados no generaron una óptima separación de los dos compuestos, aun tratándose de una columna cuya eficiencia de separación es teóricamente mejor. Debido a lo anterior, es que nuevamente se procedió a cambiar la columna por una Waters YMC Pack Pro® C18 de 250 mm, la cual fue la definitiva a utilizar.

Con la nueva columna, se llegaron a las condiciones cromatográficas finales trabajadas con los estándares, presentadas en la Tabla n°6. Además, por la gran cantidad de muestras a procesar, fue necesario un equipo de HPLC-UV acoplado a un *autosampler*, por lo cual los últimos resultados experimentales fueron obtenidos de un equipo cromatográfico distinto al usado en un comienzo, procediendo a la utilización de otro equipo Merck Hitachi, con bomba L6200, acoplado a un detector L4200 UV-VIS e interfase D6000A, con *autosampler* L7250.

Cabe destacar que, a pesar de otorgar una mejor comodidad en cuanto al trabajo práctico, este equipo tiene una menor sensibilidad, lo cual provocó que las señales de MEGX, fuesen poco reproducibles y con alta variabilidad. Por esta razón se implementó una última modificación en la metodología, agregando la “adición estándar” para la cuantificación de MEGX utilizando una concentración base constante de 0,495 ppm y así generar una señal cuantificable y reproducible para las condiciones del equipo. De modo que la solución de estándar interno incluyó la concentración necesaria para generar una muestra con una base de 0,495 ppm de MEGX.

Estos resultados fueron más similares a los presentados por el grupo de trabajo de Piwowarska y cols., [19] que a los del trabajo de Ferrufino [24]. Todas las pruebas fueron realizadas tanto desde agua, como a partir de su extracción desde suero sanguíneo humano, ya que esta última es la matriz a utilizar.

Tabla n°6. Condiciones cromatográficas finales.

Columna	Waters YMC Pack Pro C18 250 mm
Fase móvil	(12:88) ACN:BF 0,01M pH 4,5
Velocidad de Flujo	0,8 mL/min
Longitud de onda	210 nm

ACN=acetonitrilo, BF=*Buffer* fosfato.

Bajo estas condiciones cromatográficas, los valores aproximados para los tiempos de retención de los compuestos MEGX, trimetoprim y lidocaína son 11, 14 y 18 minutos respectivamente. En la Figura n°4 se presenta un cromatograma representativo para la elución de los dos analitos y el estándar interno, cuyas condiciones cromatográficas fueron determinadas anteriormente.

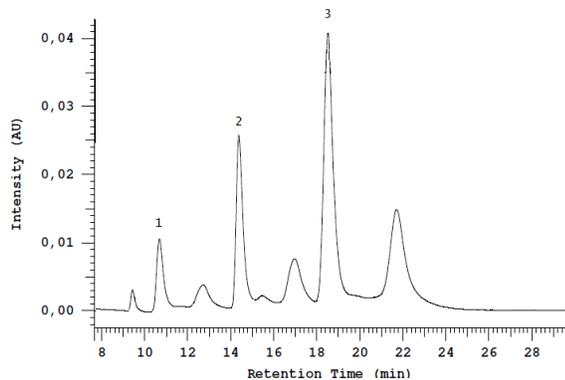


Figura n°4. Cromatograma para la determinación simultánea de MEGX 1 mg/L (1), TMP 1,46 mg/L (2) y LIDO 10 mg/L (3) en una matriz de suero sanguíneo humano. Los tiempos de retención fueron 10,68, 14,38 y 18,51 minutos respectivamente.

d) Parámetros de *performance* cromatográfica.

Para las condiciones cromatográficas finales, se calcularon distintos parámetros para evaluar si estas condiciones son óptimas para trabajar. Se realizó el cálculo del factor de retención, factor de separación o selectividad, resolución [31,32] y factor de simetría [32] en base al cromatograma de la Figura n°4. Ver Tabla n°7.

$$k' = \frac{t_R - t_m}{t_m}$$

Fórmula n°1

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

Fórmula n°2

$$RS = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{0.5 (W_A + W_B)}$$

Fórmula n°3

$$Tf = \frac{W_{0.05}}{2a}$$

Fórmula n°4

Factor de retención (k'): describe las velocidades de migración de los solutos en las columnas. Se calcula con la fórmula n°1. Lo ideal es obtener valores dentro del rango entre 2 -10, lo cual indicaría que el tiempo de retención para un analito no es ni muy extenso ni extremadamente rápido, resultados que se ven reflejados en la metodología desarrollada, en la cual se obtuvieron todos los valores >2.5.

$$k'_{MEGX} = \frac{10.68 - 2.9}{2.9} = 2.683$$

Factor de selectividad (α): Se calcula con la fórmula n°2 y siempre es mayor a 1. Para este análisis se realizó la selectividad de acuerdo al orden de elución, lo cual significó la selectividad trimetoprim/MEGX y lidocaína/trimetoprim. En ambos casos el factor de selectividad calculado fue mayor a 1.

$$\alpha_{TMP/MEGX} = \frac{3.959}{2.683} = 1.475$$

Resolución (R_s): es aquel factor que permite evaluar si existe una óptima separación entre dos analitos. Para calcular este parámetro se utiliza la fórmula n°3, para el cual se considera que con un valor >1.5 representa una separación completa de dos analitos. De acuerdo a esto, se puede observar que tanto la comparación de MEGX-trimetoprim y trimetoprim-lidocaína son >2.5 , lo cual indica que existe una buena separación de los analitos, siendo de esta forma consecuente con el cromatograma observado. Ver Figura n°4.

$$R_{sTMP/MEGX} = \frac{(14.38 - 10.68)}{0.5(1.3 + 1.4)} = 2.74$$

Factor de simetría (T_f): Muestra cuál es la asimetría del *peak* desde la forma Gaussiana. Se utiliza la fórmula n°4 para su cálculo, donde $W_{0.05}$ es el ancho del *peak* al 5% de la altura. Se espera que el valor sea lo más cercano posible a 1, pero se considera como bueno un factor de simetría <1.5 . Para los resultados de esta metodología se puede observar que para todos los compuestos es <1.5 , por lo cual se considera que existe una simetría aceptable para las señales entregadas.

$$T_{fMEGX} = \frac{1.2}{2 \cdot 0.5} = 1.2$$

Tabla n°7. Datos de la performance cromatográfica para las condiciones cromatográficas finales.

	Factor de retención	Factor de selectividad	Resolución	Factor de simetría
MEGX	2,683			1,20
trimetoprim	3,959	1,475	2,74	1,30
lidocaína	5,383	1,359	2,66	1,33

La información sobre la *performance* cromatográfica muestra que la metodología desarrollada tiene óptimas condiciones para seguir trabajando con ella y proceder a la validación de ésta.

Procedimiento de extracción de la muestra.

Se realizaron dos modificaciones con respecto al procedimiento líquido-líquido establecido por el trabajo de Piwowarska et al [19]. Por un lado, se disminuyó el volumen agregado de la solución de estándar interno, utilizando una de mayor concentración. Por otro lado, se adicionó alcohol isopropílico en un 10% v/v de la fase orgánica, para evitar la emulsión que era generada entre ambas fases durante el periodo de agitación de la muestra, de forma de optimizar la recuperación de los analitos.

Validación de la metodología analítica.

Todo este proceso fue realizado con muestras preparadas en suero sanguíneo humano como matriz de la muestra.

Para la validación de la metodología se realizó una curva de calibración todos los días, la cual se utilizó para la cuantificación de los distintos ensayos correspondientes a ese día. La evaluación constó de cuatro puntos dentro de ella. Estos cuatro puntos consideran el Límite de Cuantificación (LOQ) y tres controles de calidad (QC). Ver Tabla n°8.

Tabla n°8. Concentraciones para los niveles de trabajo en la validación analítica.

Nivel	Conc. MEGX (ppm)	Conc. Lidocaína (ppm)
LOQ	0,05	0,5
QCb	0,15	1,5
QCm	0,50	5,0
QCa	0,75	7,5

- El Límite de Cuantificación (LOQ) se estableció como el punto más bajo de la curva de calibración para cada analito.
- Control de calidad bajo (QCb): al menos tres veces el LOQ.
- Control de calidad medio (QCM): cerca del 50% del intervalo de la curva de calibración.
- Control de calidad alto (QCa): un 75% de la concentración más alta de la curva de calibración.

a) Linealidad: Curva de calibración.

Para evaluar la linealidad de lidocaína y MEGX, y se realizó una curva de calibración de siete puntos cuyas concentraciones fueron establecidas en base a las curvas de calibración encontrada en la literatura y los resultados de concentraciones experimentales del trabajo de Piwowarska et al [19], considerando a éstos como valores esperados en el análisis de las futuras muestras. Por lo tanto, las concentraciones para lidocaína fueron 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 5,0 y 10 ppm, mientras que para MEGX fueron 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,5 y 1,0 ppm.

Se realizó una curva considerando un punto blanco (matriz de suero), un punto cero (matriz de suero solo con el estándar interno) y siete puntos calibrantes correspondientes a las concentraciones esperadas determinadas previamente. Todas las muestras fueron hechas en triplicado.

Tabla n°9. Curva de calibración para lidocaína.

Conc. Teórica (ppm)	RA LIDO/TMP	SD	CV (%)	Conc. Exp. (ppm)	%error
0,5	0,1553	0,0098	6,31	0,4528	-9,45
1,0	0,3082	0,0347	11,27	0,9968	-0,32
1,5	0,3786	0,0647	17,09	1,2471	-16,86
2,0	0,6001	0,0088	1,47	2,0352	1,76
2,5	0,8052	0,1056	13,11	2,7647	10,59
5,0	1,4530	0,0046	0,31	5,0695	1,39
10,0	2,8196	0,0322	1,14	9,9310	-0,69

RA = razón. SD = desviación estándar. CV = coeficiente de variación. LIDO = lidocaína. TMP=trimetoprim.

Para lidocaína, los valores de las concentraciones experimentales promedio reflejaron un comportamiento lineal para el rango establecido entre 0,5 y 10 ppm, con $R=0,9989$, cuyo porcentaje de error respecto a la concentración teórica fue menor al 20% para todos los puntos. Ver Tabla n°9 y Figura n°5. Estos resultados son congruentes con estudios anteriores, en los cuales distintos autores plantean un comportamiento lineal para rango de concentración entre 0,1 a 5 ppm [19,25,26].

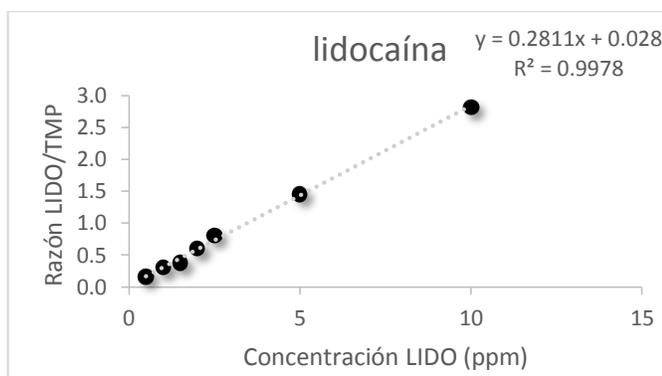


Figura n°5. Gráfico de la curva de calibración para lidocaína.

Para el caso de MEGX, los siete puntos establecidos con un rango entre 0,05 y 1 ppm, también mostraron un comportamiento lineal de las concentraciones promedio, con un $R = 0,9922$, ver Figura n°6. Considerando otros estudios, las curvas de calibración cuyo comportamiento fue lineal se encontraban en el rango entre 0,01-0,5 ppm [19,25,26], por lo cual el rango de evaluación fue bien establecido y su comportamiento lineal es congruente con estos estudios. A pesar de esto, si bien la variación es mayor al 20% en solo un punto, el desplazamiento de la concentración experimental respecto de la concentración teórica es muy grande, superando el 20% de diferencia en las concentraciones más bajas de la curva. Ver Tabla n°10.

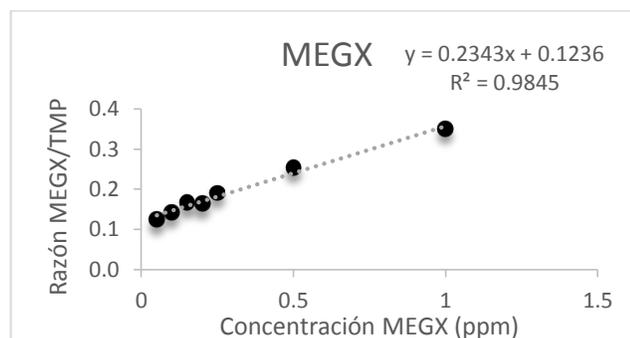


Figura n°6. Gráfico de la curva de calibración para MEGX.

Tabla n°10. Curva de calibración para MEGX.

Conc. Teórica (ppm)	RA MEGX/TMP	SD	CV (%)	Conc. Exp.	% Error
0,05	0,1239	0,008	6,19	0,0015	-97,09
0,10	0,1417	0,038	27,01	0,0773	-22,67
0,15	0,1670	0,002	1,37	0,1853	23,50
0,20	0,1648	0,019	11,50	0,1760	-11,98
0,25	0,1905	0,008	4,18	0,2857	14,30
0,50	0,2544	0,012	4,72	0,5583	11,66
1,00	0,3500	0,021	5,90	0,9664	-3,36

RA = razón. SD = desviación estándar. CV = coeficiente de variación. TMP = trimetoprim.

b) Precisión y exactitud.

Se realizaron dos ensayos para evaluar la precisión y exactitud: uno intradía y uno interdía. El primer ensayo consistió en el análisis de los cuatro puntos de la curva sometidos a evaluación, cada uno por quintuplicado. El segundo ensayo consistió en repetir dos veces más, en días distintos, el ensayo intradía, de forma de tener por triplicado este ensayo y así poder comparar los resultados.

a. Ensayo intradía: Este ensayo se realizó en tres oportunidades.

Para lidocaína, ver Tabla n°11, el comportamiento de los controles de calidad (QC) fueron similares, pudiendo observarse que para el primer día de evaluación los resultados experimentales tuvieron la mayor variabilidad, superando en todos los puntos un CV >20%, incluso para QCb se observa un CV >40%, y, además, presentado la mayor desviación de la concentración experimental respecto de la concentración teórica.

Para el segundo y tercer día de evaluación, los resultados de los QC fueron más cercanos al valor teórico siendo para QCb el valor absoluto del error <15% y para QCM y QCa <2%. Esto mismo se replica para la variación entre los puntos, cuyos valores reflejaron un CV <15%.

Este comportamiento no fue igual para el Límite de Cuantificación (LOQ), el cual presentó menos variación y desviación en el primer día de análisis, mostrando solo durante el segundo y tercer día un CV >20%, el cual indica que lidocaína también presentaría un patrón de variabilidad importante en la parte más baja de la curva.

Para el caso de MEGX, ver Tabla n°12, hay que considerar que todos los resultados, para los distintos días y puntos evaluados, presentaron una variabilidad muy grande reflejada por un CV >20% para todos los puntos analizados en cada día.

La mayor variabilidad se presentó durante el segundo día de trabajo, encontrando un CV >70% en todos los puntos evaluados. A pesar de esto, la mayor desviación respecto de la concentración teórica fue >60%, en su valor absoluto, en todos los puntos evaluados durante el tercer día, aun así no deja de ser menor la desviación del segundo día, cuyo valor absoluto de error fue en todos los puntos >20%.

Estos resultados no permiten asumir que existe una buena precisión en los análisis de MEGX dentro del mismo día de trabajo.

Tabla n°11. Precisión intradía para lidocaína.

Intradía lidocaína						
Tipo	Conc. Teórica	Día	Promedio	DS	CV (%)	% Error
LOQ	0,5	1	0,6740	0,0962	14,27	34,79
		2	0,4437	0,1157	26,08	-11,25
		3	0,8133	0,2120	26,06	62,67
QCb	1,5	1	1,0762	0,4467	41,51	-28,26
		2	1,2802	0,0955	7,46	-14,66
		3	1,3559	0,3723	27,46	-9,61
QCm	5,0	1	4,7656	1,0738	22,53	-4,69
		2	4,9104	0,6963	14,18	-1,79
		3	4,9686	0,3179	6,40	-0,63
QCa	7,5	1	5,5872	1,4754	26,41	-25,50
		2	7,3515	0,4305	5,86	-1,98
		3	7,3063	0,4415	6,04	-2,58

Tabla n°12. Precisión intradía para MEGX.

Intradía MEGX						
Tipo	Conc. Teórica (ppm)	Día	Promedio	DS	CV (%)	% Error
LOQ	0,05	1	0,1489	0,0659	44,24	197,79
		2	0,0050	0,0192	383,84	-89,99
		3	-0,1959	0,0459	-23,43	-491,72
QCb	0,15	1	0,1450	0,0310	21,40	-3,32
		2	0,0379	0,0405	107,01	-74,74
		3	-0,5151	0,1811	-35,16	-443,43
QCm	0,50	1	0,5536	0,2582	46,63	10,73
		2	0,3968	0,3787	95,45	-20,65
		3	0,1777	0,0722	40,64	-64,46
QCa	0,75	1	1,1875	0,4386	36,94	18,75
		2	0,4549	0,3577	78,64	-39,35
		3	1,6592	0,8329	50,20	121,23

b. Ensayo Interdía:

Para lidocaína, ver Tabla n°13, la variabilidad entre los distintos días para los QC presentan un valor <20%, tanto para el CV como para el valor absoluto del error. No así para el LOQ, cuyos valores son >20% para ambas comparaciones. Este mismo comportamiento está reflejado en el ensayo intradía, lo cual permite ver que para los valores más pequeños de concentración existen los mayores problemas de cuantificación.

Tabla n°13. Ensayo interdía para lidocaína.

INTERDIA lidocaína					
Tipo	Conc. Teórica (ppm)	Prom	DS	CV (%)	% error
LOQ	0,5	0,6437	0,1524	23,68	28,74
QCb	1,5	1,2374	0,1181	9,55	-17,51
QCm	5,0	4,8815	0,0853	1,75	-2,37
QCa	7,5	6,7484	0,8212	12,17	-10,02

Para el caso de MEGX, ver Tabla n°14, no existe una congruencia entre los valores entregados para los distintos días de trabajo, obteniendo un valor de CV >40% y un valor absoluto del error >20% para todos los puntos evaluables.

Esto coincide con el comportamiento del ensayo intradía y también con el LOQ de lidocaína en la comparación interdía, pudiendo observar nuevamente que para el trabajo con bajas concentraciones existe la mayor variabilidad de los análisis.

Este comportamiento fue una constante durante todos los ensayos realizados, el cual puede ser atribuido a la baja sensibilidad del equipo cromatográfico haciendo que el peak entregado para las concentraciones más bajas de la curva sean muy cercanas al área mínima cuantificable y reproducible por el equipo, por lo cual para concentraciones de trabajo menores a 0,5 ppm no sería factible asegurar una adecuada cuantificación.

Para el ensayo de precisión y exactitud, los valores anteriormente presentados no son congruentes con los encontrados en la literatura, ya que existen trabajos que indican valores de CV <5% [19,26-27] para los ensayos de precisión tanto intradía como interdía

de ambos analitos, así como también la exactitud de la metodología se presentan valores de CV <10% [19]. Esto permitiría esperar que la metodología desarrollada hubiese tenido un comportamiento apropiado y, por lo tanto, ser considerada reproducible, lo cual fue todo lo contrario a lo obtenido en los datos experimentales.

Tabla n°14. Ensayo interdía para MEGX.

Intedía MEGX					
Tipo	Conc. Teórica (ppm)	Prom	DS	CV(%)	% error
LOQ	0,05	-0,0140	0,1414	-1010,75	-127,98
QCb	0,15	-0,1107	0,2893	-261,20	-173,83
QCm	0,50	0,3760	0,1542	41,00	-24,79
QCa	0,75	1,1005	0,4955	45,02	46,74

Debido al mejor comportamiento mostrado para las concentraciones más altas de ambos analitos, tiene sentido pensar que la baja precisión podría ser corregida, o al menos disminuida, con el aumento de las concentraciones de trabajo. Aun así, esto no fue posible de implementar porque las concentraciones de MEGX a encontrarse debiesen ser bajas, ya que se espera que los pacientes incluidos en el protocolo, al cual pertenece este estudio, tengan una función hepática disminuida debido a su inestabilidad hemodinámica producida por su alta gravedad.

c) Recuperación.

Para este ensayo, los valores esperados era lograr una recuperación >80%, ya que la literatura establecía valores de >70% para lidocaína y >80% para MEGX [19,25-27,30].

Para lidocaína, la recuperación experimental fue entre 70-91%, valor que se asemeja a los valores esperados. En el caso de MEGX, la recuperación fue entre 45-90%, ver Tabla n°15.

Estos resultados muestran su menor valor para la concentración más baja evaluada, lo cual sigue indicando tendencia a problemas de cuantificación para las concentraciones más pequeñas de trabajo. Para los resultados de MEGX, existe gran diferencia entre los

valores de recuperación, siendo para QCb la mitad del valor presentado por QCa, pero siendo este último el único valor dentro de los resultados esperados.

Tabla n°15. Recuperación para lidocaína y MEGX.

lidocaína				
Tipo	Conc. Teórica (ppm)	Extraído	100%	% Recuperado
QCb	1,5	1,1603	1,6128	71,93
QCm	5,0	4,9844	5,5269	90,18
Qca	7,5	8,1567	8,9982	90,64
MEGX				
Tipo	Conc. Teórica (ppm)	Extraído	100%	% Recuperado
QCb	0,15	0,1325	0,2824	46,92
QCm	0,50	0,5574	0,8604	64,78
Qca	0,75	0,8785	1,0132	86,70

La extracción líquido-líquido es una técnica sencilla de realizar y se sugiere que para el análisis de anestésicos locales en muestras biológicas [21] se utilicen solventes orgánicos poco solubles en agua, de baja toxicidad y moderada volatilidad, requisitos que cumple el solvente utilizado, diclorometano, para el desarrollo de esta metodología. Aun así, se vieron altas variaciones en las áreas entregadas del estándar interno, por lo cual se puede inferir que no existió un comportamiento constante de la extracción, pudiendo ser consecuencia de la formación de una emulsión entre la fase acuosa y orgánica durante la agitación, a pesar de haber agregado alcohol isopropílico en un 10% para que esto no sucediera.

La alternativa para mejorar esta condición podría ser, por un lado, pensar en cambiar el solvente orgánico utilizado o cambiar la metodología de extracción, como lo sería la extracción en fase sólida, también descrita en la literatura [22].

d) Estabilidad.

Este ensayo contemplaba la realización de estabilidad a corto plazo, largo plazo y ciclos de congelamiento-descongelamiento. Los tres ensayos se realizan utilizando dos puntos de análisis, QCb y QCa.

- Estabilidad a corto plazo: Se realizan dos análisis, uno a tiempo cero (T0) y otro luego de seis horas (T6). Cada uno por triplicado.
- Estabilidad a largo plazo: Se prepara un set de 18 muestras para cada control de calidad. Se analizan tres muestras de cada QC, valores que corresponden al tiempo cero. El resto se congela y cada semana se analizan tres muestras por cada control de calidad. Esto abarca T0, semana 1, semana 2, semana 3, semana 4 y semana 10.
- Estabilidad por ciclos de congelamiento-descongelamiento: Se prepara un set de 12 muestras para cada control de calidad. Se analizan tres muestras de cada QC, las que corresponden al tiempo cero y se congela el resto. Cada día, se descongelan todas las muestras restantes y se analizan tres de cada nivel. Esto abarca ciclo CD T0, ciclo CD 1, ciclo CD 2 y ciclo CD 3.

a. Estabilidad a corto plazo.

Los resultados para lidocaína presentan un baja variabilidad, CV <5%, y desviación con respecto a la concentración teórica <20%. Para MEGX, los resultados siguen el mismo patrón obtenido en los ensayos anteriores, cuyo valor más pequeño de concentración evaluado presenta un valor de desviación con respecto al valor teórico de concentración muy grande. Ver Tabla n°16.

De los tres ensayos de estabilidad propuestos anteriormente, se realizó solo la estabilidad a corto plazo, ya que luego de evaluar los resultados encontrados para precisión y exactitud, se decidió no seguir con el resto de los análisis pendientes para la validación, debido a la baja reproducibilidad que presentó la metodología.

Tabla n°16. Estabilidad a corto plazo para lidocaína y MEGX.

lidocaína						
Tipo	Conc. Teórica (ppm)	Tiempo	Prom	SD	CV (%)	% Error
QCb	1,5	0 h	1,1603	0,0190	1,64	16,00
		6 h	1,3459	0,0145	1,08	
Qca	7,5	0 h	8,1567	0,1043	1,28	4,15
		6 h	8,4952	0,4520	5,32	
MEGX						
Tipo	Conc. Teórica (ppm)	Tiempo	Prom	SD	CV (%)	% Error
QCb	0,15	0 h	0,1325	0,0383	28,93	-75,60
		6 h	0,0323	0,0008	2,63	
Qca	0,75	0 h	0,8785	0,0271	3,09	-3,85
		6 h	0,8447	0,1829	21,65	

Aun así, la literatura indica que ambos analitos son estables a temperatura ambiente por más de 24 horas [20,33]. Las soluciones estándar indican ser estables por más de 90 días almacenadas a 4°C [34] y que las muestras de suero, o plasma, con lidocaína y MEGX presentan una buena estabilidad luego de seis meses almacenadas a -20°C [34] como también una buena estabilidad luego de 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento de 24 horas [20,33]

5.2. Otros ensayos.

Debido a los resultados obtenidos en la validación de la metodología analítica, se realizaron una serie de ensayos para mejorar las señales entregadas y ver una posible solución.

a) Evaluación de la condición de la columna: ensayo de platos teóricos.

Se evaluó con una inyección de 10 µL de acenafteno 230 ppm. Ver Figura n°7. Este ensayo se realizó tres veces, dando como resultado el mismo diseño del *peak*

cromatográfico, de forma que no se pudieron establecer los platos teóricos de la columna. Esto llevó a la conclusión de que la columna debido a su gran tiempo de uso, y matrices inyectadas, ya no estaba en condiciones de seguir siendo utilizada.

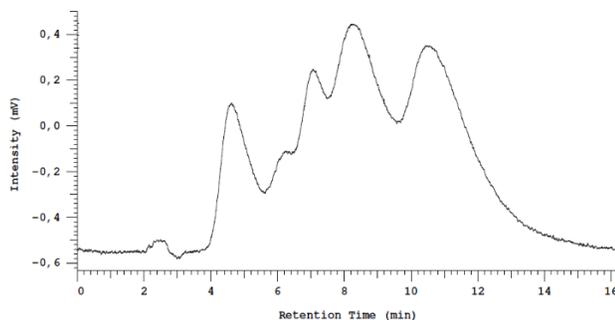


Figura n°7. Acenafteño 230 ppm para ensayo de determinación de platos teóricos.

Este resultado se condice con la forma de los *peak* obtenidos al momento de comenzar la validación hasta la decisión de darle término, ya que no presentaban una forma tan simétrica y aguda como en un principio.

Como resultado final, se cambió la columna por una nueva de la misma marca y modelo utilizado. Se realizó una prueba de los estándares de MEGX, trimetoprim y lidocaína, cuya muestra fue constituida por fase móvil, generando para los estándares señales simétricas, agudas y únicas. Ver Figura n°8. A pesar de utilizar el mismo modelo de columna, los tiempos de retención aumentaron generando un aumento en la corrida del análisis.

Con esta nueva columna, se procedió a realizar un ensayo de extracción en fase sólida para orientar hacia una nueva metodología de extracción.

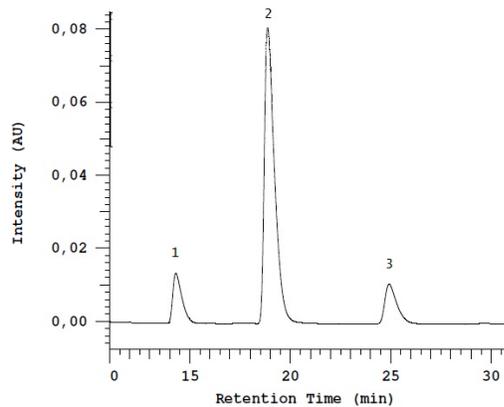


Figura n°8. Estándares MEGX 0,49 ppm (1), trimetoprim 1,46 ppm (2) y lidocaína 0,5 ppm (3) para la columna nueva.

b) Extracción en fase sólida.

Se realizó la reproducción descrita en el trabajo de Kang [22] junto con unas pequeñas modificaciones a este mismo procedimiento de extracción, proponiendo tres opciones de extracción. Ver Tabla n°17. Para esto se utilizaron cartridges Chromobond® C18ec para realizar una extracción preliminar de los analitos desde agua.

De las tres alternativas propuestas anteriormente, la única que mostró resultados con señales identificables fue la opción 3, cuyos resultados se encuentran en la Tabla n°18 y representados en la Figura n°9.

Estos resultados muestran que esta sería una buena alternativa para desarrollar un procedimiento de extracción con señales de mayor tamaño, ya que las de extracción líquido-líquido no superaban los valores de 70000 para estas mismas concentraciones extraídas de MEGX y lidocaína, además de también aumentar la señal de trimetoprim, la cual era cercana a los 800000.

Tabla n°17. Alternativas para procedimiento de extracción en fase sólida para lidocaína, MEGX y trimetoprim.

Opción 1 [22]	Opción 2	Opción 3
Lavar columna con 2 mL de acetonitrilo.	Lavar columna con 1 mL de acetonitrilo.	Lavar columna con 1 mL de acetonitrilo.
Lavar columna con 2 mL de agua.	Lavar columna con 1 mL de agua.	Lavar columna con 1 mL de agua.
Colocar la muestra en la columna de extracción. Lavar tubo de la muestra con 0,5 mL de agua y colocar en la columna. Agregar a la columna 1 mL de agua.	Colocar la muestra en la columna de extracción y agregar 1,5 mL de agua.	Colocar la muestra en la columna de extracción y agregar 1,5 mL de agua.
Lavar 4 veces con 0,5 mL de solución ACN:BF pH 9 (10:90).	Lavar 4 veces con 0,5 mL de Buffer Fosfato 0,01M pH 9.	Lavar 4 veces con 0,5 mL de Buffer Fosfato 0,01M pH 9.
Eluir con 500 µL de ACN:BF pH 4 (40:60).	Eluir con acetonitrilo. Llevar a sequedad y reconstituir en 250 µL de fase móvil.	Eluir con acetonitrilo ácido. Llevar a sequedad y reconstituir en 250 µL de fase móvil.
Inyectar 200 µL.	Inyectar 100 µL.	Inyectar 100 µL.

ACN:BF = acetonitrilo:buffer fosfato 0,01M.

Tabla n°18. Tiempo de retención (t_R) y área de los analitos para opción 3 del ensayo de extracción en fase sólida.

	Extracción Fase Sólida		Sin Extracción		% Extraído
	t_R	Área	t_R	Área	
MEGX	13,87	147520	14,31	210786	69,99
trimetoprim	18,19	1056662	18,87	1419662	74,43
lidocaína	24,06	139975	24,93	219299	63,83

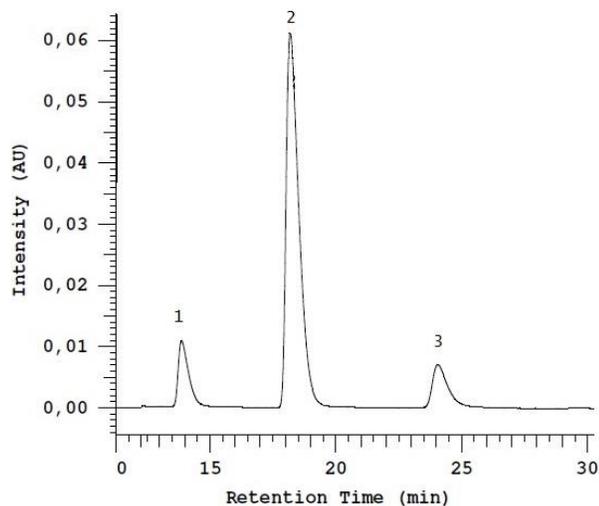


Figura n°9. Cromatograma para opción 3 de extracción en fase sólida. MEGX (1), trimetoprim (2) y lidocaína (3).

5.3. Recolección de muestras.

El estudio piloto estimó una muestra de tres pacientes para la evaluación de la efectividad de la HFAV sobre pacientes hemodinámicamente inestables, como terapia de rescate.

Las muestras de estos tres pacientes fueron recolectadas, donde para el paciente n°1 se pudieron recolectar solo los dos primeros ciclos y para los pacientes 2 y 3 los tres ciclos correspondientes. Ver Tabla n°19. Estas muestras permanecen almacenadas a una temperatura de -80°C.

Tabla n°19. Recolección de muestras sanguíneas para los pacientes del protocolo en estudio.

Paciente 1					
Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3	
Tiempo Teórico [min]	Tiempo [min] Sangre Arterial	Tiempo Teórico [min]	Tiempo [min] Sangre Arterial	Tiempo Teórico [min]	Tiempo [min] Sangre Arterial
0	---	0	---	0	---
5	0:04:55	5	0:05:30	5	---
10	0:10:00	10	0:11:29	10	---
15	0:14:55	15	0:15:15	15	---
20	0:19:48	20	0:21:05	20	---
30	0:30:56	30	0:30:30	30	---
45	0:41:05	45	0:46:18	45	---
60	---	60	0:58:10	60	---

Paciente 2					
Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3	
Tiempo Teórico [min]	Tiempo [min] Sangre Arterial	Tiempo Teórico [min]	Tiempo [min] Sangre Arterial	Tiempo Teórico [min]	Tiempo [min] Sangre Arterial
0	---	0	---	0	---
5	0:07:50	5	0:06:00	5	0:05:00
10	0:10:20	10	0:11:07	10	0:10:02
15	0:15:02	15	0:15:29	15	0:15:24
20	0:19:58	20	0:22:42	20	0:21:00
30	0:30:37	30	0:30:06	30	0:31:24
45	0:44:12	45	0:41:06	45	0:53:58
60	1:00:21	60	1:01:20	60	1:01:40

5.4. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS: Determinación de la concentración y parámetros farmacocinéticos de Lidocaína y MEGX.

Estos análisis no fueron realizados debido a que no se pudo completar y aprobar la validación de la metodología desarrollada.

6. CONCLUSIONES

Según lo visto en la literatura, el “test de MEGX”, es una prueba que no ha sido ampliamente usada con el correr de los años. En la actualidad, se intenta utilizar como una herramienta para evaluar la función hepática, de la cual sus usos más publicados son en pacientes cirróticos o con trasplante hepático.

Además, se considera que la determinación y cuantificación de lidocaína, MEGX y trimetoprim mediante cromatografía de alta eficiencia (HPLC) con detección UV, es una metodología simple, fácil de implementar, reproducible y de menor costo.

Considerando lo anterior, se desarrolló una metodología analítica que permite la determinación simultánea de tres compuestos: MEGX, lidocaína y trimetoprim, este último como estándar interno, utilizando como matriz suero sanguíneo humano.

Se realizaron ensayos de linealidad, precisión, exactitud, recuperación y estabilidad, cuyos resultados experimentales mostraron gran variabilidad y desviación comparándolos tanto a los valores teóricos establecidos como también para los encontrados en la literatura. Esto hizo que la metodología analítica desarrollada no pudiese ser validada, y por tanto no es reproducible.

Los mayores errores se encontraron en las concentraciones de trabajo más bajas para ambos analitos, siendo más variable para MEGX, cuyas concentraciones eran 10 veces menor que las concentraciones de trabajo para lidocaína. Por lo tanto, a medida que disminuía la concentración se presentaron mayores variaciones en los resultados.

A pesar de la gran variabilidad, el comportamiento de lidocaína estuvo marcado por la tendencia a acercarse a la validación para este analito. No así para MEGX cuyo comportamiento fue extremadamente variable, otorgándole poca fiabilidad a su análisis.

Los resultados fallidos se pueden atribuir a dos factores. Por una parte a la baja sensibilidad de la técnica cromatográfica utilizada y, por otro lado, al procedimiento de extracción de la muestra. Este último se cree es el más relevante, ya que durante el desarrollo de esta metodología, existió una gran variabilidad entre los distintos niveles

evaluados, generando una recuperación muy variable, sobre todo para MEGX, para el cual además sus resultados se alejaban del valor encontrado en la literatura.

Según lo anterior, se decidió hacer una prueba preliminar de cómo sería la extracción bajo un método de fase sólida. Este último ensayo mostró que las señales entregadas se generaban con un área de señal mucho mayor, la cual no sería problema para cuantificar. Por lo tanto, cambiar el procedimiento de extracción líquido-líquido por uno de extracción en fase sólida podría ser la solución para tener una cuantificación más confiable y menos variable que la obtenida en los resultados de este estudio, dejando la oportunidad de cumplir a cabalidad los objetivos iniciales planteados para esta investigación.

En cuanto al protocolo clínico, como Químico Farmacéutico, el rol principal consiste en la verificación de los tiempos correctos de recolección de muestras sanguíneas para poder realizar un óptimo análisis farmacocinético de los analitos. Además, permite la inserción al equipo de salud de investigación, ya que es el profesional encargado de la realización y análisis de los estudios que tienen relación con la caracterización farmacocinética de un fármaco, así como de las propuestas de dosis y forma de administración para obtener un resultado terapéutico adecuado.

Aun así, para este protocolo en particular, el desarrollo clínico fue complicado debido a la compatibilidad entre el diseño del estudio y la realidad práctica de éste, ya que se contemplaban pacientes de alta gravedad, por lo cual no fue posible seguir el protocolo estrictamente como estaba establecido.

7. PROYECCIONES

Considerando el procedimiento de extracción como uno de los factores limitantes, se podría desarrollar un procedimiento de extracción en fase sólida, de forma de optimizar y lograr una mejor recuperación de los analitos, cuyos resultados preliminares resultaron ser favorables para seguir con esta línea de trabajo.

Por otro lado, se podría desarrollar una metodología utilizando un equipo con mayor sensibilidad, como lo sería un espectrómetro de masa, debido a las bajas concentraciones de MEGX con las que se trabajan.

REFERENCIAS

1. Drug dosing in special populations: renal and hepatic disease, dialysis, heart failure, obesity and drug interactions en: BAUER, Larry. Applied clinical pharmacokinetics. 2° edición, Estados Unidos. McGraw Hill, 2008. 52-87
2. DE PAEPE Peter, BELPAIRE F. y BUYLAERT, Walter. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations when treating patients with sepsis and septic shock. Clinical Pharmacokinetics, 41(14):1135-1151, 2002.
3. DOUGNAC, Alberto et al. Prevalencia de sepsis grave en las Unidades de Cuidado Intensivo. Primer estudio nacional multicéntrico. Revista Médica de Chile. 135:620-630, 2007.
4. ANGUS, Derek C. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med 2001 Vol. 29, No. 7 1303-1310.
5. Lidocaine en: BAUER, Larry. Applied clinical pharmacokinetics. 2° edición, Estados Unidos. McGraw Hill, 2008. 356-382.
6. DELLINGER, Phillip y cols. Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock. Critical Care Medicine. 41(2):580-637. 2012.
7. ROMERO, C.M., DOWNEY, P., HERNÁNDEZ, G. Hemofiltración de alto volumen en shock séptico. Medicina intensiva, 34(5):345-352, 2010.
8. R. CORNEJO y cols. High-volume hemofiltration as salvage therapy in severe hyperdynamic septic shock. Intensive Care Med. 32(5):713-722, mar. 2006.
9. TAPIA, Pablo y cols. Effectiveness of short-term 6-hour high-volume hemofiltration during refractory severe septic shock. J Trauma, 72(5):1228-1238. 2012.
10. DRESING, K y cols. Real-time assessment of hepatic function is related to clinical outcome in critically ill patients after polytrauma. Clinical biochemistry. 40:1194-1200, 2007.
11. OELLERICH M. y ARMSTRONG VW. The MEGX test: a tool for the real-time assessment of hepatic function. Therapeutic Drug Monitoring. 23:81-92, 2001.
12. COLUMB, Malachy y RAMSARAN, Richard. Local Anaesthetic agents. Anaesthesia and Intensive Care Medicine, 11(3): 113-117. 2010.
13. MARTINDALE. The complete drug reference. 36° Edición, Reino Unido. Pharmaceutical Press. 2009. 1862-1866p.
14. A textbook of clinical pharmacology and therapeutics por RITTER, James et al. 5° Edición, Londres. Hodder Arnold, 2008. 219p.

15. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamics concepts en: BAUER, Larry. Applied clinical pharmacokinetics. 2° edición, Estados Unidos. McGraw Hill, 2008.
16. LEHMANN, U y cols. Monoethylglycinexylidide as an early predictor of posttraumatic multiple organ failure. *Therapeutic Drug Monitoring*, 17(2):125–32, 1995.
17. SCHROTER, J y cols. Lignocaine metabolite formation: an indicator for liver dysfunction and predictor of survival in surgical intensive care patients. *Anaesthesia*, 50(10):850–4. 1995.
18. SCHÜTZ, Ekkehars y cols. Determination of monoethylglycinexylidide by fluorescence polarization immunoassay in highly icteric serum samples: modified precipitation procedure and HPLC compared. *Clinical Chemistry*. 44(6):1269-1274. 1998.
19. PIWOWARSKA, J y cols. Liquid chromatographic method for the determination of lidocaine and monoethylglycine xylidide in human serum containing various concentrations of bilirubin for the assessment of liver function. *Journal of chromatography B*. 805:1-5. 2004.
20. WEIJDEN y cols. Easy and fast LC–MS/MS determination of lidocaine and MEGX in plasma for therapeutic drug monitoring in neonates with seizures. *Journal of Chromatography B*, 881– 882:111– 114. 2012.
21. BANICERU, M y cols. Chromatographic analysis of local anesthetics in biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 54:1-12. 2011.
22. KANG,L., JUN, H.W. y MCCALL, J.W. HPLC assay of Lidocaine in plasma with solid phase extraction and UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 19:737-745. 1999.
23. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Guideline on bioanalytical method validation. 2011.
24. FERRUFINO, Felipe. Estudio comparativo de la liberación in vitro de la asociación de lidocaína-prilocaína desde preparados magistrales. Tesis (Químico Farmacéutico). Santiago, Chile, universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2011. 68 h.
25. O'NEAL, Carol y POKLIS, Alphonse. Sensitive HPLC for simultaneous quantification of lidocaine and its metabolites monoethylglycinexylidide y glycinexylidide in serum. *Clinical Chemistry* .42(2):330-331. 1996.
26. CHEN y cols. HPLC method for the simultaneous determination of MEGX y lignocaine. *Journal of chromatography*. 574:361-364. 1992.

27. KAKIUCHI y cols. Chromatographic determination of free lidocaine and its active metabolites in plasma from patients under epidural anesthesia. *Int J Clin Phar and Ther.* 40(11):493-498. 2002.
28. KIHARA y cols. Plasma concentrations of lidocaine and its principal metabolites during continuous epidural infusion of lidocaine with or without epinephrine. *Regional anesthesia and pain medicine.* 24(6):529-533. 1999.
29. KLEIN y cols. Simultaneous determination of lidocaine, prilocaine and the prilocaine metabolite o-toluidine in plasma by high performance liquid chromatography. 655:83-88. 1994.
30. SWEZEY, C y PONZO, J. Liquid determination of lidocaine in serum. 17:230-232. 1984.
31. SKOOG, Douglas. A., HOLLER, F. J. y NIEMAN. Introducción a las separaciones cromatográficas. En su: Principios de análisis instrumental. 5ª ed. Madrid, McGraw-Hill, 1992. pp.730-757.
32. The United States Pharmacopeial Convention. Farmacopea de los Estados Unidos de América. 35th Revisión. Baltimore, MD, USA, United Book Press, 2012, volumen 1.
33. CARIS y cols. Automated analysis of lidocaine and its metabolite in plasma by in-tube solid-phase microextraction coupled with LC-UV for pharmacokinetic study. *J. Sep. Sci.* 35:734–741. 2012.
34. TOLEDO y cols. A Simple Method for Quantification of Lidocaine and Its Metabolite Monoethylglycine Xylidide in Plasma. *Chromatographia.* 71(5/6):545-547. 2010.