



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Validación de Métodos Analíticos por Cromatografía
Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la
Cuantificación de Cefuroxima, Delafloxacino y
Tilvalosina en Muestras Biológicas

Dña. Verónica Hernandis Belenguer

2022

PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONFORMAN LA TESIS DOCTORAL

La presente tesis doctoral titulada: “**Validación de métodos analíticos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de cefuroxima, delafloxacino y tilvalosina en muestras biológicas**” se presenta bajo la modalidad de compendio de publicaciones tras recibir la autorización de la Comisión General de Doctorado.

El compendio de publicaciones que ha dado lugar a la presentación de esta tesis doctoral lo conforman tres trabajos publicados en revistas indexadas en *Journal Citation Report (JCR)* cuyos detalles se muestran a continuación:

Publicación 1: **Hernandis, V.**, Escudero, E., Galecio, J., Marín, P. (2022). Quantification and Determination of Stability of Tylvalosin in Pig Plasma by Ultra-High Liquid Chromatography with Ultraviolet detection. *Animals (Basel)*, 12(11), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ani12111385>

Publicación 2: **Hernandis, V.**, Escudero, E., Marín, P. (2022). A novel liquid chromatography-fluorescence method for the determination of delafloxacin in human plasma. *Journal of Separation Science*, 45(3), 706–716. <https://doi.org/10.1002/jssc.202100768>

Publicación 3: **Hernandis, V.**, Escudero, E., Pareja, A., Marín, P. (2021). A fast, cost-saving and sensitive method for determination of cefuroxime in plasma by HPLC with ultraviolet detection. *Biomedical Chromatography*, 35 (10), 1–6. <https://doi.org/10.1002/bmc.5188>

Agradecimientos

A mis padres y a mi hermano, por todos estos años de largo sacrificio y por creer siempre en mí. Sin ellos hoy no estaría aquí.

A Felipe y Paula, mi familia; a la que tanto adoro y quiero con locura.

Gracias a mi hija Paula que me impulsó a seguir siempre adelante.

A D. Pedro Marín Carrillo, director de tesis y amigo, por darme la oportunidad de crecer como investigadora. Y...sobre todo, gracias...gracias...gracias... por apoyarme en esta difícil elección y por creer que este trabajo era posible.

A Doña. Elisa Escudero Pastor, directora de tesis y amiga que, con su inestimable ayuda, con su ímpetu y sabiduría, ha sabido ver en mí aquello que seguramente estaba oculto en mi interior: el amor por la ciencia y la investigación, demostrando que poco a poco se pueden alcanzar metas y sueños. Un millón de gracias.

A los profesores del Área de Fisiología Animal, que me han apoyado cada día con una sonrisa.

A mis inseparables amigas de “a la hora en punto” por aguantarme todas las mañanas (que no es poco), y por estar ahí cuando las he necesitado.

A mis amigos, a los que no olvido.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	CEFUROXIMA.....	4
1.2	DELAFLOXACINO.....	6
1.3	TILVALOSINA.....	9
1.4	VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	12
1.4.1	<i>Parámetros de validación de un método analítico.....</i>	<i>15</i>
1.4.1.1	Recta de calibrado	15
1.4.1.2	Selectividad	16
1.4.1.3	Especificidad	16
1.4.1.4	Efecto matriz	16
1.4.1.5	Límite de detección (LOD)	17
1.4.1.6	Límite de cuantificación (LOQ)	17
1.4.1.7	Exactitud.....	18
1.4.1.8	Precisión	19
1.4.1.9	Carry-over o arrastre	20
1.4.1.10	Recuperación.....	20
1.4.1.11	Efecto dilución	21
1.4.1.12	Estabilidad.....	21
2	BIBLIOGRAFÍA.....	25
3	OBJETIVOS.....	45
3.1	OBJETIVO GENERAL	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
4	JUSTIFICACIÓN Y ESTRUCTURA DE LA TESIS DOCTORAL.....	49
5	PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONFORMAN LA TESIS DOCTORAL. 55	
5.1	QUANTIFICATION AND DETERMINATION OF STABILITY OF TYLVALOSIN IN PIG PLASMA BY ULTRA-HIGH LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH ULTRAVIOLET DETECTION	55
5.2	A NOVEL LIQUID CHROMATOGRAPHY-FLUORESCENCE METHOD FOR THE DETERMINATION OF DELAFLOXACIN IN HUMAN PLASMA	69
5.3	A FAST, COST-SAVING AND SENSITIVE METHOD FOR DETERMINATION OF CEFUROXIME IN PLASMA BY HPLC WITH ULTRAVIOLET DETECTION	83
6	CONCLUSIONES.....	93
7	RESUMEN.....	97
8	SUMMARY	101

Introducción

1 INTRODUCCIÓN

El uso desmesurado de los antibióticos, tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, ha provocado en los últimos años una evolución rápida en la adquisición de resistencias microbianas y la aparición de superbacterias (Aslam et al., 2021; Li et al., 2022). La resistencia a los antibióticos es un problema grave a escala mundial, especialmente cuando se produce a múltiples agentes antimicrobianos, pues supone una grave amenaza para la salud pública y la medicina moderna. Si no se toman medidas es posible que para el año 2050 la tasa de mortalidad anual sea de diez millones de personas (Kraker et al., 2016; O'Neill, 2016). Asimismo, el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos se encuentra en un prolongado declive. Los laboratorios más importantes han abandonado este campo de investigación en beneficio de fármacos más rentables, útiles en tratamientos crónicos y sin pérdida de eficacia a lo largo del tiempo, como aquellos utilizados en terapia oncológica o enfermedades endocrinas (Plackett, 2020).

En atención a la problemática expuesta, la OMS en su plan de acción sobre la resistencia microbiana (OMS, 2015) persigue, entre varios de sus objetivos, utilizar de forma óptima y eficaz el uso de estos medicamentos en salud humana y animal. Si la evolución actual de las resistencias a antibióticos no se frena, se espera que sea una de las diez principales amenazas de salud pública a las que se enfrente la humanidad. El origen de las bacterias resistentes en la población humana se ha debido a muchas causas, como el alto consumo de antibióticos, uso sin prescripción médica de estos fármacos y tratamiento indiscriminado de infecciones simples con antibióticos, condicionando una intensa presión selectiva sobre las bacterias (Cecchini et al. 2015). En Medicina Veterinaria, la situación es también alarmante, debido a los grandes volúmenes de antibióticos que se han utilizado como promotores de crecimiento en varias especies animales, y en segundo término, a que el tratamiento de enfermedades infecciosas, no han contado con el acompañamiento de un cultivo y/o antibiograma (Alonso et al, 2018). En consecuencia, es de máxima importancia optimizar el uso de los antibióticos de manera que todo el esfuerzo conseguido para un desarrollo sostenible a nivel mundial, no se vea truncado por un uso desmesurado e irracional de los antimicrobianos. Además de este aspecto, la OMS en su política antimicrobiana plantea adecuar un tratamiento eficaz a cada paciente, con el mínimo de complicaciones y reacciones adversas, controlar el

desarrollo y propagación de cepas de microorganismos resistentes, así como reducir los costes hospitalarios siempre que sea posible (OMS, 2015).

Por otra parte, en la actualidad el movimiento “One Health” (Una sola salud) desarrollado por la OMS en colaboración con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y el Programas de las Naciones Unidas para el medio ambiente (UNEP) pretende centrar su enfoque en la integración entre la salud humana, la sanidad animal y el medio ambiente, con el fin de proteger la salud de todos, al mismo tiempo que proporciona una serie de herramientas para una mejora en todos los aspectos.

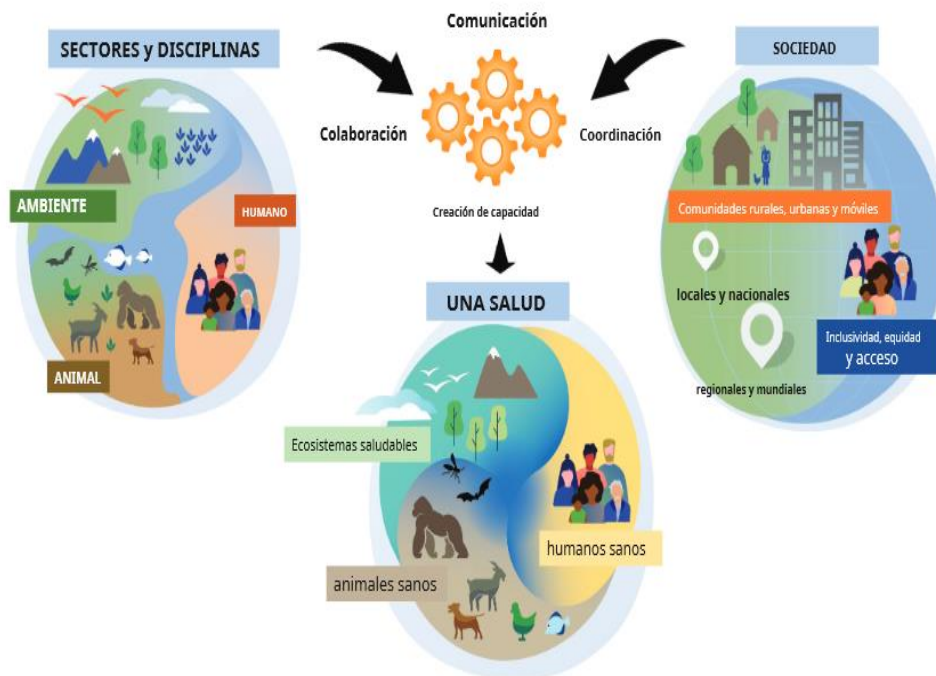


Figura 1: Ilustración del enfoque "One Health" (extraído de la declaración tripartita OMS, FAO, OIE)

En un primer nivel los objetivos principales en el enfoque “One Health” se centran en la concienciación, la educación, la vigilancia, la investigación, la prevención de infecciones, el uso responsable de los antimicrobianos y la innovación en nuevas tecnologías para hacer frente a la resistencia a los antimicrobianos (Ramanathan et al., 2020). En este sentido, para incidir en el uso responsable tanto en medicina humana y salud animal, así como disminuir el consumo de antibióticos haciendo hincapié en las premisas desarrolladas en la estrategia “One Health”, se pretende adecuar los tratamientos farmacológicos para obtener posologías ajustadas e individualizadas en cada paciente, de

manera que se maximice la eficacia clínica pero minimizando la toxicidad y el riesgo potencial de aparición de resistencias (Aslam et al., 2021; Collignon & McEwen, 2019; Hernando-Amado et al., 2019; McEwen & Collignon, 2018).

Para poder abordar todos estos aspectos es necesario recurrir a los estudios farmacocinéticos que se deben realizar en cada una de las especies de destino. El objetivo es la optimización los tratamientos antimicrobianos, maximizando la eficacia y minimizando la aparición de efectos adversos, además y más importante, disminuyendo el riesgo potencial de aparición de resistencias. En su definición más amplia, la farmacocinética comprende una rama de la farmacología cuyo fundamento estriba en el estudio del fármaco en su paso a través del organismo, es decir, la evolución temporal de las concentraciones de un fármaco en las diferentes matrices biológicas (sangre, plasma, tejidos) hasta que es eliminado (Currie, 2018). El conocimiento con exactitud de las concentraciones de un fármaco a lo largo del tiempo, junto con la utilización de herramientas matemáticas, constituye un primer paso para la obtención de los diferentes parámetros farmacocinéticos, con el objetivo de extraer toda la información necesaria de forma que se pueda individualizar el tratamiento farmacológico de acuerdo con las necesidades del paciente, optimizando la respuesta al fármaco y ajustando la dosis y régimen posológico del mismo (López-Briz & Ordovás-Baines, 2021).

En este sentido, los estudios farmacocinéticos constituyen una herramienta muy valiosa a la hora de evaluar la concentración de fármaco en el organismo, con la finalidad de asegurar el éxito clínico y evitar la aparición de resistencias bacterianas (Pantaleão et al., 2022). Para poder realizar el análisis cuantitativo de cualquier fármaco la determinación y validación de métodos analíticos en las muestras biológicas supone un paso previo fundamental a la hora de realizar los estudios farmacocinéticos, toxicológicos, de biodisponibilidad/bioequivalencia y monitorización de fármacos (FDA, 2021; Y. Huang et al., 2012; Shintani, 2012; Wicha et al., 2021). Por ello, es fundamental el desarrollo de métodos analíticos simples, rápidos, económicos, fiables y reproducibles que puedan ser utilizados para realizar estas investigaciones en cualquier tipo de laboratorio, sin la necesidad de emplear equipos sofisticados (Blanchard, 1981; Vuignier et al., 2010).

Atendiendo a lo expuesto anteriormente, se han seleccionado tres antibióticos que tienen en el futuro un gran potencial de desarrollo en nuevas indicaciones terapéuticas

tanto en medicina humana como en medicina veterinaria. Los antibióticos objeto de estudio son: cefuroxima (medicina humana y veterinaria), delafloxacino (medicina humana) y tilvalosina (medicina veterinaria).

1.1 CEFUROXIMA

Se han descrito en la literatura numerosos métodos para cuantificar cefuroxima en plasma humano mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de ultravioleta. Alguno de ellos proporcionan alta sensibilidad pero incluyen extracción en fase sólida en el proceso de extracción del fármaco (Denooz & Charlier, 2008; Piva G, Farin D, Gozlan I, 2000). Otros, sin embargo, usan metanol o acetonitrilo como reactivo extractante, evaporando finalmente el disolvente y alargando el tiempo de preparación de la muestra (Szlągowska et al., 2010; Wolff et al., 2013). Si bien es cierto que la cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas es una técnica con una sensibilidad muy alta, también hay que reconocer que tiene un elevado coste y, por tanto, no está disponible en muchos laboratorios, por lo que la determinación de cefuroxima por LC-UV sigue siendo una de las mejores opciones hoy en día.

Por lo anteriormente expuesto, es trascendental el desarrollo y optimización de un método rápido, económico y reproducible mediante LC-UV, que logre acortar el tiempo de análisis y permita la determinación de concentraciones de cefuroxima con rapidez para su monitorización clínica en hospitales, lo que posibilitará el ajuste de la dosis óptima en el paciente a fin de obtener un tratamiento más individualizado.

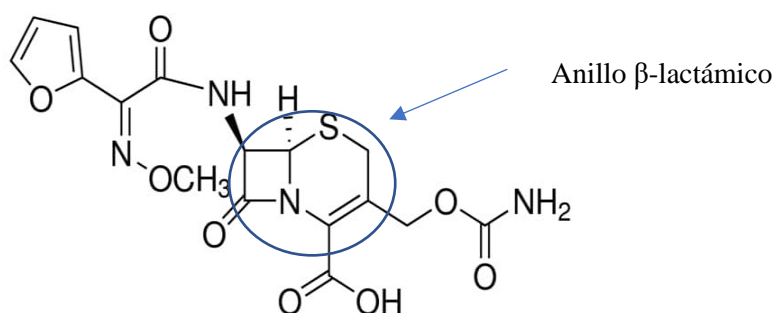


Figura 2: Estructura de la cefuroxima

La cefuroxima es una cefalosporina de segunda generación perteneciente al grupo de los antibióticos β -lactámicos por poseer en su estructura química básica el anillo

β -lactámico. Presenta actividad bactericida y es activa normalmente frente a aerobios grampositivos (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis* y *estreptococo beta-hemolítico.*), aerobios gramnegativos (*E. coli*, *Proteus mirabilis*, *H. influenzae* y *Moxarella (Branhamella) catarrhalis*) y algunos anaerobios (*Peptococcus spp.* *Peptostreptococcus spp.*) (Rao et al., 2013). Su profármaco (cefuroxima axetilo) es de elección en medicina humana debido a su gran permeabilidad y biodisponibilidad en las formulaciones orales (Mizera et al., 2020). La cefuroxima también se utiliza en medicina veterinaria (Albarellos et al., 2016; FAO, 2002) y en España, se encuentra comercializada como medicamentos genéricos la cefuroxima axetilo y la cefuroxima sódica.

La cefuroxima se presenta bajo la forma amorfa al 50% de dos diastereoisómeros, formando un polvo blanco-amarillento y las disoluciones concentradas presentan una ligera coloración amarillenta (Dabrowska & Krzek, 2010; Wozniak & Hicks, 1991). Posee un peso molecular de 424.4 g/mol y número CAS: 55268-75-2. Su forma amorfa es insoluble en agua y éter, ligeramente soluble en acetona y soluble en cloroformo, acetato de etilo y metanol. Su forma cristalina es también insoluble en agua y éter, pero ligeramente soluble en etanol anhidro, soluble en acetona y débilmente soluble en cloroformo (Castle & Medical, 2007). Se sabe que la forma amorfa presenta una mayor biodisponibilidad que su forma cristalina (Dhumal et al., 2008; Liu et al., 2014; Nagar & Yadav, 2012).

En soluciones acuosas, la cefuroxima sufre hidrólisis cuyo mecanismo depende del pH de una solución. La cefuroxima posee un $pK_a = 3.15$ y el pH óptimo para asegurar su estabilidad se encuentra en el rango de 4.5-7.3. Aparte del pH, la tasa de degradación de cefuroxima en soluciones acuosas también está influenciada por la temperatura, la composición del solvente, exposición a la luz, el tipo de almacenamiento y la presencia de bacterias (Kodym et al., 2011). Desde que la sal sódica de la cefuroxima fuese desarrollada por GLAXO® en 1976, esta forma es la más utilizada ya que presenta una mejor absorción cuando se disuelve en agua (Liu et al., 2014).

La cefuroxima posee un carácter hidrófobo por lo que se puede separar por cromatografía (Signs et al., 1984) y, particularmente por cromatografía en fase reversa que es una técnica de separación ampliamente utilizada en química analítica. Las variables que pueden afectar al desarrollo y optimización de un método cromatográfico

son: el detector, la fase móvil, la fase estacionaria, el método de extracción, la temperatura de la columna y la duración del cromatograma (Chew et al., 2021; Malviya et al., 2010; Meenakshi & Meenaxi, 2013; Peris-Vicente et al., 2022; Soni Love & Sanjay, 2016).

La longitud de onda de absorción de la cefuroxima es de $\lambda = 280$ nm (Vieira & Salgado, 2011), por lo que el uso de un detector de ultravioleta es lo más recomendable. La preparación de tampones para la fase móvil, ampliamente usados en cromatografía, permite una separación eficaz, pero con el inconveniente de provocar problemas en la bomba y el detector como obstrucciones y precipitación de sales (Albarellos et al., 2016; Szlagowska et al., 2010; Wolff et al., 2013). En este caso, el uso de fases móviles ligeramente ácidas evita el problema de precipitación y acorta el tiempo de preparación. La columna cromatográfica con sus dimensiones y relleno particular, permite obtener elevada especificidad en las separaciones cromatográficas (Andrić & Héberger, 2017; Zhang et al., 2014). Finalmente, el método de extracción es trascendental, tanto la extracción en fase sólida como la extracción líquido-líquido poseen el inconveniente de usar disolventes orgánicos que posteriormente deben ser evaporados, con el consiguiente consumo de tiempo en la extracción y evaporación (Colin et al., 2013; Partani et al., 2010).

1.2 DELAFLOXACINO

Delafloxacino, es una fluoroquinolona de cuarta generación (Azam et al., 2021) que ha sido aprobada recientemente por la FDA para el tratamiento de infecciones de piel y estructuras anejas agudas. Delafloxacino, fue desarrollada por los laboratorios Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd., (Osaka & Hiroshima, en Japón) y por los laboratorios ABBOTT® (Illinois, USA), (Kocsis & Szabo, 2016; Remy et al., 2012). Posteriormente Melinta Therapeutics (CT, USA) comercializó delafloxacino bajo el nombre de Baxdela® en Estados Unidos (Markham, 2017).

Desde diciembre de 2019, la Agencia Europea del Medicamento autorizó su comercialización bajo el nombre de Quofenix® de los laboratorios A. Menarini Industrie Farmaceutiche Riunite S.R.L (EMA, 2021), aunque en España la Agencia Española del Medicamento autorizó su uso en junio de 2021, todavía no está comercializado.

Al contrario que sucede con la cefuroxima, no existe ningún método económico para su determinación. Los escasos estudios que hay publicados hasta el momento,

determinan delafloxacino mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas (R. Hoover et al., 2016b, 2016a, 2017; R. K. Hoover et al., 2018; Iqbal et al., 2020, 2021; A. McEwen et al., 2015). Al disponer de pocos estudios farmacocinéticos que permitan mejorar la dosis de administración a los pacientes, la búsqueda de un método alternativo y económico que permita cuantificar delafloxacino con total seguridad y confianza es fundamental, además de la evaluación de la estabilidad del antibiótico en las muestras de plasma y en las disoluciones madre.

Atendiendo principalmente a una de sus propiedades físico-químicas, (la fluorescencia), delafloxacino, como la mayoría de las fluoroquinolonas, presenta una fluorescencia intrínseca (Bauer et al., 2013; Nabb et al., 2019), y de acuerdo a esta propiedad, la optimización y determinación mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de fluorescencia permitiría abaratar los costes de dichos estudios farmacocinéticos.

Delafloxacino se presenta en forma de polvo-blanco amarillento y se comercializa bajo la forma de delafloxacino meglumina con un peso molecular de 635.97 g/mol, con número CAS: 352458-37-8. Delafloxacino se debe conservar a -20°C según las recomendaciones del fabricante Targetmol (Cánada). Al ser poco soluble en agua, las últimas formulaciones de delafloxacino están estabilizadas con sulfobutiléter-ciclodextrina para mejorar así su solubilidad (Cho et al., 2018).

DELAFLOXACINO

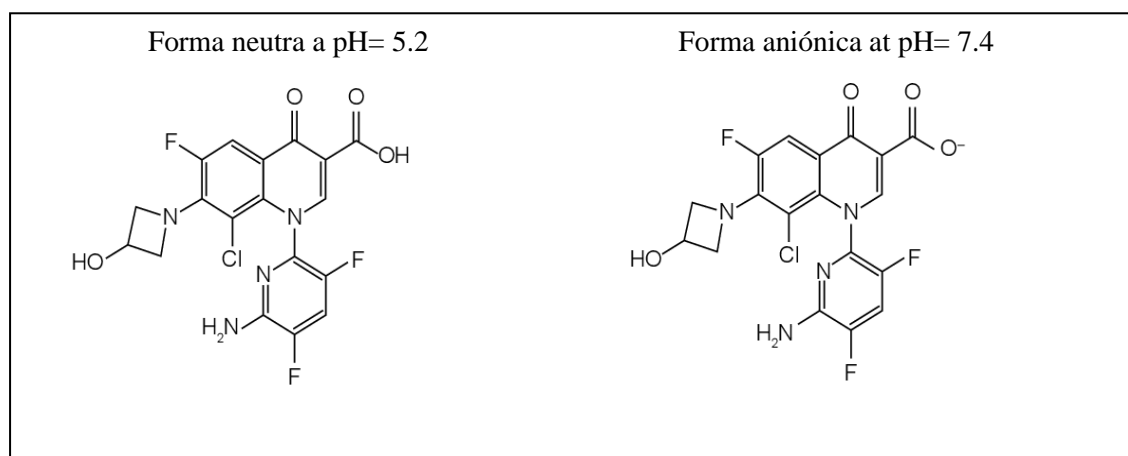


Figura 3: Estructura de delafloxacino a diferentes pH modificado de (Tulkens et al., 2019).

Por lo general, los valores de pKa de algunas fluoroquinolonas se encuentran entre 6 y 8, convirtiéndolas en anfóteras en medio fisiológico (Park et al., 2002; Pistos et al., 2005; Saleh et al., 2013). Sin embargo, delafloxacino aun siendo una fluoroquinolona, no exhibe un comportamiento anfótero, posee un pKa= 5.4 permitiendo que esta característica fisicoquímica sea clave confiriéndole unas propiedades extraordinarias en ambientes ligeramente ácidos.

Como se observa en la figura 3, a pH fisiológico (pH=7.4), la molécula delafloxacino se encuentra en forma iónica, mientras que a pH < 5.5, la molécula se encuentra no ionizada. Esta peculiar característica, que no presentan otras fluoroquinolonas, hace que la molécula se encuentre prácticamente neutra aumentando así su potencia en ambientes ligeramente ácidos, facilitando su penetración hacia el interior de la célula. Una vez la molécula llega al interior de la célula cuyo pH es neutro, la molécula se ioniza y es ahí cuando exhibe todo su potencial (Lemaire et al., 2011; Mogle et al., 2018; Saravolatz & Stein, 2019; Van Bambeke, 2015).

Las fluoroquinolonas se pueden determinar por cromatografía con detector de fluorescencia (Czyrski, 2017; Marín et al., 2013, 2018; Saleh et al., 2013; Sousa et al., 2012). Delafloxacino posee fluorescencia nativa (Bauer et al., 2013; Nabb et al., 2019), y teniendo en cuenta su pKa= 5.4, la forma de extracción en plasma difiere de la forma de extracción general de las fluoroquinolonas, que se basa en gran medida en la precipitación de proteínas con acetonitrilo (Ashri & Abdel-Rehim, 2011; Czyrski, 2017; Marín et al., 2013, 2018). Sin embargo, la extracción líquido-líquido permite aumentar la sensibilidad y el rendimiento del proceso de extracción, siempre que el pH de la fase acuosa y el disolvente orgánico de elección sean los adecuados, permitiendo acortar el tiempo del proceso de extracción (Ashri & Abdel-Rehim, 2011; Hammad et al., 2022; Tshepelevitsh et al., 2017). En relación a la elección de la fase móvil en las fluoroquinolonas, se prefiere el uso de fases móviles ácidas más que la elección de tampones (Sousa et al., 2012), aunque la adición de un modificador orgánico como el dodecilsulfato (SDS) aumenta el tiempo de retención de las fluoroquinolonas en medio ácido (Overholser et al., 2003). Otros reactivos muy estudiados en la separación de las fluoroquinolonas es la adición de aminas como por ejemplo dimetil, o trimetil aminas, con el objetivo de reducir las interacciones del fármaco con los grupos silanoles de la columna cromatográfica (Escudero et al., 2007; Kim et al., 2002; Nguyen et al., 2004). Por otro lado, las columnas utilizadas para el desarrollo y validación de los métodos analíticos de fluoroquinolonas

en cromatografía líquida acoplada a detectores de fluorescencia o ultravioleta son las denominadas columnas C18 sin ningún tipo de relleno especial (Czyrski, 2017; Kudchadkar & N Pai, 2019). En ese caso, la elección de una columna C18 lo más económica posible aseguraría una buena selectividad y sensibilidad abaratando los costes.

1.3 TILVALOSINA

Tilvalosina o acetilisovaleriltilosina es un macrólido semisintético de tercera generación derivado de la tilosina y, relativamente nuevo, registrado para su uso en medicina veterinaria en el tratamiento de afecciones respiratorias en aves y en la especie porcina (EMA, 2021). En España se comercializa bajo el nombre de Aivlosin® de laboratorios ECO Animal Health Europe Limited (Dublin, Irlanda). Aivlosin® está disponible como premezcla para pienso medicado o en forma de gránulo para añadir al agua de bebida. El tratamiento recomendado es la administración de 5 mg/kg con una única dosis diaria, durante 5 días. Su actividad es principalmente bacteriostática frente a bacterias gram positivas, algunos gram negativos y micoplasmas.

En relación a los métodos analíticos publicados hasta la fecha, sólo se encuentra la determinación de tilvalosina en plasma de aves mediante HPLC/UV (Elbadawy et al., 2019; Salman et al., 2016) y en suero de cerdo mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas (Canning et al., 2018). La estabilidad y cuantificación de la tilvalosina en plasma de cerdo mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de ultravioleta no ha sido evaluada, por lo que es necesario desarrollar y validar dicho método analítico de forma rápida y simple.

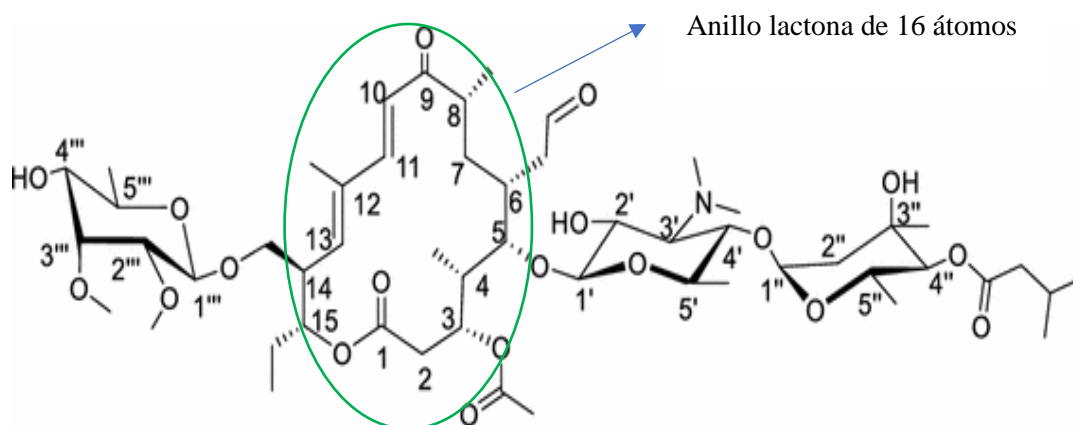


Figura 4: Estructura química de la Tilvalosina (Wu et al., 2017)

Introducción

Los macrólidos son una serie de antibióticos naturales y semisintéticos ampliamente utilizados en medicina humana y veterinaria, de los cuales se conocen más de 2000 compuestos cuyo anillo de lactona puede tener hasta alrededor de 60 átomos (Cobos-Trigueros et al., 2009). Debido a su bajo precio, los macrólidos han sido utilizados frecuentemente para profilaxis y tratamiento de enfermedades producidas por gérmenes sensible al antibiótico (Shiomi & Omura, 2003). En general los macrólidos poseen en su estructura una anillo lactona de 14, 15, 16 átomos (Hu et al., 2020). A su vez, los macrólidos de 16 átomos se dividen en dos familias, los derivados de la tilosina y los derivados de leucomicina-espíramicina (Arsic et al., 2018).

Como macrólido, la tilvalosina presenta propiedades físico-químicas similares. Los macrólidos son sustancias cristalinas de color blanco, blanco amarillento, poco solubles en agua, solubles en alcoholes y disolventes orgánicos como acetonitrilo, acetona, cloroformo y acetato de etilo (Oliva et al., 2002). Se caracterizan por ser bases débiles y muy lipofílicas. Son estables a pH neutro y se degradan con facilidad a pH bajos. Poseen un elevado peso molecular y puntos de fusión elevados (Lucas et al., 2007).

Con respecto a sus propiedades físico-químicas, tilvalosina se presenta como un polvo blanco o casi blanco y se comercializa como tartrato de tilvalosina con un peso molecular de 1132.93 g/mol y número CAS:63428-13-7. Posee dos pKa, pKa₁= 8.53 y pKa₂=12.57. Es poco soluble en metanol y dimetilsulfóxido (extraído de <https://go.drugbank.com/salts/DBSALT001708>).

De acuerdo con los métodos de separación de los macrólidos por cromatografía líquida publicados, cabe destacar que no todos los macrólidos absorben en la región del ultravioleta, por lo que su determinación por cromatografía con detector de ultravioleta sólo es posible si la molécula posee un grupo cromóforo (no todos lo poseen) (Bekele & Gebeyehu, 2012; Peris-Vicente et al., 2022). Los macrólidos con baja absorción en la región del ultravioleta (sin grupo cromóforo), por ejemplo la azitromicina, fueron determinados por cromatografía con detector de fluorescencia mediante derivatización y adición de un reactivo fluorescente, el cloruro de fluorenilmetoxycarbonilo (FMOC-CL), reactivo que es usado en química orgánica como grupo protector de aminas y altamente fluorescente (Bahrami et al., 2005; Główka & Karaźniewicz-Łada, 2007; Sastre Toraño & Guchelaar, 1998; Wilms et al., 2005). La determinación de azitromicina, claritromicina y gamitromicina generalmente se realiza por cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas que presenta los inconvenientes apuntados anteriormente (Berlin

et al., 2017; De Baere et al., 2015; Gordon et al., 2022; R. A. Huang et al., 2010; Sharma & Mullangi, 2013; Watteyn et al., 2013).

Al igual que la tilosina, la tilvalosina absorbe en la región del ultravioleta y ha sido determinada en plasma de pavo y pollo por cromatografía líquida acoplada a un detector de ultravioleta (Elbadawy et al., 2019; Salman et al., 2016). Aunque como se ha mencionado al inicio del apartado, también se ha descrito la determinación de tilvalosina en suero de cerdo por cromatografía acoplada a un espectrómetro de masas (Canning et al., 2018). Con respecto a la fase móvil, los estudios publicados en los que se determina tilvalosina en plasma y suero utilizan disoluciones tampón para su separación (Canning et al., 2016, 2018; Elbadawy et al., 2019; Salman et al., 2016). Los métodos de extracción de tilvalosina en ambas matrices que hay publicados son: extracción en fase sólida y extracción líquido-líquido (Canning et al., 2016; Elbadawy et al., 2019). Respecto a la selección de las columnas cromatográficas, los dos autores utilizan columnas C18, aunque tienen dimensiones distintas. Elbadawy et al., (2019) propone una columna de 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m. mientras que Canning et al., (2016) utiliza una columna más corta y con un tamaño de partícula menor (50 mm x 2.0 mm, 3 μ m).

Atendiendo a estas observaciones, el desarrollo y validación de un método cromatográfico rápido, sencillo y sensible para la determinación de tilvalosina en plasma de cerdo se convierte en un paso fundamental para poder realizar estudios farmacocinéticos que permitan el ajuste del régimen posológico óptimo en esta especie.

Por último, en los estudios farmacocinéticos, para poder evaluar la evolución temporal de las concentraciones de fármaco en las diferentes matrices biológicas a lo largo del tiempo, es necesario desarrollar previamente un método analítico óptimo para extraer el fármaco de la matriz donde se encuentra (plasma, leche...) y cuantificar con exactitud y precisión las concentraciones de fármaco en dichas matrices. En general se utiliza la cromatografía líquida (LC) o cromatografía líquida de alta eficacia cuyas siglas en inglés son HPLC acoplada a detectores como UV (ultravioleta), FL (fluorescencia) y MS (espectrometría de masas). Una vez desarrollado y optimizado el método, éste ha de ser validado de acuerdo con una serie de guías para poder ser aplicado con total seguridad.

1.4 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

En los años 80, concretamente en 1986, se publicó lo que se podría llamar la primera guía para la validación de un método analítico (Broderick et al., 1986). Estas recomendaciones surgieron por la necesidad de los laboratorios de unificar los parámetros analíticos y la reproducibilidad de los resultados en los estudios farmacológicos y toxicológicos (Shah, 2007). Esta guía fue el primer intento dirigido a evitar los problemas surgidos a finales de 1880 y principios de 1900 con la adulteración de productos derivados de la industria alimentaria, de la industria farmacéutica, venta de bebidas alcohólicas o venenos, debidos mayoritariamente a la fabricación casera por parte de los farmacéuticos que prescribían sus propias recetas (Borchers et al., 2007; Stahl, 2009). Tal fue la disparidad en los datos encontrados y la escasa uniformidad a la hora de presentar los resultados que en 1990 la AOAC (Asociación Oficial de Químicos Analíticos), Unión Europea y Comisión del Codex alimentario se reunieron para desarrollar lo que podría ser la primera guía sobre validación de métodos analíticos (Karnes et al., 1991). Con objeto de revisar todos los conceptos importantes que debían aparecer en la validación de métodos, alertaron a la Food and Drug Administration (FDA) de la deficiencia en sus resultados.

El “padre” de la FDA fue un químico llamado Harvey Washington Wiley que dirigía en 1862 la Oficina de Química en el Departamento de Agricultura. En aquellos tiempos y dada la problemática que existía sobre la proliferación de casos de adulteración de alimentos y medicamentos, se encargó de impulsar una ley federal de alimentos y medicamentos. De ahí que en 1906 se aprobara la Ley Federal de Alimentos y Medicamentos, que años más tarde pasaría a llamarse Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y cosméticos en 1938. Durante esos años la FDA obligó a las empresas a incluir los ingredientes activos en las etiquetas de los medicamentos, así como de suministrar información suficiente para su uso seguro. La FDA que pertenece al Servicio de Salud y Servicios Humanos ha crecido desde su creación en 1862 y ha logrado convertirse en una gran organización encargada de regular el proceso de aprobación de medicamentos y mantener los productos no aprobados fuera del mercado. La agencia mantiene una estrecha vigilancia sobre las fuentes de productos no aprobados y continúa tomando medidas para alentar el cumplimiento de las reglamentaciones actuales para llevar acabo su misión de proteger y promover la salud pública (Chhabra et al., 2005). En

1992 apareció la primera guía de la FDA (Shah, 2007) y así le siguieron las demás 2001, 2008, 2013 y actualmente la última que se encuentra en vigor es la guía de 2018 (FDA, 2018). A lo largo de todos estos años se han introducido y modificado parámetros de acuerdo con la sensibilidad de los instrumentos y al avance de los softwares estadísticos.

La validación de un método analítico es el conjunto de parámetros que son necesarios evaluar para obtener un método analítico exacto, sensible y reproducible. En el caso de métodos bioanalíticos, la validación se usa como un paso previo muy importante a diferentes tipos de estudios como: estudios farmacocinéticos, monitorización terapéutica de fármacos, estudios toxicológicos, etc. Teniendo en cuenta que en la literatura existe una gran cantidad de guías a nivel internacional relacionadas con la validación de métodos analíticos para la determinación de fármacos, es importantante destacar que Raposo & Ibelli-Bianco (2020), recopilaron en su artículo un resumen de la mayoría de las guías disponibles en la literatura científica. Entre ellas las más conocidas son:

- EMA (Agencia Europea del Medicamento)
- Norma ISO 17025 (Acreditación de Laboratorios de Ensayo y de Calibración)
- ICH (Conferencia Internacional Tripartita sobre Armonización).
- FDA (Food and Drug Administration)
- IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada)
- EURACHEM
- Distintas farmacopeas: como la estadounidense (United States Pharmacopoeia, USP) y británica (British Pharmacopoeia, BP)
- WHO (Organización mundial de la salud)

En la validación de métodos analíticos se pueden distinguir (Eurachem, 2004; UNE/EN/ISO/17025:2017, 2017; Wood, 1999):

1. *Métodos no normalizados*: son los métodos desarrollados por el laboratorio o métodos nuevos (ejemplo: publicado en revista científica), o bien, métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio, pero que no están normalizados.

2. *Métodos normalizados* a los que se realiza una modificación significativa: la validación se debe efectuar de forma metódica, ordenada, trazable y confiable. Se debe

saber cuáles son los requerimientos del método para establecer el alcance de la validación, conocer el método a validar y su aplicabilidad (analito, concentración y matriz en las cuales se desea utilizar).

Entre las guías enunciadas anteriormente, las dos más utilizadas para la validación de las determinaciones analíticas necesarias en estudios farmacocinéticos son las correspondientes a la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y a la Food and Drug Administration (FDA). En el caso de la EMA, la guía actualizada que se emplea en la validación de métodos es ICH M10 “Validación de un método bioanalítico” (ICH M10, 2019). Para la FDA la guía utilizada es: “Validación de un método bioanalítico. Guía para la industria” (FDA, 2018). En cada una de ellas se explican los diferentes parámetros a evaluar y los criterios de aceptación, en cada uno de los casos, para que el método finalmente sea validado.

Ambas guías desarrollan casi los mismos parámetros, pero existen pequeñas diferencias tanto en la nomenclatura, como en el número de muestras y, por supuesto, en los criterios de aceptación. Kaza et al. (2019) compararon la guía FDA del 2018 con la guía EMA del 2011 y evidenciaron que la EMA es más clara en las definiciones de los parámetros a evaluar, mientras que la FDA aporta recomendaciones que ayudan a su comprensión. En el caso de la guía EMA de 2019 los parámetros que se describen para la validación de métodos cromatográficos son: curva de calibrado, selectividad, especificidad, efecto matriz, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), exactitud, precisión, arrastre (carry-over), integridad en la dilución, estabilidad y reproducibilidad en la reinyección. Con respecto a la FDA los parámetros que se mencionan en la guía para la validación son: curva de calibrado, selectividad, especificidad, efecto matriz (para HPLC/MS), LOD, LOQ, exactitud, precisión, arrastre recuperación (recovery), efecto de la dilución y estabilidad.

Tabla 1: Esquema representativo de los parámetros de una validación

<i>Parámetro</i>	FDA	EMA	<i>Parámetro</i>	FDA	EMA
<i>Curva de calibrado</i>	+	+	<i>Precisión</i>	+	+
<i>Selectividad</i>	+	+	<i>Arrastre</i>	+	+
<i>Especificidad</i>	+	+	<i>Recuperación</i>	+	-
<i>Efecto matriz</i>	+(HPLC/MS)	+	<i>Efecto dilución</i>	+	+
<i>LOD</i>	+	+	<i>Estabilidad</i>	+	+
<i>LOQ</i>	+	+	<i>Reinyección</i>	-	+
<i>Exactitud</i>	+	+			

La principal diferencia que se observa entre las dos guías es que el efecto matriz que se produce en las muestras biológicas es un parámetro requerido por la FDA siempre que el analito se analice por cromatografía acoplada a espectrómetro de masas, ya que se observan valores elevados de analito debidos a la matriz (Matuszewski et al., 2003; Zhou et al., 2017). Mientras que la recuperación no es un parámetro a determinar por la guía EMA. Sin embargo, la guía FDA, no tiene en cuenta la reinyección para evaluar la reproducibilidad en el caso de que se tengan que repetir algunas muestras debido a algún imprevisto que pueda interrumpir el ensayo.

1.4.1 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

En nuestro laboratorio, la guía FDA es la utilizada para la validación de los diferentes métodos analíticos. Los parámetros para la validación, se describen brevemente a continuación (FDA, 2018).

1.4.1.1 RECTA DE CALIBRADO

Según la guía FDA (2018), la recta de calibrado debe comprender el rango lineal de analito en la muestra. Se debe elegir la mejor ecuación de regresión en relación a la

concentración-respuesta del detector. Esta curva debe ser continua y reproducible. Los patrones para la recta de calibrado se prepararán en la misma matriz biológica que la muestra a analizar. Si la muestra contiene más de un analito, se construirá una recta de calibrado por cada analito. La recta debe contener un blanco de la matriz biológica sin estándar interno, un blanco matriz con estándar interno y seis niveles de concentración en el que estará incluido el límite de cuantificación. Los valores calculados a partir de la recta no deben exceder de una variación de $\pm 15\%$ del valor nominal, excepto para el valor del límite de cuantificación que no debe ser superior al 20% del valor nominal. El valor nominal se refiere a la concentración teórica en la muestra biológica.

1.4.1.2 SELECTIVIDAD

Se refiere a la habilidad del método analítico para detectar y diferenciar el analito de interés de otras posibles interferencias contenidas en la matriz biológica de la muestra, como por ejemplo metabolitos, productos de degradación, proteínas, etc. En el caso de que el analito sea analizado por cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas, el análisis del efecto matriz de la muestra que se produce en este tipo de detectores es un requerimiento básico. Atendiendo a estas consideraciones, se analizarán seis blancos de la matriz para verificar que no hay interferencias entre el analito de interés y el estándar interno.

1.4.1.3 ESPECIFICIDAD

La especificidad, se refiere a si el método analítico es capaz de evaluar otras posibles moléculas que pueden estar presentes. En este sentido, se analizarán varios fármacos con el mismo método cromatográfico, asegurando por tanto que no existe interferencia con el analito de interés.

1.4.1.4 EFECTO MATRIZ

Es el aumento o disminución de la señal instrumental del analito debido a la presencia de interferencias en la matriz biológica (Zhou et al., 2017). Este efecto matriz repercute en la identificación, cuantificación, recuperación del analito, en la precisión y en la exactitud del método (Matuszewski et al., 2003).

Para el cálculo del efecto matriz se puede usar la expresión siguiente previamente reportada (Taylor, 2005; Zhou et al., 2017):

$$\text{Efecto matriz} = \frac{\text{Área del pico del analito en solución estándar} - \text{Área de pico del analito en la muestra}}{\text{Área del pico del analito en solución estándar}} \times 100$$

efecto matriz por infravaloración valores > 0

efecto matriz por sobrevaloración: valores < 0

Otros autores (Nalbant et al., 2021; Reeder et al., 2022), proponen para el cálculo del efecto matriz la relación de áreas de los picos del analito en la muestra y en la solución estándar, según la siguiente expresión:

$$\text{Efecto matriz} = \frac{\text{Área de pico del analito en la muestra}}{\text{Área del pico del analito en solución estándar}} \times 100$$

En este último caso, el resultado del coeficiente de variación de las muestras debe de ser $\leq 15\%$.

1.4.1.5 LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD)

Se define como el valor más bajo de concentración que un instrumento analítico puede detectar, pero no cuantificar con exactitud. También se define como el valor más pequeño que puede distinguirse del blanco. Existen varias formas de calcular el límite de detección, por lo que será necesario indicar el método utilizado para su cálculo.

Una de las formas de calcular el límite de detección es atendiendo a la precisión y exactitud de los valores obtenidos al analizar una serie de concentraciones muy bajas de analito, como se describe en la guía: “Validación de procedimientos analíticos” (ICH, 2022) El resultado será aquel valor de concentración cuyo valor de precisión obtenido sea $> 20\%$.

1.4.1.6 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)

Se define como el valor más bajo que un instrumento analítico puede cuantificar con exactitud y precisión. El valor está asociado a la sensibilidad del método. Existen varias expresiones para calcular el límite de cuantificación, por lo que al igual que en el caso anterior, será necesario indicar mediante qué expresión se ha realizado su cálculo.

De la misma forma que para el cálculo de LOD, la guía ICH, (2022) propone para el cálculo de LOQ, analizar una serie de muestras de concentración conocida cerca del nivel de detección y establecer el mínimo nivel en el cual el analito es cuantificado

con un valor aceptable de precisión $\leq 20\%$. Como resultado, el valor asignado para el límite de cuantificación será aquel valor con un resultado en la precisión $\leq 20\%$.

1.4.1.7 EXACTITUD

Expresa la proximidad entre el valor que es aceptado, ya sea como valor convencional verdadero (material de referencia interno), sea como valor de referencia aceptado (material de referencia certificado o estándar de una farmacopea) y el valor hallado (valor promedio) al aplicar el procedimiento de análisis un cierto número de veces. También se puede expresar como la proximidad de la concordancia entre el resultado de una medición y un valor verdadero del analito. Este parámetro evalúa, además, el error sistemático asociado a una medida analítica (Araujo, 2009).

La FDA, establece que para el cálculo de la exactitud debe realizarse el análisis de 4 niveles de concentración dentro del rango de medida, siendo uno de ellos el límite de cuantificación y un mínimo de cinco repeticiones de cada nivel. El criterio de aceptación para la exactitud en el mismo día (intra-day) y entre días (inter-day) (al menos tres días consecutivos) debe cumplir lo siguiente: el resultado del valor obtenido debe estar comprendido entre un intervalo de $\pm 15\%$ del valor nominal, exceptuando el límite de cuantificación cuyo valor aceptado es $\pm 20\%$ del valor nominal.

La exactitud se puede expresar como:

$$Exactitud = \frac{\text{valor medido} - \text{valor nominal}}{\text{valor nominal}} \times 100$$

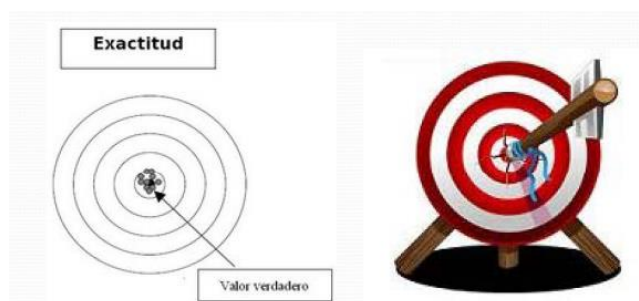


Figura 5 Figura representativa del concepto de exactitud

1.4.1.8 PRECISIÓN

Expresa la cercanía de coincidencia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo una serie de condiciones establecidas.

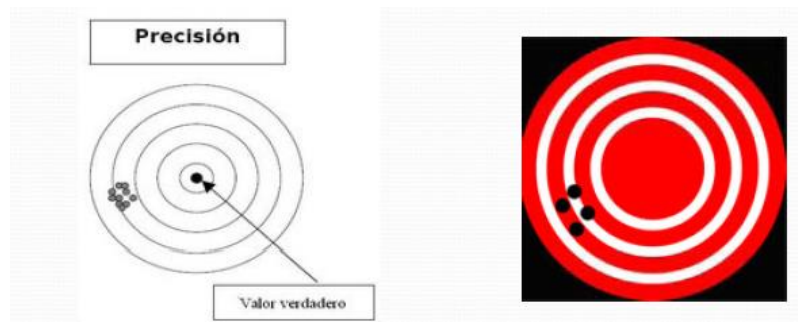


Figura 6 Representación del concepto de precisión

La FDA, establece que para el cálculo de la precisión se deben analizar 4 niveles de concentración dentro del rango de medida, siendo uno de ellos el límite de cuantificación y un mínimo de cinco repeticiones de cada nivel de concentración. El criterio de aceptación para la precisión en el mismo día (intra-day) y entre días (inter-day) (al menos tres días consecutivos) debe cumplir que el coeficiente de variación (CV) de las repeticiones de los 4 niveles de concentración, debe ser $\leq 15\%$, excepto el correspondiente al límite de cuantificación cuyo CV debe ser $\leq 20\%$.

Atendiendo a las figuras 5, 6 y 7 un método analítico puede ser:

- A) Muy exacto y preciso
- B) Muy exacto y poco preciso
- C) Poco exacto y muy preciso
- D) Poco exacto y poco preciso

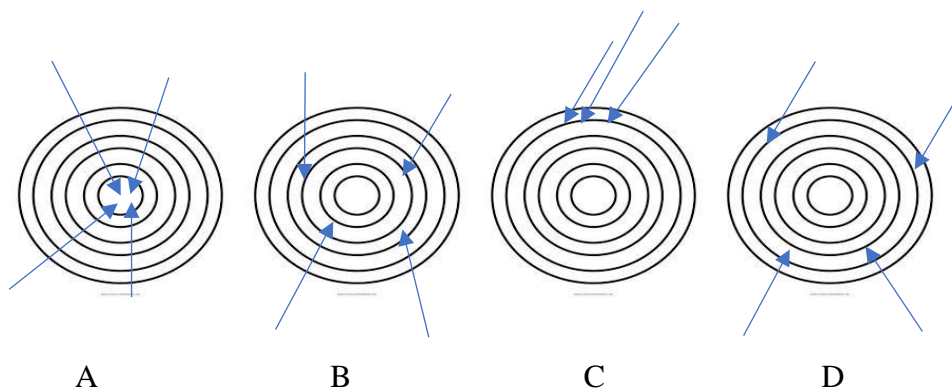


Figura 7 Representación conjunta de la precisión y la exactitud

1.4.1.9 CARRY-OVER O ARRASTRE

El término carry-over o arrastre se define como la concentración residual de un analito que permanece en el siguiente análisis, tras la cuantificación en la técnica analítica que se describe (M10, 2019). Los criterios que establece la FDA para su aceptabilidad es que el valor obtenido no debe superar el 20% del valor del límite de cuantificación. La guía no establece cómo calcular el parámetro, por lo que la medida del carry-over se realiza de la siguiente forma: se introducen en el sistema cromatográfico muestras que contienen una concentración elevada del analito a determinar y, posteriormente, se observa y cuantifica la posible transferencia que se haya podido producir en muestras blanco (M10, 2019) analizadas a continuación.

1.4.1.10 RECUPERACIÓN

La recuperación se define como la cantidad de analito que se obtiene después de aplicar un método de extracción. El valor debe ser próximo a 100 %. Este valor indica que se ha recuperado todo el analito que se espera obtener. La FDA, en la última versión de “Bionalytical method validation” (2018), expresa la recuperación como:

$$\text{Recuperación} = \frac{\text{Valor obtenido del analito después de extraer la muestra}}{\text{Valor del analito después de extraer un blanco matriz y fortificar ese blanco con el analito}} \times 100$$

Para el cálculo se analizan varias muestras repetidas (n= 5) de tres niveles de concentración establecidas previamente. Un dato curioso es que la EMA no considera el

cálculo de la recuperación como un parámetro fundamental en la validación de un método analítico.

1.4.1.11 EFECTO DILUCIÓN

Si el método requiere de dilución del analito porque la señal obtenida con el cromatógrafo sea excesiva y sature el detector, el efecto de la dilución se debe evaluar para asegurar que no afecta al proceso analítico. Para asegurar la integridad de la dilución, se deben realizar diluciones de la concentración más alta de la curva de calibrado (series de 5 repeticiones) y evaluar los valores obtenidos en cuanto a la exactitud y precisión de los resultados. El criterio de aceptación debe cumplir que la exactitud no debe superar el 15% del valor nominal y para la precisión el coeficiente de variación debe de ser $\leq 15\%$.

1.4.1.12 ESTABILIDAD

Durante el desarrollo del método se debe evaluar la estabilidad química del analito en la matriz en la que se encuentre y, además, asegurar la estabilidad a lo largo del ensayo. La validación de la estabilidad del fármaco en un fluido biológico depende en gran medida de las condiciones de almacenamiento, las propiedades fisicoquímicas del fármaco, la matriz y el envase utilizado para la conservación. En el caso de que la matriz biológica sea rara se podrá sustituir por otra compatible. Si el fármaco objeto de estudio está en combinación con otro fármaco, la estabilidad se debe estudiar conjuntamente para evidenciar posibles interacciones entre ambos compuestos. Los experimentos de estabilidad relacionados con la matriz deben comparar las muestras control a lo largo del estudio de estabilidad con las curvas de calibración recién preparadas y las muestras control recién preparados. Las condiciones requeridas para el estudio de estabilidad son las siguientes:

Para determinar la estabilidad del fármaco en la matriz biológica, se requieren un mínimo de dos concentraciones (baja y alta) con un mínimo de tres repeticiones de cada concentración. Estas concentraciones serán las que se evaluarán en el estudio de estabilidad. Los resultados de la exactitud en cada nivel de concentración calculado no deben ser $\geq 15\%$ del valor nominal. Este requisito es extensible a todos los parámetros incluidos en la estabilidad.

Estabilidad a corto plazo

- **Estabilidad del autoinyector.** Si las condiciones ambientales del autoinyector no son las mismas que las del laboratorio, este parámetro se deberá evaluar.
- **Estabilidad en las condiciones trabajo.** Se evaluará la estabilidad a las cero horas, es decir, en el momento de preparación de las muestras. Otro lote de muestras se dejará a temperatura ambiente durante 24 horas y otro lote se dejará en refrigeración a 4°C durante 24 horas.

Estabilidad a largo plazo

Las condiciones de almacenamiento y duración serán las mismas que la duración del ensayo. A modo de ejemplo: las muestras se almacenarán a -40°C durante 15 días, y a -40°C durante 30 días, ya que ésta es la previsión de duración del ensayo.

Estabilidad en la congelación y descongelación de las muestras

Este parámetro es muy importante ya que en cualquier laboratorio se congelan y descongelan las muestras frecuentemente. Una idea para establecer su estabilidad es congelar y descongelar las muestras un mínimo de tres días consecutivos, realizando la cuantificación de al menos tres réplicas para verificar su estabilidad. De lo que se podrá concluir si las muestras admiten esos ciclos de congelación/descongelación. El criterio de aceptabilidad para cada nivel de concentración no debe superar el 15% del valor nominal.

Estabilidad de las disoluciones stock

Las soluciones madre no deben prepararse a partir de materiales de referencia que estén a punto de caducar, a menos que se verifique la pureza del analito en las soluciones madre. La estabilidad de las disoluciones stock se evaluarán para asegurar que estas disoluciones son estables en unas condiciones determinadas. Para ello se analizarán dos concentraciones (baja y alta) con un mínimo de tres réplicas. De igual forma se debe hallar la estabilidad a corto y a largo plazo, para poder establecer las condiciones de almacenamiento óptimas antes del ensayo.

Bibliografía

2 BIBLIOGRAFÍA

- Albarellos, G. A., Montoya, L., Lorenzini, P. M., Passini, S. M., Lupi, M. P., & Landoni, M. F. (2016). Pharmacokinetics of cefuroxime after intravenous, intramuscular, and subcutaneous administration to dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, *39*(1), 40–44. <https://doi.org/10.1111/jvp.12239>
- Alonso M., Aracil, B., Badiola, I., Campos, J., Durán, M., y de Frutos, C. (2018). Primer análisis integrado del consumo de antibióticos y su relación con la aparición de resistencia. Recuperado de:

https://www.resistenciaantibioticos.es/es/system/files/field/files/informe_jiacra-espana.pdf?file=1&type=node&id=410&force=0
- Andrić, F., & Héberger, K. (2017). How to compare separation selectivity of high-performance liquid chromatographic columns properly? *Journal of Chromatography A*, *1488*, 45–56.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.066>
- Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *877*(23), 2224–2234. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.030>
- Arsic, B., Barber, J., Čikoš, A., Mladenovic, M., Stankovic, N., & Novak, P. (2018). 16-Membered Macrolide Antibiotics: a Review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *51*(3), 283–298. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.05.020>
- Ashri, N. Y., & Abdel-Rehim, M. (2011). Sample treatment based on extraction techniques in biological matrices. *Bioanalysis*, *3*(17), 2003–2018.

<https://doi.org/10.4155/bio.11.201>
- Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M. I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T. H., Rasool, M. H., Shahid, A., Xueshan, X., & Baloch, Z. (2021). Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 1–20.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>

Azam, F., Rahman, M. S., Amin, G. M. Al, Miah, I., & Koh, Y. (2021). Delafloxacin , a superior antibacterial agent to its competitor fluoroquinolones Comparative Activity of Delafloxacin with Other Fluoroquinolones. *Korean Journal of Microbiology*, 57(3), 133–141. <https://doi.org/10.7845/kjm.2021.1045>

Bahrami, G., Mirzaeei, S., & Kiani, A. (2005). High performance liquid chromatographic determination of azithromycin in serum using fluorescence detection and its application in human pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 820(2), 277–281. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.03.042>

Bauer, J., Siala, W., Tulkens, P. M., & Van Bambeke, F. (2013). A combined pharmacodynamic quantitative and qualitative model reveals the potent activity of daptomycin and delafloxacin against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(6), 2726–2737. <https://doi.org/10.1128/AAC.00181-13>

Bekele, L. K., & Gebeyehu, G. G. (2012). Application of Different Analytical Techniques and Microbiological Assays for the Analysis of Macrolide Antibiotics from Pharmaceutical Dosage Forms and Biological Matrices. *ISRN Analytical Chemistry*, 12, 1–17. <https://doi.org/10.5402/2012/859473>

Berlin, S., Randow, T., Scheuch, E., Grube, M., Venner, M., & Siegmund, W. (2017). Pharmacokinetics and pulmonary distribution of gamithromycin after intravenous administration in foals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 40(4), 406–410. <https://doi.org/10.1111/jvp.12402>

Blanchard, J. (1981). Plasma Samples Prior To High-Performance. *Journal of Chromatography*, 226, 455–460.

Borchers, A., Hagie, F., Keen, C., & Gershwin, M. (2007). The history and the contemporary challenges of the US Food and Drug Administration. *Clinical Therapeutics*, 29(1), 1–16. <https://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2007.01.006>

Broderick, B. E., MacLeod, N., Wood, R., & West, N. G. (1986). Method validation and

the quality control of analysis. *Analytical Proceedings*, 23(9), 328–332.

<https://doi.org/10.1039/AP9862300328>

Canning, P., Bates, J., Hammen, K., Coetzee, J., Wulf, L., Rajewski, S., Wang, C., & Karriker, L. (2016). Concentrations of tylvalosin and 3-O-acetyltylosin attained in the synovial fluid of swine after administration by oral gavage at 50 and 5 mg/kg. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 39(6), 621–624. <https://doi.org/10.1111/jvp.12309>

Canning, P., Skoland, J. B. K., Wulf, J. C. L., Gauger, C. W. P., & Karriker, A. R. L. (2018). Variation in water disappearance, daily dose, and synovial fluid concentrations of tylvalosin and 3-O-acetyltylosin in commercial pigs during five day water medication with tylvalosin under field conditions. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 41, 632–636.

<https://doi.org/10.1111/jvp.12503>

Castle, S. S., & Medical, V. A. (2007). Cefuroxime. In S. J. Enna & D. B. Bylund (Eds.), *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (pp. 1–6). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61413-8>

Cecchini, M., Langer, J., Slawomirski, L. (2015) Antimicrobial Resistance in G7 Countries and Beyond: Economic Issues, Policies and Options for Action. Recuperado de: <https://www.oecd.org/els/health-systems/Antimicrobial-Resistance-in-G7-Countries-and-Beyond.pdf>

Chew, Y. L., Khor, M. A., & Lim, Y. Y. (2021). Choices of chromatographic methods as stability indicating assays for pharmaceutical products: A review. *Heliyon*, 7(3), e06553. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06553>

Chhabra, R., Kremzner, M. E., & Kilianny, B. J. (2005). FDA policy on unapproved drug products: Past, present, and future. *Annals of Pharmacotherapy*, 39(7–8), 1260–1264. <https://doi.org/10.1345/aph.1E569>

Cho, J. C., Crotty, M. P., White, B. P., & Worley, M. V. (2018). What Is Old Is New Again: Delafloxacin, a Modern Fluoroquinolone. *Pharmacotherapy*, 38(1), 108–

121. <https://doi.org/10.1002/phar.2050>
- Cobos-Trigueros, N., Ateka, O., Pitart, C., & Vila, J. (2009). Macrolides and ketolides. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(7), 412–418.
- <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.06.002>
- Colin, P., De Bock, L., T’Jollyn, H., Boussery, K., & Van Bocxlaer, J. (2013). Development and validation of a fast and uniform approach to quantify β -lactam antibiotics in human plasma by solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 103, 285–293.
- <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.046>
- Collignon, P. J., & McEwen, S. A. (2019). One health-its importance in helping to better control antimicrobial resistance. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(1).
- <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010022>
- Currie, G. M. (2018). Pharmacology, part 2: Introduction to pharmacokinetics. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 46(3), 221–230.
- <https://doi.org/10.2967/jnmt.117.199638>
- Czyski, A. (2017). Analytical Methods for Determining Third and Fourth Generation Fluoroquinolones: A Review. *Chromatographia*, 80(2), 181–200.
- <https://doi.org/10.1007/s10337-016-3224-8>
- Dabrowska, M., & Krzek, J. (2010). Chiral separation of diastereoisomers of cefuroxime axetil by high-performance thin-layer chromatography. *Journal of AOAC International*, 93(3), 771–777. <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.3.771>
- De Baere, S., Devreese, M., Watteyn, A., Wyns, H., Plessers, E., De Backer, P., & Croubels, S. (2015). Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of gamithromycin in animal plasma, lung tissue and pulmonary epithelial lining fluid. *Journal of Chromatography A*, 1398, 73–82.
- <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.022>

- de Kraker, M. E. A., Stewardson, A. J., & Harbarth, S. (2016). Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLoS Medicine*, *13*(11), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>
- Denooz, R., & Charlier, C. (2008). Simultaneous determination of five β -lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *864*(1–2), 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.01.037>
- Dhumal, R. S., Biradar, S. V., Yamamura, S., Paradkar, A. R., & York, P. (2008). Preparation of amorphous cefuroxime axetil nanoparticles by sonoprecipitation for enhancement of bioavailability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *70*(1), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.04.001>
- Elbadawy, M., Aboubakr, M., & Abugomaa, A. (2019). Pharmacokinetics of tylvalosin in broiler Turkeys (*Meleagris gallopavo*) after single intravenous and oral administration. *Frontiers in Veterinary Science*, *6*(October), 6–11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00355>
- European Medicines Agency (EMA). (2021). *Quofenix (Delafloxacin)*. Recuperado de: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/quofenix-epar-medicine-overview_en.pdf
- Escudero, E., Cárceles, C. M., Fernandez-Varon, E., Marin, P., & Benchaoui, H. (2007). Pharmacokinetics of danofloxacin 18% in lactating sheep and goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, *30*(6), 572–577. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2007.00898.x>
- Eurachem. (2004). *La Adecuación al uso de los Métodos Analíticos*. Recuperado de: <https://doi.org/10.1055/s-2006-961117>
- European Medicines Agency (EMA). (2021). *Aivlosin (Tylvalosin)*. Recuperado de: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/aivlosin-epar-medicine-overview_en.pdepar-summary-public_en.pdf

Bibliografía

- FAO. (2002). *Dry Cow (12,5% cefuroxime sodium) and Spectrazol*. Recuperado de: https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/41-16-cefuroxim.pdf
- FDA. (2021). *Draft guidance on bioequivalence studies with pharmacokinetic endpoints for drugs submitted under an ANDA guidance for industry*.1–43. Recuperado de: <https://www.fda.gov/media/87219/download>
- FDA, F. and D. A. (2018). *Bioanalytical method validation Guidance for Industry*. Recuperado de: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
- Główka, F. K., & Karaźniewicz-Łada, M. (2007). Determination of roxithromycin in human plasma by HPLC with fluorescence and UV absorbance detection: Application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 852(1–2), 669–673.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.02.022>
- Gordon, E., Cebra, C. K., Stang, B. V., Christensen, J. M., Alshahrani, S. M., Duong, T., Huang, R., & Nosky, B. (2022). Plasma pharmacokinetics, pulmonary disposition, and safety of subcutaneous gamithromycin in alpacas. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 45(3), 283–290.
<https://doi.org/10.1111/jvp.13045>
- Hammad, S. F., Abdallah, I. A., Bedair, A., & Mansour, F. R. (2022). Homogeneous liquid–liquid extraction as an alternative sample preparation technique for biomedical analysis. *Journal of Separation Science*, 45(1), 185–209.
<https://doi.org/10.1002/jssc.202100452>
- Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F., & Martínez, J. L. (2019). Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature Microbiology*, 4(9), 1432–1442. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>
- Hoover, R., Hunt, T., Benedict, M., Paulson, S. K., Lawrence, L., Cammarata, S., & Sun, E. (2016a). Safety, Tolerability, and Pharmacokinetic Properties of Intravenous Delafloxacin after Single and Multiple Doses in Healthy Volunteers. *Clinical*

Therapeutics, 38(1), 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.11.019>

Hoover, R., Hunt, T., Benedict, M., Paulson, S. K., Lawrence, L., Cammarata, S., & Sun, E. (2016b). Single and Multiple Ascending-dose Studies of Oral Delafloxacin: Effects of Food, Sex, and Age. *Clinical Therapeutics*, 38(1), 39–52.

<https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.10.016>

Hoover, R. K., Alcorn, H., Lawrence, L., Paulson, S. K., Quintas, M., & Cammarata, S. K. (2018). Delafloxacin Pharmacokinetics in Subjects With Varying Degrees of Renal Function. *Journal of Clinical Pharmacology*, 58(4), 514–521.

<https://doi.org/10.1002/jcph.1041>

Hoover, R., Marbury, T. C., Preston, R. A., Quintas, M., Lawrence, L. E., Paulson, S. K., Luke, D. R., & Cammarata, S. K. (2017). Clinical Pharmacology of Delafloxacin in Patients With Hepatic Impairment. *Journal of Clinical Pharmacology*, 57(3), 328–335. <https://doi.org/10.1002/jcph.817>

Hu, C., Zhang, Y., Zhou, Y., Liu, Z. fei, Meng, Q., & Feng, X-S (2020). A review of pretreatment and analysis of macrolides in food (Update Since 2010). *Journal of Chromatography A*, 1634, 461662. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461662>

Huang, R. A., Letendre, L. T., Banav, N., Fischer, J., & Somerville, B. (2010). Pharmacokinetics of gamithromycin in cattle with comparison of plasma and lung tissue concentrations and plasma antibacterial activity. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 33(3), 227–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2009.01125.x>

Huang, Y., Shi, R., Gee, W., & Bonderud, R. (2012). Regulated drug bioanalysis for human pharmacokinetic studies and therapeutic drug management. *Bioanalysis*, 4(15), 1919–1931. <https://doi.org/10.4155/bio.12.157>

ICH, Q.2 (2022). *Validation of analytical procedures*. Recuperado de:

<https://doi.org/10.3109/9781420081275-11>

Iqbal, M., Ezzeldin, E., Anwer, M. K., & Imam, F. (2021). Eco-friendly uplc-ms/ms

- quantitation of delafloxacin in plasma and its application in a pharmacokinetic study in rats. *Separations*, 8(9), 1–13. <https://doi.org/10.3390/separations8090146>
- Iqbal, M., Ezzeldin, E., Herqash, R. N., Anwer, M. K., & Azam, F. (2020). Development and validation of a novel UPLC-MS/MS method for quantification of delafloxacin in plasma and aqueous humour for pharmacokinetic analyses. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1138(2457), 121961. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121961>
- Karnes, H., Gerald, S., & Shah, V. (1991). Validation of Bioanalytical methods. *Pharmaceutical Research*, 8(4421–426). <https://doi.org/10.1023/a:1015882607690>
- Kaza, M., Karaźniewicz-Łada, M., Kosicka, K., Siemiątkowska, A., & Rudzki, P. J. (2019). Bioanalytical method validation: new FDA guidance vs. EMA guideline. Better or worse? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 165, 381–385. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.12.030>
- Kim, B. H., Choi, N. H., & Ok, J. H. (2002). Comparison of reversed-phase liquid chromatographic methods for the separation of new quinolones. *Journal of Chromatographic Science*, 40(7), 369–376.
<https://doi.org/10.1093/chromsci/40.7.369>
- Kocsis, B., & Szabo, D. (2016). Delafloxacin: A Novel Fluoroquinolone Introduced in Clinical Trials. *International Journal of Clinical & Medical Microbiology*, 1(2), 1–2. <https://doi.org/10.15344/2456-4028/2016/116>
- Kodym, A., Wiśniewski, A., Kniola, D., & Olejniczak, M. (2011). Stability of cefuroxime in 1% and 5% buffered eye drops determined with HPLC method. *Acta Poloniae Pharmaceutica. Drug Research*, 68(4), 555–564.
- Kudchadkar, S. S., & N Pai, S. P. (2019). Qbd based rp-hplc method development for five fluoroquinolone anti-bacterials-through creation of design space for critical attributes. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(11), 4907. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(11\).4907-12](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(11).4907-12)
- Lemaire, S., Tulkens, P. M., & Van Bambeke, F. (2011). Contrasting effects of acidic pH

on the extracellular and intracellular activities of the anti-gram-positive fluoroquinolones moxifloxacin and delafloxacin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(2), 649–658.

<https://doi.org/10.1128/AAC.01201-10>

Li, Y., Zhu, Y., Wang, C., Shen, Y., Liu, L., Zhou, S., Cui, P. F., Hu, H., Jiang, P., Ni, X., Qiu, L., & Wang, J. (2022). Mild Hyperthermia Induced by Hollow Mesoporous Prussian Blue Nanoparticles in Alliance with a Low Concentration of Hydrogen Peroxide Shows Powerful Antibacterial Effect. *Molecular Pharmaceutics*, 19(3), 819–830. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00765>

Liu, W. J., Ma, C. Y., Feng, S. X., & Wang, X. Z. (2014). Solubility measurement and stability study of sodium cefuroxime. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 59(3), 807–816. <https://doi.org/10.1021/je400938a>

López-Briz, E., & Ordovás-Baines, J. (2021). Del real world data a la farmacoterapia personalizada. ¿Por dónde vamos? *Farmacia Hospitalaria*, 45(7619), S63. <https://doi.org/10.1038/537S63a>

Lucas, M., Mestorino, N., & Errecalde, J. (2007). Macrólidos: Novedades De Un Clásico ICH guideline M10 on bioanalytical method validation. Recuperado de:

https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b_en.pdf

Malviya, R., Bansal, V., Pal, O., & Sharma, P. (2010). High performance liquid chromatography: a short review. *Journal of Global Pharma Technology*, 2(5), 22–26.

Marín, P., Álamo, L. F., Escudero, E., Fernández-Varón, E., Hernandis, V., & Cárceles, C. M. (2013). Pharmacokinetics of marbofloxacin in rabbit after intravenous, intramuscular, and subcutaneous administration. *Research in Veterinary Science*, 94(3), 698–700. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.01.013>

Marín, P., García-Martínez, F., Hernándis, V., & Escudero, E. (2018). Pharmacokinetics of norfloxacin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration to

- rabbits. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 41(1), 137–141.
<https://doi.org/10.1111/jvp.12422>
- Markham, A. (2017). Delafloxacin: First Global Approval. *Drugs*, 77(13), 1481–1486.
<https://doi.org/10.1007/s40265-017-0790-5>
- Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., & Chavez-Eng, C. M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75(13), 3019–3030.
<https://doi.org/10.1021/ac020361s>
- McEwen, A., Lawrence, L., Hoover, R., Stevens, L., Mair, S., Ford, G., Williams, D., & Wood, S. (2015). Disposition, metabolism and mass balance of delafloxacin in healthy human volunteers following intravenous administration. *Xenobiotica*, 45(12), 1054–1062. <https://doi.org/10.3109/00498254.2015.1042946>
- McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology Spectrum*, 6(2).
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017>
- Meenakshi, D., & Meenaxi, M. (2013). A review on ultra performance liquid chromatography. *International Journal of Drug Development and Research*, 5(2), 29–34. <https://doi.org/10.13005/ojc/370411>
- Mizera, M., Szymanowska, D., Stasiłowicz, A., Siąkowska, D., Lewandowska, K., Miklaszewski, A., Plech, T., Tykarska, E., & Cielecka-piontek, J. (2020). Computer-aided design of cefuroxime axetil/cyclodextrin system with enhanced solubility and antimicrobial activity. *Biomolecules*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/biom10010024>
- Mogle, B. T., Steele, J. M., Thomas, S. J., Bohan, K. B. H., & Kufel, W. D. (2018). Clinical review of delafloxacin: A novel anionic fluoroquinolone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(6), 1439–1451.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkx543>
- Nabb, D. L., Song, S., Kluthe, K. E., Daubert, T. A., Luedtke, B. E., & Nuxoll, A. S.

- (2019). Polymicrobial Interactions Induce Multidrug Tolerance in *Staphylococcus aureus* Through Energy Depletion. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02803>
- Nagar, M., & Yadav, A. V. (2012). Chitosan-based intragastric delivery of cefuroxime axetil: Development and in-vitro evaluation of mucoadhesive approach. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, *40*(6), 406–418. <https://doi.org/10.3109/10731199.2012.696064>
- Nalbant, D., Reeder, J. A., Li, P., O’Sullivan, C. T., Rogers, W. K., & An, G. (2021). Development and validation of a simple and sensitive LC-MS/MS method for quantification of ampicillin and sulbactam in human plasma and its application to a clinical pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *196*. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.113899>
- Nguyen, H. A., Grellet, J., Ba, B. B., Quentin, C., & Saux, M.-C. (2004). Simultaneous determination of levofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in serum by liquid chromatography with column switching. *Journal of Chromatography B*, *810*(1), 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.07.019>
- O’Neill, Ji. (2016). Tackling drug-resistant infections globally. *The Review on Antimicrobial Resistance*. Recuperado de: <https://apo.org.au/sites/default/files/resource-files/2016-05/apo-nid63983.pdf>
- Oliva, M., Martínez, Á., García, A., & Pozo, D. E. L. (2002). Características y aplicaciones. *Oficina Farmacia*, *21*.
- OMS. (2015). *Plan De Acción Mundial Sobre La Resistencia a Los Antimicrobianos*. Recuperado de: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255204/9789243509761-spa.pdf>
- Overholser, B. R., Kays, M. B., & Sowinski, K. M. (2003). Determination of gatifloxacin in human serum and urine by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *798*(1), 167–173.

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.09.020>

Pantaleão, S. Q., Fernandes, P. O., Gonçalves, J. E., Maltarollo, V. G., & Honorio, K. M. (2022). Recent Advances in the Prediction of Pharmacokinetics Properties in Drug Design Studies: A Review. *ChemMedChem*, 17(1).

<https://doi.org/10.1002/cmdc.202100542>

Park, H. R., Kim, T. H., & Bark, K. M. (2002). Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 37(6), 443–460. [https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(02\)01361-2](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(02)01361-2)

Partani, P., Gurule, S., Khuroo, A., Monif, T., & Bhardwaj, S. (2010). Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry method for the determination of cefuroxime in human plasma: Application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878(3–4), 428–434.

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.12.025>

Peris-Vicente, J., Peris-García, E., Albiol-Chiva, J., Durgbanshi, A., Ochoa-Aranda, E., Carda-Broch, S., Bose, D., & Esteve-Romero, J. (2022). Liquid chromatography, a valuable tool in the determination of antibiotics in biological, food and environmental samples. *Microchemical Journal*, 177, 107309.

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107309>

Pistos, C., Tsantili-Kakoulidou, A., & Koupparis, M. (2005). Investigation of the retention/pH profile of zwitterionic fluoroquinolones in reversed-phase and ion-interaction high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39(3–4), 438–443.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.03.032>

Piva G, Farin D, Gozlan I, K.-C. R. (2000). H P L C Method for Determination of Cefuroxime in Plasma. *Chromatographia*, 51(3), 9–11.

Plackett, B. (2020). No money for new drugs. *Nature Outlook*, 586, 50–52.

- Ramanathan, K., Antognini, D., Combes, A., Paden, M., Zakhary, B., Ogino, M., Maclaren, G., & Brodie, D. (2020). Evidence for action: a One Health learning platform on interventions to tackle antimicrobial resistance. *The Lancet*, *20*, 307-311
- Rao, G. K., Mandapalli, P. K., Manthri, R., & Reddy, V. P. (2013). Development and in vivo evaluation of gastroretentive delivery systems for cefuroxime axetil. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *21*(1), 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.01.003>
- Raposo, F., & Ibelli-Bianco, C. (2020). Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *129*, 115913.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115913>
- Reeder, J. A., Abdallah, I. A., Bach, T., O'Sullivan, C. T., Xu, Y., Nalbant, D., & An, G. (2022). Development and validation of a simple and sensitive LC-MS/MS method for the quantification of cefazolin in human plasma and its application to a clinical pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *210*, 114521. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114521>
- Remy, J. M., Tow-Keogh, C. A., McConnell, T. S., Dalton, J. M., & De Vito, J. A. (2012). Activity of delafloxacin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Resistance selection and characterization. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *67*(12), 2814–2820. <https://doi.org/10.1093/jac/dks307>
- Saleh, G. A., Askal, H. F., Refaat, I. H., & Abdel-Aal, F. A. M. (2013). Review on recent separation methods for determination of some fluoroquinolones. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, *36*(10), 1401–1420.
<https://doi.org/10.1080/10826076.2012.691440>
- Salman, A. H., Youssef, S. A. H., Ramadan, A., & Soliman, A. M. (2016). Pharmacokinetics of tylvalosin in healthy and experimentally mycoplasma gallisepticum infected broiler chickens. *International Journal of PharmTech Research*, *9*(10), 72–80.
- Saravolatz, L. D., & Stein, G. E. (2019). Delafloxacin: A New Anti-methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus Fluoroquinolone. *Clinical Infectious Diseases*, 68(6), 1058–1062. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy600>
- Sastre Toraño, J., & Guchelaar, H. J. (1998). Quantitative determination of the macrolide antibiotics erythromycin, roxithromycin, azithromycin and clarithromycin in human serum by high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride and fl. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 720(1–2), 89–97.
- [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00456-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00456-3)
- Shah, V. P. (2007). The history of bioanalytical method validation and regulation: Evolution of a guidance document on bioanalytical methods validation. *AAPS Journal*, 9(1). <https://doi.org/10.1208/aapsj0901005>
- Sharma, K., & Mullangi, R. (2013). A concise review of HPLC, LC-MS and LC-MS/MS methods for determination of azithromycin in various biological matrices. *Biomedical Chromatography*, 27(10), 1243–1258.
- <https://doi.org/10.1002/bmc.2898>
- Shintani, H. (2012). Studies for Validation Analysis towards Pharmacokinetic and Bio-Equivalency of Drugs in Biological Fluids. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 01(S1), 10–11. <https://doi.org/10.4172/2153-2435.s11-e001>
- Shiomi, K., & Omura, S. (2003). Discovery of New Macrolides. Omura, S (Ed). *Macrolide Antibiotics: Chemistry, Biology, and Practice*. (pp 1-56) . Elsevier.
- <https://doi.org/10.1016/B978-012526451-8/50002-3>
- Signs, S. A., File, T. M., & Tan, J. S. (1984). High-pressure liquid chromatographic method for analysis of cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 26(5), 652–655. <https://doi.org/10.1128/AAC.26.5.652>
- Soni Love, k, & Sanjay, J. (2016). Strategic Approaches of Controlling Variables in RP-HPLC Method Development and Validation: A Review. *Journal of Applied Research*, 2(11), 733–750. <https://doi.org/10.18535/rajar/v2i11.09>

- Sousa, J., Alves, G., Fortuna, A., & Falcão, A. (2012). Analytical methods for determination of new fluoroquinolones in biological matrices and pharmaceutical formulations by liquid chromatography: A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(1), 93–129. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5706-8>
- Stahl, E. G. (2009). Política De Medicamentos En Estados Unidos De América. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 26(4), 537–580.
- Szlagowska, A., Kaza, M., & Rudzki, P. J. (2010). Validated HPLC method for determination of cefuroxime in human plasma. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 67(6), 677–681.
- Taylor, P. J. (2005). Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, 38(4), 328–334. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.11.007>
- Tshepelevitsh, S., Hernits, K., Jenčo, J., Hawkins, J. M., Muteki, K., Solich, P., & Leito, I. (2017). Systematic Optimization of Liquid-Liquid Extraction for Isolation of Unidentified Components. *ACS Omega*, 2(11), 7772–7776.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01445>
- Tulkens, P. M., Van Bambeke, F., & Zinner, S. H. (2019). Profile of a novel anionic fluoroquinolone - Delafloxacin. *Clinical Infectious Diseases*, 68, S213–S222. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy1079>
- UNE/EN/ISO/17025:2017. (2017). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Recuperado de:
<https://www.enac.es/documents/7020/b7e24234-daba-4a62-9652-76eb7e96db30>
- Van Bambeke, F. (2015). Delafloxacin, a non-zwitterionic fluoroquinolone in Phase III of clinical development: Evaluation of its pharmacology, pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical efficacy. *Future Microbiology*, 10(7), 1111–1123. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.39>
- Vieira, D. C. M., & Salgado, H. R. N. (2011). Comparison of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of cefuroxime sodium in

- pharmaceutical products. *Journal of Chromatographic Science*, 49(7), 508–511.
<https://doi.org/10.1093/chrsi/49.7.508>
- Vuignier, K., Schappler, J., Veuthey, J. L., Carrupt, P. A., & Martel, S. (2010). Drug-protein binding: A critical review of analytical tools. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(1), 53–66. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3737-1>
- Watteyn, A., Plessers, E., Wyns, H., De Baere, S., De Backer, P., & Croubels, S. (2013). Pharmacokinetics of gamithromycin after intravenous and subcutaneous administration in broiler chickens. *Poultry Science*, 92(6), 1516–1522.
<https://doi.org/10.3382/ps.2012-02932>
- Wicha, S. G., Märtsen, A. G., Nielsen, E. I., Koch, B. C. P., Friberg, L. E., Alffenaar, J. W., & Minichmayr, I. K. (2021). From Therapeutic Drug Monitoring to Model-Informed Precision Dosing for Antibiotics. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 109(4), 928–941. <https://doi.org/10.1002/cpt.2202>
- Wilms, E., Trumpie, H., Veenendaal, W., & Touw, D. (2005). Quantitative determination of azithromycin in plasma, blood and isolated neutrophils by liquid chromatography using pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl-chloride and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 814(1), 37–42.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.09.058>
- Wolff, F., Deprez, G., Seyler, L., Taccone, F., Hites, M., Gulbis, B., Vincent, J. L., Jacobs, F., & Cotton, F. (2013). Rapid quantification of six β -lactams to optimize dosage regimens in severely septic patients. *Talanta*, 103, 153–160.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.024>
- Wood, R. (1999). How to validate analytical methods. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 18(9–10), 624–632. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(99\)00150-8](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(99)00150-8)
- Wozniak, T. J., & Hicks, J. R. (1991). Analytical Profile of Cefuroxime Sodium. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, 20(C), 209–236.
[https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(08\)60532-8](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(08)60532-8)

Wu, J. X., Zhang, C. L., Xu, J. L., Zhang, G. D., Hao, J., Zhang, M., Song, M., Qi, P., Zhang, G., & Liang, J. Le. (2017). Bioconversion, purification and characterization of tylvalosin. *Chemical Papers*, 71(11), 2283–2291. <https://doi.org/10.1007/s11696-017-0222-8>

Zhang, W. qing, Hu, Q. xin, Zhang, X., Li, Y. ping, Wang, M. juan, & Hu, C. qin. (2014). The selection of suitable columns for a reversed-phase liquid chromatographic separation of beta-lactam antibiotics and related substances via chromatographic column parameters. *Journal of Chromatography A*, 1323, 87–96.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.11.005>

Zhou, W., Yang, S., & Wang, P. G. (2017). Matrix effects and application of matrix effect factor. *Bioanalysis*, 9(23), 1839–1844. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0214>

Objetivos

3 OBJETIVOS

La presente tesis doctoral presenta los siguientes objetivos:

3.1 OBJETIVO GENERAL

Validar diferentes métodos analíticos para la cuantificación de tres antibióticos (cefuroxima, delafloxacino y tilvalosina) en diferentes matrices biológicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Desarrollar y validar un método rápido y económico para la determinación de cefuroxima en plasma humano mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de ultravioleta
- 2 Desarrollar y validar un método analítico para la determinación de delafloxacino en plasma humano mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de fluorescencia
- 3 Determinar la estabilidad de delafloxacino en plasma humano y en las disoluciones madre
- 4 Desarrollar y validar un método analítico para cuantificar tilvalosina en plasma de cerdo mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de ultravioleta.
- 5 Determinar la estabilidad de tilvalosina en plasma de cerdo y en las disoluciones madre

Justificación y estructura de la tesis doctoral

4 JUSTIFICACIÓN Y ESTRUCTURA DE LA TESIS DOCTORAL

La presente tesis doctoral se presenta bajo el compendio de publicaciones de la cual se derivan tres publicaciones científicas que conforman esta tesis doctoral y cuyos objetivos justifican este trabajo.

Publicación 1: [Quantification and determination of stability of tylvalosin in pig plasma by Ultra-High Liquid Chromatography with ultraviolet detection.](#)

Para poder prevenir la resistencia microbiana es importante realizar estudios farmacocinéticos y éstos precisan de determinaciones analíticas de fármacos que sean lo más rápidas y simples posibles. Por ello, se pretende desarrollar un método analítico para cuantificar tilvalosina en plasma de cerdo por cromatografía de líquidos con detección ultravioleta. Actualmente, no existe ningún método analítico disponible en la literatura científica ni tampoco ensayos de estabilidad. Por tanto, los objetivos planteados en este estudio y que derivaron en una publicación científica son:

- *Objetivo específico 4.* Desarrollar y validar un método analítico para cuantificar tilvalosina en plasma de cerdo mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de ultravioleta.
- *Objetivo específico 5.* Determinar la estabilidad de tilvalosina en plasma de cerdo y en las disoluciones madre.

Publicación 2: A novel liquid chromatography-fluorescence method for the determination of delafloxacin in human plasma

Delafloxacino es una fluoroquinolona aprobada recientemente por la Agencia Europea del Medicamento y, por tanto, en el futuro próximo será objeto de numerosos estudios farmacocinéticos. Actualmente, no existe en la literatura científica ningún método para la determinación de delafloxacino mediante HPLC/FL. Tampoco se conoce la estabilidad de dicho antibiótico a diferentes temperaturas ni el método óptimo de extracción de muestras de plasma humano. Por tanto, los objetivos planteados en este estudio y que derivaron en una publicación científica son:

- *Objetivo específico 2.* Desarrollar y validar un método analítico para la determinación de delafloxacino en plasma humano mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de fluorescencia.
- *Objetivo específico 3.* Determinar la estabilidad de delafloxacino en plasma humano y en las disoluciones madre.

Publicación 3: A fast, cost-saving and sensitive method for determination of cefuroxime in plasma by HPLC with ultraviolet detection

Cefuroxima es un fármaco ampliamente utilizado en medicina humana y en medicina veterinaria. Dado su extenso uso en Farmacia Hospitalaria, se requiere de un método rápido y económico para desarrollar estudios farmacocinéticos individualizados y ajustar la dosis terapéutica según cada paciente, sobre todo en pacientes críticos donde la farmacocinética del compuesto puede variar. Por tanto, el objetivo planteado en este estudio y que derivó en una publicación científica es:

- *Objetivo específico 1.* Desarrollar y validar un método rápido y económico para la determinación de cefuroxima en plasma humano mediante cromatografía líquida acoplada a un detector ultravioleta.

**Publicaciones originales
que conforman la tesis
doctoral**

5 PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONFORMAN LA TESIS DOCTORAL

5.1 QUANTIFICATION AND DETERMINATION OF STABILITY OF TYLVALOSIN IN PIG PLASMA BY ULTRA-HIGH LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH ULTRAVIOLET DETECTION

Título: [Quantification and determination of stability of tylvalosin in pig plasma by Ultra-High Liquid Chromatography with ultraviolet detection](#)

Autores: Verónica Hernandis, Elisa Escudero, Juan Sebastián Galecio, Pedro Marín

Revista: *Animals (basel)*



animals

Factor de impacto (2020): 2.752 Q1

Ámbito: Veterinary Sciences Q1

Agriculture, dairy & animal science Q1

Fecha de publicación: Junio 2022

Volumen: 12

Número: 11

DOI: 10.3390/ani12111385

URL:

https://mdpi-res.com/d_attachment/animals/animals-12-01385/article_deploy/animals-12-01385.pdf?version=1653661491

APORTACIÓN DE LA DOCTORANDA EN EL ARTÍCULO INCLUIDO EN LA TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

La doctoranda ha participado en el diseño experimental, el procesado de las muestras, diseño y preparación del estudio de estabilidad, la determinación analítica, recopilación de los resultados e interpretación, así como en la preparación del manuscrito discutiendo los resultados obtenidos. También se ha responsabilizado del envío del manuscrito a la revista, responsabilizándose de todo el proceso editorial, siendo la autora de correspondencia del artículo.

5.2 A NOVEL LIQUID CHROMATOGRAPHY-FLUORESCENCE METHOD FOR THE DETERMINATION OF DELAFLOXACIN IN HUMAN PLASMA

Título: A novel liquid chromatography-fluorescence method for the determination of delafloxacin in human plasma

Autores: Verónica Hernandis, Elisa Escudero; Pedro Marín

Revista: *Journal Separation Science*

Factor de impacto (2020): 3.645 (Q2)

Fecha de publicación: Febrero 2022

Volumen: 45

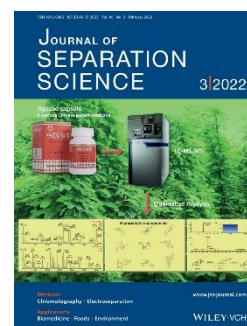
Número: 3

Ámbito: Chemistry, Analytical; 25/87;

DOI: 10.1002/jssc.202100768

URL:

<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jssc.202100768>



APORTACIÓN DE LA DOCTORANDA EN EL ARTÍCULO INCLUIDO EN LA TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

La doctoranda ha participado en el diseño experimental y optimización del proceso, preparación del estudio de estabilidad, el procesado de las muestras, la determinación analítica, recopilación de los resultados e interpretación, así como en la preparación del manuscrito discutiendo los resultados obtenidos. También se ha responsabilizado del envío del manuscrito a la revista, responsabilizándose de todo el proceso editorial, siendo la autora para la correspondencia derivada del artículo.

5.3 A FAST, COST-SAVING AND SENSITIVE METHOD FOR DETERMINATION OF CEFUROXIME IN PLASMA BY HPLC WITH ULTRAVIOLET DETECTION

Título: A fast, cost-saving and sensitive method for determination of cefuroxime in plasma by HPLC with ultraviolet detection

Autores: Verónica Hernandis, Elisa Escudero; Ana Pareja, Pedro Marín

Revista: *Biomedical Chromatography*

Factor de impacto (2020): 1.902 (Q4)

Fecha de publicación: Octubre 2021

Volumen: 35

Número: 10

Ámbito:

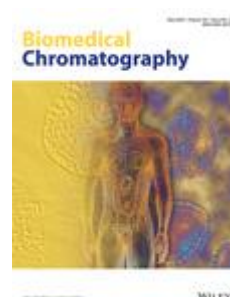
Biochemical Research Methods; 65/78; Q4

Biochemistry & Molecular Biology; 256/297; Q4

Chemistry, Analytical; 67/87; Q4, Pharmacology & Pharmacy; 228/276; Q4

DOI: 10.1002/bmc.5188.

URL: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmc.5188>



APORTACIÓN DE LA DOCTORANDA EN EL ARTÍCULO INCLUIDO EN LA TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

En dicho trabajo, la doctoranda ha participado en el diseño experimental, el procesado de las muestras, la determinación analítica, recopilación de los resultados e interpretación de los resultados, así como la preparación del manuscrito y la discusión de los resultados obtenidos

Conclusiones

6 CONCLUSIONES

A partir de los resultados descritos y derivados de los diferentes estudios en los que se ha organizado la presente tesis doctoral, se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. El método analítico para la cuantificación de la cefuroxima se realizó en plasma humano mediante HPLC/UV, empleando como estándar interno la cefazolina. La extracción se realizó mediante precipitación de proteínas con metanol/TFA (ácido trifluoroacético), obteniéndose un valor medio de recuperación elevado (93.52 %). Los tiempos de retención para la cefuroxima y la cefazolina se obtuvieron a los 9.8 y 7.4 minutos, respectivamente. La exactitud y la precisión del método fueron elevadas, con valores por debajo del 10 % en los coeficientes de variación. Los límites de detección y cuantificación se establecieron en 0.1 y 0.25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Por tanto, el método desarrollado es sencillo, rápido, económico y sensible para la determinación de cefuroxima por HPLC-UV que puede ser fácilmente aplicable en estudios clínicos, análisis de rutina y estudios farmacocinéticos.

2. El método analítico para la cuantificación del delafloxacino se realizó en plasma humano mediante HPLC acoplado a un detector de fluorescencia, empleando como estándar interno el valsartán. La extracción se realizó con acetato de etilo como reactivo extractante (extracción líquido-líquido), obteniéndose un valor medio de recuperación cercano al 100% (98.3 %). Los tiempos de retención para el delafloxacino y el valsartán se obtuvieron a los 5.4 y 11.6 minutos, respectivamente. La exactitud y la precisión del método fueron elevadas, con valores por debajo del 11 % en los coeficientes de variación. Los límites de detección y cuantificación se establecieron en 0.05 y 0.1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Por tanto, el nuevo método desarrollado es simple, rápido, sensible y reproducible para la determinación del delafloxacino por HPLC-FL, que puede ser fácilmente aplicable en estudios clínicos, monitorización del fármaco y en estudios farmacocinéticos.

3. Los controles de calidad en plasma humano de delafloxacino (0.5 y 2 $\mu\text{g/mL}$) fueron estables a 4 °C y a temperatura ambiente durante 24 horas. Sin embargo, fueron inestables cuando se congelaron a temperatura de -40 °C durante 30 días. Tras cinco ciclos de congelación (-40 °C) y descongelación, los controles de calidad de 0.5 $\mu\text{g/mL}$

Conclusiones

fueron inestables, mientras que los de 2 µg/mL permanecieron estables. Similar conclusión se obtiene con las soluciones madre de delafloxacino (2.5 y 25 µg/mL) conservadas a -40 °C, siendo la de menor concentración inestable los días 7, 15 y 30, sin embargo, la de mayor concentración fue estable los días 7 y 15, mostrando inestabilidad a los 30 días de conservación.

4. El método analítico para la cuantificación de tilvalosina se realizó en plasma de cerdo mediante HPLC acoplado a un detector de ultravioleta, empleando como estándar interno el enrofloxacino. La extracción se llevó a cabo con una mezcla de ácido fórmico en acetonitrilo (extracción líquido-líquido), obteniéndose un valor medio de recuperación elevado (93.87 %). Los tiempos de retención para la tilvalosina y el enrofloxacino se obtuvieron a los 14.1 y 5.9 minutos, respectivamente. La exactitud y la precisión del método fueron elevadas, con valores por debajo del 6.5 % en los coeficientes de variación. Los límites de detección y cuantificación se establecieron en 0.05 y 0.1 µg/mL, respectivamente. Por tanto, el nuevo método desarrollado es simple, rápido y reproducible para la cuantificación de la tilvalosina por HPLC-UV, que puede ser fácilmente aplicable en estudios farmacocinéticos y para la detección de residuos en muestras de animales.

5. La tilvalosina fue estable en los controles de calidad en plasma de cerdo (0.5 y 2 µg/mL) a 4 °C y a temperatura ambiente durante 24 horas, durante 30 días a temperatura de -40 °C y tras cinco ciclos de congelación (-40 °C) y descongelación. Igualmente, también fueron estables las soluciones madre de tilvalosina (2.5 y 25 µg/mL) conservadas a -40 °C durante 7, 20 y 60 días.

Resumen

7 RESUMEN

El uso de antibióticos tanto en medicina humana como en medicina veterinaria se está restringiendo en la actualidad debido a la elevada resistencia que ofrecen los microorganismos. Los estudios farmacocinéticos constituyen una herramienta muy valiosa a la hora de evaluar la concentración de fármaco en el organismo y establecer posologías adecuadas que aseguren el éxito clínico y minimicen el riesgo de aparición de resistencias bacterianas. Para poder realizar dichos estudios en muestras biológicas, tanto de humanos como de animales, es necesario previamente desarrollar y validar un método analítico para cuantificar las concentraciones del fármaco en la muestra de forma adecuada. En general, los métodos analíticos más usados en los estudios farmacocinéticos para la cuantificación del fármaco son los métodos cromatográficos. En este caso, el objetivo general de la presente tesis doctoral fue la validación de tres métodos analíticos para la cuantificación de tres antibióticos (cefuroxima, delafloxacino, tilvalosina) que permita la obtención de la concentración exacta del fármaco en diferentes matrices biológicas y de este modo utilizarlos para realizar los estudios farmacocinéticos pertinentes.

El desarrollo, optimización y validación de un método analítico para la cuantificación de la cefuroxima se realizó en plasma humano mediante HPLC/UV. La extracción se realizó mediante precipitación de proteínas con metanol/TFA (ácido trifluoroacético). Los resultados obtenidos en los parámetros de validación fueron satisfactorios obteniendo una elevada recuperación (93.52 %), alta selectividad y especificidad, con un valor en el error de la exactitud por debajo del 10 %. De igual forma, para el cálculo de la precisión se obtuvo un valor $< 10\%$ en el coeficiente de variación. Los límites de detección y cuantificación se establecieron en 0.1 y 0.25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Por lo que el método analítico propuesto es adecuado para ser aplicado en estudios clínicos, análisis de rutina y estudios farmacocinéticos.

El desarrollo, optimización y validación de un método analítico para la cuantificación de delafloxacino se realizó en plasma humano mediante HPLC/FL. El proceso de extracción consistió en una extracción líquido-líquido con ácido fórmico al 50% y acetato de etilo. También se evaluó la estabilidad de dicho antibiótico en diferentes matrices y a diferentes temperaturas. Los resultados obtenidos en los parámetros de

Resumen

validación fueron satisfactorios obteniendo una elevada recuperación (98.3 %), alta selectividad y especificidad, un límite de detección de 0.05 µg/mL y un límite de cuantificación de 0.1 µg/mL. Los valores obtenidos en la precisión, expresados como coeficiente de variación, fueron < 11%. De igual forma, los valores obtenidos para el error en la exactitud fueron < 11%. Los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad mostraron inestabilidad tanto en las muestras de plasma como en las disoluciones madre a partir de los quince días de almacenamiento a -40°C. De ahí que se propongan nuevos estudios con el fin de asegurar la estabilidad del delafloxacino en diferentes condiciones de almacenamiento.

El desarrollo, optimización y validación de un método analítico para la cuantificación de la tilvalosina se realizó en plasma de cerdo mediante HPLC/UV. La extracción se realizó mediante precipitación de proteínas con una solución al 0.1 % de ácido fórmico en acetonitrilo. También se evaluó la estabilidad de dicho antibiótico en diferentes matrices y a diferentes temperaturas. Los resultados obtenidos en los parámetros de validación fueron excelentes, obteniendo un rango en el valor de recuperación entre 89.66-96.92 %. Los límites de detección y cuantificación fueron de 0.05 µg/mL y 0.1 µg/mL, respectivamente. Con lo que respecta a los valores obtenidos para la precisión y el error en la exactitud, éstos fueron < 13.0 % en ambos parámetros. Hay que destacar la buena selectividad y especificidad del método analítico. Finalmente, los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad a -40°C fueron también satisfactorios demostrando la estabilidad a corto y largo plazo. Por lo que se puede concluir que este método puede ser aplicado en estudios clínicos, monitorización de niveles eficaces y estudios farmacocinético.

Summary

8 SUMMARY

The use of antibiotics in both human and veterinary medicine is currently being restricted due to the high resistance offered by microorganisms. Pharmacokinetic studies are a very valuable tool to assess drug concentration in the body and to establish appropriate dosages in order to ensure clinical success and minimize the risk of the appearance of bacterial resistance. In order to carry out these studies on biological samples, both from humans and animals, it is necessary first to develop and validate an analytical method to adequately quantify drug concentrations in the sample. In general, the analytical methods most used in pharmacokinetic studies for drug quantification are chromatographic methods. In this case, the general objective of this doctoral thesis was the validation of three analytical methods for the quantification of three antibiotics (cefuroxime, delafloxacin, tylvalosin) that allows to obtain exact concentrations of the drug in different biological matrices and thus use them to perform relevant pharmacokinetic studies.

The development, optimization and validation of an analytical method for the quantification of cefuroxime was carried out in human plasma by HPLC/UV. Extraction was performed by protein precipitation with methanol/TFA (trifluoroacetic acid). Validation parameters were satisfactory, obtaining a high recovery (93.52%), high selectivity and specificity, with an accuracy error value below 10%. Similarly, for the calculation of precision, a value $< 10\%$ was obtained in the coefficient of variation. Detection and quantification limits were 0.1 and 0.25 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Therefore, the proposed analytical method is suitable to be applied in clinical studies, routine analysis and pharmacokinetic studies.

The development, optimization and validation of an analytical method for the quantification of delafloxacin was performed in human plasma by HPLC/FL. The extraction process consisted of a liquid-liquid extraction with 50% formic acid and ethyl acetate. The stability of the antibiotic in different matrices and at different temperatures was also evaluated. Validation parameters were satisfactory, obtaining a high recovery (98.3%), high selectivity and specificity, a detection limit of 0.05 $\mu\text{g/mL}$ and a quantification limit of 0.1 $\mu\text{g/mL}$. The values obtained in precision, expressed as coefficient of variation, were $< 11\%$. Similarly, the values obtained for the accuracy error were $< 11\%$. Stability studies showed instability in both plasma samples and mother

Summary

solutions after fifteen days of storage at -40°C. Hence, new studies are needed to ensure the stability of delafloxacin in different storage conditions.

The development, optimization and validation of an analytical method for the quantification of tylvalosin was carried out in pig plasma by HPLC/UV. Extraction was performed by protein precipitation with a 0.1% solution of formic acid in acetonitrile. Antibiotic stability in different matrices and at different temperatures was also evaluated. Validation parameters were excellent, obtaining a range in the recovery value between 89.66-96.92%. The detection and quantification limits were 0.05 µg/mL and 0.1 µg/mL, respectively. Regarding the values obtained for precision and accuracy error, these were both lower than 13.0%. The good selectivity and specificity of this analytical method should be highlighted. Finally, the results obtained in the stability studies at -40°C were also satisfactory, demonstrating short- and long-term stability. Therefore, it can be concluded that this method can be applied in clinical studies, effective levels monitoring and pharmacokinetic studies.