

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias
Biológicas

“BIOANÁLISIS DE FÁRMACOS PARA MONITOREO TERAPÉUTICO. GENERACIÓN DE ESTRATEGIAS ANALÍTICAS DE CALIDAD BASADAS EN EL DISEÑO, UTILIZANDO CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA Y NUEVA TECNOLOGÍA DE PARTÍCULAS ALTAMENTE EFICIENTES”

Lic. Yamile Soledad Caro

Directora: **Dra. María Mercedes De Zan**

Co-directora: **Dra. María Silvia Cámara**

Lugar de realización: **Laboratorio de Control de Calidad de
Medicamentos LCCM – FBCB – UNL**

2023

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y a la Universidad Nacional del Litoral por haberme permitido realizar en esta casa de estudio el presente trabajo de tesis.

A mi directora, Mercedes De Zan, y codirectora, María Silvia Cámara, por confiar en mí, por todo lo aprendido y compartido durante estos años. Por guiarme en mi crecimiento personal, profesional y como docente. Por su apoyo y dedicación, por alentarme en los momentos que más lo necesite. Por haber convertido este proceso en una experiencia inolvidable que siempre llevaré conmigo. Gracias por permitirme ser parte de sus vidas.

A Caco, por su llamada telefónica en el año 2014 que cambió mi vida para siempre. Gracias por confiar en mí. Si me vieras.....

A Héctor, por no dejar de intentar y creer en mí. ¡Lo logré!

A Quela que, a pesar de estar a muchos kilómetros de distancia, siempre está cerca. Gracias por ser incondicional.

A todos los integrantes de mi apreciado segundo hogar, el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos: Alicia, Mauro, Paula, Luci, Mati. Gracias por hacer el día a día algo maravilloso. Amo el trabajo que hacemos a diario y el gran equipo que somos.

A mis amigas Tali, Marie y Pome, por cruzarse en mi camino, por brindarme su apoyo y alentarme a no bajar los brazos y lograr concretar esta meta. Extiendo mi gratitud a sus respectivos compañeros e hijos, por todas las experiencias compartidas en este último tiempo.

A mi querida familia, que sin saber ni entender lo que estaba haciendo, siempre estuvo a mi lado apoyándome y confiando en mí. Por inculcarme el valor de la perseverancia y la importancia del esfuerzo.

A mis adorados hijos, Dimas e Iñaki, por ser la luz de mi vida. Gracias por su amor, por su paciencia y comprensión siendo tan pequeños. ¡Los amo con todo mi ser!

A Mati, mi compañero de vida. Gracias por la familia que construimos, por creer en mí, por estar en cada momento y detalle. Sin vos, no lo hubiese logrado.

¡¡¡¡A todos eternamente gracias!!!!

APORTES CIENTÍFICO-TECNOLÓGICOS

Publicaciones pertenecientes al trabajo de tesis

- ***A review of bioanalytical methods for the therapeutic drug monitoring of β -lactam antibiotics in critically ill patients: Evaluation of the approaches used to develop and validate quality attributes.*** Y.S. Caro, M.S. Cámara, M.M. De Zan. *Talanta* 210 (2020) 120619.
- ***Application of the lifecycle approach to the development and validation of a chromatographic method for therapeutic drug monitoring of ceftazidime, meropenem, and piperacillin.*** Y.S. Caro, P. Van Strate, M.E. Sartorio, M.S. Cámara, M.M. De Zan. *Microchemical Journal* 170 (2021) 106692.

Publicaciones relacionadas al tema de tesis

- **“Quality by Design applications to development of analytical methods for quality control of pharmaceuticals”** Yamile Soledad Caro, María Silvia Cámara and María Mercedes De Zan. **Chapter 10 in: Introduction to Quality by Design in Pharmaceutical Manufacturing and Analytical Development**, Hardcover: ISBN 978-3-031-31504-6 Due: 19 July 2023, Publisher: Springer Cham, Editors: Marcia Cristina Breikreitz, Hector Goicoechea.
- **“Monitorización terapéutica de metotrexato en pacientes leucémicos mediante cromatografía líquida de alta resolución. Desarrollo, validación y aplicación clínica del método analítico”** Lucía Torregiani, Yamile Soledad Caro y María Mercedes De Zan. *Rev Lab Clin.* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2017.09.007>.
- **“Bioanalytical Method Optimization for the Therapeutic Drug Monitoring of Vancomycin”** Ariana Beatriz Alasino, Yamile Soledad Caro, María Mercedes De Zan. (2017) *J Anal Bioanal Sep Tech* 2(2): 89- 95. DOI: 10.15436/2476-1869.17.1733.

INDICE

I. ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	11
II. RESUMEN.....	17
III. SUMMARY	19
IV. INTRODUCCIÓN	21
IV.1. Monitoreo terapéutico de drogas	21
IV.1.1. Conceptos de farmacocinética y farmacodinamia.....	22
IV.1.2. Farmacoterapias que requieren MTD	26
IV.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución	27
IV.2.1. Conceptos fundamentales	28
IV.2.2. Fases estacionarias	28
IV.2.3. Preparación de muestras biológicas	29
IV.3. Calidad por diseño en el desarrollo de métodos analíticos.....	31
IV.3.1. Gestión del ciclo de vida de un método analítico y conceptos de AQbD	32
IV.3.1.1. Perfil del objetivo analítico	33
IV.3.1.2. Gestión de riesgos de la calidad.....	34
IV.3.1.3. Etapa 1: Diseño del método.....	36
IV.3.1.3.1. Atributos críticos del método.....	36
IV.3.1.3.2. Parámetros críticos del método.....	37
IV.3.1.3.3. Región del diseño de operabilidad de método, espacio de control y punto óptimo de trabajo	38
IV.3.1.3.4. Estrategia de control	39
IV.3.1.4. Diseño y optimización de experimentos.....	40
IV.3.1.5. Metodología de la superficie de respuesta	42
IV.3.1.5.1. Función deseabilidad.....	46
IV.3.1.5.2. Softwares.....	48
IV.3.1.6. Etapa 2: Calificación del desempeño del método	49
IV.3.1.6.1. Selectividad.....	51
IV.3.1.6.2. Límite inferior de cuantificación.....	51
IV.3.1.6.3. Curva de calibrado, rango analítico y modelo de predicción	51
IV.3.1.6.4. Precisión	52
IV.3.1.6.5. Sesgo.....	53

IV.3.1.6.6. Exactitud. Evaluación conjunta de precisión y sesgo.....	53
IV.3.1.7. Etapa 3: Monitoreo continuo.....	54
V. OBJETIVOS	56
V.1. Objetivos generales:.....	56
V.2. Objetivos específicos:.....	56
CAPÍTULO 1: BIONÁLISIS DE ETAMBUTOL, ISONIACIDA Y PIRAZINAMIDA EN PLASMA PARA MONITOREO TERAPÉUTICO EN EL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS.....	57
1.1. INTRODUCCIÓN.....	58
1.1.1. Tuberculosis	58
1.1.1.1. Características generales de la enfermedad	58
1.1.1.2. Problemática actual	58
1.1.1.3. Aportes del MTD en el tratamiento de la TB.....	60
1.1.1.4. Contribución al abordaje de la problemática.....	60
1.1.2. Antibióticos tuberculostáticos.....	60
1.1.2.1. Clasificación.....	60
1.1.2.2. Tratamiento farmacológico de la DS-TB.....	61
1.1.2.3. Índice pK/pD	62
1.1.3. Antecedentes analíticos para la cuantificación de antibióticos tuberculostáticos en fluidos biológicos.....	63
1.1.4. Etambutol, isoniacida y pirazinamida.....	64
1.2. OBJETIVOS PARTICULARES	66
1.3. MATERIALES Y MÉTODOS	66
1.3.1. Instrumental y equipamiento.....	66
1.3.2. Softwares para la adquisición y procesamiento de datos	67
1.3.3. Reactivos y muestras.....	67
1.3.4. Soluciones de estándares, muestras calibradoras y muestras de control de calidad	67
1.3.5. Pretratamiento de las muestras de plasma.....	69
1.3.6. Sistema cromatográfico	70
1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	70
1.4.1. Definición del perfil del objetivo analítico	70
1.4.2. Diseño, desarrollo y comprensión del método	71
1.4.2.1. Selección de la técnica analítica.....	71
1.4.2.2. Sistema analítico inicial.....	71

1.4.2.3. Identificación de riesgos	72
1.4.2.4. Fase de exploración y conocimiento inicial del sistema.....	73
1.4.2.4.1. Selección de la columna y la longitud de onda	73
1.4.2.4.2. Selección de la fase móvil y gradiente de elución.....	74
1.4.2.4.3. Evaluación de la señal endógena	75
1.4.2.4.4. Pretratamiento de la muestra de plasma	76
1.4.2.5. Evaluación de riesgos.....	77
1.4.2.6. Atributos críticos del método.....	78
1.4.2.7. Parámetros críticos del método	78
1.4.2.7.1. Evaluación del efecto de los factores y del entorno experimental. Diseños de primer orden.....	79
1.4.2.7.2. Generación de conocimiento detallado del sistema. Diseños de segundo orden.....	82
1.4.2.8. Definición de MODR, punto óptimo, punto robusto y espacio de control	85
1.4.2.9. Validación experimental del espacio de control	86
1.4.3. Validación del método.....	88
1.4.3.1. Selectividad	88
1.4.3.2. Curva de calibrado y modelo de predicción	89
1.4.3.3. Precisión intra-ensayo e inter-ensayo.....	89
1.4.3.4. Sesgo	90
1.4.3.5. Exactitud. Evaluación conjunta de sesgo y precisión.....	90
1.4.3.6. Estudios de estabilidad	91
1.4.4. Estrategia de control y monitoreo continuo de método	91
1.5. CONCLUSIONES.....	92

CAPÍTULO 2: DETERMINACIÓN DE CEFTAZIDIMA, MEROPENEM Y PIPERACILINA EN PLASMA DE PACIENTES POLIMEDICADOS CRÍTICAMENTE ENFERMOS

2.1. INTRODUCCIÓN.....	94
2.1.1. Tratamientos con antibióticos en pacientes con terapias de reemplazo renal	94
2.1.1.1. Problemática general.....	94
2.1.1.2. Problemática particular	94
2.1.1.3. Contribución al abordaje de la problemática.....	95
2.1.2. Antibióticos betalactámicos.....	95
2.1.2.1. Clasificación.....	95

2.1.2.2. Índice pK/pD y objetivos terapéuticos	96
2.1.3. Ceftazidima, meropenem y piperacilina	97
2.1.4. Antecedentes analíticos para la cuantificación de antibióticos betalactámicos en fluidos biológicos	99
2.2. OBJETIVOS PARTICULARES	100
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS	100
2.3.1. Declaración de ética	100
2.3.2. Instrumental y equipamiento	100
2.3.3. Softwares para la adquisición y procesamiento de datos	101
2.3.4. Reactivos y muestras.....	102
2.3.5. Soluciones de estándares, muestras calibradoras y muestras de control de calidad	103
2.3.6. Pretratamiento de las muestras de plasma	105
2.3.7. Sistema cromatográfico	106
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	106
2.4.1. Definición del perfil del objetivo analítico	106
2.4.1.1. Definición de los rangos analíticos	107
2.4.1.2. Polimedición de los pacientes.....	107
2.4.2. Diseño, desarrollo y comprensión del método	108
2.4.2.1. Selección de la técnica analítica	108
2.4.2.2. Sistema analítico inicial.....	109
2.4.2.3. Identificación de riesgo.....	109
2.4.2.4. Fase de exploración y conocimiento inicial del sistema.....	110
2.4.2.4.1. Selección de la columna	110
2.4.2.4.2. Selección de la fase móvil y del modo de elución.....	110
2.4.2.4.3. Evaluación de medicación concomitante.....	112
2.4.2.4.4. Selección de las longitudes de onda.....	113
2.4.2.4.5. Pretratamiento de la muestra.....	114
2.4.2.5. Evaluación de riesgos.....	115
2.4.2.6. Atributos críticos del método.....	115
2.4.2.7. Parámetros críticos del método.....	116
2.4.5.7.1. Evaluación de los factores y entorno experimental. Diseños de primer orden.....	116

2.4.2.7.2. Generación de conocimiento detallado del sistema. Diseños de segundo orden.....	119
2.4.2.8. Definición del MODR, espacio de control y punto óptimo de trabajo	123
2.4.3. Validación del método.....	127
2.4.3.1. Selectividad	128
2.4.3.2. Curva de calibrado y modelo de predicción	128
2.4.3.3. Precisión intra-ensayo e inter-ensayo.....	129
2.4.3.4. Sesgo	130
2.4.3.5. Exactitud. Evaluación conjunta de sesgo y precisión.....	130
2.4.3.6. Estudios de estabilidad	130
2.4.4. Estrategia de control y monitoreo continuo de método.	131
2.5. CONCLUSIONES.....	132

CAPÍTULO 3: DOSAJE DE MEROPENEM EN PLASMA DE PACIENTES BAJO TERAPIA DE REEMPLAZO RENAL. APLICACIÓN DE UN MÉTODO BIOANALÍTICO ADECUADO PARA EVALUAR OBJETIVOS TERAPÉUTICOS EN LA PRÁCTICA CLÍNICA.....

3.1. INTRODUCCIÓN.....	134
3.1.1. Complejidad de los tratamientos con antibióticos en pacientes críticamente enfermos.	134
3.1.2. Terapias de reemplazo renal	134
3.1.3. Esquemas terapéuticos con meropenem.....	136
3.1.4. Contribución a la problemática particular	137
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES	137
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS	138
3.3.1. Ética y consentimiento informado	138
3.3.2. Diseño del estudio y criterios de inclusión	138
3.3.3. Datos recopilados	138
3.3.4. Modalidades de TRR	138
3.3.5. Análisis farmacodinámico y objetivos terapéuticos	139
3.3.6. Dosificación y toma de muestra	139
3.3.7. Cuantificación del meropenem plasmático. Método analítico.	140
3.3.8. Análisis estadístico	141
3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	141
3.4.1. Información de los pacientes y series de muestras	141

3.4.2. Hallazgos en pacientes con TRR-C	143
3.4.3. Hallazgos en pacientes con TRR-I.....	145
3.5. CONCLUSIONES.....	148

CAPÍTULO 4: APLICACIÓN DE AQbD RETROSPECTIVA EN LA ACTUALIZACIÓN DE UN MÉTODO BIOANALÍTICO UTILIZADO PARA EL MONITOREO TERAPÉUTICO DE METOTREXATO

4.1. INTRODUCCIÓN.....	151
4.1.1. Tratamientos con altas dosis de metotrexato.....	151
4.1.2. Contribución a la problemática.....	152
4.1.3. Metotrexato	152
4.1.3.1. Propiedades fisicoquímicas y mecanismo de acción	152
4.1.4. Administración, metabolismo y toxicidad.....	154
4.1.5. Importancia del monitoreo terapéutico de MTX.....	155
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	155
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS	156
4.3.1. Instrumental y equipamiento.....	156
4.3.2. Softwares para la adquisición y procesamiento de datos	156
4.3.3. Reactivos y muestras.....	157
4.3.4. Soluciones estándares, muestras calibradoras y muestras controles.....	157
4.3.5. Pretratamiento de las muestras de plasma.....	159
4.3.6. Sistema cromatográfico	160
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:.....	161
4.4.1. Definición del perfil del objetivo analítico.....	161
4.4.1.1. Revisión de los objetivos terapéuticos	161
4.4.1.2. Redefinición del rango analítico	162
4.4.2. Rediseño del método	162
4.4.2.1. Sistema analítico inicial.....	162
4.4.2.2. Identificación de riesgos.....	163
4.4.2.3. Medicación coadministrada	164
4.4.2.4. Definición de los CMAs.....	164
4.4.2.5. Evaluación de riesgos.....	164
4.4.2.5.1. Evaluación de la concentración de la SR.....	164
4.4.2.5.2. Evaluación del pH de la SR	166

4.4.4.5.3. Evaluación de la medicación coadministrada	166
4.4.4.5.4. Evaluación conjunta de la temperatura del horno de la columna y la velocidad de flujo	167
4.4.4.5.5. Generación información detallada del sistema	169
4.4.2.6. Definición del MODR, espacio de control y punto óptimo de trabajo.....	173
4.4.2.7. Validación del espacio de control.....	174
4.4.3. Revalidación del método bioanalítico.....	175
4.4.3.1. Selectividad	176
4.4.3.2. Curva de calibrado y modelo de predicción	176
4.4.3.3. Precisión intra-ensayo e inter-ensayo.....	177
4.4.3.4. Sesgo	177
4.4.3.5. Exactitud. Evaluación conjunta de sesgo y precisión.....	177
4.4.4. Estrategia de control y monitoreo continuo de método.	178
4.4.5. Análisis de muestras reales	180
4.5. CONCLUSIONES.....	181
VI. CONCLUSIONES	183
VII. BIBLIOGRAFÍA	185

I. ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

$\%REC$	Recuperación relativa
$\overline{\%REC}$	Recuperación relativa promedio
\overline{CP}	Concentración predicha promedio
$Z^2_{(1+P)/2}$	Percentil normal estándar
r_n	Importancia relativa
s_i^2	Varianza
β_i	Coefficiente de primer orden
β_{ii}	Coefficiente de segundo orden
β_{ij}	Coefficiente de la interacción
β_0	Constante o intercepto
$\chi^2_{\alpha;n-1}$	Percentil chi cuadrado
3-DFC	Diseño factorial completo en tres niveles
40% ID	40% Interdosis
40% S	40% del tiempo de duración de la sesión
7-OH-MTX	7-hidroxi-metotrexato
a	Ordenada al origen
ABC	Área bajo la curva
ABC/CIM	Relación entre el área bajo la curva y la concentración inhibitoria mínima
ACN	Acetonitrilo
AF	Ácido fólico
AP	Ácido perclórico
AQbD	Calidad analítica basada en el diseño, del inglés <i>analytical quality by design</i>
ASP	Aspirina
ATP	Perfil objetivo analítico, del inglés <i>Analytical target profile</i>
b	Pendiente
bias%	Bias porcentual
C18	Octadecilsilano
C8	Octilsilano
CE	Compuesto endógeno
CHL	Cloroformo

CIM	Concentración inhibitoria mínima
CLAR	Cromatografía líquida alta resolución
CLAR_DAD	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos
CLAR_MS	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de masa
CLAR_MS/MS	Cromatografía líquida de alta resolución con detector masa/masa
CLAR-UV	Cromatografía líquida de alta resolución con detector UV
CMA	Atributo crítico del método, del inglés <i>critical method attribute</i>
C_{máx}	Concentración máxima
C_{máx}/CIM	Relación entre la concentración máxima y la concentración inhibitoria mínima
CME	Concentración mínima efectiva
C_{mín}	Concentración mínima
CMP	Parámetro crítico del método, del inglés <i>critical method parameter</i>
CMT	Concentración mínima toxica
CN	Concentración nominal
CP	Concentración predicha
CPDG2	carboxipeptidasa-G2
CV	Coefficiente de variación
CVi	Coefficiente de variación inter-ensayo
CVr	Coefficiente de variación de repetibilidad
CVVH	Hemofiltración veno-venosa continua, del inglés <i>continuous veno-venous haemofiltration</i>
CVVHDF	Hemodiafiltración veno-venosa continua, del inglés <i>continuous veno-venous Haemodiafiltration</i>
D	Deseabilidad global
DAMPA	Ácido 2,4-diamino-N-metilpteroico
DBB	Diseño de Box-Behnken
DCC	Diseño central compuesto
DFC	Diseño factorial completo
DFF	Diseño factorial fraccionado
DHFR	Enzima dihidrofolatoreductasa
DOE	Diseño de experimeintos, del inglés <i>design of experiments</i>
DOP	Dopamina
DPB	Diseño de Plackett y Burman

DSP	Diseño split-plot
DS-TB	Tuberculosis por cepas sensibles a las drogas de primera línea, del inglés <i>drug susceptible tuberculosis</i>
E	Experimentos
EC	Espacio de control
ELL	Extracción líquido-líquido
EMB	Etambutol
EUCAST	Comité europeo de evaluación de la sensibilidad antimicrobiana, del inglés <i>european committee on antimicrobial susceptibility testing</i>
FRS	Furosemida
HDMTX	Altas dosis de MTX, del inglés <i>High-Dose Metotrexate</i>
IMC	Índice de masa corporal
INH	Isoniacida
k	Factor
LADME	Liberación, absorción, distribución, metabolización y excreción.
LIC	Límite inferior de cuantificación
LogP	Logaritmo del coeficiente de reparto
LSC	Límite superior de cuantificación
MB	Muestra blanco
MC	Muestra calibradora
MDR-TB	Tuberculosis por cepas multirresistentes, del inglés <i>multidrug resistant tuberculosis</i>
MeOH	Metanol
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanolsulfónico
MODR	Región del diseño de operabilidad del método, del inglés <i>method operable design region</i>
MOP	Morfina
MQ	Muestra control
MR	Muestra real
MSR	Metodología de superficie de respuesta
MTD	Monitoreo terapéutico de drogas
MTX	Metotrexato
MTXPG	Metotrexato poliglutamatos

NA	Nivel alto
NaOH	Hidróxido de sodio
NB	Nivel bajo
NM	Nivel medio
NOR	Noradrenalina
OMS	Organización mundial de la salud
OT	Objetivos terapéuticos
OWP	Punto óptimo de trabajo, del inglés <i>optimal working point</i>
PB	Plasma blanco
pc	Puntos centrales
PCT	Paracetamol
pe	Puntos axiales o estrella
pf	Puntos factoriales
PFP	Pentafluorofenilo
PIP	Piperacilina
pK/pD	Farmacocinética/Farmacodinamia del inglés, <i>pharmacokinetic/pharmacodinamic</i>
pKa	Constante de disociación
PP	Precipitación de proteínas
PZA	Pirazinamida
Q²	Coefficiente de determinación de la predicción según programa MODDE.
QbD	Calidad basada en el diseño, del inglés <i>quality by design</i>
R²	Coefficiente de determinación
R²-adj	Coefficiente de determinación ajustado
R²-pred.	Coefficiente de determinación de predicción
RI	Rango intercuartílico
RNT	Ranitidina
s	Peso
s.t.c	Sustancia tal cual
Sa	Desvío estándar de la ordenada al origen
SA	Señal analítica
SAMR	<i>Staphilococcus aureus</i> meticilin resistentes
Sb	Desvío estándar de la pendiente

SC	Superficie corporal
SEIC	Solución estándar intermedia combinada
SES	Solución estándar stock
SEST	Solución estabilizadora
SI	Solución intermedia
SLED	diálisis sostenida de baja eficiencia, del inglés <i>sustained low-efficiency dialysis</i>
SPE	Extracción en fase sólida, del inglés <i>solid phase extraction</i>
SPME	Microextracción en fase sólida, del inglés <i>solid phase microextraction</i>
SR	Solución reguladora
SS	Solución stock
SST	Prueba de aptitud del sistema, del inglés <i>system suitability test</i>
ST	Solución de trabajo
t	Peso
<i>t</i>_{1/2}	Tiempo de vida media o semivida
TB	Tuberculosis
TCA	Ácido tricloroacético
<i>tm</i>_{máx}	Tiempo máximo
TRR	Terapia de reemplazo renal
TRR-C	Terapia de reemplazo renal continua
TRR-I	Terapia de reemplazo renal intermitente
UTI	Unidad de terapia intensiva
V_{A-B}	Muestras en valle
XDR-TB	Tuberculosis por cepas de resistencia extrema, del inglés <i>extensively-drug resistant tuberculosis</i>
β	Bias% promedio
β-LA	Antibiótico betalactámico
<i>Li</i>	Límite inferior, de inglés <i>lower</i>
<i>Pr</i>	Probabilidad real
<i>Rs</i>	Resolución cromatográfica
<i>S</i>	Desvío estándar general para el bias %
<i>Si</i>	Desvío estándar obtenido a partir de la varianza
<i>Sr</i>	Desvío estándar de la concentración predicha

Ti	En el valor, del inglés <i>target</i>
Ui	Límite superior, del inglés <i>upper</i>
Y	Resultado informado
$di(yi)$	Función deseabilidad individual
tr	Tiempo de retención
xi	Variable independiente o factor
y	Variable dependiente o respuesta
ε	Error residual
λ	Límite de incertidumbre
τ	Valor verdadero o valor de referencia

II. RESUMEN

La ciencia farmacéutica ha logrado grandes progresos en los últimos años y continúa buscando soluciones más efectivas y seguras para combatir enfermedades viejas y nuevas. Junto con este desarrollo y la medicina personalizada, el monitoreo terapéutico de drogas (MTD) resulta de gran valor para el manejo de algunos tratamientos farmacológicos. Basada en la determinación de la concentración alcanzada por los fármacos en los fluidos biológicos, su principal beneficio es el de optimizar la eficacia, y prevenir la toxicidad ajustando la dosis individual a cada paciente. De esta manera se logra evitar consecuencias negativas como el fracaso terapéutico, efectos adversos o la aparición de nuevas resistencias microbianas a los antibióticos.

Frente a esta realidad se pone de manifiesto la vital importancia de que la comunidad médica pueda contar con laboratorios de análisis que dispongan de métodos bioanalíticos de fácil implementación y acceso, pero de calidad analítica adecuada para llevar a cabo la determinación de fármacos en muestras biológicas. Los mismos permitirán avanzar tanto, en el establecimiento de rangos terapéuticos adecuados para poblaciones especiales en las que aún no se han definido, como en la realización exitosa del MTD.

En este contexto, la cromatografía líquida de alta resolución empleando nueva fases estacionarias con tecnología de partículas altamente eficientes presenta un desempeño altamente selectivo y reproducible que se adapta a las necesidades de costo, simplicidad, disponibilidad y fácil acceso de laboratorios de mediana complejidad para el desarrollo de nuevos métodos bioanalíticos.

Por otro lado, la implementación de los fundamentos de la calidad analítica basada en el diseño (AQbD) y de la gestión del ciclo de vida, resultan poderosas herramientas, que permiten la incorporación del concepto de calidad desde el diseño mismo de los métodos analíticos. Resaltando la importancia de enfoques científicos sólidos y de un aseguramiento de la calidad de los resultados informados, AQbD se basa en la gestión de riesgos aplicada tanto en el desarrollo, como en el control, establecimiento y uso rutinario de los métodos analíticos.

En el presente trabajo de tesis se aplicaron AQbD y gestión del ciclo de vida en el desarrollo, validación y monitoreo continuo de tres métodos cromatográficos aplicados para MTD de tuberculostáticos, antibióticos betalactámicos y metotrexato. Todos resultaron aptos para el uso previsto presentando características de desempeño en concordancia con los requerimientos internacionales para métodos bioanalíticos.

El Capítulo 1 se centra en el desarrollo de un nuevo método bioanalítico destinado a determinar las concentraciones plasmáticas de etambutol, isoniacida y pirazinamida en pacientes con tuberculosis sensible a fármacos de primera línea. El Capítulo 2 presenta también el desarrollo de un nuevo método cromatográfico, en este caso previsto para la cuantificación de ceftazidima, meropenem y piperacilina en plasma de pacientes polimedcados. En ambos casos, las diferentes herramientas de AQbD utilizadas permitieron lograr la sensibilidad y la selectividad requeridas para generar resultados confiables en tiempos de análisis cortos y a un costo razonable.

El Capítulo 3 aborda la aplicación del método bioanalítico desarrollado en el Capítulo 2 para concretar un estudio clínico del comportamiento de los niveles plasmáticos de meropenem en pacientes bajo dos tipos de terapias de reemplazo renal, internados en la unidad de terapia intensiva del hospital “J. M. Cullen” de la ciudad de Santa Fe, con el objetivo de validar la adecuación de las dosis administradas habitualmente.

Por último, el Capítulo 4 presenta la aplicación retrospectiva de las herramientas de AQbD para actualizar un método bioanalítico utilizado desde el año 2010 para monitoreo terapéutico de metotrexato en pacientes diagnosticados con diferentes patologías oncohematológica.

III. SUMMARY

Over the last few years, the pharmaceutical industry has achieved outstanding signs of progress and is on a continued search for more effective and secure solutions to combat old and new diseases. With this development and personalized medicine, the therapeutic monitoring of drugs (TDM) is of great value for the managing of certain pharmacological treatments. Based on the determination of drug concentrations in biological fluids, its main benefit is to optimize the efficacy and prevent the toxicity by adjusting the individual doses for each patient. In this manner, negative consequences, such as therapeutic failure, adverse effects, and the generation of new bacterial resistance, are avoided.

Under this scenario, it is of vital importance for the medical community to be able to count on analytical laboratories that have bioanalytical methods that are easy to implement and access, but of adequate analytical quality, to carry out the determination of drugs in biological samples. In this way, it would be possible to move forward both in the establishment of appropriate therapeutic windows of drugs or populations where they have not yet been defined, and so as in the successful implementation of the TDM.

In this regard, high-performance liquid chromatography (HPLC) using new stationary phases with highly efficient particle technology, shows excellent selective and reproducible performance that fits the necessity of cost, simplicity, availability, and ease of accessibility of laboratories of medium complexity that aim to develop new bioanalytical methods.

On the other hand, the implementation of the principles of analytical quality by design (AQbD) and the life cycle management are powerful tools that allow the incorporation of the quality concept from the design of the analytical method itself. Capitalizing on the importance of solid scientific approaches and the quality assurance of the reported results, AQbD is based on the risks management applied to the development, control, implementation, and routine use of analytical methods.

Along the work of this thesis, AQbD and lifecycle management were applied in the development, validation and continuous monitoring of three chromatographic methods used for the TDM of tuberculostatic agents, beta-lactam antibiotics and methotrexate. The developed methods demonstrated to be suitable for the intended purpose, showing performance characteristics in accordance with international requirements for bioanalytical methods.

Chapter 1 is advocated for the determination of plasmatic concentrations of ethambutol, isoniazid, and pyrazinamide in patients with tuberculosis sensitive to first-line drugs. Chapter 2 describes the quantitation of ceftazidime, meropenem and piperacillin in the plasma of polymedicated patients who are in intensive care unities. In both cases, the utilized AQbD tools allowed for achieving the sensitivity and selectivity required to generate reliable results, straightforwardly and affordably.

Chapter 3 depicts the implementation of the bioanalytical method developed in Chapter 2 to carry out a clinical study of the behavior of the meropenem plasmatic levels in patients under two different renal replacement therapies, who are admitted to intensive care unit of “J. M. Cullen” Hospital, Santa Fe City, aiming to validate the adequacy of the meropenem doses that are usually used.

Last, Chapter 4 presents the retrospective application of the AQbD tools in the upgrade of a current bioanalytical method that has been utilized since 2010 for the therapeutic monitoring of methotrexate in patients diagnosed with different oncohaematological pathologies.

IV. INTRODUCCIÓN

IV.1. Monitoreo terapéutico de drogas

La ciencia farmacéutica ha avanzado enormemente en las últimas décadas y la investigación en el área de los medicamentos sigue siendo hoy prioritaria en pos de descubrir tratamientos cada vez más eficaces y seguros para enfermedades antiguas y nuevas. Hoy se sabe certeramente que, en el empleo terapéutico, un fármaco debe ser capaz de alcanzar el sitio de acción deseado en una concentración adecuada después de administrarse por una vía conveniente para lograr la eficacia necesaria. En general, existe una alta correlación entre el nivel en sangre de un fármaco de acción sistémica y la eficacia terapéutica y/o la toxicidad del mismo. Esto ha llevado a la realización de grandes esfuerzos por parte de investigadores del área farmacológica para establecer las ventanas terapéuticas (valores de concentración adecuados para el objetivo terapéutico) para muchos de los medicamentos actualmente utilizados [1, 2]. Sin embargo, a la hora de realizar un tratamiento, alcanzar estos niveles óptimos en todos los pacientes no es tarea sencilla. Son innumerables los factores que influyen en la reacción de un sujeto a un fármaco. Algunos de estos factores son, por ejemplo, la edad, los alimentos, el empleo concomitante de otros productos farmacéuticos u otras sustancias químicas (interacciones medicamentosas), la administración previa del mismo fármaco u otros semejantes (tolerancia), la enfermedad de órganos involucrados en la eliminación del medicamento y diversos factores genéticos que influyen en la cinética de absorción, metabolización, excreción y toxicidad de los medicamentos (farmacogenética). Esta realidad conocida como variabilidad biológica en la respuesta a un fármaco, impide predecir la concentración que alcanzará un medicamento en los fluidos biológicos luego de ser administrado a un determinado paciente [3–5]. Está demostrado que, frente a un mismo protocolo de tratamiento, diferentes pacientes alcanzarán diferentes niveles del fármaco o mantendrán esos niveles por mayor o menor tiempo (variabilidad biológica interindividual). Pero, además, las diferentes condiciones fisiopatológicas que puede atravesar un mismo individuo, harán que se altere su propia relación con el fármaco en distintos momentos del tratamiento (variabilidad biológica intraindividual). Para cierto tipo de fármacos, con ventanas terapéuticas estrechas, se presenta entonces la necesidad de realizar durante el tratamiento una determinación analítica de la concentración del fármaco en sangre, o en otro fluido biológico, para poder realizar una individualización del tratamiento, de manera que el mismo resulte seguro y eficaz para el paciente en particular.

La medición e interpretación del resultado de la concentración de drogas terapéuticas en los fluidos corporales, se denomina monitoreo terapéutico de drogas (MTD). También denominada

en algunos países de habla hispana como monitorización terapéutica de drogas, esta práctica resulta entonces, de gran valor para el control de algunos tratamientos farmacológicos. Mediante la combinación del conocimiento sobre el producto farmacéutico y de la farmacocinética-farmacodinamia del mismo, el MTD permite maximizar la eficacia de la droga, evitar la toxicidad, identificar razones potenciales de fallas terapéuticas y facilitar el ajuste individual de dosis en una variedad de entornos clínicos [6–8].

IV.1.1. Conceptos de farmacocinética y farmacodinamia

Para comprender y aplicar MTD para un fármaco particular, es importante conocer los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos del mismo y cómo estos parámetros se relacionan entre sí [9, 10].

La farmacocinética se ocupa de entender los cambios de la concentración de los fármacos en el organismo en función de la dosis y del tiempo transcurrido desde la administración de un producto farmacéutico. Básicamente, estudia los procesos que determinan la liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco, los cuales se denominan en su conjunto con las siglas LADME (**Fig. IV.1**). Estos procesos condicionan la concentración alcanzada en la circulación y su variación a lo largo del tiempo [1, 11].

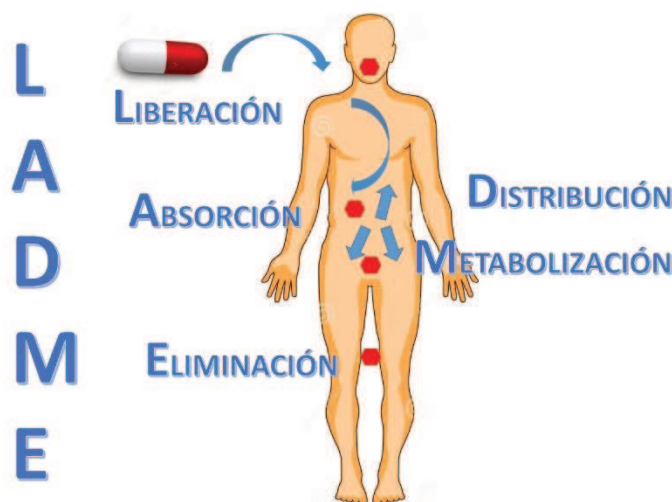


Figura IV.1: Procesos LADME: liberación, absorción, distribución, metabolización y eliminación de un fármaco.

Por otro lado, la farmacodinamia se encarga de comprender los efectos bioquímicos y fisiológicos de los fármacos y sus mecanismos de acción. Analiza entonces la relación entre la concentración del fármaco en el compartimiento de acción y el efecto biológico producido. Se sabe que, cuando el fármaco llega al sitio donde ejerce su acción, interactúa con receptores celulares y moleculares específicos y genera una así una respuesta farmacológica. Es así, que se asume que

existe una relación directa entre la cantidad del fármaco presente en el sitio de acción y la magnitud de su efecto farmacológico, por lo que se puede inferir que hay una concordancia entre las concentraciones del fármaco en el plasma y la magnitud el efecto farmacológico. En la mayoría de los casos, además, el efecto farmacológico fluctuará según la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas que se producen por los procesos LADME [1].

En la práctica, se suele utilizar entonces el curso temporal de las concentraciones plasmáticas de los fármacos para predecir su efecto. Se obtiene así una curva que describe las variaciones sufridas por la concentración del fármaco en el plasma desde su administración hasta su desaparición del organismo (**Fig. IV.2**). A partir de esta relación, se desprenden varios conceptos fundamentales, denominados parámetros farmacocinéticos [1, 11].

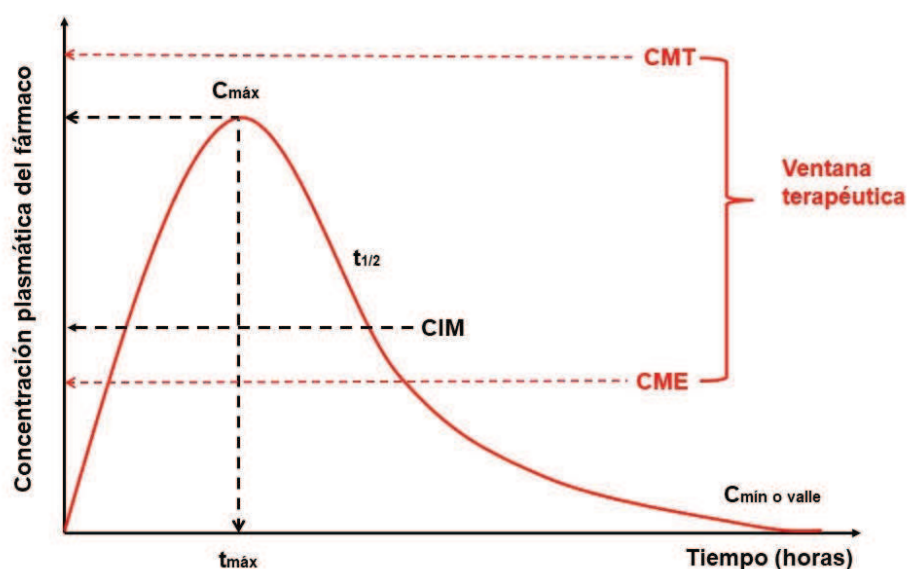


Figura IV.2: Evolución de la concentración plasmática del fármaco en función del tiempo. Concentración máxima alcanzada de un fármaco luego de la dosificación ($C_{máx}$), concentración inhibitoria mínima (CIM), concentración mínima o en valle ($C_{mín}$ o valle), concentración mínima tóxica (CMT), concentración mínima eficaz (CME), tiempo máximo ($t_{máx}$) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$).

En primer lugar, se puede definir el $t_{máx}$, que es el tiempo que transcurre desde que se administra un fármaco a un individuo hasta que llega a la $C_{máx}$, es decir, la concentración máxima alcanzada en plasma después de la dosificación. Estos parámetros dependen de varios factores, tales como la vía de administración, la absorción, la biodisponibilidad, el volumen de distribución y el aclaramiento. Por el contrario, la concentración mínima ($C_{mín}$), también conocida como concentración valle, representa el nivel mínimo de concentración que se alcanza al finalizar un intervalo de dosificación. Este parámetro se ve afectado, sobre todo, por los mecanismos de metabolización y distribución, entre otros. Por último, el tiempo de vida media o semivida ($t_{1/2}$) de un fármaco es el tiempo que tarda en eliminarse el 50% de la cantidad del fármaco en el plasma.

Este parámetro resulta útil para determinar los intervalos de dosificación necesarios para mantener la concentración plasmática del fármaco en el rango terapéutico.

Otros parámetros relacionados con el efecto del fármaco (en relación a la concentración plasmática) son la concentración mínima eficaz (CME), que hace referencia a la concentración por encima de la cual suele observarse el efecto farmacológico y la concentración mínima tóxica (CMT), que es aquella a partir de la cual comienzan aparecer los efectos tóxicos o adversos del fármaco. Estos parámetros pueden determinarse de diversas maneras mediante estudios de toxicidad in vitro, pero también en estudios in-vivo en animales e incluso en humanos durante las diferentes fases de los estudios clínicos en el desarrollo de nuevas drogas. El intervalo entre estos parámetros CMT y CME (ventana terapéutica) es aquel que optimiza la eficacia del medicamento y minimiza los efectos tóxicos o adversos.

Para brindar información farmacológica certera, estos parámetros se deben determinar en sistemas en estado de equilibrio o estado estacionario. Este estado se logra cuando la cantidad de fármaco que se elimina es igual a la cantidad de fármaco que se administra por unidad de tiempo. La relación entre estos conceptos es que el estado estacionario se alcanza cuando la concentración en valle se mantiene constante después de varias dosis del fármaco (**Fig. IV.3**) [1, 11].

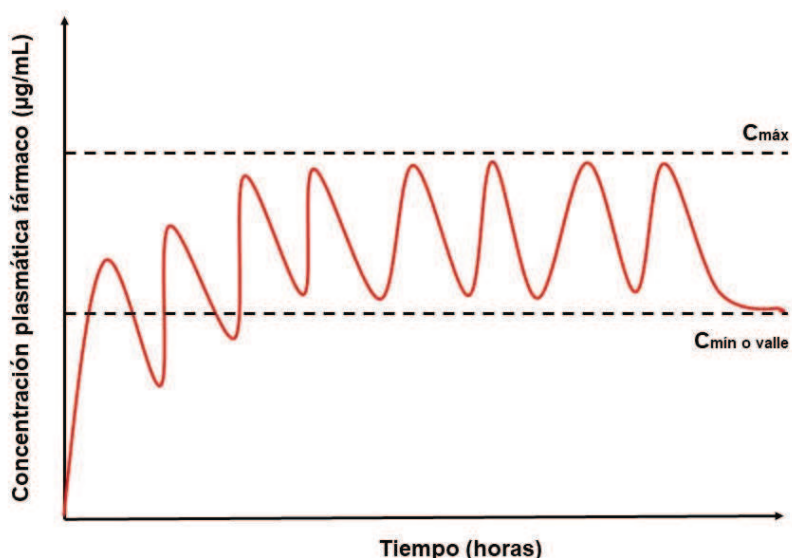


Figura IV.3: Curva de concentración plasmática de un fármaco vs. tiempo. En el estado estacionario tanto la $C_{\text{máx}}$ como la $C_{\text{mín}}$ se mantienen constante luego de varias administraciones de una dosis de fármaco.

En el caso de los antibióticos, cuyo target de acción es un microorganismo invasor, un parámetro importante a tener en cuenta en el tratamiento farmacológico es la concentración inhibitoria mínima (CIM). La CIM surge de los estudios de susceptibilidad de los microorganismos

a los antibióticos que se realizan mediante técnicas de antibiograma, cuyo objetivo es evaluar la respuesta de un microorganismo a la exposición a un antibiótico. De este modo, el antibiograma define la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo concreto y su resultado se utiliza como factor predictor de su eficacia clínica. Existen diferentes métodos para realizar el antibiograma, y en función del método usado los resultados de sensibilidad se expresarán como diámetro de halo (en mm) o como CIM (en $\mu\text{g/mL}$).

En la antibioterapia los índices pK/pD (del inglés, *pharmacokinetics/pharmacodynamics*) son parámetros que relaciona propiedades farmacocinéticas de un fármaco con sus propiedades farmacodinámicas. Estos índices son predictores de la eficacia de un tratamiento con un antibiótico determinado y están relacionados con la CIM para un microorganismo particular [12].

De esta manera, los índices pK/pD (**Fig. IV.4**) más utilizados son:

- **$C_{\text{máx}}/\text{CIM}$** : es la relación entre la máxima concentración alcanzada por el antibiótico y la CIM para el patógeno. Se considera un parámetro predictivo de eficacia para los antibióticos que actúan de forma dependiente de la concentración y se busca que $C_{\text{máx}}$ sea mayor a la CIM.
- **% t > CIM**: es % del tiempo entre una administración de dosis y la siguiente, durante el cual la concentración del antibiótico en el plasma es superior a la CIM para el patógeno. Se considera un parámetro predictivo de eficacia para los antibióticos que actúan de forma dependiente del tiempo y se busca que alcance un determinado % del tiempo interdosis.
- **ABC/CIM**: es la relación entre el área bajo la curva (ABC) de concentración plasmática versus tiempo (generalmente 24 horas) y la CIM para el patógeno. Se considera un parámetro predictivo de eficacia para los antibióticos que actúan tanto como concentración dependientes como para aquellos con propiedades intermedias entre tiempo y concentración-dependientes. Dependiendo del antibiótico, en general se busca que el ABC sea mayor a 100 o 125.

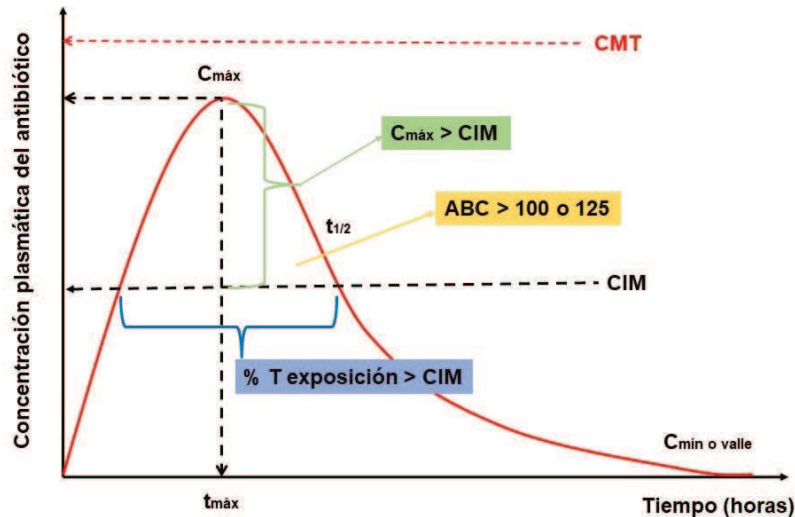


Figura IV.4: Evolución de la concentración plasmática del antibiótico en función del tiempo y parámetros pK/pD asociados. Concentración mínima efectiva (CMT), concentración máxima esperada luego de la dosificación del fármaco ($C_{máx}$), concentración inhibitoria mínima (CIM), área bajo la curva (ABC), porcentaje de tiempo de exposición del fármaco (% T exposición > CIM), concentración mínima o en valle (C_{min} o valle), tiempo máximo ($t_{máx}$) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$).

IV.1.2. Farmacoterapias que requieren MTD

Los fármacos que habitualmente requieren de monitorización durante el tratamiento incluyen citostáticos, antiepilépticos, inmunosupresores, antiarrítmicos, psicofármacos, antivirales y antibióticos [13–16].

Dentro de ellos, los antibióticos constituyen una problemática muy particular debido a la gran cantidad de resistencias microbianas que se están registrando en los últimos tiempos, generadas por el uso de dosis subterapéuticas de los mismos. Así es que, uno de los mayores desafíos para los infectólogos hoy en día es el tratamiento de infecciones invasivas por *Staphilococcus aureus* meticilin resistentes (SAMR), el patógeno multirresistente más prevalente en el mundo [17].

Incluso se registran actualmente cada vez más microorganismos como *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella spp* con resistencias a antibióticos potentes tales como los carbapenem, la vancomicina, las cefalosporinas y las fluoroquinolonas, lo que genera un serio problema de salud pública. Terapias más agresivas, con nuevos fármacos o multidroga, con un estricto MTD, son necesarias en estos casos [18–21].

El tratamiento de la tuberculosis con drogas como rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol, tanto como monoterapias o en forma combinada es otra área de gran atención en la actualidad en virtud del enorme problema de salud pública que constituye esta infección a nivel

mundial. Fallas terapéuticas y resistencia microbiana a estos fármacos se han detectado en los últimos años debido a una falta de control sobre los tratamientos utilizados [22–24].

Un estudio reciente de MTD para isoniazida y rifampicina ha demostrado que los niveles terapéuticos de este tipo de antibióticos aún no se han establecido adecuadamente, y que muchas veces los niveles plasmáticos alcanzados se encuentran por debajo o por encima de los valores recomendados por los protocolos actuales de tratamiento [25].

Por otro lado, las terapias oncológicas o quimioterapias están asociadas a la administración de fármacos citostáticos. Este tipo de fármacos reúnen varios de los criterios preestablecidos para aplicar MTD, tales como una elevada variabilidad farmacocinética inter e intra paciente, una relación definida entre la concentración en fluidos biológicos y el efecto farmacológico, y una ventana terapéutica estrecha. Tanto la toxicidad como la falta de eficacia terapéutica pueden atribuirse a las características inherentes del paciente o del tumor, pero también pueden atribuirse a una dosificación excesiva o insuficiente inadvertida. Por lo tanto, la administración de una dosis cuidadosamente ajustada para el paciente individual es un factor importante para aumentar la probabilidad de éxito del tratamiento [26, 27].

IV.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución

La implementación de MTD requiere contar con métodos analíticos adecuados que permitan determinar con exactitud las concentraciones plasmáticas de fármacos de interés en matrices complejas, tales como lo son las matrices biológicas. Para atender a este requerimiento, la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) acoplada a diferentes tipos de detectores presenta un desempeño altamente eficiente respecto de otras técnicas analíticas debido a su alta sensibilidad, selectividad y reproducibilidad.

Últimamente se han reportado en la literatura científica, varios métodos analíticos de alta complejidad que utilizan CLAR acoplada a detector de masas o masa/masa (CLAR-MS, CLAR-MS/MS) para la determinación de fármacos en fluidos biológicos o tejidos [28–32]. Si bien esta tecnología es de referencia y es altamente deseable en estudios de fase clínica por su elevada sensibilidad, no siempre se adapta a las necesidades de costo, simplicidad, disponibilidad y fácil acceso que requiere un MTD.

La cromatografía líquida con detector ultravioleta (CLAR-UV) se presenta, en cambio, como una excelente opción para un laboratorio clínico de mediana complejidad debido a su menor costo y más sencilla implementación. Teniendo como objetivo la transferencia al sistema sanitario local de los desarrollos logrados, en este trabajo de tesis se utilizó entonces esta técnica analítica.

IV.2.1. Conceptos fundamentales

La característica que distingue a la cromatografía de la mayoría de los métodos físicos y químicos de separación, es que, en esta, se ponen en contacto dos fases mutuamente inmiscibles, una fase estacionaria y otra móvil. La muestra se introduce en la fase móvil y es transportada a lo largo de la columna que contiene distribuida una fase estacionaria. Las especies químicas de la muestra experimentan interacciones repetidas entre ambas fases, repartiéndose entre las fases inmiscibles a lo largo de la corrida cromatográfica. El reparto entre las fases aprovecha las diferencias entre las propiedades físicas y/o químicas de los componentes de la muestra y las fases (móvil y estacionaria) involucradas. De esta manera, los analitos con mayor afinidad por la fase estacionaria serán más retenidos en la columna.

Cuando ambas fases se escogen en forma apropiada los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas en la fase móvil y al final del proceso eluyen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. Como resultado de este proceso de partición los analitos que tuvieron mayor afinidad con la fase estacionaria reportarán mayores tiempos de retención (t_r).

La columna de separación puede considerarse entonces como uno de los elementos principales del sistema cromatográfico, proporcionando versatilidad en los tipos de análisis que pueden realizarse en función de la composición y tipo de empaque de la fase estacionaria [33].

IV.2.2. Fases estacionarias

Los desarrollos en el área de la tecnología de fases estacionarias para cromatografía avanzan muy rápidamente en la actualidad y es así que existe hoy en día una amplia y novedosa variedad de partículas para CLAR en el mercado. Actualmente las columnas son exclusivamente del tipo empacadas, siendo la sílice el material de relleno más investigado y utilizado como soporte. La sílice se usa sola, sin modificar, o modificada con una amplia variedad de moléculas que le otorgan a la fase estacionaria diversas selectividades. El empaque de la sílice puede hacerse en forma monolítica o utilizando partículas de diferentes características. Las partículas se manufacturan mayormente en forma de micro-esferas porosas y no porosas, siendo las de naturaleza porosa las más ampliamente utilizadas. El tamaño y la forma de las partículas, el tamaño del poro, el tipo de unión de la fase estacionaria a la partícula, la densidad de carga, la presencia de silanoles residuales, así como la calidad del empaque de la sílice, pueden afectar significativamente la performance de la columna. Es por esto que numerosas empresas compiten en el mercado ofreciendo una amplísima variedad de novedosas fases estacionarias, las cuales a su vez están empacadas en diversos tamaños de columnas, posibilitando la resolución de

problemas analíticos en los que se necesitan separar compuestos de muy diversas propiedades fisicoquímicas.

Tradicionalmente las partículas de CLAR tienen un tamaño de 5 μm de diámetro, sin embargo, en las últimas décadas comenzaron a utilizarse partículas con diámetros más pequeños para mejorar la eficiencia en la separación. Dentro de ellas, las columnas con partículas “sub-2 μm ” son las que más aparecen en la literatura. De altísima eficiencia y velocidades de separación, la principal desventaja que presentan es que generan altas presiones que superan los límites aceptables para los instrumentos convencionales [34]. Es así que, en los últimos años, y como una propuesta intermedia, se han desarrollado columnas compuestas por micro-esferas sólidas, generalmente de sílice, cubiertas con una capa de fase estacionaria modificada porosa. Estas partículas fueron llamadas “core-shell” (núcleo sólido y cubierta porosa superficialmente). Además de no generar problemas de altas presiones, proveen una mayor superficie de contacto con el analito, permitiendo así separaciones altamente eficientes [35, 36].

En cuanto a la composición de la fase estacionaria, sin dudas las más utilizadas en la determinación de fármacos son las de cadenas hidrocarbonadas unidas a sílice, tales como el octilsilano (C8) y el octadecilsilano (C18). Utilizadas en innumerables métodos de las farmacopeas para el control de calidad de materias primas y productos farmacéuticos, son también de gran utilidad para la determinación de fármacos en muestras biológicas. Estas fases estacionarias, pertenecientes al grupo de las llamadas fases reversas, separan los analitos principalmente por la fuerza de las interacciones hidrofóbicas con las estructuras no polares de las moléculas.

Sin embargo, cuando se deben separar compuestos de muy diferentes propiedades químicas y que se encuentran en una matriz compleja tal como es una matriz biológica, a veces es necesario recurrir a fases estacionarias que ofrezcan más de un mecanismo de interacción con los analitos. Es aquí donde nuevas fases estacionarias funcionalizadas con diferentes grupos polares tales como dioles, fenilos, cianuros, amidas o zwitteriones, proporcionan mecanismos adicionales de separación basados en interacciones hidrofílicas, iónicas y puentes de hidrógeno, ofreciendo una muy amplia y valiosa alternativa para el desarrollo de métodos analíticos de alta eficiencia.

IV.2.3. Preparación de muestras biológicas

Un etapa crítica en el desarrollo de métodos bioanalíticos (se llama así a los métodos destinados a determinar fármacos en muestras biológicas), es la preparación de las muestras, ya que la misma influye en la exactitud, la sensibilidad, la reproducibilidad y en los demás parámetros de rendimiento del método, y por lo tanto en la calidad de los resultados emitidos.

Las muestras biológicas son, en general, muy complejas debido al contenido de proteínas, lípidos, sales, ácidos, bases y numerosos compuestos orgánicos con propiedades químicas similares a los analitos (fármacos que se deben cuantificar). Además, habitualmente los analitos están en bajas o muy bajas concentraciones. Por lo tanto, la preparación previa de la muestra es necesaria para extraer los analitos separándolos, en lo posible de componentes mayoritarios sin diluir significativamente su concentración, con el fin de favorecer la sensibilidad y selectividad instrumental. Particularmente para el análisis de fármacos en plasma (matriz biológica utilizada en la presente tesis) se aplican usualmente diversos procedimientos de preparación de muestras, incluyendo precipitación de proteínas (PP), la extracción líquido-líquido (ELL), la extracción en fase sólida SPE (por sus siglas en inglés, *solid phase extraction*) y la microextracción en fase sólida SPME (por sus siglas en inglés, *solid phase microextraction*), entre otras. Cada una de estas técnicas se puede aplicar sola o en combinación con otras [37].

A continuación, se describen los procedimientos aplicados para la preparación de muestra llevadas a cabo en la presente tesis.

- **Precipitación de proteínas**

En el análisis de fármacos en plasma por CLAR se deben eliminar las proteínas plasmáticas antes de un proceso de extracción adecuado debido a que, en contacto con la fase móvil las mismas precipitan y pueden producir taponamientos tanto en los capilares del cromatógrafo como en la columna.

Generalmente, en la desproteínización de las muestras biológicas se utilizan solventes orgánicos miscibles en agua, ácidos orgánicos y sales iónicas [38].

Los solventes orgánicos como el metanol, acetona, acetonitrilo y etanol han sido ampliamente utilizados en bioanálisis debido a su compatibilidad con las fases móviles utilizadas en CLAR. Estos solventes actúan disminuyendo la solubilidad de las proteínas y tienen una efectividad inversamente proporcional a su polaridad. Por otro lado, las proteínas que están en su forma catiónica a pH bajos forman sales insolubles con los ácidos. Para la desproteínización en medio ácido, soluciones de 5-20 % de los mismos generalmente son suficientes y los mejores resultados pueden obtenerse utilizando los reactivos fríos. Ácidos tales como el tricloroacético (TCA) y el perclórico (AP) son muy eficientes para este fin [38].

Los procedimientos de desnaturalización de las proteínas también incluyen el efecto salino, pues la mayoría de las proteínas son menos solubles a concentraciones elevadas de sal. La concentración de sal a la cual una proteína precipita difiere de una proteína a la otra, siendo la más utilizada el sulfato de amonio.

- **Extracción líquido-líquido**

Esta técnica, basada en el reparto de un compuesto entre dos líquidos inmiscibles en función de su coeficiente de distribución, resulta también de gran interés en el pre-tratamiento de muestras de plasma para las determinaciones bioanalíticas.

Cuando el analito es no polar, el uso de un solvente hidrofóbico es útil para la extracción del mismo, aislándolo de compuestos polares del plasma y en algunos casos se logra también pre-concentrarlo incluyendo una etapa de evaporación del solvente.

En el caso de analitos más polares, la ELL en muestras desproteinizadas con solventes aporta la ventaja de extraer los lípidos del plasma, dejando una muestra más limpia y menos dañina para los componentes del instrumento; a la vez que logra la re-extracción del solvente usado para la PP, por lo que se consigue también una pre-concentración del analito [37].

IV.3. Calidad por diseño en el desarrollo de métodos analíticos

El desarrollo de un nuevo método analítico por CLAR implica el manejo de muchas variables, tanto en la etapa pre-analítica, es decir en la preparación de la muestra, como en la etapa cromatográfica, la cual incluye el establecimiento de la composición de la fase móvil, el pH, la velocidad de elución y la temperatura, entre otras variables. Considerando esta gran cantidad de factores que influyen en el sistema cromatográfico, es habitual que, al desarrollar un método para el análisis de una muestra compleja, se requiera de la aplicación de un procedimiento de optimización mediante la aplicación de diseño experimental para lograr un buen desempeño del mismo. Es así que, el concepto de calidad por diseño, QbD (de sus siglas en inglés, *Quality by Design*) utilizado desde hace tiempo en la industria farmacéutica para mejorar la robustez de los procesos de manufactura, se ha extendido al desarrollo de los métodos analíticos con el objetivo de optimizar su desempeño y confiabilidad [39, 40].

El término calidad analítica basada en el diseño, AQbD (de sus siglas en inglés, *Analytical Quality by Design*) deriva de los principios de QbD y hace referencia a la aplicación de esos principios o conceptos en la gestión del ciclo vida de los métodos analíticos permitiendo la incorporación de calidad desde el diseño de los mismos. Es decir, resalta la importancia de enfoques científicos sólidos y de una gestión de calidad de riesgos para el desarrollo, control, establecimiento y uso de los métodos analíticos[41].

Definida en un artículo de estímulo por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) en el año 2013, la AQbD ha comenzado lentamente a implementarse en la industria para los métodos analíticos utilizados en el control de calidad de materias primas y productos farmacéuticos,

encontrándose hoy varias publicaciones científicas que lo demuestran. Sin embargo, en el área de los métodos bioanalíticos este enfoque prácticamente no se ha aplicado hasta el momento.

En la presente tesis se exploró la utilidad de aplicar las herramientas de AQbD en el ciclo de vida de métodos bioanalíticos empleados para el MTD.

IV.3.1. Gestión del ciclo de vida de un método analítico y conceptos de AQbD

El enfoque analítico de la gestión del ciclo de vida del método establecido por el capítulo 1220 de la USP [42] y alineado con la ICH Q14 [43], es un enfoque holístico que abarca todas las actividades, desde el desarrollo de métodos hasta la validación, control y el uso rutinario. Enfatiza la importancia de contar con enfoques científicos sólidos y una gestión de riesgo de calidad para todas las etapas de la vida de un método.

El ciclo de vida de un método analítico se basa en la definición y el alcance de un perfil del objetivo analítico (ATP, del inglés *Analytical Target Profile*) a través de tres etapas: diseño del método (etapa 1), calificación del desempeño del método (etapa 2) y verificación continua del desempeño del método (etapa 3) (**Fig. IV.5**). A partir de la definición del ATP, todas las etapas subsecuentes deben tener un sentido congruente y es así que se logra obtener un concepto de calidad analítica que va más allá de la aptitud del método para el uso previsto (definición clásica de calidad analítica) [41].

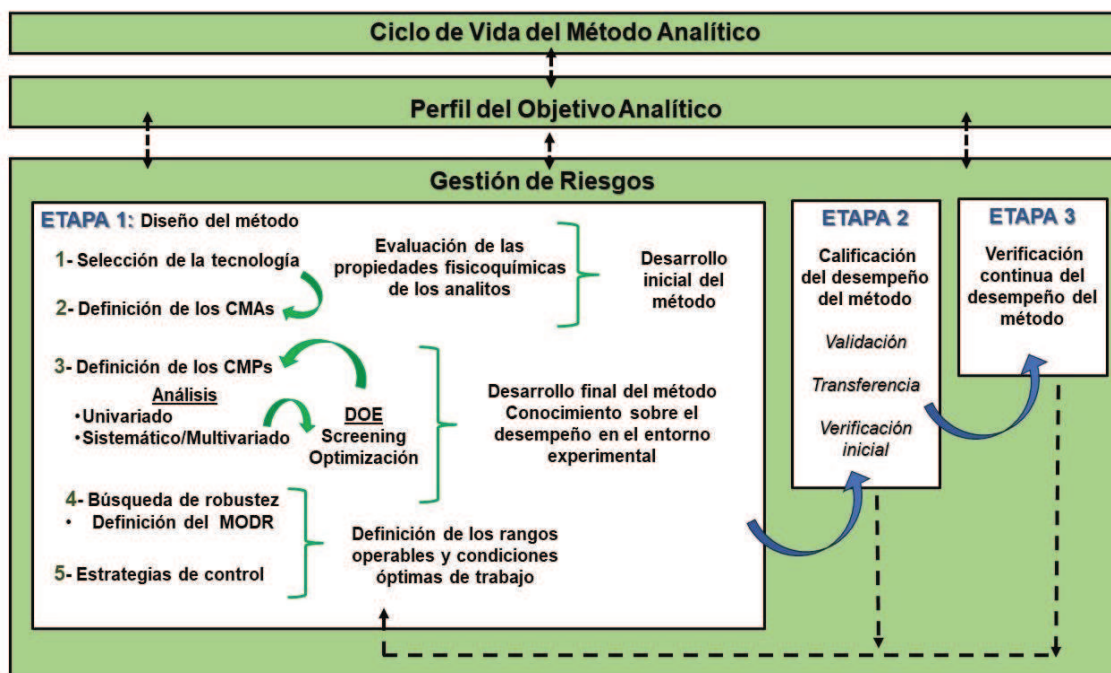


Figura IV.5: Ciclo de vida del método analítico y elementos claves involucrados. Atributos críticos del método (CMA, del inglés *critical method attribute*). Parámetros críticos del método (CMP, del inglés *critical method parameter*), Diseño y optimización de experimentos (DOE). Región del diseño operable del método (MODR, del inglés, *method operable design region*).

En las secciones siguientes se describen los elementos claves involucrados en la gestión del ciclo de vida de un método y sus características más relevantes.

IV.3.1.1. Perfil del objetivo analítico

El ATP es un componente fundamental del enfoque del ciclo de vida, y su definición es el primer paso en el marco de la AQbD. Concretamente es una prospectiva del desempeño deseado de un método analítico, y define la calidad requerida del valor informable. En otras palabras, proporciona la definición del alcance del método, especifica los requisitos de calidad del resultado a informar y define los requisitos para las características de desempeño del método que están vinculadas a la aplicación prevista.

Idealmente, la definición es independiente de la tecnología a utilizar para el desarrollo del método; sin embargo, en algunos casos puede ser necesario vincularlo directamente a una técnica analítica concreta.

Considerando que es necesario establecer los requisitos de calidad del valor que se informa en concordancia con el uso previsto, generalmente incluye en la definición del ATP el error analítico total máximo admisible teniendo en cuenta el nivel aceptable de riesgo a tomar una decisión incorrecta a partir del resultado informado. Se establecen, por lo tanto, requerimientos para el

sesgo (como medida de la veracidad o error sistemático) y para la variabilidad analítica (como medida de precisión o error aleatorio) o directamente para la evaluación conjunta de estos parámetros como medida de la exactitud o error total.

En su definición se pueden incluir también otros aspectos de calidad analítica tales como el tiempo de ejecución del análisis, el costo y el impacto ambiental que genera su uso.

Otro aspecto importante a destacar es que el ATP sirve como base para los criterios de calificación de desempeño del método (etapa 2) y proporciona una guía que facilita el seguimiento del rendimiento durante su uso rutinario (etapa 3).

IV.3.1.2. Gestión de riesgos de la calidad

La gestión de riesgos de la calidad (QRM, de sus siglas en inglés, *Quality Risk Management*) está involucrada a lo largo de todo el ciclo de vida del método analítico y respalda la justificación científica para la toma de decisiones. Es un proceso sistemático para la evaluación, control, comunicación y revisión del riesgo para la calidad del valor informable a lo largo del ciclo de vida del método analítico [41, 44].

Los principales objetivos de la aplicación de QRM son los siguientes:

- Evaluación de las condiciones analíticas del método y la identificación de fuentes de sesgo y variabilidad.
- Adquisición de conocimientos para el diseño de controles apropiados sobre los parámetros del método analítico y atributos de calidad con el objetivo de optimizar el desempeño, minimizar o incluso eliminar los riesgos que asegurarán que el método cumpla con el ATP y otros requisitos de desempeño definidos.
- Permitir la gestión continua del conocimiento y la mejora de la calidad al garantizar que el procedimiento es apto para su uso a lo largo de su ciclo de vida incrementando la confianza en la toma de decisiones en base al resultado informable.

Para lograr los propósitos del proceso de QRM se puede aplicar una variedad de herramientas, ya sea solas o en combinación. También es posible aplicarlas más de una vez durante el ciclo de vida del método.

La gestión de riesgos de la calidad incluye los siguientes pasos [41, 45]:

- **Identificación del riesgo:** Consiste en identificar sistemáticamente todas las variables asociadas al procedimiento analítico que pueden tener influencia en los atributos críticos del método (CMA, del inglés *critical method attribute*) (ver sección **IV.3.1.3.1**). Esta etapa debe incluir todos los aspectos del procedimiento analítico completo, es decir, muestreo, reactivos, preparación

de la muestra y estándares de referencia, instalaciones y condiciones de operación del equipo, estrategia de calibración y replicación, y cálculos de los resultados informables, entre otros. Se puede utilizar un mapa del procedimiento preliminar para ordenar las variables identificadas en una lista, una tabla o un diagrama de Ishikawa (también conocido como diagrama de espina de pescado). Para sistemas complejos, puede resultar útil dividir el proceso en pasos.

- **Análisis de riesgos:** en base a los conocimientos previos y a una evaluación preliminar del procedimiento, se pueden tomar decisiones sobre cuáles de las variables identificadas previamente representan o no un riesgo real. Por lo tanto, este paso del proceso tiene como objetivo seleccionar, de las muchas variables identificadas, aquellas cuyo impacto en los CMAs deberá evaluarse experimentalmente para poder conocer su efecto real. Este proceso se puede realizar de manera cualitativa o cuantitativa utilizando una variedad de herramientas de análisis de riesgos, como el método CNX (Control, Ruido, eXperimental); mapas de riesgo o de calor (del inglés, *Heat-map*); análisis de modos y efectos de fallas (FMEA, del inglés, *Failure Mode and Effect Analysis*); análisis modal de falla, efectos y criticidad (FMECA, del inglés *Failure Modes, Effects and Criticality Analysis*); y análisis de árbol de fallas (FTA, del inglés, *fault tree analysis*), entre otros.

- **Evaluación de riesgos:** esta es una etapa experimental que permite clasificar las variables en función de la magnitud de sus efectos sobre los CMAs. Esta nueva clasificación se puede conseguir mediante la metodología de superficie de respuesta, aplicando diseños de experimentos como se detalla en la sección **IV.3.1.4**. En esta etapa se genera conocimiento que permite determinar cuáles de las variables del procedimiento experimental impactan mayormente sobre el ATP. De esta manera, las variables que ponen en riesgo el alcance del ATP se definen como parámetros críticos del método (CMP, del inglés *critical method parameter*) (ver sección **IV.3.1.3.2**)

- **Control y revisión de riesgos:** esta etapa implica la toma de decisiones para reducir o para aceptar un determinado nivel de riesgo conocido. La reducción del riesgo puede incluir acciones para reducir la gravedad y la probabilidad y/o mejorar la detectabilidad del mismo. Por otro lado, implica encontrar los niveles más convenientes de las variables del método para alcanzar los requerimientos establecidos para los CMAs y establecer los controles apropiados para garantizar que esto cumpla con el uso rutinario del método.

El proceso QRM es secuencial e iterativo; por lo tanto, si no es posible un control adecuado de los CMPs bajo ciertas condiciones propuestas, es posible que sea necesario rediseñar el procedimiento analítico o implementar cambios adecuados. Si el riesgo no se puede eliminar por completo, existe un cierto grado de riesgo residual que debe ser aceptado. La estrategia de control del método tiene como objetivo reducir y mantener el riesgo residual en niveles aceptables,

mientras que la revisión periódica del riesgo debe ser parte del proceso de monitoreo de procedimientos de rutina [45].

IV.3.1.3. Etapa 1: Diseño del método

El inicio de esta etapa incluye, como primer paso, la selección de la tecnología a utilizar. Se puede seleccionar cualquier técnica analítica que sea capaz de cumplir los criterios del ATP. Generalmente, proporciona una gran ayuda contar con conocimientos previos pertinentes sobre la técnica seleccionada, como así también sobre las propiedades físicas y químicas de los analitos, la información procedente de bibliografía científica y cualquier método existente para el análisis del mismo tipo de analitos.

Una vez seleccionada la tecnología y recopilada toda la información pertinente es necesario enfocarse en la adquisición y comprensión sobre cómo los parámetros o variables del método afectan o impactan sobre los atributos de calidad establecidos en el ATP. Como se mencionó anteriormente, este objetivo se logra mediante la generación de información experimental que permita obtener modelos matemáticos predictivos para la identificación de condiciones analíticas óptimas. Para concretar este objetivo se utilizan dos tipos de enfoques [41]:

- Enfoque mínimo (también conocido como enfoque tradicional) [43]: normalmente incluye el desarrollo de métodos utilizando el enfoque de un factor a la vez (OFAT, del inglés, *one-factor-at-a-time*) (experimentos univariado), donde las características de rendimiento del método se evalúan en función del estudio de los parámetros modificados uno a la vez. Esta estrategia aporta una probabilidad reducida de diseñar controles apropiados para garantizar la idoneidad para su uso y optimizar el desempeño del procedimiento.
- Enfoque mejorado: Enfoque sistemático y multivariado para evaluar el impacto de los parámetros del procedimiento en el desempeño donde múltiples factores generalmente varían simultáneamente con el objetivo de evaluar los efectos principales y de la interacción de los factores, amplificando la extensión del conocimiento adquirido y la probabilidad de identificar riesgos y fuentes de variabilidad. Este enfoque enfatiza la importancia del QRM y el establecimiento de un plan de gestión de cambios en el ciclo de vida, lo que permite una gestión más integral de riesgos y conocimientos, facilitando el establecimiento de condiciones optimizadas y sólidas y estrategias de control analítico adecuadas.

IV.3.1.3.1. Atributos críticos del método

Concretamente, los CMAs son variables de salida del proceso analítico (respuestas) que reflejan la calidad del método y están relacionados con la selectividad, precisión, sensibilidad y

veracidad (recuperación y/o sesgo) del método. Por ejemplo, en los métodos cromatográficos, los requisitos de sensibilidad se pueden traducir a la magnitud de los parámetros relacionados con la señal analítica, como la altura, el área o la relación señal-ruido de los picos del analito. Las demandas de selectividad pueden monitorearse a través de variables que evalúan la separación adecuada entre picos adyacentes, como las resoluciones (R_s) o el factor de separación (α), mientras que el factor de cola (T), el factor de retención (k) y el número de placas teóricas (N) se pueden evaluar para garantizar una buena forma de pico, lo que está relacionado con la precisión y la selectividad. Finalmente, el tiempo de ejecución se puede adoptar como un CMA que se correlaciona con las propiedades analíticas relacionadas con la productividad. Una vez que se seleccionan los CMAs, se deben establecer valores objetivo o rangos aceptables para que los CMAs respalden las siguientes actividades de desarrollo del método y definan la estrategia de control [45].

IV.3.1.3.2. Parámetros críticos del método

Los CMPs son variables de entrada (factores) del método cuya variabilidad tiene un impacto directo y significativo sobre los CMAs y conviven con otros factores de menor impacto. Es así que luego de un análisis de riesgos, los factores de un método se pueden clasificar en "críticos" y "no críticos" y a su vez pueden ser [42, 45]:

- Factores relacionados con la preparación de la muestra, como, por ejemplo, reactivos, disolventes, etc.
- Factores del método analítico como, por ejemplo, configuración de los equipos e instrumentos.
- Factores ambientales como, por ejemplo, la luz, la humedad o la temperatura.

Además, los factores pueden ser clasificados como "controlables" o "no controlables" sin perder de vista que todos ellos pueden afectar la calidad del resultado analítico.

El conocimiento teórico y experimental del sistema permite obtener modelos que describen el proceso en el que las respuestas (y) dependen de los niveles de los factores (x) (**Fig. IV.6**) [41].

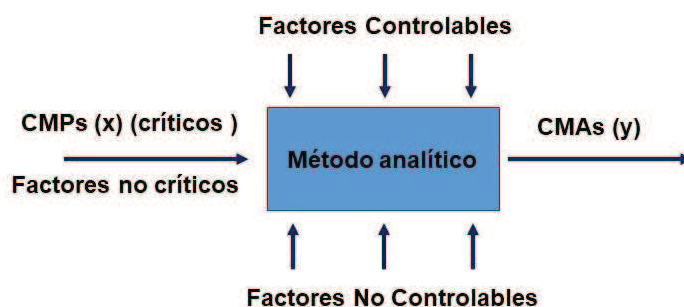


Figura IV.6: Tipos de factores (x) y su relación con las respuestas (y).

IV.3.1.3.3. Región del diseño de operabilidad de método, espacio de control y punto óptimo de trabajo

Con el objetivo de proporcionar un alto grado de comprensión sobre las fuentes de variabilidad que afectan la veracidad y la precisión es requisito evaluar la robustez del método. La robustez refiere a una medida de la capacidad para cumplir con los requisitos de desempeño esperados durante el uso normal y generalmente se evalúa mediante variaciones deliberadas de los parámetros del método analítico [42, 43]. Para establecerla es necesario definir la región del diseño operable del método (MODR, del inglés, *method operable design region*) el cual se define como una combinación multidimensional de los parámetros de método donde se ha demostrado que todas las combinaciones e interacciones de factores estudiados proporcionan un rendimiento medio y una solidez aceptables. En otras palabras, cualquier combinación de los CMPs dentro del MODR garantiza que se cumpla el ATP y, por lo tanto, proporciona garantía de la calidad del valor medido (Fig. IV.7) [46].

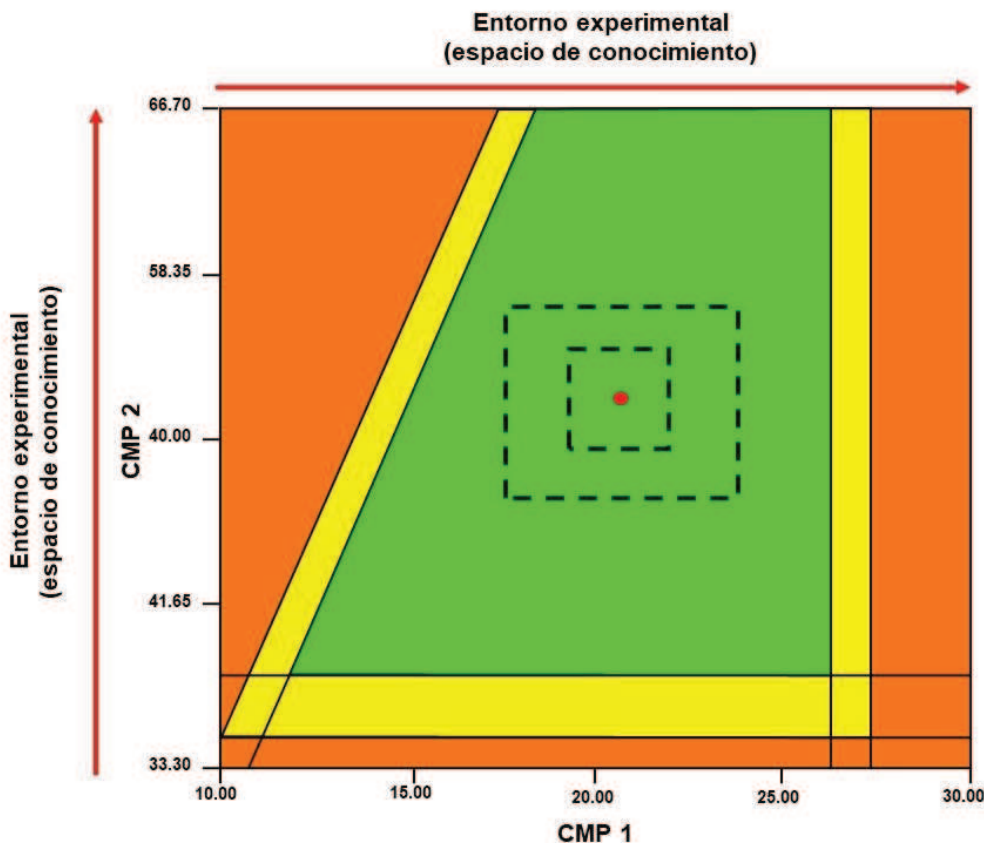


Figura IV.7: Representación gráfica del entorno experimental delimitado por los niveles evaluados para cada CMP. La región de desempeño no aceptable se muestra en color naranja. En verde se observa la región que representa el MODR y en amarillo su intervalo de incertidumbre. Los posibles espacios de control se representan entre líneas discontinuas. El punto rojo señala el OWP.

Como se muestra en la **Figura IV.7** el MODR se establece dentro de un entorno experimental, comúnmente llamado espacio de conocimiento, es decir el espacio en el que se conoce cómo se comportan los CMAs cuando se combinan diferentes valores de los CMPs. Dentro de ese entorno experimental se puede identificar “región de desempeño no aceptable” en donde los CMAs no cumplirán con las especificaciones establecidas. La región en la que los CMAs se encuentran dentro de las especificaciones es lo que se establece como MODR. Los límites de incertidumbre del MODR pueden representarse como intervalos de confianza, de predicción o de tolerancia predefinidos y proporcionan una evaluación de la robustez del método teniendo en cuenta la variabilidad analítica, dada a su vez tanto por la variabilidad de los CMPs como de los CMAs. Otra forma de establecer el MODR es mediante la utilización de modelado bayesiano o simulaciones de Montecarlo que evalúen la propagación de la variabilidad a un determinado nivel de confianza y de riesgo [46].

En la **Figura IV.7**, se observan, además, diferentes rectángulos en líneas discontinuas que representan posibles espacios de control (ECs). Estos ECs son entornos experimentales simétricos definidos dentro del MODR en los que se conformará la estrategia de control del método. La validación del EC seleccionado puede realizarse también de manera estadística mediante simulaciones de Monte Carlo o experimentalmente utilizando diseños experimentales adecuados.

Finalmente, el punto de color rojo mostrado en la figura dentro del EC, es denominado punto óptimo de trabajo (OWP, de sus siglas en inglés, *optimal working point*) siendo una combinación operativa de los CMPs seleccionada para llevar a cabo la etapa 2 del ciclo de vida del método y el uso de rutina del mismo. Este punto puede elegirse en función de la conveniencia operativa o de criterios estadísticos, siempre que se encuentre en una zona robusta dentro del EC [45, 46].

IV.3.1.3.4. Estrategia de control

La última actividad de la etapa 1 consiste en la definición de la estrategia de control, la cual garantiza el desempeño del método analítico y la calidad del resultado medido en el uso rutinario [42, 43]. Consiste en un conjunto de controles necesarios para garantizar que el procedimiento analítico funcione como se espera y desempeña un papel clave para garantizar que se cumpla el ATP durante todo el ciclo de vida. Incluye parámetros del procedimiento analítico que necesitan control y la prueba de idoneidad del sistema (SST, del inglés *system suitability test*) que forman parte de la descripción del procedimiento analítico. La comprensión de las principales fuentes de variabilidad dentro de un procedimiento analítico se puede utilizar, además, para desarrollar una

estrategia de replicación [47] donde los factores del procedimiento que contribuyen a una gran parte de la variación general se pueden replicar para mejorar la precisión[48].

IV.3.1.4. Diseño y optimización de experimentos

En el marco del AQbD, el diseño y optimización de experimentos (DOE), tiene como objetivos principales la identificación de los CMPs, la evaluación de la magnitud de sus efectos sobre los CMAs y la selección de las condiciones operativas óptimas, es decir, la definición del MODR. Su utilización, por lo tanto, es fundamental la durante la etapa 1 del ciclo de vida de un método analítico.

El DOE, una herramienta muy conocida en el ámbito de las ciencias experimentales, se podría definir como la aplicación del método científico para generar conocimiento acerca de un sistema o proceso por medio de pruebas planteadas adecuadamente. Esta metodología se ha ido consolidando como un conjunto de técnicas estadísticas y de ingeniería, que permiten entender mejor situaciones complejas de relación causa-efecto [49]. Así, mediante la elaboración de modelos matemáticos, el diseño experimental logra extraer la máxima cantidad de información de los datos con un mínimo número de pruebas experimentales [50].

Brevemente, para aplicar correctamente DOE es necesario considerar las siguientes etapas [51–55]:

1. Formular correctamente el problema, definiendo el objetivo de los experimentos. Es decir, establecer claramente y con fundamento que es lo que se quiere optimizar, por ejemplo: la separación cromatográfica, la sensibilidad del método, el tiempo de análisis, etc. En base a este objetivo se elegirán las variables más convenientes a evaluar, por ejemplo: resolución entre picos, área de pico, tiempo de retención, etc. A estas variables (variables dependientes), que serán sujeto del procedimiento de optimización, se las denomina de manera genérica “respuestas” y en el ámbito de la AQbD constituyen los CMAs.

2. Identificar cuáles son los factores (variables independientes) que podrían tener un efecto sobre el comportamiento de las respuestas a optimizar. Tal como se vio, el número de factores a considerar cuando se trata de optimizar un método cromatográfico puede llegar a ser muy grande. Es necesario aplicar entonces un mecanismo de selección de factores que permita establecer cuáles de todos ellos son los que tienen un efecto más significativo sobre la respuesta. En el ámbito de la AQbD estos factores constituyen los CMPs, ya que son aquellos que ponen en riesgo la calidad del método analítico.

3. Seleccionar los factores en función de los efectos sobre las respuestas. El mecanismo de selección de factores puede ser básicamente de dos tipos. El primero de ellos es aquel que se

basa en conocimientos del sistema, ya sea por fundamentación teórica, experiencias previas o por información recabada en la literatura. Para CLAR se han desarrollado incluso modelos capaces de predecir los parámetros de retención de compuestos ionizables en función del pH, la composición de la fase móvil y la temperatura [56–60]. La disponibilidad de recursos y el interés particular del analista puede también ser un parámetro de selección. El segundo mecanismo consiste en la aplicación de diseños experimentales de screening también conocidos como diseños de selección de factores. Estos diseños son de primer orden y dentro de ellos, los diseños Factorial Completo (DFC), Factorial Fraccionado (DFF) y Plackett y Burman (DPB) son muy utilizados en esta etapa porque son muy económicos y eficientes. Estos diseños permiten determinar cuáles son, entre todos los factores potencialmente considerables, aquellos que influyen más significativamente en las respuestas calculando el efecto de los mismos. El efecto de un factor se define como el cambio en la respuesta producida por un cambio en el nivel del factor y se conoce como efecto principal porque se refiere a los factores de interés fundamentales del experimento. Dependiendo del diseño empleado se pueden determinar también, en algunos casos, los efectos de las interacciones entre dos factores. Mediante cualquiera de las dos estrategias se logra circunscribir el problema al análisis de un número más reducido de factores, los más significativos, generalmente de dos a cuatro. Los factores que no serán estudiados en la etapa de optimización deben controlarse perfectamente bien y mantenerse siempre en un nivel fijo.

4. Encontrar las condiciones operativas óptimas, las cuales en el ámbito de la AQbD se identifican con el MODR. Para esto es necesario, en primer lugar, definir el rango en que se estudiará cada factor y el tipo de diseño experimental que se empleará. El rango está establecido por los niveles máximos y mínimos a ensayar para cada factor y se selecciona en base al conocimiento previo del sistema, los resultados de los experimentos de selección de factores y fundamentalmente las restricciones de la técnica que se está empleando. Los rangos seleccionados definen el dominio experimental. En cuanto al diseño a emplear en esta etapa, el mismo debe seleccionarse entre los diseños de segundo orden, conocidos también como diseños de optimización, que son aquellos que responden a la Metodología de la Superficie de Respuesta (MSR) que se describe en la sección **IV.3.1.5**. En segundo lugar, se deben llevar a cabo los experimentos y obtener los valores de las respuestas. Los experimentos que surgen del diseño programado se realizan en una secuencia aleatoria de manera de minimizar el efecto de los factores no controlados. Si el número de experimentos a realizar excede la cantidad posible a realizar durante un mismo día o secuencia de trabajo, los experimentos pueden realizarse en bloques, es decir grupos de experimentos que mantienen cierta estructura dentro del diseño. Cada bloque se realiza en una secuencia o día distinto de trabajo. Cuando se trabaja de esta manera es

necesario evaluar el efecto del bloqueo al realizar la evaluación de los modelos. Generalmente es también recomendable hacer réplicas del punto central y/o de otros puntos del diseño a los fines de estimar el error o variabilidad de los coeficientes. En esta etapa es sumamente necesario evitar errores experimentales, ya que los mismos puedan anular la validez de los resultados.

5. Analizar los datos obtenidos, construir y evaluar los modelos. Después de ejecutar los experimentos y obtener los resultados para las respuestas en estudio, se construye para cada una de ellas un modelo polinomial. Este modelo debe ser capaz de describir la relación entre la respuesta y los factores estudiados. La validez de estos modelos deberá comprobarse estadísticamente como se describe más adelante.

6. Localizar el óptimo para la respuesta y determinar cuáles son los valores de los factores necesarios para alcanzarlo. La localización del óptimo para una única respuesta, en general no es demasiado complicada y suele lograrse mediante el estudio de las gráficas de contorno o las gráficas tridimensionales de la superficie de respuesta. Sin embargo, cuando se necesita optimizar más de una respuesta simultáneamente debe utilizarse una estrategia de optimización multirrespuesta como el uso de la Función Deseabilidad de Derringer que se describe la sección **IV.3.1.6.**

IV.3.1.5. Metodología de la superficie de respuesta

Desarrollada por Box y sus colaboradores en la década de 1950, la MSR utiliza una serie de técnicas matemáticas y estadísticas para la construcción de un modelo que responde al ajuste de una ecuación polinomial de los datos experimentales [61]. Este modelo debe ser capaz de describir adecuadamente el comportamiento de dichos datos con el objetivo de realizar predicciones estadísticas. El nombre de la metodología se debe a la perspectiva gráfica que se genera luego del ajuste matemático del modelo. Cuando una o varias respuestas son dependientes de la influencia de varios factores, esta metodología resulta sumamente útil para lograr la optimización simultánea de los niveles que deben alcanzar estas variables para obtener un rendimiento óptimo del sistema [62]. Esta metodología supone estudiar cada factor en tres o más niveles a los fines de modelar la curvatura del sistema y existen varios tipos de diseños distintos para llevarlo a cabo. La elección de uno u otro diseño dependerá básicamente del número de factores a optimizar, del entorno experimental y de la eficiencia y complejidad de cada uno de ellos.

Los diseños empleados para modelar una superficie de respuesta de segundo orden deben cumplir básicamente con dos requisitos [53]:

1. Involucrar al menos tres niveles para cada factor (k).
2. Poseer al menos $1+2k+k(k-1)/2$ puntos experimentales que es el número de coeficientes del modelo que deberá construirse.

Además de estas condiciones indispensables, las características más buscadas en los diseños experimentales que se emplean en esta metodología son [63]:

- Proporcionar un buen ajuste del modelo a los datos.
 - Permitir investigar la idoneidad del modelo matemático, incluyendo la falta de ajuste.
- Proporcionar una estimación de error puro.
- Proporcionar una distribución razonable de puntos de datos, y por lo tanto de información, en toda la región de interés.
 - No requerir demasiados niveles para cada factor.
 - Permitir la realización de experimentos en bloques.
 - Ser fácil de interpretar y llevar a cabo.
 - Asegurar la posibilidad de calcular todos los coeficientes requeridos para el modelo.
 - Ser robusto frente a la presencia de resultados anómalos (outliers) dentro de los datos.
 - Tener rotabilidad, es decir la propiedad de predecir las respuestas con una variancia que sea sólo función de la distancia del punto experimental al centro del diseño y no de la dirección.
 - No requerir un gran número de experimentos (E).
 - Ser eficiente, siendo la eficiencia un parámetro del modelo definido por el número de coeficientes estimados dividido el número de experimentos.

En la **Figura IV.8** se observa una representación esquemática de los tres tipos de diseños clásicos para aplicar la MSR a la optimización de métodos cromatográficos [55, 62, 64]:

1. El Diseño Factorial Completo en tres niveles (3-DFC). Consta de tres niveles para cada factor: nivel inferior (-1), nivel intermedio (0) y nivel superior (+1). Cada nivel de un factor se combina en los distintos experimentos con todos los niveles de los otros factores. El número de experimentos está dado por $E=k^3$, por lo que crece exponencialmente con el número de factores. Sólo es conveniente para un número pequeño de factores.

2. El Diseño Central Compuesto (DCC). Es probablemente, el diseño más utilizado para ajustar superficies de respuesta de segundo orden. En forma genérica un DCC incluye distintas clases de puntos dentro del dominio experimental: puntos factoriales (pf), en niveles (-1) o (+1), puntos axiales o puntos estrella (pe), que tienen todos los factores en el nivel intermedio (0) menos uno de los factores que se encuentra en un nivel axial ($\pm\alpha$) y los puntos centrales (pc), que tienen

todos los factores en nivel intermedio. Generalmente se hacen réplicas de este punto para obtener la estimación del error. El número de experimentos es $E=2k+2k+pc$. De acuerdo a lo previamente dicho, se puede ver que cada factor se encuentra en cinco niveles posibles: $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$ y cuando α toma el valor de la raíz cuarta de f , siendo f el número de puntos factoriales, se dice que el diseño es rotable.

3. El Diseño de Box-Behnken (DBB). Es una opción eficiente cuando se requiere estudiar los factores en tres niveles, en el cual los puntos experimentales están localizados en los puntos medios de las aristas de un cubo y en el centro (pc). Igual que en DCC el punto central generalmente se replica para estimar el error. Es un diseño de naturaleza esférica y rotable y el número de experimentos está dado por: $E=2k(k-1)+pc$, por lo que resulta más eficiente que los anteriores.

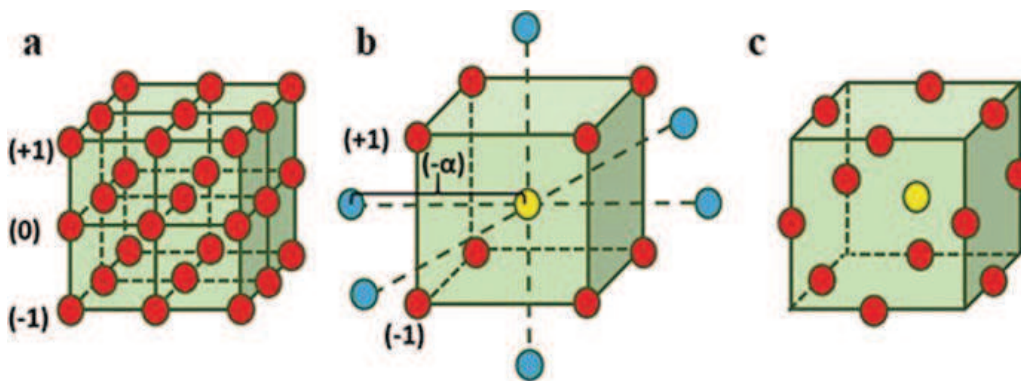


Figura IV.8: Representación esquemática de (a) 3-DFC, (b) DCC y (c) DBB, todos ellos de tres factores. Extraída de la Ref. [65]

4. El Diseño Split-plot (DSP) [49], basado en el concepto de parcelas divididas (idea inspirada en el campo de la agricultura). Es una opción cuando la aleatorización completa de las corridas experimentales no es factible debido a que el nivel de uno o varios factores son poco prácticos o presentan inconvenientes para ser cambiados. Por lo tanto, la construcción de un DSP involucra diferentes tamaños de unidades experimentales, que restringen la completa aleatorización de los experimentos. En este tipo de diseño, el factor difícil de cambiar (del inglés, *hard-to change*) está asociado a la parcela completa o WP (de sus siglas en inglés, *whole-plot*) y los factores fáciles de cambiar (del inglés, *easy-to change*) que se aplican en diferentes niveles a secciones más pequeñas del WP, constituyendo las subparcelas o SP (de sus siglas en inglés, *sub-plot*). Este esquema se reproduce para los niveles del factor WP y el número de réplicas según corresponda. En consecuencia, se obtendrán dos términos de error al aplicar estos dos niveles de aleatorización, un error correspondiente al WP y un error correspondiente SP.

5. El Diseño óptimo (DO). Es un diseño para evaluar dominios asimétricos (no simétricos) que se implementan para hacer frente a diferentes condiciones establecidas por el analista, tales como: cantidad de puntos experimentales, tipo de modelo a ajustar, rangos de variables, regiones con restricciones multifactoriales. Se dividen en diferentes tipos, nombrados por letras del alfabeto y se refiere a la propiedad o criterio que se pondera en el diseño, es decir que algunos de ellos se centran en una buena estimación de los parámetros del modelo, mientras que otros se centran en una buena predicción en la región de diseño. El diseño D-óptimo (DDO), es un diseño basado en el criterio de proporcionar una buena estimación de los parámetros de regresión para el modelo seleccionado [53, 66].

Una vez corridos los diseños, los datos experimentales recabados se ajustan mediante regresión lineal múltiple por el método de los cuadrados mínimos, a un modelo polinomial que responde a la siguiente ecuación general:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

donde y es la respuesta, x_i son los factores, β_0 es el término constante o intercepto, β_i , β_{ii} y β_{ij} representan los coeficientes de primer orden, segundo orden y del término de la interacción, respectivamente, y ε es el error residual asociado con los experimentos.

Estos modelos, correctamente ajustados, tienen la propiedad de predecir valores de respuesta en combinaciones de niveles de factores en los que no se ha experimentado, por lo que pueden utilizarse para optimizar las respuestas, buscando puntos de máxima o mínima respuesta mediante el empleo de herramientas gráficas o matemáticas [49, 53]. La inferencia y validación de los modelos son tareas esenciales que deben realizarse antes de utilizarlos para los pasos de interpretación y/o predicción. Por lo tanto, es necesario conocer ciertos indicadores de calidad de los modelos:

- R^2 -ajd. (R^2 ajustado). Este indicador representa el porcentaje de variancia explicada por el modelo. Es una medida que permite evaluar la bondad de ajuste de un modelo, es decir, qué tan bien el modelo explica la relación entre la variable dependiente y las variables independientes. El R^2 -ajd. se basa en el R^2 , que es el coeficiente de determinación, pero lo corrige para tener en cuenta el número de variables independientes y el tamaño de la muestra. El R^2 -ajd. siempre será

menor o igual que el R^2 , y penalizará la inclusión de variables que no aporten información relevante al modelo.

- R^2 -pred (R^2 de predicción) o Q^2 (según el programa MODDE). Este indicador es una medida para evaluar la capacidad de un modelo para predecir nuevos valores de la variable dependiente a partir de valores de las variables independientes que no se han utilizado para ajustar el modelo. Se basa en el R^2 , pero lo corrige para tener en cuenta el error de predicción que se produce al aplicar el modelo a nuevos datos. Un valor alto de R^2 -pred indica que el modelo tiene una buena capacidad predictiva y que las variables independientes son relevantes para predecir la variable dependiente. Por el contrario, un valor bajo indica que las variables independientes no son útiles para predecir la variable dependiente.

A su vez, la superposición de las gráficas de contorno, permite encontrar regiones operativas que satisfacen simultáneamente los requerimientos o criterios de aceptación de dos o más respuestas, lo que en el entorno de la AQbD se conoce como MODR.

Además, los modelos pueden combinarse entre sí matemáticamente creando un nuevo modelo, conocido como Función Deseabilidad de Derringer y Suich (ver sección **IV.3.1.5.1**) que permite también la optimización simultánea de varias respuestas encontrando un punto operativo óptimo [64].

IV.3.1.5.1. Función deseabilidad

Derringer y Suich propusieron en 1980 una función matemática capaz de transformar el problema multivariado generado por la optimización simultánea de múltiples respuestas de un mismo sistema, en un problema univariado. Llamaron a esta función Deseabilidad[67], ya que la misma se basa en la idea de que el funcionamiento de un sistema es indeseable si al menos una de las respuestas toma valores por fuera de los criterios de aceptación para la misma.

La función permite encontrar la mejor solución de compromiso para todas las respuestas del sistema, en base a criterios de optimización establecidos individualmente para cada una de ellas[53]. Su aplicación consta de los siguientes pasos:

- Obtener una función deseabilidad para cada respuesta estableciendo el criterio de optimización para la misma y utilizando el modelo matemático ajustado que la relaciona a las variables del sistema. La función deseabilidad individual $di(yi)$ varía entre 0 y 1, donde 0 (cero) significa no deseable y 1 (uno) significa ideal, mientras que los valores intermedios representan respuestas aceptables. Dependiendo del criterio de optimización para cada respuesta, pueden usarse diferentes $di(yi)$. Derringer y Suich denominaron Li (del inglés, lower), Ui (del inglés,

upper) y Ti (del inglés, target) a los valores bajo, alto y un valor fijo respectivamente, de respuestas deseadas. Estos valores se eligen de acuerdo a las necesidades o prioridades de la respuesta.

Cuando el criterio de optimización es el de ajustar la respuesta a un valor Ti , la función deseabilidad toma la siguiente forma:

$$d(\hat{Y}_i(x)) = \begin{cases} 0 & \text{si } \hat{Y}_i(x) \leq Li \\ \left(\frac{\hat{Y}_i(x)-Li}{Ti-Li}\right)^s & \text{si } Li < \hat{Y}_i(x) < Ti \\ 1 & \text{si } \hat{Y}_i(x) = Ti \\ \left(\frac{\hat{Y}_i(x)-Ui}{Ti-Ui}\right)^t & \text{si } Ti < \hat{Y}_i(x) < Ui \\ 0 & \text{si } \hat{Y}_i(x) \geq Ui \end{cases}$$

donde los exponentes s y t se denominan pesos y permiten cambiarle la forma a cada función deseabilidad individual. Los pesos se utilizan para darle énfasis a los criterios. Cuando el peso es 1, la función $di(yi)$ varía entre 0 y 1 linealmente. Pesos mayores a 1 (hasta un máximo de 10) le otorgan más énfasis al criterio establecido, mientras que pesos menores a 1 (hasta un mínimo de 0.1) le dan menos peso al criterio (**Figura IV.9 A**)

Cuando el criterio de optimización es maximizar la respuesta (**Fig. IV.9.B**), $di(yi)$ está definida como:

$$d(\hat{Y}_i(x)) = \begin{cases} 0 & \text{si } \hat{Y}_i(x) < Li \\ \left(\frac{\hat{Y}_i(x) - Li}{Ui - Li}\right)^s & \text{si } Li \leq \hat{Y}_i(x) \leq Ui \\ 1 & \text{si } \hat{Y}_i(x) > Ui \end{cases}$$

Finalmente, si el criterio es minimizar la respuesta se debe usar:

$$d(\hat{Y}_i(x)) = \begin{cases} 1 & \text{si } \hat{Y}_i(x) < Li \\ \left(\frac{Ui - \hat{Y}_i(x)}{Ui - Li}\right)^s & \text{si } Li \leq \hat{Y}_i(x) \leq Ui \\ 0 & \text{si } \hat{Y}_i(x) > Ui \end{cases}$$

La **Figura IV. 9**, muestra un esquema de las curvas de $di(yi)$ cuando se quiere maximizar una función utilizando diferentes pesos. El gráfico resulta inverso cuando se quiere minimizar la función.

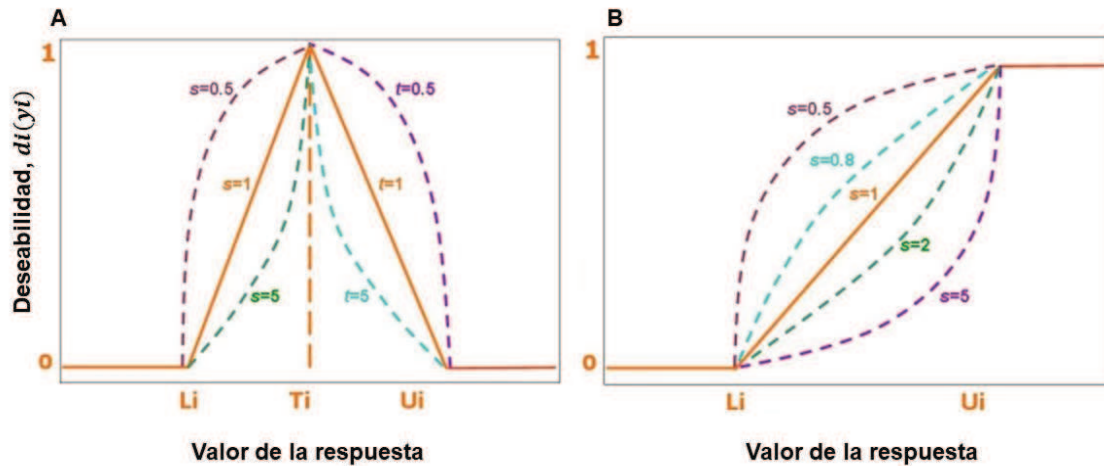


Figura IV.9: Curvas de la función deseabilidad individual $d_i(y_i)$, cuando el criterio de optimización es ajustar el valor de un respuesta a un valor determinado (A), y cuando se quiere maximizar la respuesta (B). s y t representan los pesos de la respuesta.

- Combinar las funciones individuales en una única función global que logre encontrar la mejor respuesta conjunta. La función deseabilidad global (D) combina las deseabilidades individuales ($d_i(y_i)$) de cada respuesta a optimizar según su importancia relativa (r_n), es decir que mide el grado de satisfacción de los criterios de optimización para todas las respuestas y se calcula para muchas combinaciones de factores usando los modelos ajustado, de la siguiente manera:

$$D = (d_1^{r_1} x d_2^{r_2} x \dots x d_n^{r_n})^{\frac{1}{\sum r_i}} = \left(\prod_{i=1}^n d_i^{r_i} \right)^{\frac{1}{\sum r_i}}$$

Si D es mayor que 0 (cero), significa que hay al menos una combinación de factores que cumple con los requisitos. Por el contrario, si D es igual 0 (cero), significa que hay al menos una respuesta completamente indeseable. La optimización puede generar una o más zonas de condiciones óptimas donde D es aceptable, denominadas, soluciones robustas.

IV.3.1.5.2. Software

El creciente uso de DOE, MSR y la función Deseabilidad en diversos campos de las ciencias experimentales en los que se aplica la QbD, ha llevado en los últimos años, al desarrollo de numerosos software comerciales que proporcionan diversas herramientas para implementarlas de una manera sencilla y eficiente. Dentro de ellos se pueden destacar: Minitab (<http://www.minitab.com/>), SPSS (www.ibm.com/analytics/us/en/technology/spss/), JMP

(<https://www.imp.com/>), Six Sigma (<https://www.isixsigma.com/six-sigma-software/>), The Unscrambler (<http://www.camo.com/>), NCSS (<http://www.ncss.com/>), Cornerstone (www.camline.com/), SAS (<https://support.sas.com/rnd/app/qc/qc/qcdesign.html>), Design-Expert (<http://www.statease.com/>) y Modde (<https://www.sartorius.com/en/products/processanalyticaltechnology/data-analytics-software/doi-software/modde>); siendo los dos últimos los que se utilizaron en la presente tesis.

IV.3.1.6. Etapa 2: Calificación del desempeño del método

Una vez que se define la estrategia de control al final de la etapa 1, el ATP se puede redefinir si es necesario, caso contrario el método está listo para someterse a un proceso de validación.

El objetivo de la validación, en el marco de la AQbD, es realizar una demostración final, formal y documentada de que el desempeño del método cumple con el ATP. Luego de validado, método puede ser fácilmente transferido a otro laboratorio analítico, el cual, a su vez deberá realizar una verificación inicial del desempeño (similar a la validación, pero más acotada) para garantizar que las características de rendimiento presentadas durante la validación en el laboratorio de origen, se siguen manteniendo (**Fig. IV.5**) [41].

En la presente tesis el proceso de validación de los métodos bioanalíticos se llevó a cabo según los lineamientos descritos en las guías de validación de métodos bioanalíticos de: (a) la Agencia Médica Europea, EMA (por sus siglas en inglés, *European Medicines Agency*) [68], (b) la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos, FDA (por sus siglas en inglés, *Food and Drug Administration*)[69] y el Consejo Internacional de Armonización, ICH (por sus siglas en inglés, *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) [70]. En estas guías se describen los parámetros de rendimiento que se deben evaluar y los posibles procedimientos para llevar a cabo su evaluación junto a los criterios de aceptación para cada uno de ellos.

A continuación, se detallan algunos de los conceptos y consideraciones derivadas de las guías y utilizadas en la presente tesis para la validación de los métodos desarrollados para cuantificar fármacos en plasma humano:

- La muestra blanco (MB) es una muestra de plasma blanco (PB) libre de analito, obtenida a partir de una persona no tratada con el fármaco para el cual se desarrolló el método.
- La muestra calibradora (MC) es un PB fortificado con una cantidad exactamente conocida del analito, a partir de una solución estándar y que se utiliza para obtener la curva de calibración del método.

- La muestra control (MQ) es un PB fortificado con una cantidad exactamente conocida del analito, a partir de una solución estándar y que se utiliza para asegurar la validez de una calibración o de una corrida analítica. Las MQ se preparan a partir de soluciones estándares independientes de las utilizadas para la preparación de las MC.
- La muestra real (MR) es una muestra de plasma obtenida a partir de un paciente tratado con el fármaco para el cual se desarrolló el método.
- La concentración nominal (CN) es la concentración teórica del analito añadida a un PB y la concentración predicha (CP) es la concentración de analito hallada en una muestra al someterla al procedimiento analítico y calcular su concentración el modelo de predicción establecido.
- Para evaluar precisión intra-ensayo (repetibilidad) se utiliza el coeficiente de variación de repetibilidad (CVr) según la siguiente ecuación:

$$CVr = \frac{Sr}{\overline{CP}}$$

donde Sr es el desvío estándar de la CP en un determinado nivel de concentración y \overline{CP} es la concentración predicha promedio obtenida para ese nivel de concentración.

- Para evaluar precisión inter-ensayo (precisión intermedia) se utiliza el coeficiente de variación inter-ensayo (CVi) según la siguiente ecuación:

$$CVi = \frac{Si}{\overline{\%REC}}$$

donde Si , es el desvío estándar obtenido a partir la varianza del pool de datos (s_i^2) de las recuperaciones relativas de las series analizadas y $\overline{\%REC}$ es la recuperación promedio obtenida para ese nivel como:

$$\%REC = \frac{CP}{CN} \times 100$$

- Para evaluar sesgo se utiliza el bias porcentual (bias%) tal como se indica en la siguiente ecuación:

$$bias\% = \frac{(CP - CN)}{CN} \times 100$$

IV.3.1.6.1. Selectividad

La selectividad de un método bioanalítico se define como su capacidad de distinguir la señal analítica (SA) del analito de manera precisa en presencia de interferentes, tales como componentes del solvente de inyección (SI), compuestos endógenos (CE) de la matriz biológica, medicación co-administrada, productos de hemolisis, lípidos u otros componentes de la matriz bajo las condiciones establecidas para el método.

Para evaluarla se deben analizar con el método, SI, muestras hemolizadas, PB de al menos 6 (seis) fuentes independientes (personas diferentes) y PB fortificados con medicación habitualmente coadministrada con los fármacos de interés. En todos estos casos se debe evaluar la presencia de SA de posibles interferentes en los tiempos de retención de los analitos y verificar que, si se detecta, la misma sea $\leq 20\%$ de la SA del analito en el límite inferior de cuantificación (LIC).

IV.3.1.6.2. Límite inferior de cuantificación

El LIC es la menor concentración de analito que puede ser cuantificada con veracidad y precisión aceptable con el método. La evaluación del LIC puede llevarse a cabo de manera independiente o como parte de la evaluación de precisión y veracidad para el rango de calibración establecido.

Para establecerlo se deben evaluar un mínimo de 5 (cinco) MQ en concentraciones correspondientes al LIC, en al menos en tres corridas analíticas diferentes y verificar que se cumplan en todas ellas con los siguientes criterios de aceptación: selectividad, $CV \leq 20\%$ y $bias\%$ entre $\pm 20\%$.

IV.3.1.6.3. Curva de calibrado, rango analítico y modelo de predicción

La curva de calibrado es la relación entre la SA y la CN del analito en las MCs. La función matemática que describe esta relación se utiliza para obtener el modelo que permite predecir la concentración del analito en las MRs. Para obtenerla se deben procesar en una misma corrida el SI, la MB y al menos 6 (seis) niveles de concentración de MC, incluidos el LIC y límite superior de cuantificación (LSC). Queda de esta manera establecido el rango analítico como el rango de concentraciones entre el LIC y el LSC.

Es necesario que al diseñar el método se tenga en cuenta que este rango comprenda las concentraciones esperables de la mayoría de las MRs. Las MRs que presenten concentraciones

inferiores al LIC no podrán ser cuantificadas, mientras que las que superan el LSC deberán ser diluidas para entrar en el rango analítico.

Para obtener la ecuación de la curva de calibrado se debe utilizar un modelo de regresión más simple que describa adecuadamente la relación de la CN con la SA, sin incluir la respuesta de las MB. En los métodos bioanalíticos, en los que el rango analítico suele ser amplio, es habitual tener que recurrir a regresiones ponderadas, con diferentes pesos, o el uso de señales transformadas para poder ajustar correctamente un modelo lineal.

Para construir las curvas de calibrado las MCs pueden procesarse por duplicado y pueden contener más de un analito si el método está destinado para la cuantificación de más de un fármaco de manera simultánea. En este caso se debe generar una curva de calibrado para cada uno de ellos.

Para validar el modelo de calibración para un analito se deben analizar las gráficas de residuos de la regresión y calcular para cada MC la CP utilizando el modelo de predicción propuesto en al menos tres curvas de calibrado obtenidas de manera independiente y en días diferentes de trabajo. Los criterios de aceptación para este el modelo son los siguientes, en las tres curvas:

- La distribución de los residuos debe ser homocedástica.
- El coeficiente de determinación (R^2) de la curva multinivel debe ser > 0.99 .
- La regresión obtenida por el método de los cuadrados mínimos para la curva multinivel debe ajustarse a un modelo lineal.
- La CP de al menos el 75% de las MC y el 50% en cada nivel de concentración debe estar dentro del 15% del valor nominal, excepto para el LIC que puede ser de $\pm 20\%$.

IV.3.1.6.4. Precisión

La precisión es la capacidad del método de obtener mínima variación en las mediciones repetidas de una misma muestra homogénea. Incluye un componente de intra-ensayo (repetibilidad) y uno inter-ensayo (precisión intermedia) y está estrechamente relacionada con el error aleatorio.

La precisión intra-ensayo se debe estudiar procesando MQs en 4 (cuatro) niveles diferentes en el rango de trabajo por quintuplicado en cada nivel y procesando las muestras en condiciones homogéneas y por un mismo analista.

La precisión inter-ensayo se debe estudiar procesando las mismas MQ en los mismos niveles de concentración, en tres días diferentes y por diferentes analistas.

Los niveles de concentración de las MQs deben ser los siguientes:

- LIC
- Nivel bajo (NB) corresponde a 3 x LIC
- Nivel Medio (NM) corresponde al 30 - 50% del rango de calibración.
- Nivel Alto (NA) corresponde al 75% del LSC.

Los criterios de aceptación tanto para precisión intra-ensayo como inter ensayo es que el CV_r y el CV_i sean $\leq 15\%$, excepto en LIC que puede ser $\leq 20\%$.

IV.3.1.6.5. Sesgo

El sesgo es el grado de concordancia entre el valor verdadero o valor nominal de la concentración del analito en la muestra y el valor medio obtenido como resultado al aplicar el método analítico. Es una medida de la veracidad del método y está estrechamente relacionado con el error sistemático.

Para evaluarlo se pueden utilizar los mismos ensayos que en el estudio de precisión, siendo los criterios de aceptación a cumplir: bias% dentro de $\pm 15\%$, excepto en LIC que puede ser de $\pm 20\%$.

IV.3.1.6.6. Exactitud. Evaluación conjunta de precisión y sesgo.

Si bien en las guías de validación no está indicado cómo evaluar la exactitud (evaluación conjunta de sesgo y precisión) en todas las validaciones llevadas a cabo en la presente tesis se agregó dicha evaluación, de acuerdo al método propuesto por Hubert y col.[71] y al capítulo USP <1210> [72] en los que se tiene en cuenta la incertidumbre aceptable del resultado informado tal como se indica en el ATP. Este criterio contempla el error total (error sistemático y error aleatorio) para evaluar la probabilidad de alcanzar la exactitud requerida y asegura que

$$\Pr(-\lambda + \tau < Y < \lambda + \tau) \leq P$$

donde Pr es la probabilidad real, λ es el límite de incertidumbre, τ es el valor verdadero o el valor de referencia (en nuestro caso es la concentración nominal de la MQ), Y es el resultado informado (en nuestro caso, es la CP), y P es la probabilidad deseada (en nuestro caso 90%).

Para validar esta propuesta se calcularon los intervalos de tolerancia (95% confianza) del bias% promedio para cada analito para un $P=0.90$ y $\alpha=0.10$, según

$$\beta \pm [K \times S] \quad ; \quad K = \sqrt{\frac{Z_{(1+P)/2}^2}{\chi_{\alpha;n-1}^2}} \times \left(1 + \frac{1}{n}\right)$$

Donde β es el bias% promedio, S es el desvío estándar general para β , $Z_{(1+P)/2}^2$ es el percentil normal estándar con un área $\frac{(1+P)}{2}$ hacia un lado, $\chi_{\alpha;n-1}^2$ es el percentil chi-cuadrado con un área α hacia un lado y $(n - 1)$ grado de libertad.

IV.3.1.7. Etapa 3: Monitoreo continuo

El monitoreo continuo es una actividad o un conjunto de actividades que permiten confirmar la idoneidad del método durante el uso rutinario y el cumplimiento de los criterios establecidos en el ATP a lo largo del tiempo. Para su implementación práctica se debe establecer una estrategia de control en el correspondiente procedimiento analítico, donde se describen estas actividades.

Esta etapa incluye tanto (a) monitoreo de rutina de los datos vinculados al rendimiento del método analítico y (b) la evaluación del rendimiento del método después de los cambios que pudiesen darse para determinar si el procedimiento analítico sigue siendo adecuado para su propósito. Los criterios del ATP continúan siendo los criterios de rendimiento utilizados para realizar esta evaluación, la cual puede hacerse de diversas maneras y en proporción adecuada al conocimiento adquirido en la evaluación del método.

Como se mencionó anteriormente, para llevar a cabo el monitoreo continuo es necesario contar con los procedimientos operativos estándar (POEs), documentos en los que se describe detalladamente las instrucciones para ejecutar el método analítico en las condiciones operativas óptimas y la estrategia de control del mismo, incluyendo los SSTs. Los parámetros de la estrategia de control del método deben evaluarse y registrarse en cada corrida analítica verificando el cumplimiento de las especificaciones establecidas.

Una valiosa actividad, que se usa como recurso en esta etapa es la construcción de cartas control. Estas gráficas proveen de una manera sencilla para realizar un control estadístico del proceso analítico en el tiempo, evaluando la aparición de tendencias y/o eventos fuera de lo esperado. Existe más de una forma de obtener estas gráficas, siendo su principal utilidad la de evaluar la variabilidad en el tiempo de parámetros de aptitud del sistema o de resultados obtenidos a partir de muestras control que se analizan en cada corrida analítica. En la **Figura IV.10** se muestra de manera genérica una gráfica de control en la que se especifican los límites de control

(o límites de alarma), dentro de los cuales se encuentra la variabilidad aceptable, y los límites de acción, que son aquellos que, al superarse, indican la necesidad de una acción correctiva sobre el método [41, 45].

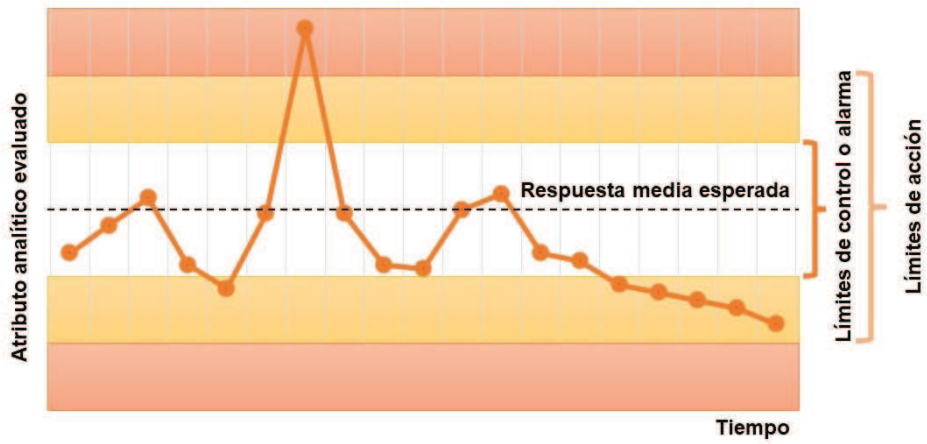


Figura IV.10: Carta control. Evolución en el tiempo del atributo analítico evaluado junto a sus límites de control o alarma y límites de acción.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivos generales:

- Contribuir al desarrollo del bioanálisis en general y, en particular, al análisis de fármacos en muestras biológicas por cromatografía líquida.
- Generar una plataforma bioanalítica de calidad basada en el diseño destinada al monitoreo terapéutico de fármacos.

V.2. Objetivos específicos:

- Estudiar la problemática actual relacionada al uso racional de medicamentos, terapias personalizadas y control de tratamientos con fármacos de elevada toxicidad o con ventana terapéutica estrecha.
- Evaluar el rendimiento de nuevas partículas cromatográficas disponibles en el mercado para lograr mayor eficiencia en la separación de fármacos a partir de muestras biológicas.
- Aplicar herramientas de AQbD para el desarrollo, optimización y validación de métodos bioanalíticos.
- Obtener métodos analíticos protocolizados destinados al MTD que permitan el control de tratamientos con fármacos, especialmente antibióticos betalactámicos, tuberculostáticos y citostáticos, utilizando instrumentación de mediana complejidad.

CAPÍTULO 1

**BIONÁLISIS DE ETAMBUTOL, ISONIACIDA Y PIRAZINAMIDA EN
PLASMA PARA MONITOREO TERAPÉUTICO EN EL TRATAMIENTO
DE LA TUBERCULOSIS**

1.1. INTRODUCCIÓN

1.1.1. Tuberculosis

1.1.1.1. Características generales de la enfermedad

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, que afecta principalmente a los pulmones del huésped, pero puede propagarse a otros órganos o sistemas del cuerpo. Según el sitio de infección se clasifica en *pulmonar* y *extrapulmonar*. La TB *pulmonar* es la forma más común y contagiosa, y se transmite por el aire cuando las personas infectadas tosen, estornudan o escupen. Los síntomas pueden incluir tos (a veces con sangre), dolor torácico, fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso y dificultad para respirar. La TB *extrapulmonar* afecta a otros órganos o sistemas del cuerpo, como los ganglios linfáticos, el sistema nervioso central, los huesos, las articulaciones, el tracto genitourinario, el abdomen o el pericardio. En este caso, los síntomas varían según el órgano afectado, pero en general puede incluir fiebre, malestar general, pérdida de peso y dolor o hinchazón en la zona afectada [73–75].

Además de esta clasificación, la TB se puede presentar como *activa* o *latente*, en relación con la actividad de los bacilos. En la primera situación, los bacilos están presentes de manera activa en el cuerpo causando daño y síntomas, mientras que en la TB *latente* los bacilos están presentes y vivos pero inactivos, no provocan síntomas y no se transmiten [76].

1.1.1.2. Problemática actual

Según un informe actual de la organización mundial de la salud (OMS) la TB, continúa siendo una de las enfermedades infecciosas con mayor incidencia y mortalidad en el mundo y un grave problema de salud pública, aun cuando se trata de una enfermedad curable y prevenible. En 2019, unos 1,4 millones de personas murieron por enfermedades relacionadas con la tuberculosis. De los 10 millones de personas que se calcula desarrollaron la tuberculosis ese año, unos 3 millones no tenían diagnosticada la enfermedad, o sus casos no se notificaron oficialmente a las autoridades nacionales. La situación es aún más grave para las personas con tuberculosis farmacorresistente. En 2019 se diagnosticó esa forma de tuberculosis a unas 465 000 personas, de las que menos del 40% pudieron acceder al tratamiento [77].

Alrededor del 85% de las personas que desarrollan la enfermedad por cepas sensibles a las drogas de primera línea (DS-TB, del inglés *drug susceptible TB*) se pueden tratar con éxito mediante un régimen terapéutico adecuado, lo que conlleva el beneficio adicional de reducir la

transmisión de la infección. Las tasas de curación se reducen al 57% para la enfermedad causada por cepas multirresistentes (MDR-TB, del inglés, *multidrug resistant TB*), que son aquellas que no responden a tratamiento de primera línea, y a 25% para las originadas por cepas de resistencia extrema (XDR-TB, del inglés *extensively-drug resistant TB*), que son las resistentes a tratamientos de primera y segunda línea [78].

Poner fin a la epidemia de TB es una de las metas de salud de los Objetivos de Desarrollo Sostenible propuestos por la OMS, que busca que los países aborden diferentes aspectos mediante un enfoque integral que combine intervenciones sanitarias y sociales [79].

Nuestro país asumió este compromiso y desde entonces se implementaron diferentes estrategias, para reducir la morbi-mortalidad de TB, así como la resistencia del bacilo a los medicamentos tuberculostáticos. El Boletín N° 6 emitido a principio del año 2023, por el Ministerio de Salud de la Nación, hace hincapié en fortalecer las acciones relacionadas a la prevención, el diagnóstico precoz, la notificación oportuna y adecuada y al seguimiento y monitoreo de tratamientos de calidad [80].

En el abordaje de esta tarea se debe contemplar que la baja tasa de éxito del tratamiento farmacológico de la TB se debe, en principio, a varios factores. Entre ellos se encuentran, fundamentalmente, la larga duración del tratamiento estándar (mínimo 6 meses) y los efectos adversos producidos por los fármacos que, a menudo, conducen a la falta de adherencia al tratamiento por parte de los pacientes. Dentro de los efectos adversos mencionados se pueden incluir: prurito, erupción cutánea y diferentes reacciones de hipersensibilidad; trastornos gastrointestinales como náuseas, dolor abdominal, anorexia y hepatitis; trastornos inmunológicos con eosinofilia, leucopenia, trombocitopenia y miopatías; aumento de las concentraciones de transaminasas y bilirrubinas en sangre y trastornos de la función hepática; astenia; neuropatías; confusión, desorientación, alucinaciones, vértigo, malestar y alteraciones visuales (visión borrosa, ceguera de color rojo-verde, pérdida de visión) [81].

Otros factores relevantes en esta problemática son la variabilidad intra e inter individual en la farmacocinética de los antibióticos tuberculostáticos y las comorbilidades [82]. Comorbilidades como la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), la diabetes mellitus, falla renal o hepática o malnutrición son condiciones que alteran notablemente la farmacocinética de estos fármacos. La malabsorción, la absorción condicionada a la ingesta de alimentos y la existencia de diferencias en el metabolismo hepático de algunos individuos son factores que también inciden en el logro de los objetivos terapéuticos. Varios estudios han correlacionado una respuesta pobre al tratamiento para DS-TB con concentraciones sanguíneas bajas de los fármacos administrados [83, 84].

1.1.1.3. Aportes del MTD en el tratamiento de la TB

Las situaciones anteriormente mencionadas llevan muchas veces a la recaída del paciente en tratamiento por TB y a la aparición de nuevas resistencias de la bacteria a los tuberculostáticos, haciendo que se genere un círculo vicioso [5]. Esta práctica terapéutica deficiente puede ser notablemente mejorada mediante el seguimiento del tratamiento farmacológico por MTD, especialmente en las poblaciones de mayor riesgo, como lo son las HIV positivo o que las padecen de diabetes, o insuficiencias renales o hepáticas.

Para llevar adelante este MTD se requiere de métodos analíticos capaces de cuantificar las concentraciones plasmáticas de los tuberculostáticos de una manera eficiente, confiable y accesible, y de esta forma permitir la toma de decisiones médicas apropiadas, buscando el éxito inmediato del tratamiento de la TB, sobre en beneficio del paciente y de la salud pública en general [83, 84, 86].

1.1.1.4. Contribución al abordaje de la problemática

La contribución de este capítulo de tesis a la problemática actual en el tratamiento de la TB consiste en poner a disposición del sistema de salud un método bioanalítico accesible, eficiente y de calidad para ser utilizado en el MTD de tres tuberculostáticos de primera línea. Se espera que su implementación redunde en beneficio de un tratamiento eficiente de la DS-TB mediante dosificaciones personalizadas de los antibióticos evitando efectos adversos graves y aumentando por lo tanto la adherencia del paciente al mismo.

1.1.2. Antibióticos tuberculostáticos

1.1.2.1. Clasificación

Los antibióticos tuberculostáticos se clasifican según el mecanismo de acción y/o su espectro de actividad [76, 87]:

Según su mecanismo de acción:

- Inhibidores de la síntesis de la pared celular: isoniazida, etionamida, cicloserina, etambutol.
- Inhibidores de la síntesis de proteínas: estreptomina, amikacina, kanamicina, capreomicina, rifampicina, rifabutina, rifapentina.
- Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos: pirazinamida, quinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino), linezolid.
- Inhibidores de otros procesos metabólicos: ácido paraaminosalicílico, d-clofazimina.

- Según su espectro de actividad:
 - De primera línea: isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol, estreptomina. Son los más eficaces y los menos tóxicos. Se usan en el tratamiento de DS-TB.
 - De segunda línea: etionamida, cicloserina, ácido paraaminosalicílico, capreomicina, kanamicina, amikacina, quinolonas, linezolid. Son menos eficaces y más tóxicos que los de primera línea y se usan para tratamiento de MDR-TB.
 - De tercera línea: d-clofazimina, bedaquilina, delamanida. Son los más recientes y se usan en casos de MDR-TB y XDR-TB.

1.1.2.2. Tratamiento farmacológico de la DS-TB

En general, el tratamiento de la DS-TB tiene como objetivos fundamentales [88]:

- Disminuir rápidamente el número de bacilos en el huésped para reducir la morbilidad y morbilidad en el paciente, y para disminuir la capacidad de contagio a otras personas.
- Prevenir el desarrollo de las TB resistentes.
- Evitar las recaídas después de completar el tratamiento.

La estrategia terapéutica se fundamenta, además, en dos grandes bases bacteriológicas: la asociación de fármacos para evitar la selección de cepas resistentes y la aplicación de tratamientos prolongados para eliminar a todos los bacilos en sus diferentes fases de crecimiento metabólico [73].

Así, el esquema terapéutico actual para DS-TB está constituido en principio por el uso simultáneo de los cuatro antibióticos de primera línea: etambutol (EMB), isoniazida (INH), pirazinamida (PZA) y rifampicina (RIF), los cuales se administran ambulatoriamente, vía oral bajo la forma de comprimidos y son la base del tratamiento estándar. Las drogas de segunda línea se reservan para situaciones especiales de intolerancia o reacciones adversas a los fármacos de primera línea.

Según recomendaciones de la OMS el tratamiento estándar consta, además, de dos fases: una fase inicial corta (o etapa intensiva), en la que se administra diariamente dosis altas de los medicamentos y una fase menos intensa (o etapa de consolidación) en la que se administra una menor cantidad de drogas, pero por un tiempo más prolongado.

Los regímenes, a su vez, pueden ser de dos tipos diferenciándose en la frecuencia de administración de los fármacos en la etapa de consolidación. La denominación general de estos regímenes se basa en siglas en las que se utiliza la H para INH, R para RIF, Z para PZA y E para EMB. Las siglas indican así la combinación de fármacos usada, la barra diferencia las fases del

tratamiento (intensiva y de consolidación) y el número 3 (tres) la frecuencia de administración por semana en la fase de consolidación. Los regímenes son [76]:

- **HRZE/HR**: consta de una fase inicial de 2 meses de tratamiento con EMB, INH, PZA y RIF y una fase de consolidación de 4 meses con INH y RIF con administración diaria de la medicación.
- **HRZE/HR3**: consta de una fase inicial de 2 meses de tratamiento con EMB, INH, PZA y RIF con administración diaria de la medicación y fase de consolidación de 4 meses con INH y RIF, con administración de la medicación tres veces por semana.

Ambos regímenes tienen una eficacia similar, pero el segundo puede ser más conveniente para algunos pacientes que prefieren tomar menos comprimidos o que tienen dificultades para acceder al sistema de salud. Sin embargo, el segundo régimen requiere una mayor supervisión y adherencia, ya que saltarse una dosis puede tener un mayor impacto en la efectividad del tratamiento.

1.1.2.3. Índice pK/pD

Para los fármacos tuberculostáticos de primera línea, el índice pK/pD más relevante es el ABC/CIM. Sin embargo, en la práctica rutinaria del MTD, estimar el ABC no es algo habitual, ya que esto requiere de un mínimo de 6 a 7 muestras de sangre tomadas en distintos tiempos pos administración del fármaco.

En su lugar, se utiliza entonces como parámetro de seguimiento la $C_{m\acute{a}x}$ luego de la administración de las dosis estándar. En este caso, se toman una o dos muestras de sangre al $t_{m\acute{a}x}$, generalmente entre 1 – 2 horas pos administración de los fármacos. Este resultado se compara con la CIM del fármaco para el microorganismo causante de la infección y de esta forma se puede estimar si el tratamiento está siendo efectivo o si se requiere ajustar las dosis o cambiar el régimen terapéutico[89].

Actualmente la CIM de los tuberculostáticos para los bacilos susceptibles no están completamente definidas, sino que se han establecidos rangos esperables [90]. Las CIM reales deben por lo tanto obtenerse experimentalmente para cada aislamiento de manera de ajustar el objetivo terapéutico a cada caso concreto.

En la **Tabla 1.1** se resumen algunas características farmacocinéticas esperables de los tuberculostáticos de primera línea luego de una dosis estándar en ambas fases del tratamiento de la DS-TB [74, 91, 92].

Tabla 1.1: Características farmacocinéticas de EMB, INH, PZA y RIF.

Fármaco	Dosis (mg/kg)	t _{máx} (h)	C _{máx} (µg/mL)	t _{1/2} (h)	Tipo de Eliminación	CIM (µg/mL)
Etambutol	15 - 20	2 - 3	2 - 6	2 - 4	Renal	1 - 5
	25 - 35		4 - 12			
Isoniacida	4 - 6	1 - 2	3 - 6	2 - 4	Metabólica	0.025 - 0.050
	8 - 12		9 - 15			
Pirazinamida	20 - 30	1 - 2	20 - 60	9	Metabólica	20
	30 - 40		60 - 90			
Rifampicina	10 - 15	2	8 - 24	2 - 3	Metabólica	0.005 - 0.2

1.1.3. Antecedentes analíticos para la cuantificación de antibióticos tuberculostáticos en fluidos biológicos.

Actualmente, la mayoría de los métodos bioanalíticos publicados para la cuantificación simultánea de los 4 tuberculostáticos de primera línea en fluidos biológicos se basan principalmente en CLAR-MS o CLAR MS-MS [93–98]. Estos métodos son sensibles y selectivos, pero requieren equipos e insumos costosos y personal altamente calificado.

En menor medida se encontraron publicados desarrollos de métodos mediante CLAR-UV, que resulta más simple y económica que la espectrometría de masas. Sin embargo, ninguno de estos métodos permite la determinación simultánea de los 4 fármacos en fluidos biológicos [99]

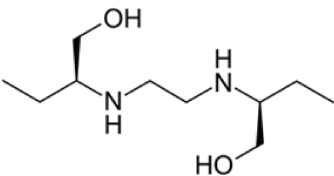
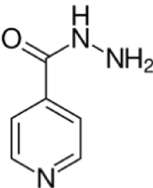
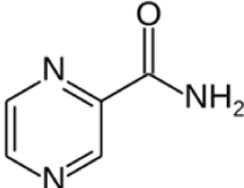
El caso más complejo es el del EMB, ya que la ausencia de cromóforos en la molécula, requiere de una derivatización [100] o de la formación de un complejo con cobre para su detección y cuantificación mediante absorbancia en el UV [101, 102]. Los otros fármacos (INH, PZA y RIF) se han cuantificado en matrices biológicas por CLAR-UV de forma individual [103, 104] o en combinación entre ellos [105–108], pero no se han encontrado publicados métodos que incluyan la determinación simultánea de EMB con otros tuberculostáticos en este tipo de muestras.

Siendo que abundan en la literatura los métodos para dosaje plasmático de RIF [103, 109–113], y que debido a su gran inestabilidad es conveniente cuantificarla de manera individual con un método dedicado, se propuso en este trabajo el desarrollo de un método para cuantificar simultáneamente en plasma los otros tres tuberculostáticos: INH, PZA y EMB. Como alcance de este método se propuso el dosaje de INH, PZA y EMB en plasma para el MTD de la primera fase del tratamiento de la DS-TB.

1.1.4. Etambutol, isoniacida y pirazinamida

En la **Tabla 1.2** se detallan la estructura molecular y las propiedades fisicoquímicas más relevantes de los analitos [94, 114].

Tabla 1.2: Información propiedades fisicoquímica de los analitos

Propiedades	Etambutol	Isoniacida	Pirazinamida
Tipo de compuesto	Derivado de la etilendiamina.	Hidracida del ácido isonicotínico.	Derivado sintético de la nicotinamida.
Formula química	$C_{10}H_{24}N_2O_2$	$C_6H_7N_3O$	$C_5H_5N_3O$
Estructura molecular			
Peso formula	204.31 g/mol	137.14 g/mol	123.11 g/mol
Solubilidad	Soluble en agua y dimetilsulfóxido, ligeramente soluble en etanol, difícil de disolver en acetona y cloroformo.	Parcialmente soluble en agua, en etanol y en cloroformo. Prácticamente insoluble en éter y benceno	Soluble en cloroformo y cloruro de metileno, menos soluble en benceno y moderadamente soluble en agua.
pKa	14.8 – 9.55	13.6 – 3.35	13.1 - 0.55
LogP	-0.006	-0.69	-1.23
Presentación comercial	Comprimidos de 400 mg. Comprimidos combinados de 75 mg de INH, 150 mg de RIF, 400 mg de PZA y 275 mg de EMB.	Comprimidos de 100 y 300 mg. Comprimidos combinados de 100 mg INH y 300 mg de RIF. Comprimidos combinados de 75 mg de INH, 150 mg RIF y 400 mg de PZA. Comprimidos combinados de 75 mg de INH, 150 mg de RIF, 400 mg de PZA y 275 mg de EMB.	Comprimidos de 250 y 500 mg Comprimidos combinados de 75 mg de INH, 150 mg RIF y 400 mg de PZA. Comprimidos combinados de 75 mg de INH, 150 mg de RIF, 400 mg de PZA y 275 mg de EMB.

1.2. OBJETIVOS PARTICULARES

Los objetivos del presente capítulo de tesis fueron:

- Desarrollar un nuevo método bioanalítico por CLAR-DAD para ser aplicado a la determinación simultánea de los niveles plasmáticos de EMB, INH y PZA en plasmas de pacientes que se encuentren en la etapa intensiva del tratamiento de la DS-TB.
- Aplicar conceptos de ciclo de vida y AQBd al desarrollo, optimización y validación del nuevo método, siguiendo las recomendaciones de organismos internacionales.

1.3. MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1. Instrumental y equipamiento

Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo líquido Shimadzu equipado con una bomba cuaternaria LC-20AT, inyector automático con refrigeración SIL-30AC Nexera, horno de columna CTO-10ASVP, desgasificador DGU-20A5R y un detector UV-Vis con arreglo de diodos SPDM20A.

Se emplearon y evaluaron dos columnas cromatográficas:

- **Phenomenex Luna PFP.** Fase estacionaria pentafluorfenilo (PFP) ligada a partículas de sílice completamente porosa de 5.0 μm de diámetro. Tamaño de poro de 100 Å. Dimensión de la columna: 4.6 x 150 mm. Los grupos PFP unidos a la superficie de sílice ofrecen una selectividad aromática, única, debido al flúor altamente electronegativo en la periferia de cada anillo fenilo. Proporciona selectividad para compuestos polares no halogenados y no polares
- **Innoval C18.** Fase estacionaria C18 ligada a partículas esféricas de sílice completamente porosa de 5.0 μm de diámetro. Tamaño de poro de 100 Å. Dimensión de la columna: 4.6 x 100 mm.

Se utilizaron también los siguientes instrumentos, equipos y materiales:

- Peachímetro- potenciómetro Termo Scientific Orion 5 Star.
- Electrodo de pH Van London Co. Modelo 573V526R-003B.
- Microcentrífuga para tubos eppendorf Gelec. Modelo G-134
- Vortex Nevation Modelo iSwix.
- Balanza analítica digital (Incertidumbre: 0.00001 g) Ohaus Discovery Modelo DV 215CD.
- Balanza analítica digital (Incertidumbre: 0.0001g) Sartorius Modelo Entris.

- Equipo de sistema de alimentación ininterrumpida, UPS (de sus siglas en inglés, *Uninterruptable Power Supply*), KATODO. Modelo EA906.
- Equipo de producción de agua ultrapura Millipore Modelo Simplicity System.
- Material volumétrico de borosilicato Clase A.

1.3.2. Softwares para la adquisición y procesamiento de datos

Para la adquisición y procesamiento de datos cromatográficos se utilizó el software Workstation Labsolution LC/GC versión 5.73 de Shimadzu.

La generación de los diseños experimentales, el análisis de datos mediante RLM, como así también la determinación y validación del MODR se llevó a cabo con el software MODDE v.13 (Umetrics, Sartorius).

Para el análisis estadístico de los datos de la validación del método se utilizó el programa Microsoft Excel (2013).

1.3.3. Reactivos y muestras

Los estándares farmacéuticos secundarios de EMB (99.3 % p/p s.t.c), INH (100.1 % p/p s.t.c) y PZA (100.5 % p/p s.t.c.) fueron generados en nuestro laboratorio a partir de materias primas analizadas según las respectivas monografías de la Farmacopea Argentina y de la Farmacopea de Estados Unidos (USP-NF), siguiendo los requerimientos de disposición de ANMAT (3602-2018).

Los solventes orgánicos, acetonitrilo (ACN) y metanol (MeOH) de calidad cromatográfica y el ácido acético p.a se obtuvieron de Sintorgan (Buenos Aires, Argentina), mientras que el ácido perclórico 70% p.a. (AP), acetato de amonio p.a (AcNH₄), cloruro de metileno p.a. (MeCl) e hidróxido de sodio p.a. (NaOH) se adquirieron en Cicarelli (San Lorenzo, Argentina). El acetato de cobre p.a (Ac₂Cu) se obtuvo de Anedra de Resaerch AG (Buenos Aires, Argentina) y el acetato de sodio trihidrato p.a (AcNa. 3H₂O) de Biopack (Buenos Aires, Argentina). El agua ultrapura se obtuvo en el laboratorio mediante el sistema de purificación de agua Millipore Simplicity.

El PB se obtuvo a partir de voluntarios no tratados con los fármacos en estudio.

1.3.4. Soluciones de estándares, muestras calibradoras y muestras de control de calidad

Todas las soluciones y muestras aquí mencionadas fueron utilizadas durante el desarrollo y/o la validación del método.

Las soluciones reguladoras (SRs) se prepararon en diferentes concentraciones mediante disolución de una cantidad determinada de acetato de amonio o acetato de sodio trihidrato p.a. en agua ultrapura y agregado de un volumen determinado de ácido acético p.a, controlando el pH mediante el uso de un peachímetro recientemente calibrado.

Las Soluciones Estándares Stock (SESs) de EMB (2.00 mg/mL), INH (2.00 mg/mL) y PZA (10.00 mg/mL), se prepararon mediante pesada de los estándares farmacéuticos y posterior disolución en agua ultrapura para EMB e INH y en una mezcla agua:MeOH (15:85) para PZA. Las SES, se prepararon diariamente y para cada ensayo en particular. Las concentraciones exactas de las SES preparadas se calcularon en función de las masas pesadas y la potencia de los estándares usados en cada caso.

Las SES se diluyeron diariamente con agua ultrapura utilizando material volumétrico clase A para obtener Soluciones Estándar Intermedias Combinadas (SEICs) en las concentraciones objetivo indicadas en la **Tabla 1.3**.

Las MCs se prepararon en tubos eppendorf mediante la fortificación de 180.0 µL de PB con 20.0 µL de las diferentes SEICs de manera de obtener 7 niveles de calibración en los rangos analíticos de: 2.00 – 20.0 µg/mL para EMB, 3.00 – 20.0 µg/mL para INH y 10.0 – 100 µg/mL para PZA (**Tabla 1.3**). Las MCs se prepararon en tres días diferentes cada vez que se ensayó la curva de calibrado multinivel según los requerimientos del procedimiento de validación.

Las MQs se prepararon siguiendo el mismo procedimiento que para las MCs. Para estas muestras las SEICs se obtuvieron en cuatro niveles de concentración. De esta manera las concentraciones objetivo de cada analito en las SEICs y MQs fueron las mostradas en la **Tabla 1.4**. Las MQs, al igual que las MCs, fueron preparadas en días diferentes según el requerimiento de los ensayos de validación.

Tabla 1.3: Preparación y rango de concentraciones de las SEISs y las MCs.

Nivel	1	2	3	4	5	6	7
SEICs							
Volumen SES EMB (µL)	100.0	200.0	300.0	400.0	600.0	800.0	1000.0
Volumen SES INH (µL)	150.0	225.0	300.0	375.0	600.0	800.0	1000.0
Volumen SES PZA (µL)	100.0	200.0	300.0	475.0	650.0	825.0	1000.0
Volumen final, con agua ultrapura (mL)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Concentración final EMB (µg/mL)	20.0	40.0	60.0	80.0	120	160	200
Concentración final INH (µg/mL)	30.0	45.0	60.0	75.0	120	160	200
Concentración final PZA (µg/mL)	100	200	300	475	650	825	1000
MCs							

Volumen SEIC (μL)	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Volumen PB (μL)	180.0	180.0	180.0	180.0	180.0	180.0	180.0
Concentración final EMB ($\mu\text{g/mL}$)	2.00	4.00	6.00	8.00	12.0	16.0	20.0
Concentración final INH ($\mu\text{g/mL}$)	3.00	4.50	6.00	7.50	12.0	16.0	20.0
Concentración final PZA ($\mu\text{g/mL}$)	10.0	20.0	30.0	47.5	65.0	82.5	100

Tabla 1.4: Preparación y niveles de concentración de las SEICs y MQs.

Nivel	LIC	NB	NM	NA
SEICs				
Volumen SES EMB (μL)	100.0	300.0	500.0	750.0
Volumen SES INH (μL)	150.0	450.0	500.0	750.0
Volumen SES PZA (μL)	100.0	300.0	500.0	750.0
Volumen final, con agua ultrapura (mL)	10.0	10.0	10.0	10.0
Concentración final EMB ($\mu\text{g/mL}$)	20.0	60.0	100	150
Concentración final INH ($\mu\text{g/mL}$)	30.0	90.0	100	150
Concentración final PZA ($\mu\text{g/mL}$)	100	300	500	750
MQs				
Volumen SEI (μL)	20.0	20.0	20.0	20.0
Plasma blanco (μL)	180.0	180.0	180.0	180.0
Concentración final EMB ($\mu\text{g/mL}$)	2.00	6.00	10.0	15.0
Concentración final INH ($\mu\text{g/mL}$)	3.00	9.00	10.0	15.0
Concentración final PZA ($\mu\text{g/mL}$)	10.0	30.0	50.0	75.0

Las concentraciones exactas de las SEICs, MCs y MQs se calcularon a partir de las concentraciones exactas de las SESs utilizadas en cada caso.

1.3.5. Pretratamiento de las muestras de plasma

El pretratamiento más conveniente para las muestras se estudió y optimizó durante el desarrollo del método (ver sección **1.4.2.4.4**)

En la etapa de validación del método el pretratamiento de las muestras de PB, MC, MQ y/o MR se llevó a cabo de la misma manera mediante el siguiente procedimiento:

- 200.0 μL de plasma se trasvararon a un tubo eppendorf de 1.5 mL
- Se agregó 20.0 μL de una mezcla de MeOH y AP (1:1) y se aplicó agitación por vortex durante 20 segundos para permitir la precipitación de proteínas
- Finalmente se centrifugó a 7000 rpm durante 4 minutos y 130.0 μL del sobrenadante se trasvararon a un vial de inyección con inserto para su procesamiento en el cromatógrafo.

1.3.6. Sistema cromatográfico

Durante el desarrollo del método, el sistema cromatográfico se ajustó desde unas condiciones iniciales hasta las condiciones óptimas con las cuales se lograron los objetivos propuestos (ver sección 1.4.2.8).

Finalmente, en la etapa de validación del método y para el procesamiento de las MRs la separación de los analitos se llevó a cabo en una columna Luna PFP (4.6 x 150 mm, 5.0 μ m de tamaño de partícula). La fase móvil óptima consistió en una mezcla de Solución A: acetato de cobre en MeOH (equivalente a 60.0 mM de cobre) y Solución B: SR de acetato de sodio/acético 930 mM y acetato de cobre (equivalente a 60.0 mM de cobre) de pH=5.00, con el gradiente de elución presentado en la **Tabla 1.5**, a una velocidad de flujo de 1.15 mL/min. El volumen de inyección fue de 50 μ L y la monitorización de los tres analitos fue a una longitud de onda de 270 nm.

Tabla 1.5: Gradiente de elución del método validado

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0	10.0	90.0
1.0	10.0	90.0
8.0	90.0	10.0
9.5	90.0	10.0
13.0	10.0	90.0

1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4.1. Definición del perfil del objetivo analítico

El ATP para el nuevo método analítico fue definido como: ***“La cuantificación selectiva de EMB, INH y PZA en plasma de pacientes bajo tratamiento para la tuberculosis, en el rango de $C_{m\acute{a}x}$ esperada para cada antibiótico luego de la administración de la dosis estándar, en un tiempo de análisis ≤ 15 min y asegurando suficiente exactitud, de modo que los resultados informados se encuentren dentro de ± 15.0 % del valor real (± 20.0 % en LIC) con una probabilidad ≥ 90 % determinada con un 95% de confianza.”***

Para arribar a esta definición se consideraron los aspectos fundamentales del alcance del método. Entre ellos se destacan los requerimientos de calidad del resultado de un dosaje de la concentración de un fármaco en fluidos biológicos para llevar a cabo MTD, la necesidad de disponer del resultado en cortos tiempos, las concentraciones máximas esperadas para cada analito (ver **Tabla 1.1**) y el tipo de muestra.

1.4.2. Diseño, desarrollo y comprensión del método

Para llevar adelante este desarrollo, como así también para la ejecución de la validación y la definición de las estrategias de control del método, se utilizaron herramientas de gestión de riesgos.

1.4.2.1. Selección de la técnica analítica

En base a los antecedentes bibliográficos se seleccionó la CLAR en fase reversa con detección UV como técnica analítica con el objetivo de obtener un método accesible para un laboratorio de mediana complejidad y de bajo costo de aplicación.

1.4.2.2. Sistema analítico inicial

En función de que EMB presenta baja absorptividad en el UV se evaluó la propuesta del ensayo de valoración de la monografía de EMB en comprimidos de la Farmacopea Internacional (FI) [115], la cual utiliza una fase móvil conteniendo iones cobre. El complejo EMB-Cu que se forma cuando el analito entra en el sistema cromatográfico posee absorptividad apreciable en el UV presentando un máximo de absorción a 270 nm.

A continuación, se describe el sistema propuesto en la monografía FI para comprimidos de EMB:

- Columna cromatográfica: Fase estacionaria C18 ligada a partículas esféricas de sílice completamente porosa de 5.0 μm de diámetro con las siguientes dimensiones: 4.6 x 150 mm.
- Fase Móvil: integrada por MeOH y una SR compuesta por acetato de amonio (650 mM) y acetato de cobre (equivalente a 70.0 mM de cobre) a pH 5.00 ajustado con ácido acético. Proporción SR:MeOH (94:6).
- Velocidad de flujo 2.0 mL/min.
- Modo de elución: isocrático.
- Volumen de inyección: 20 μL de soluciones de concentración aproximada de 200 $\mu\text{g/mL}$.
- Detección: longitud de onda de 270 nm.
- Tiempo de retención de EMB: 6.0 minutos aproximadamente.
- No se indica ni control de temperatura del inyector, ni del horno de la columna.

En base a este antecedente, como punto de partida para el desarrollo del nuevo método, se ensayó un sistema cromatográfico conformado por una combinación de fase estacionaria C18 y una fase móvil compuesta por una SR preparada como indica la FI. Como modificador orgánico

se propuso una combinación de MeOH y ACN con gradiente de elución según **Tabla 1.6**, a los fines de estudiar la separación de los tres analitos. La velocidad de flujo se estableció en 1.00 mL/min y la temperatura del horno de columna se mantuvo constante en 25°C. El volumen de inyección fue de 20 µL y la detección se realizó a una longitud de onda de 270 nm.

Tabla 1.6: gradiente de elución inicial

Tiempo (min)	MeOH (%)	SR (%)	ACN (%)
0	4.0	96.0	0
3.00	4.0	96.0	0
10.0	50.0	0	50.0
15.0	4.0	96.0	4.0

A partir de este sistema inicial se realizaron algunas pruebas preliminares para estudiar el efecto de algunos factores de manera univariada. Esto permitió conocer la incidencia de los mismos en la performance del método y tomar decisiones tempranas en cuanto a la selección de algunos parámetros y/o el estudio de otros mediante diseños experimentales.

1.4.2.3. Identificación de riesgos

Mediante la confección de un Diagrama de Ishikawa (**Fig. 1.1**), se identificaron de manera sistemática las variables con posible incidencia sobre el rendimiento del sistema cromatográfico.

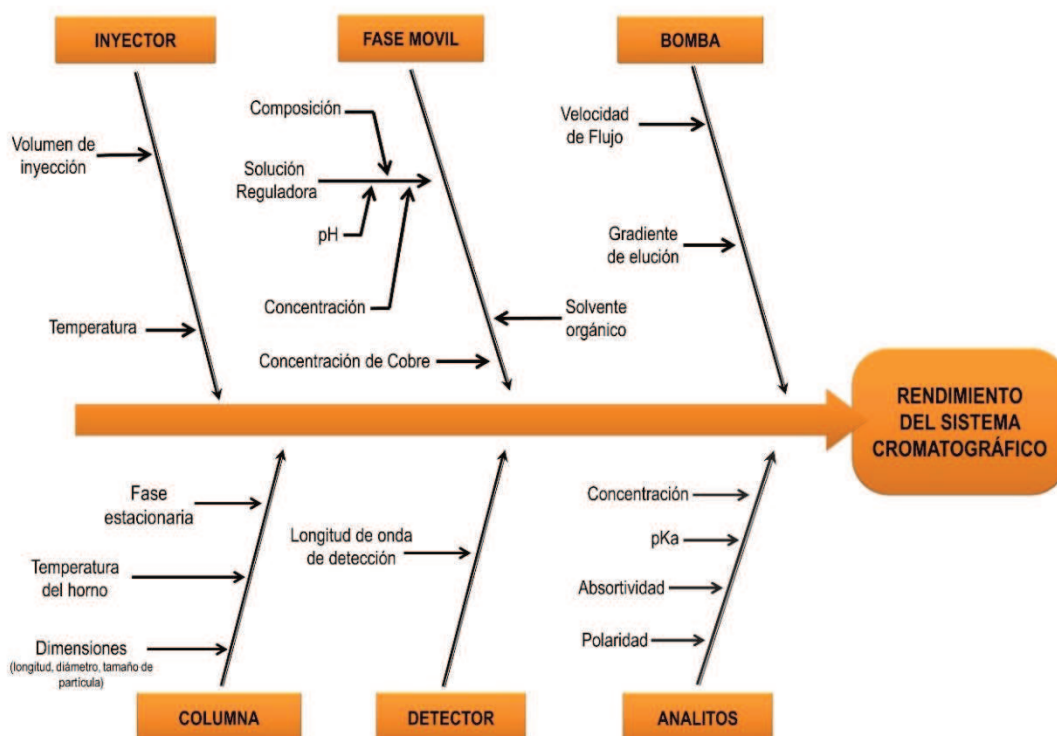


Figura 1.1: Diagrama de Ishikawa para identificación de riesgos. Factores asociados al rendimiento del sistema cromatográfico.

1.4.2.4. Fase de exploración y conocimiento inicial del sistema.

Una vez identificados los factores asociados al desempeño del método, el efecto de algunos de ellos se evaluó de manera univariada para obtener un conocimiento inicial del sistema. Esto permitió, por un lado, tomar decisiones tempranas en cuanto a los niveles operativos de alguno de ellos, como, por ejemplo, la columna cromatográfica, la incorporación de cobre en la fase móvil, longitud de onda de monitoreo. Por otro lado, permitió determinar cuáles eran los factores que convenía seguir estudiando para encontrar condiciones operativas robustas.

1.4.2.4.1. Selección de la columna y la longitud de onda

Se evaluaron las columnas de iguales dimensiones, pero diferentes fases estacionarias. Por un lado, una columna con fase estacionaria C18 (150 x 4.6 mm, 5.0 μm) (C1) y por otro una columna de tecnología novedosa con fase estacionaria de PFP (150 x 4.6 mm, 5.0 μm) (C2), resultando ambas de rendimiento similar para la separación de los analitos.

En la **Figura 1.2** se muestran los cromatogramas obtenidos en ambas columnas a partir de una solución acuosa concentrada que contiene EMB, INH y PZA, en una concentración de: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente utilizando el sistema analítico inicial. Puede observarse aquí que con la columna C2, se obtienen mayores tiempos de retención de los analitos (corrimiento aproximado de 2.0 min para INH y PZA) mientras que para EMB fue menos significativo (corrimiento aproximado de 0.9 min).

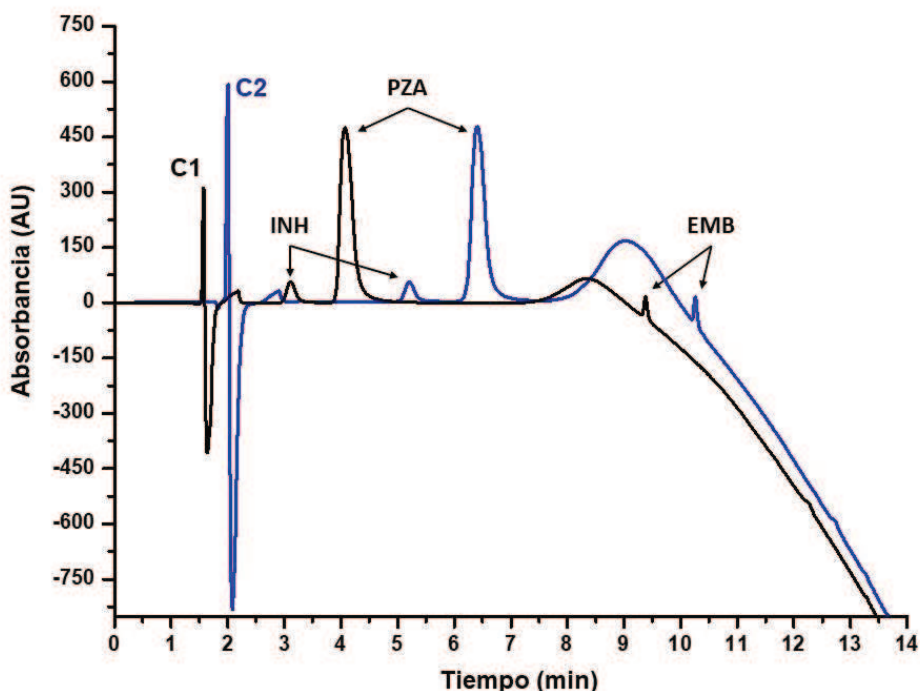


Figura 1.2: Cromatogramas registrados a 270 nm de una solución acuosa combinada con EMB (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), INH (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y PZA (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con dos columnas cromatográficas: Innoval C18 (150 x 4.6 mm, 5.0 μm) (C1) en negro y Luna PFP (150 x 4.6 mm, 5.0 μm) (C2) en azul.

En base a lo observado y debido a la alta proporción acuosa inicial de la fase móvil, se decidió continuar el desarrollo con la C2 para evitar desgastes de la fase C18 que generarán en el tiempo cambios en la retención de los analitos y en la selectividad del método. La novedosa fase estacionaria de PFP es estable cuando se utilizan fases móviles 100% acuosas y está recomendada para la separación simultánea de compuestos polares y no polares. Esto permitió estudiar otras posibilidades del gradiente de elución, sin cambios en el orden de elución y sin comprometer la vida útil de la columna cromatográfica.

Respecto a la longitud de onda para la detección de los analitos, se seleccionó 270 nm, que es en la que INH y el complejo EMB-Cu presentaron mayor absorción. En el caso de PZA también se ve favorecida en esta longitud de onda (**Fig. 1.3**).

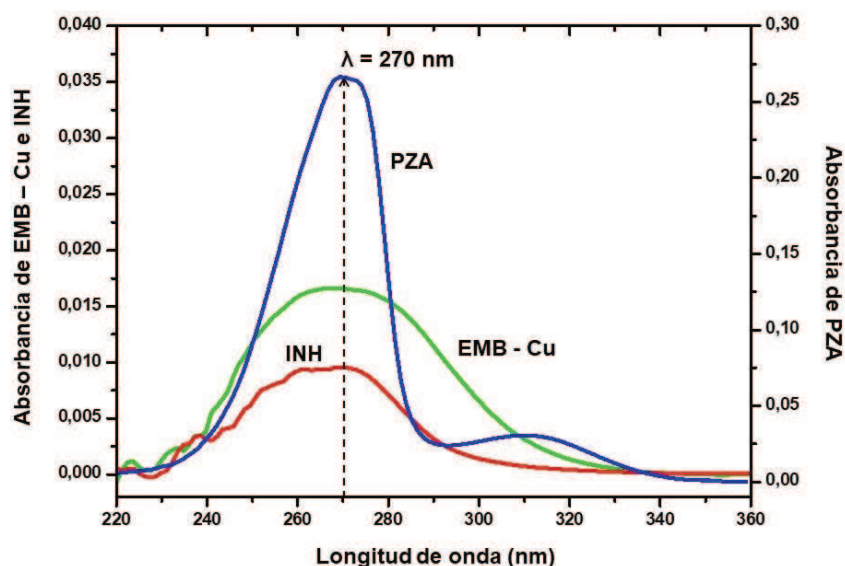


Figura 1.3: Espectros de absorción obtenidos de un cromatograma de una solución acuosa del complejo EMB-Cu (color verde), INH (color azul) y PZA (color azul) con DAD.

1.4.2.4.2. Selección de la fase móvil y gradiente de elución

Si bien la solución acuosa inicial de la fase móvil usada en ensayos preliminares, se compuso de una SR compuesta de acetato de amonio/ácido acético y acetato de cobre a pH = 5,00, finalmente se optó por utilizar acetato de sodio en la conformación de la SR, debido a que este reactivo es más estable y genera menos ruido en la línea de base. En relación al pH de la SR el mismo se mantuvo siempre en un valor de 5,00, tal como como se indica en la monografía farmacopeica de EMB. No se estudiaron variaciones de este factor, sobre todo teniendo en cuenta que a pH superiores a 5,00 podría formarse hidróxido de cobre [102] y precipitar originando problemas de taponamiento en el cromatógrafo.

Como modificador orgánico se evaluaron MeOH, ACN y una mezcla de ambos. Para ello se

usó el mismo gradiente de elución (**Tabla 1.6**), la misma SR y la misma solución acuosa conteniendo los analitos. Se observó en estas pruebas que al utilizar sólo ACN como modificador la señal analítica (SA) de EMB disminuye aproximadamente 45% respecto a la utilización de una mezcla de solventes (ACN y MeOH), mientras que con MeOH la SA aumenta un 38% lográndose por lo tanto mayor sensibilidad para este analito (**Fig. 1.4**). En el caso de INH y PZA también se observó una disminución en la SA con ACN, aunque no tan pronunciada como la de EMB. Por otro lado, como era de esperarse el uso de ACN disminuyó los tiempos de retención y el ancho de los picos cromatográficos, pero a pesar de este efecto beneficioso, se descartó su utilización en la fase móvil priorizando la sensibilidad del método para la cuantificación de EMB.

Definido el modificador orgánico (MeOH) y con el fin de evitar el decaimiento pronunciado que se producía en la línea de base al cambiar la composición de la fase móvil (**Fig. 1.2**) se agregó al MeOH, la misma cantidad de cobre agregada a la SR. De esta manera se obtuvo una línea de base menos pronunciada cercana al tiempo de retención de EMB, lográndose una mejor integración del pico cromatográfico (**Fig. 1.4**, cromatograma representado en color azul).

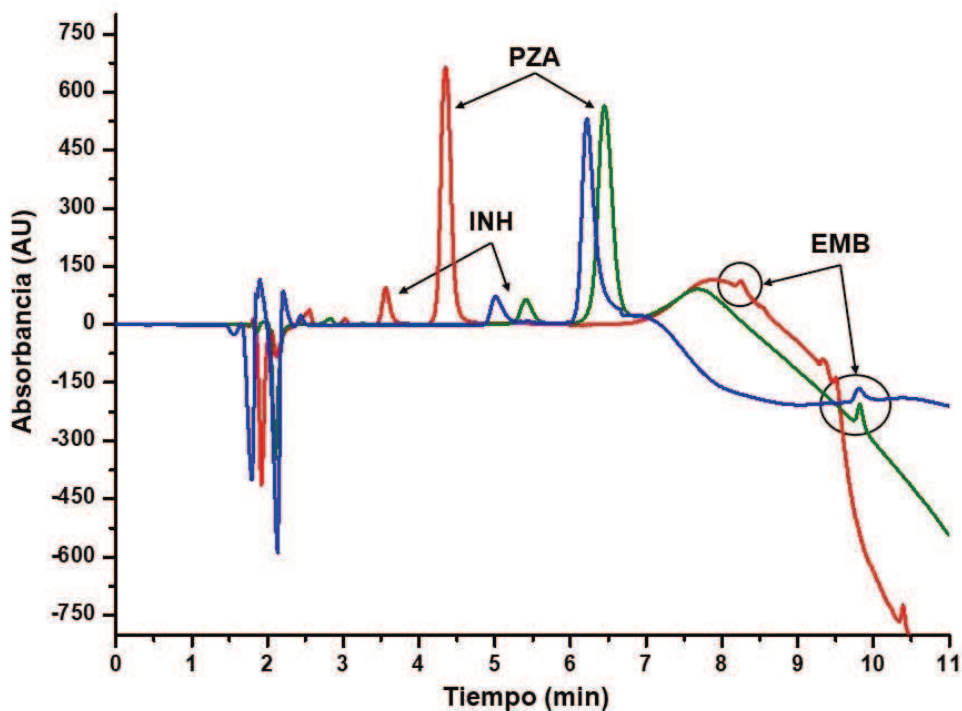


Figura 1.4: Cromatogramas registrados a 270 nm de una solución acuosa combinada de EMB (20 µg/mL), INH (30 µg/mL) y PZA (200 µg/mL) con una fase móvil compuesta por SR con cobre y ACN (color rojo), MeOH (color verde) y MeOH con cobre (color azul) como modificadores orgánicos.

1.4.2.4.3. *Evaluación de la señal endógena*

Posteriormente se estudió la señal cromatográfica de muestras de plasma humano conteniendo los analitos. Para esto se fortificó un PB utilizando una solución acuosa combinada,

se aplicó el pretratamiento de muestra que se detalla en la sección **1.4.2.4.4** y se inyectó un volumen de 50 μL del plasma tratado y utilizando el gradiente de elución descrito en la **Tabla 1.5**, obteniéndose el perfil de elución que se muestra en la **Figura 1.5**. Como se observa en esta figura, el plasma presentó algunos picos cromatográficos correspondientes a compuestos endógenos (CE) que no interfieren en la detección de los analitos, excepto uno de ellos que eluye cercano a EMB, el cual se tuvo en cuenta en las etapas posteriores del desarrollo del método.

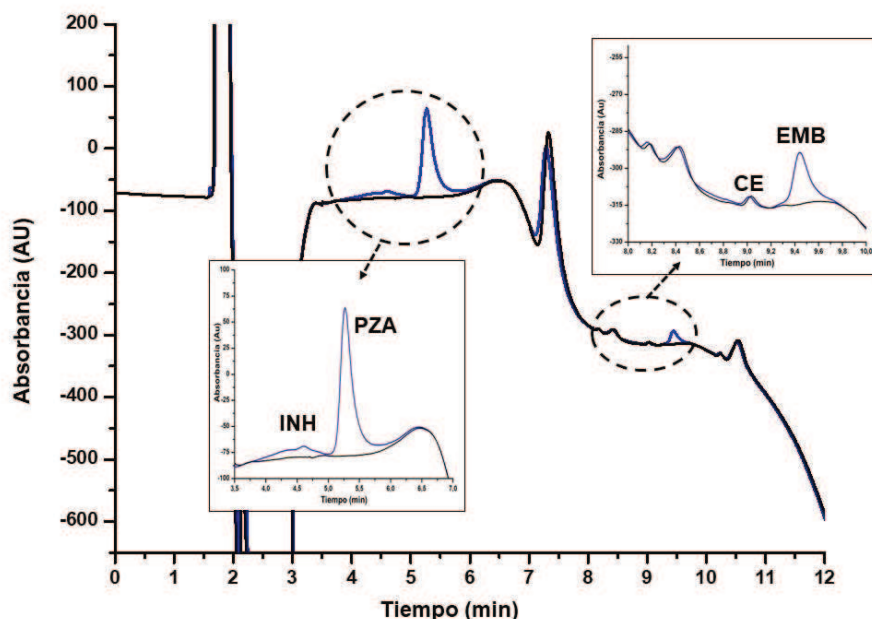


Figura 1.5: Cromatograma registrado a 270 nm de una muestra de plasma fortificado con EMB (6.00 $\mu\text{g/mL}$), INH (6.00 $\mu\text{g/mL}$) y PZA (20.0 $\mu\text{g/mL}$).

La concentración de cada analito, la SA obtenida para cada uno de ellos, como así también, los tiempos de retención y las resoluciones (R_s) entre picos adyacentes se muestran en la **Tabla 1.7**.

Tabla 1.7: Señales analíticas en plasmas fortificados

Analito	Concentración en plasma ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo de retención (min)	R_s	Señal analítica – Área (mAu)
Isoniacida	6.14	4.62	2.20	29530
Pirazinamida	19.35	5.27		1375220
Compuesto Endógeno	-	9.01	2.19	13913
Etambutol	5.81	9.44		161425

1.4.2.4.4. Pretratamiento de la muestra de plasma

Se evaluaron diferentes pretratamientos de las muestras de plasma para PP combinando o no con una etapa de ELL para separar los lípidos y reextraer el solvente precipitante:

- a) PP con ACN en una proporción (1:2) respecto al plasma y ELL con MeCl en proporción (1:1)

respecto al desproteínizado.

- b) PP con ACN en una proporción (1:2) respecto al plasma.
- c) PP con MeOH en una proporción (1:2) respecto al plasma y ELL con MeCl en proporción (1:1) respecto al desproteínizado.
- d) PP con MeOH en una proporción (1:2) respecto al plasma.
- e) PP con ácido perclórico: 10 μL de AP para un volumen total de plasma de 200 μL
- f) de 20 μL de una mezcla AP:MeOH (1:1) para un volumen total de plasma de 200 μL

En los tratamientos con solventes como precipitantes de proteínas (a-d) se observó muy poca señal y deformación de los picos cromatográficos de INH y PZA. La ELL con MeCl por su parte implicó la pérdida de señal para el EMB, indicando que este analito se re-extraía con el MeCl. Las muestras sometidas a pretratamiento con AP presentaron buena señal para todos los analitos, siendo la mejor la del tratamiento f ya que al proveer MeOH a la composición final del solvente de muestra previene la deformación del pico de INH (**Fig. 1.6**).

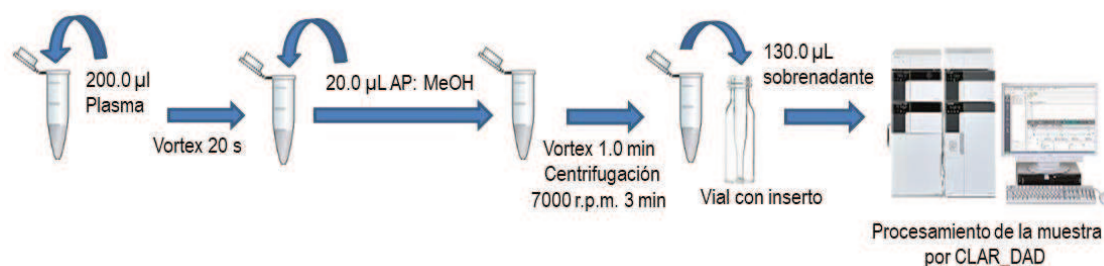


Figura 1.6: Procedimiento adoptado para el pretratamiento de las muestras de plasma.

1.4.2.5. Evaluación de riesgos

Durante la etapa de exploración inicial del sistema se lograron un pretratamiento de muestra y un sistema cromatográfico inicial con los cuales se obtuvieron SAs relativamente adecuadas para la cuantificación de INH y EMB en plasma en los rangos terapéuticos. Sin embargo, la señal analítica de estos analitos debía mejorarse para garantizar suficiente sensibilidad, precisión y exactitud. Por otro lado, se verificó que la señal analítica de PZA en el rango terapéutico no presentaba inconvenientes en las condiciones ensayadas. En relación a las R_s entre los picos de los analitos y/o con CEs de las muestras de plasma, las mismas fueron suficientemente buenas para garantizar la selectividad del método para los tres antibióticos, siendo la más comprometida la R_s entre los picos de INH y PZA y la de EMB con un CE. Finalmente, el tiempo de la corrida cromatográfica resultó apropiado en relación a lo propuesto. En base a estos resultados y con el objetivo de optimizar el método de manera de garantizar los requerimientos del ATP, se continuó

con un estudio más profundo y detallado del sistema.

1.4.2.6. Atributos críticos del método

En base a lo anteriormente expuesto se definieron como CMAs las variables respuestas dadas por las SAs (áreas de pico) de EMB e INH y las R_s entre los picos cromatográficos de INH y PZA, y la de un CE con EMB, de manera de no perder la selectividad lograda inicialmente. Por lo tanto, se identificaron y definieron un total de 4 (cuatro) CMAs y se establecieron para ellos criterios de aceptación a los fines de asegurar el cumplimiento del ATP (**Tabla 1.8**). Particularmente, para definir los criterios de aceptación para las áreas de pico de EMB e INH se tuvo en cuenta la necesidad de obtener LICs de al menos 2.00 µg/mL y 3.00 µg/mL para EMB e INH, respectivamente. Con este objetivo se establecieron los valores mínimos aceptables para ambas señales analíticas al evaluar muestras de plasma fortificadas al doble de los LICs requeridos, es decir a 4.00 µg/mL para EMB y a 6.00 µg/mL para INH. Para las R_s se establecieron criterios de aceptación de al menos 1.0 garantizando resolución de los picos en línea de base.

Tabla 1.8: Atributos críticos del método y criterios de aceptación

CMAs - Respuestas (<i>y</i>)	Descripción	Criterios de aceptación
<i>y</i> 1	Área de INH	≥ 60000
<i>y</i> 2	R_s INH – PZA	≥ 1.0
<i>y</i> 3	Área de EMB	≥ 80000
<i>y</i> 4	R_s CE – EMB	≥ 1.0

1.4.2.7. Parámetros críticos del método

Habiéndose fijado en la etapa inicial las condiciones operacionales de algunas de las variables del método (columna cromatográfica, temperatura de la columna y del inyector, volumen de inyección y composición de la fase móvil) se identificaron tres factores cuyos niveles modificados dentro de un rango experimental inicial, podían tener efectos significativos sobre alguno de los CMAs. Estos factores fueron escogidos como posibles CMPs (**Tabla 1.9**) y fueron por lo tanto estudiados en mayor profundidad para establecer la magnitud de sus efectos sobre cada uno de los CMAs, así como también la existencia de interacciones entre ellos.

Tabla 1.9: Probables parámetros críticos del método y rangos experimentales evaluado

Probables CMPs – Factores (<i>x</i>)	Descripción	Rango Experimentales
--	-------------	----------------------

x1	Concentración de la SR	500 – 800 mM
x2	Concentración de cobre en la fase móvil	50.0 – 80.0 mM
x3	Velocidad de Flujo de la fase móvil	1.00 – 1.30 mL/min

Los rangos experimentales que se muestran en la **Tabla 1.9** se fundamentan en los resultados obtenidos en la etapa inicial de desarrollo del método. En particular, se decidió evaluar las variables entorno a las condiciones centrales propuestas anteriormente, es decir: concentración de cobre 70.0 mM, concentración de la SR 650 mM y en el caso de la velocidad de flujo se decidió evaluar el rango entre 1.00 y 1.30 mL/min, estableciendo el valor de 1.30 mL/min como máximo debido a la presión que se genera en el equipo a velocidades de flujo más altas.

1.4.2.7.1. **Evaluación del efecto de los factores y del entorno experimental. Diseños de primer orden.**

Para una primera evaluación de los efectos de los factores y del entorno experimental seleccionado se utilizó un DFC1 en dos niveles con tres repeticiones del punto central generado mediante el programa MODDE. Los CMAs descritos en la **Tabla 1.9** fueron asignados como las respuestas en los cromatogramas obtenidos a partir de muestras de plasma fortificado con los analitos en las siguientes concentraciones: 6.00 µg/mL, 4.00 µg/mL y 40.0 µg/mL para INH, EMB y PZA, respectivamente.

Como puede observarse en la **Tabla 1.10**, las *Rs* entre los picos cromatográficos de INH – PZA como así también entre CE – EMB resultaron superiores a 1.0, garantizando la selectividad del método en este entorno experimental. Sin embargo, los rangos de las respuestas para las áreas de pico de INH y EMB incluyen valores muy por debajo de lo deseado, notándose además que la SA de INH resultó menos favorecida que la de EMB.

Tabla 1.10: Plan de experimentación y resultados del diseño DFC1.

Corrida	CMPs ^a			CMAs ^b			
	x1 (mM)	x2 (mM)	x3 (mL/min)	y1	y2	y3	y4
1	500	50.0	1.00	45595	2.268	95894	1.365
2	800	50.0	1.00	66359	1.990	168666	1.678
3	500	80.0	1.00	41268	2.018	131445	1.331
4	800	80.0	1.00	66088	1.968	128367	2.356
5	500	50.0	1.30	42551	2.104	66654	1.697
6	800	50.0	1.30	77793	1.835	118699	2.134
7	500	80.0	1.30	35422	1.894	71247	1.453
8	800	80.0	1.30	60609	1.789	69331	2.034
9	650	65.0	1.15	51511	2.000	170543	1.672
10	650	65.0	1.15	50549	1.988	166639	1.889

11	650	65.0	1.15	51204	1.997	168315	1.886	
Rango de respuestas				Mínimo	41268	1.835	66654	1.331
				Máximo	77793	2.268	170543	2.356

^a CMPs: x_1 : concentración de la SR (mM), x_2 : concentración de cobre en la fase móvil (mM) y x_3 : velocidad de flujo de la fase móvil (mL/min).

^b CMAs: y_1 : área de INH, y_2 : R_s INH-PZA, y_3 : área de EMB e y_4 : R_s CE – EMB.

Con los datos recopilados se obtuvieron, mediante regresión lineal múltiple, los modelos lineales para describir el comportamiento de cada CMA en función de los niveles de los factores. Se evaluó la significancia (valor $p < 0.05$) de los coeficientes de regresión de las variables y sus interacciones, mediante el análisis de varianza (ANOVA), de manera que permitieran evaluar los efectos de los factores estudiados (**Fig. 1.7**). Como puede observarse, todos los factores estudiados tienen efectos significativos sobre una o más de una respuesta, confirmándose de esta manera que efectivamente son CMPs.

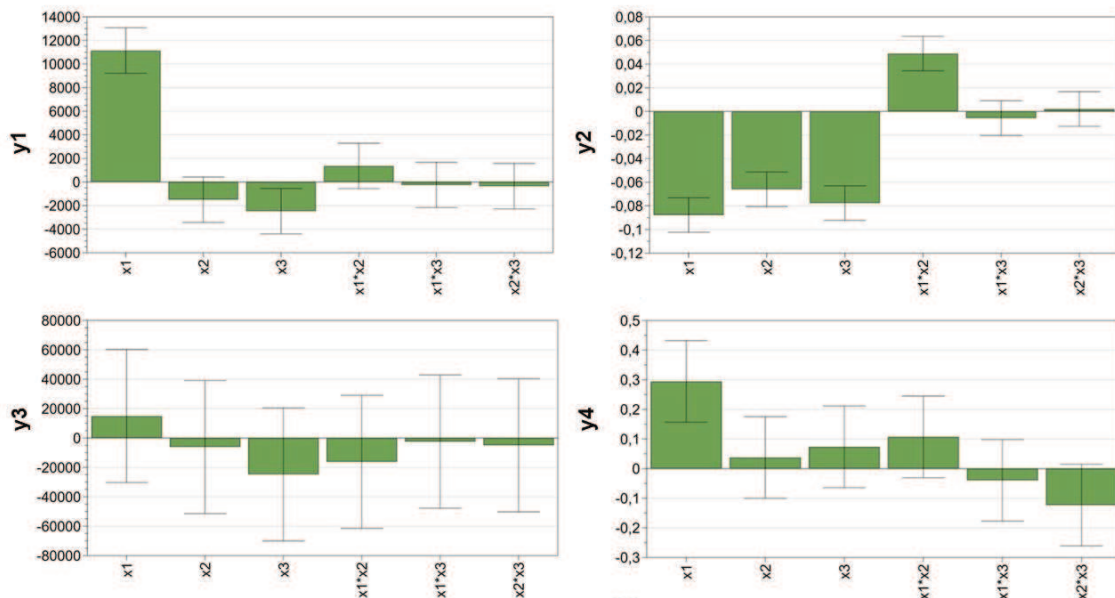


Figura 1.7: Representación de los efectos, sus interacciones y su significancia para los CMPs (x_1 , concentración de cobre; x_2 , concentración de la SR; x_3 , velocidad de flujo) sobre cada uno de los CMA en el DFC1. La magnitud del efecto se representa por los histogramas, resultando efectos positivos aquellos que se encuentran por encima de $y=0$, y los negativos hacia debajo de $y=0$. Los efectos resultan significativos si la barra de error no atraviesa el eje y .

En particular para y_3 , el modelo lineal resultó no significativo (valor $p = 0.297$) con falta de ajuste (valor $p = 0.002$) significativa. Además, el análisis de curvatura para el modelo de esta respuesta resultó significativa indicando la necesidad de incluir términos de segundo orden al modelo para lograr el ajuste de un modelo que describa el comportamiento de esta respuesta.

A pesar de los resultados poco informativos obtenidos para y_3 , en general se observó que el principal efecto sobre las respuestas en su conjunto fue el de la concentración de la SR y el de

la interacción de este factor con la concentración de cobre (x_1x_2). La velocidad de flujo mostró un efecto negativo sobre tres de los CMAs, a excepción de y_4 .

Para una mejor comprensión del comportamiento del sistema en este entorno experimental, se analizaron las gráficas de contorno de todos los CMAs en función de la concentración de la SR y de cobre (**Fig. 1.8**). Como se observa en la **Figura 1.8**, manteniendo la velocidad de flujo en 1.15 mL/min (punto central del DFC1) el aumento de la concentración de la SR favorece fundamentalmente a y_1 pero también a y_3 e y_4 . Por otro lado, el aumento de la concentración de cobre favorece la resolución entre CE – EMB, pero no así la de INH – PZA, ni la SA de EMB. En el caso de la SA de INH, esta no es afectada por la concentración de cobre.

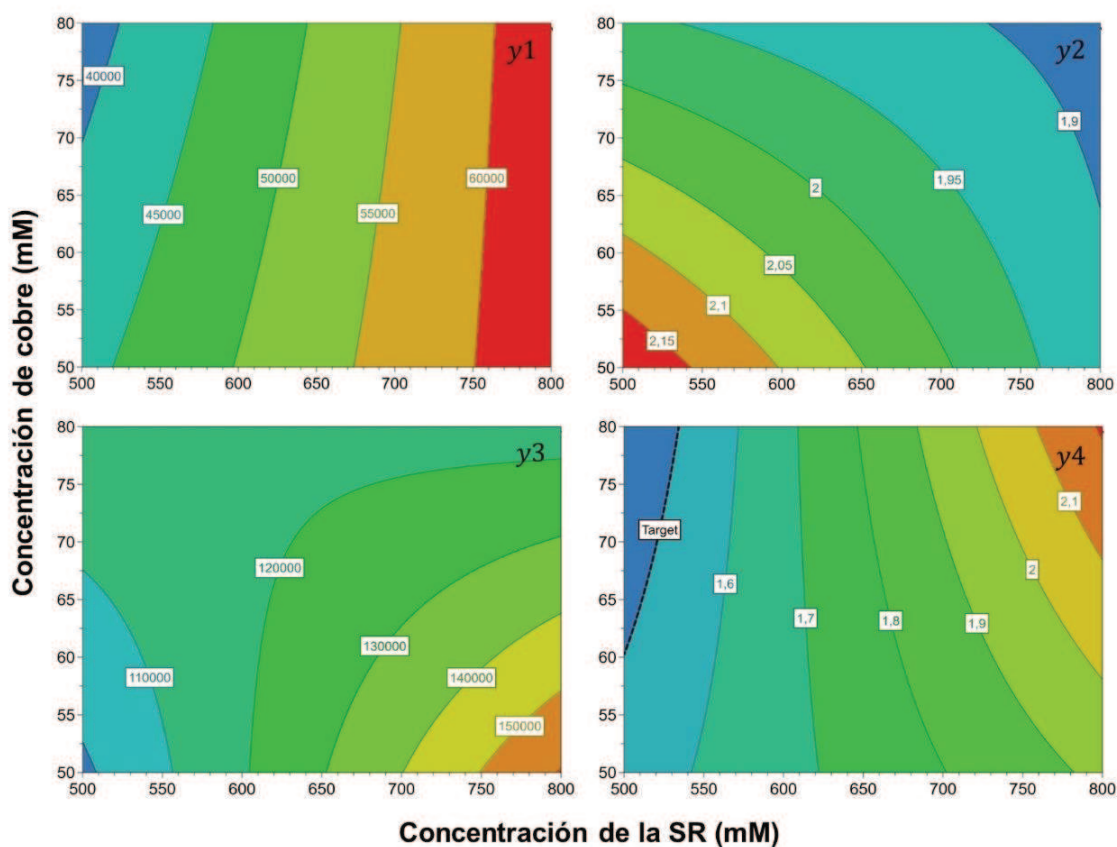


Figura 1.8: Gráficas de contorno de los CMAs (y_1 : área de INH, y_2 : resolución de INH – PZA, y_3 : área de EMB e y_4 : resolución de CE - EMB) en función de la concentración de cobre en la fase móvil y la concentración de la SR a una velocidad de flujo de 1.15 mL/min.

En concordancia con estos resultados y de acuerdo a la metodología secuencial de DOE, se evaluó un nuevo entorno experimental buscando condiciones más favorables, es decir lograr aumentar la sensibilidad del método mediante el aumento de la señal analítica de INH y EMB, sin perder selectividad.

Nuevamente se aplicó un DFC (DFC2) con tres repeticiones del punto central para evaluar

en este caso los dos CMPs con mayor efecto: concentración de cobre y de la SR. De esta manera utilizando la misma muestra que en el diseño anterior (DFC1) se corrieron 7 (siete) nuevos puntos experimentales. En este caso la velocidad de flujo se fijó en 1.15 mL/min y se mantuvo el rango de concentración de cobre (50.0 – 80.0 mM), expandiéndose solo la concentración de la SR (800 – 1200 mM).

Las respuestas obtenidas en el nuevo dominio experimental fueron modeladas y se evaluaron los efectos de las variables mediante ANOVA. Los resultados obtenidos con el experimento del DFC2 (**Tabla 1.11**) demostraron que la concentración de la SR tiene un efecto significativo sobre la mayoría de las respuestas. De la misma manera la concentración de cobre tiene efecto significativo sobre y_1 , y_3 e y_4 . Además, tanto la resolución de INH – PZA como la de CE – EMB se mantuvieron por encima de 1.00, llegando incluso a valores mayor o igual a 1.50. La SA de INH mejoró considerablemente en este entorno experimental, pero no así la EMB. Sin embargo, esta respuesta crítica se mantuvo siempre dentro de valores aceptables.

Tabla 1.11: Plan de experimentación y resultados del diseño DFC2.

Corrida	CMPs ^a		CMAs ^b			
	x_1 (mM)	x_2 (mM)	y_1	y_2	y_3	y_4
1	800	50.0	73295	1.87	181695	1.58
2	1200	50.0	122731	1.51	96442	2.64
3	800	80.0	58694	1.85	118164	1.95
4	1200	80.0	92895	1.47	90946	2.90
5	1000	65.0	124124	1.60	108799	2.70
6	1000	65.0	121681	1.62	108743	2.75
7	1000	65.0	119004	1.59	106109	2.89
Rango de respuestas		Mínimo	58694	1.47	96442	1.58
		Máximo	124124	1.87	181695	2.90

^a CMPs: x_1 : concentración de la SR (mM) y x_2 : concentración de cobre en la fase móvil (mM).

^b CMAs: y_1 : área de INH, y_2 : R_s INH-PZA, y_3 : área de EMB e y_4 : R_s CE – EMB.

1.4.2.7.2. Generación de conocimiento detallado del sistema. Diseños de segundo orden.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al aplicar ambos diseños de screening, se generó un diseño experimental de segundo orden para evaluar en detalle los efectos de los dos principales CMPs e identificar las condiciones experimentales óptimas para cumplir con los criterios establecidos para todos los CMAs de manera simultánea.

El diseño DFC2, se aumentó mediante el uso del software, agregando nuevos puntos experimentales adecuadamente distribuidos dentro del entorno experimental, de manera de obtener un DDO1 que permitiera evaluar el efecto de los términos cuadráticos.

La matriz experimental y las respuestas obtenidas al ejecutar estos nuevos puntos experimentales se muestran en la **Tabla 1.12**. Como se observa, todos los CMAs alcanzaron valores aceptables en la mayoría de las corridas cromatográficas, por consiguiente, las respuestas fueron modeladas y analizadas para encontrar una solución apropiada dentro del entorno experimental evaluado.

Tabla 1.12: Plan de experimentación y resultados obtenidos al aplicar el DDO1

Corrida	CMPs ^a		CMAs ^b			
	x1 (mM)	x2 (mM)	y1	y2	y3	y4
1	800	50.0	73295	1.87	181695	1.58
2	1200	50.0	122731	1.51	96442	2.64
3	800	80.0	58694	1.85	118164	1.95
4	1200	80.0	92895	1.47	90946	2.90
5	1000	65.0	124124	1.61	108799	2.70
6	1000	65.0	121681	1.61	108743	2.75
7	1000	65.0	119004	1.59	106109	2.89
8	1200	70.0	109055	1.48	88613	2.49
9	933.3	50.0	89569	1.59	126849	1.70
10	1068	50.0	118675	1.54	118223	2.04
11	933.3	80.0	97816	1.53	86320	1.75
12	1068	80.0	96857	1.54	120801	2.69
13	1000	65.0	115641	1.51	128471	2.44
14	1000	65.0	113629	1.55	128073	2.35
Rango de respuestas	Mínimo		58694	1.47	86320	1.58
	Máximo		124124	1.87	181695	2.89

^a CMPs: x1: concentración de la SR (mM) y x2: concentración de cobre en la fase móvil (mM).

^b CMAs: y1: área de INH, y2: Rs INH-PZA, y3: área de EMB e y4: Rs CE – EMB.

En la **Tabla 1.13** se resumen los resultados de los modelos. Se obtuvo para cada uno el R²-adj para estimar la bondad del ajuste y Q² para evaluar la capacidad del modelo para predecir nuevas observaciones. Para el modelo de y3 el Q² es bajo respecto al de los demás, lo fue debido a la mayor variabilidad en los resultados obtenidos para las mismas condiciones experimentales. Este resultado afecta en cierta medida al R², el cual también resultó más bajo en comparación al resto. De todas maneras, los modelos resultaron significativos.

Tabla 1.13: Análisis de los modelos ajustados

CMA	Rango	Modelo	Términos significativos (xi)	Término ^a Adicionado	ANOVA valor <i>p</i> ^b		R ² - <i>adj.</i>	Q ²
					Modelo	Falta de Ajuste		
y1	58694 - 124124	Cuadrático	x_1, x_2, x_1^2, x_2^2	-	<0.0001	0.071	0.896	0.727
y2	1.47 - 1.85	Cuadrático	x_2, x_2^2	-	<0.0001	0.416	0.873	0.820
y3	86320 - 181695	Lineal	x_1, x_2, x_1x_2	-	0.0020	0.302	0.758	0.448
y4	1.58 - 2.89	Cuadrático	x_1, x_2, x_2^2	x_2	0.0060	0.256	0.700	0.428

^a Término adicionado para mantener la jerarquía.

^b Valor *p* menor a 0.05 indica parámetro significativo.

A continuación, se obtuvieron y evaluaron las gráficas de contorno de cada modelo ajustado. En la **Figura 1.9** se puede observar claramente, el comportamiento de cada uno de los CMAs. Si bien, todas respuestas se encuentran dentro de un rango de valores aceptables, las más comprometidas fueron *y1* e *y3*, teniendo en cuenta que el objetivo principal era obtener condiciones experimentales que maximicen la sensibilidad del método. Por lo tanto, fue requisito lograr un compromiso entre estos dos CMAs para definir el MODR.

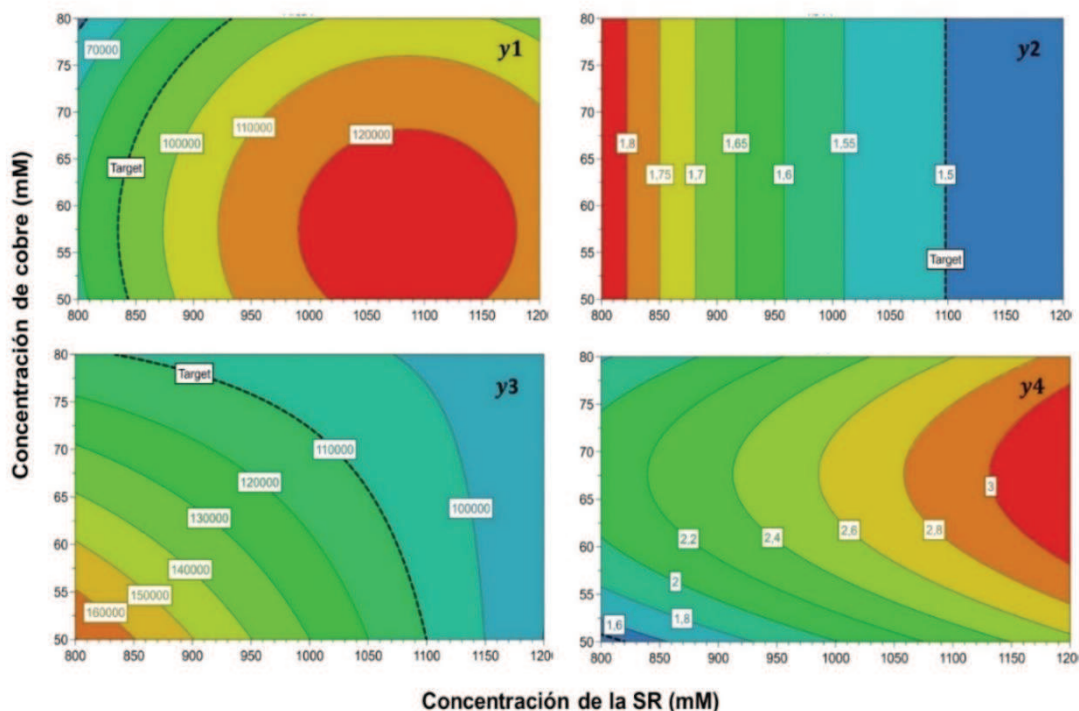


Figura 1.9: Gráficos de contorno de los modelos ajustados para cada CMA en el entorno experimental evaluado en función de los CMPs a una velocidad de flujo constante de 1.15 mL/min

1.4.2.8. Definición del MODR, punto óptimo, punto robusto y espacio de control

El MODR se definió en este caso mediante simulaciones de Monte Carlo a partir de los modelos de regresión ajustados, considerando la incertidumbre de los coeficientes y la variabilidad esperable para los CMPs (concentración de la SR ± 50 mM y concentración de cobre ± 5.0 mM). Esta simulación permitió estimar la probabilidad de falla de alcanzar los objetivos propuestos (Tabla 1.8). Esto puede verse gráficamente como el espacio de diseño (según MODDE). Para generar esta gráfica fue necesario establecer un límite de aceptación de no cumplir con los criterios establecidos para las CMAAs, que en este caso fue del 5%, y el tipo de intervalo de estimación requerido (en este caso se seleccionó una tolerancia del 95% con una confianza del 95%) (Fig. 1.10).

Dentro del MODR, se obtuvo un punto óptimo (indicado como un círculo en la Fig. 1.10) y un punto robusto (indicado como una cruz en la Fig. 1.10). El punto óptimo refiere a las condiciones experimentales que proporcionan el máximo de la función Deseabilidad considerando los objetivos de optimización fijados para los CMAAs, mientras que el punto robusto proporciona condiciones experimentales que son menos sensibles a las variaciones de los CMPs, manteniendo la calidad de los CMAAs dentro de los límites establecidos (Tabla 1.14).

El punto óptimo resultó en la siguiente combinación de los CMPs: concentración de la SR igual a 1019 mM y concentración de cobre de 61.6 mM; mientras que el punto robusto resultó en una concentración de la SR de 930 mM y una concentración de cobre de 60.0 mM. En términos de probabilidad de falla, este último presentó menor riesgo de cumplimiento de los criterios, 1.7 % frente a 4.8 % para el punto óptimo.

Tabla 1.14: Criterios para la optimización

Parámetro	Objetivo	Criterios de aceptación		
		Límite inferior	Límite superior	
CMPs	<i>x1</i>	En rango	800	1200
	<i>x2</i>	En rango	50.0	80.0
CMAAs	<i>y1</i>	Maximizar	60000	90000
	<i>y2</i>	Maximizar	1.0	1.5
	<i>y3</i>	Maximizar	80000	110000
	<i>y4</i>	Maximizar	1.0	1.5

Por otro lado, en la Figura 1.10 se muestra un rectángulo en línea de punto que corresponde a una visualización en 2D de un volumen (hipercubo) en torno al punto robusto y que define el EC del método. Dentro de este hipercono ninguna combinación de los CMPs compromete el alcance

de los criterios de aceptación de los CMAs resultando en las siguientes probabilidades de fallar: $y_1 = 0.01\%$, $y_2 = <0.01\%$, $y_3 = 1.0\%$ y para $y_4 = 0.68\%$ (en el punto robusto). Los límites corresponden a la variación de los CMPs ($x_1 = 880 - 980$ mM y $x_2 = 55.0 - 65.0$ mM) donde las probabilidades de no cumplir con los criterios resultaron las siguientes: para $x_1 = 880$ mM y $x_2 = 55.0$ mM en 4.71% , para $x_1 = 880$ mM y $x_2 = 65.0$ mM en 3.50% ; para $x_1 = 980$ mM y $x_2 = 55.0$ mM en 2.32% y para $x_1 = 980$ mM y $x_2 = 65.0$ mM en 4.54% .

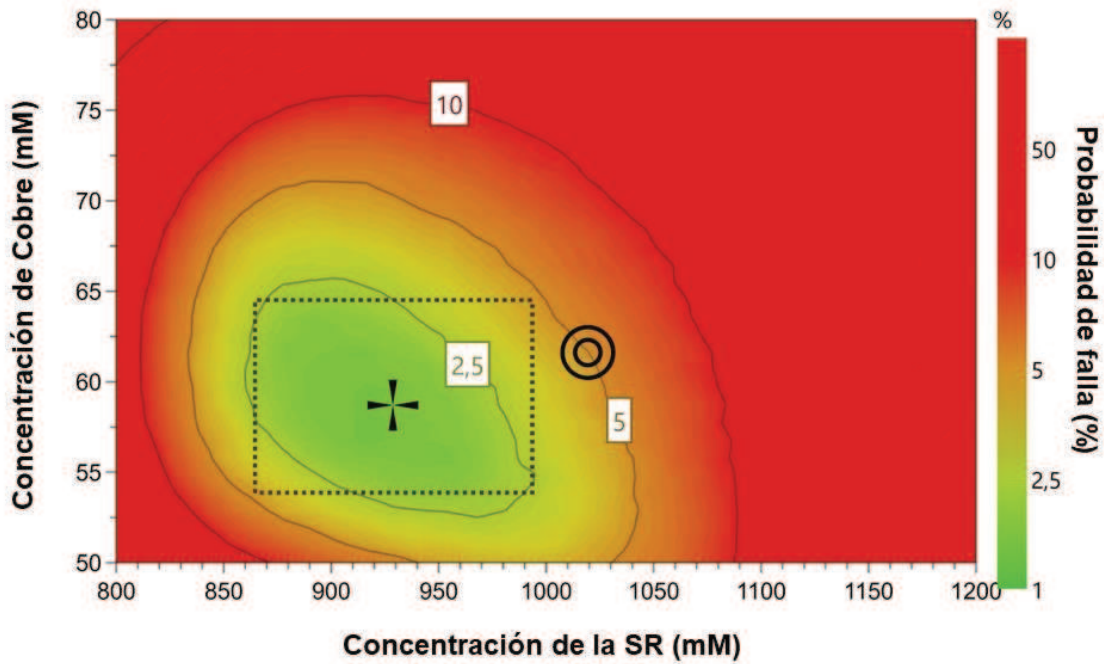


Figura 1.10: MODR para todos los CMAs en función de los CMPs expresado como un mapa de probabilidad de falla %. La zona verde representa el MODR. El punto óptimo ($x_1 = 61.6$ mM y $x_2 = 1019$ mM) está representado por un círculo negro y el punto robusto ($x_1 = 60.0$ mM y $x_2 = 930$ mM) como una cruz negra. Los números dentro de los recuadros blancos representan la probabilidad de falla expresada en % y el rectángulo en línea de punto representa el espacio de control.

Para establecer las condiciones operativas del método se seleccionó, en este caso, al punto robusto como punto de trabajo. En este punto las respuestas predichas por los modelos ajustados para cada CMA junto a sus intervalos de tolerancia del 95 % fueron: $y_1 = 109611$ (101835 - 117387), $y_2 = 1.63$ (1.59 - 1.67), $y_3 = 131461$ (120930 - 141991) e $y_4 = 2.29$ (2.01 - 2.58).

1.4.2.9. Validación experimental del espacio de control

Las respuestas predichas por los modelos para el punto de trabajo, al igual que el EC fueron validados experimentalmente mediante un enfoque multivariado aplicando un diseño de primer orden. Para tal fin se corrió un DDO2 con un total de 7 pruebas experimentales con 3 réplicas del punto de trabajo. Los rangos de variación de los CMPs fueron $x_1 = 880 - 980$ mM y $x_2 = 55.0 -$

65.0 mM, y centrados al alrededor del punto de trabajo y en concordancia con el espacio de control. Se utilizó una muestra de plasma fortificado con los tres analitos en las mismas concentraciones evaluadas en el resto de los diseños.

Los resultados de la aplicación del DDO2 se muestran en la **Tabla 1.15**, los que evidenciaron que hay un alto grado de aseguramiento en lograr los objetivos propuestos.

Tabla 1.15: Plan de experimentación y resultados del DDO2

Corrida	CMPs ^a		CMAs ^b			
	x1 (mM)	x2 (mM)	y1	y2	y3	y4
1	55	880	109029	1.56	130906	2.35
2	55	980	104618	1.70	99683	2.78
3	65	880	104896	1.51	91506	2.44
4	65	980	104442	1.60	106462	1.71
5	60	930	103490	1.70	135618	2.58
6	60	930	109207	1.70	132429	2.49
7	60	930	104515	1.70	136327	2.65

^a CMPs, x1: concentración de la SR (mM) y x2: concentración de cobre en la fase móvil (mM).

^b CMAs, y1: área de INH, y2: *Rs* INH – PZA, y3: área de EMB e y4: *Rs* CE – EMB.

Finalmente, se confirmó experimentalmente (n=3) la calidad de los CMAs mediante la evaluación del punto de trabajo. Las respuestas en promedio fueron: y1= 105735, y2= 1.70, y3 = 134791, y4= 2.57, en concordancia con lo predicho por los modelos y confirmando de esta manera que las condiciones experimentales seleccionadas proporcionan robustez al método (**Fig. 1.11**).

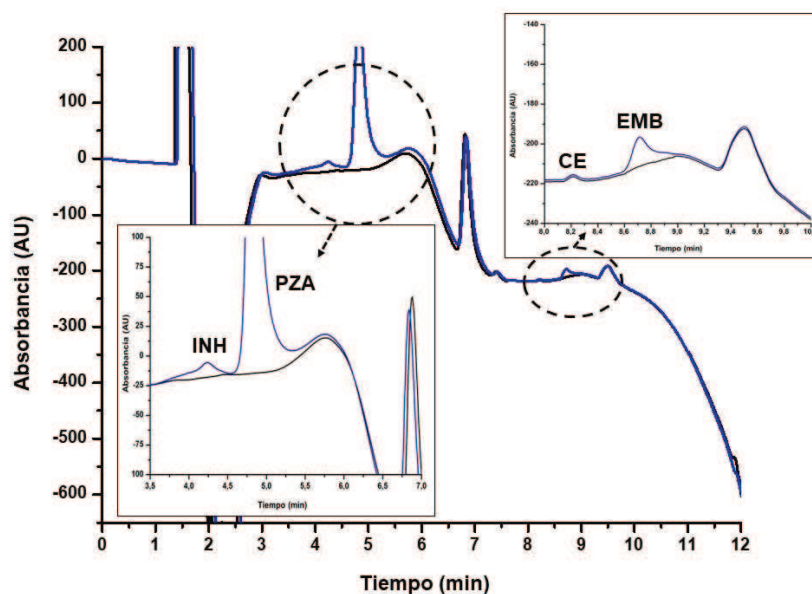


Figura 1.11: Cromatograma registrado a 270 nm en las condiciones del punto de trabajo, de una muestra de plasma fortificada con EMB (4.0 µg/mL), INH (6.0 µg/mL) y PZA (40 µg/mL) (azul) frente a una muestra de plasma blanco (negro).

Como se observa en la **Figura 1.11**, definiendo las condiciones operacionales en el punto de trabajo se logró una disminución en los tiempos de retención de los analitos: 4.23 min., 4.82 min. y 8.72 min para INH, PZA y EMB en relación con los obtenidos antes de la optimización del método (**Tabla 1.7** y **Fig. 1.5**). Se alcanzaron también, señales analíticas adecuadas de acuerdo a los criterios establecidos para lograr la sensibilidad requerida. Esto se manifestó principalmente en el área obtenida para INH, la que aumentó de 29530 a 109611 para una misma concentración en plasma. Finalmente, la selectividad del método se mantuvo dentro de los criterios establecidos superando el límite de 1.5 en todas las *Rs* evaluadas.

1.4.3. Validación del método

En primer lugar, se redactaron los Procedimientos Operativo Estándar Bioanalítico de Medicamentos para la determinación de etambutol, isoniacida y pirazinamida en plasma humano (**POE_BAM_008**) y el correspondiente Procedimiento Operativo Estándar de Validación (**POE_VBAM_008**), ambos documentos pertenecientes al Sistema de Gestión de la Calidad del LCCM – FBCB - UNL.

Los parámetros de rendimiento del método evaluados fueron: selectividad, curva de calibrado y modelo de predicción, precisión intra-ensayo e inter-ensayo, sesgo, exactitud (evaluación conjunta del sesgo y precisión) y la estabilidad de las muestras procesadas en el inyector siguiendo recomendaciones de la guía de validación de método bioanalíticos ICH [70].

1.4.3.1. Selectividad

Como se mencionó anteriormente, la selectividad se abordó desde el inicio del desarrollo del método, estableciendo condiciones de trabajo que garanticen resoluciones satisfactorias de los analitos de interés. La selectividad se asignó demostrando la ausencia de señal analítica en los tiempos de retención de los analitos de interés durante el análisis del solvente de inyección (n=3) y de plasmas heparinizados obtenidos de diferentes personas no medicadas (n=6), Estos resultados se muestran en la **Figura 1.11**, donde se observa que ni el solvente de inyección ni el PB presentaron señal en los tiempos de retención de INH, PZA y EMB a la longitud de onda de monitoreo de los analitos.

1.4.3.2. Curva de calibrado y modelo de predicción

Para establecer los modelos de predicción del método para cada uno de los analitos se construyeron curvas de calibrado multinivel con las MCs descritas en la **Tabla 1.3** de la sección **1.3.4** en siete niveles de concentración por duplicado cada nivel en tres días diferentes. Esto resultó en un total de nueve curvas de calibrado, tres para cada analito.

En la **Tabla 1.16** se muestran los resultados obtenidos en un día de trabajo. Resultados similares se obtuvieron para los otros dos días.

Tabla 1.16: parámetros de regresión estimados a partir de las curvas multinivel para cada analito.

Parámetro	EMB	INH	PZA
Analito			
Rango analítico (µg/mL)	2.0 – 20	3.0 – 20	10 – 100
R ²	0.9981	0.9966	0.9930
Peso	-	-	1/x ²
Pendiente (b)	24967.2	22977.2	82860.5
Sb	311.7	388.2	2018.0
Ordenada al origen (a)	-15069.9	-17785.3	110679.0
Sa	3586.1	4208.7	44333.2
IC 95%	[(-22883.3) - (-7256.4)]	[(-26995.1) - (-8615.4)]	[14085.4 – 207273.0]

La ecuación de regresión está dada por $y = a + bx$; R², coeficiente de determinación del modelo de regresión
 Sa: desvío estándar de la ordenada al origen y Sb, desvío estándar de la pendiente.
 IC 95%, intervalo de confianza de la ordenada al origen calculado con un 95% de confianza.

De esta manera, los modelos de predicción quedaron representados por la ecuación general:

$$CP = \frac{SA - a}{b}$$

donde SA es la señal analítica, a es la ordenada al origen de la ecuación de regresión, b es la pendiente de la ecuación de regresión y CP es la concentración predicha del analito en la MC, MQ o MR.

1.4.3.3. Precisión intra-ensayo e inter-ensayo

El estudio de precisión se llevó a cabo mediante el procesamiento de las MQ descritas en la **Tabla 1.4** de la sección **1.3.4**, es decir cuatro niveles de concentración por quintuplicado en tres días diferentes.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la precisión se muestran en la **Tabla 1.17** Como se observa, tanto para repetibilidad como para precisión intermedia se cumplen con los

criterios de aceptación establecidos para métodos bioanalíticos ($CV \leq 15\%$ para todos los niveles, excepto para LIC donde el $CV \leq 20\%$).

1.4.3.4. Sesgo

Para el estudio del sesgo del método en la cuantificación de cada uno de los analitos, se utilizaron los datos obtenidos experimentalmente en el estudio de precisión y se calculó el bias en términos porcentuales (b%). El criterio de aceptación establecido para este parámetro fue de $\pm 15\%$ para todos los niveles, excepto para el LIC donde puede ser $\pm 20\%$, los que se cumplieron satisfactoriamente. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 1.17**.

1.4.3.5. Exactitud. Evaluación conjunta de sesgo y precisión.

La exactitud se evaluó teniendo en cuenta la incertidumbre aceptable del resultado informado tal cómo se indica en el ATP. Por lo tanto, se calcularon los intervalos de tolerancia (95% confianza) del b% promedio para cada analito para un $P=0.90$ y $\alpha=0.10$, tal como se explicó en la sección **IV.3.1.8.6**.

Los resultados de esta evaluación se muestran en la **Tabla 1.17**. Como se observa en dicha tabla los límites inferior y superior del b% promedio obtenido para cada analito se encuentran en el rango de los límites de incertidumbre aceptables para el ATP propuesto ($\pm 15\%$ y $\pm 20\%$ para el LIC).

Tabla 1.17: Resultados del estudio de precisión (intra e inter-ensayo), sesgo y exactitud.

Precisión (n=5 por nivel)	EMB		INH		PZA	
	CVr(%) ^a	CVi(%) ^b	CVr(%) ^a	CVi(%) ^b	CVr(%) ^a	CVi(%) ^b
LIC	4.7	3.9	5.6	3.5	6.0	4.4
3 x LIC	4.7	3.0	3.7	2.8	5.8	3.7
0.5 x LSC	5.1	4.1	3.5	2.2	6.3	3.9
0.75 x LSC	3.3	3.0	5.2	5.2	4.2	2.6
Sesgo (n=5 por nivel)	(b%)^c					
LIC	3.6		5.9		5.5	
3 x LIC	-0.4		-8.3		7.7	
0.5 x LSC	-5.6		-9.0		4.3	
0.75 x LSC	2.2		-4.6		-2.0	
Exactitud (n=60)	β					
	0.8		-2.0		2.7	
	Desvío estándar general de					
	β (S)					
	6.6		6.2		4.4	
	Intervalo de Tolerancia de β ($P=0.90$, $\alpha=0.05$)					
	LI-T^d	LS-T^e	LI-T	LS-T	LI-T	LS-T
	-11.7	13.3	-13.7	9.75	-5.64	11.0

^a Coeficiente de variación obtenido para el ensayo de precisión intra-ensayo: un día, un analista.

^b Coeficiente de variación obtenido para el ensayo de precisión intermedia: tres días, tres analistas.

^c bias porcentual obtenido para un día de trabajo.

^d Límite inferior de tolerancia de β .

^e Límite superior de tolerancia de β .

1.4.3.6. Estudios de estabilidad

En primer lugar, el plazo máximo para la conservación y uso de las SESs se estableció en 48 hs conservadas en la heladera a 4 – 8°C, teniendo en cuenta que su preparación se debe hacer en el día de uso para obtener las MQs, según lo detallado en la estrategia de control que se menciona en la sección **1.4.4**.

En la bibliografía consultada se encontraron reportados estudios de estabilidad de las muestras de plasma para la determinación de los analitos. Los mismos indican que las muestras resultan estables al menos 4 (cuatro) horas sobre la mesada del laboratorio y pueden conservarse a -20.0°C durante 4 (cuatro) semanas. Además, pueden someterse a hasta 3 (tres) ciclos de congelado (-20.0°C) y descongelado sin degradación significativa de los analitos.

Finalmente, se realizó un estudio de estabilidad de manera de conocer los periodos aptos para el análisis de las muestras procesadas conservadas a temperatura ambiente en el inyector del cromatógrafo. Para ello se utilizaron MQs en dos niveles de concentración: 3 x LIC y 0.75 x LSC. Los extractos analizados resultaron estables durante al menos 9 (nueve) horas observándose una relación de la SA respecto de la inicial en los rangos de 93.5 – 107.3% para EMB, de 98.3 – 105.7% para INH y de 97.7 – 102.7% para PZA.

1.4.4. Estrategia de control y monitoreo continuo de método.

Una vez finalizada la validación del método se estableció una estrategia de control de manera de asegurar el mantenimiento del rendimiento de calidad durante todo el tiempo que el mismo se use en el análisis rutinario.

Por un lado, en la versión final del **POE_BAM_008** se estableció la estrategia de control mediante la descripción detallada de la preparación de la fase móvil para asegurar que tanto la concentración de la SR como la de cobre resulten adecuadas. Para ello se describió detalladamente los rangos de las masas a pesar de acetato de sodio y acetato de cobre, como así también el rango de volumen de ácido acético, con el fin de obtener una SR de concentración de 930 mM \pm 50 mM y una concentración de cobre de 60.0 mM \pm 5.0 mM, tanto en la SR a pH= 5.00 como en MeOH (modificador orgánico). El resto de los CMPs corresponden a variables instrumentales que pueden mantenerse bajo control de manera relativamente sencilla en un instrumento con calificación operacional periódica.

Por otro lado, se consignaron en el mismo POE los requerimientos de SST del sistema cromatográfico para cada corrida analítica y la evaluación del desempeño del método. En ambos casos, se propuso la utilización de MQs en dos niveles de concentración correspondientes al LIC y 3xLIC para cada uno de los analitos. Las MQs se procesan por duplicado, siendo los criterios de aceptación los siguientes:

- Tiempos de retención relativos de aproximadamente 0.85, 1.0 y 1.80 para INH, PZA y EMB.
- Resolución entre INH y PZA y cualquier pico correspondiente a CE y EMB debe ser ≥ 1.5 .
- El b% en la predicción de la concentración de los analitos en las MQs debe ser $\pm 20.0\%$ para LIC y $\pm 15.0\%$ para 3xLIC.
- El CV entre las réplicas de las MQs debe ser $\leq 20.0\%$ para LIC y $\leq 15.0\%$ para 3xLIC.

La implementación de estos criterios de aceptación asegura el cumplimiento del ATP, y minimiza el riesgo de cometer errores en la cuantificación de los fármacos en las muestras reales.

Finalmente, se incorporó el uso de cartas control para los parámetros b% y CV de las MQs, como instrumento para el seguimiento del desempeño del método como así también para la detección de tendencias de los resultados obtenidos.

1.5. CONCLUSIONES

Mediante la aplicación de las herramientas propuestas por el enfoque AqBd se logró el desarrollo de un nuevo método bioanalítico para la determinación simultánea de tres antibióticos tuberculostáticos de primera línea: etambutol, isoniacida y pirazinamida en plasmas de pacientes bajo tratamiento para la tuberculosis sensible a los fármacos mencionados.

El método, basado en CLAR con detección en el UV es simple ya que no requiere de equipamiento sofisticado, económicamente conveniente y permite generar resultados en cortos tiempos de análisis. Mediante la aplicación de una estrategia experimental adecuada se logró generar valioso conocimiento sobre el comportamiento del método desde las primeras etapas de su desarrollo. El análisis de riesgos y la aplicación de DOE permitieron arribar exitosamente a condiciones experimentales óptimas y robustas que aseguran un buen desempeño analítico. Durante su evaluación formal se demostró que el método cumple con los parámetros de rendimiento establecidos en las guías internacionales para métodos bioanalíticos.

El método se encuentra disponible en el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral y podrá ser utilizado próximamente para llevar a cabo el MTD de los antibióticos tuberculostáticos mediante convenios existentes con centros de salud pública de nuestro medio.

CAPÍTULO 2

**DETERMINACIÓN DE CEFTAZIDIMA, MEROPENEM Y
PIPERACILINA EN PLASMA DE PACIENTES POLIMEDICADOS
CRÍTICAMENTE ENFERMOS**

2.1. INTRODUCCIÓN

2.1.1. Tratamientos con antibióticos en pacientes con terapias de reemplazo renal

2.1.1.1. Problemática general

Según publicaciones recientes, es muy frecuente encontrar niveles sub-terapéuticos de antibióticos en los fluidos biológicos de los pacientes críticamente enfermos cuando se aplican los regímenes de dosificación habituales [116]. Este grave inconveniente se atribuye a cambios pronunciados en la pK/pD de las drogas en este tipo de pacientes, lo que se suma a la variabilidad inter-individual [117–119].

Con una especial dificultad se presenta el caso de los enfermos que deben ser sometidos a terapias de reemplazo renal (TRR) ya que este tipo de terapias, destinadas a suplir la función renal disminuida, alteran la eliminación de los fármacos de manera significativa en relación a la farmacocinética de los pacientes con función renal conservada, poniendo muchas veces en riesgo la eficiencia de los tratamientos farmacológicos [120, 121].

Es, por lo tanto, de sumo interés poder conocer las concentraciones que alcanzan los antibióticos en los fluidos biológicos en esta población particular de pacientes, ya que esto permite, en primer lugar, validar las recomendaciones terapéuticas vigentes y, por otro lado, realizar los ajustes de las dosis individualmente para cada uno de ellos. El alcance de estos objetivos es de enorme importancia para garantizar la eficacia de las antibioticoterapias, logrando no sólo el beneficio del paciente, sino también la reducción de la selección de cepas mutantes resistentes a los antibióticos disponibles.

2.1.1.2. Problemática particular

En un análisis interdisciplinario llevado a cabo entre los grupos de la unidad de terapia intensiva (UTI), el laboratorio central (sección UTI) y el servicio de farmacia del hospital público “José María Cullen” de la ciudad de Santa Fe, Argentina y el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (LCCM–FBCB–UNL) durante los años 2017-2020, se verificó que los antibióticos más comúnmente utilizados en la UTI del mencionado centro de salud para el tratamiento de pacientes sometidos a TRR eran la vancomicina (VCM), la colistina (COL), la ceftazidima (CAZ), el meropenem (MEM), y la piperacilina (PIP); estos últimos tres pertenecientes al grupo de los antibióticos betalactámicos (β -LA).

Mientras que los niveles plasmáticos de VCM se dosaban de rutina mediante un inmunoensayo en los pacientes de la UTI con TRR para realizar el ajuste de dosis necesario, con los β -LA se trabajaba de manera empírica, siguiendo esquemas de dosificación propios del hospital, pero sin garantía de alcanzar los objetivos terapéuticos recomendados a nivel internacional.

2.1.1.3. Contribución al abordaje de la problemática

La contribución de este capítulo de tesis a la resolución del problema planteado por necesidad de conocer el comportamiento de los niveles plasmáticos de los β -LA utilizando esquemas de dosificación propios del hospital; consistió en poner a disposición del sistema salud un método bioanalítico accesible, eficiente y de calidad para ser utilizado en el MTD de estos antibióticos. La implementación del mismo se detalla en el **Capítulo 3** de la presente tesis.

2.1.2. Antibióticos betalactámicos

2.1.2.1. Clasificación

La familia de los antibióticos β -LA se define químicamente por la presencia del anillo betalactámico en la estructura de los compuestos. Este anillo es el que determina el mecanismo de acción (inhibición de la síntesis de la pared celular), la escasa toxicidad directa (actúa sobre la pared celular del microorganismo) y el principal mecanismo de resistencia (las betalactamasas) de esta familia de antibióticos. No obstante, para que el fármaco sea activo, es preciso que el anillo esté unido a otros radicales (habitualmente otros anillos) lo que le confiere propiedades bactericidas o bacteriostáticas. Muchas de estas moléculas son sensibles a las betalactamasas (enzimas producidas por bacterias que rompen el anillo betalactámico), por lo que suelen administrarse en combinación con fármacos inhibidores de las betalactamasas.

La asociación de diferentes tipos de cadenas lineales, junto con las características propias del esqueleto básico formado por los dos anillos centrales (llamado núcleo), modifica las propiedades del compuesto resultante y da lugar a los diferentes grupos de antibióticos [122]:

- Las penicilinas constituyen los primeros antibióticos de este tipo. En estas moléculas el anillo betalactámico está unido a un anillo tiazolidínico. Según su actividad antibacteriana se dividen a su vez en penicilinas naturales, semisintéticas y las resistentes a penicilinasas. Pertenecen a este último grupo las carboxipenicilinas (carbenicilina y ticarcilina) y ureidopenicilinas (mezlocilina, azlocilina y piperacilina).

- Las cefalosporinas constituyen el segundo grupo de derivados betalactámicos siendo el más amplio en cuanto a moléculas desarrolladas y comercializadas. El segundo anillo del núcleo es un anillo dihidrotiacínico. Las cefalosporinas se agrupan por generaciones que incluyen desde la de primera generación a la quinta. La mayoría son bactericidas contra Gram negativos y positivos, pero dependiendo de la generación a la que pertenezcan actúan sobre uno u otro grupo de microorganismos. Dentro de las cefalosporinas de primera generación se destaca la cefazolina de administración parenteral y el cefadroxilo de administración oral. Las de segunda generación presentan mayor resistencia a las betalactamasas (cefuroxima, cefoxitina). En el caso de las de tercera generación, la ceftazidima es la única molécula con actividad frente *Pseudomona aeruginosa*, pero también se incluyen en este grupo la ceftriaxona, cefotaxima, entre otras. Las últimas generaciones incluyen a cefepima (4ta generación) y ceftarolina (5ta generación).

- Los carbapenémicos tienen en su estructura un anillo pirrolínico, incluyen entre otros a meropenem, imipenem, doripenem y ertapenem. Son bactericidas por vía parenteral que tienen un espectro de actividad extremadamente amplio. Muchas de las bacterias multirresistentes que se transmiten en el ámbito hospitalario son sensibles sólo a este grupo de antibióticos.

- Los monobactámicos, a diferencia de otros β -LA, tienen un solo anillo en su estructura. En general tienen poca actividad antimicrobiana, destacándose para uso clínico el aztreonam

- Los inhibidores de las betalactamasas tienen un anillo oxazolidínico unido al anillo betalactámico. Estos compuestos no tienen de por sí actividad antimicrobiana, sino que impiden la acción de las betalactamasas. Dentro de este grupo podemos encontrar a: tazobactam, sulbactam, ácido clavulánico y avibactam.

2.1.2.2. Índice pK/pD y objetivos terapéuticos

La actividad antibacteriana de los β -LA es del tipo tiempo-dependiente. Es decir, la relación pK/pD asociada a una actividad óptima está definida % T> CIM [123, 124].

Además, dependiendo de la clase de β -LA, se proponen en general diferentes porcentajes del intervalo de tiempo de dosificación en el cual debe cumplirse este requerimiento, es decir, diferentes objetivos terapéuticos. A saber [124, 125]:

- Penicilinas: 50 % T> CIM
- Cefalosporinas: 60 – 70 % T> CIM
- Carbapenémicos: 40 % T> CIM

En el caso de los pacientes críticamente enfermos, que a su vez se encuentran bajo algún tipo de TRR, se sugieren objetivos terapéuticos más exigentes para lograr una terapia eficaz. Estos

pueden alcanzarse mediante exposiciones más prolongadas a la concentración inhibitoria del antibiótico ($100\%T > CIM$) y/o más elevadas ($2 - 5 \times CIM$) [123].

2.1.3. Ceftazidima, meropenem y piperacilina

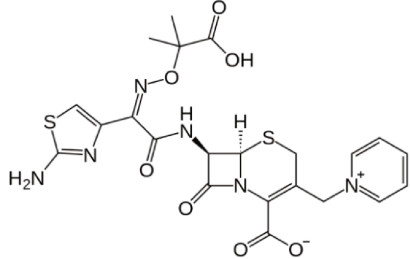
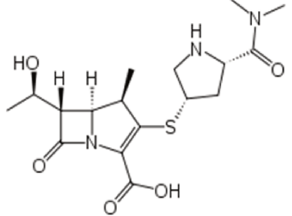
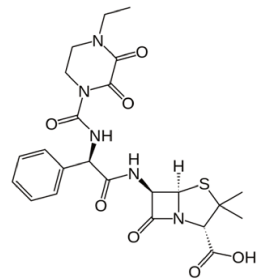
La CAZ es una cefalosporina de tercera generación que se administra de manera parenteral. Es de elección en el tratamiento empírico de las infecciones urinarias en las que se sospecha que pueda estar implicada *Pseudomona aeruginosa*. Además, la asociación *ceftazidima/avivactam* se utiliza en el tratamiento de las infecciones intraabdominales complicadas, del tracto urinario (incluyendo la pielonefritis), para el tratamiento de la neumonía nosocomial (incluyendo la neumonía asociada a ventilación mecánica) y para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram negativas aerobias en pacientes con opciones de tratamiento limitadas [122].

El MEM se utiliza para el tratamiento de diversos cuadros infecciosos: neumonías, infecciones del tracto urinario, infecciones intraabdominales, ginecológicas, dermatológicas, meningitis en monoterapia o en combinación con agentes antivirales o antifúngicos [126, 127].

La PIP es efectiva contra una gran variedad de microorganismos, incluyendo aquellos resistentes a la penicilina como el *Streptococcus pneumoniae*. Es común encontrar preparaciones comerciales de este antibiótico asociado con inhibidores de la betalactamasa, tal como tazobactam. Este inhibidor de betalactamasas tiene un efecto sinérgico, empleándose una combinación de ocho partes de PIP por una parte de tazobactam. Se utiliza en el tratamiento de infección bacteriana en pacientes neutropénicos, infección urinaria complicada (incluida pielonefritis) y no complicada, intraabdominal, ginecológica, de piel y partes blandas, polimicrobianas causadas por microorganismos aerobios y anaerobios, septicemia bacteriana y neumonía nosocomial. Es activa frente a casi todos los estafilococos sensibles a la metilina, los estreptococos y los enterococos [128, 129].

En la **Tabla 2.1** se detallan las propiedades fisicoquímicas más relevantes y la estructura molecular de los tres antibióticos de interés.

Tabla 2.1: Información propiedades fisicoquímica de los analitos

Propiedades	Ceftazidima	Meropenem	Piperacilina
Tipo de compuesto	Semisintético del subgrupo de las cefalosporinas.	Semisintético del grupo de los carbapenems.	Semisintético perteneciente a la clase del ureido penicilinas.
Formula química	$C_{22}H_{22}N_6O_7S_2$	$C_{17}H_{25}N_3O_5S$	$C_{23}H_{27}N_5O_7S$ (anhidra)
Estructura molecular			
Peso fórmula	Anhidro: 546.573 g/mol Pentahidrato: 636.67 g/mol	Anhidro: 383.464 g/mol. Trihidrato: 437.508 g/mol	Anhidra: 517.557 g/molL Sódica: 539.54 g/molL
Solubilidad	Soluble en álcalis y dimetilsulfóxido; poco soluble en dimetilformamida, metanol y agua; insoluble en acetona, alcohol, cloroformo, dioxano, éter, acetato de etilo y tolueno. Su solubilidad en agua se ve favorecida gracias al agregado de carbonato de sodio.	Se ve aumentada gracias al agregado de carbonato de sodio. Es bastante soluble en agua, muy poco soluble en alcohol, prácticamente insoluble en acetona y éter, y soluble en dimetilformamida y en una solución al 5% p/v de fosfato monobásico de sodio.	La piperacilina sódica es soluble en agua o metanol (1 g en 1.5 mL) o en alcohol etílico (1 g en 5 mL).
Temperatura de almacenamiento	A temperaturas menores a 30°C protegida de la luz.	En heladera (2 - 8°C) protegido de la luz.	A temperaturas menores a 25°C.
Presentación comercial	Se comercializa hidratada por cinco moléculas de agua junto a carbonato de sodio anhidro, de forma que aumenta su estabilidad. Polvo estéril para reconstituir inyectable de administración endovenosa.	Se comercializa hidratado por tres moléculas de agua junto a carbonato de sodio anhidro, de forma que aumenta su estabilidad. Polvo estéril para reconstituir inyectable de administración endovenosa.	Se comercializa en forma sódica junto a tazobactam (inhibidor de betalactamasas) para potenciar su acción bactericida. Polvo estéril para reconstituir inyectable de administración endovenosa.

2.1.4. Antecedentes analíticos para la cuantificación de antibióticos betalactámicos en fluidos biológicos

En una extensa revisión bibliográfica se pudo determinar que entre el año 2010 y septiembre de 2019, se publicaron 43 trabajos científicos que involucraban 45 desarrollos de métodos analíticos para la cuantificación de uno o más β -LA en matrices biológicas. El objetivo principal de estas publicaciones era determinar los niveles plasmáticos de los antibióticos en pacientes críticamente enfermos para contribuir a la demanda de MTD de los tratamientos farmacológicos [130–151] y para estudios de bioequivalencia en voluntarios sanos [152–156] y/o en pacientes con alguna patología específica [131, 157–161].

La mayoría de los métodos publicados utilizan como técnica a la CLAR-UV o CLAR.MS. Otros métodos describen el uso de un inmunosensor [162], biosensor [132, 163], espectrofluorimetría [152] o ensayos microbiológicos [164]. En cuanto al alcance, se cuantifican simultáneamente, en algunos casos, uno o algunos pocos β -LAs, mientras que en otros hasta más de 10 (diez) fármacos de distintas naturalezas.

El plasma fue el fluido biológico más utilizado para la cuantificación de los β -LA, aunque también se emplearon con menor frecuencia otros fluidos biológicos, tales como suero, orina, fluido peritoneal, cerebrospinal, aspiraciones bronquiales, dializado y/o líquido de micro diálisis.

Si bien en la gran mayoría de los estudios en los que se analiza suero o plasma no se menciona el volumen de sangre extraído de los pacientes, el 50% de los métodos publicados utilizó un volumen de muestra en el rango de 100 – 200 μ L, mientras que el 25% requirió una cantidad que oscila de 15 – 50 μ L. Sin embargo, en el trabajo de Cazorla-Reyes y col. [147] como en el de Dailly y col. [159] los volúmenes son de aproximadamente 1.0 mL e incluso de 2.5 mL [165], lo que implica una extracción de un gran volumen de sangre para el manejo de rutina de pacientes críticamente enfermos.

El pretratamiento por elección en estos métodos fue la PP con algún solvente orgánico, ácido o soluciones salinas concentradas, seguido por centrifugación a altas velocidades para lograr la separación del sobrenadante. En ocasiones los analitos se extrajeron luego del sobrenadante acuoso utilizando ELL; y en algunos procedimientos se separó la capa orgánica, se evaporó a sequedad y el residuo obtenido se reconstituyó en un volumen adecuado de fase móvil u otro solvente compatible para su análisis por CLAR [153, 159, 160, 166]. En otros casos, a la PP le sucedió una SPE [153, 165, 167].

La separación cromatográfica de los analitos se logra con una variedad de columnas con diferentes fases estacionarias como C8 [150, 168], pentafluorofenilo [159] y amidas [149] entre

otras. No obstante, la fase estacionaria más empleada es la C18 [137, 143–146, 151, 153, 160, 165, 169, 170].

La incorporación de un estándar interno se observó en varios trabajos en los que se aplicó SPE [141, 154, 155, 161, 167, 169, 171], ya que este procedimiento de calibración proporciona una estandarización de la recuperación de los analitos. Sin embargo, en métodos con otros tipos de pretratamiento de muestra su utilización no fue debidamente justificada [134, 135, 151, 158–160, 166, 172, 173], introduciendo al procedimiento una complejidad innecesaria. Pero sin dudas, lo más llamativo de la mayoría de estos desarrollos fue la falta de adecuación del rango de calibrado en relación al alcance del método: medir concentraciones de los antibióticos en niveles terapéuticos. Muchas de las calibraciones fueron propuestas en concentraciones que no abarcan estos niveles. De igual manera, llama la atención que en casi ningún desarrollo se haya tenido en cuenta que los pacientes reciben variada medicación concomitantemente al tratamiento antibiótico, pudiendo estas drogas interferir con la determinación de los antibióticos.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

Los objetivos del presente capítulo de tesis fueron:

- Desarrollar un nuevo método bioanalítico por CLAR-DAD para ser aplicado a la determinación simultánea de los niveles plasmáticos de CAZ, MEM y/o PIP en plasmas de pacientes polimedcados.
- Aplicar conceptos de ciclo de vida y AQbD al desarrollo, optimización y validación del nuevo método, siguiendo las recomendaciones de organismos internacionales.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Declaración de ética

Este trabajo fue autorizado por los comités de ética de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral Res.23.09.18 y del hospital “José María Cullen”, ACTA 09/18.

2.3.2. Instrumental y equipamiento

Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo líquido Shimadzu equipado con una bomba cuaternaria LC-20AT, inyector automático con refrigeración SIL-30AC

Nexera, horno de columna CTO-10ASVP, desgasificador DGU-20A5R y un detector UV-Vis con arreglo de diodos SPDM20A.

Se emplearon y evaluaron tres columnas cromatográficas conteniendo octadecilsilano (C18) unido a sílica, de diferentes dimensiones y configuración de partícula:

- **Zorbax Eclipse XDB-C18.** Fase estacionaria C18 ligado a partículas esféricas completamente porosa de 3.5 μm de diámetro. Tamaño de poro de 80 Å. Carga de carbono de 10%. Tiene incorporado un ligando extradenso, XDB (de sus siglas en inglés, eXtra Densely Bonded) de organo-silano y doble desactivación. Dimensión de la columna: 4.6 x 100 mm.
- **Zorbax Eclipse Plus C18.** Fase estacionaria C18 con doble desactivación ligada a partículas esféricas completamente porosa de 3.5 μm de diámetro. Tamaño de poro de 95 Å. Carga de carbono de 8%. Dimensión de la columna: 4.6 x 75 mm.
- **InfinityLab Poroshell 120 EC-C18.** Fase estacionaria C18 ligada a partículas esféricas de 2.7 μm de diámetro con núcleo sólido (1.7 μm) y superficie porosa (0.5 μm). Tamaño de poro de 120 Å. Carga de carbono de 10%. Dimensión de la columna: 3.0 x 75 mm.

Se utilizaron también los siguientes instrumentos, equipos y materiales:

- Peachímetro- potenciómetro Termo Scientific Orion 5 Star.
- Electrodo de pH Van London Co. Modelo 573V526R-003B.
- Microcentrifuga para tubos eppendorf Gelec. Modelo G-134
- Vortex Nevation Modelo iSwix.
- Balanza analítica digital (Incertidumbre: 0.00001 g) Ohaus Discovery Modelo DV 215CD.
- Balanza analítica digital (Incertidumbre: 0.0001g) Sartorius Modelo Entris.
- Equipo de sistema de alimentación ininterrumpida, UPS (de sus siglas en inglés, Uninterruptable Power Supply), KATODO. Modelo EA906.
- Equipo de producción de agua ultrapura Millipore Modelo Simplicity System.
- Material volumétrico de borosilicato Clase A.

2.3.3. Softwares para la adquisición y procesamiento de datos

Para la adquisición y procesamiento de datos cromatográficos se utilizó el software Workstation Labsolution LC/GC versión 5.73 de Shimadzu.

La generación de los diseños experimentales, como así también el análisis de datos mediante la MSR se llevó a cabo con el software Design Expert Versión 11 de prueba (State Ease, Miniapolis).

Para validar el OWP, es decir las condiciones experimentales óptimas y sus rangos operables se llevaron a cabo simulaciones de Montecarlo para lo cual se utilizó el software Oracle Crystal Ball versión de prueba 11.1.2.4.850 (Redhood, CA).

Para el análisis estadístico de los datos de la validación del método se utilizó el programa Microsoft Excel (2013).

2.3.4. Reactivos y muestras

Los estándares farmacéuticos secundarios de ceftazidima pentahidrato (79.1 %p/p de CAZ) y piperacilina/tazobactam (80.6 %p/p de PIP) fueron provistos por Laboratorios Klonal (Buenos Aires, Argentina), mientras que el estándar secundario de meropenem trihidrato (71.8 %p/p de MEM) y el ácido 2- (N-morfolino) etanosulfónico (MES) (BioXtra \geq 99.0%p/p) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA). Los fármacos evaluados en el estudio de la selectividad del método frente a la mediación coadministrada fueron estándares farmacéuticos primarios del Instituto Nacional del Medicamento (INAME), estándares farmacéuticos secundarios generados en nuestro laboratorio, materias primas de calidad farmacéutica cedidas por Laboratorios LAFEDAR (Paraná, Argentina), o preparaciones comerciales adquiridas en farmacias locales (Tabla 2.2).

Los solventes orgánicos, acetonitrilo (ACN) y metanol (MeOH) de calidad cromatográfica se obtuvieron de Sintorgan (Buenos Aires, Argentina), mientras que el cloruro de metileno p.a. (MeCl), cloroformo p.a. (CHL), fosfato monosódico anhidro p.a. (NaH₂PO₄) e hidróxido de sodio p.a. (NaOH) se adquirieron en Cicarelli (San Lorenzo, Argentina). El agua ultrapura se obtuvo en el laboratorio mediante el sistema de purificación de agua Millipore Simplicity.

El PB y las MRs, fueron obtenidos por el personal de la unidad de terapia intensiva mediante solicitud del Laboratorio Central del Hospital “José María Cullen” y remitidos al LCCM-FBCB-UNL con cadena de frío. En ambos casos los plasmas se obtuvieron mediante centrifugación de sangre entera heparinizada (usando heparina de litio como anticoagulante) a 3000 rpm durante 10 min a 4°C y se conservaron a -80°C hasta el día de análisis.

Tabla 2.2: Listado de la medicación coadministrada.

Medicación	Datos/Procedencia
Vancomicina	Producto comercial – ICOPLAX® – Polvo para perfusión - Lote GU06
Dobutamina	Producto comercial – GDR GRAY® – Solución inyectable – Lote 10187
Colistina	Producto comercial – FABRA® – Liofilizado - Certificado: 55646
Metronidazol	Estándar secundario LCCM – Lote 001
Fluconazol	Materia prima – LAFEDAR – Lote: FLP0721013

Hidrocortisona	Materia prima – LAFEDAR – Lote: MP55/08
Morfina	Estándar secundario LCCM – Lote 002
Propofol	Producto comercial – DUBERNARD® NORTHIA – Lote: 34118
Midazolam	Materia prima – LAFEDAR – Lote 204634
Ranitidina	Estándar secundario LCCM – Lote 002
Omeprazol	Producto comercial – SURAR PHARMA® – Certificado: 48117
Salbutamol	Materia prima – LAFEDAR – Lote SCC/88/0512044
Bromuro de Ipatropio	Materia prima – LAFEDAR – Lote IPT-0110317
Dopamina Clorhidrato	Producto comercial – NORTHIA® – Solución Inyectable – Lote 32907
Atracurio besilato	Producto comercial – RICHMOND® – Solución inyectable – Lote JPU8
Furosemida	Estándar secundario LCCM – Lote 001
Amiodarona	Estándar primario INAME – Certificado 104051
Labetalol	Materia prima – LAFEDAR – 316030
Digoxina	Materia prima – LAFEDAR – Lote 1093144
Adrenalina	Producto comercial – FABRA® – Solución inyectable – Lote 4374
Nimodipina	Materia prima – LAFEDAR – Lote 120307
Noradrenalina	Producto comercial – BIOL® – Solución Inyectable – Lote 4970
Clorpromazina	Producto comercial – DUNCAN® – Solución Inyectable – Lote 026-065
Paracetamol	Estándar secundario LCCM – Lote 001
Aspirina	Estándar secundario LCCM – Lote 002

2.3.5. Soluciones de estándares, muestras calibradoras y muestras de control de calidad

Todas las soluciones y muestras aquí mencionadas fueron utilizadas durante el desarrollo y/o la validación del método.

La solución estabilizadora (SEST) se preparó en concentración 1.0 M mediante la disolución de 5.10 g de MES en 25.0 mL de agua ultrapura y se ajustó a pH = 6.0 con NaOH 5.0 M.

Las SRs se prepararon en diferentes concentraciones mediante disolución de una cantidad determinada de NaH₂PO₄ p.a. en agua ultrapura y agregado de un volumen determinado de NaOH 1.0 mol/L controlando el pH mediante el uso de un peachímetro recientemente calibrado.

Las SESs de CAZ, MEM y PIP se prepararon mediante pesada de los estándares farmacéuticos y posterior disolución en agua ultrapura para obtener las siguientes concentraciones objetivo: 4800, 1200, and 9600 µg/mL, respectivamente. Las SESs, se prepararon diariamente y para cada ensayo en particular hasta que se determinó su estabilidad en la validación del método. Luego se conservaron a 4 – 8°C durante un máximo de tres días. Las concentraciones exactas de

las SESs preparadas se calcularon en función de las masas pesadas y la potencia de los estándares usados en cada caso.

Las SESs se diluyeron diariamente con agua ultrapura utilizando material volumétrico clase A para obtener soluciones estándar intermedias combinadas (SEICs) en las concentraciones objetivo indicadas en la **Tabla 2.3**.

Las MCs se prepararon en tubos eppendorf mediante la fortificación de 130.0 µL de PB con 20.0 µL de las diferentes SEICs de manera de obtener 7 niveles de calibración en los rangos analíticos de: 2.00 – 64.0 µg/mL para CAZ, 0.50 – 16.0 µg/mL para MEM y 4.00 – 128.0 µg/mL para PIP (**Tabla 2.3**). Las MCs se prepararon en tres días diferentes cada vez que se ensayó la curva de calibrado multinivel según los requerimientos del procedimiento de validación.

Las MQs se prepararon siguiendo el mismo procedimiento que para las MCs, pero a partir de SES preparadas de manera independiente. Para estas muestras las SEIC se obtuvieron en cuatro niveles de concentración según las concentraciones objetivo de cada analito de manera que permitieran preparar MQs en los niveles correspondientes (**Tabla 2.4**).

Las MQs, al igual que las MCs, fueron preparadas en días diferentes según el requerimiento de los ensayos de validación.

Tabla 2.3: Preparación y rango de concentraciones de las SEICs y las MCs

Nivel	1	2	3	4	5	6	7
Volumen SES (µL)	156.0	156.0	312.0	250.0	500.0	750.0	1000.0
Volumen final, con agua ultrapura (mL)	50.0	25.0	25.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Concentración final CAZ (µg/mL)	15.0	30.0	60.0	120	240	360	480
Concentración final MEM (µg/mL)	3.75	7.50	15.0	30.0	60.0	90	120
Concentración final PIP (µg/mL)	30.0	60.0	120	240	480	720	960
Volumen SEIC (µL)	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Volumen PB (µL)	130.0	130.0	130.0	130.0	130.0	130.0	130.0
Concentración final CAZ (µg/mL)	2.00	4.00	8.00	16.0	32.0	48.0	64.0
Concentración final MEM (µg/mL)	0.50	1.00	2.00	4.00	8.00	12.0	16.0
Concentración final PIP (µg/mL)	4.00	8.00	16.0	32.0	64.0	96.0	128

Tabla 2.4: Preparación y niveles de concentración de las SEICs y MQs

Nivel	LIC	NB	NM	NA
SEIC				
Volumen SES (µL)	156.0	235.0	500.0	750.0

Volumen final, con agua ultrapura (mL)	50.0	25.0	10.0	10.0
Concentración final CAZ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	15.0	45.0	240	360
Concentración final MEM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	3.75	11.25	60.0	90.0
Concentración final PIP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	30.0	90.0	480	720
MQ				
Volumen SEI (μL)	20.0	20.0	20.0	20.0
Plasma blanco (μL)	130.0	130.0	130.0	130.0
Concentración final CAZ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	2.00	6.00	32.0	48.0
Concentración final MEM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.50	1.50	8.00	12.0
Concentración final PIP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	4.00	12.0	64.0	96.0

Las concentraciones exactas de las SEICs, MCs y MQs se calcularon a partir de las concentraciones exactas de las SESs utilizadas en cada caso.

2.3.6. Pretratamiento de las muestras de plasma

El pretratamiento más conveniente para las muestras se estudió y optimizó durante el desarrollo del método (ver sección **2.4.2.4.5**).

En la etapa de validación y en la aplicación rutinaria del método el pretratamiento de las muestras de PBs, MCs, MQs y/o MRs se llevó a cabo de la misma manera mediante el siguiente procedimiento:

- 150.0 μL de plasma se trasvasó a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se estabilizó con el mismo volumen de SEST (1.0 M, pH=6.00).
- Se aplicó vortex durante 20 segundos para homogeneizar la mezcla.
- Se agregó 500.0 μL de ACN, se aplicó vortex durante 20 segundos para permitir la precipitación de proteínas y a continuación se centrifugó a 6000 rpm durante 2 minutos.
- 500.0 μL del sobrenadante se trasvasó a otro tubo eppendorf de 1.5 mL y se agregó 1.0 mL de MeCl.
- Se aplicó nuevamente vortex durante 20 segundos para permitir la reextracción de ACN y la separación de lípidos del plasma.
- Finalmente se centrifugó a 6000 rpm durante 2 minutos y 100.0 μL de la fase superior se trasvasó a un vial de inyección con inserto para su procesamiento en el cromatógrafo.

2.3.7. Sistema cromatográfico

Durante el desarrollo del método el sistema cromatográfico se ajustó desde unas condiciones iniciales hasta las condiciones óptimas con las cuales se lograron los objetivos propuestos (ver sección 2.4.2.8).

Finalmente, en la etapa de validación y durante el uso rutinario del método la separación de los analitos se llevó a cabo a 30°C en una columna Zorbax Eclipse XDB C18 (4.6 x 100 mm, 3.5 µm de tamaño de partícula). La fase móvil consistió en ACN, agua ultrapura y SR 30.3 mM (27.5 – 34.5 mM) de pH=7.30 (7.18 – 7.46), con el gradiente de elución presentado en la **Tabla 2.5**, a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min. La temperatura del inyector se mantuvo a 4.0°C y el volumen de inyección fue de 20 µL. La monitorización de CAZ y MEM fue a una longitud de onda de 298 nm y la de PIP a 250 nm.

Tabla 2.5: Gradiente de elución del método validado

Tiempo (min)	ACN (%)	SR (%)	H ₂ O (%)
0	5.0	95.0	0.0
8.0	80.0	0.0	20.0
9.0	5.0	95.0	0.0
13.0	5.0	95.0	0.0

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1. Definición del perfil del objetivo analítico

El ATP para el nuevo método analítico fue definido como: ***“La cuantificación selectiva de CAZ, MEM y/o PIP en plasma de pacientes polimedicados en un rango analítico comprendido entre 0.25 y 8 veces de la CIM para cada antibiótico, en un tiempo de análisis ≤ 15 min, asegurando suficiente exactitud, de modo que los resultados informados se encuentren dentro de ± 15.0 % del valor real con una probabilidad ≥ a 90% determinada con un 95% de confianza.”***

Para arribar a esta definición se consideraron los aspectos fundamentales del alcance del método. Entre ellos se destacan los requerimientos de calidad del resultado para llevar a cabo MTD, la necesidad de disponer del resultado en cortos tiempos, los objetivos terapéuticos y el tipo de muestra.

2.4.1.1. Definición de los rangos analíticos

Considerando que los β -LAs son antibióticos tiempo-dependiente, se necesitaba de un método útil para evaluar el cumplimiento los objetivos terapéuticos más utilizados por la comunidad médica internacional para el tratamiento de infecciones en pacientes en UTI, a saber [174, 175]:

- que la concentración plasmática del antibiótico se encuentre por encima de la CIM durante el 100% del tiempo interdosis [$100\%T > CIM$] y/o
- que la concentración plasmática del antibiótico se encuentre 4 veces por encima de la CIM al menos el 40 % del tiempo inter dosis [$40\%T > 4 \times CIM$].

Como microorganismo de referencia para este estudio se tomó la *Pseudomona aeuriginosa*, ya que es uno de los patógenos resistentes más frecuentemente aislados en pacientes críticamente enfermos [123].

En función de estos objetivos y teniendo presentes las CIM de los antibióticos en estudio indicadas en la guía EUCAST (de sus siglas en inglés, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) para *Pseudomonas aurigionosa*, que se muestran en la **Tabla 2.6** [176], se establecieron los rangos analíticos necesarios para cada uno de ellos. Estos rangos están dados por las concentraciones plasmáticas abarcadas entre [$0.25 \times CIM$] y [$8 \times CIM$] en cada caso.

Tabla 2.6: Rangos analíticos en base a los objetivos terapéuticos

β -LA	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Objetivos terapéuticos		Rango analítico propuesto ($\mu\text{g/mL}$)	
		Muestras en valle ^a	Muestras 40% inter-dosis ^b	LIC	LSC
CAZ	8.00	>8.00	>32.0	2.00	64.0
MEM	2.00	>2.00	>8.00	0.50	16.0
PIP	16.0	>16.0	>64.0	4.00	128

^a Para evaluar cumplimiento del objetivo terapéutico [$100\% T > CIM$]

^b Para evaluar cumplimiento del objetivo terapéutico [$40\% T > 4 \times CIM$]

2.4.1.2. Polimedicación de los pacientes

Los pacientes internados en UTI reciben, en general, un esquema antibiótico empírico hasta que se realice un rescate del microorganismo causante de la infección. En estos casos, asociados a los β -LAs de interés, suelen administrarse, como ya se mencionó, vancomicina y colistina. En otros casos, de acuerdo al foco de infección y al microorganismo que se supone como agente probable, se opta por daptomicina en lugar de vancomicina y en casos más raros por linezolid. Otras veces se agrega metronidazol. Cuando se sospecha de infección por hongos, se asocia

algún antifúngico, como fluconazol o anidulafungina. Finalmente, de acuerdo a la patología de base del paciente, también pueden estar indicados en forma concomitante los siguientes fármacos:

- sedantes/analgésicos: morfina, remifentanilo o fentanilo, dexmedetomidina.
- moduladores del sistema nervioso central: propofol o benzodiazepinas como midazolam y tiopental
- protectores gástricos: ranitidina y omeprazol.
- anticolinérgicos: salbutamol.
- inotrópicos: adrenalina, dopamina y digoxina.
- para hemorragias subaracnoideas: nimodipina.
- bloqueantes neuromusculares: atracurio y pancuronio.
- anticonvulsivantes/coadyuvantes en la sedación: fenitoína, clorpromazina, risperidona y quetiapina.
- antipiréticos: paracetamol.
- corticoides: hidrocortisona.
- para tratar el edema cerebral: manitol, solución salina hipertónica.
- anticoagulantes: heparina, enoxaparina.

Más allá de las interacciones farmacológicas que puedan darse por la administración simultánea de varios de estos fármacos, la coexistencia de uno o varios de ellos con los β -LAs en el plasma de los pacientes implica una importante amenaza para la selectividad del método bioanalítico. Esta situación fue, por lo tanto, foco de especial atención para la definición del ATP como marco para el desarrollo, la optimización, la validación y el uso de rutina del método.

2.4.2. Diseño, desarrollo y comprensión del método

Para llevar adelante este desarrollo, como así también para la ejecución de la validación y la definición de las estrategias de control del método, se utilizaron herramientas de gestión de riesgos en el marco de la AQbD.

2.4.2.1. Selección de la técnica analítica

Considerando el ATP propuesto y la bibliografía consultada [177, 178] se seleccionó como técnica analítica para la cuantificación de los analitos la CLAR en fase reversa con detección UV con el fin de obtener un método accesible y de bajo costo de aplicación. La detección por absorción en el UV supone suficiente sensibilidad a un costo razonable.

El pretratamiento de la muestra seleccionado consistió en una PP seguido de ELL para separar los lípidos del plasma y re-extracción del solvente orgánico utilizado en la PP.

2.4.2.2. Sistema analítico inicial

En función de las características fisicoquímicas de los analitos y de los métodos publicados en la bibliografía consultada se establecieron las siguientes condiciones iniciales como punto de partida para el desarrollo del nuevo método:

- **Pre-tratamiento de muestra:** estabilización de los analitos en plasma con SEST (1:1), desproteínización con ACN (1:1) y reextracción del solvente y eliminación de lípidos de con MeCl (1:1).
- **Sistema cromatográfico:** conformado por una combinación de fase estacionaria C18 y una fase móvil compuesta de una SR de fosfato 50.0 mM a pH: 7.00 y ACN en una proporción (95:5) con una velocidad de flujo de 1.00 mL/min bajo la modalidad isocrática. La temperatura del horno de columna se mantuvo constante en 25°C y la del inyector de 4°C para garantizar la estabilidad de los analitos. En todos los casos se inyectaron 20 µL de cada solución a ensayar y en función de los espectros de absorción de cada uno de los analitos la detección de los mismos se propuso a una longitud de onda de 250 nm para CAZ y PIP, y a 298 nm para MEM.

Varias pruebas preliminares se realizaron a partir de este sistema inicial para estudiar el comportamiento de algunos factores de manera univariada. Esto permitió conocer la incidencia de los mismos en el rendimiento del método y tomar decisiones tempranas en cuanto a la selección de algunos parámetros y/o el estudio de otros mediante diseños experimentales.

2.4.2.3. Identificación de riesgos

La identificación de riesgos se formalizó mediante la aplicación de Diagramas de Ishikawa (Fig. 2.1), sistematizando el estudio de la potencial incidencia de los factores que conformaban el método inicial.

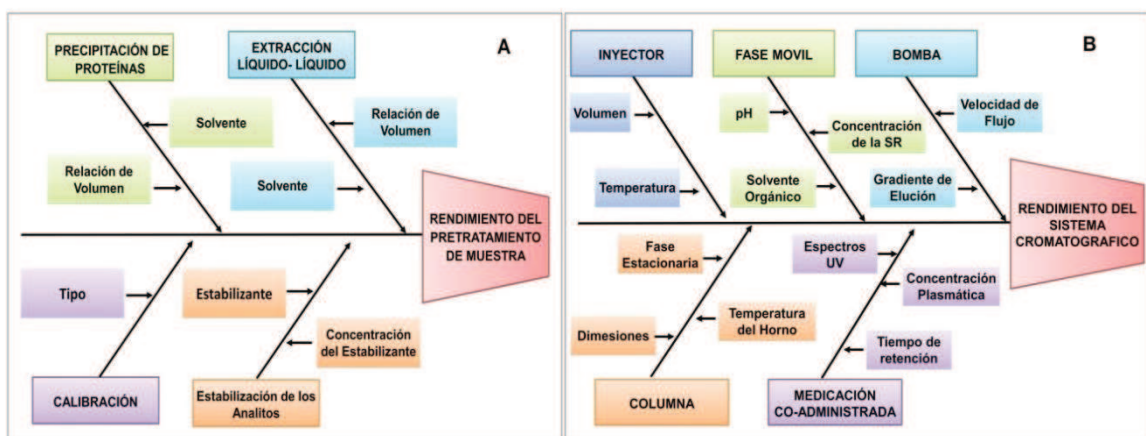


Figura 2.1: Diagramas de Ishikawa para identificación de riesgos. Factores asociados al rendimiento del A) pretratamiento de muestra y B) sistema cromatográfico.

2.4.2.4. Fase de exploración y conocimiento inicial del sistema

Una vez identificados los factores asociados al desempeño de ambas etapas del método se evaluaron los niveles operativos de algunos de ellos. Este análisis se fundamentó en algunos casos en conocimientos teóricos previos y/o a resultados de la fase inicial de experimentación, como así también en base a la disponibilidad de recursos.

2.4.2.4.1. Selección de la columna

Se evaluaron tres columnas cromatográficas, seleccionándose una columna Zorbax Eclipse XDB C18 (100 x 4.6 mm, 3.5 μm) de resolución rápida (C1), frente a otras dos columnas: Zorbax Eclipse Plus C18 (75 x 4.6 mm, 3.5 μm) (C2) e Infinitylab Poroshell 120 EC C18 (75 x 3.0 mm, 2.7 μm) (C3). Si bien las tres columnas presentan el mismo tipo de fase estacionaria (C18), se eligió la C1 porque el revestimiento extradenso de la fase ligada y la desactivación de los silanoles residuales disminuyen las interacciones perjudiciales de los silanoles con los analitos y además protegen el soporte de sílice de la disolución en entornos de pH intermedio y alto.

A modo de ejemplo, en la **Figura 2.2** se evidencia la obtención de un pico cromatográfico de MEM con mejor simetría y menor ancho de pico obtenido con la columna C1 que con las otras columnas evaluadas.

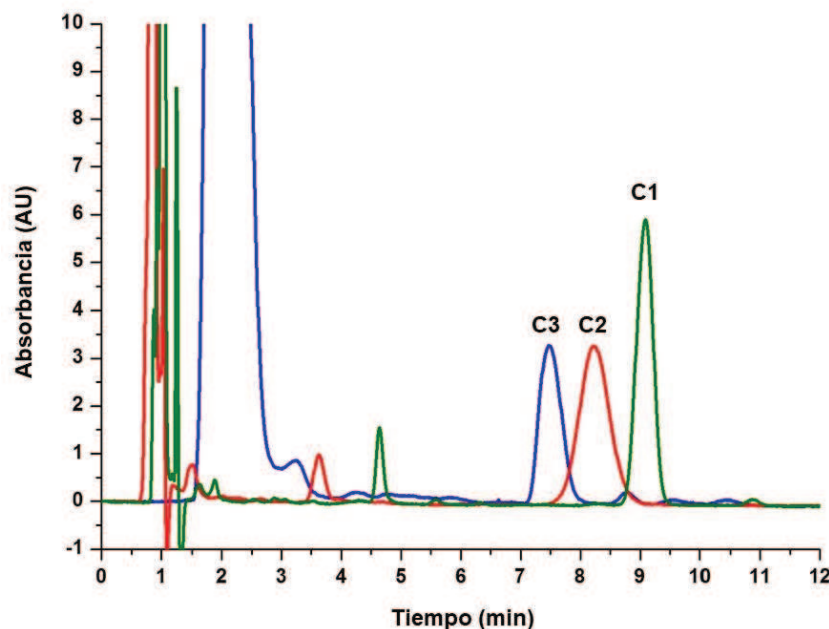


Figura 2.2: Cromatograma registrado a 298 nm de una muestra de plasma fortificado con MEM (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con tres columnas cromatográficas: Zorbax Eclipse XDB C18 (100 x 4.6 mm, 3.5 μm) de resolución rápida (C1), Zorbax Eclipse Plus C18 (75 x 4.6 mm, 3.5 μm) (C2) y Infinitylab Poroshell 120 EC C18 (75 x 3.0 mm, 2.7 μm) (C3).

2.4.2.4.2. Selección de la fase móvil y del modo de elución

Respecto a la fase móvil inicial se seleccionó ACN como modificador orgánico debido a su

menor polaridad en comparación con la de MeOH, lo que a su vez reduce los tiempos de retención y disminuye el ancho del pico cromatográfico de los analitos analizados.

Para mantener el pH, se seleccionó una SR de fosfatos debido a su gran capacidad de regulación a pH cercanos a 7.00 y su insignificante absorción a las longitudes de onda seleccionadas para el monitoreo de los antibióticos en estudio. Se optó por utilizar un pH inicial de 7.00 debido a que MEM presenta inestabilidad a pH muy ácidos y básicos [171]. Por otro lado, los tres analitos presentan diferentes pKa. Mientras que MEM presenta un grupo carboxílico ($pK_{a1}=2.9$) y un grupo amino secundario del anillo de pirrolidina ($pK_{a2}=7.4$) [179], CAZ contiene un grupo carboxílico fuertemente ácido unido al núcleo ($pK_{a}=1.9$), un centro de aminotiazol débil en la cadena lateral ($pK_{a}=4.1$) y un segundo grupo carboxílico en la cadena lateral ($pK_{a}=2.7$) [180]. Por último, PIP presenta al igual que MEM, dos pKa 3.4 y 4.3 [141]. Al trabajar a un pH cercano a 7.00 se logró entonces obtener diferentes polaridades de los antibióticos de interés estableciéndose un perfil de elución adecuado. Bajo las condiciones iniciales del sistema cromatográfico anteriormente mencionadas, los tiempos de retención de cada analito fueron los siguientes: 4.50 min para CAZ, 9.10 min para MEM y mayor a 25.0 min para PIP.

En base a estos resultados preliminares se realizaron ajustes en la proporción de ACN y SR en la fase móvil, con el objetivo de obtener señales analíticas (SA) adecuadas para los tres analitos de manera simultánea y tiempos de retención en conformidad con los requerimientos del ATP. Por lo tanto, se cambió de la modalidad isocrática a gradiente de elución, y se agregó una proporción de agua ultrapura al gradiente para evitar la precipitación de la mezcla de SR 50 mM y ACN (Tabla 2.5), resultando en un perfil de elución como el que se muestra en la Figura 2.3.

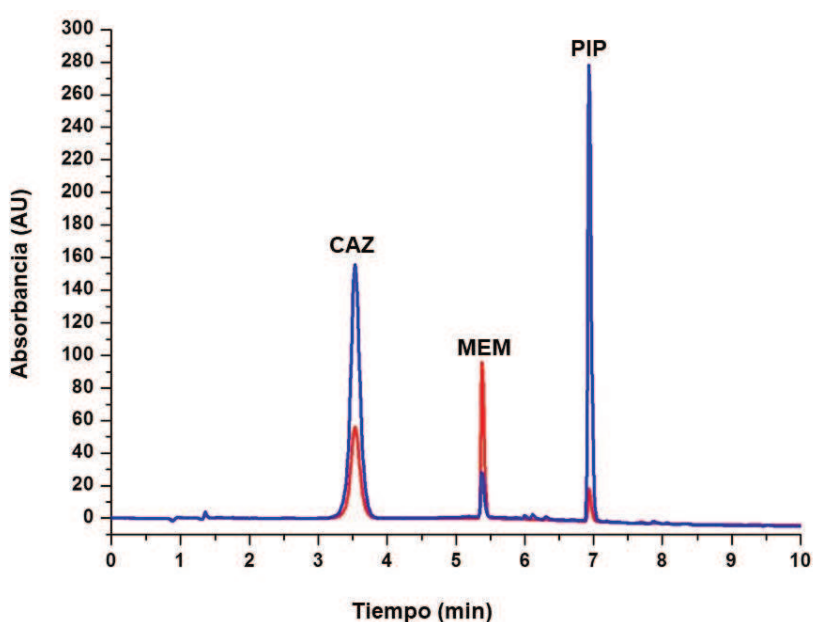


Figura 2.3: Cromatograma registrado a 298 nm (rojo) y a 250 nm (azul) de una solución acuosa combinada diluida de CAZ (32.0 $\mu\text{g/mL}$), MEM (8.0 $\mu\text{g/mL}$) y PIP (65 $\mu\text{g/mL}$) con gradiente de elución.

Utilizando la misma solución acuosa combinada que la evaluada en el cromatograma de la **Figura 2.3** se fortificó un PB y luego de aplicar el pre-tratamiento inicial de la muestra se obtuvo el perfil de elución que se muestra en la **Figura 2.4**. Como puede observarse, el perfil cromatográfico obtenido con los analitos en plasma fue parecido al que se observó en solución acuosa, sin embargo, aparecen señales nuevas atribuibles a componentes endógenos (CE) del plasma. Por otro lado, se observa que el pico correspondiente a CAZ presentó una marcada partición generada por el solvente de inyección de la muestra.

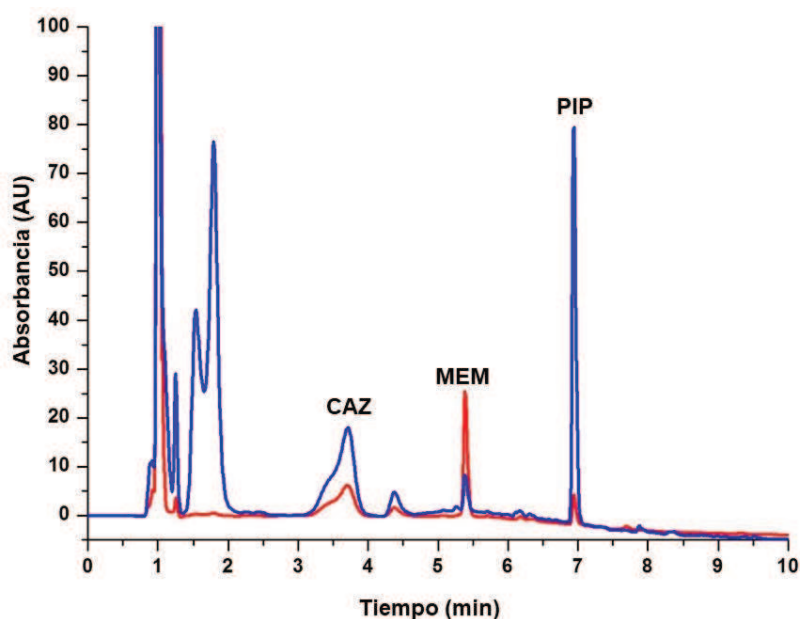


Figura 2.4: Cromatograma registrado a 298 nm (rojo) y a 250 nm (azul) de una muestra de plasma fortificado con los tres analitos de interés en las concentraciones aproximadas CAZ (32.0 $\mu\text{g/mL}$), MEM (8.00 $\mu\text{g/mL}$) y PIP (64.0 $\mu\text{g/mL}$).

2.4.2.4.3. Evaluación de medicación concomitante

Para continuar con el desarrollo se realizó un estudio detallado de los fármacos que podrían tener un impacto sobre la selectividad del método. En principio se descartaron como posibles interferentes el remifentanilo, el fentanilo, la fenitoína, el levetiracetam y la heparina debido a que son moléculas que no poseen absorción a las longitudes de onda establecidas para el monitoreo de los antibióticos de interés. El resto de la medicación listada en la **Tabla 2.2** (ver sección **2.3.4**) se evaluó experimentalmente.

Para ello, se prepararon soluciones individuales de cada uno de los fármacos mediante disolución de una cantidad determinada en agua ultrapura o MeOH según sus respectivas solubilidades. Posteriormente se efectuaron diluciones apropiadas de estas soluciones en agua ultrapura y se fortificaron PBs en concentraciones terapéuticas habituales. El pre-tratamiento aplicado a las muestras de plasma fortificadas y el sistema cromatográfico fueron los descriptos

en la sección 2.4.2.2. Luego de identificar la SA producida por cada fármaco de manera individual, se fortificó un mismo PB con los tres analitos más los fármacos posiblemente concomitantes. El resultado obtenido al analizar esta muestra se observa en la **Figura 2.5**. La coelución o la elución en tiempos de retención cercanos a los analitos fue el criterio adoptado para clasificar a un CE o a un fármaco como un posible interferente. Siguiendo el orden de elución en el sistema cromatográfico se observaron entonces, los siguientes interferentes potenciales: noradrenalina (NOR), dopamina (DOP), compuesto endógeno 1 (CE1), aspirina (ASP), compuesto endógeno 2 (CE2), paracetamol (PCT), metronidazol (MTZ), morfina (MOP), ranitidina (RNT) y furosemda (FRS). El resto de los fármacos evaluados experimentalmente no presentó SA, por lo que se supone que no se co-extrajeran con el pretratamiento de muestra aplicado o que eluyeron en el frente de la corrida.

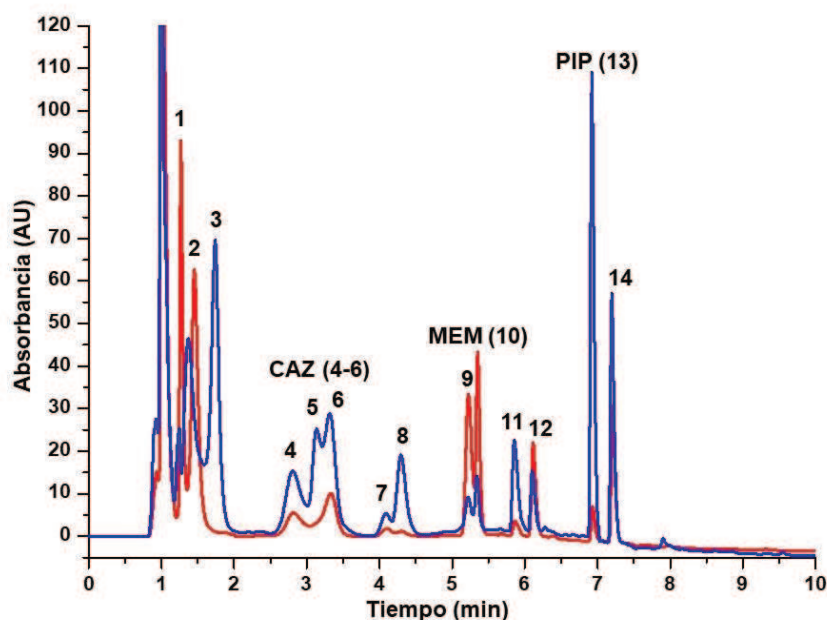


Figura 2.5: Cromatograma registrado a 298 nm (rojo) y 250 nm (azul) de una muestra de PB enriquecida con CAZ (32.0 µg/mL, 4 y 6), MEM (8.00 µg/mL, 10) y PIP (64.0 µg/mL, 13) y la medicación coadministrada que resultó posible interferente: NOR (1), DOP (2), CE (3 y 7), ASP (5), PCT (8), MTZ (9), MOP (11), RNT (12) y FRS (14).

2.4.2.4.4. Selección de las longitudes de onda

A partir de los resultados obtenidos en el punto anterior, se evidenció la necesidad de replantear la longitud de onda de monitoreo para CAZ. Si bien se observa claramente que a 250 nm el sistema presenta mayor sensibilidad para este analito, a 298 nm presenta mejor selectividad, siendo esta última la propiedad analítica menos lograda. Por lo tanto, se cambió la longitud de onda de monitoreo para CAZ a 298 nm al igual que para MEM, quedando el monitoreo a 250 nm para PIP. A raíz de esta decisión, se elimina a ASP como posible interferente, debido a que su SA a 298 nm es despreciable.

2.4.2.4.5. Pretratamiento de la muestra

Se adoptó inicialmente el pre-tratamiento de muestras plasmáticas para determinación de β -LA descrito por Casal y col.[166] que utiliza una relación 1:1 entre plasma y SEST (ver sección 2.3.6). Los autores mencionados demostraron que el agregado de una solución estabilizadora es necesario para garantizar la estabilidad de los β -LA durante el análisis.

Tanto la etapa de PP como la de ELL, se estudiaron experimentalmente con el fin de mejorar la SA de CAZ, el analito más desfavorecido en cuanto a la forma del pico (**Fig. 2.4**) sin afectar las SAs de MEM y PIP. Para ello se evaluó el efecto del tipo de solvente y la proporción de volúmenes entre plasma y solvente orgánico utilizados. El solvente en la PP fue ACN debido a que es el modificador orgánico con el cual está compuesta la fase móvil, lo que es recomendable. Se evaluaron dos proporciones de volúmenes, 1:1 y 1:2 para esta etapa. Para la ELL se evaluó la utilidad de CHL y de MeCl en las mismas proporciones (**Tabla 2.7**).

Tabla 2.7: Ensayos para evaluar el desempeño de PP y ELL.

Pretratamiento	Estabilización	PP	ELL	
	Volumen (μ L) Plasma: SEST ^a	Volumen (μ L) ACN	Proporción (μ L) SB ^b : Cloroformo	Proporción (μ L) SB: Cloruro de Metileno
1	150:150	500	600:600	
2	150:150	500		500:1000
3	250:250	500	600:600	
4	250:250	500		500:1000
5 ^c	150:150	600		600:600

^a SEST: solución estabilizadora.

^b SB: sobrenadante que corresponde a plasma desproteinizado.

^c Corresponde al pretratamiento inicial.

Los mejores resultados, es decir aquellos que proporcionaron una mejor SA para CAZ sin afectar la de MEM y PIP, se obtuvieron con una proporción 1:2 de plasma: ACN para la etapa PP y una proporción 1:2 de plasma desproteinizado:MeCl para la ELL, quedando establecido el pre-tratamiento de la muestra cómo se indica en la sección 2.3.6 y en la **Figura 2.6**.

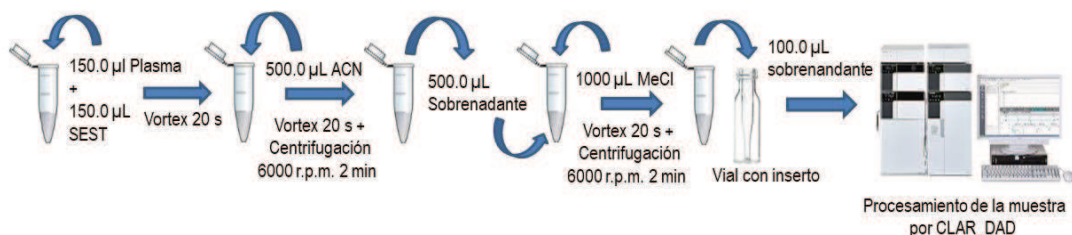


Figura 2.6: Procedimiento optimizado para el pretratamiento de las muestras de plasma.

2.4.2.5. Evaluación de riesgos

Durante la etapa de exploración inicial del sistema se lograron un pretratamiento de muestra y un sistema cromatográfico iniciales a partir de los cuales se obtuvieron SAs adecuadas para los analitos en un tiempo de análisis apropiado y se identificaron posibles interferentes. Sin embargo, las resoluciones cromatográficas de los picos de los analitos con picos de la medicación coadministrada y/o diversos componentes endógenos del plasma no eran todavía satisfactorias, afectando la selectividad del método. Se continuó entonces, con un estudio más profundo y detallado del sistema a los fines de optimizarlo. En este sentido se definieron los CMAs, se identificaron los CMPs y se estudiaron las relaciones entre ellos mediante la aplicación de DOEs.

2.4.2.6. Atributos críticos del método

Se definieron como CMAs las variables respuestas dadas por las resoluciones (R_s) entre los picos cromatográficos de los β -LAs y los CE y/o la medicación coadministrada (posibles interferentes). Además, sabiendo que el logro de un aumento de R_s en pico cromatográficos puede traer como consecuencia un aumento significativo en el tiempo de la corrida cromatográfica, se sumó también como CMA el tiempo de retención (tr) de PIP, el último β -LA en eluir en el cromatograma. Por lo tanto, se identificaron y definieron un total de 7 (siete) CMAs y se establecieron para ellos criterios de aceptación a los fines de asegurar el cumplimiento del ATP (Tabla 2.8).

Tabla 2.8: Atributos críticos del método y criterios de aceptación

CMAs - Respuestas (y)	Descripción	Criterios de aceptación
y1	R_s CE ₁ – CAZ	≥ 1.0
y2	R_s CAZ – CE ₂	≥ 1.0
y3	R_s MTZ – MEM	≥ 1.0
y4	R_s MEM – MOP	≥ 1.0
y5	R_s RAN – PIP	≥ 1.0
y6	R_s PIP – FRS	≥ 1.0
y7	tr PIP	≤ 13.0 min

Definidos los CMAs, el siguiente paso fue determinar qué parámetros del sistema cromatográfico, en términos de condiciones operativas, podían modificarse para lograr el cumplimiento del ATP, es decir, identificar los probables CMPs.

2.4.2.7. Parámetros críticos del método

Habiéndose fijado en la etapa inicial las condiciones operacionales de algunas de las variables del método (columna cromatográfica, temperatura del inyector, volumen de inyección y composición de la fase móvil) se identificaron cuatro factores que podían modificarse dentro del rango experimental inicial de manera tal de poder evaluar si sus efectos eran o no significativos sobre alguno de los CMA. Estos factores fueron designados como probables CMPs (**Tabla 2.9**).

Tabla 2.9: Probables parámetros críticos del método y rangos experimentales a evaluar.

Probables CMPs – Factores (x)	Descripción	Rango Experimentales
x_1	pH de la SR	6.80 – 7.20
x_2	Concentración de la SR	10.0 – 50.0 mM
x_3	Velocidad de flujo de la fase móvil	0.80 – 1.20 mL/min
x_4	Temperatura del horno de columna	25.0 – 35.0°C

Los rangos experimentales que se muestran en la **Tabla 2.9** se seleccionaron en función de los resultados obtenidos en la etapa inicial de desarrollo del método. En particular, se decidió evaluar concentraciones más bajas de la SR (máximo 50.0 mM) para evitar inconvenientes con la mezcla de ACN y temperaturas más altas (mínimo 25°C) teniendo en cuenta la estabilidad de la columna cromatográfica. El resto de las variables se evaluaron entorno a las condiciones centrales propuestas anteriormente, es decir pH de la SR = 7.00 y velocidad de flujo= 1.00 mL/min.

2.4.2.7.1. Evaluación de los factores y del entorno experimental. Diseños de primer orden.

Para una primera evaluación de los efectos de los factores y del entorno experimental seleccionado se utilizó un DFF1 en dos niveles con tres repeticiones del punto central. Los CMA descritos en la **Tabla 2.8** fueron evaluados como las respuestas en los cromatogramas obtenidos a partir de muestras de plasma fortificado con los analitos de interés en concentraciones correspondientes a [4xCIM] para cada uno y los 6 (seis) fármacos que resultaron potenciales interferentes en concentraciones terapéuticas aproximadas.

Como puede observarse en la **Tabla 2.10**, en el dominio experimental del DFF1, los CMA menos favorecidos resultaron y_2 e y_3 . En ambos casos, los rangos de las respuestas incluyen resoluciones no satisfactorias, resultando ser y_3 el CMA más crítico, ya que, en la mayoría de las corridas, se obtuvieron resoluciones menores a 1.0 entre los picos de MTZ y MEM. El resto de los CMA lograron cumplir los criterios establecidos.

Tabla 2.10: Plan de experimentación y resultados del diseño DFF1

Corrida	Probables CMPs ^a				CMAs ^b						
	x ₁	x ₂ (mM)	x ₃ (mL/min)	x ₄ (°C)	y ₁	y ₂	y ₃	y ₄	y ₅	y ₆	y ₇ (min)
1	7.00	30.0	1.00	30.0	7.40	2.53	0.60	4.31	5.81	1.81	6.94
2	7.20	50.0	1.20	35.0	7.12	1.33	1.11	4.71	6.07	1.87	6.18
3	7.20	50.0	0.80	25.0	12.3	0.38	0.00	4.45	4.62	2.08	8.22
4	6.80	10.0	0.80	25.0	4.79	1.86	0.00	2.36	6.54	2.09	8.12
5	6.80	50.0	1.20	25.0	5.68	3.33	0.00	4.18	6.18	1.82	6.08
6	6.80	50.0	0.80	35.0	6.36	2.24	0.00	4.28	4.21	1.71	8.05
7	7.00	30.0	1.00	30.0	7.34	2.24	0.44	4.14	6.11	1.84	6.92
8	7.20	10.0	0.80	35.0	7.59	3.40	0.00	7.02	2.30	1.65	8.05
9	7.20	10.0	1.20	25.0	5.63	3.59	0.85	5.95	3.78	1.74	6.04
10	6.80	10.0	1.20	35.0	6.42	1.84	0.94	2.83	8.17	1.97	6.18
11	7.00	30.0	1.00	30.0	7.25	2.30	0.25	4.00	5.99	1.86	6.93
Rango de Respuestas				Mínimo	4.79	0.38	0.00	2.36	2.30	1.65	6.04
				Máximo	12.3	3.59	1.11	7.02	8.17	2.09	8.22

^a CMPs: x₁: pH de la SR, x₂: concentración de la SR (mM), x₃: velocidad de flujo de la fase móvil (mL/min) y x₄: temperatura del horno de la columna.

^b CMAs: y₁: *R_s* CE₁ – CAZ, y₂: *R_s* CAZ – CE₂, y₃: *R_s* MTZ – MEM, y₄: *R_s* MEM – MOP, y₅: *R_s* RAN – PIP, y₆: *R_s* PIP – FRS e y₇: *t_R* PIP.

Mediante el uso del programa Design Expert 11.0 se obtuvieron los modelos de regresión lineal múltiple para describir el comportamiento de cada CMA en función de los niveles de los factores. Se evaluó la significancia (valor $p < 0.10$) de los coeficientes de regresión de las variables y sus interacciones, mediante ANOVA para obtener modelos significativos (valor $p < 0.05$), sin falta de ajuste (valor $p \geq 0.05$) y parsimoniosos, de manera que permitieran evaluar los efectos de los factores estudiados (**Fig. 2.7**). Estos resultados evidenciaron en primer lugar que todos los factores tenían efectos significativos sobre una o más de una respuesta, por lo que constituían verdaderamente CMPs. Además, se observó que, en general, los principales efectos sobre las respuestas en su conjunto fueron los de la concentración y del pH de la SR, el de la interacción de estos factores (x_1x_2) y el de la velocidad de flujo. En comparación con estos, la temperatura del horno de columna, presentó un efecto menos significativo sobre todas las respuestas en conjunto.

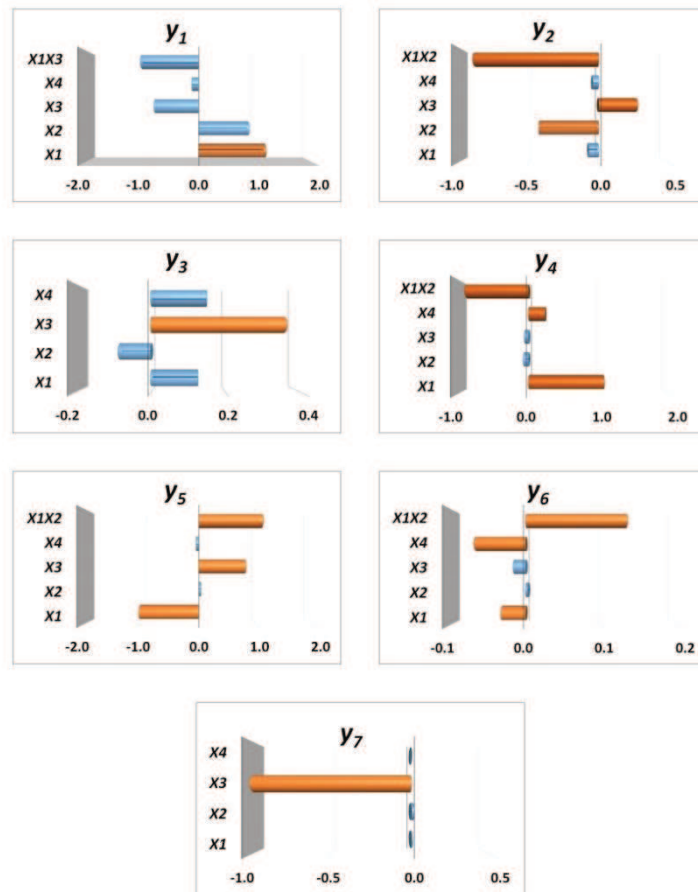


Figura 2.7: Representación de los efectos y significancia de los cuatro CMPs (x_1 , pH de la SR; x_2 , concentración de la SR; x_3 , velocidad de flujo y x_4 , temperatura del horno de la columna) y sus interacciones sobre cada uno de los CMA en el diseño de screening DFF1. Los efectos positivos se presentan hacia la derecha y los negativos hacia a la izquierda. Los efectos de los factores significativos se representan en color naranja y los no significativos en color celeste.

También se observó que la velocidad de flujo era un factor significativo con un efecto positivo sobre las respuestas más críticas, y como era de esperarse, con un efecto negativo sobre y_7 .

Aunque la velocidad de flujo fue el único factor que resultó realmente significativo sobre y_3 , esta respuesta se vio favorecida también por temperaturas altas del horno de columna, altos pH y bajas concentraciones de SR.

Para el caso de y_2 , una de las respuestas más críticas, el factor que resultó altamente significativo fue la interacción entre el pH y la concentración de la SR, viéndose favorecida en dos condiciones inversas. Por un lado, altos pH y bajas concentraciones de la SR y, por otro lado, bajos pH con altas concentraciones de la SR. Además, sobre este CMA, la velocidad de flujo tuvo un efecto significativo positivo, al igual que sobre y_3 .

De acuerdo a la metodología secuencial de DOE y teniendo en cuenta los conocimientos adquiridos en el primer diseño de screening, se evaluó un nuevo dominio experimental para lograr

condiciones más favorables para y_2 e y_3 .

Nuevamente se aplicó un DFF con tres repeticiones del punto central (DFF2) para evaluar los CMPs más influyentes: la velocidad de flujo y el pH de la SR. De esta manera se corrieron 7 (siete) nuevos puntos experimentales utilizando la misma muestra que en el diseño anterior. En este caso la temperatura del horno de la columna se fijó en 35°C y la concentración de la SR en 10.0 mM debido a que las resoluciones más críticas resultaron más favorecidas en estas condiciones. Por otro lado, se expandieron los rangos de pH de la SR (7.20 – 7.80) y de la velocidad de flujo (1.00 – 1.50 mL/min).

Las respuestas obtenidas en el nuevo dominio experimental fueron modeladas y los efectos de las variables se evaluaron, nuevamente mediante ANOVA. Los resultados del DFF2 (**Tabla 2.11**) demostraron que, el pH de la SR tiene un efecto significativo sobre la mayoría de las respuestas, y a pesar que la resolución de CAZ y MEM con sus picos adyacentes mejoró considerable, la resolución de PIP con sus picos adyacentes se convirtió en la respuesta más crítica, particularmente y_6 .

Tabla 2.11: Plan de experimentación y resultados del diseño DFF2.

Corrida	CMPs ^a		CMAs ^b						
	x_1	x_3 (mL/min)	y_1	y_2	y_3	y_4	y_5	y_6	y_7 (min)
1	7.50	1.25	12.2	3.43	1.46	8.43	1.16	1.81	5.87
2	7.80	1.00	12.4	3.86	1.38	9.15	0.00	0.00	6.85
3	7.20	1.00	11.6	6.92	0.98	6.11	2.26	1.37	6.81
4	7.50	1.25	11.9	3.31	1.55	8.87	1.05	1.81	5.86
5	7.50	1.25	11.9	3.61	1.60	8.85	1.04	1.79	5.86
6	7.80	1.50	9.09	3.63	2.79	10.9	0.00	0.00	5.20
7	7.20	1.50	7.32	3.66	1.47	6.60	3.77	0.00	5.20
Rango de Respuestas		Mínimo	7.32	3.31	0.98	6.11	0.00	0.00	5.20
		Máximo	12.4	6.92	2.79	10.9	3.77	1.81	6.85

^a CMPs: x_1 : pH de la SR y x_3 : velocidad de flujo de la fase móvil (mL/min).

^b CMAs: y_1 : R_s CE₁ – CAZ, y_2 : R_s CAZ – CE₂, y_3 : R_s MTZ – MEM, y_4 : R_s MEM – MOP, y_5 : R_s RAN – PIP, y_6 : R_s PIP – FRS e y_7 : t_R PIP.

2.4.2.7.2. Generación de conocimiento detallado del sistema. Diseños de segundo orden.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en ambos diseños de screening, se corrió un diseño experimental de segundo orden para evaluar en detalle los efectos de los dos principales

CMPs e identificar las condiciones experimentales óptimas para cumplir con los criterios establecidos para todos CMAs de manera simultánea.

Para los CMPs de menor impacto se establecieron las siguientes condiciones: velocidad de flujo en 1.50 mL/min y temperatura del horno de columna en 30.0°C. Esta temperatura se seleccionó como compromiso para favorecer la resolución del pico de PIP y FRS (y_6) y para preservar la integridad de la columna (no es recomendable el uso de una fase estacionaria a base de sílice a altas temperaturas y altos pH, simultáneamente). En el caso de la velocidad de flujo, se seleccionó esa condición ya que mejora la resolución de MEM (y_3).

El diseño empleado fue un DCC con una distancia codificada para $\alpha = 1.41$ para lograr el criterio de isovarianza por rotación. La matriz experimental se dividió en dos bloques, para poder realizar los experimentos en dos días diferentes. En cada bloque, las corridas cromatográficas se realizaron en un orden aleatorio para asegurar la independencia de los resultados y minimizar los efectos de los errores no controlados.

La matriz experimental y las respuestas obtenidas se muestran en la **Tabla 2.12**. Como se observa, tanto y_3 como y_6 , fueron los CMAs menos favorecidos, pero como todos los CMAs alcanzaron valores aceptables en algunas de las corridas cromatográficas, las respuestas fueron modeladas y analizadas para encontrar una solución aceptable dentro del entorno experimental evaluado. Para ello se construyó un modelo experimental para cada CMA ajustando los datos del DCC a una función polinomial de segundo orden.

En cada modelo, se evaluaron los coeficientes de regresión estimados mediante ANOVA, y se llevó a cabo un procedimiento de regresión hacia atrás para eliminar los términos no significativos (valor $p > 0.10$). De esta manera, se obtuvieron modelos que incluyen solo los términos significativos y los necesarios para mantener la jerarquía. Los modelos ajustados, fueron, a su vez sometidos a un análisis ANOVA para determinar su significancia (valor $p < 0.05$) y la falta de ajuste (valor $p > 0.05$).

Tabla 2.12: Plan de experimentación y resultados del DCC

Experimento	Bloque	CMPs ^a		CMAs ^b						
		x_1	x_2 (mM)	y_1	y_2	y_3	y_4	y_5	y_6	y_7 (min)
1	1	7.65	44.1	7.22	3.57	2.08	7.73	3.07	1.52*	5.32
2	1	7.65	15.9	5.93	2.57*	2.45	8.88	1.75	0.00	5.26
3	1	6.95	44.1	7.33	2.28	0.70	1.97	7.83	2.11	5.33
4	1	7.30	30.0	6.80	2.57	1.52	5.93	5.30	1.84	5.42
5	1	7.30	30.0	6.74	2.70	1.70	5.80	5.06	1.93	5.32
6	1	7.30	30.0	6.55	2.75	1.78	5.78	5.03	1.67	5.31

7	1	6.95	15.9	6.11	3.52	0.99	4.12	6.48	1.36	5.27
8	2	7.30	30.0	6.28	2.96	1.57	6.17	5.23	1.59	5.28
9	2	7.30	50.0	6.00*	3.41	0.77	3.38*	6.94	0.70	5.21
10	2	7.30	10.0	5.50	3.19	1.97	7.36	3.38	0.00	5.21
11	2	7.30	30.0	6.56	2.79	1.52	6.12	5.16	1.02*	5.29
12	2	7.30	30.0	6.50	2.86	1.64	6.38	4.87	1.47	5.29
13	2	7.80	30.0	6.88	2.28	2.65	9.18	1.66	0.00	5.29
14	2	6.80	30.0	6.66	2.58	0.79	1.90	8.51	2.03	5.30

* Outliers (residuos estudiantizados >3)

^a CMPs: x_1 : pH de la SR, x_2 : concentración de la SR (mM), x_3 : velocidad de flujo de la fase móvil (mL/min) y x_4 : temperatura del horno de la columna.

^b CMAs: y_1 : R_s CE₁ – CAZ, y_2 : R_s CAZ – CE₂, y_3 : R_s MTZ – MEM, y_4 : R_s MEM – MOP, y_5 : R_s RAN – PIP, y_6 : R_s PIP – FRS e y_7 : t_R PIP.

En la **Tabla 2.13** se resumen los resultados de los modelos ajustados y el nivel de criticidad de cada uno de los CMA's asociado al rango de respuesta obtenido en el entorno experimental evaluado, el cual está estrechamente relacionado al cumplimiento del ATP. Se obtuvo para cada uno el R^2 -*adj* para estimar el ajuste del modelo y el R^2 -*pred* para evaluar la capacidad del modelo para predecir nuevas observaciones.

Se considera que la falta de ajuste del modelo de y_5 es consecuencia de la baja variabilidad obtenida experimentalmente entre los replicado del punto central, sin embargo, el modelo presentó un R^2 -*pred* altamente satisfactorio, por lo que se consideró útil para evaluar el comportamiento de la respuesta.

Por otro lado, la capacidad de predecir del modelo y_7 no fue muy bueno (R^2 -*pred* = 0.0557), por lo que no se tuvo en cuenta en la etapa de optimización, teniendo en cuenta que el nivel de criticidad es bajo y el rango de respuesta es aceptable.

Tabla 2.13: Análisis de los modelos ajustados de cada una de las CMA evaluadas

CMA	Rango	Nivel de Criticidad	Modelo	Términos significativos (x_i)	Término ^a Adicionado	ANOVA valor p^b		R ² Adj.	R ² Pred.
						Modelo	Falta de Ajuste		
y1	5.50 – 7.32	Bajo	Cuadrático	x_2, x_1^2	x_1	0.0001	0.5264	0.8840	0.7391
y2	2.28 – 3.57	Bajo	Cuadrático	$x_1, x_2, x_1x_2, x_1^2, x_2^2$	-	<0.0001	0.3938	0.9583	0.8576
y3	0.70 – 2.65	Alto	Cuadrático	x_1, x_2, x_2^2	-	<0.0001	0.1429	0.9413	0.7973
y4	1.90 – 9.18	Medio	Cuadrático	x_1, x_2, x_1x_2, x_1^2	-	<0.0001	0.4365	0.9974	0.9930
y5	1.66 – 8.51	Medio	Lineal	x_1, x_2	-	<0.0001	0.0624	0.9771	0.9540
y6	0 – 2.11	Alto	Cuadrático	x_1, x_2, x_1^2, x_2^2	-	<0.0001	0.6980	0.9836	0.9577
y7	5.21 – 5.42	Bajo	Cuadrático	x_2^2	x_2	0.0096	0.9355	0.5259	0.0557

^a Término adicionado para mantener la jerarquía.

^b Valor p menor a 0.05 indica parámetro significativo.

A continuación, se obtuvieron y evaluaron las gráficas de superficie de respuesta de cada modelo ajustado. En la **Figura 2.8** se puede observar claramente el comportamiento antagónico de los CMA, y_3 e y_6 , las respuestas más críticas. Por un lado, la resolución entre MTZ y MEM se ve favorecida por baja concentración y alto pH de la SR, contrario a la resolución entre PIP y FRS. Por lo tanto, fue requisito lograr un compromiso entre estos dos CMA para definir el MODR.

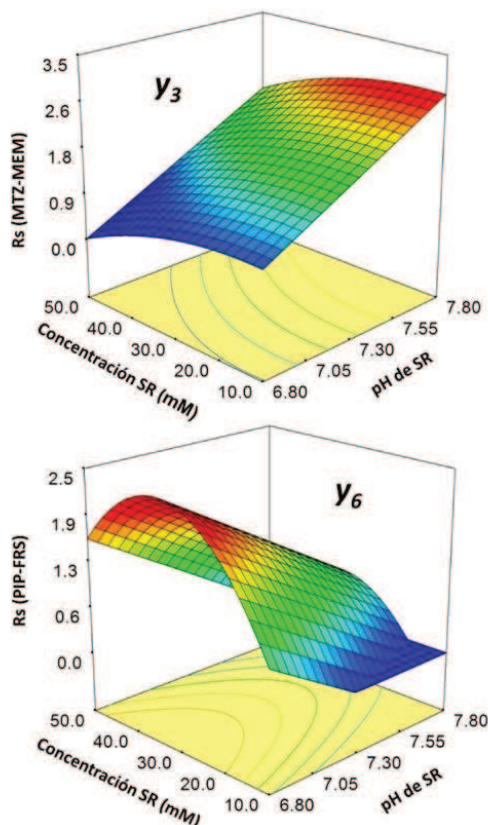


Figura 2.8: gráficos de superficie de respuesta de los modelos ajustados para los CMA (resolución de pico, R_s) más comprometidos: y_3 e y_6 , en el dominio experimental a una temperatura de horno de columna de 30.0°C (x_4) y a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min (x_3).

2.4.2.8. Definición del MODR, espacio de control y punto óptimo de trabajo

Para definir el MODR se recurrió a la optimización gráfica que ofrece el programa Design Expert. Con esta herramienta se obtuvieron las gráficas de contorno de los modelos ajustados de los CMA más comprometidos, y_3 e y_6 , especificando el límite inferior aceptable para las respuestas ($R_s = 1.0$) con sus correspondientes intervalos de predicción. Estas graficas se muestran en la **Figura 2.9 A y B**, donde se observan delimitadas tres áreas diferentes. Las áreas de color naranja representan el entorno experimental de los factores dónde no se cumplen los criterios de $R_s > 1.0$, las áreas de color amarillo corresponden a los intervalos de predicción

(con 95% de confianza) para $R_s = 1.0$ y las áreas de color verde representan la región o entorno experimental de los factores en donde las $R_s > 1.0$.

Para poder identificar la región común en el entorno experimental de los factores en donde ambos CMAs cumplen con los criterios de aceptación, se superpusieron las gráficas de contorno (Fig. 2.9 C), quedando definida la región de compromiso o MODR. Esta región está delimitada por los límites inferiores de los intervalos de predicción para $R_s = 1.0$ de y_3 y de y_6 , conformando entonces el entorno experimental de los factores en donde el método es operable para lograr la calidad analítica requerida.

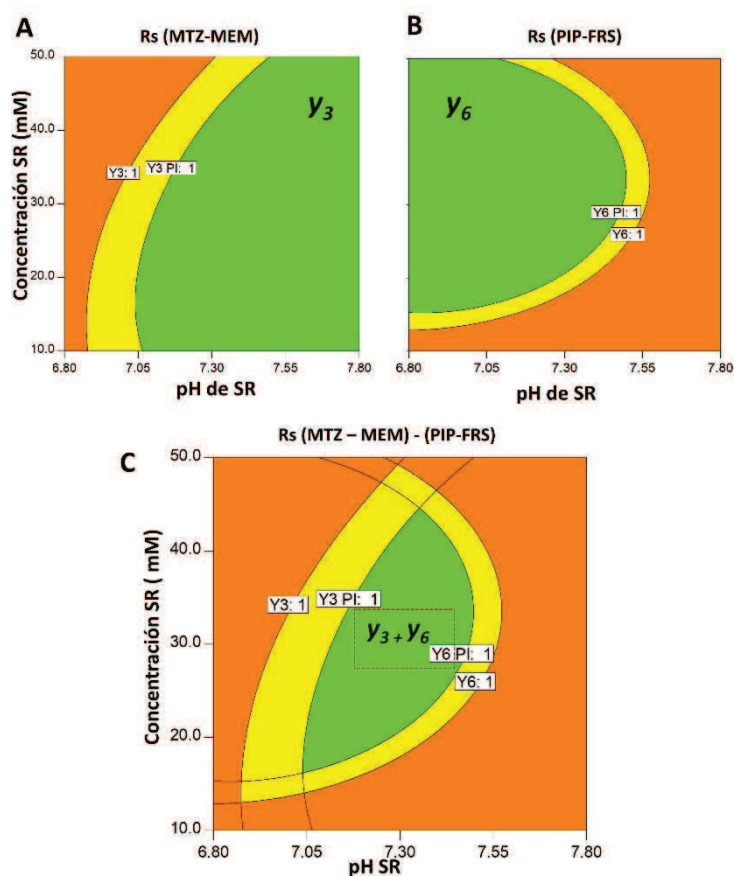


Figura 2.9: Gráficos de contorno de los modelos ajustados de y_3 (A) e y_6 (B) y superposición de los gráficos de ambas CMAs (C). Los límites inferiores de predicción (PI) para $R_s = 1.0$ con el 95% de confianza se representan con líneas negras.

Seguidamente se seleccionaron dentro del MODR los rangos prácticos de pH y concentración de la SR definiendo de esta manera el EC del método. Para ello se trazó un rectángulo imaginario dentro de la zona verde (Fig. 2.9 C) definido por el rango de pH de 7.18 – 7.46 y de la concentración de la SR de 27.5 – 34.5 mM.

Finalmente, para determinar el OWP se llevó a cabo la optimización numérica simultánea de los CMPs y los CMAs maximizando la función Deseabilidad, D. Los criterios para lograr esas

condiciones experimentales óptimas de operabilidad se seleccionaron en base a los objetivos y límites especificados que se muestran en la **Tabla 2.14**. Para los CMPs se establecieron como requisitos los límites del EC, mientras que para las R_s se establecieron criterios de maximización, dándose mayor importancia dentro de la función D a las respuestas más críticas, y_3 e y_6 .

Tabla 2.14: Condiciones para la optimización numérica

Parámetro	Objetivo	Límites		Importancia	
		Inferior	Superior		
CMPs	x_1	En rango	7.18	7.46	3
	x_2	En rango	27.5	34.5	3
CMAs	y_1	Maximizar	5.49	7.33	3
	y_2	Maximizar	2.28	3.57	3
	y_3	Maximizar	1.00	3.00	5
	y_4	Maximizar	1.90	9.18	3
	y_5	Maximizar	1.66	8.51	3
	y_6	Maximizar	1.00	3.00	5

Mediante la optimización numérica, se logró identificar un punto estable ($D = 0.424$) a $\text{pH} = 7.30$ y una concentración de SR de 30.3 mM, estableciéndose esta combinación como la condición experimental óptima, es decir el OWP (**Fig. 2.10**). En este punto dentro del espacio de los factores, las respuestas predichas por los modelos ajustados fueron: $y_1 = 6.73$, $y_2 = 2.85$, $y_3 = 1.70$, $y_4 = 6.37$, $y_5 = 4.80$ e $y_6 = 1.53$. Estas respuestas predichas resultaron satisfactorias y fueron confirmadas experimentalmente luego de realizar la validación estadística del OWP.

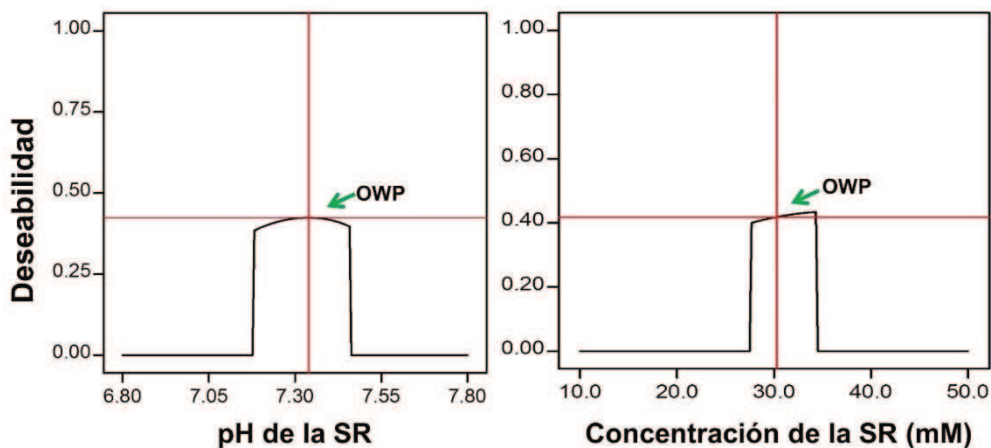


Figura 2.10: D en función del pH y concentración de la SR durante la optimización simultánea de dos CMPs y los CMAs.

Para la validación estadística del OWP y del EC señalado se determinó, mediante simulaciones de Montecarlo, la probabilidad de fallar. Para esta validación se estableció como falla un valor de $R_s \leq 1.5$ cuando se trabaja en el OWP, o un valor de $R_s \leq 1.0$ cuando se trabaja en

cualquier otro punto del EC. Para obtener la simulación se consideró la variabilidad estándar de los CMPs (± 0.02 para el pH y ± 0.5 mM para la concentración de la SR) y el error de los coeficientes de los modelos ajustados y en ambos casos se asumió una distribución normal.

Utilizando el software Cristal Ball se obtuvieron las simulaciones mediante la ejecución de 100 000 iteraciones en cada caso. En la **Figura 2.11** se muestran los histogramas para las distribuciones de respuestas probables. En base a estas distribuciones predictivas, el riesgo de falla para $R_s \leq 1.5$ cuando se trabaja en el OWP resultó $<1.5\%$ para y_3 y $<0.4\%$ para y_6 . Por otro lado, en las simulaciones obtenidas en los puntos extremos del EC, el riesgo de falla ($R_s \leq 1.0$) fue prácticamente igual a cero en todos los casos. Estos resultados demuestran la robustez del método desarrollado, asegurando un alto grado de cumplimiento del ATP durante el empleo rutinario del método al trabajar dentro del espacio de control.

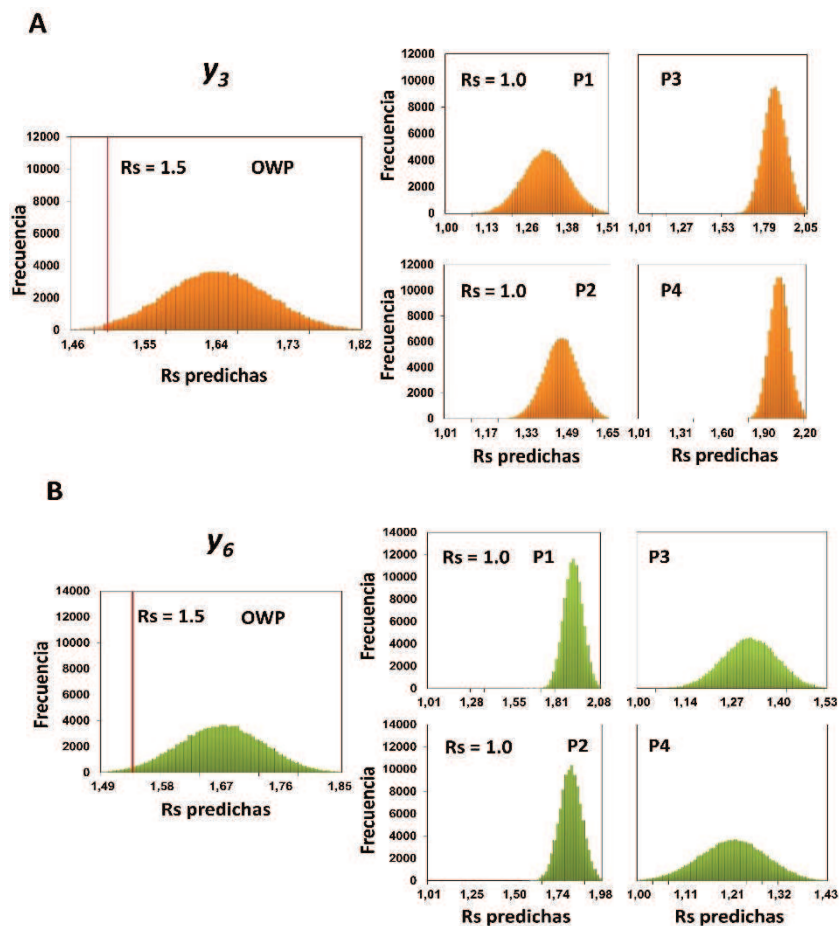


Figura 2.11: Graficas de distribución de las R_s predichas para y_3 (A) e y_6 (B) obtenidas mediante simulaciones de Montecarlo. La línea vertical roja señala la especificación predefinida para la R_s en el OWP y en los diferentes extremos del espacio de control de pH y concentración de la SR: P1 (pH = 7.18 y concentración de SR = 34.5 mM), P2 (pH = 7.18 y concentración de SR = 27.5 mM), P3 (pH = 7.46 y concentración de SR = 27.5 mM), y P4 (pH = 7.46 y concentración de SR = 34.5 mM).

Cómo último paso en la validación del OWP se confirmó experimentalmente la calidad de los CMA's obtenidos en esas condiciones al analizar muestras de plasma fortificado con los 9 fármacos (3 analitos y 6 fármacos identificados como interferentes). Los resultados promedios (n= 3) obtenidos para las *R_s* fueron $y_1 = 6.43$, $y_2 = 2.61$, $y_3 = 1.52$, $y_4 = 7.38$, $y_5 = 5.20$ e $y_6 = 1.46$ (Fig. 2.12). Estos resultados se encuentran dentro de los intervalos de predicción de cada una de las repuestas, confirmando de esta manera, que los modelos ajustados para cada CMA son adecuados para predecir nuevas respuestas experimentales.

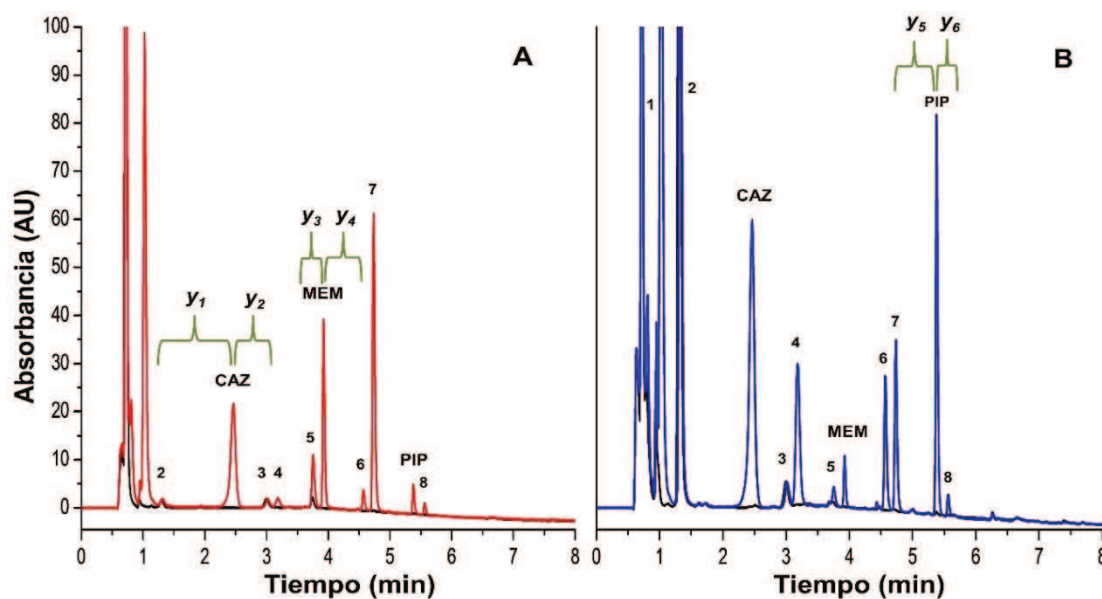


Figura 2.12: Cromatograma registrado a 298 nm (A, rojo) y 250 nm (B, azul) en las condiciones del punto óptima de trabajo, de una muestra de plasma enriquecida con CAZ (32 $\mu\text{g/mL}$), MEM (8.0 $\mu\text{g/mL}$) y PIP (64 $\mu\text{g/mL}$) en las concentraciones esperadas y la medicación coadministrada: dopamina (1), compuestos endógenos (2 y 3), paracetamol (4), metronidazol (5), morfina (6), ranitidina (7) y furosemida (8), frente a una muestra de plasma blanco (negro).

2.4.3. Validación del método

En primer lugar, se redactaron el Procedimiento Operativo Estándar Bioanalítico de Medicamentos para la determinación de ceftazidima, meropenem y/o piperacilina en plasma humano (POE_BAM_006) y el correspondiente Procedimiento Operativo Estándar de Validación (POE_VBAM_006), ambos documentos pertenecientes al Sistema de Gestión de la Calidad del LCCM – FBCB – UNL.

Los parámetros de rendimiento del método evaluados fueron: selectividad, curva de calibrado y modelo de predicción, precisión intra-ensayo e inter-ensayo, sesgo, exactitud (evaluación conjunta del sesgo y precisión), efecto dilución y diferentes estudios de estabilidad, tales como: la estabilidad de las SES, de las muestras procesadas en el inyector y en la mesada,

la estabilidad a corto y largo plazo y los ciclos de congelamiento y descongelamiento. Se siguieron para esto los lineamientos y recomendaciones de la guía de validación de método bioanalíticos de la FDA [69]

2.4.3.1. Selectividad

Como se mencionó anteriormente, el alcance de la selectividad se abordó desde el inicio del desarrollo del método, estableciendo las condiciones de trabajo que garanticen *R_s* satisfactorias de los picos de los analitos, incluso en un escenario complejo de polimedicación. Sin embargo, se confirmó la ausencia de SA en los tiempos de retención de los analitos de interés en cromatogramas del solvente de inyección (n=3), de plasmas heparinizados obtenidos a partir de diferentes personas no medicadas (n=6), de plasmas obtenidos a partir de sangre entera hemolizada (n=6) y de plasmas fortificados con los analitos y los fármacos posiblemente concomitantes. Parte de estos resultados se muestran en la **Figura 2.13**, donde se observa que ni el solvente de inyección ni el PB presentaron señal en los tiempos de retención de CAZ (2.70 min), MEM (4.00 min) y PIP (5.50 min) a las longitudes de onda de monitoreo.

Por otro lado, no fue necesario evaluar la interferencia de metabolitos de los antibióticos β -LAs de interés, ya que se sabe que la mayor parte de la dosis que se administra se mantiene inalterada hasta su eliminación renal [181].

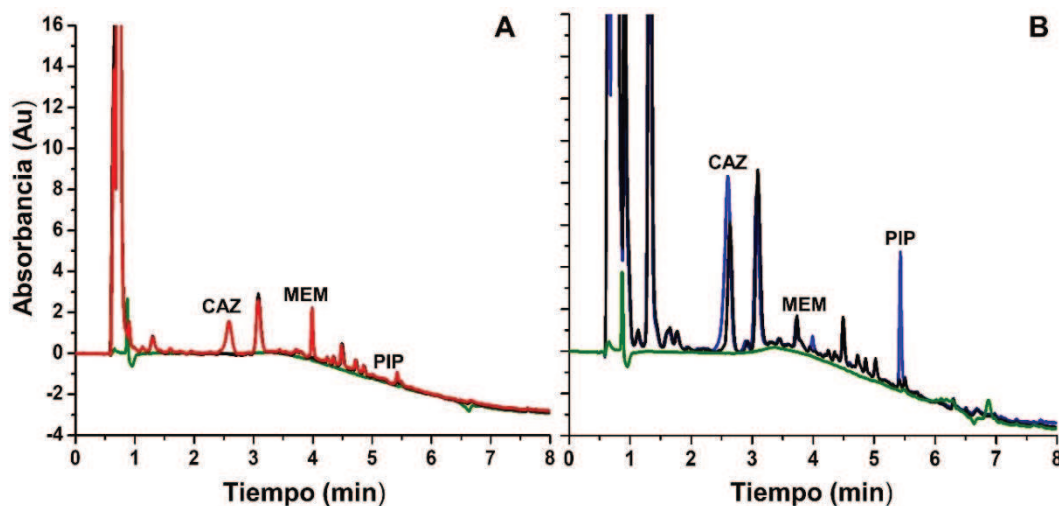


Figura 2.13: Cromatograma registrado a 298 nm (A, rojo) y 250 nm (B, azul) de CAZ (2.0 µg/mL), MEM (0.50 µg/mL) y PIP (4.0 µg/mL) en el límite inferior de cuantificación (LIC). En verde se representa el solvente de inyección y en negro PB.

2.4.3.2. Curva de calibrado y modelo de predicción

Para establecer los modelos de predicción del método para cada uno de los analitos se construyeron curvas de calibrado multinivel con las MCs descritas en la **Tabla 2.3** de la sección

2.3.5, en 7 (siete) niveles de concentración por duplicado cada nivel en tres días diferentes. Esto resultó en un total de nueve curvas de calibrado, tres para cada analito.

Los resultados obtenidos del análisis de regresión en un día de trabajo se muestran en la **Tabla 2.15**. Resultados similares se obtuvieron para los otros dos días.

Tabla 2.15: Parámetros de regresión estimados a partir de las curvas multinivel para cada analito.

Parámetro	Analito	CAZ	MEM	PIP
Rango analítico (µg/mL)		2.0 – 64	0.5 – 16	4.0 – 128
R ²		0.9996	0.9996	0.9993
Pendiente (b)		5469.6	11288.3	3684.1
S _b		31.5	65.9	28.3
Ordenada al origen (a)		-2172.5	-1153.2	-3979.5
S _a		1058.4	559.9	1906.8
IC 95%		-4478.6 – 133.7	-2373.2 – 66.8	-8134.1 – 175.1

La ecuación de regresión $y = a + bx$; R², coeficiente de determinación

S_a: desvío estándar de la ordenada al origen y S_b, desvío estándar de la pendiente.

IC 95%, intervalo de confianza de la ordenada al origen calculado con un 95% de confianza.

Teniendo en cuenta que, en todas las curvas analizadas, el intervalo de confianza de la ordenada al origen incluía el cero, se optó como modelo de predicción para los análisis de rutina, el de la calibración en un único nivel. Este modelo de calibrado implica el cálculo de un factor de calibración obtenido en cada corrida analítica mediante el análisis de una MC de nivel intermedio. Así, el factor de calibración resulta el cociente entre la concentración exacta de la MC y su SA analítica (el área del pico de interés).

De esta manera, los modelos de predicción quedaron representados por la ecuación general:

$$CP = FC \times SA$$

donde SA es la señal analítica, FC es el factor de calibración y CP es la concentración predicha del analito en la MC, MQ o MR.

2.4.3.3. Precisión intra-ensayo e inter-ensayo

El estudio de precisión se llevó a cabo mediante el procesamiento de las MQs descritas en la **Tabla 2.4** de la sección **2.3.5**, es decir cuatro niveles de concentración por quintuplicado en tres días diferentes.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la precisión se muestran en la **Tabla 2.16**. Como se observa, tanto para repetibilidad como para precisión intermedia se cumplen con los

criterios de aceptación establecidos: $CV \leq 15\%$ para todos los niveles, excepto para LIC donde el $CV \leq 20\%$.

2.4.3.4. Sesgo

Para el estudio del sesgo del método en la cuantificación de cada uno de los analitos, se utilizaron los datos obtenidos experimentalmente en el estudio de precisión y se calculó el bias en términos porcentuales (b%). Los resultados obtenidos para cada nivel en un día de trabajo se muestran en la **Tabla 2.16**. Como se observa en dicha tabla, el criterio de aceptación de $\pm 15\%$ para todos los niveles, excepto para el LIC donde puede ser $\pm 20\%$ se cumplió satisfactoriamente.

2.4.3.5. Exactitud. Evaluación conjunta de sesgo y precisión.

La exactitud se evaluó de acuerdo al método propuesto por Hubert y col.[71] en el que se tiene en cuenta la incertidumbre aceptable del resultado informado tal cómo se indica en el ATP.

Los resultados de esta evaluación se muestran en la **Tabla 2.16**. Como se observa en dicha tabla los límites inferior y superior del b% promedio obtenidos para cada analito se encuentran en el rango de los límites de incertidumbre aceptables para el ATP propuesto ($\pm 15\%$ o $\pm 20\%$ para el LIC).

2.4.3.6. Estudios de estabilidad

Finalmente se realizaron diferentes estudios de estabilidad de manera de conocer los periodos aptos para la conservación y manipulación de las diferentes SES y muestras. Los ensayos de estabilidad de muestras se realizaron en diferentes etapas y utilizando MQs en dos niveles de concentración: $3 \times LIC$ y $0.75 \times LSC$.

Como resultado de estos ensayos se verificó que las SESs de cada analito fueron estables al menos durante 72 horas conservadas en heladera entre $4 - 8^{\circ}C$ con una degradación porcentual $\leq 15.0\%$ para cada analito (CAZ: -11.7% , MEM: -2.7% y PIP: -2.8%). Los extractos de las muestras procesadas conservadas en el inyector automático del cromatógrafo a $4^{\circ}C$ resultaron estables durante al menos 7 (siete) horas observándose relación de la señal analítica respecto de la inicial en los rangos de $93.3 - 101.0\%$ para CAZ, de $93.8 - 102.4\%$ para MEM y de $93.8 - 104.7\%$ para PIP. Se verificó también que las muestras son estables al menos durante 6 (seis) horas sobre la mesada del laboratorio y que pueden conservarse a $-80.0^{\circ}C$ durante 2 (dos) meses. Por último, se verificó que las muestras pueden someterse a hasta 3 (tres) ciclos de congelado ($-80.0^{\circ}C$) y descongelado sin degradación significativa de los analitos.

Tabla 2.16: Resultados del estudio de precisión (intra e inter-ensayo), sesgo y exactitud.

Precisión (n=5 por nivel)	CAZ		MEM		PIP	
	CVr(%) ^a	CVi(%) ^b	CVr(%) ^a	CVi(%) ^b	CVr(%) ^a	CVi(%) ^b
LIC	2.0	5.1	3.8	4.5	1.6	6.8
3 x LIC	5.0	4.2	3.6	3.2	2.8	6.4
0.5 x LSC	4.5	6.9	2.9	6.7	2.6	3.0
0.75 x LSC	3.2	6.2	2.2	5.3	1.6	3.3
Sesgo (n=5 por nivel)	(b%)^c					
LIC	3.1		3.7		0.6	
3 x LIC	-2.6		-3.4		-6.3	
0.5 x LSC	0.9		3.9		0.6	
0.75 x LSC	3.1		4.3		-1.2	
Exactitud (n=20)	β					
	1.13		2.13		-1.33	
	Desvío estándar general de β (S)					
	4.13		4.38		3.59	
	Intervalo de Tolerancia de β (P= 0.90, α = 0.05)					
	LI-T^d	LS-T^e	LI-T	LS-T	LI-T	LS-T
	-8.0	10.2	-7.5	11.8	-9.2	6.6

^a Coeficiente de variación obtenido para el ensayo de precisión intra-ensayo: un día, un analista.
^b Coeficiente de variación obtenido para el ensayo de precisión intermedia: tres días, tres analistas.
^c bias porcentual obtenido para un día de trabajo.
^d Límite inferior del intervalo de tolerancia de β.
^e Límite superior del intervalo de tolerancia de β.

2.4.4. Estrategia de control y monitoreo continuo de método.

Una vez finalizada la validación se estableció una estrategia de control de manera de asegurar el rendimiento de calidad del método durante todo el tiempo que el mismo se use en el análisis rutinario. Para ello se propusieron varias pautas de control basadas en el conocimiento adquirido sobre el sistema.

En primer lugar, se indicó en la versión final del **POE_BAM_006** que tanto el pH como la concentración de la SR que conforma la fase móvil son factores críticos que afectan la performance del método. Por lo tanto, se describió detalladamente la preparación de esta solución para que resulte de pH 7.30 (7.18 – 7.46) y concentración 30.3 mM (27.5 – 34.5). Los demás CMPs corresponden a variables instrumentales que pueden mantenerse bajo control de manera relativamente sencilla en un instrumento con calificación operacional periódica.

Por otro lado, se introdujo en el método requerimientos de aptitud del sistema cromatográfico para cada corrida analítica a ser alcanzados por una MQ conteniendo los analitos en concentraciones correspondientes a las respectivas CIM. Los criterios de aceptación para esta

estrategia de control fueron tiempo de retención relativos de aproximadamente 0.65, 1.0 y 1.40 para los picos de CAZ, MEM y PIP respectivamente y factor de cola ≤ 2.0 .

También se generaron cartas de control para evaluar el desempeño del método mediante la evaluación del bias% en la predicción de la concentración de los analitos en la MQ estableciendo para este parámetro un criterio de aceptación $\leq 15.0\%$

Finalmente se impuso como criterio la evaluación de la R_s de los picos de los analitos en las MR analizadas en la rutina, siendo el criterio de aceptación ≥ 1.5 . Este criterio tiene en cuenta el riesgo de cometer errores en la cuantificación de los fármacos por la aparición de señales analíticas debidas a medicación concomitante no evaluada durante el desarrollo del método. En caso de no lograrse la selectividad requerida se pueden introducir pequeños cambios en las variables del sistema cromatográfico basadas en el exhaustivo conocimiento generado al optimizar el método, de manera de alcanzar la resolución necesaria. Además, una pronta consulta al equipo médico permitirá identificar el nuevo fármaco y realizar la experimentación adicional necesaria para estudiar y documentar su comportamiento en el método como posible interferente.

2.5. CONCLUSIONES

El concepto de ciclo de vida y estrategia AQbD se aplicó exitosamente al desarrollo de un nuevo método bioanalítico para la determinación simultánea de tres antibióticos β -LAs en plasmas de pacientes polimedicados. El método, basado en CLAR con detección en el UV es relativamente simple, económicamente conveniente y permite generar resultados en cortos tiempos de análisis. Está destinado a estudios de farmacocinética poblacional y MTD y podría ser aplicado en un centro de salud de mediana complejidad.

Mediante la aplicación de una estrategia experimental adecuada se logró generar valioso conocimiento sobre el comportamiento del método desde las primeras etapas de su desarrollo. El análisis de riesgos y la aplicación de DOE permitieron arribar exitosamente a condiciones experimentales óptimas que aseguran un buen desempeño analítico en un escenario complejo, dado por el tipo de muestra y la polimedicación a la que son sometidos habitualmente los pacientes para los cuales se desarrolló este método.

CAPÍTULO 3

**DOSAJE DE MEROPENEM EN PLASMA DE PACIENTES BAJO
TERAPIA DE REEMPLAZO RENAL. APLICACIÓN DE UN MÉTODO
BIOANALÍTICO ADECUADO PARA EVALUAR OBJETIVOS
TERAPÉUTICOS EN LA PRÁCTICA CLÍNICA**

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. Complejidad de los tratamientos con antibióticos en pacientes críticamente enfermos

Se sabe que aproximadamente el 50% de los pacientes internados en una UTI padece una infección que requiere tratamiento con antibióticos. Dentro de estos cuadros, a su vez, la sepsis severa y el shock séptico son entidades muy frecuentes para las que, si bien en las últimas décadas se ha logrado disminuir la tasa de mortalidad asociada, ésta continúa siendo aún elevada [182].

La sepsis resulta de la compleja interacción entre microorganismos patógenos y la respuesta inflamatoria desbalanceada y sistémica del huésped. En estos casos, el control de la fuente del patógeno, así como la selección y la dosificación adecuada de los fármacos, son intervenciones clínicas que mejoran los resultados de los tratamientos. Sin embargo, este objetivo no es sencillo de lograr ya que, sumado a la variabilidad individual, los pacientes sépticos experimentan cambios fisiológicos importantes como consecuencia de las múltiples fallas orgánicas, lo que altera aún más la farmacocinética de los antibióticos [183]. Particularmente, la aparición de insuficiencia renal aguda es muy frecuente en el contexto de la sepsis, requiriendo de la aplicación de alguna TRR, la cual puede alterar todavía más el clearance renal de las drogas. El tratamiento adecuado con antibióticos es, por lo tanto, en estos casos, un desafío con múltiples factores a contemplar, llevando a la necesidad de genera conocimiento sobre el tema y, de ser necesario, considerar la opción de aplicar esquemas terapéuticos individualizados para cada paciente [182, 184]

3.1.2. Terapias de reemplazo renal

El término *terapia de reemplazo renal* hace referencia a los procedimientos que limpian la sangre de manera extracorpórea sustituyendo la función renal alterada. La depuración de la sangre se logra mediante diálisis, haciendo circular la sangre por un filtro de membrana en contracorriente con un líquido de diálisis; o por convección, haciendo en este caso circular la sangre por un filtro de alta permeabilidad [185].

Las TRRs pueden clasificarse en dos grandes grupos en función de la duración de la misma. Por un lado, están las terapias de reemplazo renal continuas (TTR-C), que se aplican al paciente de manera ininterrumpida y por otro las terapias de reemplazo renal intermitentes (TRR-I), que se aplican durante algunas horas diarias. Dentro de estas últimas se encuentran la hemodiálisis

intermitente convencional (IHD, del inglés *intermittent hemodialysis*) y las terapias híbridas conocidas como terapias de reemplazo renal prolongadas intermitentes (PIRRT, del inglés, *prolonged intermittent renal replacement therapy*). En esta modalidad híbrida se combinan los principios de IHD y TRR-C.

En base a los datos de supervivencia a nivel internacional las TRR-C son actualmente las técnicas preferidas en Europa, Asia y Australia, aun cuando están asociadas a un alto grado de complejidad médica, altos costos y la necesidad de mantener al paciente anticoagulado de manera continua [186].

Dentro de las TRR-C se utilizan tanto la hemofiltración veno-venosa continua (CVVH, del inglés *continuous veno-venous haemofiltration*) como la hemodiafiltración veno-venosa continua (CVVHDF, del inglés *continuous veno-venous haemodiafiltration*).

Por otro lado, las IHD, preferidas en América del Norte [187], se complican a menudo por causar cuadros de hipotensión y una inadecuada remoción de los líquidos [188]. Es así que en la última década las PIRRT han ganado mucho terreno [189, 190]. Entre ellas destacan la diálisis sostenida de baja eficiencia (SLED, del inglés *sustained low-efficiency dialysis*) y la diálisis diaria extendida (EDD, del inglés *extended daily dialysis*).

SLED es una modalidad extendida de diálisis intermitente que combina la ventaja de ser intermitente con una buena remoción de solutos y una mayor estabilidad hemodinámica en comparación con la HDI convencional. Además, es significativamente más económica que las TRR-C. Para la aplicación de esta técnica se utilizan máquinas de diálisis tradicionales, sin necesidad de equipamiento adicional, siendo las soluciones empleadas también de bajo costo, a diferencia de las utilizadas en las terapias continuas. Más aún en estos procedimientos no hace falta anticoagular al paciente [191]. La mayor desventaja que se presenta es que impide un aclaramiento (mencionado en la práctica médica con su término en inglés, *clearance*) regular, de manera que, por un lado, cuando el paciente se encuentra desconectado (fase anúrica) el clearance es infra-fisiológico y depende de la función renal residual que tenga el paciente; mientras que cuando se encuentra realizando el procedimiento, el clearance es supra-fisiológico y dependerá de los ajustes de la técnica (tipo de filtros, dosis, duración, etc.).

Otro aspecto a tener en cuenta es que las membranas utilizadas varían de una técnica a la otra, viéndose de manera general que en SLED hay un clearance más elevado de moléculas pequeñas, mientras que las moléculas de tamaño intermedio (1000 a 10000 Dalton) se remueven en menor medida en relación a TRR-C [192].

En nuestro país la elección de una terapia u otra depende de la demanda que tenga el paciente, de la evolución de su patología y de la disponibilidad de equipamiento de cada institución [185].

3.1.3. Esquemas terapéuticos con meropenem

El MEM, cuyas características fisicoquímicas y actividad antimicrobiana se describieron en el **Capítulo 2** de la presente tesis, se utiliza actualmente con frecuencia en las UTI para el tratamiento de infecciones graves, incluyendo las intra-abdominales, los episodios febriles en pacientes neutropénicos, meningitis, septicemia e infecciones del tracto respiratorio bajo, del tracto urinario, de piel y partes blandas y en infecciones obstétricas y ginecológicas. Este antibiótico β -LA se elimina preferentemente por vía renal sin metabolizar, y su unión a proteínas es baja, aproximadamente del 2%. Esto último, sumado a su hidrofobicidad y a su bajo peso molecular (383.5 Dalton) permite una remoción eficiente del sistema sanguíneo, tanto por hemofiltración como por hemodiálisis [127, 193].

Aunque está ampliamente demostrado que la acción bactericida de los antibióticos β -LA es tiempo dependiente, en la comunidad médica todavía no hay consenso sobre el objetivo terapéutico para los tratamientos con MEM en pacientes críticamente enfermos. Entre los más frecuentes se encuentran protocolos en los que se busca una concentración plasmática cuatro veces superior a la CIM durante el 40% del tiempo que dure el intervalo interdosis [$40\%T > 4 \times CIM$] y otros en los que se busca que la concentración plasmática permanezca todo el tiempo por arriba de la CIM [$100\%T > CIM$] [194].

De igual manera que el logro del objetivo terapéutico, es importante garantizar la administración de dosis no tóxicas del antibiótico. En varios trabajos se ha logrado asociar efectos neurotóxicos con concentraciones elevadas de MEM en el valle [195–197]; mientras que la nefrotoxicidad también ha sido demostrada por algunos investigadores [198].

Por otro lado, las recomendaciones actuales de dosificación para este antibiótico durante las TRRs también varían, encontrándose protocolos de administración en bolo (30 min), prolongada (3 horas) o continua, con y sin dosis de carga de 2 g y con dosis de mantenimiento que van desde los 0.5 gramos cada 8 horas (0.5gc8h), 1 gramo cada 12 horas (1gc12h) y hasta 2 gramos cada 8 horas (2gc8h). Estas recomendaciones se basan en información obtenida a partir de poblaciones heterogéneas de pacientes, en las cuales fueron utilizados diversos equipos y técnicas de hemofiltración o hemodiálisis, por lo que se desconoce si son adecuadas para todos los casos [199–201]

Como se pudo evaluar en la literatura internacional, la falta de estandarización en las TRR, el desconocimiento de cómo cada una de ellas en particular afecta la remoción de los antibióticos, los diversos esquemas terapéuticos vigentes, el temor a los efectos tóxicos y la falta de estudios de farmacocinética en poblaciones particulares son factores que podrían contribuir a terapias antimicrobianas carentes de eficiencia y/o de seguridad. El gran problema es que las concentraciones sub-terapéuticas, no sólo conducen a una falla en el control del foco, sino que podrían estar asociadas al desarrollo de resistencia bacteriana, un enorme problema de salud pública en nuestros tiempos. Por otro lado, la sobre dosificación y/o la acumulación de la droga en fluidos biológicos por falla renal pueden conducir, como ya se mencionó, a la aparición de efectos adversos por toxicidad.

3.1.4. Contribución a la problemática particular

La contribución del presente capítulo de tesis a la problemática particular consistió en la aplicación del método bioanalítico desarrollado y validado descrito en el **Capítulo 2** a la recolección de datos de los niveles plasmáticos de MEM en la población particular constituida por pacientes de nuestro entorno social, internados en una UTI y sometidos a una determinadas TRR. Esta información permitió conocer la farmacocinética de este antibiótico en este entorno clínico y evaluar la pertinencia de los esquemas terapéuticos aplicados.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

Los objetivos del presente capítulo de tesis fueron:

- Utilizar el método bioanalítico desarrollado para determinación de antibióticos β -LA en muestras de plasmas de pacientes polimedicados para llevar adelante un estudio clínico.
- Registrar los valores de los niveles plasmáticos de MEM en pacientes adultos sometidos a algún tipo de TRR en la UTI del Hospital Dr. José María Cullen con el fin de validar los tratamientos empíricos utilizados en la población local y verificar si se alcanzan los objetivos terapéuticos más habituales para pacientes críticamente enfermos.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Ética y consentimiento informado

Como se mencionó en el **Capítulo 2**, este estudio fue aprobado por los comités de ética correspondientes. Además, antes de admitir a los pacientes al estudio, los médicos responsables del estudio clínico obtuvieron los correspondientes consentimientos informados firmados por los mismos pacientes o sus representantes legales.

3.3.2. Diseño del estudio y criterios de inclusión

Se realizó un estudio prospectivo y descriptivo en la UTI del Hospital Dr. José María Cullen de la ciudad de Santa Fe entre los meses de octubre 2018 y diciembre 2019. Este estudio incluyó pacientes mayores de 18 años en tratamiento con MEM, ya sea en monoterapia o terapia combinada y en falla renal aguda, en tratamiento concomitante con algún tipo de TRR por más de 24 horas, ya sea en modalidad continua o terapias híbridas. Se excluyeron los pacientes que fallecieron o suspendieron el tratamiento el primer día del estudio.

3.3.3. Datos recopilados

Por cada paciente que ingresó en el estudio se completó un registro con el diagnóstico de admisión a UTI y a la TRR y con los siguientes datos clínicos y demográficos: edad, sexo, peso corporal actual, índice de masa corporal (IMC), función renal y estadio de falla renal aguda alcanzado al momento de inicio de la TRR, comorbilidades, parámetros de laboratorio clínico, índices de severidad SOFA (del inglés, *Sequential Organ Failure Assessment score*) y APACHE II (del inglés, *Acute Physiology and Chronic Health Disease Classification System II*).

3.3.4. Modalidades de TRR

Se aplicaron dos modalidades diferentes de TRR. Para las TRR-C por CVVH y CVVHDF se utilizó un equipo Prismaflex® (Gambro), con un hemofiltro AN69 (Prismaflex M100®, Gambro), polisulfona de alto flujo (Prismaflex HF1400®, Gambro) o hemofiltro AN69 ST150 (Prismaflex AN69 ST®, Gambro). Para la TRR-I por SLED/PIRRT de alto flujo se utilizó un equipo Fresenius 5008S, con un dializador Helixona FX 600-800.

3.3.5. Análisis farmacodinámico y objetivos terapéuticos

Para establecer los objetivos terapéuticos (OTs) a evaluar se consideró, como modelo, la CIM de MEM para Enterobacterias y para *Pseudomonas aeruginosa* definida por EUCAST [176] que es de 2 µg/mL. De esta manera los OTs analizados fueron:

- **OT1:** concentración plasmática de MEM ≥ 2 µg/mL 100% del tiempo
- **OT2:** concentración plasmática de MEM ≥ 8 µg/mL el 40 % del tiempo interdosis

Las concentraciones en valle por arriba de 50 µg/mL se consideraron indeseables por ser potencialmente tóxicas [202].

3.3.6. Dosificación y toma de muestra

El inicio de la terapia con MEM en los pacientes incluidos en el estudio fue decisión de los médicos tratantes de acuerdo a la situación clínica del paciente y de los rescates microbiológicos encontrados.

Al inicio del tratamiento se les administró una dosis de carga de 2 g de MEM, mientras que la dosis de mantenimiento fue administrada en esquemas dependientes del tipo de TRR.

En la modalidad TRR-C se administró 1g \times 8h de forma extendida mediante infusión endovenosa en 3 horas en 250 mL de solución fisiológica. En la modalidad TRR-I el MEM se administró en forma endovenosa en bolo infundido en 30 minutos en 100 mL de solución fisiológica, una dosis de 1 g antes de comenzar la sesión de diálisis y otra dosis igual inmediatamente después de finalizada la sesión de diálisis.

La estrategia de toma de muestra se llevó a cabo de manera de obtener datos de los niveles plasmáticos de MEM que permitieran analizar el cumplimiento de los OT propuestos. Para ello, se obtuvo sangre entera arterial heparinizada (heparina de litio) a partir de las 24 horas posteriores al comienzo de la administración de la primera dosis de MEM y en tiempos prefijados durante 72 horas. Las muestras de sangre se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 3000 rpm y el plasma se conservó en freezer a -70°C hasta su análisis.

Para pacientes con TRR-C el muestreo se realizó entre 15 - 30 minutos antes de la dosificación (valles) y al 40 % del tiempo inter-dosis (40% ID). Se tomaron muestras durante 3 días consecutivos en dos valles (V_A y V_B) y en el punto correspondiente a 40% ID cada día, completando un total de 9 (nueve) muestras por paciente (**Fig. 3.1 A**).

En el régimen TRR-I se tomó una primera muestra dentro de los 30 minutos previos a la administración de la dosis (pre-diálisis), la que corresponde al valle de la etapa anúrica u oligoanúrica del paciente (V_A). La segunda muestra se tomó al 40 % del tiempo establecido para

la sesión de la TRR-I (40%S) y la tercera muestra inmediatamente finalizada la sesión, es decir, antes de la administración de la dosis post-diálisis, que correspondió al valle de la sesión (V_B). Este esquema se repitió durante 3 días consecutivos, obteniéndose un total de 9 (nueve) muestras por paciente (**Fig. 3.1 B**)

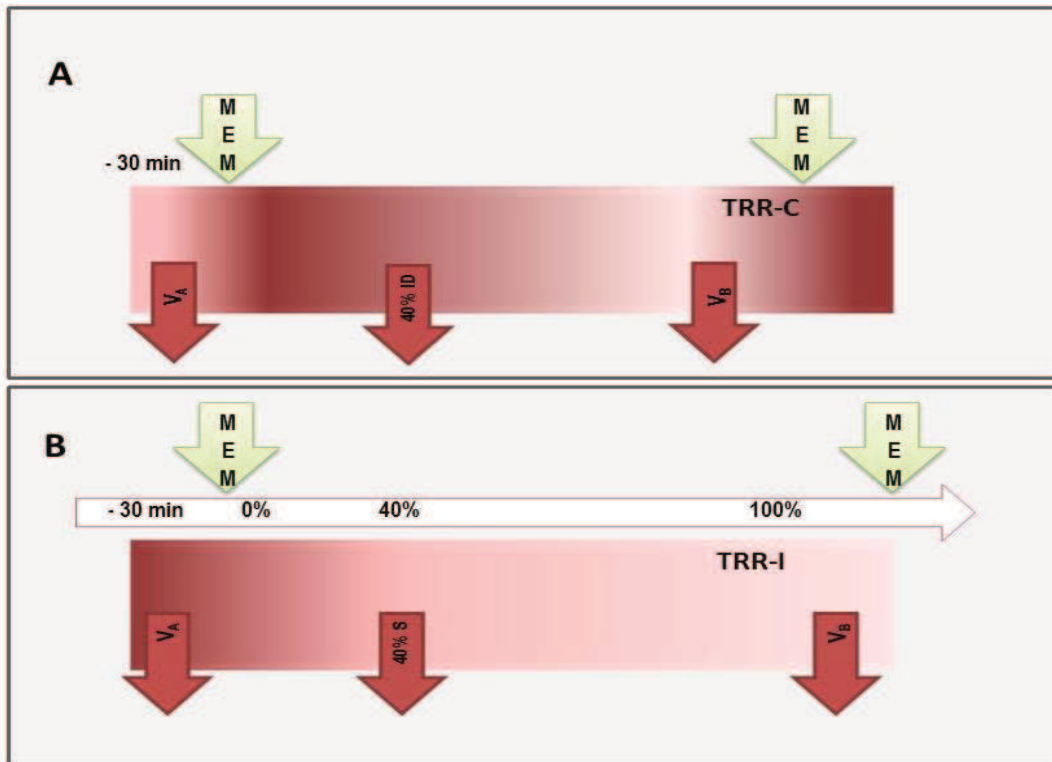


Figura 3.1: Esquema de dosificación de MEM y toma de muestra en pacientes con TRR-C (A) y con TRR-I (B). En TRR-C, V_A y V_B representan muestras en valle antes de la administración de una dosis de MEM y 40% ID el 40% del tiempo entre administración de dosis. En TRR-I, V_A representa muestra en valle antes del inicio de la sesión, V_B una muestra antes de finalizada la sesión y 40% S, es al 40% del tiempo de duración de la sesión.

3.3.7. Cuantificación del meropenem plasmático. Método analítico.

La cuantificación de los niveles plasmáticos de MEM se llevó a cabo utilizando el método cromatográfico cuyo desarrollo, optimización y validación mediante AQbD se describió en el **Capítulo 2** de esta tesis y que está detallado en el **POE_BAM_006**. Brevemente, a una alícuota de 150.0 μ L de plasma recientemente descongelado se adicionaron 150.0 μ L de una solución reguladora conteniendo ácido 2- (N-morfolino)etanosulfónico (MES) 1.0 M a pH=6.0 como estabilizante y se desproteinizó mediante el agregado de 500.0 μ L de acetonitrilo. Se incluyó luego una etapa de preconcentración del antibiótico y extracción de lípidos con cloruro de metileno. Finalmente 20.0 μ L de la fase acuosa se inyectaron en el sistema cromatográfico. La separación de MEM de compuestos endógenos y otros fármacos coadministrados se realizó a 30°C en una columna Zorbax Eclipse Plus C18 (4.6 x 100 mm) empacada con partículas de 3.5 μ m de diámetro.

La fase móvil fluyó por la columna a 1.5 mL/min variando en el tiempo de corrida de 13 minutos, en un gradiente de elución conformado por acetonitrilo, agua y solución de fosfatos 30.3 mM y pH 7.30. La concentración de MEM se cuantificó a 298 nm frente a curva de calibrado y se aplicó la estrategia de control especificada en el **POE_BAM_006** para el monitoreo continuo del método, a los fines de garantizar la calidad de los resultados obtenidos.

3.3.8. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico de los datos de las concentraciones plasmáticas de MEM recolectados durante el estudio trabajando con el programa estadístico MINITAB 16. Para evaluar la normalidad de la distribución de los datos se seleccionó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y además se construyeron gráficas de cajas y bigotes. Como en algunos conjuntos de datos se observó una desviación con respecto a la normalidad, los resultados se expresaron utilizando la mediana y el rango intercuartílico (RI). Para detectar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los conjuntos de datos obtenidos en los pacientes a lo largo de los 3 días consecutivos del estudio se utilizó la prueba no paramétrica de Friedman para muestras relacionadas. El análisis se realizó en cada punto de muestreo y para cada TRR estudiada.

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1. Información de los pacientes y series de muestras

El estudio incluyó un total de 21 pacientes, cuyos datos demográficos, parámetros clínicos, sitio de infección y medicación coadministrada se presentan en la **Tabla 3.1**.

Considerando toda la población estudiada, la insuficiencia respiratoria aguda (n=5), el shock séptico (n=4) y el traumatismo (n=3) fueron los principales motivos, entre otros, de admisión a la UTI. El diagnóstico para el ingreso a una TRR fue el shock séptico en la totalidad de los casos. Además, el 46 % en TRR-C y el 50 % en TRR-I presentó falla múltiple de órganos.

Trece pacientes fueron tratados con TRR-C (11 modalidad CVVHDF y 2 CVVH), mientras que 8 pacientes recibieron TRR-I por modalidad SLED. Un paciente perteneciente a este último grupo, fue admitido en dos ciclos con un período de 14 días entre cada ciclo, por lo que en total se estudiaron 9 episodios. El promedio de edad fue de 46 años para TRR-C y de 47 años para TRR-I, predominio del sexo masculino para ambos procedimientos (76% y 62%). El peso promedio al ingreso a la TRR-C fue de 93 kg, y de 81 kg en TRR-I; el IMC promedio fue de 32 y 23,

respectivamente. El score de SOFA fue similar para ambos grupos, 12 para TRR-C y 11 para TRR-I.

El 69% de los pacientes en TRR-C y el 50% en TRR-I presentó una comorbilidad asociada, resultando la diabetes como la más frecuentemente hallada en ambos grupos, y en algunos pacientes, se observó más de una.

En relación al foco primario de infección se detectó como principal, el respiratorio, en ambos grupos. Se hallaron cultivos positivos en el 77% de los pacientes en TRR-C y en el 25% de los pacientes en TRR-I. La mayoría de estos resultados se obtuvieron a las 48-72 h posteriores al inicio del tratamiento con el antibiótico, por lo tanto, solo un 15% de los pacientes en TRR-C recibió un tratamiento dirigido, es decir, se conocían los resultados de los cultivos antes del inicio de la terapia antibiótica. El 85% restante de los pacientes en TRR-C y la totalidad de los pacientes en TRR-I recibió un tratamiento empírico.

Además, fue destacable la gran cantidad de medicación coadministrada a cada paciente con el objetivo de lograr sinergia en el tratamiento antibiótico y/o tratar la patología de base.

Tabla 3.1: Datos demográficos, parámetros clínicos, sitios de infección y medicación coadministrada de los pacientes del estudio

Información de los pacientes	TRR-C (n=13)	TRR-I (n=8)
Edad, mediana (rango)	46 (29-72)	47 (31-57)
Masculino/Femenino, n (%)	10/3 (76/23)	5/3 (62/37)
Peso, mediana (rango), kg	93 (65-120)	81 (60-100)
IMC, mediana (rango) Kg/m ²	31.9 (24.2 - 46.3)	29.0 (25.9-32.0)
APACHE II score, mediana (rango)	22 (13-37)	23 (12-32)
SOFA score, mediana (rango)	12 (9-15)	11 (8-12)
Comorbilidades, n (%)	9/13 (69)	4/8 (50%)
Diabetes	4	3
Hipertensión arterial	2	0
Enfermedad cardiovascular	2	0
Falla renal crónica	1	0
Trasplante renal	1	1
Obesidad	1	0
Artritis reumatoidea	1	0
Etilismo	1	0
Sitio de la infección (n)		
Neumonía	5	3

Sanguínea	0	3
Intraabdominal	4	1
Cirugía	2	0
Tracto urinario	0	1
Piel y tejidos blandos	1	0
Empiema pleural	1	0
Desconocido	0	1
Cultivo positivo n, (%)	8 (77)	2 (25)
Mortalidad global (%)	76.9	62.0
Medicación coadministrada, n (%)		
Vancomicina	12 (92)	9 (100)
Colistina	6 (46)	7 (78)
Anidulafungina	1 ()	2 (22)
Norepinefrina	11 (84)	7 (78)
Sedo analgesia (Remifentanilo/Midazolam/otros)	13 (100)	8 (89)
Omeprazol	1	1
Hidrocortisona	8 (61)	3 (33)
Insulina	1	3 (33)
Furosemida	1	0
Amiodarona	1	0

En total, se extrajeron y analizaron 102 muestras sanguíneas de pacientes en TRR-C, 68 de ellas correspondientes a valles (V_A y V_B) y 34 al tiempo de 40% ID. De los pacientes en TRR-I se obtuvieron y analizaron un total de 69 muestras, de las cuales 24 correspondieron a V_A , 23 al tiempo 40% S y 22 a V_B . En 18 pacientes se realizó el esquema completo de muestreo, mientras que en 3 pacientes no pudo completarse por fallecimiento (1) o suspensión de la farmacoterapia por adecuación al cultivo (2).

3.4.2. Hallazgos en pacientes con TRR-C

El comportamiento de los niveles plasmáticos de MEM durante los tres días evaluados se muestra en la **Fig. 3.2**. Como puede observarse, el perfil de concentraciones a lo largo de los tres días evaluados fue similar, encontrándose concentraciones de MEM inferiores en los valles y más elevadas en el punto correspondiente al 40% ID.

Dentro de estos resultados se destacan: una muestra de V_A que no alcanzó el OT1 (0.90 $\mu\text{g/mL}$), una muestra al 40% ID que no alcanzó el OT2 (6.60 $\mu\text{g/mL}$) y una muestra de V_B que superó levemente el nivel potencialmente tóxico (52.9 $\mu\text{g/mL}$). Este último valor resultó atípico y se sospecha fuertemente que se debió a un error en el tiempo de toma de la muestra. En general se observa que las fallas en alcanzar los OTs se produjeron en el primer día de muestreo, cuando los parámetros farmacocinéticos de los pacientes se encuentran todavía más alterados.

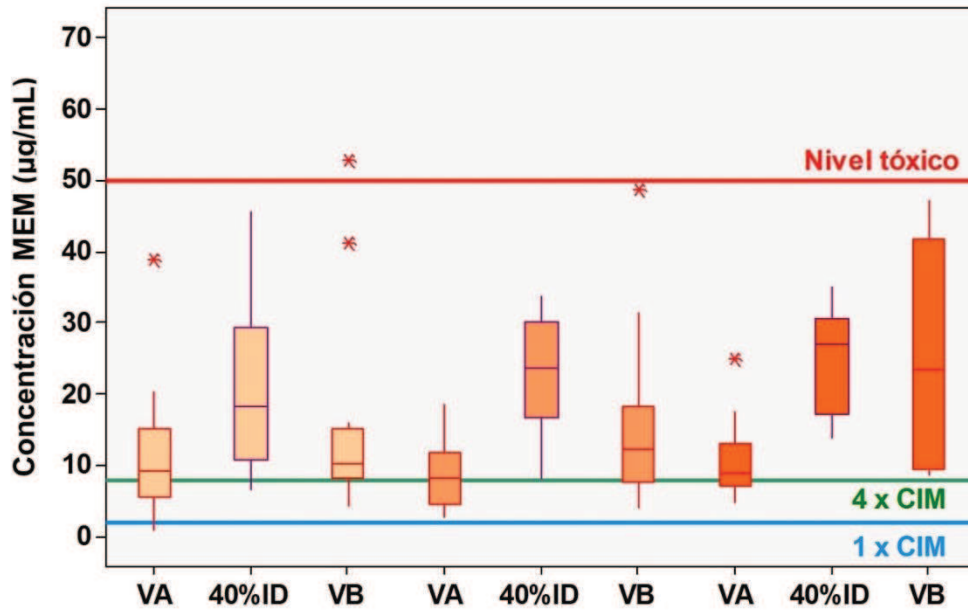


Figura 3.2: Niveles plasmáticos de MEM ($\mu\text{g/mL}$) en los distintos puntos de muestreo evaluados durante 72 h de tratamiento en pacientes sometidos a TRR-C. La línea celeste representa el nivel correspondiente al OT1 (1 x CIM), la línea verde el nivel correspondiente a OT2 (4 x CIM) y la línea roja indica el nivel tóxico (50.0 $\mu\text{g/mL}$).

Por otro lado, si bien en el tercer día de evaluación se observaron algunas concentraciones elevadas en el V_B (lo que aumentó considerablemente la variabilidad en este conjunto de datos respecto al resto de los V_B); no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para cada punto de muestreo durante los tres días evaluados (valor $p > 0.05$) (**Tabla 3.2**).

Tabla 3.2: Evaluación de la normalidad de los datos y comparación estadística de los niveles plasmáticos de MEM obtenidos en TRR-C

Punto de Muestreo	Valor p^a			Valor p^b
	Día 1	Día 2	Día 3	
V_A	0.135	> 0.150	0.041	0.641
40% ID	> 0.150	> 0.150	> 0.150	0.497
V_B	< 0.010	< 0.010	0.094	0.905

^a Valor- p calculado con la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluación de la normalidad.

^b Valor- p calculado con la prueba de Friedman para evaluar diferencias entre días.

El valor- $p < 0.05$ indica significancia estadística.

Los valores de los niveles plasmáticos encontrados para cada punto de muestreo teniendo en cuenta la totalidad de las muestras obtenidas en los tres días del estudio fueron los siguientes:

- V_A : rango de 0.90 – 38.8 $\mu\text{g/mL}$, mediana = 9.00 $\mu\text{g/mL}$ y $RI= 6.10 \mu\text{g/mL}$,
- 40% ID: rango de 6.60 – 45.7 $\mu\text{g/mL}$, mediana = 23.6 $\mu\text{g/mL}$ y $RI= 13.4 \mu\text{g/mL}$,
- V_B : rango de 4.10 – 52.9 $\mu\text{g/mL}$, mediana = 12.1 $\mu\text{g/mL}$ y $RI=22.3 \mu\text{g/mL}$.

Además, se analizó la totalidad de datos por tipo de muestra (muestras en valle y al 40% ID), independientemente del tipo de valle y del día de muestreo. En la **Figura 3.3**, se observan estos resultados gráficamente, mostrando que bajo esta modalidad de TRR ambos OTs se cumplieron en un buen grado.

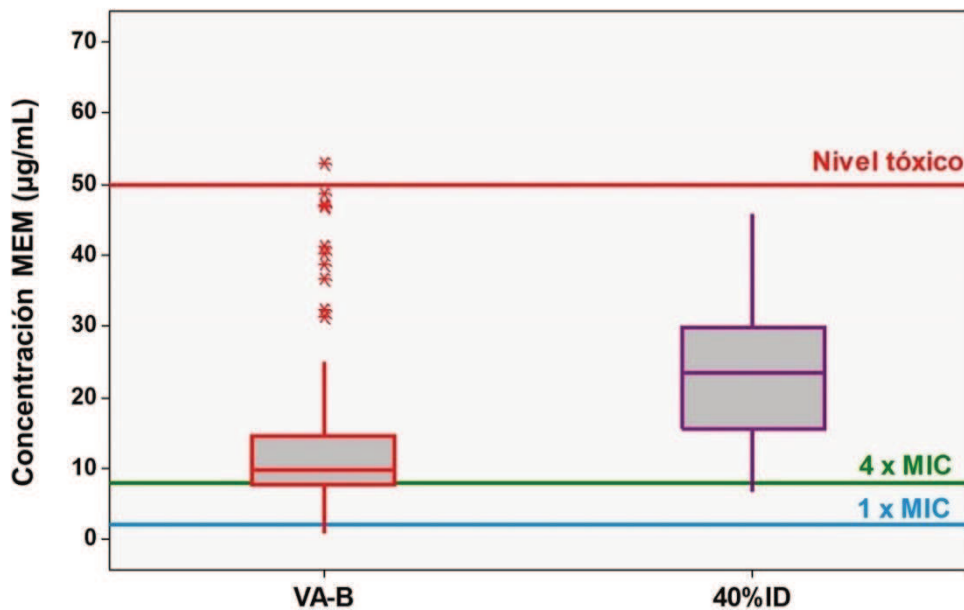


Figura 3.3: Niveles plasmáticos de MEM ($\mu\text{g/mL}$) según el tipo de muestra para pacientes bajo la modalidad de TRR-C. V_{A-B} corresponde a la totalidad de las muestras en valle y 40%ID corresponde la totalidad de las muestras al 40% interdosis a lo largo de los tres días de estudio.

3.4.3. Hallazgos en pacientes con TRR-I

En los pacientes sometidos a TRR-I el comportamiento de los niveles plasmáticos de MEM encontrado fue diferente al observado en TRR-C. En este caso las concentraciones más altas de MEM se encontraron en el primer punto de muestreo (V_A), correspondiente a la etapa anúrica del paciente, para luego descender a medida que avanzó el tiempo de diálisis (**Fig. 3.4**).

Este comportamiento se repitió durante los 3 días evaluados y al igual que en la modalidad continua, algunos conjuntos de datos no se distribuyen normalmente ($\text{valor-}p < 0.05$) y tampoco se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas para cada punto de muestreo a lo largo del tiempo del estudio ($\text{valor-}p > 0.05$) (**Tabla 3.3**).

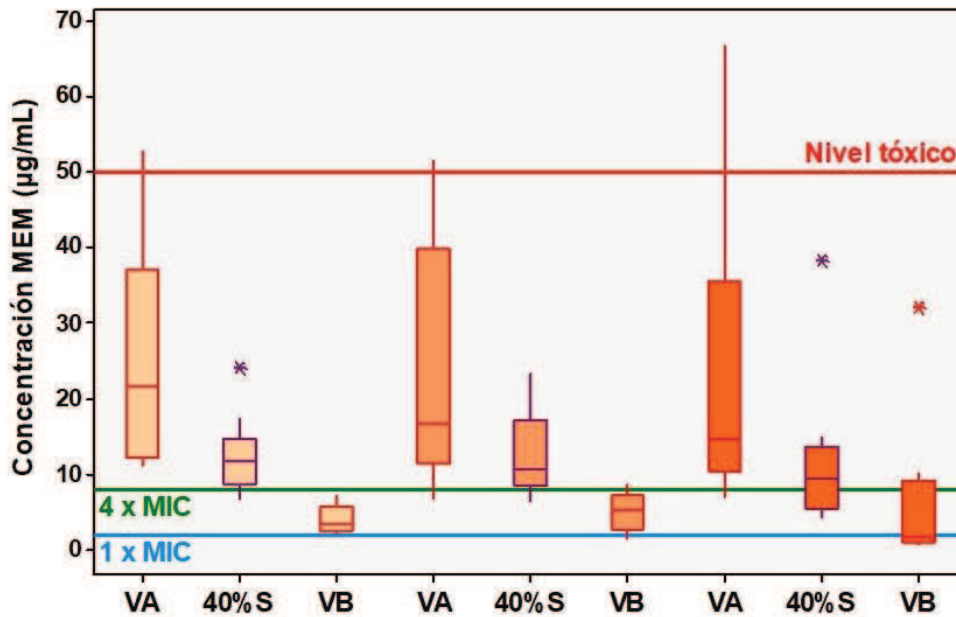


Figura 3.4: Niveles plasmáticos de MEM (µg/mL) en los distintos puntos de muestreo durante 72 h de tratamiento en pacientes sometidos a TRR-I. La línea celeste representa el nivel correspondiente al OT1 (1 x CIM), la línea verde el nivel correspondiente a OT2 (4 x CIM) y la línea roja indica el nivel tóxico (50 µg/mL).

Tabla 3.3: Evaluación de la normalidad de los datos y comparación estadística de los niveles plasmáticos de MEM obtenidos en TRR-I.

Puntos de Muestreo	Valor- <i>p</i> ^a			Valor- <i>p</i> ^b
	Día 1	Día 2	Día 3	
V _A	0.134	>0.150	0.043	0.236
40% S	0.024	0.010	0.027	0.882
V _B	>0.150	>0.150	0.037	0.368

^a Valor-*p* calculado con la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluación de la normalidad.

^b Valor-*p* calculado con la prueba de Friedman para evaluar diferencias entre días.

El valor-*p* < 0.05 indica significancia estadística del estadístico de prueba.

El análisis de los niveles plasmáticos de MEM en función del tipo de muestra para la totalidad de las mismas se representa en la **Figura 3.5**. Para las muestras del tipo V_A se obtuvo una mediana de 17.7 µg/mL, con un RI de 20.5 µg/mL. Es de destacar la gran variabilidad de este grupo, explicable por las diferencias en la diuresis residual entre los pacientes. Tres muestras de este grupo, pertenecientes a tres pacientes diferentes presentaron valores por arriba del nivel potencialmente tóxico, mientras que no se encontró ninguna muestra con concentraciones inferiores a 2.0 µg/mL. Para las muestras correspondientes al tiempo 40% S se observa un brusco decaimiento de la concentración plasmática del antibiótico, con una mediana de 10.5 µg/mL y un RI de 4.7 µg/mL. Seis muestras de este grupo, pertenecientes a 3 pacientes diferentes no lograron alcanzar el OT2. Para las muestras del V_B se obtuvo una mediana de 3.6 µg/mL con un RI de 4.7

µg/mL, encontrándose 5 muestras, pertenecientes a 4 pacientes distintos, que no alcanzaron el OT1. Es de resaltar, además, que la falla fue más evidente en el tercer día muestreado, sugiriendo que la situación se profundiza a medida que transcurre más tiempo de aplicación de la TRR-I.

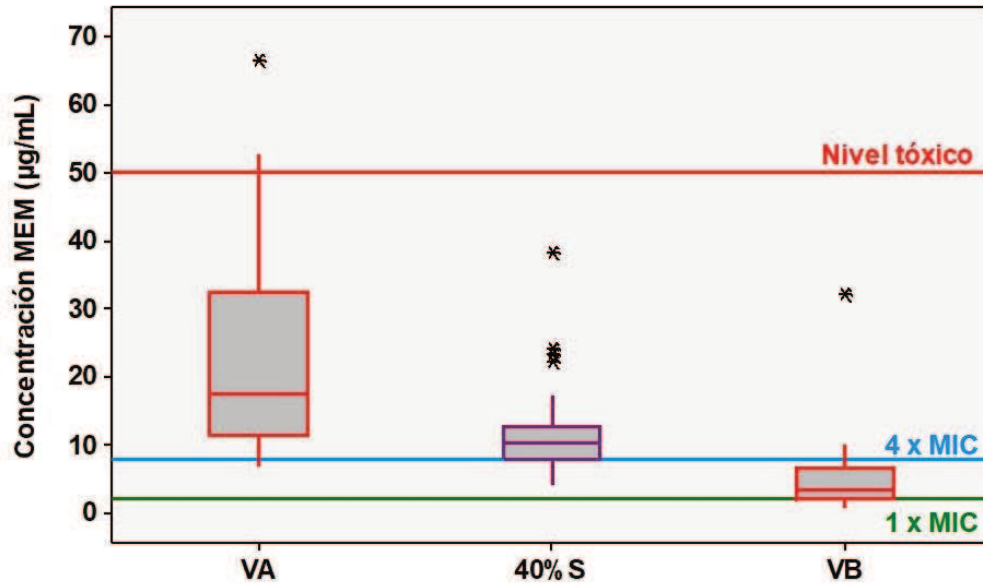


Figura 4.5: Niveles plasmáticos de MEM (µg/mL) según el tipo de muestra para pacientes bajo la modalidad de TRR-I. V_A corresponde a la totalidad de las muestras previo al inicio de sesión, 40% S corresponde la totalidad de las muestras al 40% S de la sesión y V_B a la totalidad de las muestras finalizada la sesión, a lo largo de los tres días de estudio

Finalmente, en la **Tabla 3.4** se pueden observar de manera comparativa los resultados obtenidos para ambas TRR en relación al no cumplimiento de los OTs planteados como objetivos.

Es evidente que hay diferencias en el cumplimiento de los OTs entre ambas TRR. En la TRR-C se observó un porcentaje inferior al 10.0% del no cumplimiento de los OTs, mientras que en la TRR-I la mitad de los pacientes evaluados no logró alcanzar concentraciones superiores a 2.0 µg/mL en la totalidad de la sesión y el 37.5% no superaron las concentraciones de 8.0 µg/mL al 40% del tiempo de la sesión. Esto indica la necesidad de evaluar alguna estrategia que permita mantener las concentraciones plasmáticas de MEM por encima de los OTs llegando al final del tiempo de la sesión en la TRR-I.

Tabla 3.4: Resultados de no cumplimiento de los OTs de ambas TRR.

Objetivo terapéutico	TRR-C				TRR-I			
	Muestras		Pacientes		Muestras		Pacientes	
	n	%	n	%	n	%	n	%
MEM 100%T>CIM	1/102	1.0	1/13	7.7	5/69	7.2	4/8	50.0
MEM 40%T>4 x CIM	1/34	3.0	1/13	7.7	6/23	26.1	3/8	37.5

3.5. CONCLUSIONES

En primer lugar, se puede concluir que el método bioanalítico por cromatografía líquida de alta resolución utilizado, permitió obtener resultados de alta calidad y confiabilidad para las concentraciones plasmáticas de MEM en pacientes polimedicados sometidos a TRR, de manera sencilla, a bajo costo y en cortos tiempos de análisis. El método resultó por lo tanto muy adecuado para la generación de conocimiento mediante la creación de una base de datos para el análisis del comportamiento pK/pD del MEM en una población particular y podría utilizarse para llevar a cabo el MTD de este fármaco de manera muy conveniente.

En cuanto al estudio clínico realizado es valioso destacar que este fue el primer relevamiento de este tipo realizado en la población local (ciudad de Santa Fe, Argentina y su zona de influencia) en pacientes críticamente enfermos, utilizando los equipos de TRR y las técnicas disponibles en la UTI del hospital Dr. José María Cullen.

Mediante los resultados encontrados en este estudio se puede concluir que el logro de los OTs para los tratamientos antibióticos con MEM en esta población de pacientes, dependió ampliamente del tipo de TRR aplicada. Mientras que los pacientes sometidos a TRR-C lograron en su gran mayoría alcanzar los OTs recomendados internacionalmente para el tratamiento de infecciones por enterobacterias y/o *Pseudomonas aeruginosa* utilizando un esquema terapéutico consistente en una dosis de carga de 2 g y una dosis de mantenimiento de 1gc8h (infusión en 3 horas); un alto porcentaje de los pacientes sometidos a TRR-I no alcanzo los OTs con un esquema terapéutico consistente en dosis de carga de 2 g y dosis de mantenimiento de 1g antes y después de la sesión de TRR (bolo en 30 min).

En base a estos resultados el servicio de UTI del hospital propuso una revisión de los esquemas terapéuticos empleados hasta el momento para evitar los tratamientos con dosis subterapéuticas en las TRR-I. Se propuso también estandarizar de la mejor manera posible los horarios de la aplicación de SLED, de manera de poder dosificar el antibiótico también de una manera más regular y sistematizada en beneficio de una concentración plasmática más estable a lo largo de los días que dure el tratamiento farmacológico.

Finalmente es necesario remarcar que el OT inicialmente propuesto de manera empírica deberá adaptarse una vez aislado el microorganismo agresor y determinada su CIM real en estudios de laboratorio.

Considerando entonces la gran variabilidad pK/pD observada en la población estudiada, sumada a la variabilidad aportada por la terapia SLED, y a la variabilidad observada también en la sensibilidad al fármaco de los microorganismos prevalentes en la UTI, se concluye que el MTD de MEM sería la estrategia más adecuada para asegurar el alcance de los OTs en la práctica clínica.

Esta práctica multidisciplinaria debería ser considerada una herramienta de gran valor en el seguimiento del paciente y ser utilizada a diario para individualizar la dosificación y asegurar la exposición óptima al fármaco.

CAPÍTULO 4

**APLICACIÓN DE AQB_D RETROSPECTIVA EN LA ACTUALIZACIÓN
DE UN MÉTODO BIOANALÍTICO UTILIZADO PARA EL MONITOREO
TERAPÉUTICO DE METOTREXATO**

4.1. INTRODUCCIÓN

4.1.1. Tratamientos con altas dosis de metotrexato

El metotrexato (MTX) es uno de los fármacos antineoplásicos con mayor uso clínico, indicado para tratar cánceres como la leucemia linfoblástica aguda (LLA), los linfomas no Hodking, y el osteosarcoma en pacientes adultos y pediátricos [203, 204]. Además de la actividad antiproliferativa, el MTX tiene propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras, por lo que se utiliza también en estrategias terapéuticas para la artritis reumatoide y psoriasis [205].

En general, para tratamientos oncológicos el MTX se utiliza en dosis elevadas, mientras que se emplea en dosis bajas para el tratamiento de las enfermedades reumáticas.

Las dosis mayores o iguales a 500 mg/m² de superficie corporal (SC), administradas por vía intravenosa definen los tratamientos conocidos como de “altas dosis” (HDMTX, por sus siglas en inglés, *High-Dose Metotrexate*) [206], los cuales deben hacerse en internación bajo estricta supervisión médica.

La terapia con HDMTX puede causar una toxicidad significativa, afectando principalmente a las células en replicación activa. Sin embargo, su efecto citotóxico también puede afectar a los tejidos sanos, causando, por ejemplo, depresión de la médula ósea y trastornos gastrointestinales severos. Estos efectos adversos pueden conducir incluso a la mortalidad ocasional del paciente. Para evitar esta toxicidad aguda, se debe recurrir a protocolos estandarizados, conocidos como “terapia de rescate”, para frenar la acción de la droga [206, 207].

Por otro lado, varios factores de variabilidad biológica intra e inter individual, pueden conducir a un retraso en la excreción de MTX, por lo que, la exposición del paciente a concentraciones tóxicas de la droga se prolonga, repercutiendo negativamente en la morbi-mortalidad del tratamiento. Es así que, el MTD de esta droga resulta indispensable en los tratamientos de HDMTX, siendo desde hace años una práctica médica-bioquímica consolidada internacionalmente. Esta práctica permite garantizar el adecuado manejo del paciente implementando correctamente las terapias de rescate y el mantenimiento de la homeostasis corporal, junto con adecuadas medidas de soporte para favorecer la eliminación de la droga del organismo [203, 207].

4.1.2. Contribución a la problemática

La contribución de este capítulo de tesis a la problemática planteada por el tratamiento con HDMTX fue la de mantener a disposición del sistema de salud local un método bioanalítico accesible, eficiente y de calidad para ser utilizado en el MTD de MTX. La actualización del método bioanalítico vigente desde el año 2010 en el marco de AQbD garantiza que los resultados informados por el servicio cumplen con criterios de calidad establecidos.

4.1.3. Metotrexato

4.1.3.1. Propiedades fisicoquímicas y mecanismo de acción

El MTX (PF: 454.44) presenta una estructura química análoga a la del ácido fólico (AF). La molécula está compuesta por una porción heterocíclica unida a una porción amino benzoilo enlazada a su vez por un enlace amida a un residuo de ácido glutámico. Las principales variaciones en la estructura, respecto a la del AF, es la presencia de un grupo amino en la posición C2, en lugar de la función hidroxilo, y la metilación en la posición N10 (**Fig. 4.1**). La molécula es un polielectrolito debido a la presencia de dos grupos carboxilos con constantes de disociación de 3.36 (α -carboxilo) y 4.70 (γ -carboxilo) y varias funciones nitrogenadas potencialmente protonadas, resultando la más básica la guanidina N1 en el anillo pterino (constante de disociación igual 5.71) [203]

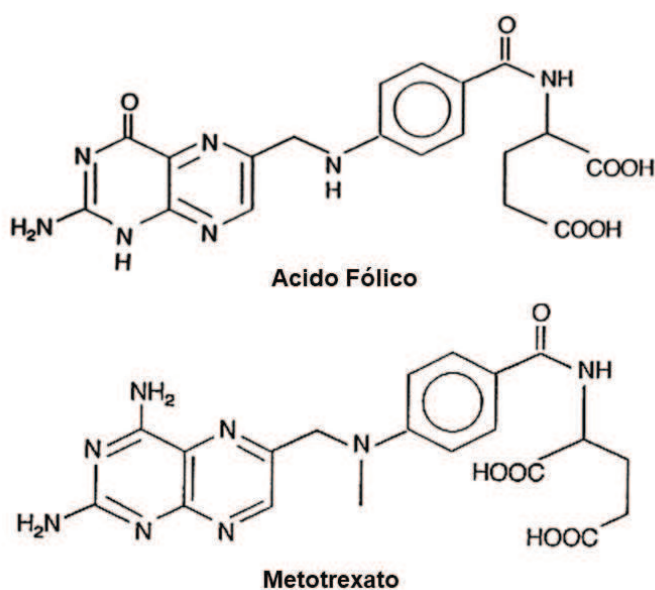


Figura 4.1: Estructura química del ácido fólico y del metotrexato.

En cuanto a la solubilidad, se trata de un compuesto insoluble en agua y soluble en solventes orgánicos como dimetilsulfóxido o dimetilformamida, o en soluciones alcalinas. Sin embargo, en solución básica es inestable y no se recomienda almacenar este tipo de soluciones por tiempo prolongado. Por otro lado, la disolución del MTX en agua es posible en el caso del empleo de la droga como sal sódica. En todos los casos, se debe proteger el compuesto de la luz ya que es inestable a la radiación [208].

El MTX ejerce una actividad antiproliferativa mediante la inhibición competitiva de la dihidrofoloreductasa (DHFR), enzima involucrada en el metabolismo del AF. En la célula, el AF es reducido a dihidrofolato y éste es convertido, por acción de la DHFR, en tetrahidrofolato, la molécula activa del AF. El tetrahidrofolato está involucrado en una serie de reacciones que incluyen la síntesis “*de novo*” de purinas y la síntesis de timidina, mediante la acción de la enzima timidilato sintasa [209]. Al ingresar en la célula, el MTX es retenido dentro de la misma mediante la adición de residuos de ácido glutámico, dando lugar a MTX-poliglutamatos (MTXPG). Ambos tipos de compuestos, MTX libre y MTXPG, inhiben la acción de la enzima DHFR, causando una depleción en los niveles de tetrahidrofolato y la consecuente inhibición de la síntesis de purinas, lo que desencadena un efecto citotóxico, especialmente en células en activa división. Por otro lado, los MTXPG inhiben la enzima timidilato sintasa, contribuyendo al efecto citotóxico del MTX [11, 206] (**Fig. 4.2**).

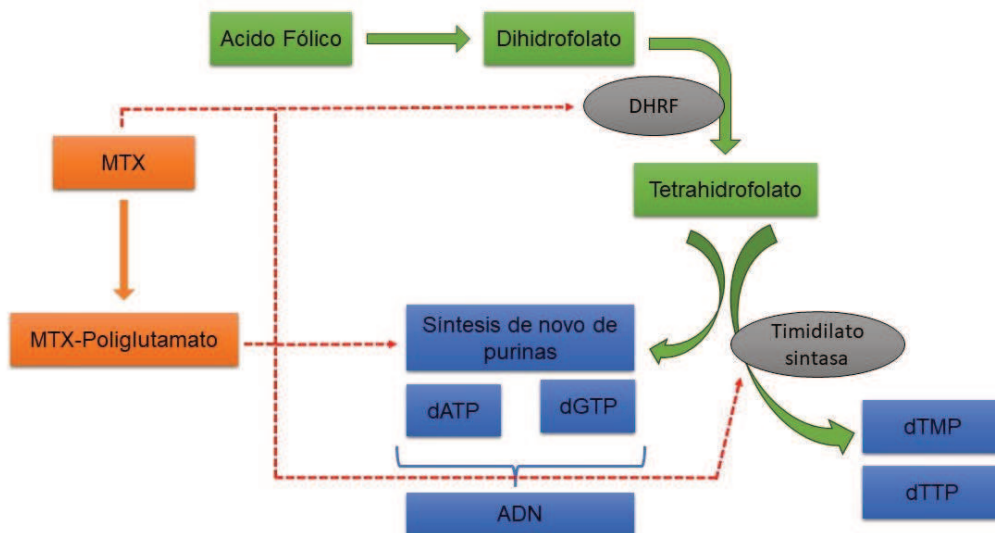


Figura 4.2: Mecanismo de acción del MTX.

4.1.4. Administración, metabolismo y toxicidad

Cómo se mencionó anteriormente, según el esquema terapéutico de la enfermedad tratada, el MTX puede administrarse en diferentes dosis. Las dosis bajas de MTX, menores a 25 mg/m² SC se administran vía oral ya que se absorben rápidamente por el tracto gastrointestinal. Sin embargo, las dosis más altas, por arriba de 3g/m² SC, no se absorben completamente por esta vía por lo que deben administrarse por infusión intravenosa o por vía intratecal [203, 204]

Al pH fisiológico el MTX se presenta en su forma doblemente aniónica, lo que le dificulta atravesar la membrana celular y por ello es transportada al interior de la célula por un sistema transportador específico de alta afinidad [204]. Una vez que ingresa a la célula sigue la misma ruta metabólica del AF; es convertido en poliglutamatos, lo que juega un rol clave en la citotoxicidad de la droga [203].

Otras rutas metabólicas que atraviesa el MTX son las diferentes vías de detoxificación que permiten eliminar la droga del organismo y limitar su efecto citotóxico en el tiempo. Una de ellas es llevada a cabo en el hígado, que involucra la hidroxilación en la posición C7 del anillo pteridínico para formar 7-hidroxi-metotrexato (7-OH-MTX). Otra vía de detoxificación es la metabolización del MTX en ácido 2,4-diamino-N-metilpteroico (DAMPA) por una enzima de la flora bacteriana intestinal, denominada carboxipeptidasa-G2 (CPDG2) [210].

La principal vía de excreción del MTX y sus metabolitos es la renal, mediante filtración glomerular y secreción tubular activa. Dado que el 7-OH-MTX es menos soluble que el MTX en el medio ácido del túbulo renal, puede precipitar causando severos daños renales. Por este motivo, es recomendable tratar a los pacientes con bicarbonato de sodio con el fin de alcalinizar la orina antes de iniciar el tratamiento de HDMTX [203].

La capacidad de metabolizar y eliminar la droga más o menos rápidamente depende de cada paciente, existiendo deficiencias enzimáticas que conducen a una muy pobre metabolización del compuesto. Por otro lado, el retraso en la eliminación del MTX puede estar causado, por ejemplo, por alguna disfunción renal, la falta de hidratación o la alcalinización insuficiente [211].

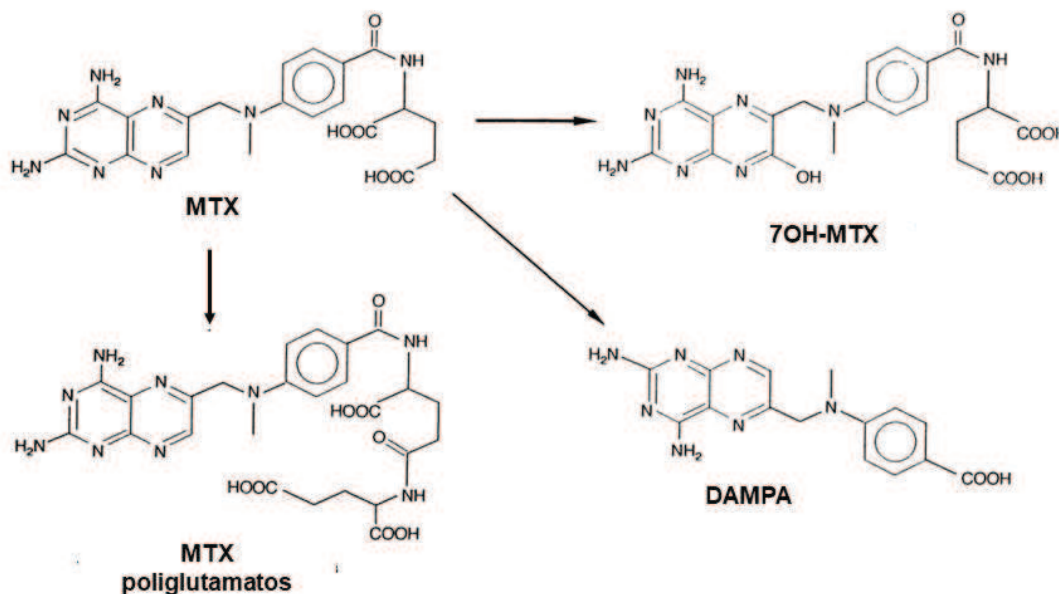


Figura 4.3: Metabolismo del MTX y vías de detoxificación, que dan lugar a la formación de los principales metabolitos: 7-OH-MTX y DAMPA, como la conversión a compuestos citotóxicos como lo son los poliglutamatos.

4.1.5. Importancia del monitoreo terapéutico de MTX

Cómo se mencionó, para limitar los efectos tóxicos del tratamiento HDMTX se utiliza una terapia de rescate, la cual requiere de la administración de otra droga: la leucovorina. La leucovorina o ácido folínico es una forma reducida del AF, que no requiere de la acción de la enzima DHFR para su reducción, por lo que su función no es afectada por la inhibición de esta enzima ejercida por el MTX. Esto permite regenerar la síntesis de purinas y timidina, antes bloqueada por la acción inhibitoria del MTX sobre la DHFR, dando lugar nuevamente a la síntesis de ADN, ARN y proteínas.

La magnitud de la terapia de rescate aplicada a cada paciente depende directamente del nivel de MTX en plasma. Es decir, que teniendo el resultado de la concentración plasmática de MTX a un determinado tiempo pos infusión de la droga, el personal médico debe decidir cómo aplicar el rescate con leucovorina.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

Los objetivos del presente capítulo de tesis fueron:

- Revisión de los protocolos actualmente utilizados en los centros de salud públicos y privados que remiten muestras de plasma de pacientes al LCCM – FBCB – UNL para el dosaje de MTX.
- Actualizar el procedimiento bioanalítico mediante CLAR-DAD aplicado a la monitorización

terapéutica de metotrexato MTX incorporando herramientas de AQbD y gestión del ciclo de vida.

- Desarrollar estrategias de control y de verificación continua del desempeño del método
- Calificar el desempeño del método bioanalítico actualizado mediante ensayos de validación

protocolizados.

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1. Instrumental y equipamiento

Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo líquido Shimadzu equipado con una bomba cuaternaria LC-20AT, inyector automático con refrigeración SIL-30AC Nexera, horno de columna CTO-10ASVP, desgasificador DGU-20A5R y un detector UV-Vis con arreglo de diodos SPDM20A.

Se empleó una columna cromatográfica Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 5.0 µm de tamaño de partícula) de Agilent Technologies.

Se utilizaron también los siguientes instrumentos, equipo y materiales:

- Peachímetro- potenciómetro Termo Scientific Orion 5 Star.
- Electrodo de pH Van London Co. Modelo 573V526R-003B.
- Microcentrífuga para tubos eppendorf Gelec. Modelo G-134
- Vortex Nevation Modelo iSwix.
- Balanza analítica digital (Incertidumbre: 0.00001 g) Ohaus Discovery Modelo DV 215CD.
- Balanza analítica digital (Incertidumbre: 0.0001g) Sartorius Modelo Entris.
- Equipo de sistema de alimentación ininterrumpida, UPS (de sus siglas en inglés, Uninterruptable Power Supply), KATODO. Modelo EA906.
- Equipo de producción de agua ultrapura Millipore Modelo Simplicity System.
- Material volumétrico de borosilicato Clase A.

4.3.2. Softwares para la adquisición y procesamiento de datos

Para la adquisición y procesamiento de datos cromatográficos se utilizó el software Workstation Labsolution LC/GC versión 5.73 de Shimadzu.

La generación de los diseños experimentales, como así también el análisis de datos mediante la MSR se llevó a cabo con el software Design Expert Versión 11 de prueba (State Ease, Miniapolis).

Para el análisis estadístico de los datos de la validación del método se utilizó el programa Microsoft Excel (2013) y STATGRAPHICS Centurion XVIII (Statpoint Technologies, Inc.).

4.3.3. Reactivos y muestras

El estándar farmacéutico secundario de MTX base (88.9 %p/p sobre sustancia tal cual) se adquirió en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los fármacos evaluados para el estudio de selectividad del método frente a la medicación coadministrada fueron estándares farmacéuticos de farmacopea, materias primas de calidad farmacéutica cedidas por Laboratorios LAFEDAR (Paraná, Entre Ríos, Argentina) o preparaciones comerciales adquiridas en farmacias (**Tabla 4.2**).

El solvente orgánico, acetonitrilo (ACN) grado cromatográfico y el ácido acético p.a. se obtuvieron de Sintorgan (Buenos Aires, Argentina), mientras que el cloroformo (CHL), acetato de sodio trihidrato p.a. ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) e hidróxido de sodio p.a. (NaOH) se adquirieron en Cicarelli (San Lorenzo, Argentina). El agua ultrapura se obtuvo en el laboratorio mediante el sistema de purificación de agua Millipore Simplicity.

Tabla 4.2: Listado de la medicación co-administrada

Medicación	Datos/Procedencia
Ácido Fólico	Material certificado-Farmacopea Europea-Lote 1802
Vincristina	Producto comercial – FILAXIS LABORATORIO – Lote 20108H
Piperacilina-Tazobactam	Producto comercial – FABRA LABORATORIO – Lote 55527
Ondansetrón	Materia prima – LAFEDAR– Lote ZOS 0031114
Omeprazol	Producto comercial – SURAR PHARMA – Certificado: 48117
Allopurinol	Producto comercial – LAZAR

El PB se obtuvo a partir de voluntarios no tratados con el fármaco en estudio y se conservó a -20°C hasta el día de uso. Las MRs fueron remitidas al LCCM – FBCB – UNL por los servicios de onco-hematología de los hospitales “Dr. Orlando Alassia” y “J.B Iturraspe” de la ciudad de Santa Fe. Las muestras de plasma se obtuvieron mediante centrifugación de sangre entera heparinizada (usando heparina de litio como anticoagulante) a 6000 rpm durante 2 minutos y se analizaron el mismo día de recibida la muestra.

4.3.4. Soluciones estándares, muestras calibradoras y muestras controles

Todas las soluciones y muestras aquí mencionadas fueron utilizadas durante el desarrollo y/o validación del método.

Las soluciones reguladoras (SRs) se prepararon en diferentes concentraciones mediante disolución de una cantidad determinada de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ p.a. en agua ultrapura y agregado de un volumen determinado de ácido acético p.a. controlando el pH mediante el uso de un peachímetro recientemente calibrado.

Para la evaluación del método se utilizaron soluciones stock (SSs) de MTX que se prepararon mediante pesada de MTX sódico (polvo liofilizado para solución inyectable) y disolución en agua ultrapura para obtener una concentración de aproximadamente 1250 $\mu\text{mol/L}$. A partir de estas SSs se prepararon soluciones intermedias (SIs) mediante dilución en agua ultrapura utilizando material volumétrico clase A para obtener concentraciones de 0.50 y 1.00 $\mu\text{mol/L}$ de MTX en plasma.

Para llevar a cabo la revalidación del método se utilizaron SESs de MTX que se prepararon mediante pesada del estándar farmacéutico secundario de MTX base y posterior disolución en NaOH 0.10 mol/L, lográndose una concentración aproximada de 2500 $\mu\text{mol/L}$. Las SESs, se prepararon diariamente y para cada ensayo en particular. Las concentraciones exactas de las SESs preparadas se calcularon en función de las masas pesadas y la potencia del estándar.

Las SESs se diluyeron con agua ultrapura utilizando material volumétrico clase A para obtener una solución estándar intermedia (SEI) en una concentración de 500 $\mu\text{mol/L}$.

Las soluciones de trabajo (STs) se prepararon mediante dilución en agua ultrapura utilizando material volumétrico clase A a partir de las SESs y SEIs, en las concentraciones objetivo indicadas en la **Tabla 4.3**.

Las MCs se prepararon en tubos eppendorf mediante la fortificación de 225.0 μL de PB con 25.0 μL de las SES o SEI de manera de obtener 9 niveles de calibración en el rango analítico: 0.05 – 50.0 $\mu\text{mol/L}$ para MTX (**Tabla 4.3**). Las MCs se prepararon en tres días diferentes cada vez que se ensayó la curva de calibrado multinivel según los requerimientos del procedimiento de validación.

Tabla 4.3: Preparación y rango de concentraciones de las STs y MCs.

Nivel	1	2	3	4	5	6	7	8	9
STs									
Volumen SES (μL)	-	-	-	-	-	500	1500	3000	5000
Volumen SEI (μL)	25.0	50.0	125	250	500				
Volumen final (mL)					25.0				
Concentración MTX ($\mu\text{mol/L}$)	0.50	1.0	2.5	5.0	10	50	150	300	500
MCs									
Volumen ST (μL)					25.0				

Plasma blanco (μL)						225.0			
Concentración MTX ($\mu\text{mol/L}$)	0.05	0.10	0.25	0.50	1.0	5.0	15	30	50

Las MQs se prepararon siguiendo el mismo procedimiento que para las MCs, pero a partir de SES y SEI preparadas de manera independiente. Para estas muestras, las STs se obtuvieron en cuatro niveles de concentración de manera que permitieran preparar MQs en los niveles que se muestran en la **Tabla 4.4**.

Las MQs, al igual que las MCs, fueron preparadas en días diferentes según el requerimiento de los ensayos de validación.

Tabla 4.4: Preparación y niveles de concentración de las STs y MQs.

Nivel	LIC	NB	NM	NA
STs				
Volumen SEI (μL)	25.0	75.0	-	-
Volumen SES (μL)	-	-	2500	3750
Volumen final (mL)			25.0	
Concentración final MTX ($\mu\text{mol/L}$)	0.50	1.5	250	375
MQs				
Volumen ST (μL)			25.0	
Plasma blanco (μL)			225.0	
Concentración final MTX ($\mu\text{mol/L}$)	0.05	0.15	25.0	37.5

4.3.5. Pretratamiento de las muestras de plasma

El pre-tratamiento para las muestras no fue sujeto a modificaciones y se mantuvo según lo indicado en el **POE_BAM_001** vigente hasta el momento de la actualización. Tanto en la etapa de validación como en la aplicación rutinaria del método, el pre-tratamiento de las muestras MBs, MCs, MQs y/o MRs se llevó a cabo de la misma manera mediante el siguiente protocolo (**Fig. 4.4**):

- 250.0 μL de plasma se trasvasó a un tubo eppendorf de 1.5 mL.
- Se agregó 500.0 μL de ACN, se aplicó vortex durante 20 segundos para permitir la precipitación de proteínas y a continuación se centrifugó a 6000 rpm durante 2 minutos.
- 600.0 μL del sobrenadante se trasvasó a otro tubo eppendorff de 1.5 mL y se agregó 600.0 μL de CHL.
- Se aplicó nuevamente vortex durante 20 segundos para permitir la re-extracción de ACN y la separación de lípidos del plasma.

- Finalmente se centrifugó a 6000 rpm durante 2 minutos y 100.0 µL de la fase superior se trasvasó a un vial de inyección con inserto para su análisis en el cromatógrafo.

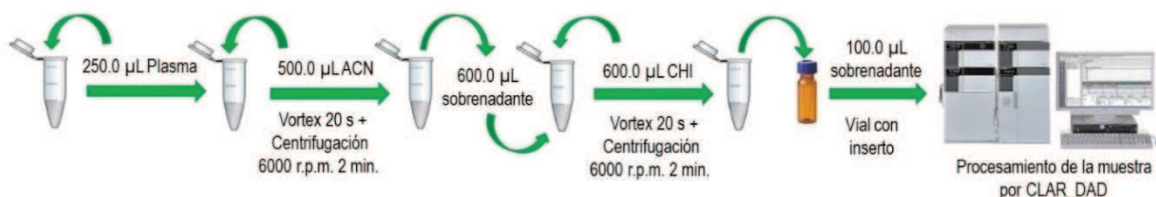


Figura 4.4: Procedimiento para el pre-tratamiento de las muestras de plasma.

4.3.6. Sistema cromatográfico

La actualización del método se basó principalmente en una reevaluación del sistema cromatográfico, por lo tanto, se ajustó desde las condiciones iniciales (empleadas desde la implementación del método) hasta las condiciones óptimas con las cuales se lograron los objetivos propuestos (ver sección **4.4.2.6**)

En la etapa de validación y durante el uso rutinario del método la separación de MTX, su metabolito (7-OH MTX), medicación coadministrada y compuestos endógenos (CE) se llevó a cabo a 25°C en una columna Zorbax Eclipse XDB C18 (4.6 x 150 mm, 5.0 µm de tamaño de partícula). La fase móvil consistió en ACN y SR 400 ± 50 mM a pH=3.65 ± 0.05 con gradiente de elución como se indica en la **Tabla 4.5**, a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min. La temperatura del inyector se mantuvo a 25°C y el volumen de inyección fue de 50 µL. La monitorización de MTX y 7-OH MTX se efectuó a una longitud de onda de 305 nm.

Tabla 4.5: Gradiente de elución de la fase móvil.

Tiempo (min)	ACN (%)	SR (%)
0.00	90.5	9.50
2.00	90.5	9.50
3.00	80.0	20.0
6.50	80.0	20.0
7.30	90.5	9.50
10.0	90.5	9.50

4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

4.4.1. Definición del perfil del objetivo analítico

En función de los antecedentes evaluados y la actualización propuesta en el marco de AQbD para el procedimiento, el ATP quedó definido como: **“La cuantificación selectiva de MTX en plasma humano heparinizado en el rango comprendido entre 0.05 – 500.0 $\mu\text{mol/L}$, con una variabilidad del resultado informable $\leq 15\%$ ($\leq 20\%$ en el LIC) y un bias $\pm 15\%$ ($\pm 20\%$ en el LIC), asegurando suficiente exactitud con una probabilidad $\geq 90\%$ determinada con un 95% de confianza en un corto tiempo de análisis”.**

Para arribar a esta definición se consideraron los aspectos fundamentales del alcance del método. Entre ellos se destacan los requerimientos de calidad del resultado de un dosaje de la concentración de un fármaco en fluidos biológicos para llevar a cabo MTD, la necesidad de disponer del resultado en cortos tiempos, y los objetivos terapéuticos.

4.4.1.1. Revisión de los objetivos terapéuticos

Actualmente en los centros de salud públicos y privados de la ciudad de Santa Fe y alrededores se utilizan las guías de tratamiento elaboradas por el Grupo Argentino de Tratamiento de la Leucemia Aguda (GATLA) [212, 213]. En estas guías se describen los esquemas de dosificación de MTX para pacientes con LLA, linfomas y otras patologías (**Tabla 4.6**).

El rescate con leucovorina se inicia 12 horas pos infusión de MTX con una dosis inicial del 15 - 30 mg/m^2 de SC y se mantiene la dosis cada 6 horas. Sin embargo, si los valores de concentración de MTX superan los valores esperados para cada etapa se corrigen de la siguiente manera:

$$\text{Leucovorina administrada (mg)} = \text{concentración plasmática de MTX } (\mu\text{mol/L}) \times \text{peso corporal (kg)}.$$

Tabla 4.6: Tratamientos con MTX según diagnóstico y concentraciones esperadas pos inicio del tratamiento.

Diagnóstico	Tratamiento	Concentración de MTX ($\mu\text{mol/L}$) pos inicio tratamiento		
LLA		Infusión en 24 horas		
		2g/m ² SC infusión en 24 horas	Hora 24	< 150
			Hora 36	< 3.0
		5g/m ² SC infusión en 24 horas	Hora 42	< 1.0
			Hora 48	< 0.40
		1 – 2 g/m ² SC infusión en 36 horas	Hora > 48	< 0.25
			Infusión en 36 horas	
			Hora 36	< 10.0
			Hora 48	< 0.50
			Hora > 48	< 0.25
Linfomas	1 - 5g/m ² SC infusión en 24 hora	Infusión en 24 horas		
		Hora 24	< 150	

Otros	Hora 48	< 0.40
	Infusión en 4 horas	
	Hora 24	< 2.0
	Hora 48	< 0.20
	Hora >72	< 0.20

4.4.1.2. Redefinición del rango analítico

El rango de calibración establecido en el **POE_VBAM_001** vigente al momento de la actualización, estaba comprendido entre 0.05 – 5.0 $\mu\text{mol/L}$, por lo que permitía cuantificar MTX de 0.05 – 125 $\mu\text{mol/L}$ luego de aplicar diferentes diluciones a las MRs para las cuales se esperaba concentraciones elevadas, acorde al tratamiento recibido por el paciente y la hora de muestreo (ver **Tabla 4.7**).

Tabla 4.7: Diluciones para el procesamiento de la MR según tratamiento y según procedimiento inicial

Tratamiento	Muestra (en h pos inicio de la infusión)	Dilución de la Muestra
12g/m ² SC infusión en 4 horas	24	1/5
5g/m ² SC infusión en 24 horas	24	1/25
1 o 2g/m ² SC infusión en 36 horas	36	1/25

En base a esta información, la revisión mencionada en la sección **4.4.1.1**, y los rangos de concentración plasmática encontrados en los dosajes realizados en el LCCM a lo largo de 12 años, de servicio (**Tabla 4.8**), se redefinió el rango de calibrado y la estrategia de dilución. El nuevo rango analítico se fijó en 0.05 – 50.0 $\mu\text{mol/L}$ y se estableció una única dilución de 1/5 (conformada por 50.0 μL de MR y 200.0 μL de PB), para MRs correspondientes a 24 horas pos inicio de la infusión. Esta estrategia permite cuantificar MTX en concentraciones de 0.05 – 500.0 $\mu\text{mol/L}$.

Tabla 4.8: Rango de concentraciones de MTX halladas en el LCCM según diagnósticos.

Concentración de MTX ($\mu\text{mol/L}$)	LLA	Linfomas y otros
Valores máximos	167.0	60.0
Rango de concentración frecuente	30.0 – 60.0	25.0 – 50.0

4.4.2. Rediseño del método

4.4.2.1. Sistema analítico inicial

El método analítico objeto de actualización en el presente capítulo, comprendía el siguiente sistema cromatográfico:

- Columna cromatográfica: Fase estacionaria C18 ligada a partículas esféricas de sílice completamente porosa de 5.0 µm de diámetro con las siguientes dimensiones: 4.6 x 150 mm.
- Fase móvil: integrada por ACN y una SR compuesta por acetato de sodio/ácido acético 1000 mM a pH= 3.50.
- Velocidad de flujo 1.5 mL/min.
- Modo de elución: gradiente de elución según se indica en la **Tabla 4.5** de la sección **4.3.6**.
- Volumen de inyección: 50 µL.
- Detección: longitud de onda de 305 nm.
- Temperatura del horno de la columna: 25°C.
- Tiempo de corrida: 10.0 min.

En estas condiciones cromatográficas MTX eluye a un tiempo de retención de 3.80 min y el 7-OH-MTX a los 6.50 min.

4.4.2.2. Identificación de riesgos

Mediante la aplicación de Diagramas de Ishikawa (**Fig. 4.5**), se formalizó la identificación de los factores del sistema cromatográfico que podrían tener efecto sobre la calidad del método. Dentro de ellos, y en base al conocimiento ya adquirido en el uso del método, se decidió dejar varios de estos factores en sus niveles iniciales y estudiar experimentalmente el efecto de la concentración y el pH de la SR, de la velocidad de flujo de la fase móvil y de la temperatura del horno de la columna para determinar si los mismos constituían CMPs.

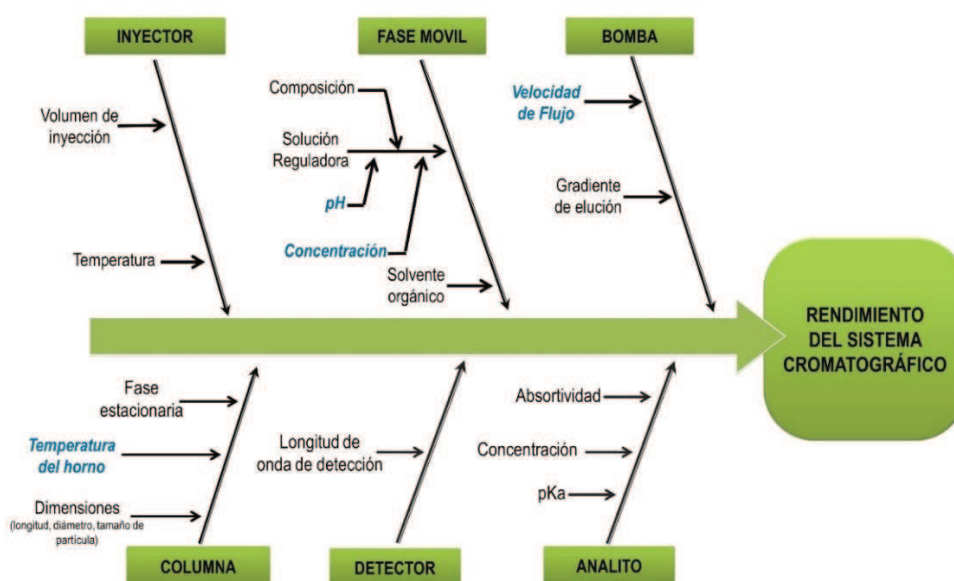


Figura 4.5: Diagramas de Ishikawa para la identificación de riesgos. Factores asociados al rendimiento del sistema cromatográfico. Los factores evaluados se indican en celeste.

4.4.2.3. Medicación coadministrada

En el desarrollo y validación inicial de la selectividad del método se estudió el comportamiento en el sistema cromatográfico de toda la medicación posiblemente coadministrada en los tratamientos de HDMTX, ya que las mismas podrían constituirse como interferencias. Las drogas estudiadas en esa etapa fueron: ondansetrón, clindamicina, ácido tranexámico, piperacilina/tazobactam, vincristina, leucovorina, daunorrubicina, doxorubicina, citarabina, prednisona, ácido fólico, anfotericina B y ranitidina. Como resultado de esa evaluación se determinó que ninguno de los fármacos constituía un interferente ya que no se co-extraían con MTX al aplicar el pre-tratamiento de muestra, eluyeron con el frente de corrida o presentaron R_s mayores a 6.0.

Teniendo presente estos resultados, y con el fin de completar y reevaluar el estudio de la selectividad del método, se verificó el comportamiento en el sistema analítico en evaluación de algunos de los fármacos concomitantes sobre los que se tenía aún poco conocimiento: omeprazol y allopurinol; y sobre aquellos fármacos que se co-extraían con MTX, pero presentaban tiempos de retención relativos altos en el sistema cromatográfico inicial. Esos fármacos fueron: piperacilina/tazobactam, vincristina, ondansetrón y AF.

4.4.2.4. Definición de los CMAs

Se definieron como CMAs las respuestas relacionadas con la selectividad, la sensibilidad y la precisión del método:

- Área de MTX: relacionada con la sensibilidad.
- Factor de cola de MTX: relacionado con la selectividad y precisión.
- Ancho de pico de MTX: relacionado con la selectividad y precisión.
- Resolución del pico de MTX con CEs, con 7-OH-MTX o con la medicación coadministrada: relacionada con la selectividad.

4.4.2.5. Evaluación de riesgos

Los efectos de los factores seleccionados para evaluar experimentalmente se estudiaron mediante una estrategia combinada de análisis uni y multivariado.

4.4.2.5.1. Evaluación de la concentración de la SR

Al evaluar los niveles de los factores en el procedimiento inicial, se comprobó que la

concentración de la SR de la fase móvil era muy elevada (1000 mM) en comparación a la propuesta por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) en la monografía de MTX (aproximadamente 300 mM) [214]. De la misma manera, se observó que en el trabajo de revisión realizado por Rubino[203] sobre métodos cromatográficos para la determinación de MTX en diversas matrices, las SRs empleadas habitualmente estaban en el rango de 10.0 a 200 mM.

Teniendo en cuenta esta información y con el objetivo de introducir una mejora al método, se evaluó el impacto de disminuir la concentración de la SR sobre el comportamiento del analito en el sistema cromatográfico. El interés en disminuir la concentración de la SR se basa en el hecho de que las sales producen un gran desgaste en los componentes del cromatógrafo, generando mayores costos de mantenimiento del instrumento.

Para esta evaluación se prepararon SRs de distintas concentraciones molares para conformar la fase móvil (siempre de pH=3.50) y se evaluó la forma y el *t_r* del pico de MTX. Todos los demás parámetros del sistema se mantuvieron en los niveles basales, por lo que se realizó un análisis univariado del factor concentración de la SR.

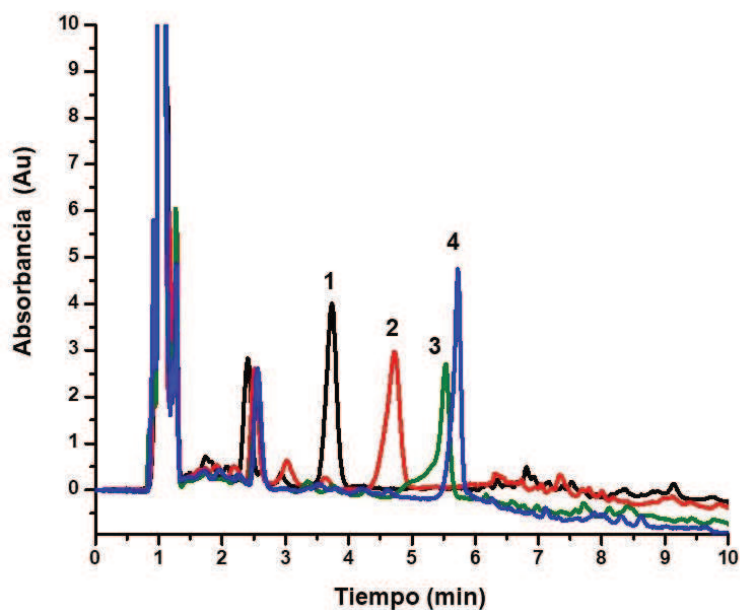


Figura 4.6: Cromatogramas registrados a 305 nm en las condiciones cromatográficas vigentes de una muestra de plasma fortificado con MTX (1.0 $\mu\text{mol/L}$) utilizando diferentes concentraciones de la SR a pH= 3.50 en la fase móvil: (1) 1000 mM, (2) 500 mM, (3) 250 mM y (4) 125 mM.

Cómo se muestra en la **Figura 4.6** a medida que disminuyó la concentración salina, aumentó el tiempo de retención de MTX y en particular, a una concentración aproximada de 250 mM el pico de MTX se deformó. Estos resultados evidenciaron que la concentración salina de la SR es un parámetro con un efecto significativo sobre el método, por lo que realmente constituía un CMP.

4.4.2.5.2. Evaluación del pH de la SR

Teniendo en cuenta las constantes de disociación de la molécula de MTX [215] se seleccionaron y evaluaron 3 (tres) pH diferentes en la SR de la fase móvil: 3.50, 4.00 y 5.00. En todos los casos la concentración salina se mantuvo constante en 300 mM, ya que en evaluaciones anteriores (sección 4.4.2.5.1) se observó que concentraciones menores aumentaban el tiempo de retención y favorecían la deformación del pico del analito. Los demás parámetros del sistema se mantuvieron en sus niveles basales.

En la **Figura 4.7**, se muestra el efecto significativo que posee el pH de la SR sobre los parámetros del pico, produciendo una disminución en el tiempo de retención a medida que aumenta la basicidad de la SR. Con ambos pH extremos, 3.50 y 5.00, se obtuvo una forma de pico aceptable, seleccionándose como segundo factor a evaluar en la etapa de optimización.

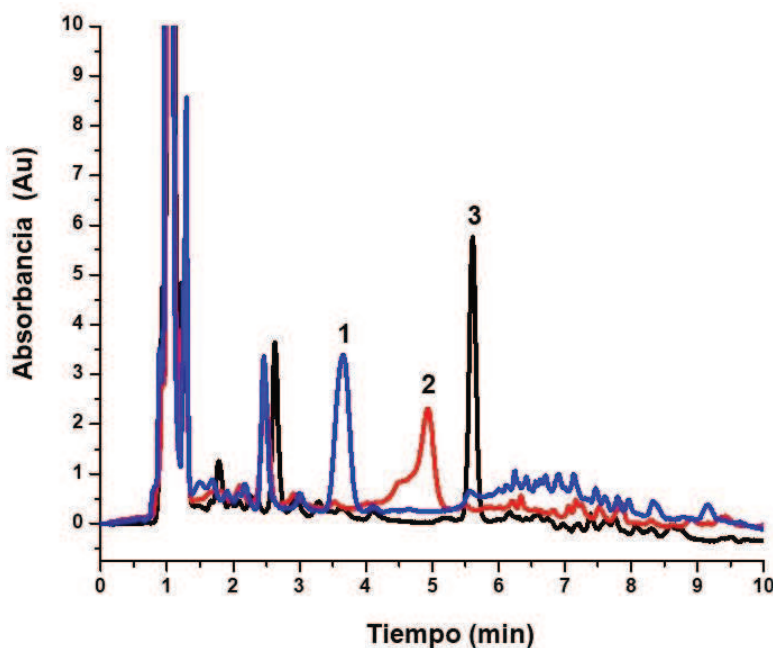


Figura 4.7: Cromatogramas registrados a 305 nm en las condiciones cromatográficas vigentes de una muestra de plasma fortificado con MTX (1.0 µmol/L) utilizando diferentes pH de una SR de 300 mM en la fase móvil: (1) pH=5.00, (2) pH=4.00 y (3) pH=3.50.

4.4.2.5.3. Evaluación de la medicación coadministrada.

En base a lo mencionado en la sección 4.4.3.1, se verificó el comportamiento de algunos fármacos con el sistema cromatográfico modificado, con el fin de completar el estudio de selectividad del método.

Para llevar a cabo esta evaluación, se prepararon soluciones acuosas de cada fármaco a partir de preparados farmacéuticos comerciales (inyectables o comprimidos según el caso) y se utilizaron para fortificar PB en concentraciones adecuadas para obtener buena señal analítica.

Inyectando los extractos de estas muestras en el sistema cromatográfico con fase móvil compuesta por SR 300 mM y pH= 3.50, se observó que ninguno de estos fármacos generaba señal analítica en las proximidades del pico de MTX; excepto el AF ya que eluye en las proximidades del tiempo de retención del MTX y tiene un espectro de absorción similar al analito. Por lo que se decidió evaluar solamente al AF en la etapa de optimización del sistema.

4.4.2.5.4. Evaluación conjunta de la temperatura del horno de la columna y la velocidad de flujo.

Para evaluar conjuntamente la influencia de temperatura del horno de la columna y la velocidad de flujo de la fase móvil sobre el sistema cromatográfico, se utilizó un DFF, con 2 factores en dos niveles (+1, -1), con tres puntos centrales.

En base a los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, la concentración de la SR se estableció en 300 mM y el pH en 3.50.

En la **Tabla 4.9** se muestran los rangos experimentales analizados. En este entorno experimental se evaluaron los siguientes CMA: área de MTX (y_1), factor de cola (y_2), R_s AF – MTX (y_3) y R_s MTX – 7-OH MTX (y_4).

Tabla 4.9: Posibles CMPs y rangos experimentales evaluados

Posibles CMPs – Factores (x)	Descripción	Rango Experimentales
x_1	Temperatura del horno de la columna	25 – 40°C
x_2	Velocidad de flujo de la fase móvil	1.50 – 2.00 mL/min.

Para el trabajo experimental se utilizó un pool de remanentes de plasmas de pacientes previamente analizados en el servicio de MTD del LCCM. Los plasmas correspondieron a 42 – 48 horas pos infusión con el fin de disponer de buena SA del 7-OH-MTX. A un volumen determinado de plasma, se le adicionaron alícuotas de una solución de AF y de una solución de MTX de manera tal de lograr concentraciones de 1.0 $\mu\text{mol/L}$ y 0.50 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Los resultados obtenidos de aplicar el DFF se muestran en la **Tabla 4.10**.

Tabla 4.10: Plan de pruebas experimentales y resultados del DFF

Corrida	Posibles CMPs ^a		CMAs ^b			
	x1 (°C)	x2 (mL/min)	y1	y2	y3	y4
1	25	1.50	26074	1.07	10.4	3.82
2	40	1.50	26397	0.89	8.78	3.96
3	25	2.00	19358	0.90	9.06	4.12
4	40	2.00	25909	1.34	6.61	4.86
5	33	1.75	22734	0.91	8.64	4.16
6	33	1.75	23003	0.89	8.59	4.15
7	33	1.75	22354	0.89	8.97	4.18
Rango de Respuestas	Mínimo		19358	0.89	8.59	3.82
	Máximo		26397	1.34	10.4	4.86

^a CMPs: x1: temperatura del horno de la columna y x2: velocidad de flujo de la fase móvil (mL/min).

^b CMAs: y1: área de MTX, y2: factor de cola de MTX, y3: *Rs* AF – MTX e y4: *Rs* MTX – 7-OH MTX.

Como puede observarse en la **Figura 4.8** los efectos de los factores resultaron significativos para dos de los CMAs estudiados, y3 e y4 (**Fig. 4.8 C y D**), por lo que se verificó que estos factores constituían también CMPs. Sin embargo, los efectos de estos factores sobre y1 e y2 resultaron no significativo (**Fig. 4.8 A y B**).

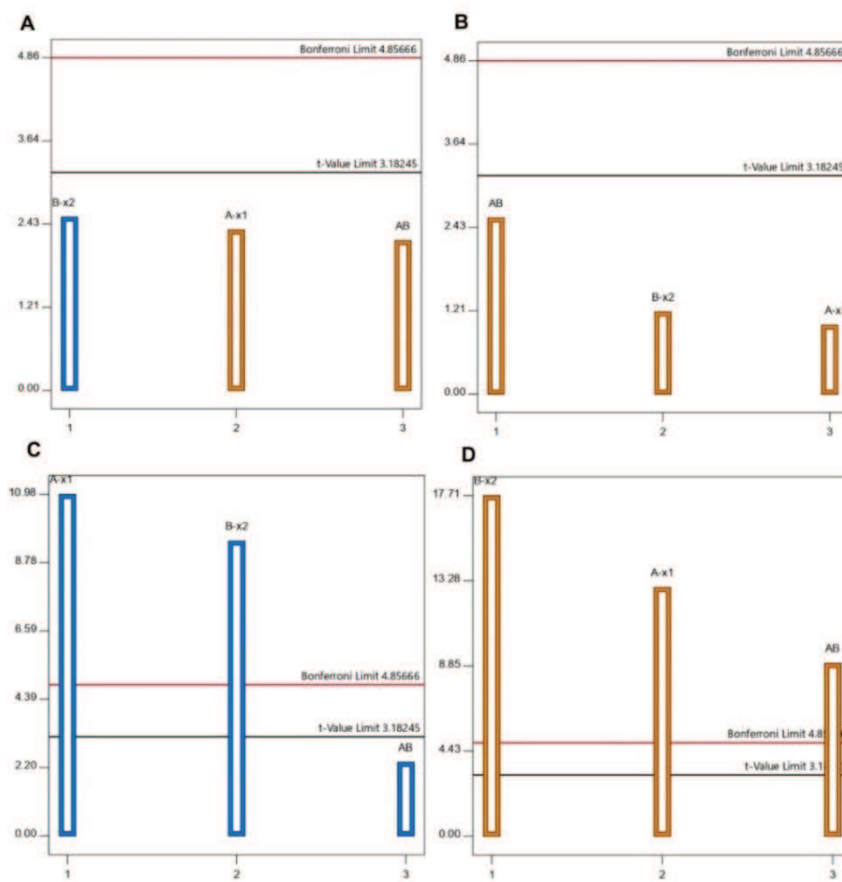


Figura 4.8: Graficas de Pareto de cada una de las respuestas estudiadas: A) y1, área de MTX, B) y2, factor de cola del pico de MTX, C) y3, Resolución entre AF - MTX y D) y4, Resolución entre MTX – 7-OH MTX. Efecto positivo en color naranja y efecto negativo en color azul.

Respecto al efecto de los CMPs sobre y_3 e y_4 resulta interesante observar que mientras ambos factores ejercen un efecto negativo sobre y_3 , indicando una disminución de la R_s entre MTX y AF a medida que aumentan los valores de temperatura del horno de la columna y de la velocidad de flujo, el efecto es contrario sobre la R_s de MTX con su metabolito, la cual se ve favorecida por un aumento de la temperatura y de la velocidad de flujo.

Además, se observó que ambas resoluciones fueron superiores al mínimo requerido de 1.5 (criterio establecido en el **POE_VBAM_001**), lo que permitió un adecuado margen experimental para optimizar las respuestas.

4.4.2.5.5. Generación información detallada del sistema

En base a los resultados obtenidos y siendo un parámetro instrumental fácilmente controlable, se decidió fijar la velocidad de flujo, en un valor conveniente de 1.5 mL/min a los fines de simplificar la etapa de optimización.

Los niveles evaluados de cada CMP en esta etapa se muestran en la **Tabla 4.11**. Dos de los CMPs son factores difíciles de cambiar en un sistema cromatográfico: la concentración y el pH de la SR, por lo que se decidió utilizar en esta oportunidad un diseño sencillo de implementar en esta situación, tal como el DSP. El proceso experimental se llevó a cabo en dos días siguiendo un orden aleatorio para asegurar la independencia de los resultados y minimizar los efectos de los factores no controlados.

Tabla 4.11: Posibles CMPs y rangos experimentales evaluados en el DSP

Posibles CMPs – Factores (x)	Descripción	Rango Experimentales
x_1	Concentración de la SR de la fase móvil	300 – 500 mM
x_2	pH de la SR de la fase móvil	3.50 – 5.00
x_3	Temperatura del horno de la columna	25 – 40°C

Para recabar información detallada sobre el desempeño del método al analizar muestras con baja concentración del analito (dosajes de hora 42 – 48 pos infusión); en las que se vuelve significativa la SA de los CEs, se utilizó un pool de MRs remanentes de pacientes obtenidos a las 48 horas pos infusión. Esta muestra presentaba una SA importante de 7-OH-MTX y se fortificó sucesivamente con AF y MTX para lograr una concentración aproximada de 1.0 $\mu\text{mol/L}$ y 0.5 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. En una evaluación inicial de la muestra fortificada utilizando una fase móvil compuesta por una concentración de la SR de 300 mM y pH= 3.50, se observó que el AF puede coeluir con un compuesto endógenos del plasma (C_0), lo que se manifestó en el aumento de la SA en el mismo t_r de C_0 (**Tabla 4.12** y **Fig. 4.9**) y en el análisis de perfiles espectrales (**Fig.**

4.10). Otra observación importante del análisis de esta muestra fue la presencia de otros CEs. Un, CE₁, que eluye entre AF y MTX, y otro, CE₂, que eluye entre MTX y 7-OH-MTX.

Tabla 4.12: Resultados de la evaluación del pool de plasma fortificado con bajos niveles de MTX y AF.

Muestra	t _R de C ₀ y/o AF	Área de C ₀ y/o AF	t _R MTX	Área de MTX
Pool de plasma	2.645	18037 ^a	5.653	11333
Plasma fortificado con AF	2.811	214527 ^b	5.679	12387
Plasma fortificado con AF y MTX	2.730	216434	5.590	33235

^a El área corresponde solo al compuesto endógeno (C₀)

^b El área corresponde a la sumatoria del C₀ y AF 1.0 µmol/L.

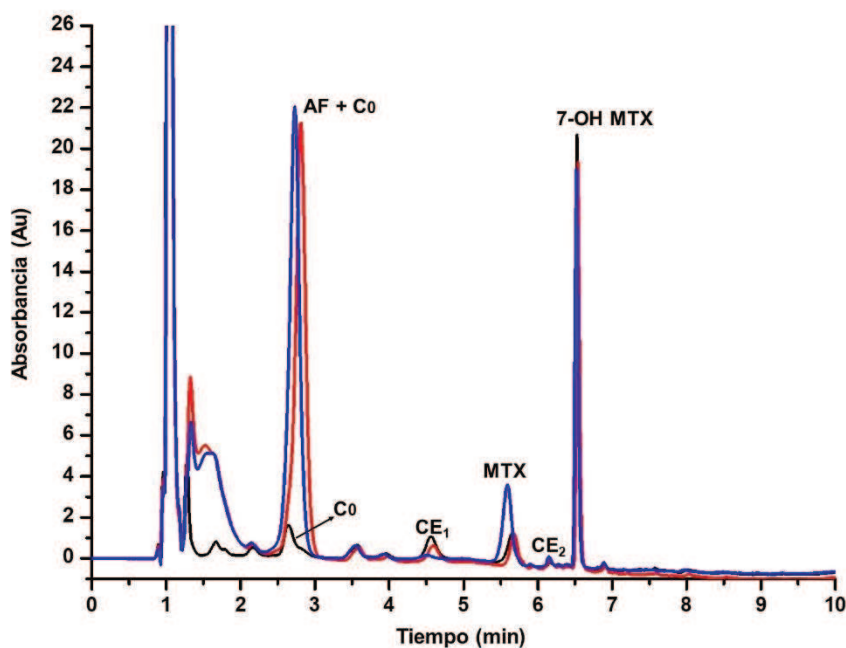


Figura 4.9: Cromatogramas registrados a 305 nm de un pool de plasmas remanentes de MRs (negro), pool de plasma fortificado con AF 1.0 µmol/L (rojo) y pool de plasma fortificado con AF 1.0 µmol/L y MTX 0.50 µmol/L.

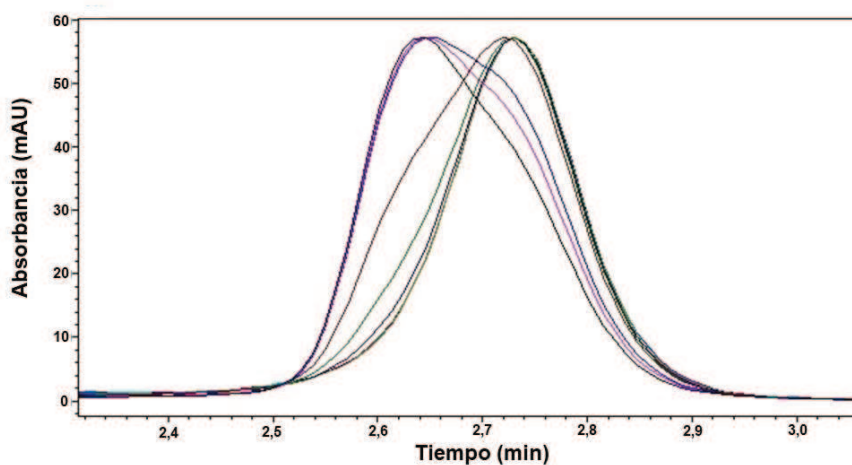


Figura 4.10: Perfil del pico correspondiente a la sumatoria de AF y C₀ que eluye a un tiempo de retención de 2.73 min., registrado a diferentes longitudes de onda (280 – 330 nm, cada 5 nm).

Teniendo en cuenta el análisis de este pool de muestra, los CMAs analizados en esta etapa fueron: factor de cola de MTX (y_1), ancho 5% pico MTX (y_2), altura pico MTX (y_3), R_s CE₁ – MTX (y_4), R_s MTX – CE₂ (y_5), t_r 7-OH MTX (y_6), R_s AF – MTX (y_7), R_s MTX – 7-OH MTX (y_8) y área de pico MTX (y_9). Los criterios de aceptación establecidos para cada CMA se muestran en la **Tabla 4.13**.

La matriz experimental y las respuestas obtenidas al ejecutar el DSP se muestran en la **Tabla 4.14**. Como se observa, los CMAs alcanzaron valores aceptables en la mayoría de las corridas cromatográficas.

Tabla 4.13: Criterios de aceptación de los CMAs

CMAs – Respuestas (y)	Descripción	Criterio de aceptación
y_1	Factor de cola	≤ 2.00
y_2	Ancho de pico cromatográfico 5% MTX	≤ 0.500
y_3	Altura del pico cromatográfico de MTX	≥ 1500
y_4	R_s CE ₁ – MTX	≤ 1.50
y_5	R_s MTX– CE ₂	≤ 1.50
y_6	t_r 7-OH-MTX	≤ 10.00
y_7	R_s AF – MTX	≤ 1.50
y_8	R_s MTX – 7-OH-MTX	≤ 1.50
y_9	Área del pico cromatográfico de MTX	≥ 20000

Tabla 4.14: Plan de pruebas experimentales y resultados del DSP.

Corrida	Grupo	CMPs ^a			CMAs ^b								
		x_1 (mM)	x_2	x_3 (°C)	y_1	y_2	y_3	y_4	y_5	y_6 (min)	y_7	y_8	y_9
1	1	500	5.00	27	0.802	0.496	1454	3.45	1.35	5.35	3.45	12.6	21452
2		500	5.00	40	0.821	0.453	1595	3.42	1.71	4.92	3.42	12.8	21702
3	2	300	4.94	40	0.834	0.448	1542	4.01	1.60	5.36	4.01	12.2	21806
4		300	4.94	26	0.746	0.605	1265	4.06	1.26	5.70	4.06	11.8	21462
5	3	466	3.50	25	1.000	0.300	2413	4.99	0.65	6.54	4.99	19.6	22744
6		466	3.50	40	1.042	0.449	1738	3.13	4.46	6.44	3.13	19.8	22599
7	4	466	3.50	32	1.000	0.400	1727	3.40	0.40	6.48	3.40	20.9	22143
8		407	5.00	35	0.804	0.504	1408	3.45	1.62	5.25	3.45	12.9	21311
9	5	407	5.00	25	0.771	0.553	1268	3.54	1.45	5.49	3.54	12.8	20759
10		382	4.24	25	0.874	0.513	1467	2.10	5.21	6.22	2.10	27.2	22243
11	6	382	4.24	33	0.973	0.522	1590	1.57	6.35	6.14	1.57	28.5	22916
12		382	4.24	33	0.925	0.551	1525	1.51	6.23	6.14	1.51	28.8	22975
13	6	500	4.19	32	0.966	0.454	1814	1.88	5.75	6.14	1.88	28.0	23456
14		500	4.19	40	0.963	0.408	1958	1.68	6.72	6.11	1.68	27.1	24235

15		500	4.19	25	0.911	0.454	1595	2.14	5.78	6.17	2.14	28.9	21261
16	7	382	4.24	32	0.900	0.500	1358	1.63	6.16	6.16	1.63	29.4	21592
17		382	4.24	40	0.901	0.491	1608	1.36	6.12	6.11	1.36	28.7	22896
18		300	3.50	40	0.945	0.512	1642	2.40	3.98	6.43	2.40	22.6	24035
19	8	300	3.50	32	0.893	0.545	1620	2.72	3.22	6.47	2.72	22.5	24101
20		300	3.50	25	0.926	0.434	1992	3.36	3.07	6.50	3.36	20.9	22521
Rango de respuestas		Mínimo			0.746	0.300	1265	1.36	0.40	4.92	1.36	11.8	20759
		Máximo			1.042	0.605	2413	4.99	6.72	6.54	4.99	29.4	24235

^a CMPs: x_1 : concentración de la SR (mM), x_2 : pH de la SR y x_3 : temperatura del horno de la columna (°C).

^b CMAs: y_1 : área de MTX, y_2 : factor de cola de MTX, y_3 : R_s AF – MTX e y_4 : R_s MTX – 7-OH MTX.

Particularmente, tres de las respuestas estudiadas, y_7 , y_8 e y_9 , resultaron no afectadas en el entorno experimental evaluado y no se tuvieron en cuenta en el análisis posterior. Para las otras respuestas (y_1 a y_6), se construyeron los modelos de regresión lineal múltiple y los mismos se ajustaron mediante ANOVA. Los términos no significativos del modelo (valor $p > 0.10$) fueron eliminados, excepto aquellos necesarios para mantener la jerarquía (Tabla 4.15).

Tabla 4.15: Análisis de los modelos ajustados de cada una de las CMA evaluadas

CMA	Rango	Modelo	Términos significativos (x_i/X_i) ^a	Término adicionado ^b	R ² Adj.
y_1	0.716 – 1.042	Lineal	x_1, x_2, X_3	-	0.8751
y_2	0.300 – 0.605	Cúbico	$x_1, x_2, x_1x_2, x_1^2, x_2^2, x_1^2x_2, X_3, x_1X_3, x_2X_3, X_3^2, x_2X_3^2, x_1^2X_3, X_3^3$	x_1^2, X_3^2	0.9058
y_3	1265 – 2413	Cúbico	$x_1, x_2, x_1x_2, x_1^2, x_2^2, x_1^2x_2, X_3, x_1X_3, x_2X_3, X_3^2, x_1^2X_3, x_2^2X_3, x_2X_3^2, X_3^3$	$x_1x_2, x_2^2, x_1X_3, x_2X_3, X_3^2$	0.9034
y_4	1.36 – 4.99	Cúbico	$x_1, x_2, x_1x_2, x_2^2, X_3, x_1X_3, x_2X_3, X_3^2, x_1x_2X_3, x_2X_3^2, X_3^3$	x_1, x_1X_3	0.9695
y_5	0.40 – 6.72	Cuadrático	$x_1, x_2, x_1x_2, x_2^2, X_3, x_1X_3, x_2X_3, X_3^2, x_1x_2X_3, x_1X_3^2, x_2X_3^2$	x_2, x_1X_3, X_3^2	0.9289
y_6	4.92 – 6.54	Cuadrático	$x_1, x_2, x_1x_2, x_2^2, X_3, x_2X_3, x_2^2X_3$	-	0.9977

^a x_i representa los factores difíciles de cambiar del WP e X_i el factor fácil de cambiar del SP.

^b Término adicionado para mantener la jerarquía.

4.4.2.6. Definición del MODR, espacio de control y punto óptimo de trabajo

Para determinar el OWP se llevó a cabo la optimización numérica simultánea de los CMAs y los CMPs maximizando la función deseabilidad D. Los criterios para lograr esas condiciones experimentales óptimas de operabilidad se seleccionaron en base a los objetivos y límites especificados que se muestran en la **Tabla 4.16**.

Tabla 4.16: Condiciones para la optimización numérica y gráfica

Parámetro	Objetivo	Límites		Importancia	
		Inferior	Superior		
CMPs	<i>x1</i>	Minimizar	300	500	3
	<i>x2</i>	En rango	3.50	5.00	3
	<i>x3</i>	En 25°C	25	40	3
CMAs	<i>y1</i>	En 1	0.900	1.042	3
	<i>y2</i>	Minimizar	0.300	0.500	3
	<i>y3</i>	Maximizar	2000	2413	3
	<i>y4</i>	Maximizar	2.00	4.99	3
	<i>y5</i>	Maximizar	2.00	6.73	3
	<i>y6</i>	Minimizar	4.92	6.54	3

El resultado del proceso de optimización numérica arrojó como condiciones estables ($D=0.351$) una concentración de la SR= 400 mM y un pH= 3.65 a una temperatura del horno de la columna 25°C. En estas condiciones, las respuestas predichas por los modelos ajustados, con sus respectivos intervalos de tolerancia al 95 % (Confianza del 95%), fueron: $y1 = 0.944$ (0.791 – 1.097), $y2 = 0.424$ (0.316 – 0.532), $y3 = 2241$ (1713 – 2769), $y4 = 3.55$ (2.86 – 4.24), $y5 = 3.12$ (0.83 – 5.41) e $y6 = 6.48$ (6.40 – 6.56).

En simultaneo a este análisis, se realizó la superposición de las gráficas de contorno de los modelos ajustados de todas CMAs evaluados como se muestra en la **Figura 4.11 A**, donde se observa un área de color amarillo que representa al MODR. Dentro del MODR se definió el EC (representado por un rectángulo en rojo), el que incluye al OWP, como se muestra en la **Figura 4.11 B**.

Como resultado de este análisis quedaron establecidas las siguientes condiciones experimentales para el EC: temperatura del horno de la columna en 25°C, la velocidad de flujo en 1.5 mL/min, la concentración de la SR en 400 ± 50 mmol/L y el pH 3.65 ± 0.05 .

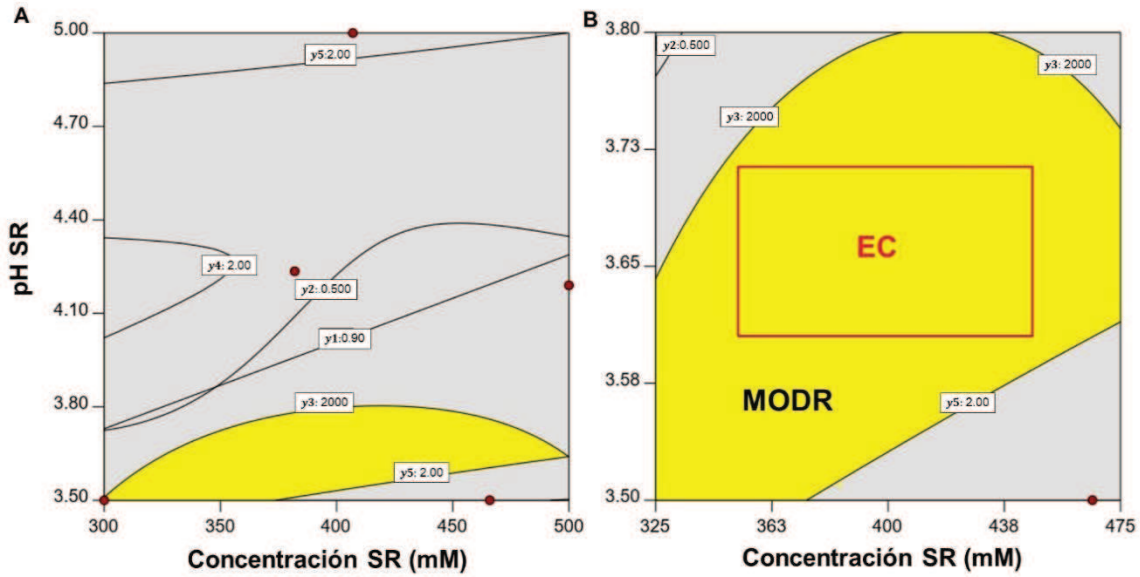


Figura 4.11: Superposición de gráficos de contorno de los modelos ajustados de todas las CMA en el entorno experimental evaluado A) entorno experimental evaluado donde la región amarilla representa el MODR. B) delimitación del espacio de control (EC): temperatura del horno 25°C, concentración de la SR 350 – 450 mM y pH de la SR 3.60 – 3.70.

4.4.2.7. Validación del espacio de control

Las respuestas predichas por los modelos ajustados para el OWP, al igual que el EC, fueron validados mediante un enfoque multivariado. Para tal fin se aplicó un DFC con total de 13 pruebas experimentales con 5 réplicas del punto central, el cual coincidió con el OWP. Los rangos de variación de los CMPs fueron: $x_1 = 350 - 450$ mM y $x_2 = 3.60 - 3.70$, en concordancia con el EC. Se utilizó una muestra de plasma con MTX en las mismas concentraciones evaluadas en el resto de los diseños.

Los resultados de la aplicación del DFC se muestran en la **Tabla 4.17**, lo que evidenciaron el cumplimiento de las respuestas predichas por los modelos ajustados en la etapa de optimización.

Tabla 4.17: Plan de experimentación y resultados del DFC

Corrida	CMPs				CMA			
	x_1 (mM)	x_2	y_1	y_2	y_3	y_4	y_5	y_6
1	450	3.60	0.930	0.359	2517	2.59	3.24	6.48
2	450	3.70	0.989	0.385	2297	1.82	3.95	6.44
3	350	3.70	0.942	0.282	3104	-	3.35	6.49
4	350	3.60	0.929	0.288	3071	2.08	2.74	6.51
5	350	3.60	0.954	0.270	2929	2.68	2.78	6.50
6	400	3.65	0.915	0.369	2344	2.74	2.99	6.48
7	400	3.65	0.889	0.355	2424	2.85	3.05	6.51

8	400	3.65	0.878	0.362	2539	2.81	2.86	6.51
9	350	3.70	0.859	0.376	2438	3.21	2.95	6.48
10	400	3.65	0.891	0.395	2311	2.64	2.87	6.50
11	450	3.60	0.922	0.413	2207	2.23	3.18	6.48
12	450	3.70	0.953	0.412	2086	2.84	3.40	6.45
13	400	3.65	0.897	0.378	2382	3.05	3.04	6.49

Además, se confirmó mediante la evaluación del OWP (n=5) la calidad de los CMAs, cuyas respuestas en promedio fueron: $y_1 = 0.894$, $y_2 = 0.372$, $y_3 = 2400$, $y_4 = 2.82$, $y_5 = 2.96$ e $y_6 = 6.50$, en concordancia con lo predicho por los modelos confirmándose los criterios establecidos para los CMAs (**Fig. 4.12**). Estas condiciones experimentales cumplen los criterios establecidos en el ATP y proporcionan robustez al método.

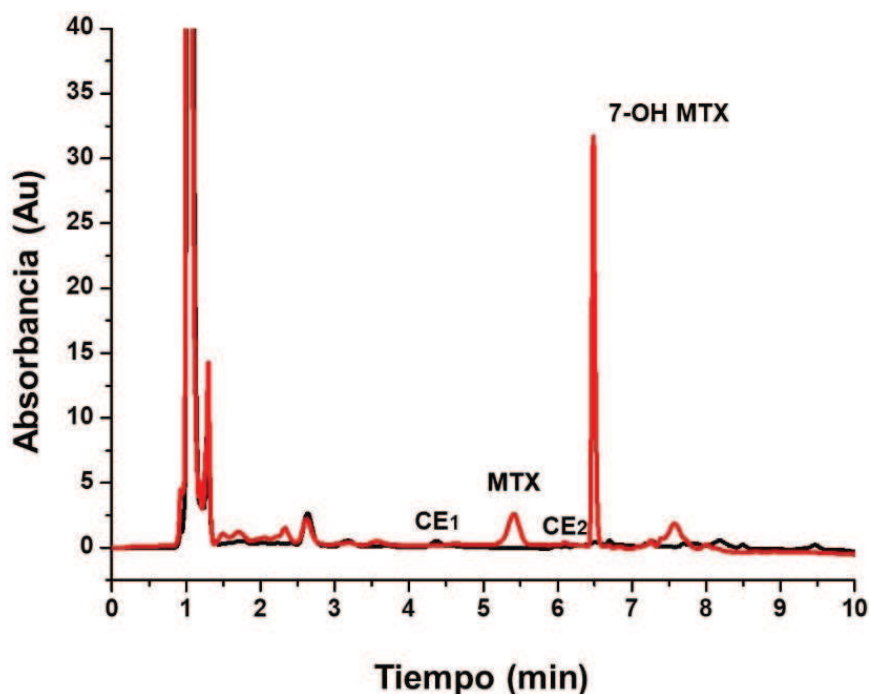


Figura 4.12: Cromatograma registrado a 305 nm de un plasma blanco (negro) y un plasma de un paciente (hora 42 pos infusión) con una concentración aproximada de MTX de 0.5 $\mu\text{mol/L}$ (rojo) en las condiciones del punto óptima de trabajo: temperatura del horno de la columna 25°C, concentración de la SR 400 mM y pH 3.65.

4.4.3. Revalidación del método bioanalítico

Finalizadas las etapas de definición del EC y selección del OWP, se llevó a cabo la revalidación del método para demostrar, mediante evidencia objetiva, que el rendimiento del mismo esté en concordancia con el ATP.

En primer lugar, se redactaron el Procedimiento Operativo Estándar Bioanalítico de Medicamentos para la determinación de metotrexato en plasma humano (**POE_BAM_001 Ed. 3/Rev. 2**) y el correspondiente Procedimiento Operativo Estándar de Validación (**POE_VBAM_001**

Ed. 2/Rev. 1), ambos documentos pertenecientes al Sistema de Gestión de la Calidad del LCCM – FBCB - UNL.

Los parámetros de rendimiento del método evaluados fueron: selectividad, curva de calibrado y modelo de predicción, precisión intra-ensayo e inter-ensayo, sesgo, exactitud (evaluación conjunta del sesgo y precisión).

4.4.3.1. Selectividad

Como se mencionó anteriormente, la selectividad se abordó desde el inicio de la evaluación del método, estableciendo las condiciones de trabajo que garantizaron la capacidad del método de discriminar la señal analítica de MTX de compuestos endógenos del plasma, del metabolito 7-OH-MTX y medicación coadministrada teniendo en cuenta la variabilidad interindividual.

4.4.3.2. Curva de calibrado y modelo de predicción

Para establecer la relación entre la SA y la concentración exacta de MTX en las muestras se construyó una curva de calibrado multinivel con las MCs descritas en la **Tabla 4.3** de la sección **4.3.4**, con nueve niveles de concentración por duplicado cada nivel en tres días diferentes.

Los resultados obtenidos del análisis de regresión en un día de trabajo se muestran en la **Tabla 4.18**. Resultados similares se obtuvieron para los otros dos días.

Tabla 4.18: Parámetros de regresión estimados a partir de una curva de calibrado multinivel.

Parámetros	MTX
Rango analítico (µmol/L)	0.05 – 50.0
R ²	0.9998
Peso	1/CN
Pendiente (b)	43485.2
<i>S_b</i>	144.2
Ordenada al origen (a)	92.0
<i>S_a</i>	218.7
IC 95%	[-317.5 – 555.6]

De esta manera, el modelo de predicción quedó representado por la ecuación general:

$$CP = \frac{SA - a}{b}$$

donde *SA* es la señal analítica, *a* es la ordenada al origen de la ecuación de regresión, *b* es la pendiente de la ecuación de regresión y *CP* es la concentración predicha de MTX en la MC, MQ o MR.

4.4.3.3. Precisión intra-ensayo e inter-ensayo

El estudio de precisión se llevó a cabo mediante el procesamiento de las MQs descritas en la **Tabla 4.4** de la sección **4.3.4**, es decir cuatro niveles de concentración por quintuplicado en tres días diferentes.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la precisión se muestran en la **Tabla 4.19**. Como se observa, tanto para repetibilidad como para precisión intermedia se cumplen con los criterios de aceptación establecidos, $CVr \leq 15\%$ para todos los niveles, excepto para LIC donde el CVr puede ser $\leq 20\%$.

4.4.3.4. Sesgo

Para el estudio del sesgo del método en la cuantificación de MTX, se utilizaron los datos obtenidos experimentalmente en el estudio de precisión y se calculó el bias%. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 4.19**, los cuales cumple satisfactoriamente con los criterios de aceptación establecidos: $\pm 15\%$ para todos los niveles, excepto para el LIC donde puede ser $\pm 20\%$.

4.4.3.5. Exactitud. Evaluación conjunta de sesgo y precisión.

La exactitud se evaluó teniendo en cuenta la incertidumbre aceptable del resultado informado tal cómo se indica en el ATP. Por lo tanto, se calcularon los intervalos de tolerancia (95% confianza) del bias% promedio para un $P=0.90$ y $\alpha=0.10$ cómo se indica en la sección **IV.3.1.6.6**.

Los resultados de esta evaluación se muestran en la **Tabla 4.19**. Como se observa en dicha tabla los límites inferior y superior del b% promedio obtenido se encuentra en el rango de los límites de incertidumbre aceptables para el ATP propuesto ($\pm 15\%$ y $\pm 20\%$ incluido el LIC).

Tabla 4.19: Resultados del estudio de precisión (intra e inter-ensayo), sesgo y exactitud.

Precisión (n=5 por nivel)	MTX	
	CVr(%) ^a	CVi(%) ^b
LIC	7.4	6.3
3 x LIC	2.0	2.3
0.5 x LSC	3.6	2.3
0.75 x LSC	1.0	1.1
Sesgo (n=5 por nivel)	(b%) ^c	
LIC	-4.2	
3 x LIC	-12.7	
0.5 x LSC	-4.4	
0.75 x LSC	-2.81	
Exactitud (n=20)	β	S_{β}

3.9	5.4
Intervalo de Tolerancia de β ($P= 0.90, \alpha = 0.05$)	
LI-T^d	LS-T^e
-8.9	17.0

^a Coeficiente de variación obtenido para el ensayo de precisión intra-ensayo: un día, un analista.

^b Coeficiente de variación obtenido para el ensayo de precisión intermedia: tres días, tres analistas.

^c bias porcentual obtenido para un día de trabajo.

^d Límite inferior de tolerancia de β .

^e Límite superior de tolerancia de β .

4.4.4. Estrategia de control y monitoreo continuo de método.

Una vez finalizada la revalidación del método se estableció una estrategia de control de manera de asegurar el mantenimiento del rendimiento de calidad durante el uso de rutina a lo largo de todo el ciclo de vida, asegurando su aplicabilidad para el fin previsto.

Por un lado, en la versión final del **POE_BAM_001** se estableció la estrategia de control mediante la descripción detallada de la preparación de la fase móvil, prestando especial atención a la concentración de la SR y en el pH. Para ello se describieron detalladamente los rangos de las masas a pesar de acetato de sodio trihidrato, como así también el rango de volumen de ácido acético, con el fin de obtener una SR de concentración de $400 \text{ mM} \pm 50 \text{ mM}$ y un $\text{pH } 3.65 \pm 0.05$. El resto de los CMPs corresponden a variables instrumentales que pueden mantenerse bajo control de manera relativamente sencilla en un instrumento con calificación operacional periódica.

Por otro lado, se consignaron en el mismo procedimiento los requerimientos de aptitud del sistema cromatográfico para cada corrida analítica y la evaluación del desempeño del método. En ambos casos, se propuso la utilización de MQs en dos niveles de concentración correspondientes a la concentración $0.25 \text{ } \mu\text{mol/L}$ y $15.0 \text{ } \mu\text{mol/L}$, procesadas por duplicado. Los criterios de aceptación para ambas evaluaciones fueron los siguientes:

Para aptitud del sistema cromatográfico:

- Resolución entre MTX y cualquier pico correspondiente a compuestos endógenos debe ser ≥ 1.5 .
- El factor de cola del pico correspondiente a MTX debe ser ≤ 2.0
- El ancho del pico correspondiente a MTX debe ser ≤ 0.500
- El número de plato teóricos debe ser > 2000

Para la evaluación del desempeño del método:

- El bias% en la predicción de la concentración de los analitos en las MQs obtenida con la curva de calibración vigente debe ser $\pm 15.0\%$.
- El CV entre las réplicas de las MQs debe ser $\leq 15.0\%$.

La implementación de estos criterios de aceptación asegura el cumplimiento del ATP, y minimiza el riesgo de cometer errores en la cuantificación de MTX en las muestras reales.

Finalmente, se incorporó el uso de cartas control para los parámetros bias% y CV de las MQs, como instrumento para el seguimiento del desempeño del método como así también para la detección de tendencias relativas de los resultados obtenidos. Para la construcción de las cartas control se estableció:

- Bias%: límites de control superior (LCS) e inferior (LCI) como el valor correspondiente a 2 (dos) veces el valor del desvío estándar general del bias%, S_{β} (ver **Tabla 4.19** de la sección **4.4.7.5**). Es decir $\pm 2 S_{\beta}$ (5.4), para ambas MQ y límites de acción igual al criterio establecido para la evaluación de desempeño del método, en el ATP, $\pm 15.0\%$.
- CV: límite de control (LC) igual a 3 (tres) veces el valor del CVi obtenido durante la recalificación del método (ver **Tabla 4.19** de la sección **4.4.7.5**), para las concentraciones más próximas a las MQ evaluadas. De esta manera, para la MQ de concentración igual a $0.25 \mu\text{mol/L}$ se utilizó el valor de CVi obtenido para la MQ = $3 \times \text{LIC}$ (2.3%) y para la MQ de concentración igual $15.0 \mu\text{mol/L}$ el CVi obtenido para la MQ de $0.50 \times \text{LSC}$ (2.3%). Como límite de acción (LA) se utilizó el criterio de aceptación establecido en el ATP, $\text{CV} \leq 15\%$.

En la **Figura 4.13**, se muestran las cartas de control tanto para el CV de las réplicas de ambas MQs (**Fig. 4.13 A**) como para el bias% en la predicción de la concentraciones en las MQs (**Fig. 4.13 B**) con los primeros controles realizados desde que entró en vigencia la nueva versión del **POE_BAM_001**.

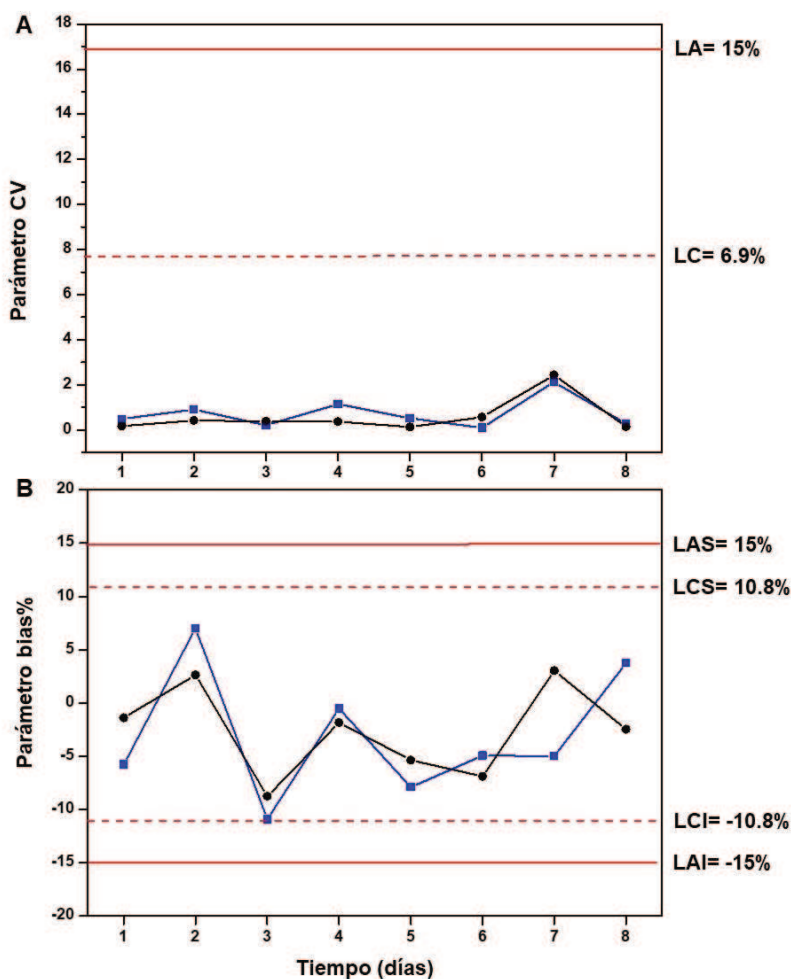


Figura 4.13: Cartas control para el CV (A) y para el bias% (B) de la MQ 0.25 µmol/L (azul) y de la MQ 15.0 µmol/L. Límite de control superior (LCS) e inferior (LCI). Límite de acción superior (LAS) e inferior (LAI). Límite de control (LC) y de acción (LA).

4.4.5. Análisis de muestras reales

Durante el período comprendido entre el año 2017 y hasta a fines del 2022 se remitieron al LCCM un total de 532 muestras de plasma de pacientes pediátricos correspondientes a 50 pacientes desde el hospital de niños “Dr. Orlando Alassia”, de la ciudad de Santa Fe, Argentina. Durante el mismo período, se recibió una cantidad igual o mayor de provenientes del hospital “J. B. Iturraspe” y otros centros de salud privados de la ciudad y alrededores.

Las muestras analizadas correspondieron a pacientes con diferentes patologías, principalmente LLA, linfoma no Hodking y en menor medida osteosarcoma. Particularmente, se observó en dos pacientes el uso de MTX para el tratamiento de tumores teratoide rabdoide, un tumor primario del sistema nervioso central.

Teniendo en cuenta que el principal diagnóstico fue LLA, los tratamientos que habían recibido estos pacientes consistieron principalmente en 5g/m² SC en infusión en 24 horas. Sin

embargo, también se recibieron muestras correspondientes a tratamientos de 2g/m² SC en infusión en 24 horas y 1g/m² SC en infusión en 36 horas. Para el caso particular de osteosarcoma, el tratamiento realizado había sido de 12g/m² SC en infusión en 4 horas.

En base a estos tratamientos se recibieron principalmente muestras correspondientes a 24 (173) y 48 (154) horas pos infusión. Luego, en menor cantidad, y según tratamiento, sumado a las indicaciones médicas, se recibieron un total de 104 muestras correspondientes a hora 42, un total de 13 para hora 36 y solo 4 muestras correspondientes a 4 horas pos infusión de MTX.

De los 50 pacientes analizados en este periodo, en 23 de ellos se tuvo que continuar con el monitoreo de los niveles plasmáticos más allá de las 48 horas pos tratamiento como consecuencia de no lograr las concentraciones de MTX esperadas para ese tiempo pos infusión. Se procesaron entonces muestras correspondientes a hora 66 (38), a hora 72 (21), a hora 88-90 (5), a la hora 96 (7) e incluso en dos oportunidades hasta hora 164 y 192 pos infusión.

Desde el inicio del servicio de MTD de MTX y actualmente, el monitoreo de la concentraciones plasmáticas de MTX se suspende por solicitud de los médicos tratantes, con quienes se mantiene un comunicación fluida desde el arribo de la muestras al laboratorio hasta el informe de los resultados obtenidos en cada etapa.

4.5. CONCLUSIONES

La metodología AQbD retrospectiva se aplicó exitosamente a la actualización de un método bioanalítico para la determinación de los niveles plasmáticos de MTX en pacientes pediátricos y adultos que presentan diferentes patologías oncológicas.

El uso de las diferentes herramientas de AQbD facilitó el ordenamiento de la información histórica del método y permitió sintetizar el conocimiento adquirido para introducir mejoras en el procedimiento, objeto de actualización.

Las mejoras incorporadas resultaron en una reducción de la concentración salina de la fase móvil; la redefinición del rango de calibración que permitió simplificar el procesamiento de las muestras de plasma remitidas al laboratorio, la incorporación de una estrategia de control de los parámetros críticos del método gestionados a través de una evaluación de riesgos y la verificación de la robustez del método mediante la definición del MODR y el espacio de control.

En concordancia con estas mejoras se recalificó el método, el que demostró no sólo el cumplimiento de los requerimientos internacionales para métodos bioanalíticos, sino también el alcance de los criterios de calidad preestablecidos en el ATP. Además, la nueva información generada en relación al comportamiento de las variables del método, permitió la construcción de

las cartas control para los parámetros de desempeño (bias% y CV) con las que se realiza actualmente el monitoreo continuo de la aptitud del sistema cromatográfico en cada corrida analítica.

Se logró entonces simplificar y mejorar el desempeño de un método analítico vigente generando un conocimiento profundo sobre su funcionamiento y de esta manera garantizar la calidad de los resultados informados por el servicio de MTD del LCCM-FBCB-UNL, que se encuentra a disposición del sistema de salud local y alrededores.

VI. CONCLUSIONES

El presente trabajo de tesis abordó diferentes áreas temáticas con el objetivo de contribuir al desarrollo del bioanálisis en general y al MTD en particular, utilizando instrumentación de mediana complejidad y herramientas de AQBd.

El estudio detallado de todo lo relacionado a las propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y farmacodinámicas, como así también a los diferentes esquemas de administración y dosificación de los distintos fármacos evaluados en la presente tesis (etambutol, isoniacida, pirazinamida, meropenem, ceftazidima, piperacilina y metotrexato) permitió adquirir un valioso conocimiento sobre las diferentes problemáticas presentadas por las farmacoterapias abordadas.

La CLAR-UV-Vis, como técnica analítica, y el empleo de nuevas fases estacionarias con tecnología de partículas altamente eficientes, demostraron ser de gran utilidad para el cumplimiento de los atributos de calidad preestablecidos para los diferentes métodos propuestos. Además, y en concordancia con la tecnología seleccionada, los procedimientos de pre-tratamiento de las muestras de plasma, como la precipitación de proteínas y la extracción líquido-líquido, resultaron sencillos y aptos para lograr los requerimientos de calidad propuestos. Con esto se puso de manifiesto que no fue necesario llevar a cabo pre-tratamientos de muestra complejos y/o la utilización de equipamiento sofisticado, estrategias que se defienden habitualmente en la literatura científica para el abordaje de problemas analíticos similares a los aquí presentados.

La incorporación de los conceptos y herramientas que brindan la metodología AQBd y la gestión del ciclo vida facilitaron en gran medida el diseño, la implementación e incluso la actualización de métodos bioanalíticos para MTD. Estas estrategias demostraron concretamente ser de suma utilidad para el logro de selectividad y sensibilidad analítica en escenarios sumamente complejos, tales como la determinación de bajas concentraciones de fármacos en muestras de plasma de pacientes polimedificados.

Se demostró que los requerimientos de calidad internacionalmente consensuados para un bioanálisis destinado al MTD, se pueden plasmar en la definición del ATP del método resultando esto beneficioso, tanto como punto de partida para el desarrollo de los nuevos métodos bioanalíticos, como para la actualización de métodos en uso.

En este contexto, se destacaron los valiosos aportes de la gestión de riesgos, los diseños experimentales, la metodología de superficie de respuesta y la función deseabilidad de Derringer,

para descubrir los CMPs y encontrar las condiciones operativas que garanticen un adecuado desempeño de los CMAs.

La definición del MODR, el punto de trabajo y el espacio de control permitieron encontrar condiciones operativas robustas y generar estrategias de control para los métodos propuestos, de manera de garantizar la obtención de resultados altamente confiables durante el uso rutinario de los mismos.

Se demostró también que, mediante la aplicación de la metodología AqBd, la calidad del método bioanalítico se logra desde las primeras etapas de su desarrollo, arribando a la etapa de validación con un valioso conocimiento sobre el funcionamiento del método, por lo que esta última evaluación formal se realiza de manera sencilla y sin riesgo de obtener resultados no satisfactorios.

Es así que, abordando problemáticas relacionadas a terapias farmacológicas actuales, se logró generar una plataforma bioanalítica de calidad basada en el diseño, destinada a la determinación de las concentraciones plasmáticas de antibióticos betalactámicos, tuberculostáticos y metotrexato para llevar a cabo estudios de farmacocinética poblacional y MTD. Actualmente, esta plataforma se encuentra disponible en el LCCM-FBCB-UNL y resulta en un gran aporte para la comunidad médica de la ciudad de Santa Fe y alrededores.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Goodman L, Gilman A. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 11th ed. Mc Graw Hill Interamericana, 2006.
- [2] Kang JS, Lee MH. Overview of therapeutic drug monitoring. *Korean Journal of Internal Medicine* 2009; 24: 1–10.
- [3] Eap CB, Buclin T, Baumann P. Interindividual Variability of the Clinical Pharmacokinetics of Methadone Implications for the Treatment of Opioid Dependence. *Clin Pharmacokinetics* 2002; 41: 1153–1193.
- [4] Lin JH. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Variability: A Daunting Challenge in Drug Therapy. *Curr Drug Metab* 2007; 8: 109–136.
- [5] Millner L, Rodriguez C, Jortani SA. A clinical approach to solving discrepancies in therapeutic drug monitoring results for patients on sirolimus or tacrolimus: Towards personalized medicine, immunosuppression and pharmacogenomics. *Clinica Chimica Acta* 2015; 450: 15–18.
- [6] Bowers LD. Analytical goals in therapeutic drug monitoring. *Clin Chem* 1998; 44: 375–380.
- [7] Yang YL, Lin DT, Chang SK, et al. Pharmacogenomic variations in treatment protocols for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 54: 206–211.
- [8] Eliasson E, Lindh JD, Malmström RE, et al. Therapeutic drug monitoring for tomorrow. *Eur J Clin Pharmacol* 2013; 69: S25–S32.
- [9] Escobar QFL. Monitorización terapéutica de fármacos y aspectos prácticos de farmacocinética. *Rev Med Clin Condes* 2016; 27: 605–614.
- [10] Calvo MV, García MJ, Martínez J, et al. Farmacocinética Clínica. In: *Farmacia Hospitalaria. Tomo I*. Barcelona: SCM, SL, 2002, pp. 625–665.
- [11] Ritter JM, Flower RJ, Henderson G, et al. *Rang and Dale's Pharmacology*. 9th ed. Elsevier, 2018.
- [12] Horcajada JP. Aplicabilidad de los parámetros PK/PD de los antimicrobianos en el tratamiento de infecciones complejas y resistencias extremas. *Rev Esp Quimioter* 2015; 28: 16–18.

- [13] Aarmoutse RE, Schapiro JM, Boucher CAB, et al. *Therapeutic Drug Monitoring An Aid to Optimising Response to Antiretroviral Drugs?* 2003.
- [14] Johannessen SI, Battino D, Berry DJ, et al. Therapeutic Drug Monitoring of the Newer Antiepileptic Drugs. *Ther Drug Monit* 2003; 25: 347–363.
- [15] Shokry E, Villanelli F, Malvagia S, et al. Therapeutic drug monitoring of carbamazepine and its metabolite in children from dried blood spots using liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2015; 109: 164–170.
- [16] Okada K, Kimura T, Mikamo H, et al. Clinical practice guidelines for therapeutic drug monitoring of arbekacin: A consensus review of the Japanese Society of Chemotherapy and the Japanese Society of Therapeutic Drug Monitoring. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2014; 20: 1–5.
- [17] Gould IM, David MZ, Esposito S, et al. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2012; 39: 96–104.
- [18] Grégoire M, Leroy AG, Bouquié R, et al. Simultaneous determination of ceftaroline, daptomycin, linezolid and rifampicin concentrations in human plasma by on-line solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2016; 118: 17–26.
- [19] Shipkova M, Jamoussi H. *Therapeutic Drug Monitoring of Antibiotic Drugs: The Role of the Clinical Laboratory*. 2021.
- [20] Pai MP, Neely M, Rodvold KA, et al. Innovative approaches to optimizing the delivery of vancomycin in individual patients. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2014; 77: 50–57.
- [21] Jacob JT, Diaz Granados CA. High vancomycin minimum inhibitory concentration and clinical outcomes in adults with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases* 2013; 17: e93–e100.
- [22] Field SK, Fisher D, Jarand JM, et al. New treatment options for multidrug-resistant tuberculosis. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease* 2012; 6: 255–268.
- [23] Mitchison D, Davies G. The chemotherapy of tuberculosis: Past, present and future. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2012; 16: 724–732.

- [24] Ramírez Lapausa M, Pascual Pareja JF, Noguerado Asensio A. Nuevos fármacos antituberculosos en la tuberculosis resistente y multirresistente. *Medicina Clinica* 2013; 141: 306–313.
- [25] Moreno Exebio LE. *"Monitoreo terapéutico de rifampicina e isoniazida"*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2014.
- [26] Knezevic CE, Clarke W. Cancer Chemotherapy: The Case for Therapeutic Drug Monitoring. *Therapeutic drug monitoring* 2020; 42: 6–19.
- [27] Aga QAAK, Bataineh YA, Sbaih HM. Therapeutic drug monitoring of cytotoxic drugs. *International Journal of Drug Delivery Technology* 2020; 10: 284–291.
- [28] Adaway JE, Keevil BG. Therapeutic drug monitoring and LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2012; 883–884: 33–49.
- [29] Ramanathan R, Korfmacher W. The emergence of high-resolution MS as the premier analytical tool in the pharmaceutical bioanalysis arena. *Bioanalysis* 2012; 4: 467–469.
- [30] Putty S, Vemula H, Bobba S, et al. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for d-Ala-d-Lac: A key intermediate for vancomycin resistance in vancomycin-resistant enterococci. *Anal Biochem* 2013; 442: 166–171.
- [31] Navarrete A, Martínez-Alcázar MP, Durán I, et al. Simultaneous online SPE-HPLC-MS/MS analysis of docetaxel, Temsirolimus and sirolimus in whole blood and human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013; 921–922: 35–42.
- [32] Shipkova M, Svinarov D. LC–MS/MS as a tool for TDM services: Where are we? *Clin Biochem* 2016; 49: 1009–1023.
- [33] Quattrocchi OA, Abelaira de Andrizzi SI, Laba RF. *Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica*. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro S.A, 1992.
- [34] Sommella E, Pepe G, Ventre G, et al. Evaluation of two sub-2 μ m stationary phases, core-shell and totally porous monodisperse, in the second dimension of on-line comprehensive two dimensional liquid chromatography, a case study: Separation of milk peptides after expiration date. *J Chromatogr A* 2015; 1375: 54–61.

- [35] Hayes R, Ahmed A, Edge T, et al. Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2014; 1357: 36–52.
- [36] González-Ruiz V, Olives AI, Martín MA. Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 2015; 64: 17–28.
- [37] Pawliszyn J, Lord HL. *Handbook of Sample Preparation*. John Wiley & Sons, 2010.
- [38] Biddlecombe B, Smith G. Sample preparation techniques. In: Evans G (ed) *A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism*. Florida: CRC Press LLC, 2004.
- [39] Lloyd DK, Bergum J. Application of quality by design (QbD) to the development and validation of analytical methods. In: Riley CM, Rosanske TW, Riley SRR (eds) *Specification of drug substances and products. Development and validation of analytical methods*. Elsevier, 2014, pp. 30–71.
- [40] Borman P. The Application of Quality by Design to Analytical Methods. *Pharmaceutical Technology* 2007; 31: 142–152.
- [41] Mahr AG, Lourenço FR, Borman P, et al. Analytical Quality by Design Fundamentals and Compendial and Regulatory Perspectives. In: Breitzkreitz MC, Goicoechea HC (eds) *Introduction to Quality by Design in Pharmaceutical Manufacturing and Analytical Development. AAPS Introductions in the Pharmaceutical Sciences*. Springer, Cham, 2023, pp. 163–198.
- [42] USP. *General Chapter <1220> Analytical Procedure Lifecycle*. 2022.
- [43] ICH. *ICH Draft Guideline Q14 Analytical Procedure Development*. 2022.
- [44] ICH. *ICH Q9(R1) Quality Risk Management*. 2021.
- [45] Caro YS, Cámara MS, De Zan MM. Quality by Design Applications to Development of Analytical Methods for Quality Control of Pharmaceuticals. In: Breitzkreitz MC, Goicoechea H (eds) *Introduction to Quality by Design in Pharmaceutical Manufacturing and Analytical Development. AAPS Introductions in the Pharmaceutical Sciences*. Springer, Cham, 2023, pp. 221–244.

- [46] Mahr AG, Lourenço FR, Borman P, et al. Analytical Target Profile (ATP) and Method Operable Design Region (MODR). In: Breitzkreitz MC, Goicoechea H (eds) *Introduction to Quality by Design in Pharmaceutical Manufacturing and Analytical Development. AAPS Introductions in the Pharmaceutical Sciences*. Springer, Cham, 2023, pp. 199–219.
- [47] Borman P, Schofield T, Lansky D. Reducing uncertainty of an analytical method through efficient use of replication. *Pharmaceutical Technology* 2021; 45: 48–56.
- [48] Ermer J, Agut C. Precision of the reportable result. Simultaneous optimisation of number of preparations and injections for sample and reference standard in quantitative liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2014; 1353: 71–77.
- [49] Gutiérrez Pulido H, De La Vara Salazar R. *Análisis y diseño de experimentos*. 2nd ed. McGraw Hill Interamericana, 2008.
- [50] Box GE, Hunter WE, Hunter JS. *Statistics for Experimenters: Design, Innovation and Discovery*. 2nd ed. New Jersey, E.E. U.U, 2005.
- [51] Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC, et al. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics. Part A*. 1st ed. Amsterdam, Holanda: Elsevier, 1997.
- [52] Mutihac L, Mutihac R. Mining in chemometrics. *Analytica Chimica Acta* 2008; 612: 1–18.
- [53] Myers RH, Montgomery DC. *Response Surface Methodology: Product and Process Optimization Using Designed Experiments*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2002.
- [54] Leardi R. Experimental design in chemistry: A tutorial. *Anal Chim Acta* 2009; 652: 161–172.
- [55] Dejaegher B, Vander Heyden Y. The use of experimental design in separation science. *Acta Chromatogr* 2009; 21: 161–201.
- [56] Castells CB, Ràfols C, Rosés M, et al. Effect of temperature on pH measurements and acid-base equilibria in methanol-water mixtures. *J Chromatogr A* 2003; 1002: 41–53.
- [57] Castells CB, Gagliardi LG, Ràfols C, et al. Effect of temperature on the chromatographic retention of ionizable compounds: I. Methanol-water mobile phases. *J Chromatogr A* 2004; 1042: 23–36.
- [58] Gagliardi LG, Castells CB, Ràfols C, et al. Effect of temperature on the chromatographic retention of ionizable compounds: II. Acetonitrile-water mobile phases. *J Chromatogr A* 2005; 1077: 159–169.

- [59] Gagliardi LG, Castells CB, Ràfols C, et al. Modeling retention and selectivity as a function of pH and column temperature in liquid chromatography. *Anal Chem* 2006; 78: 5858–5867.
- [60] Agrafiotou P, Ràfols C, Castells C, et al. Simultaneous effect of pH, temperature and mobile phase composition in the chromatographic retention of ionizable compounds. *J Chromatogr A* 2011; 1218: 4995–5009.
- [61] Bruns RE, Scarminio IS, de Barros Neto B. *Statistical design-Chemometrics*. 1st ed. Elsevier, 2006.
- [62] Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 2008; 76: 965–977.
- [63] Ferreira SLC, Bruns RE, da Silva EGP, et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography A* 2007; 1158: 2–14.
- [64] Vera Candiotti L, De Zan MM, Cámara MS, et al. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta* 2014; 124: 123–138.
- [65] Goicoechea HC. Experimental Design. In: Siddiqi KS, Nollet LML (eds) *Fingerprinting Techniques in Food Authentication and Traceability*. Boca Raton: Taylor and Francis, 2018, pp. 1–448.
- [66] De Aguiar PF, Bourguignon B, Khots MS, et al. D-optimal designs. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 1995; 30: 199–210.
- [67] Derringer G, Suich R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *Journal of Quality Technology* 1980; 12: 214–219.
- [68] European Medicines Agency (EMA). *Guideline on bioanalytical method validation*. 2011.
- [69] Food and Drug Administration (FDA). *Bioanalytical Method Validation Guidance*. 2018.
- [70] ICH. *ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis Step5*. 2022.
- [71] Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal - Part I. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 36: 579–586.

- [72] USP. *General chapter <1210> statistical tools for procedure validation*. 2020.
- [73] Boldú J, Cebollero P, Abu J, et al. Tratamiento de la tuberculosis pulmonar. *Anales Sis San Navarra* 2007; 30: 99–115.
- [74] World Health Organization (WHO). *Treatment of Tuberculosis. Guidelines*. 4th ed. WHO, 2010.
- [75] Pascual-Pareja JF, Carrillo-Gómez R, Hontañón-Antoñana V, et al. Treatment of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2018; 36: 507–516.
- [76] Dirección de Sida ETS Hepatitis y TBC. Guía práctica para el diagnóstico y tratamiento de las personas con TB en el primer nivel de atención.
- [77] OMS. En riesgo los progresos mundiales contra la tuberculosis, <https://www.who.int/es/news/item/14-10-2020-who-global-tb-progress-at-risk>.
- [78] World Health Organization. *Global Tuberculosis Report*. World Health Organization, 2020.
- [79] Bernal O, López R, Montoro E, et al. Determinantes sociales y meta de tuberculosis en los Objetivos de Desarrollo Sostenible en las Américas. *Rev Panam Salud Publica* 2020; 44: e153.
- [80] Coordinación de Tuberculosis y Lepra., Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Dr. Emilio Coni. *Boletín N°6: Tuberculosis y Lepra en Argentina*. March 2023.
- [81] García Rodríguez JF. Manejo de los efectos adversos del tratamiento antituberculoso. *Galicia Clin* 2008; 69: 21–28.
- [82] Srivastava S, Pasipanodya JG, Meek C, et al. Multidrug-resistant tuberculosis not due to noncompliance but to between-patient pharmacokinetic variability. *Journal of Infectious Diseases* 2011; 204: 1951–1959.
- [83] Mota L, Al-Efraij K, Campbell JR, et al. Therapeutic drug monitoring in anti-tuberculosis treatment: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2016; 20: 819–826.
- [84] Fage D, Brilleman R, Deprez G, et al. Development, validation and clinical use of a LC-MS/MS method for the simultaneous determination of the nine main antituberculosis drugs in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2022; 215: 114776.

- [85] Magis-Escurra C, Later-Nijland HMJ, Alffenaar JWC, et al. Population pharmacokinetics and limited sampling strategy for first-line tuberculosis drugs and moxifloxacin. *Int J Antimicrob Agents*. Epub ahead of print 2014. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2014.04.019.
- [86] Luyen LT, Hung TM, Huyen LT, et al. Simultaneous determination of pyrazinamide, rifampicin, ethambutol, isoniazid and Acetyl Isoniazid in human plasma by LC-MS/MS method. *J Appl Pharm Sci* 2018; 8: 61–73.
- [87] Treatment Action Group (TGA). *Una guía para activistas sobre fármacos de la Tuberculosis*, www.treatmentactiongroup.org (2016).
- [88] Caminero JA, Scardigli A. Classification of antituberculosis drugs: A new proposal based on the most recent evidence. In: *European Respiratory Journal*. European Respiratory Society, 2015, pp. 887–893.
- [89] Choi R, Jeong BH, Koh WJ, et al. Recommendations for optimizing tuberculosis treatment: Therapeutic drug monitoring, pharmacogenetics, and nutritional status considerations. *Ann Lab Med* 2017; 37: 97–107.
- [90] Saktiawati AMI, Harkema M, Setyawan A, et al. Optimal Sampling Strategies for Therapeutic Drug Monitoring of First-Line Tuberculosis Drugs in Patients with Tuberculosis. *Clin Pharmacokinet* 2019; 58: 1445–1454.
- [91] Alsultan A, Peloquin CA. Therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis: An update. *Drugs* 2014; 74: 839–854.
- [92] Coll P. Active drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; 27: 474–480.
- [93] Luyen LT, Hung TM, Huyen LT, et al. Simultaneous determination of pyrazinamide, rifampicin, ethambutol, isoniazid and Acetyl Isoniazid in human plasma by LC-MS/MS method. *J Appl Pharm Sci* 2018; 8: 61–73.
- [94] Kuhlin J, Sturkenboom MGG, Ghimire S, et al. Mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of anti-tuberculosis drugs. *Clinical Mass Spectrometry* 2019; 14: 34–45.
- [95] Bioanal JA. *Quantification of isoniazid, pyrazinamide and ethambutol in serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*.

- [96] Kivrane A, Grinberga S, Sevostjanovs E, et al. LC-MS/MS method for simultaneous quantification of the first-line anti-tuberculosis drugs and six primary metabolites in patient plasma: Implications for therapeutic drug monitoring. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2021; 1185: 122986.
- [97] Hee KH, Seo JJ, Lee LS. Development and validation of liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of first line tuberculosis drugs and metabolites in human plasma and its application in clinical study. *J Pharm Biomed Anal* 2015; 102: 253–260.
- [98] Gao S, Wang Z, Xie X, et al. Rapid and sensitive method for simultaneous determination of first-line anti-tuberculosis drugs in human plasma by HPLC-MS/MS: Application to therapeutic drug monitoring. *Tuberculosis* 2018; 109: 28–34.
- [99] Faria AF, de Souza MVN, Bruns RE, et al. Optimization of an electrolyte system for analysis of ethambutol in pharmaceutical formulations by capillary zone electrophoresis using complexation with copper(II). *J Chromatogr A* 2008; 1202: 224–228.
- [100] Singh H, Sharma G, Kaur IP. Development and validation of an UPLC method for the quantification of ethambutol in rat plasma. *RSC Adv* 2014; 4: 42831–42838.
- [101] Lacroix C, Cerutti F, Nouveau J, et al. Determination of plasma ethambutol with liquid chromatography and ultraviolet spectrophotometry]. *J Chromatogr* 1987; 415: 85–94.
- [102] Jiang Z, Wang H, Locke DC. Determination of ethambutol by ion-pair reversed phase liquid chromatography with UV detection. *Anal Chim Acta* 2002; 456: 189–192.
- [103] Allanson AL, Cotton MM, Tettey JNA, et al. Determination of rifampicin in human plasma and blood spots by high performance liquid chromatography with UV detection: A potential method for therapeutic drug monitoring. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 44: 963–969.
- [104] Siddhartha TS, Prasanthi B, Santosh T, et al. Development and validation of high performance liquid chromatographic method for the determination of pyrazinamide in human plasma. *J Pharm Res* 2013; 7: 33–38.
- [105] Woo J, Wong CL, Teoh R, et al. Liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of pyrazinamide and rifampicin in serum samples from patients with tuberculous meningitis. *J Chromatogr* 1987; 420: 73–80.

- [106] Espinosa-Mansilla A, Acedo-Valenzuela MI, Muñoz De La Peña A, et al. Determination of antitubercular drugs in urine and pharmaceuticals by LC using a gradient flow combined with programmed diode array photometric detection. *Talanta* 2002; 58: 273–280.
- [107] Bozorg BD, Goodarzi A, Fahimi F, et al. Simultaneous determination of isoniazid, pyrazinamide and rifampin in human plasma by high-performance liquid chromatography and uv detection. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2019; 18: 1735–1741.
- [108] Zhou Z, Chen L, Liu P, et al. Simultaneous Determination of Isoniazid, Pyrazinamide, Rifampicin and Acetylisoniazid in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Sciences* 2010; 26: 1133–1138.
- [109] Panchagnula R, Sood A, Sharda N, et al. Determination of rifampicin and its main metabolite in plasma and urine in presence of pyrazinamide and isoniazid by HPLC method. *J Pharm Biomed Anal* 1999; 18: 1013–1020.
- [110] Calleja I, Blanco-Príeto MJ, Ruz N, et al. High-performance liquid-chromatographic determination of rifampicin in plasma and tissues. *J Chromatogr A* 2004; 1031: 289–294.
- [111] Srivastava A, Waterhouse D, Ardrey A, et al. Quantification of rifampicin in human plasma and cerebrospinal fluid by a highly sensitive and rapid liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method. *J Pharm Biomed Anal* 2012; 70: 523–528.
- [112] Balbão MS, Bertucci C, Bergamaschi MM, et al. Rifampicin determination in plasma by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 51: 1078–1083.
- [113] Mohan B, Sharda N, Singh S. Evaluation of the recently reported USP gradient HPLC method for analysis of anti-tuberculosis drugs for its ability to resolve degradation products of rifampicin. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 31: 607–612.
- [114] Brennam PJ, Young DB, Robertson BD (eds). Handbook of Anti-Tuberculosis Agents. In: *Tuberculosis*. Elsevier, pp. 85–86.
- [115] The International Pharmacopoeia. *Ethambutol hydrochloride tablets (Ethambutoli hydrochloridi compressi)*. 2019.
- [116] Petersson J, Giske CG, Eliasson E. Standard dosing of piperacillin and meropenem fail to achieve adequate plasma concentrations in ICU patients. *Acta Anaesthesiol Scand* 2016; 60: 1425–1436.

- [117] Escobar L, Gai MN, Regueira T, et al. Consideraciones farmacocinéticas en el paciente crítico. *Rev Med Chil* 2012; 140: 780–788.
- [118] Boucher BA, Wood GC, Swanson JM. Pharmacokinetic Changes in Critical Illness. *Critical Care Clinics* 2006; 22: 255–271.
- [119] De Waele JJ, Lipman J, Akova M, et al. Risk factors for target non-attainment during empirical treatment with β -lactam antibiotics in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2014; 40: 1340–1351.
- [120] Roberts JA, Choi GYS, Joynt GM, et al. SaMpling Antibiotics in Renal Replacement Therapy (SMARRT): An observational pharmacokinetic study in critically ill patients. *BMC Infect Dis* 2016; 16: 1–8.
- [121] Beumier M, Casu GS, Hites M, et al. β -lactam antibiotic concentrations during continuous renal replacement therapy. *Crit Care* 2014; 18: 2–10.
- [122] Gómez J, García-Vázquez E, Hernández-Torres A. Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quimioter* 2015; 28: 1–9.
- [123] Sulaiman H, Roberts JA, Abdul-Aziz MH. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-lactam antibiotics in critically ill patients. *Farmacia Hospitalaria* 2022; 46: 182–190.
- [124] Blasco AC, Alfaro LA, Reinoso JC, et al. Análisis farmacocinético-farmacodinámico en microbiología: Herramienta para evaluar el tratamiento antimicrobiano. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2015; 33: 48–57.
- [125] MacGowan A. Revisiting Beta-lactams - PK/PD improves dosing of old antibiotics. *Current Opinion in Pharmacology* 2011; 11: 470–476.
- [126] Giner Almaraz S, Canós Cabedo M, Ferrer Gómez C. *Meropenem: un nuevo carbapenem en el arsenal terapéutico*. 1995.
- [127] Azanza Perea JR, Manubens Guarch A, Urdaneta Abate M, et al. Meropenem, aspectos farmacocinéticos/farmacodinámicos y seguridad. *Rev Esp Quimioter* 2010; 23: 18–24.
- [128] El-Haffaf I, Caissy JA, Marsot A. Piperacillin-Tazobactam in Intensive Care Units: A Review of Population Pharmacokinetic Analyses. *Clinical Pharmacokinetics* 2021; 60: 855–875.

- [129] Mekdad SS, Alsayed L. Prospective evaluating the appropriate use of piperacillin/tazobactam in cardiac center of a tertiary care hospital. *J Cardiothorac Surg* 2020; 15: 2–6.
- [130] Rigo-Bonnin R, Ribera A, Arbiol-Roca A, et al. Development and validation of a measurement procedure based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous measurement of β -lactam antibiotic concentration in human plasma. *Clinica Chimica Acta* 2017; 468: 215–224.
- [131] Delattre IK, Musuamba FT, Verbeeck RK, et al. Empirical models for dosage optimization of four β -lactams in critically ill septic patients based on therapeutic drug monitoring of amikacin. *Clin Biochem* 2010; 43: 589–598.
- [132] Chen Q, Andersson A, Mecklenburg M, et al. Fast determination of antibiotics in whole blood. *Clinical Microbiology and Infection* 2013; 19: 869–874.
- [133] Paal M, Zoller M, Schuster C, et al. Simultaneous quantification of cefepime, meropenem, ciprofloxacin, moxifloxacin, linezolid and piperacillin in human serum using an isotope-dilution HPLC–MS/MS method. *J Pharm Biomed Anal* 2018; 152: 102–110.
- [134] Campos ML, Moura Alonso J de, Santos Martins E dos, et al. Ceftriaxone pharmacokinetics by new simple and sensitive ultra-high-performance liquid chromatography method. *Diagnositc Microbiology and Infections Desease* 2017; 95–99.
- [135] Pinder N, Brenner T, Swoboda S, et al. Therapeutic drug monitoring of beta-lactam antibiotics – Influence of sample stability on the analysis of piperacillin, meropenem, ceftazidime and flucloxacillin by HPLC-UV. *J Pharm Biomed Anal* 2017; 143: 86–93.
- [136] Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM. Quantification of meropenem in human plasma by HILIC – tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2017; 1046: 13–17.
- [137] Lefevre S, Bois-Maublanc J, Hocqueloux L, et al. A simple ultra-high-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of 15 antibiotics in plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2017; 1065–1066: 50–58.
- [138] Rigo Bonnin R, Alía Ramos P. Desarrollo y validación de un procedimiento de medida para la medición simultánea de la concentración de masa de ceftazidima, meropenem y

- piperacilina en el plasma mediante UHPLC-MS/MS. *Revista del Laboratorio Clinico* 2017; 10: 4–13.
- [139] Ferrone V, Cotellese R, Di Marco L, et al. Meropenem, levofloxacin and linezolid in human plasma of critical care patients: A fast semi-automated micro-extraction by packed sorbent UHPLC-PDA method for their simultaneous determination. *J Pharm Biomed Anal* 2017; 140: 266–273.
- [140] Roth T, Weber L, Niestroj M, et al. Simultaneous determination of six antibiotics in human serum by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Biomedical Chromatography* 2021; 35: 1–12.
- [141] Veillette JJ, Winans SA, Forland SC, et al. A simple and rapid RP-HPLC method for the simultaneous determination of piperacillin and tazobactam in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2016; 131: 80–86.
- [142] Carlier M, Stove V, De Waele JJ, et al. Ultrafast quantification of β -lactam antibiotics in human plasma using UPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2015; 978–979: 89–94.
- [143] la Marca G, Giocaliere E, Villanelli F, et al. Development of an UPLC-MS/MS method for the determination of antibiotic ertapenem on dried blood spots. *J Pharm Biomed Anal* 2012; 61: 108–113.
- [144] Ohmori T, Suzuki A, Niwa T, et al. Simultaneous determination of eight β -lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011; 879: 1038–1042.
- [145] Briscoe SE, McWhinney BC, Lipman J, et al. A method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012; 907: 178–184.
- [146] Zou L, Meng F, Hu L, et al. A novel reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of imipenem and meropenem in human plasma and its application in TDM. *J Pharm Biomed Anal* 2019; 169: 142–150.

- [147] Cazorla-Reyes R, Romero-González R, Frenich AG, et al. Simultaneous analysis of antibiotics in biological samples by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 89: 203–212.
- [148] Sime FB, Roberts MS, Roberts JA, et al. Simultaneous determination of seven β -lactam antibiotics in human plasma for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2014; 960: 134–144.
- [149] Abdulla A, Bahmany S, Wijma RA, et al. Simultaneous determination of nine β -lactam antibiotics in human plasma by an ultrafast hydrophilic-interaction chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2017; 1060: 138–143.
- [150] Crutchfield CA, Marzinke MA. Bioanalytical development and validation of liquid chromatographic-tandem mass spectrometric methods for the quantification of total and free cefazolin in human plasma and cord blood. *Pract Lab Med* 2015; 1: 12–21.
- [151] McWhinney BC, Wallis SC, Hillister T, et al. Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010; 878: 2039–2043.
- [152] Salman BI, Hussein SA, Ali MFB, et al. Innovative ultra-sensitive spectrofluorimetric method for nanogram detection of doripenem monohydrate in human plasma, urine and pharmaceutical formulation. *Microchemical Journal* 2019; 145: 959–965.
- [153] Partani P, Gurule S, Khuroo A, et al. Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry method for the determination of cefuroxime in human plasma: Application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010; 878: 428–434.
- [154] Xie R, Wen J, Wei H, et al. High-throughput determination of faropenem in human plasma and urine by on-line solid-phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography with UV detection and its application to the pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 52: 114–121.
- [155] Nagarajan JSK, Vimal CS, George R, et al. Simultaneous pharmacokinetic assessment of cefadroxil and clavulanic acid in human plasma by LC-MS and its application to bioequivalence studies. *J Pharm Anal* 2013; 3: 285–291.

- [156] Kratzer A, Schieber S, Matzneller P, et al. Determination of total and free ceftolozane and tazobactam in human plasma and interstitial fluid by HPLC-UV. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2019; 163: 34–38.
- [157] Carlier M, Stove V, Roberts JA, et al. Quantification of seven β -lactam antibiotics and two β -lactamase inhibitors in human plasma using a validated UPLC-MS/MS method. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 40: 416–422.
- [158] Verhoven SM, Groszek JJ, Fissell WH, et al. Therapeutic drug monitoring of piperacillin and tazobactam by RP-HPLC of residual blood specimens. *Clinica Chimica Acta* 2018; 482: 60–64.
- [159] Dailly E, Bouquié R, Deslandes G, et al. A liquid chromatography assay for a quantification of doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem concentrations in human plasma: Application to a clinical pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011; 879: 1137–1142.
- [160] Wolff F, Deprez G, Seyler L, et al. Rapid quantification of six β -lactams to optimize dosage regimens in severely septic patients. *Talanta* 2013; 103: 153–160.
- [161] Scheer F, Krämer I. A Liquid Chromatography Assay for the Simultaneous Quantification of Piperacillin and Ciprofloxacin in Human Plasma and Dialysate in Critically Ill Patients Undergoing Continuous Renal Replacement Therapy. *Int J Anal Mass Spectrom Cromatogr* 2014; 02: 43–51.
- [162] Merola G, Martini E, Tomassetti M, et al. Simple and suitable immunosensor for β -lactam antibiotics analysis in real matrixes: Milk, serum, urine. *J Pharm Biomed Anal* 2015; 106: 186–196.
- [163] Soto D, Silva C, Andresen M, et al. Monitorización terapéutica de antibióticos. Nuevas metodologías: biosensores Therapeutic monitoring of antibiotics. New methodologies: biosensors. *Rev Med Chile* 2015; 143: 1050–1057.
- [164] Fridlund J, Woksepp H, Schön T. A microbiological method for determining serum levels of broad spectrum β -lactam antibiotics in critically ill patients. *J Microbiol Methods* 2016; 129: 23–27.

- [165] Qureshi T, Memon N, Memon SQ, et al. LC/UV determination of cefradine, cefuroxime, and cefotaxime in dairy milk, human serum and wastewater samples. *Springerplus* 2013; 2: 1–8.
- [166] Casals G, Hernández C, Hidalgo S, et al. Development and validation of a UHPLC diode array detector method for meropenem quantification in human plasma. *Clin Biochem* 2014; 47: 223–227.
- [167] Miranda Bastos AC, Vandecasteele SJ, Tulkens PM, et al. Development and validation of a high performance liquid chromatography assay for the determination of temocillin in serum of haemodialysis patients. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 90: 192–197.
- [168] Paal M, Zoller M, Schuster C, et al. Simultaneous quantification of cefepime, meropenem, ciprofloxacin, moxifloxacin, linezolid and piperacillin in human serum using an isotope-dilution HPLC-MS/MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2018; 152: 102–110.
- [169] Colin P, De Bock L, T'Jollyn H, et al. 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* 2013; 103: 285–293.
- [170] Verdier MC, Tribut O, Tattevin P, et al. Simultaneous determination of 12 β -lactam antibiotics in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection: Application to therapeutic drug monitoring. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 4873–4879.
- [171] Roth T, Fiedler S, Mihai S, et al. Determination of meropenem levels in human serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Biomedical Chromatography*, 31. Epub ahead of print 1 May 2017. DOI: 10.1002/bmc.3880.
- [172] Sahu PK, Ramiseti NR, Cecchi T, et al. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2018; 147: 590–611.
- [173] Dong Q, Shi HY, Kou C, et al. A microscale HPLC-UV method for the determination of latamoxef in plasma: An adapted method for therapeutic drug monitoring in neonates. *Biomedical Chromatography*, 32. Epub ahead of print 1 August 2018. DOI: 10.1002/bmc.4243.

- [174] Fratoni AJ, Nicolau DP, Kuti JL. A guide to therapeutic drug monitoring of β -lactam antibiotics. *Pharmacotherapy* 2021; 41: 220–233.
- [175] Guilhaumou R, Benaboud S, Bennis Y, et al. Optimization of the treatment with beta-lactam antibiotics in critically ill patients - Guidelines from the French Society of Pharmacology and Therapeutics (Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique - SFPT) and the French Society of Anaesthesia and Intensive Care Medicine (Société Française d'Anesthésie et Réanimation - SFAR). *Critical Care*; 23. Epub ahead of print 29 March 2019. DOI: 10.1186/s13054-019-2378-9.
- [176] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters., <http://www.eucast.org>.
- [177] Alasino AB, Caro YS, De Zan MM. Bioanalytical Method Optimization for the Therapeutic Drug Monitoring of Vancomycin. *Journal of Analytical, Bioanalytical and Separation Techniques* 2017; 2: 89–95.
- [178] Torregiani L, Caro YS, De Zan MM. Therapeutic monitoring of methotrexate in leukaemia patients using high performance liquid chromatography. Development, validation and clinical application of the analytical method. *Revista del Laboratorio Clínico* 2018; 11: 64–72.
- [179] Demiralay EÇ, Koç D, Daldal YD, et al. Determination of chromatographic dissociation constants of some carbapenem group antibiotics and quantification of these compounds in human urine. *Biomedical Chromatography* 2014; 28: 660–666.
- [180] Sanli S, Sanli N, Gumustas M, et al. Simultaneous estimation of ceftazidime and ceftizoxime in pharmaceutical formulations by HPLC method. *Chromatographia* 2011; 74: 549–558.
- [181] Suárez C, Gudiol F. Beta-lactam antibiotics. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; 27: 116–129.
- [182] Corona A, Cattaneo D, Latronico N. Antibiotic Therapy in the Critically Ill with Acute Renal Failure and Renal Replacement Therapy: A Narrative Review. *Antibiotics*; 11. Epub ahead of print 1 December 2022. DOI: 10.3390/antibiotics11121769.
- [183] Vincent J-L, Pereira AJ, Gleeson J, et al. Early management of sepsis. *Clin Exp Emerg Med* 2014; 1: 3–7.

- [184] Phe K, Heil EL, Tam VH. Optimizing pharmacokinetics-pharmacodynamics of antimicrobial management in patients with sepsis: A review. *Journal of Infectious Diseases* 2021; 222: S132–S141.
- [185] Mengarelli C, Pichon-Riviere A, Augustovski F, et al. *Terapias de reemplazo renal en insuficiencia renal aguda*. Buenos Aires, January 2020.
- [186] Manns B, Doig CJ, Lee H, et al. Cost of acute renal failure requiring dialysis in the intensive care unit: clinical and resource implications of renal recovery. *Crit Care Med* 2003; 31: 449–455.
- [187] Legrand M, Darmon M, Joannidis M, et al. Management of renal replacement therapy in ICU patients: An international survey. *Intensive Care Med* 2013; 39: 101–108.
- [188] Brown P, Battistella M. Principles of Drug Dosing in Sustained Low Efficiency Dialysis (SLED) and Review of Antimicrobial Dosing Literature. *Pharmacy* 2020; 8: 33.
- [189] Marshall MR, Golper TA, Shaver MJ, et al. *Sustained low-efficiency dialysis for critically ill patients requiring renal replacement therapy*. 2001.
- [190] 1-s2.0-S0085253815480421-main.
- [191] Berbece AN, Richardson RMA. Sustained low-efficiency dialysis in the ICU: Cost, anticoagulation, and solute removal. *Kidney Int* 2006; 70: 963–968.
- [192] Fliser D, Kielstein JT. Technology Insight: Treatment of renal failure in the intensive care unit with extended dialysis. *Nature Clinical Practice Nephrology* 2006; 2: 32–39.
- [193] Hurst M, Lamb HM, Blumer JL. Meropenem A Review of its Use in Patients in Intensive Care. *Aids Drug Evaluation* 2000; 59: 653–680.
- [194] Yokoyama Y, Nishino K, Matsumoto K, et al. Dosing optimization of meropenem based on a pharmacokinetic analysis in patients receiving hemodiafiltration and an in vitro model. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2018; 24: 92–98.
- [195] Imani S, Buscher H, Marriott D, et al. Too much of a good thing: A retrospective study of β -lactam concentration-toxicity relationships. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2017; 72: 2891–2897.
- [196] McDonald CLJRJ, Cotta MO, Little PJ, et al. Is high-dose β -lactam therapy associated with excessive drug toxicity in critically ill patients? *Minerva Anestesiol* 2016; 82: 957–965.

- [197] Chow KM, Hui AC, Szeto CC. Neurotoxicity induced by beta-lactam antibiotics: From bench to bedside. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2005; 24: 649–653.
- [198] Tune BM. Nephrotoxicity of beta-lactam antibiotics: mechanisms and strategies for prevention. *Pediatr Nephrol* 1997; 11: 768–772.
- [199] Lertwattanachai T, Montakantikul P, Tangsujaritvijit V, et al. Clinical outcomes of empirical high-dose meropenem in critically ill patients with sepsis and septic shock: A randomized controlled trial. *J Intensive Care* 2020; 8: 2–10.
- [200] Wong G, Briscoe S, McWhinney B, et al. Therapeutic drug monitoring of b-lactam antibiotics in the critically ill: Direct measurement of unbound drug concentrations to achieve appropriate drug exposures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2018; 73: 3087–3094.
- [201] Jacobs A, Taccone FS, Roberts JA, et al. Lactam Dosage Regimens in Septic Patients with Augmented Renal Clearance. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62: e02534-17.
- [202] Roberts JA, Joynt GM, Lee A, et al. The Effect of Renal Replacement Therapy and Antibiotic Dose on Antibiotic Concentrations in Critically Ill Patients: Data from the Multinational Sampling Antibiotics in Renal Replacement Therapy Study. *Clinical Infectious Diseases* 2021; 72: 1369–1378.
- [203] Rubino FM. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *Journal of Chromatography B* 2001; 764: 217–254.
- [204] Periañez-Párraga L, Pérez-Rodríguez O, do Pazo-Oubiña F, et al. Toxicidad aguda de altas dosis de metotrexato en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda en niños: a propósito de un caso. *Farmacia Hospitalaria* 2009; 33: 172–173.
- [205] Hamed KM, Dighriri IM, Baomar AF, et al. Overview of Methotrexate Toxicity: A Comprehensive Literature Review. *Cureus* 2022; 14: e29518.
- [206] Howard SC, McCormick J, Pui C-H, et al. Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. *Oncologist* 2016; 21: 1471–1482.
- [207] Gales E, Jebabli N. Methotrexate Side Effects: Review Article. *J Drug Metab Toxicol*; 3. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.4172/2157-7609.1000125.
- [208] Sigma-Aldrich. Product information: Methotrexate hydrate.

- [209] Rajagopalan PTR, Zhang Z, Mccourt L, et al. Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: Ensemble and single-molecule kinetics. *PNAS* 2002; 99: 13481–13486.
- [210] Genestier L, Paillot R, Quemeneur L, et al. Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology* 2000; 47: 247–257.
- [211] Stanulla M, Schrappe M. Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Semin Hematol* 2009; 46: 52–63.
- [212] Grupo GATLA. *Guía de Tratamiento Linfoma no Hodgkin Pediátrico*. 2017.
- [213] GATLA. *Estudio del I-BFM-SG para el tratamiento de niños con leucemia linfoblástica aguda sin tratamiento previo*. 2010.
- [214] USP. *Methotrexate monograph*. May 2010.
- [215] Meloun M, Ferenčíková Z, Vrána A. The thermodynamic dissociation constants of methotrexate by the nonlinear regression and factor analysis of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data. *Central European Journal of Chemistry* 2010; 8: 494–507.