



**Universidad**  
Zaragoza



Máster en Biología Molecular y Celular

Curso 2023/24

## **TRABAJO FIN DE MÁSTER**

---

# OPTIMIZACIÓN DEL ANÁLISIS DE ANTIBIÓTICOS DE USO EN HUMANOS Y DETERMINACIÓN DE SUS NIVELES EN DIFERENTES MUESTRAS DE INTERÉS CLÍNICO

---

### **Autor:**

María Teresa Villalta Palmer

### **Directores:**

Eva Galvez Buerba

Julián Pardo Jimeno

# ÍNDICE

---

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
1. Clases de antibióticos: Mecanismos de acción y de resistencia.....	3
2. Métodos de detección de antibióticos.....	5
3. Metabolismo de los antibióticos.....	7
4. Detección de antibióticos en diferentes muestras.....	8
4.1 Estudios farmacocinéticos en aguas residuales.....	8
4.2 Estudios en alimentos.....	9
4.3 Estudios farmacocinéticos en sueros humanos.....	9
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
1. Equipo y condiciones cromatográficas.....	13
2. Análisis de muestras de sueros.....	14
2.1 Preparación de disoluciones stock, patrones de calibración y rectas de calibrado.....	14
2.2 Preparación de las fases móviles.....	16
2.3 Proceso de extracción de suero en fase sólida.....	17
3. Aspectos éticos.....	18
4. Análisis de antibióticos en muestras de agua residuales.....	19
4.1 Preparación de disoluciones stock, patrones de calibración y rectas de calibrado.....	19
4.2 Preparación de las fases móviles.....	20
4.3 Preparación de las muestras.....	20
4.4 Proceso de extracción de muestras en fase sólida (SPE).....	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
1. Análisis en sueros.....	22
1.1 Optimización de las condiciones cromatográficas.....	23
1.2 Preparación de la muestra.....	27
1.3 Validación del método analítico.....	34
1.4 Análisis de muestras en pacientes.....	38
2. Análisis en aguas residuales.....	41
2.1 Optimización de las condiciones cromatográficas.....	41
2.2 Preparación de la muestra.....	45
2.3 Análisis de muestras de aguas residuales.....	46
2.4 Validación del método analítico.....	50
CONCLUSIONES.....	55
BIBLIOGRAFÍA.....	58

## ABREVIATURAS

---

<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography
<b>SMX</b>	Sulfametoxazol
<b>INN</b>	Sulfapiridina
<b>NOR</b>	Norfloxacino
<b>ENR</b>	Enrofloxacina
<b>CIP</b>	Ciprofloxacino
<b>OFX</b>	Ofloxacino
<b>OTC</b>	Oxitetraciclina
<b>CTC</b>	Clortetraciclina
<b>DX</b>	Doxiciclina
<b>TE</b>	Tetraciclina
<b>GCV</b>	Ganciclovir
<b>MEM</b>	Meropenem
<b>MVB</b>	Meropenem/Vaborbactam
<b>C/T</b>	Ceftolozano/tazobactam
<b>IPM/CLN</b>	Imipenem/Cilastatina
<b>DAL</b>	Dalbavancina
<b>TZP</b>	Piperacilina/Tazobactam
<b>ISC</b>	Isavuconazol
<b>CFCD</b>	Cefiderocol
<b>SPE</b>	Extracción en fase sólida
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>TDM</b>	Monitorización terapéutica de fármacos
<b>EDAR</b>	Estaciones depuradoras de aguas residuales

## RESUMEN

---

La resistencia bacteriana a antibióticos se ha convertido en un problema de salud pública cada vez más compleja, que ha dado lugar a que en la actualidad se haya restringido significativamente su uso.

La detección en los últimos años de residuos antibióticos en diferentes medios como aguas medioambientales (residuales, superficiales y subterráneas), animales acuáticos, suelos agrícolas y naturales e incluso en alimentos de origen animal y vegetal ha creado la necesidad de desarrollar y optimizar métodos efectivos de detección de antibióticos que cuantifiquen la concentración de estos fármacos en pacientes y en los medios mencionados anteriormente. De este modo se podría establecer las dosis adecuadas en que deben administrarse los fármacos con el fin de asegurar el éxito clínico y generar menos residuos que puedan terminar en estos medios, pudiendo finalmente incrementar las resistencias bacterianas a estos antibióticos.

En la actualidad, las técnicas analíticas más utilizadas para la detección y cuantificación de antibióticos son los métodos cromatográficos ya que presentan ciertas ventajas frente a otras técnicas utilizadas.

En este trabajo se han desarrollado varios métodos de detección utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), con el objetivo de analizar y cuantificar diferentes antibióticos en diferentes matrices tales como suero humano y aguas residuales.

Para ello se ha desarrollado un protocolo de preparación de muestra basado en extracción de fase sólida (SPE) y seguidamente se han optimizado las condiciones de medida para cada antibiótico.

Finalmente, se han conseguido obtener buenas separaciones cromatográficas y picos con una adecuada resolución, y se han obtenido % de recuperación general altos para la mayoría de los patrones exceptuando para el NOR, el cual se intentará mejorar en el futuro. También se consiguen recuperar cantidades significativas y cuantificar los diferentes antibióticos en las muestras de aguas residuales y en las muestras de sueros humanos.

La metodología seguida representa un enfoque sencillo de reproducir, que muestra parámetros analíticos válidos, el cual se ha optimizado en primer lugar para patrones de antibióticos y que es aplicable también a diferentes muestras con diferentes orígenes biológicos tales como aguas residuales.

## ABSTRACT

Antibiotic resistance has become an increasingly complex public health problem, leading to significant restrictions on their use today.

In recent years, the detection of antibiotic residues in various media, such as environmental waters (wastewater, surface, and groundwater), aquatic animals, agricultural and natural soils, and even in food of animal and plant origin, has created the need to develop and optimize effective detection methods that quantify the concentration of these drugs in patients and the aforementioned media. This would help establish appropriate doses for drug administration, ensuring clinical success while generating fewer residues that could end up in these environments, potentially increasing bacterial resistance to these antibiotics.

Currently, the most widely used analytical techniques for antibiotic detection and quantification are chromatographic methods, as they offer certain advantages over other techniques. In this work, several detection methods have been developed using high-performance liquid chromatography (HPLC) to analyze and quantify different antibiotics in various matrices, such as human serum and wastewater.

For this purpose, a sample preparation protocol was developed based on solid-phase extraction (SPE), followed by optimization of the measurement conditions for each antibiotic. Good chromatographic separations and peaks with adequate resolution were achieved, and high recovery percentages were obtained for all standards except for NOR, which will be improved in the future. Significant amounts of different antibiotics were also recovered and quantified in wastewater samples and in human serum samples.

The methodology followed represents a simple and reproducible approach, showing valid analytical parameters, initially optimized for antibiotic standards and applicable to different samples from various biological origins, such as wastewater.

# INTRODUCCIÓN

## 1. Clases de antibióticos: Mecanismos de acción y de resistencia

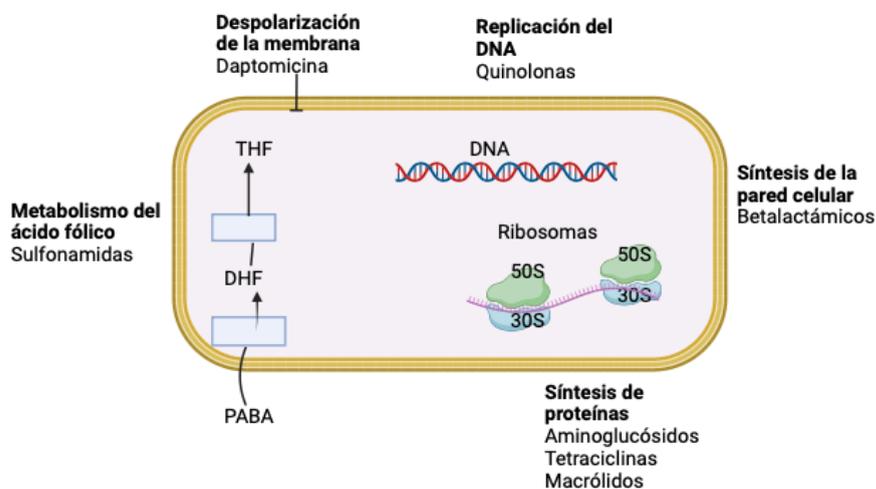
Un **antibiótico** es un agente quimioterapéutico que inhibe específicamente, mediante destrucción celular o inhibición del crecimiento, la proliferación de bacterias [1].

A día de hoy existen más de 20 clases diferentes de antibióticos aprobados para su uso clínico, entre los que destacan quinolonas, macrólidos, sulfonamidas, tetraciclinas, lipopéptidos, polipéptidos, aminoglucósidos, carbapenémicos, monobactámicos, cefalosporinas y penicilinas.

Según su origen pueden ser naturales microbianos (tetraciclinas) o no microbianos (propóleo), sintéticos (quinolonas, sulfonamidas) y semi-sintéticos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos).

Dependiendo del efecto que los antibióticos presentan frente a las bacterias, se puede diferenciar entre **bactericidas** (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos, aminoglucósidos, polipéptidos, quinolonas, y lipopéptidos) y **bacteriostáticos** (macrólidos, sulfonamidas, tetraciclinas). Los fármacos bacteriostáticos provocan una inhibición reversible del crecimiento. Por el contrario, los fármacos bactericidas destruyen al microorganismo de forma irreversible [2].

Los mecanismos de acción de los antibióticos son muy variados (**Figura 1**), y el lugar de actividad donde ejercen el mecanismo varía dentro de cada clase ya que cada una presenta una diana molecular distinta de ataque al microorganismo, en el caso de los betalactámicos se encargan de inhibir la síntesis de la pared celular, sin embargo, los lipopéptidos perturban el funcionamiento de la membrana celular. Un grupo relativamente grande de diversos antibióticos, concretamente los aminoglucósidos y macrólidos inhiben la síntesis de proteínas en muchas etapas, desde el inicio de la traducción hasta la elongación de la cadena peptídica. Por lo general, las moléculas de los fármacos se unen a diferentes moléculas de proteína ribosómica o moléculas de ARN ribosómico en las subunidades 30S y 50S, provocando la muerte celular. Las sulfonamidas, sin embargo, inhiben la síntesis de ácido fólico y las quinolonas perturban la síntesis del ADN. Estos antibióticos son inhibidores específicos de los dominios topoisomerasa II ligasa (girasa) y IV topoisomerasa. Como resultado de su actividad el ADN de la célula se fragmenta [3], [4], [5], [6].



**Figura 1.** Mecanismos de acción de algunas familias de antibióticos.

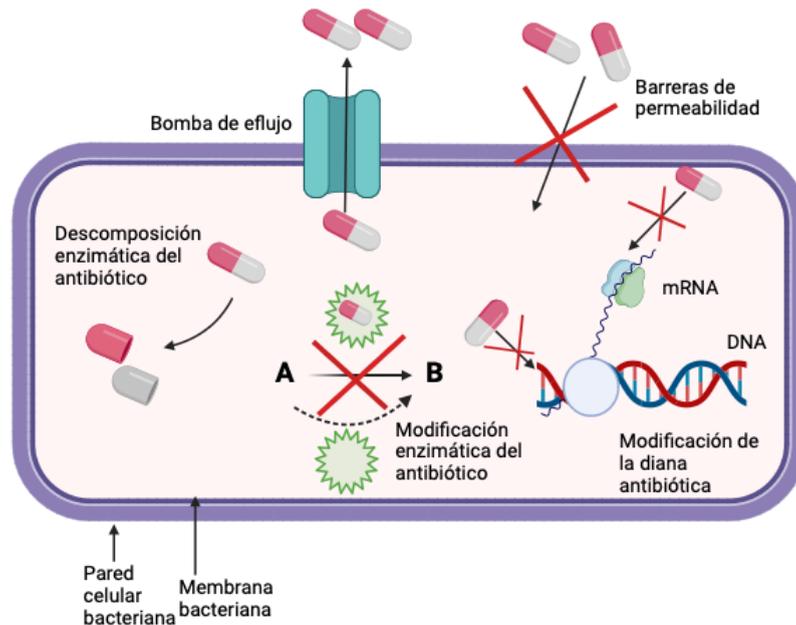
La mayoría de los antibióticos estudiados son activos frente a bacterias Gram-positivas y un número menor frente a bacterias Gram-negativas. Además, las diferentes clases de antibióticos presentan espectros antibacterianos estrechos o amplios. Así, por ejemplo, los carbapenemes poseen un amplio espectro de acción, por lo que incluyen gram positivos, gram negativos y anaerobios. Las penicilinas si son de alto espectro también abarcan infecciones producidas por gram negativos. El espectro de los macrólidos es similar al de las penicilinas, pero también son efectivos frente a *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Bordetella pertussis* y algunas *Rickettsias* y *Clamidas* [6].

Frente a la acción del antibiótico, las bacterias desarrollan estrategias para evitar ser destruidas o inhibidas por ellos. El primer mecanismo se encontró en un gran grupo de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la penicilina, y a principios de la década de 1960 se observaron cepas resistentes a la meticilina. La resistencia de los microorganismos a la clase introducida de antibióticos apareció casi inmediatamente después de su primer uso terapéutico. Las bacterias pueden ser resistentes de forma natural a un grupo específico de antibióticos o pueden adquirir resistencia a través de diversos procesos genéticos, como mutaciones, transferencia de genes (transferencia horizontal) de resistencia y también por contacto directo con las células. La resistencia a los antibióticos también puede venir determinada por elementos genéticos móviles como transposones o integrones.

Un mecanismo importante para iniciar la resistencia a los antibióticos se debe a las bombas de eflujo, proteínas que las bacterias gram-positivas y gram-negativas poseen en su membrana citoplasmática, las cuales transportan sustancias tóxicas, incluidos los antibióticos, fuera de la célula bacteriana. Acar y Moulin [7] realizaron una clasificación en la que distinguieron los siguientes mecanismos de farmacoresistencia:

- El eflujo activo, que impide alcanzar la diana del antibiótico, es decir, el lugar donde se daña la función de la célula bacteriana.
- La reducción de la permeabilidad de la membrana de la célula bacteriana, que se produce cuando se modifican su composición y su función.
- La modificación de un antibiótico en su forma inactiva con la participación de enzimas producidas por las bacterias; éstas pueden cambiar el antibiótico dentro o fuera de la célula bacteriana, eliminando su efecto antibacteriano.
- El cambio de la diana del antibiótico, reduciendo su afinidad por ella [2].

En la **figura 2** se presentan los mecanismos moleculares de la resistencia a los antimicrobianos en las bacterias.



**Figura 2.** Mecanismos moleculares de la resistencia antimicrobiana a antibióticos [2].

Desde el descubrimiento y desarrollo de estos antibióticos entre finales del siglo XIX y principios del XX, se utilizaron para tratar muchas de las enfermedades potencialmente mortales hasta entonces (tuberculosis, sífilis, peste...). Sin embargo aproximadamente treinta años después comenzó a detectarse la aparición de resistencias a antibióticos, dando lugar a que en la actualidad se esté restringiendo su uso. Esta resistencia se convierte en un problema de salud pública cuando cepas resistentes comprometen la efectividad de la terapia antibiótica prescrita y surge la necesidad de desarrollar lo más rápido posible nuevos antibióticos para sustituir a los que ya no funcionan.

Tanto es así que se pronostica que para el año 2050, las infecciones asociadas a la resistencia a antibióticos provocarán hasta 10 millones de muertes por año, superando incluso el cáncer o los accidentes de tráfico, convirtiéndose por lo tanto en la primera causa de muerte en el mundo [8].

Algunas de las causas principales de que se produzcan estas resistencias son el abuso del uso de antibióticos, las prescripciones inadecuadas, la automedicación, un mal uso de ellos o los vertidos incontrolados a las aguas medioambientales [9].

Este uso inapropiado conlleva importantes consecuencias, además de incrementar el desarrollo de resistencias bacterianas, también disminuye la eficiencia terapéutica del tratamiento, provoca efectos adversos innecesarios o tóxicos en los pacientes, tiene una gran repercusión sobre el medioambiente y genera un fuerte impacto económico [10].

## **2. Métodos de detección de antibióticos.**

Los estudios farmacocinéticos constituyen una herramienta muy valiosa ya que evaluando la concentración de fármacos en el organismo y estableciendo las dosis adecuadas en que deben administrarse los fármacos se puede asegurar el éxito clínico y minimizar el riesgo de aparición de resistencias bacterianas. Para poder realizar dichos estudios en muestras biológicas es necesario previamente desarrollar y validar un método analítico para cuantificar las concentraciones del fármaco en la muestra [11].

Entre los métodos de detección más comunes para la cuantificación de antibióticos en muestras biológicas destacan las pruebas inmunoquímicas, electroforesis capilar, y técnicas cromatográficas, de capa fina, de gases y líquida.

Los **inmunoensayos** son métodos analíticos que permiten la detección de sustancias en muestras clínicas mediante la creación de un complejo estable entre el analito y un anticuerpo específico. Las reacciones antígeno-anticuerpo son estequiométricas; por lo tanto, la determinación de antígenos libres o unidos conduce a un cálculo directo del nivel de antibiótico. Estas se caracterizan por su amplia determinabilidad, alta sensibilidad y un corto tiempo de análisis, ya que no requieren técnicas separadas de aislamiento del material biológico. Sin embargo, un problema importante de estas técnicas es la falta de especificidad de la respuesta a los antibióticos individuales del grupo, que puede dar lugar a reacciones cruzadas con metabolitos, fármacos o compuestos con una estructura química relacionada o debidas a la influencia de la matriz biológica.

Otra de las técnicas analíticas utilizadas es la de **electromigración**, las cuales se basan en fenómenos electrocinéticos: electromigración de iones, partículas cargadas y electroósmosis. Estos fenómenos aparecen en las soluciones cuando se colocan partículas cargadas en un campo eléctrico, principalmente de alto voltaje. Una ventaja significativa de esta técnica es su disponibilidad, la simplicidad del equipo, el uso de pequeñas concentraciones de disolventes orgánicos en el tampón y, sobre todo, el corto tiempo del análisis y la alta eficiencia de la separación analítica.

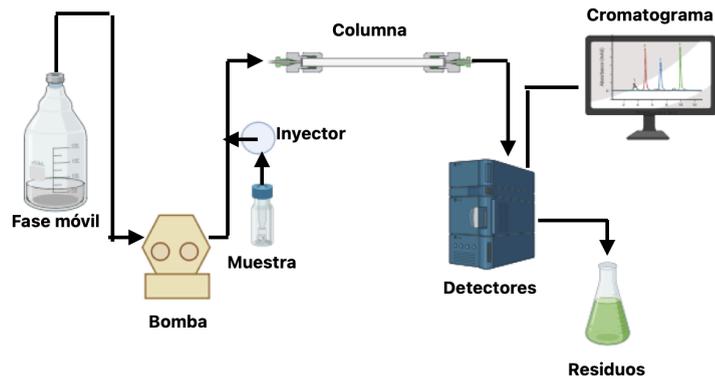
En cuanto a las **técnicas cromatográficas**, la cromatografía de gases (GC) no se utiliza tanto debido a la necesidad de transformar los fármacos y sus metabolitos en derivados termoestables

En general, los métodos analíticos más usados en los estudios farmacocinéticos para la cuantificación del fármaco son los métodos cromatográficos de líquidos ya que son métodos analíticos rápidos, sensibles y específicos que permiten la determinación del contenido de antibióticos en matrices biológicas complejas. Estos métodos incluyen la cromatografía líquida (LC), la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) que suelen ir acopladas a un detector de espectrometría de masas (MS). En la bibliografía se menciona el método UHPLC-MS/MS como el más utilizado ya que la combinación de cromatografía líquida con un espectrómetro de masas garantiza una elevada selectividad, alta sensibilidad, resolución, repetibilidad, identificación por masa y determinación de estructura por fragmentación [2], [12], [13].

En mi caso las medidas se van a realizar con cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a dos sistemas de detección, fluorescencia y ultravioleta visible.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica utilizada para separar componentes de una mezcla basándose en las interacciones químicas de los analitos entre la fase estacionaria y la fase móvil. Según la afinidad que presente la sustancia por la fase estacionaria o por la fase móvil, variará el tiempo de retención de esa sustancia o analito.

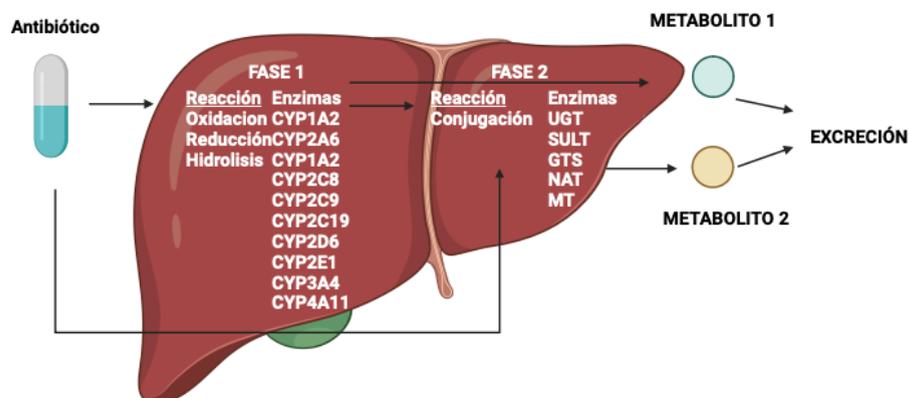
En la **figura 3** se muestra un esquema básico de la instrumentación utilizada para realizar las medidas con HPLC.



**Figura 3.** Esquema básico de un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

### 3. Metabolismo de los antibióticos

Una vez que se ha administrado un antibiótico, éste se desplaza desde el lugar de administración a la circulación sanguínea y, a continuación, se disemina en los fluidos y tejidos corporales. Los antibióticos administrados por vía sistémica se distribuyen de forma desigual por todo el organismo [14]. Sin embargo, la concentración del fármaco en cada órgano, tejido y fluido suele ser proporcional a la concentración del antibiótico en el plasma sanguíneo. En consecuencia, la dosis y la vía de administración suelen determinarse en función de la concentración probable del antibiótico en el plasma sanguíneo. En el hígado, riñones, sangre y paredes del intestino los antibióticos sufren una modificación bioquímica (biotransformación) mediante diferentes reacciones, las cuales se dividen en reacciones de fase I y fase II (**Figura 4**). Las reacciones de fase I conducen a la formación de intermediarios en los procesos de oxidación, reducción y desaminación, sin embargo, las reacciones de fase II consisten en el acoplamiento de los productos finales con el ácido glucurónico, el ácido sulfúrico, el glutatión y la glicina, y pueden dar lugar a metilación o acetilación. Como resultado de estas transformaciones, se obtienen metabolitos activos, inactivos, tóxicos o aquellos que se transforman en un compuesto primario bajo la influencia de factores físicos apropiados.



**Figura 4.** Metabolismo en el hígado [2].

Aunque no todos los antibióticos necesitan metabolizarse para generar sus formas activas, en el caso de algunos de ellos los metabolitos presentan diferentes propiedades químicas

(polaridad, tamaño molecular, ...) que el antibiótico inicial, con lo cual el antibiótico puede no ser detectado mediante técnicas cromatográficas, requiriendo la identificación de alguno de sus metabolitos [2]. A continuación (**tabla 1**), se muestran algunos ejemplos de antibióticos que se metabolizan.

<b>Antibiótico</b>	<b>Metabolito</b>	<b>Actividad del metabolito comparada con el compuesto inicial</b>
Metronidazol	1-(2-hidroxietil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol	<Bacteroides spp. <Clostridium perfringens <Clostridium spp. =Peptococcus spp.
Clarithromicina (macrólido)	14-hidroxiclaritromicina	>Haemophilus influenzae
Cefotaxima (Betalactámico)	Desacetilcefotaxima	=Pseudomonas aeruginosa <Escherichia coli >Proteus mirabilis <Shigella spp. <Klebsiella pneumoniae
Cefetamet (betalactámico)	Cefetamet pivoxil	=Escherichia coli =Streptococcus pyogenes
Norfloxacin (quinolona)	N-nitrosonorfloxacin	<Enterococcus faecalis <Escherichia coli <Staphylococcus aureus <Mycobacterium gilvum <Pseudomonas aeruginosa
Norfloxacin (quinolona)	N-acetilnorfloxacin	<Enterococcus faecalis <Escherichia coli <Staphylococcus aureus <Mycobacterium gilvum <Pseudomonas aeruginosa
Metronidazol (nitroimidazol)	Hidroximetronidazol	>Gardnerella vaginalis
Tinidazol (nitroimidazol)	Hidroxitinidazol	>Gardnerella vaginalis

**Tabla 1.** Actividad antibacteriana de algunos metabolitos de antibióticos [2]. <, el metabolito tiene actividad antimicrobiana más baja que el compuesto original; >, el metabolito tiene actividad antimicrobiana más alta que el compuesto original; =, el metabolito tiene una actividad antimicrobiana comparable a la del compuesto original.

#### **4. Detección de antibióticos en diferentes muestras**

##### **4.1 Estudios farmacocinéticos en aguas residuales**

Al inicio del siglo XXI se empezaron a detectar concentraciones significativas de antibióticos en diferentes muestras de origen medioambiental, tales como aguas subterráneas, superficiales o incluso aguas de consumo humano, los cuales pueden producir efectos adversos para el medio ambiente y la salud humana. Uno de los efectos más significativos es el desarrollo de resistencia a los mismos ya que algunos estudios muestran que las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) pueden ser reservorios de genes de resistencia a antibióticos y pueden transferirse a animales y humanos a través del agua [15].

Esto hace necesario que se haga una vigilancia de la contaminación por antibióticos en aguas residuales, que se controle y ajuste adecuadamente la dosificación de estos antibióticos a cada paciente, ya que si no las prescripciones innecesarias e incorrectas contribuyen a que estos fármacos acaben en entornos medioambientales a través de los desechos. Una de las formas de hacer esto es que previamente se desarrollen y validen métodos analíticos que permitan cuantificar estos compuestos en el plasma sanguíneo o

suero para posteriormente evaluar las dosis administradas a los pacientes y correlacionar los resultados obtenidos con las características de los individuos, lo cual permitirá finalmente ajustar la dosificación, evitando así la sobre medicación en pacientes críticos y disminuyendo, por lo tanto, la cantidad de estos fármacos que acaba en aguas residuales a través de desechos como la orina u otros [16] [17].

#### **4.2 Estudios en alimentos**

El uso excesivo y a veces inadecuado de antibióticos en uso humano, puede acabar generando residuos medioambientales que afecten a la flora y la fauna. Si los productos de origen animal y vegetal comestibles contienen estos residuos de antibióticos, pueden contribuir al desarrollo y propagación de la resistencia bacteriana a los antibióticos, lo cual genera un problema de salud global grave. Es por ello que es necesario disponer de métodos de cribado fiables para la detección rápida, selectiva y sensible de estos residuos con el fin de garantizar la seguridad alimentaria. Algunos de los antibióticos detectados en alimentos de origen animal fueron los siguientes, en muestras de leche se detectaron betalactámicos, cloranfenicol, sulfonamidas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas; en muestras de huevos se encontraron fluoroquinolonas; en carne de cerdo tetraciclinas y cloranfenicol, en carne de ave fluoroquinolonas; en pescado se detectaron fluoroquinolonas, tetraciclinas y sulfonamidas [18].

#### **4.3 Estudios farmacocinéticos en sueros humanos**

La monitorización terapéutica de fármacos (TDM) consiste en medir los fármacos activos en matrices biológicas en tiempos definidos, para controlar si sus concentraciones están dentro de los rangos terapéuticos, con el fin de obtener una eficacia óptima del tratamiento y tolerabilidad [19]. Una variable importante es la concentración inhibitoria mínima (CMI) que es la menor concentración de un antibiótico que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo en un cultivo.

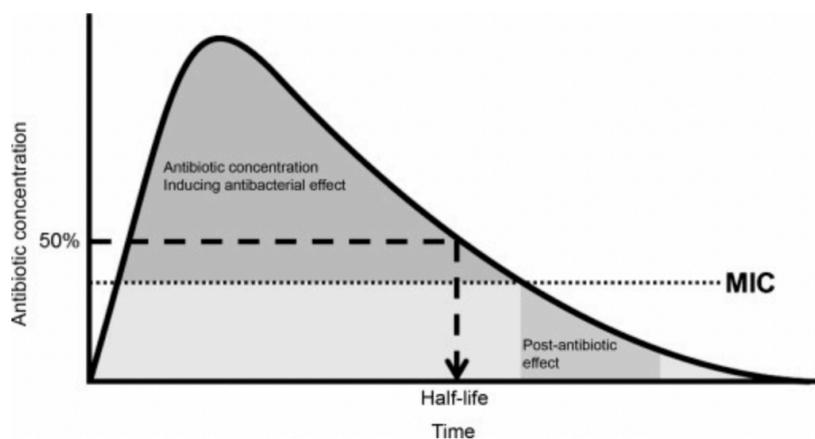
La TDM de antibióticos representa una práctica consolidada en varios contextos: en particular, esta estrategia se ha aplicado para limitar la toxicidad de clases específicas de agentes antimicrobianos, como oxazolidinonas y fluoroquinolonas y para ajustar la dosificación con el fin de minimizar efectos secundarios adversos.

Además, el actual aumento mundial de las resistencias a antimicrobianos está conduciendo a un aumento gradual en la concentración mínima inhibitoria (CMI) de varios fármacos contra muchas cepas bacterianas, haciendo que alcanzar concentraciones adecuadas de fármaco sea fundamental para alcanzar el éxito terapéutico.

Por ejemplo, en el caso de los aminoglucósidos, fluoroquinolonas, carbapenémicos, azitromicina y vancomicina, la destrucción bacteriana es dependiente de la concentración, es decir, su máxima actividad bactericida se correlaciona con concentraciones pico elevadas. Estos antibióticos incrementan significativamente su tasa de destrucción bacteriana cuando la concentración del antibiótico supera de 4 a 64 veces la CMI del fármaco para el microorganismo infectante. Sin embargo, en el caso de los betalactámicos, claritromicina o linezolid su destrucción bacteriana es dependiente del tiempo, con lo cual es fundamental mantener las concentraciones por encima de la CMI por el mayor tiempo posible. Concretamente el objetivo farmacocinético recomendado para estas clases de

antibióticos es de  $100\% f T > CMI$ , es decir, la concentración sérica del antibiótico no unida ( libre, f) debe permanecer al menos por encima de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del fármaco para el patógeno objetivo durante todo el intervalo de dosificación [20][21]. Normalmente para llevar a cabo esta monitorización, se toman muestras en niveles valle, en los 5-30 minutos previos a la administración de la dosis del fármaco, pudiéndose obtenerse justo antes de la administración del mismo y que representa la concentración máxima de fármaco en la sangre que se alcanza tras la administración de una determinada dosis y niveles pico, en el cual el momento para su obtención dependerá del fármaco a monitorizar y representa la concentración mínima de fármaco en la sangre que se obtiene al final del intervalo terapéutico, inmediatamente antes de la administración de la nueva dosis [22][23].

A continuación, en la **Figura 5** se muestra una gráfica en la que se representa la evolución temporal de la concentración de un antibiótico genérico en el torrente sanguíneo.

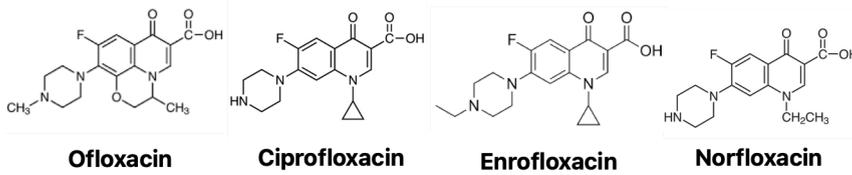


**Figura 5.** Evolución temporal de la concentración de antibiótico en el torrente sanguíneo tras la administración de una dosis de antibiótico [14].

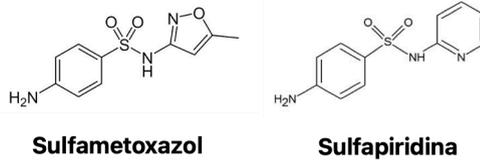
En este trabajo, se realizará una optimización de métodos para el análisis de antibióticos tanto en aguas residuales como en sueros humanos. En el caso de las aguas residuales se obtendrá una visión de los antibióticos que se vierten a las aguas medioambientales de manera incontrolada o a través de los fluidos fisiológicos. En el caso de sueros para poder analizar muestras de pacientes que permitan a los médicos minimizar las dosis controlando la eficacia del mismo y reduciendo su toxicidad.

Se analizarán en aguas residuales cuatro fluoroquinolonas (ofloxacino, ciprofloxacino, enrofloxacin y norfloxacino); cuatro tetraciclinas (clortetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina y tetraciclina); dos sulfonamidas (sulfametoxazol y sulfapiridina). En sueros de pacientes se analizarán dalbavancina, meropenem, ganciclovir, cefiderocol, isavuconazol, piperacilina/tazobactam, imipenem/cilastatina, ceftolozano/tazobactam, meropenem/vaborbactam. Todas estas estructuras se muestran en la **Figura 6**.

**FLUOROQUINOLONAS**



**SULFONAMIDAS**



**TETRACICLINAS**

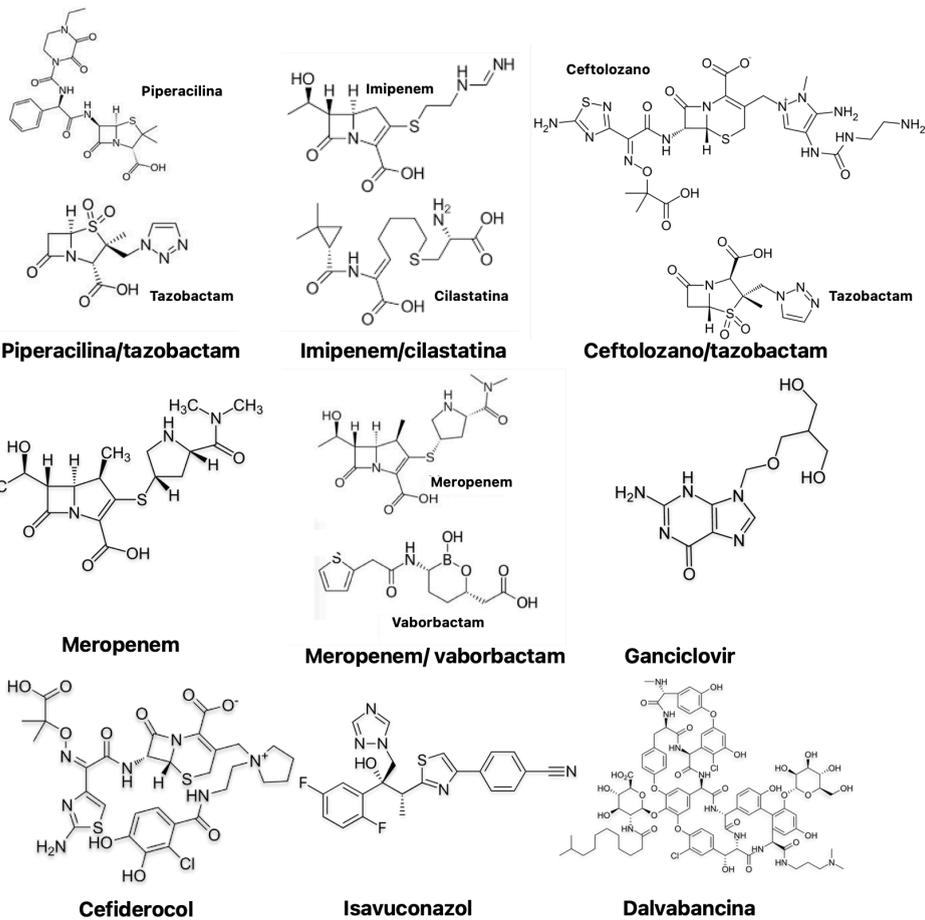
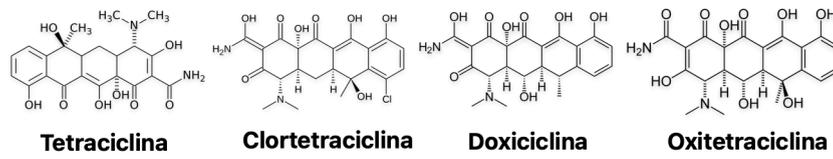


Figura 6. Estructuras químicas de los antibióticos analizados en aguas residuales y sueros humanos.

## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

---

### ANTECEDENTES

En 2020, durante la época del covid, se recogieron muestras de aguas residuales en puntos de diferentes barrios de Zaragoza (La Bombarda, las Delicias, Servet, la Almozara, las Fuentes, Torrero, Clínico) con el objetivo de realizar un muestreo de la cantidad de antibióticos presentes en ellas. De este modo se podría determinar la concentración de estos antibióticos que se están desechando al medio ambiente, pudiendo por un lado provocar daños en la flora y fauna y por otro lado incrementar las resistencias bacterianas a antibióticos. A su vez es necesario realizar una monitorización de los tratamientos de antibióticos en pacientes para poder ajustar adecuadamente la cantidad de antibióticos que se le administra a cada paciente, y así evitar administrar dosis terapéuticas por encima de las necesarias pudiendo producir resistencias bacterianas y por otro lado terminar como residuos en aguas medioambientales. En la actualidad, una de las formas frecuentes de evaluar la concentración efectiva de antibióticos en el organismo del paciente y, por otro lado, de cuantificar los residuos de estos antibióticos en aguas residuales es mediante técnicas cromatográficas, en nuestro caso utilizaremos cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). En estudios previos [24], se analizaron muestras de antibióticos en efluentes de aguas residuales del hospital principal de Girona, efluentes de la EDAR de Girona, que recibe las aguas residuales hospitalarias sin ningún tratamiento previo, junto con las aguas residuales municipales de Girona. En cuanto a TDM, un artículo bibliográfico [25] reveló que en los hospitales españoles ha aumentado la monitorización de antibióticos desde 2009, sin embargo tal y como se indica, en 2021, para antibióticos clásicos (vancomicina y aminoglucósidos) el porcentaje de actividad hospitalaria en cuanto a la combinación de determinación analítica y estudios farmacocinéticos es de 75,4%, para antibióticos no clásicos (betalactámicos, linezolid, daptomicina, colistina) es únicamente de 14,5% y para antifúngicos (azoles y candinas) es del 11,6%. Concretamente la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria [26] en colaboración con varios hospitales españoles (Hospital Universitari Vall d'Hebron, Hospital Universitario La Paz, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, etc), se realiza TDM en pacientes pediátricos para algunas familias de antibióticos.

En nuestro estudio la novedad radica en que en Aragón no existen estudios basados en la monitorización de la presencia de antibióticos en aguas medioambientales ni de monitorización terapéutica de antibióticos en sangre de pacientes con patologías infecciosas que están siendo tratados con antibióticos, cuyo fin es el de optimizar la dosis terapéutica y mejorar la eficacia clínica.

### HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En este trabajo se plantea la **hipótesis** de que es posible detectar mediante HPLC la presencia y concentración de antibióticos en aguas residuales y sangre y que su cuantificación puede ayudar a adoptar medidas para reducir su impacto sobre el medioambiente y la resistencia a antibióticos y mejorar la eficacia de estos en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

El **objetivo principal** de este trabajo es desarrollar y optimizar un método cromatográfico de análisis de diferentes muestras de origen biológico, con el fin de poder determinar la concentración de ciertos antibióticos en aguas residuales y suero de pacientes que padecen diferentes enfermedades infecciosas.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar un protocolo adecuado para el tratamiento de las muestras, concretamente un proceso de extracción en fase sólida (SPE) con el que se obtengan buenas recuperaciones del analito de interés tanto en aguas residuales como en suero.
- Desarrollar y optimizar métodos de medidas de patrones antibióticos en cromatografía líquida de alta eficiencia, que permitan obtener una buena separación, resolución y recuperación de los diferentes antibióticos en las muestras biológicas a analizar.
- Poder aplicar estos métodos de medida a muestras de origen biológico, concretamente suero de pacientes y aguas residuales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 1. Equipo y condiciones cromatográficas

El análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se ha llevado a cabo con un equipo modular modelo Waters e2695, que incluye un módulo de separación (**figura 7**), acoplado a un detector ultravioleta-visible 2489 y a un detector de fluorescencia 2475. Para el análisis de los resultados obtenidos hemos utilizado el software Empower.



**Figura 7.** Equipo HPLC utilizado para los experimentos (foto de la izquierda) y detectores ultra-violeta visible 2489 y de fluorescencia 2475 (fotos de la derecha).

La separación cromatográfica se llevó a cabo mediante una columna X Select HSS T3, de dimensiones son 4,6 x 150 mm y tamaño de partícula 3,5  $\mu\text{m}$  (**figura 8**). La fase estacionaria de la columna es un polímero funcionalizado con C18 y la fase móvil utilizada es un líquido polar acuoso-orgánico. Por tanto, se utiliza como modo cromatográfico fase reversa.



**Figura 8.** Columna X Select HSS T3 de Waters.

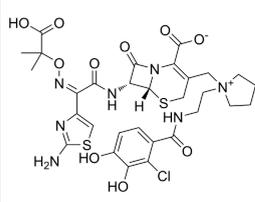
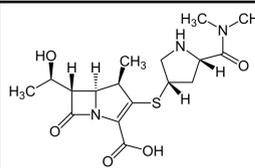
La columna se ha mantenido a 30 °C en todos procesos de separación y el flujo utilizado ha sido de 1 mL/min.

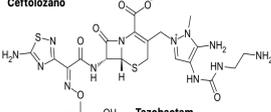
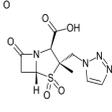
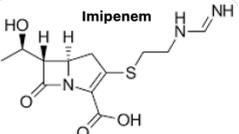
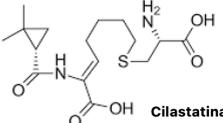
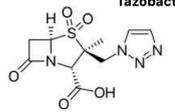
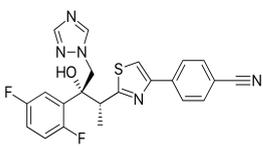
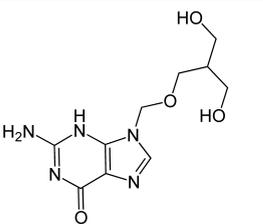
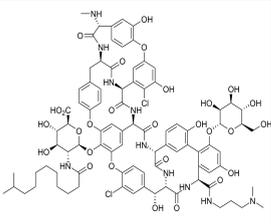
En todas las medidas, se utilizaron diferentes gradientes en los que se va modificando la composición de fase móvil por unidad de tiempo o de volumen. El tiempo total de ensayo varió dependiendo del antibiótico a analizar.

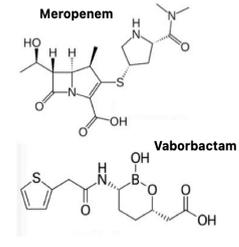
## **2. Análisis de muestras de sueros**

### ***2.1 Preparación de disoluciones stock, patrones de calibración y rectas de calibrado.***

En la siguiente tabla (**Tabla 2**), se muestran todos los antimicrobianos analizados en suero humano, clasificados por su familia química, fórmula química y peso molecular.

<b>Familia química</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Fórmula molecular</b>	<b>Masa molecular (gr/mol)</b>	<b>Representación química</b>
	Cefiderocol (CFCD)	$\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{ClN}_7\text{O}_{10}\text{S}_2$	752,21	
<b>Cefalosporina</b>	Meropenem (MEM)	$\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$	383.464	

	Ceftolozano/Tazobactam (C/T)	$C_{23}H_{30}N_{12}O_8S_2$	666,66	<p>Ceftolozano</p>  <p>Tazobactam</p> 
<b>Carbapenémicos</b>	Imipenem/Cilastatina (IPM/CLN)	$C_{28}H_{45}N_5O_{10}S_2$	675,8	<p>Imipenem</p>  <p>Cilastatina</p> 
<b>Penicilina</b>	Piperacilina/Tazobactam (TZP)	$C_{33}H_{38}N_9O_{12}S_2$	816,78	<p>Piperacilina</p>  <p>Tazobactam</p> 
<b>Azoles</b>	Isavuconazol (ISC)	$C_{35}H_{35}N_8F_2O_5S$	437,5	
<b>Antivirales</b>	Ganciclovir (GCV)	$C_9H_{13}N_5O_4$	255,23	
<b>Lipoglucopeptido</b>	Dalbavancina (DAL)	$C_{88}H_{100}Cl_2N_{10}O_{28}$	1816,7	

<p><b>Inhibidores de betalactamasas</b></p>	<p>Meropenem/Vaborbactam (MVB)</p>	<p><math>C_{29}H_{39}N_4 O_{10}S_2B_1</math></p>	<p>437,5</p>	
---	------------------------------------	--	--------------	---

**Tabla 2.** Antimicrobianos analizados en sueros, clasificados por su familia química, fórmula y masa molecular.

En primer lugar, preparamos las disoluciones stock a una concentración alrededor de 1000 mg/L. Para ello, se pesaron 10 mg de cada antibiótico y se disolvió en agua y metanol. El volumen de agua y metanol varía dependiendo de la solubilidad del antibiótico. Los antibióticos MEM, C/T, MVB se disolvieron en aproximadamente 10 mL de agua y 200  $\mu$ L de metanol; IPM/CLN, TZP, ISC, GCV y DAL se disolvieron en 10 mL de agua y en torno a 700 microlitros de metanol; CFCD se disolvió en 14 mL de agua. En todos los casos las disoluciones se sometieron a un baño de ultrasonidos durante aproximadamente un minuto para su total disolución.

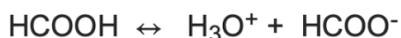
Posteriormente, procedimos a preparar los estándares de calibración de los sueros para obtener las rectas de calibrado de las diferentes familias de antibióticos.

Partiendo del stock preparado con una concentración de 1000 mg/L, tal y como se indica en el párrafo anterior, se preparan patrones de 1, 2, 5, 8, 10, 12, 15, 18 y 20, 25, 40, 60 y 100 mg/L. Finalmente, se llevan a un volumen final de 200  $\mu$ l. Como ya hemos comentado anteriormente, para el análisis de dichas muestras hemos utilizado insertos para poder inyectar el volumen requerido sin dificultad

## 2.2 Preparación de las fases móviles.

En este caso, para llevar a cabo el análisis de los antibióticos mediante HPLC, se prepararon fases móviles a diferentes pHs. Para calcular la concentración de sal necesaria se realizaron cálculos a través de los correspondientes equilibrios ácido base.

Para pH ácido, con formiato amónico:



$$pka = \frac{[H_3O^+][NH_4HCO_2]}{[HCOOH]}$$

Siendo : Pka (  $NH_3$  ) = 9,4; Pka (HCOOH)= 3,75

Masa molecular (formiato amónico) = 63,03 gramos/mol.

Para pH básicos, con formiato amónico:



$$pka = \frac{[\text{NH}_3][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{NH}_4\text{OH}]}$$

Para pH intermedios, con tampón fosfato:



$$pka = \frac{[\text{HPO}_4^{2-}][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{H}_2\text{O}][\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

Siendo Pka ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) = 7,20

Masa molecular ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ )= 137,99 gramos/mol; Masa molecular ( $\text{HPO}_4^{2-}$ )= 141,96 gramos/mol

Se prepararon las disoluciones con formiato amónico 50 mM y fosfato 50 mM ajustando el pH con NaOH,  $\text{NH}_4^+$  o fórmico dependiendo de cada una. Fase móvil a pH=2,4,8 y 10 con formiato amónico 50 mM y fase móvil a pH=5 y 7 con tampón fosfato 50 mM.

### **2.3 Proceso de extracción de suero en fase sólida.**

En muestras de sueros de pacientes que sufren enfermedades infecciosas, la matriz suele ser muy compleja, por ello, con este proceso se busca eliminar el mayor número posible de interferencias que pueden dificultar su detección y cuantificación por HPLC.

Para extraer nuestro analito de interés, hacemos una adición de los diferentes antibióticos a suero, concretamente suero de humano sano procedente del biobanco de Aragón (C.P.-C.I. EPA22/035) y llevamos a cabo el proceso de extracción utilizando los siguientes cartuchos:

- Oasis MCX (Mixed-mode Cation-eXchange) de 30 mg, contienen un adsorbente polimérico de modo mixto para extraer compuestos básicos con grupos de intercambio catiónico. Los métodos más sencillos eliminan hasta el 99% de los fosfolípidos, una causa importante de efectos de matriz, supresión iónica y menor vida útil de la columna. Está diseñado para capturar y concentrar compuestos básicos mientras que las interferencias de la matriz se eliminan de la muestra.

- OASIS WAX (Mixed-mode Weak Anion-eXchange) de 30 mg. Proporciona preparación de muestras para compuestos ácidos fuertes. El mecanismo de retención es de modo mixto (intercambio iónico y fase inversa), que mejora la retención de compuestos fuertemente ácidos.

- Oasis MAX (Mixed-mode Anion-eXchange) de 30 mg, contienen un adsorbente polimérico de modo mixto para extraer compuestos ácidos con grupos de intercambio aniónico.

- Oasis WCX (Mixed-mode Weak Cation-eXchange) de 30 mg. Proporciona una mejor preparación de muestras para bases fuertes y aminas cuaternarias. El mecanismo de retención es de modo mixto (intercambio iónico y fase inversa), que mejora retención para todo tipo de analitos básicos, especialmente bases fuertes.

El proceso de extracción en fase sólida se llevó a cabo siguiendo dos protocolos diferentes (protocolos 1 y 2 descritos a continuación), el primer protocolo se utilizó para los cartuchos

MCX y WAX y el segundo protocolo para los cartuchos MAX y WCX (**Figura 9**). A continuación, se indican los pasos del proceso de extracción que se llevaron a cabo para ambos protocolos:

### **Protocolo 1:**

En primer lugar, se realiza el acondicionamiento del cartucho añadiendo 1 mL de metanol; seguidamente el equilibrado añadiendo 1 mL de agua. A continuación, se añaden las muestras, diluyendo 500  $\mu$ L de suero en 500  $\mu$ L de ácido fosfórico al 2% y se lavan con 1 mL de ácido fórmico 2% en agua. Por último, se lleva a cabo la primera elución con 500  $\mu$ L de metanol y se hace una segunda elución con 500  $\mu$ L de amoníaco 5% en metanol.

### **Protocolo 2:**

En primer lugar, se realiza el acondicionamiento añadiendo 1 mL de metanol; seguidamente el equilibrado añadiendo 1 mL de agua. A continuación, se añaden las muestras, concretamente 500  $\mu$ L de suero en 500  $\mu$ L de ácido fosfórico al 2% y se lavan con 1 mL de amoníaco 5% en agua. Por último, se lleva a cabo la primera elución con 500  $\mu$ L de metanol y la segunda elución con 500  $\mu$ L de fórmico 2% en metanol. Seguidamente se preparan viales con cada muestra obtenida con los cuatro cartuchos diferentes, y se inyectan para su detección y cuantificación mediante HPLC.



**Figura 9.** Manifold® con cartuchos MCX, WCX, MAX y WAX utilizadas para extraer patrones de sueros.

En el caso del ISC, el cual se queda retenido en los cartuchos anteriormente descritos, se desarrolla un proceso de extracción de suero adicionado con el patrón de antibiótico. Este consiste en añadir 400 microlitros de metanol a 400 microlitros de suero adicionado, seguido de un proceso de centrifugación con el objetivo de precipitar las proteínas pertenecientes al suero y posteriormente se filtra el sobrenadante.

### **3. Aspectos éticos**

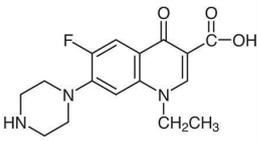
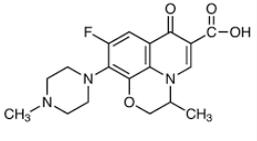
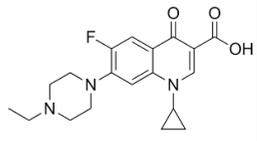
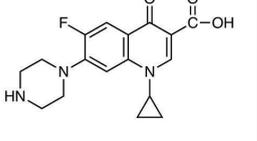
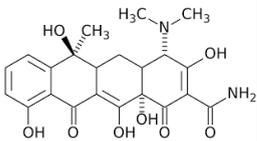
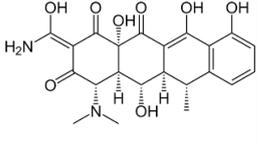
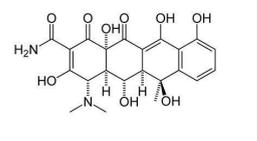
El uso de muestras humanas (suero de donantes sanos y de pacientes con enfermedades infecciosas) se ha llevado a cabo a través del Biobanco de Aragón mediante un procedimiento previamente aprobado por el Comité Ético Investigación Clínica de Aragón (CEICA), número C.P.-C.I. EPA22/035. Todas las muestras han sido recogidas con

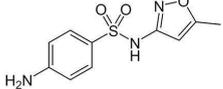
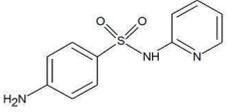
consentimiento informado de los donantes/pacientes y han sido codificadas con el fin de preservar su anonimato.

#### **4. Análisis de antibióticos en muestras de agua residuales**

##### ***4.1 Preparación de disoluciones stock, patrones de calibración y rectas de calibrado.***

En la siguiente tabla (Tabla 3), se muestran todos los antibióticos analizados en muestras de aguas residuales, clasificados por su familia química, fórmula química y peso molecular.

<b>Familia química</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>Fórmula molecular</b>	<b>Peso molecular (g/mol)</b>	<b>Representación química</b>
<b>Fluoroquinolonas</b>	Norfloxacin (NOR)	$C_{16}H_{18}N_3FO_3$	319,33	
	Ofloxacin (OFX)	$C_{18}H_{20}FN_3O_4$	361,7	
	Enrofloxacin (ENR)	$C_{19}H_{22}FN_3O_3$	359,39	
	Ciprofloxacin (CIP)	$C_{17}H_{18}N_3FO_3$	331,34	
<b>Tetraciclinas</b>	Tetraciclina (TE)	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	480,9	
	Doxiciclina (DX)	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	512,94	
	Oxitetraciclina (OTC)	$C_{22}H_{24}N_2O_9$	496,89	

<b>Sulfonamidas</b>	Sulfametoxazol (SMX)	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	253,28	
	Sulfapiridina (INN)	$C_{11}H_{11}N_3O_2S$	249,28	

**Tabla 3.** Antibióticos analizados en aguas residuales, clasificados por su familia química, fórmula y masa molecular.

En primer lugar, preparamos las disoluciones stock a una concentración de 1000 mg/L. Para ello, se pesan 10 mg de cada antibiótico y se disuelven TE, CTC, DX, OTC, SMX e INN en 10 mL MeOH y OFX, CIP, ENR, NOR en 10 mL de MeOH y 100  $\mu$ l de NaOH 1M.

Posteriormente, preparamos los estándares de calibración de los antibióticos que se van a analizar en aguas residuales para la obtención de las rectas de calibrado de las diferentes familias de antibióticos a analizar: fluoroquinolonas, tetraciclinas y sulfonamidas.

Partiendo del stock preparado a una concentración de 1000 mg/L, tal y como se indica en el párrafo anterior, se preparan muestras con una concentración 1, 2, 5, 8, 10, 12, 15, 18 y 20 mg/L mediante una dilución 1:100 de los stocks, llevándolo a un volumen final de 200  $\mu$ l con una mezcla de composición igual al de la fase móvil inicial del método utilizado. Para el análisis de dichas muestras hemos utilizado insertos para poder inyectar el volumen requerido sin dificultad.

En la **tabla 28** de resultados y discusión, se muestran las rectas de calibrado obtenidas, en las cuales también se representa su desviación estándar relativa (RSD), sus valores R y R<sup>2</sup>, y su rango de linealidad.

#### **4.2 Preparación de las fases móviles.**

Para llevar a cabo el análisis de los antibióticos mediante HPLC se prepararon las siguientes fases móviles:

Fase móvil aguas 1: 95% agua + 5% Acetonitrilo para el método aguas 1 del programa.

Fase móvil aguas 4: 85% agua + 15% Acetonitrilo para el método aguas 4 del programa.

#### **4.3 Preparación de las muestras.**

En 2020, se recogieron muestras de aguas residuales en puntos de diferentes zonas de Zaragoza (Servet, Bombarda, Delicias, la Almozara, las Fuentes, Torrero, Clínico), para detectar y cuantificar los antibióticos presentes en ellas. Para el desarrollo de este trabajo hemos utilizado las muestras de agua residual recogidas del barrio de la Bombarda de Zaragoza.

#### **4.4 Proceso de extracción de muestras en fase sólida (SPE).**

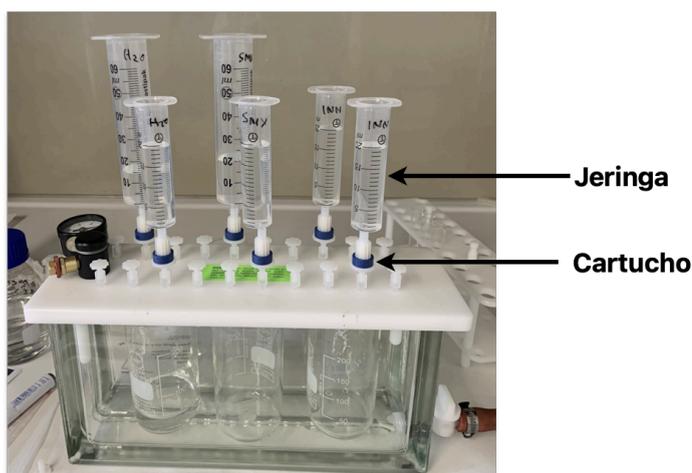
Como paso previo al análisis de las muestras por cromatografía líquida es necesario realizar una preparación que nos permita eliminar el mayor número posible de interferencias de la

matriz y a su vez concentrar el analito de interés para poder detectarlo y cuantificarlo mediante HPLC.

En el caso de las aguas residuales, las muestras suelen presentar un gran volumen, por lo que es necesario concentrar el analito de interés lo máximo posible ya que este se encuentra en la muestra muy diluido. Además, también se busca eliminar interferencias que luego puedan afectar a la detección y medida de los picos cromatográficos.

Actualmente, existen diferentes técnicas de preparación de la muestra, nosotros en este trabajo hemos llevado a cabo una extracción en fase sólida (SPE), utilizando unos tubos con relleno sólido como soporte de los grupos funcionales que realizan la separación, los cuales reciben el nombre de cartuchos; concretamente hemos utilizado Oasis HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balanced Copolymer) de 3 cm<sup>3</sup> de la marca Waters, funcionalizados con un adsorbente polimérico (propileno) para fase reversa. El proceso de preparación de la muestra lo hemos llevado a cabo tanto para extraer agua adicionada con los patrones de antibióticos como para las muestras de aguas residuales, mediante los siguientes pasos:

En primer lugar se prepara una disolución con una concentración de 10 mg/L, añadiendo 10 microlitros de antibiótico de la disolución de stock de 1000 mg/L y llevándolos a un volumen final de 100 mL con agua. Esta disolución se preparará de igual forma para cada patrón de antibiótico. Seguidamente, dicha disolución se añade a las jeringas de 60 mL colocadas encima de los cartuchos en el Manifold<sup>®</sup> con sus correspondientes filtros (Oasis prime HLB) tal y como se observa en la **Figura 10**. Seguidamente se filtra a una presión entre 5 y 10 milímetros de mercurio. Para continuar, se añaden 10 mL de agua, se deja secar el cartucho y se añaden 6 mL de metanol. Se evapora el metanol bajo corriente de nitrógeno y el residuo sólido resultante se resuspende en 1 mL de una disolución de composición igual a la de la fase móvil inicial. Posteriormente, se utilizan filtros de 0,45 µm para eliminar posibles partículas sólidas que puedan estropear la columna y dificultar (o empeorar) la separación de los antibióticos. Por último, se procede a medir por HPLC cada muestra de antibiótico inyectada por triplicado. Este proceso se lleva a cabo tanto con las muestras de aguas de aguas residuales como con los patrones adicionados a agua miliQ.



**Figura 10.** Manifold<sup>®</sup> con sus respectivos cartuchos y depósitos de muestras para la preparación de las muestras de aguas residuales.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Para poder realizar el análisis de antibióticos hay que realizar una optimización del proceso de separación de estos y por otra parte optimizar el proceso de preparación de las muestras. Tanto para el análisis de aguas como para sueros se realiza la preparación de las muestras mediante un proceso de SPE y la separación mediante una técnica cromatográfica, concretamente HPLC.

Para llevar a cabo el desarrollo del método que utilizamos para medir en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es necesario llevar a cabo una optimización de este, teniendo en cuenta diferentes factores como la composición del tampón, el volumen de inyección, el flujo y la temperatura de la columna, las muestras a analizar y la composición de la fase móvil a utilizar.

Para la optimización de los análisis tanto en suero como en aguas residuales, tal y como se describe abajo en más detalle, utilizamos un flujo fijo para todas las separaciones de 1 mL/minuto. La temperatura de la columna la fijamos en todas las medidas a 30°C y la temperatura a la que se encuentran las muestras es de 10°C. Las adiciones para los estudios de validación de los métodos de análisis se prepararon a una concentración de antibiótico de 10 mg/L o 100 mg/L en el disolvente correspondiente. El volumen de inyección es de 10 µL para todas las medidas.

### 1. Análisis en sueros

En la actualidad, el elevado uso y la inadecuada exposición farmacológica de algunos antibióticos en pacientes críticos aumenta el desarrollo de bacterias resistentes a estos. Por ello, es necesario optimizar la terapia antibiótica para garantizar resultados clínicos satisfactorios y también para prolongar su eficacia clínica. La dosificación guiada por la monitorización terapéutica de fármacos (TDM) es una forma segura y eficaz de garantizar que la exposición a los antimicrobianos alcance los objetivos farmacocinéticos en pacientes críticos, sin embargo es difícil de realizar para algunos antibióticos. En el caso del meropenem, al tratarse de un antibiótico dependiente del tiempo, su objetivo terapéutico es de 100%  $f T > CMI$ , es decir, la concentración sérica del antibiótico no unida ( libre, f) debe permanecer al menos por encima de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del fármaco para el patógeno objetivo durante todo el intervalo de dosificación [21].

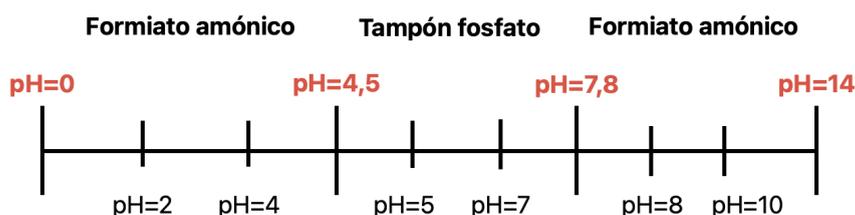
En la bibliografía, para el caso del meropenem se definieron como puntos de corte, es decir, concentraciones a las que las bacterias son susceptibles a un tratamiento exitoso con un antibiótico, concentraciones mínimas por encima de 8,0 mg/L para alcanzar el objetivo. De 1.832 muestras de meropenem analizadas, se observó que el 39,3% de las muestras no alcanzaron las concentraciones objetivo [27]. En otro estudio, de las 99 muestras de pacientes el 38,4% de las muestras analizadas de meropenem no alcanzaron las concentraciones objetivo [28].

Para poder realizar estos estudios utilizaremos muestras biológicas, sueros, y tendremos que desarrollar y validar un método analítico para cuantificar las concentraciones del fármaco en las muestras, siendo la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) uno de los métodos analíticos más usados en este tipo de estudios.

### 1.1 Optimización de las condiciones cromatográficas.

En primer lugar, se trató de buscar la fase móvil y el método de gradiente con los que se obtuviera una mejor separación de los picos. Para ello se probaron diferentes fases móviles para cada región de pH; en la zona ácida y básica se utilizó para prepararla formiato de amonio y en la zona intermedia se utilizó tampón fosfato. Para todas estas medidas de pH la fase móvil en la que se disuelven las muestras de patrones, se prepara con 5% de acetonitrilo y 95% de tampón.

Para llevar a cabo el análisis se escogieron dos pHs en zona ácida ( 2 y 4 ) , dos en zona media ( 5 y 7 ) y dos en zona básica ( 8 y 10 ) (**figura 11**).



**Figura 11.** Diagrama en el que se muestran los pHs a los que se han medido las muestras.

A continuación, se establecieron los métodos de medida para cada pH. Teniendo en cuenta, que al utilizar formiato amónico para la preparación de la fase móvil se puede alcanzar una concentración del 100% de acetonitrilo, pero sin embargo en el caso del tampón fosfato para evitar la posible precipitación en la columna se alcanza como máximo 70% de acetonitrilo. En la **tabla 4** y **tabla 5** se muestran las condiciones de gradiente utilizadas para cada pH.

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente D (%)	Velocidad de flujo (mL/min)
0	5	95	1
5	5	95	1
35	100	0	1
45	5	95	1
55	5	95	1

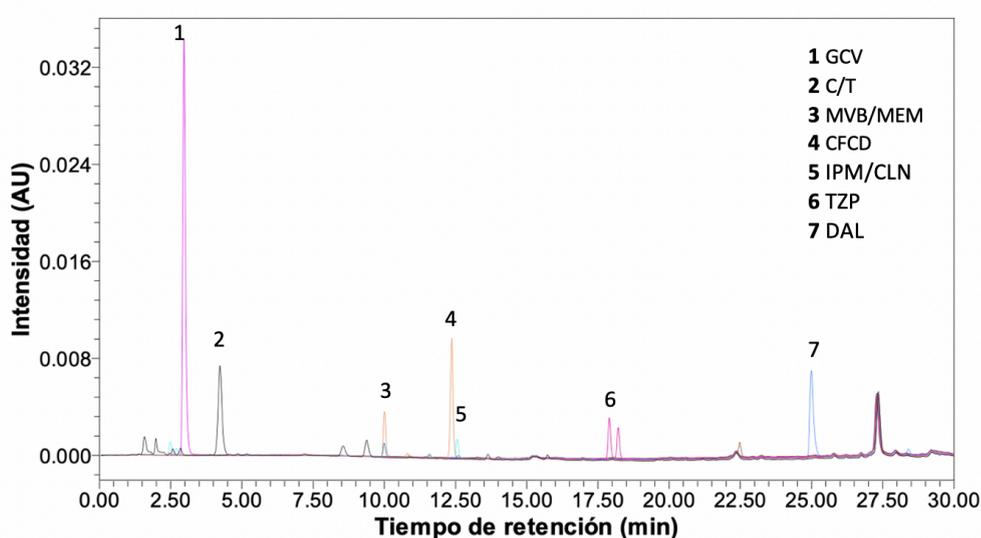
**Tabla 4.** Condiciones de los gradientes del Método sueros 1 utilizados para separar las muestras a pH=2, 4, 8, 10 con fase móvil de formiato amónico. Siendo solvente A acetonitrilo y solvente D formiato amónico.

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente D (%)	Velocidad de flujo (mL/min)
0	5	95	1
5	5	95	1
35	70	30	1

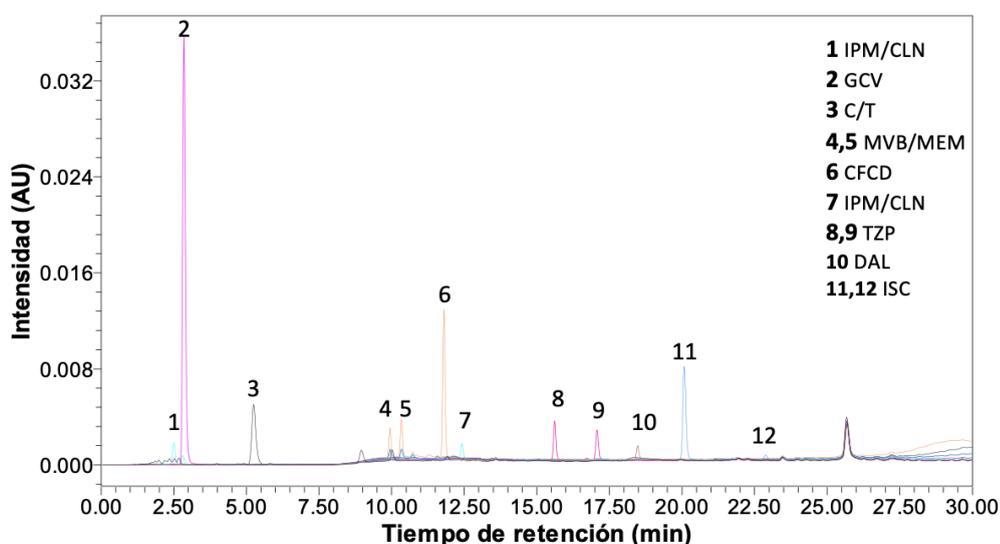
45	5	95	1
55	5	95	1

**Tabla 5.** Condiciones de los gradientes del Método sueros 2 utilizados para separar las muestras a pH=5 y 7 con fase móvil de tampón fosfato. Siendo solvente A acetonitrilo y solvente D tampón fosfato.

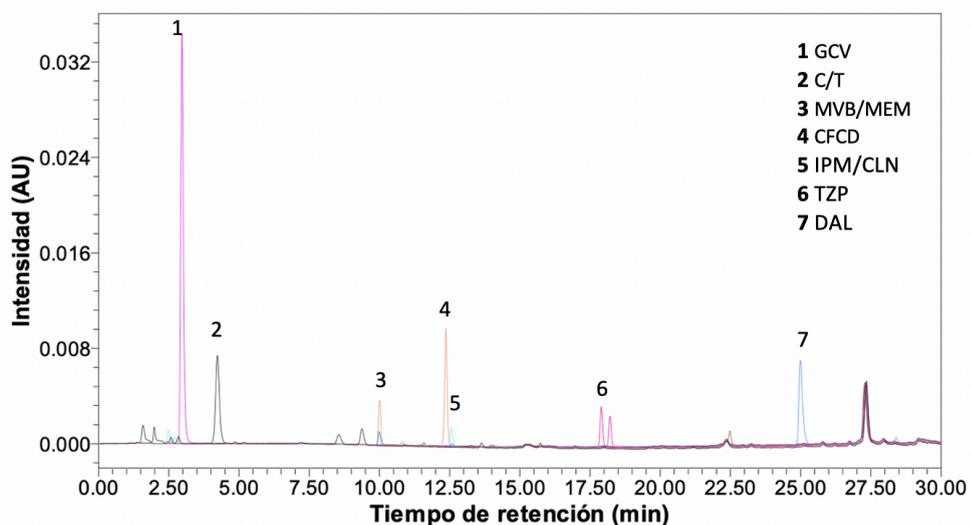
A continuación, se muestran los cromatogramas superpuestos del análisis de cada antibiótico individualmente, obtenidos utilizando fases móviles a diferentes pHs, concretamente 2 (**figura 12**), 4 (**figura 13**), 5 (**figura 14**), 7 (**figura 15**), 8 (**figura 16**) y 10 (**figura 17**). Para la preparación de estas muestras se realizaron los cálculos a través de los correspondientes equilibrios ácido base indicados en el **apartado 2.2 de Materiales y Métodos**.



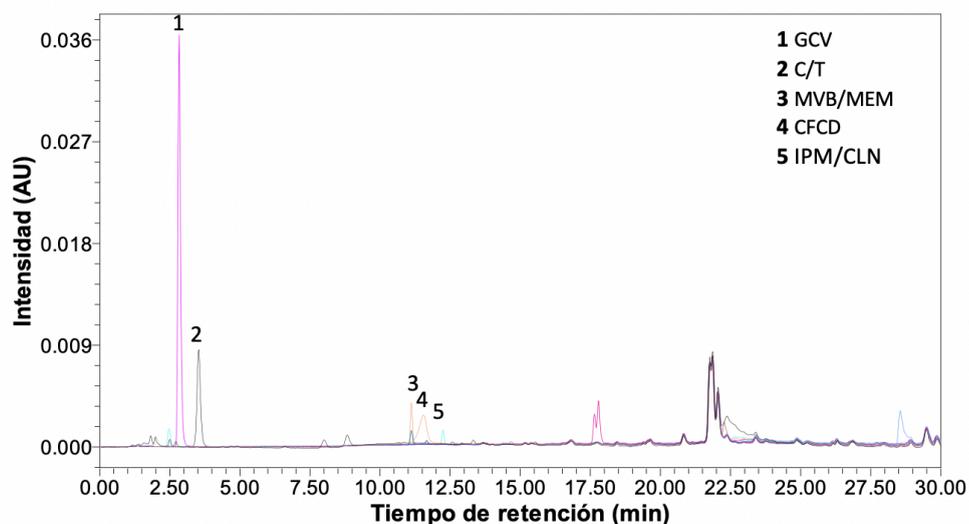
**Figura 12.** Superposición de los cromatogramas de cada patrón medido por separado utilizando como fase móvil formiato amónico a pH 2 con separación mediante HPLC en gradiente Métodos sueros 1 con detección UV a 260 nm.



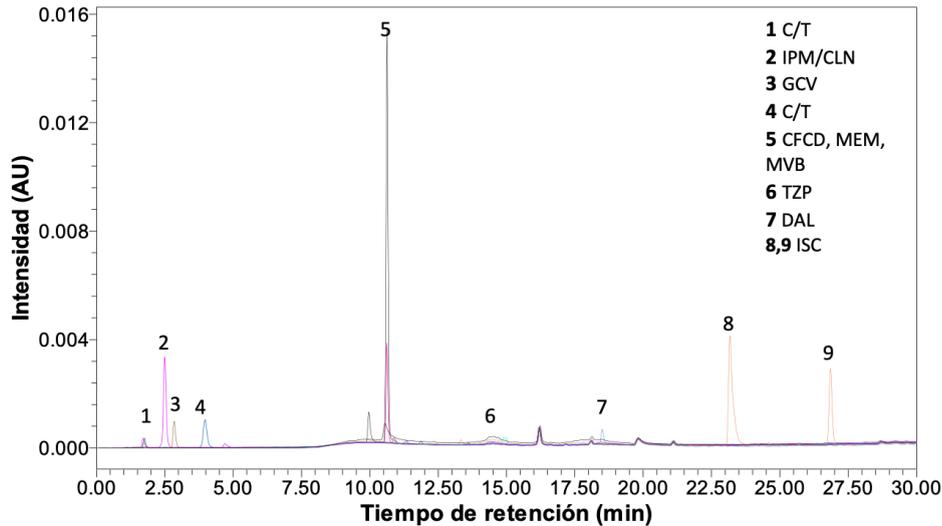
**Figura 13.** Superposición de los cromatogramas de cada patrón medido por separado utilizando como fase móvil formiato amónico a pH 4 con separación mediante HPLC en gradiente Métodos sueros 1 con detección UV a 260 nm.



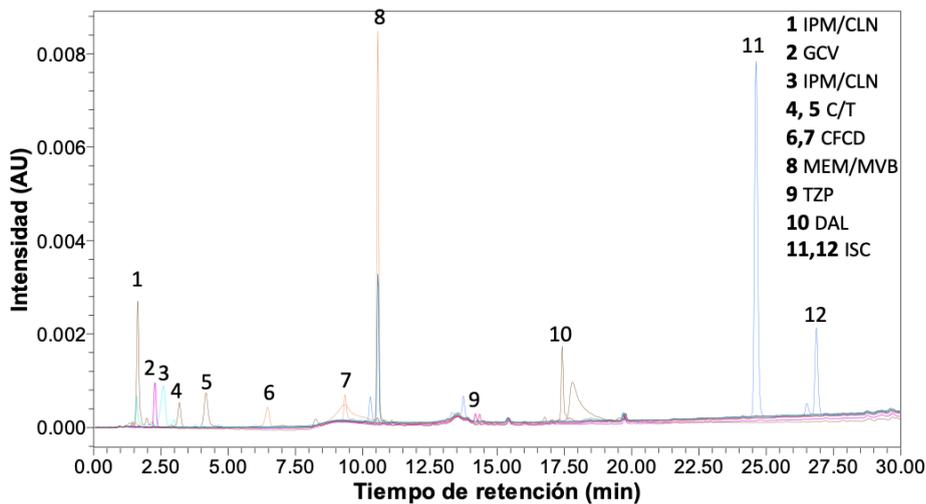
**Figura 14.** Superposición de los cromatogramas de cada patrón medido por separado utilizando como fase móvil tampón fosfato a pH 5 con separación mediante HPLC en gradiente Métodos sueros 2 con detección UV a 260 nm.



**Figura 15.** Superposición de los cromatogramas de cada patrón medido por separado utilizando como fase móvil tampón fosfato a pH 7 con separación mediante HPLC en gradiente Métodos sueros 2 con detección UV a 260 nm.



**Figura 16.** Superposición de los cromatogramas de cada patrón medido por separado utilizando como fase móvil formiato amónico a pH 8 con separación mediante HPLC en gradiente Métodos sueros 1 con detección UV a 300 nm



**Figura 17.** Superposición de los cromatogramas de cada patrón medido por separado utilizando como fase móvil formiato amónico a pH 10 con separación mediante HPLC en gradiente Métodos sueros 1 con detección UV a 260 nm

Tras la optimización del método, se demuestra que los cromatogramas que muestran mejor separación y resolución de los picos son los obtenidos a pH 4 y pH 2. Finalmente, optamos por elegir la fase móvil a pH 4 para medir los antibióticos adicionados a sueros, ya que a pHs más bajos hay posibilidad de que se dañe la columna por exceso de acidez.

En la **tabla 6**, se muestran los tiempos de retención de los patrones de antibióticos obtenidos a pH 4, pudiendo concluir que se obtiene una buena separación de todos los patrones.

Antibióticos	Tiempo de retención (minutos)
IPM/CLN	2,51
GCV	2,72
C/T	5,12
MEM y MVB	9,88
	10,28
	10,72
CFCD	9,94
	11,77
TZP	15,58
	16,97
DAL	18,53
ISC	20,1
	22,96

**Tabla 6.** Tiempos de retención de los antibióticos utilizando como fase móvil formiato amónico a pH 4 con separación mediante HPLC en gradiente Métodos sueros 1 con detección UV a 260 nm.

### 1.2 Preparación de la muestra.

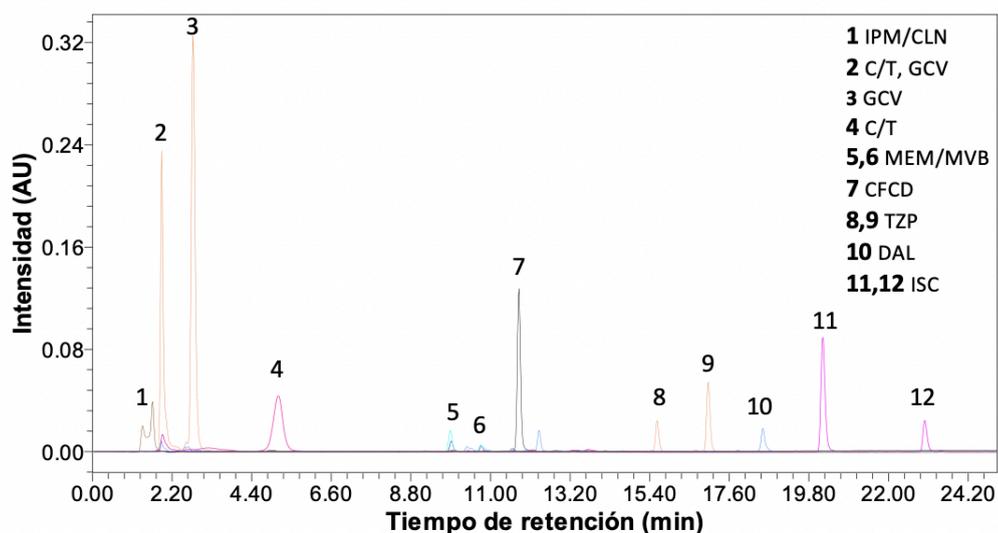
Para realizar la preparación de la muestra es necesario realizar un proceso de extracción en fase sólida de los patrones, ya que las muestras de sueros de pacientes que sufren enfermedades infecciosas presentan una matriz que suele ser muy compleja, por ello, con este proceso de extracción en fase sólida se busca eliminar el mayor número posible de interferencias que pueden dificultar su detección y su cuantificación mediante HPLC.

El primer paso consiste en caracterizar el analito según su pKa, utilizando diferentes cartuchos dependiendo de si el antibiótico es más ácido o básico. En el caso de bases débiles utilizaremos MCX, para bases fuertes WCX; sin embargo, para ácidos débiles utilizaremos MAX, y para ácidos fuertes WAX. En nuestro caso, contamos con antibióticos que poseen muchos grupos químicos diferentes, lo cual hace difícil predecir su pKa fácilmente, por ello, procedemos a pasar una mezcla de todos los antibióticos por los cuatro tipos de cartuchos.

El protocolo de análisis es el mismo para el cartucho MCX, el cual carga compuestos básicos y WAX el cual carga solvente, y para MAX el cual carga analitos ácidos y WCX que carga solvente. Este procedimiento se muestra en la sección 2.3 de materiales y métodos.

Paralelamente, se preparan viales con cada patrón de antibiótico disuelto en los diferentes disolventes utilizados para llevar a cabo las eluciones en los cartuchos, concretamente metanol, utilizado para la primera elución en ambos protocolos, 5% de amoniaco en metanol, utilizado para la segunda elución en el protocolo 1 y 2% de ácido fórmico en metanol utilizado en la segunda elución en el protocolo 2.

Para realizar las medidas, se utiliza el método sueros 1 (**Tabla 4**). A continuación, se muestra el cromatograma (**Figura 18**) obtenido al medir los patrones disueltos en metanol, disolvente con el que se realiza la primera elución del cartucho.



**Figura 18.** Superposición de los cromatogramas de cada patrón disueltos en metanol, medidos por separado utilizando como fase móvil formiato amónico a pH 4 con separación mediante HPLC en gradiente Métodos sueros 1 con detección UV a 260 nm.

En la **tabla 7** se incluyen los patrones disueltos en metanol y sus tiempos de retención obtenidos en el cromatograma anterior.

Antibióticos	Tiempo de retención (minutos)
IPM/CLN	1,35
GCV	2,86
C/T	1,9
	5,08
MEM y MVB	9,89
	10,74
	10,72
CFCD	11,87
TZP	15,61
	17,02
DAL	18,6
ISC	20,1
	25,05

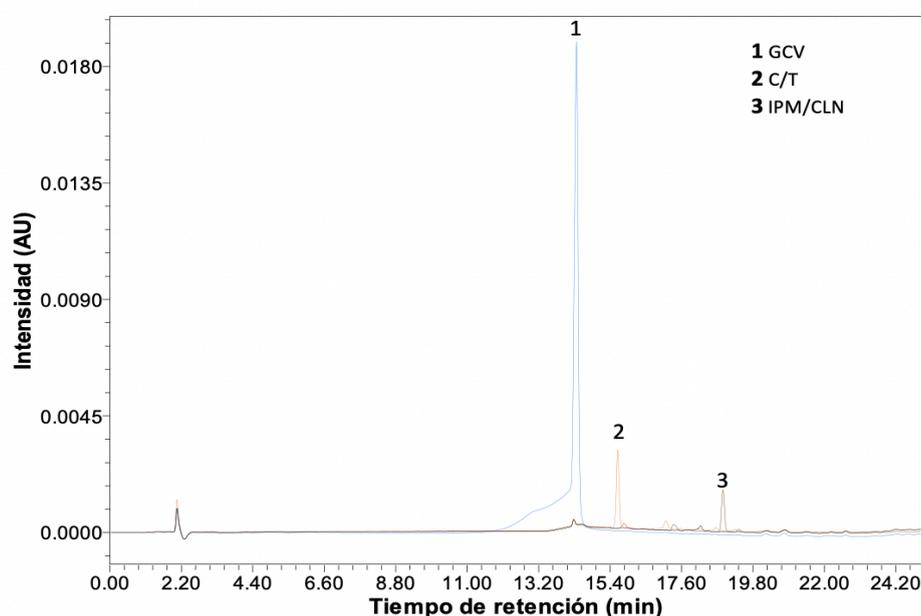
**Tabla 7.** Tiempos de retención de los antibióticos utilizando como fase móvil formiato amónico a pH 4 con separación mediante HPLC en gradiente Métodos sueros 1 con detección UV a 260 nm.

En general, se obtiene una buena separación para todos los patrones. Sin embargo, los primeros antibióticos que eluyen en el cromatograma tienen unos tiempos de retención muy bajos, es decir, no quedan apenas retenidos en la columna. Estos antibióticos se corresponden con IPM/CLN, C/T y GCV. Para intentar solucionarlo se modifica el gradiente comenzando con 100% fase tamponada (**tabla 8**).

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente D (%)	Velocidad de flujo (mL/min)
0	0	100	1
10	0	100	1
40	100	0	1
50	0	100	1
60	0	100	1

**Tabla 8.** Condiciones de los gradientes del Método Sueros 3 con fase móvil de formiato amónico. Siendo solvente A acetonitrilo y solvente D formiato amónico.

Como resultado de la medida con este nuevo gradiente (**tabla 8**) se obtiene el siguiente cromatograma (**figura 19**), en el cual aparecen los patrones GCV, C/T e IPM/CLN disueltos en metanol perfectamente separados.



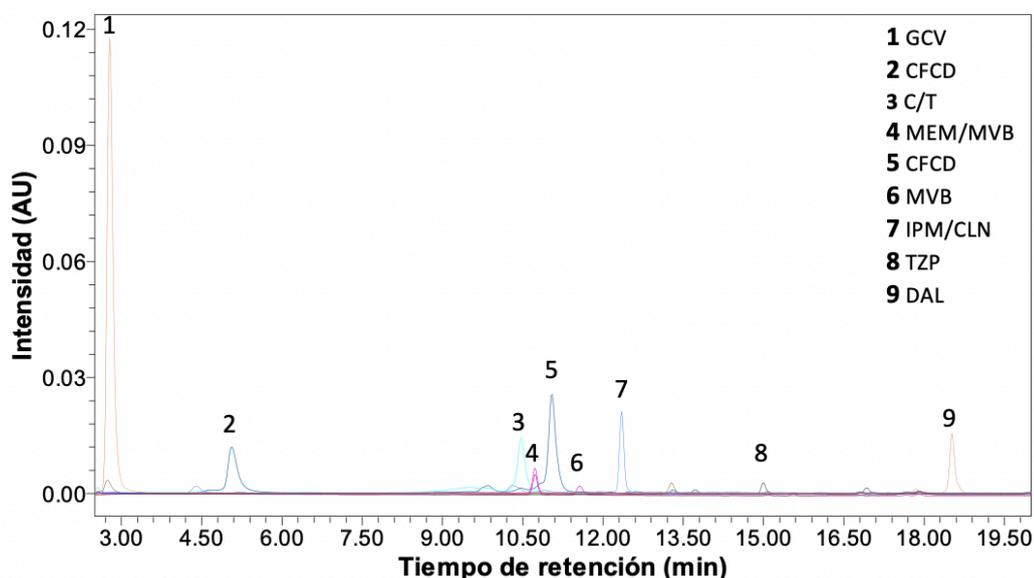
**Figura 19.** Superposición de los cromatogramas de cada patrón disueltos en metanol, medidos por separado utilizando como fase móvil formiato amónico a pH 4 con separación mediante HPLC en gradiente Métodos sueros 3 con detección UV a 260 nm.

En la **tabla 9** se incluyen los patrones disueltos en metanol con sus tiempos de retención.

Antibióticos	Tiempo de retención (minutos)
GCV	14,27
C/T	15,6
IPM/CLN	18,81

**Tabla 9.** Tiempos de retención de los antibióticos disueltos en metanol, utilizando como fase móvil formiato amónico a pH 4 con separación mediante HPLC en gradiente Métodos sueros 3 con detección UV a 260 nm.

A continuación, se muestra la superposición de los cromatogramas (**figura 20**) obtenidos al medir los patrones disueltos en 5% de amoniaco en metanol, el disolvente con el que se realiza la segunda elución de los cartuchos MCX y WAX en el primer protocolo. El método de gradiente utilizado es método sueros 1 (**tabla 4**).



**Figura 20.** Superposición de los cromatogramas de cada patrón disueltos en amoniaco en metanol, medidos por separado utilizando como fase móvil formiato amónico a pH 4 con separación mediante HPLC en gradiente Métodos sueros 1 con detección UV a 260 nm.

En la siguiente tabla (**Tabla 10**), se muestran los patrones con sus tiempos de retención.

Antibióticos	Tiempo de retención (minutos)
GCV	2,79
CFCD	5,05
	11,03
C/T	10,46
MEM	10,73
MVB	10,73
	11,57
IPM/CLN	12,35
TZP	15,01
DAL	18,54
ISC	24,15
	26,85

**Tabla 10.** Tiempos de retención de los antibióticos disueltos en amoniaco/metanol, utilizando como fase móvil formiato amónico a pH 4 con separación mediante HPLC en gradiente Métodos sueros 1 con detección UV a 260 nm.

En las medidas realizadas de los patrones por separado que se han extraído con los cartuchos MAX y WCX durante la segunda elución, no ha eluido ninguno de los patrones, por ello, no se muestran los cromatogramas obtenidos.

Con el objetivo de ver qué antibióticos eluyen en cada cartucho, se prepara una mezcla de todos los patrones a analizar y se pasan por cada uno de los cuatro cartuchos. En el apartado de Anexos (**Figura A.1**) se muestran los resultados de la superposición de los cromatogramas de los patrones disueltos en metanol medidos por separado y el cromatograma en el cual se muestran todos los patrones de antibiótico que aparecen tras el proceso de extracción durante la primera elución en el cartucho WAX medido en UV a 260 nm. En las medidas del resto de cartuchos no se observa ningún antibiótico.

También se muestran en la **tabla 11** los patrones de antibióticos detectados en los cromatogramas obtenidos tras el proceso de extracción en fase sólida utilizando los diferentes cartuchos, dependiendo de sus condiciones ácidas o básicas.

Disolvente: MEOH	PATRONES		CARTUCHOS	
	Antibióticos	Tiempo de retención (min)	Tipo	Tiempo de retención (min)
	CFCD	11,79	WAX	11,77
DAL	18,52	WAX	18,49	

**Tabla 11.** Tabla en la que se muestran los tiempos de retención de los patrones disueltos en metanol y de los patrones que eluyen en cada tipo de cartucho con separación mediante HPLC en gradiente Métodos sueros 1 con detección UV a 260 nm.

Tal y como se ha indicado los patrones GCV, C/T e IPM/CLN disueltos en metanol se separaban mejor utilizando el método de gradiente Método Sueros 3 (**tabla 8**). Por ello es necesario ver de cuáles de estos patrones se obtiene un pico en los cromatogramas obtenidos tras la extracción en fase sólida con los diferentes cartuchos, medidos con este nuevo método. Únicamente se obtiene un pico que corresponde al patrón IPM/CLN el cual eluye en el cartucho WAX, tal y como se puede ver en la superposición de cromatogramas tras el proceso de extracción en ese cartucho y el de los patrones GCV, IPM/CLN y C/T medidos por separado disueltos en metanol, el cual se incluye en el apartado de Anexos en la **figura A.2**. El tiempo de retención al que eluye IPM/CLN se muestra en la **tabla 12**.

Disolvente: MEOH	PATRONES		CARTUCHOS	
	Antibióticos	Tiempos de retención (min)	Tipo	Tiempo de retención (min)
	IPM/CLN	18,91	WAX	18,91

**Tabla 12.** Tabla en la que se muestran los tiempos de retención de los patrones disueltos en metanol y de los patrones que salen en cada tipo de cartucho con separación mediante HPLC en gradiente Métodos sueros 3 con detección UV a 260 nm.

Lo siguiente fue medir las muestras obtenidas para la segunda elución tanto para los cartuchos que se eluyen con 5% de amoniaco en metanol (MCX y WAX) como para los que eluyen con 2% de ácido fórmico en metanol (MAX y WCX).

Para la elución con fórmico en metanol no se obtuvo ningún pico que correspondiera con los patrones medidos, al igual que con la elución en 5% de amoniaco en metanol, por ello, no se incluyen los cromatogramas obtenidos.

También se mide la muestra obtenida tras la segunda elución durante el proceso de extracción en fase sólida utilizando el cartucho MCX pero ahora utilizando las condiciones de gradiente del método sueros 3 indicado en la **tabla 8** para ver si estos patrones eluyen utilizando estas condiciones. La superposición del cromatograma obtenido tras la extracción en fase sólida y de los cromatogramas obtenidos midiendo los patrones GCV, IPM/CLN y C/T disueltos en amoniaco en metanol por separado utilizando el mismo método se incluye en la **Figura A.3** en el apartado de Anexos.

En la **tabla 13** se muestran los tiempos de retención de los patrones que eluyen en los diferentes cartuchos.

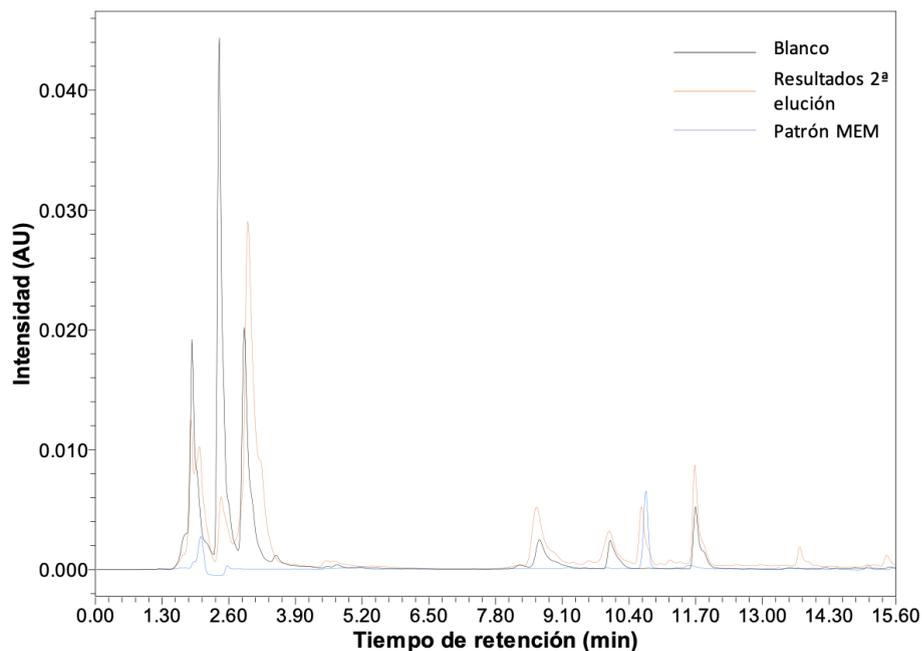
Disolvente: NH3/MEOH	PATRONES		CARTUCHOS	
	Antibióticos	Tiempos de retención (min)	Tipo	Tiempo de retención (min)
	GCV	14,28	MCX	14,38

**Tabla 13.** Tabla en la que se muestran los tiempos de retención de los patrones disueltos en 5% de amoniaco en metanol y de los patrones que salen en cada tipo de cartucho con separación mediante HPLC en gradiente Métodos sueros 3 con detección UV a 260 nm.

Se puede concluir, con estos resultados, que mediante la segunda elución, en la extracción en fase sólida con el cartucho MCX se detecta GCV. Sin embargo, no hemos conseguido que eluyan adecuadamente ni TZP, ni MEM ni MVB. Además, ISC aparece en las medidas realizadas de todos los cartuchos, lo que indica que no queda retenido en ninguno de ellos. Para confirmar en que cartuchos eluyen TZP, MEM y MVB se volvió a hacer el proceso de extracción en fase sólida pasando cada antibiótico por separado por cada uno de los cartuchos. Además, vamos a adicionar mayor concentración, concretamente 100 mg/L en vez de 10 mg/L que es la concentración que hemos adicionado habitualmente.

En el apartado de Anexos (**Figura A.4, A.5, A.6, A.7, A.8**) se muestran los cromatogramas obtenidos en las medidas de la extracción en fase sólida de los diferentes cartuchos para el patrón TZP y para MVB separados con HPLC con métodos sueros 1 de gradiente y detectados con UV a 260 nm.

A continuación, se muestran los cromatogramas (**Figura 21**) obtenidos en las medidas de la extracción en fase sólida de los diferentes cartuchos para el patrón MEM medido con Métodos sueros 1 de gradiente y detectado con UV a 260.



**Figura 21.** Superposición del cromatograma del patrón MEM disuelto en amoníaco/ metanol y cromatograma obtenidos en la extracción en fase sólida durante la segunda elución utilizando el cartucho MCX, medidos por separado utilizando como fase móvil formiato amónico a pH 4 con separación mediante HPLC en gradiente Métodos sueros 1 con detección UV a 260 nm.

Como resultado se obtiene que MEM eluye durante la segunda elución en el cartucho MCX, MVB eluye tanto en MCX como en WAX durante la segunda elución, TZP eluye en el cartucho MCX durante la primera y segunda elución y en el cartucho WAX durante la primera elución.

A continuación, en la **tabla 14 y 15** aparecen los tiempos de retención de MEM, MVB y TZP que nos indican que están presentes en los cartuchos indicados.

Disolvente: MEOH	PATRONES		CARTUCHOS	
	Antibióticos	Tiempo de retención (min)	Tipo	Tiempo de retención (min)
	TZP	15,6	MCX	15,71
		WAX	16,79	
			17,15	

**Tabla 14.** Tabla en la que se muestran los tiempos de retención de los patrones disueltos en metanol y de los patrones que salen en cada tipo de cartucho con separación mediante HPLC en gradiente Métodos sueros 1 con detección UV a 260 nm.

	PATRONES		CARTUCHOS	
	Antibióticos	Tiempo de retención	Tipo	Tiempo de retención
<b>Disolvente: NH<sub>3</sub>/MeOH</b>	MEM	10,75	MCX	10,76
	MVB	10,77	MCX	10,78
		11,57	WAX	11,62
	TZP	13,35	MCX	10,3
		13,8		10,7

**Tabla 15.** Tabla en la que se muestran los tiempos de retención de los patrones disueltos en amoníaco en metanol y de los patrones que salen en cada tipo de cartucho con separación mediante HPLC en gradiente Métodos sueros 1 con detección UV a 260 nm.

Por otro lado, ISC se queda retenido en los cartuchos, por ello, se procede a medirlo realizando como tratamiento de la muestra una precipitación de proteínas con metanol y filtrado, el cual se indica al final del apartado 3.3 de Materiales y método.

La razón por la que ISC se queda retenido en los cartuchos se puede deber a que tal como se muestra en la bibliografía, ISC está altamente unido (>99%) a las proteínas plasmáticas [29] , por ello al realizar el proceso de extracción en fase sólida (SPE) ,mostrado en el apartado 3.3 de materiales y métodos , no eluye el ISC, sin embargo, al realizar el proceso de extracción mediante precipitación de proteínas con metanol, si se puede analizar el antibiótico en el sobrenadante.

### **1.3 Validación del método analítico**

Se tomaron en cuenta los parámetros recomendados por la guía de Food and Drug Administration (FDA) para la validación de los métodos bioanalíticos, en la cual se indica que los parámetros principales de validación son la selectividad, exactitud, precisión, recuperación y linealidad La evaluación de los diferentes parámetros se realizó como se indica a continuación.

Para estudiar la selectividad de la técnica se analizaron 4 blancos de suero, de dos pacientes sin tratamiento antibiótico recogidos en días distintos.

El estudio de la linealidad se realizó preparando cinco rectas de calibrado en el rango de concentraciones desde 1 mg/L a 100 mg/L (1, 2,5,8,10,12,15,18,20,25,40,60,80,100 mg/L) tal y como se muestra en el apartado 2.1 de materiales y métodos. Obtenemos las rectas, el valor de R y R<sup>2</sup> y la desviación estándar relativa (RSD) de la recta.

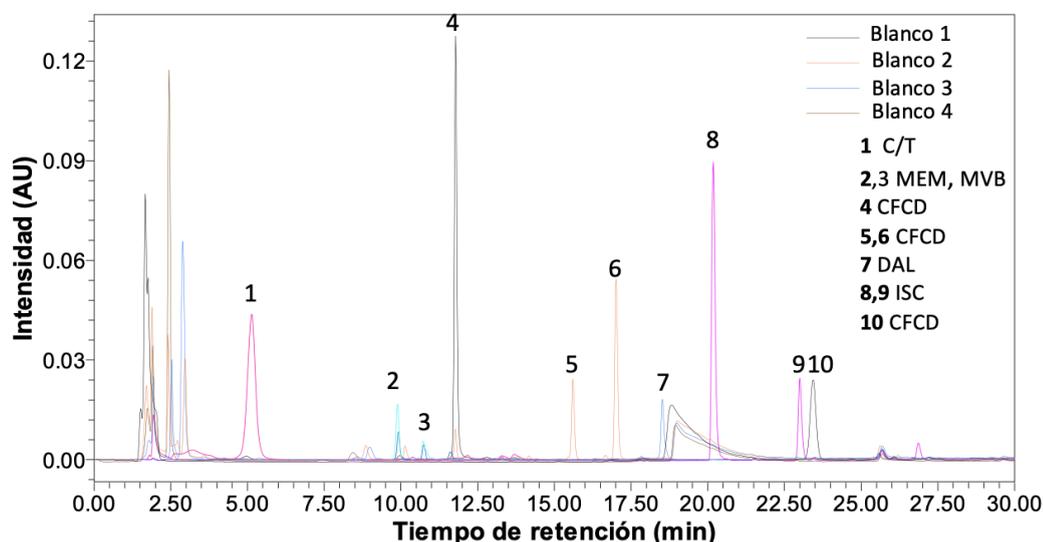
A partir de los datos del estudio de linealidad determinamos la exactitud de la técnica como porcentaje de recuperación tras el proceso de extracción en fase sólida.

En cuanto a la precisión, se estudió la repetibilidad, de forma que la misma persona preparó y analizó tres réplicas de sueros adicionados a concentraciones altas (40 mg/L), concentraciones medias (20 mg/L) y bajas (1mg/L), el mismo día, con los mismos reactivos y con el mismo equipo de medida.

También se calcularon los límites de cuantificación y detección.

Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

En cuanto a la selectividad de la técnica se comprobó analizando 4 blancos de diferentes orígenes, observándose que tal y como se muestra en la **Figura 27**, a los tiempos de retención de los diferentes patrones C/T, MEM, MVB, CFCD, DALy ISC no aparecen picos fantasma correspondientes al blanco de suero.



**Figura 27.** Superposición del cromatograma de cuatro blancos de suero disueltos en metanol y patrones de aguas medidos con método Sueros 1 y con detección en UV a 260 nm.

En cuanto a la precisión se obtienen los valores del porcentaje coeficiente de variación (CV) los cuales se calculan como  $CV = \frac{\text{desviación estándar (s)}}{\text{media aritmética}} \cdot 100$ . Siendo S la desviación estándar de las áreas del pico al tiempo de retención del patrón a cada concentración dividido por la media aritmética de las áreas tomadas de el pico a cada concentración multiplicado por 100. Este valor se calcula para el CFCD y MEM (**Tabla 16**).

Antibiótico		Área pico en 1 mg/L	Área pico en 20 mg/L	Área pico en 40 mg/L
CFCD	Réplica 1	4580	77291	130884
	Réplica 2	4374	79346	172434
	Réplica 3	5545	55816	146111
	Réplica 4	8518	73463	143418
	S	1911,897	10722,79	17458,15
	Media	5754,25	71479	148211,8
	S/media	0,332258	0,150013	0,117792
	CV (%)	33,22583	15,00132	11,7792

<b>MEM</b>	Réplica 1	2118	14668	29146
	Réplica 2	1754	14045	32464
	Réplica 3	2988	27781	53671
	S	634,0547	7756,896	13305,52
	media	2286,667	18831,33	38427
	S/media	0,277283	0,411914	0,346255
	CV (%)	27,72834	41,19143	34,62545

**Tabla 16.** Áreas de los picos obtenidas a bajas, medias y altas concentraciones y coeficientes de variación (CV) calculados para cada concentración.

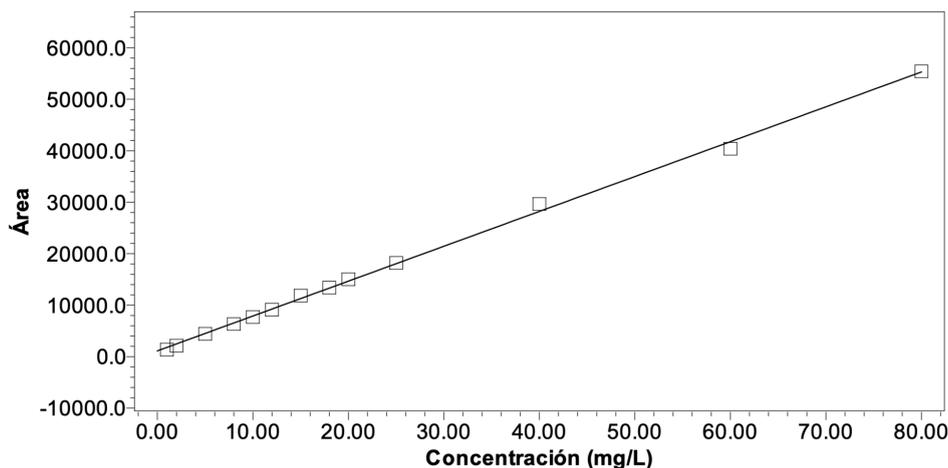
Las rectas obtenidas y los valores del coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ) y la desviación estándar de cada recta (RSD) se muestran en la **tabla 17**.

Antibiótico	Pendiente	Ordenada en el origen	Coefficiente de correlación ( $R^2$ )	Tiempo de retención (minutos)	RSD (%)
<b>ISC</b>	3,7xe2	-1,37xe3	0,990016	26,84	13,519035
<b>GCV</b>	1,16x3	2,97xe02	0,994669	14,30	9,372288
<b>IPM/CLN</b>	3,20xe0	1,05xe2	0,9886	18,875	10,874898
<b>C/T</b>	5,74xe1	-2,79xe2	0,992	15,63	12,616508
<b>CFCD</b>	4,02xe03	-1,77xe03	0,991462	11,75	10,790354
<b>TZP</b>	6,02xe0	1,27xe02	0,992550	15,67	8,103833
<b>MEM</b>	6,77Xe02	1,12xe03	0,998	10,60	4,039566
<b>MVB</b>	1,78Xe01	-3,72xe01	0,9903	11,50	12,655155
<b>DAL</b>	8,84xe01	-5,70xe02	0,99457	18,50	8,559074

**Tabla 17.** Rectas de calibrado obtenidas para cada patrón de sueros, indicando su pendiente, ordenada en el origen, el valor del coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ), el tiempo de retención del pico (TR) y la desviación estándar relativa (RSD) de la recta.

Se obtuvo un buen ajuste lineal con valores de  $R^2 > 0,99$  en casi todos los casos. Seguidamente, se eligieron dos patrones con los que se obtiene un pico con buena resolución e intensidad y se realizaron 5 réplicas de éste de forma representativa y se representó el promedio de las áreas de los picos frente a su concentración. Los patrones elegidos fueron CFCD y MEM.

A continuación, se muestran de forma representativa las rectas de calibrado obtenidas para MEM (**Figura 28**). Algunas de las demás representaciones gráficas de las rectas se adjuntan en el apartado de Anexos (**Figura A.9, A.10, A.11, A.12**).



**Figura 28.** Se realizó una recta de calibrado de MEM utilizando distintas concentraciones disueltas en amoníaco/metanol con separación mediante HPLC en gradiente Métodos sueros 1 con detección UV a 260 nm tal y como se describe en el apartado 2.1 materiales y métodos. Se incluye el tiempo de retención (RT) del pico de MEM el cual es 10,60, sus valores de correlación lineal (R y R2) los cuales son 0,999211 y 0,998422, respectivamente, la ecuación de la recta y la desviación estándar relativa (RSD) de la recta de calibrado la cual es 4,039566.

También se muestra en la **figura A.12** de Anexos la recta de calibrado obtenida para el ISC en metanol. Se han utilizado como puntos de la recta 1, 2, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 25, 40, 60, 80 y 100 mg/L. La recuperación se calcula tras realizar el proceso de extracción con metanol una única vez obteniéndose 74,51%. Es una recuperación alta, sin embargo, en el futuro se medirán más réplicas con el objetivo de que sea un resultado reproducible y preciso.

Para determinar los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) (**tabla 18**) se analizaron 5 blancos preparados para medir las rectas de calibrado de los patrones CFCD y MEM. Se midieron cinco rectas de calibrado de los patrones CFCD y MEM y se calculó el área de los picos del blanco obtenidos en el mismo tiempo de retención que los patrones. Con la pendiente, la ordenada en el origen de cada recta y el área de cada blanco se calculó la incertidumbre de la concentración del blanco (s concentración blanco) que permitió junto con las fórmulas que se indican a continuación, calcular estos límites.

$$LOD = \frac{3 \times S_{blanco}}{pendiente} \quad LOQ = \frac{10 \times S_{blanco}}{pendiente}$$

siendo m la pendiente de la recta de calibrado y  $S_{blanco}$  la desviación estándar de la señal analítica de los diferentes blancos.

Antibiótico	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Sensibilidad (pendiente curva de calibración)
CFCD	9,789	32,632	4.526

<b>MEM</b>	2,879772149	9,599240495	677
------------	-------------	-------------	-----

**Tabla 18.** Límites de detección y cuantificación y sensibilidad obtenidas para CFCD y MEM.

También se calcularon las recuperaciones obtenidas tras el proceso de extracción en fase sólida (SPE), con el objetivo de ver si el proceso de extracción es robusto, viendo si las recuperaciones obtenidas son siempre similares. Además, sabiendo la recuperación se podrá aplicar un factor de corrección al medir las muestras.

Teniendo en cuenta que se han hecho diluciones con un factor de dilución 1 y se han calculado las recuperaciones por triplicado para MEM y CFCD. En la **tabla 19** se muestran las acciones realizadas tras el proceso de extracción en fase sólida del patrón CFCD y MEM, el área de sus picos, el porcentaje medio de recuperación y la incertidumbre de las recuperaciones.

<b>Antibiótico</b>	<b>Adición (mg/L)</b>	<b>Área</b>	<b>Recuperación (%)</b>	<b>Recuperación media (%)</b>	<b>Incertidumbre de las recuperaciones</b>
<b>CFCD réplica 1</b>	100	220229	55,22	53,6	4,70
<b>CFCD réplica 2</b>	100	228522	57,28		
<b>CFCD réplica 3</b>	100	192396	48,3		
<b>MEM réplica 1</b>	100	39438	56,60	52,66	5,39
<b>MEM réplica 2</b>	100	38267	54,87		
<b>MEM réplica 3</b>	100	32606	46,51		

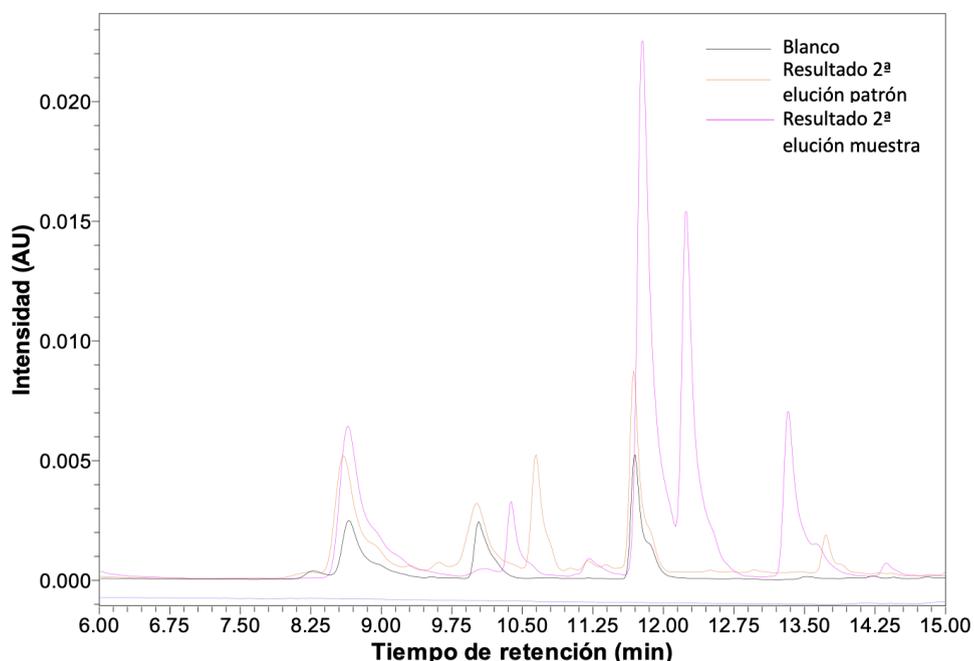
**Tabla 19.** Áreas obtenidas de los picos detectados para MEM y CFCD y % de recuperación obtenidas tras el proceso de extracción en fase sólida. También se indica la incertidumbre de todas las medidas de recuperación.

#### 1.4 Análisis de muestras en pacientes

Se midieron muestras de dos pacientes diferentes que sufrían alguna enfermedad infecciosa, a los cuales se les había administrado 1 gramo de meropenem (MEM). Se recogieron dos muestras para cada paciente; una en valle, la cual se toma justo antes de administrar la siguiente dosis y otra en pico, la cual se toma 30 minutos después del fin de la administración del meropenem. Es importante destacar que a los pacientes se les llevaba administrando seis días el antibiótico antes de coger las muestras analizadas y varios antibióticos simultáneos.

Para ambas muestras, se realizó el proceso de preparación de muestra, tal como se indica en el apartado 2.3 de materiales y métodos. Tal y como se muestra en la **Figura 28**, el MEM

eluye durante la segunda elución en el cartucho MCX, es por ello, que el proceso de preparación de las muestras de los dos pacientes se realizará de la misma forma. En la **Figura 28** se muestra la superposición del cromatograma obtenido para tras el proceso de SPE para el patrón de meropenem y el cromatograma obtenido tras SPE de la muestra pico del primer paciente.



**Figura 28.** Superposición del cromatograma obtenido tras el proceso de SPE para el patrón de meropenem y el cromatograma obtenido tras SPE de la muestra pico del primer paciente. Ambas obtenidas durante la segunda elución del cartucho MCX y detectadas mediante UV a 260 nm.

Se procede a calcular la concentración obtenida de cada patrón en las muestras séricas de pacientes tras el proceso de extracción en fase sólida el cual se presenta en la **tabla 20**. El proceso de extracción se realiza para dos réplicas de la muestra valle y de pico para el paciente 1 y una réplica para el paciente 2. Para ello, se interpola el valor del área del pico de cada patrón en su recta y se calcula el valor de x. Las ecuaciones se muestran en la **tabla 17**.

	Muestra	Número de réplica	Área	Concentración calculada (mg/L)
<b>Paciente 1</b>	Valle	1	2019	1,32
		2	1122	0,0029
	Pico	1	18435	25,57
		2	18889	26,24
<b>Paciente 2</b>	Valle	1	129	Por debajo del LOQ
	Pico		11266	14,98

**Tabla 20.** Área y concentración obtenida de las muestras en valle y pico recogidas en dos pacientes.

Teniendo en cuenta que los resultados de recuperación obtenida tras el proceso de SPE para las tres réplicas de MEM que se muestran en la **tabla 19**, presentan un % de error de repetibilidad menor del 20%, tal como indica la FDA, se interpreta que es reproducible siempre que se mida siguiendo ese proceso de extracción. Por ello, se puede tomar como factor de corrección el porcentaje que obtenemos al restar al 100% de recuperación ideal el % de recuperación obtenido, el cual es 52,66%, obteniendo así 47,34%. Por lo tanto para las concentraciones pico de la primera réplica del paciente 1 se obtiene 25,57 mg/L, que aplicando el factor de corrección será de 48,55 mg/L y para la segunda réplica se obtiene 49,82 mg/L. Para el paciente 2 se obtiene 28,44 mg/L.

Tal como se muestra en la bibliografía, las concentraciones mínimas totales por encima de 8,0 mg/L para meropenem se definieron como los puntos de corte (concentraciones a las que las bacterias son susceptibles a un tratamiento exitoso con un antibiótico) para alcanzar el objetivo terapéutico [27]. Esto quiere decir que en las muestras séricas de los pacientes analizados se obtienen concentraciones de MEM por encima de 8 mg/L, alcanzando la concentración mínima objetivo.

Los valores analíticos obtenidos se comparan con los valores establecidos por la FDA (Food and Drug Administration) y con valores obtenidos en estudios previos en la bibliografía.

- En cuanto a la **linealidad**, se puede estudiar con los valores de coeficiente de correlación lineal. En mi caso se obtienen resultados similares que tal como establece la FDA muestran  $R^2 > 0,99$ . En estudios previos se obtuvo un  $R^2 > 0,999$  y un rango lineal para MEM entre 0,05 y 100 mg/L y para CFCD de  $R^2 > 0,999$ .
- En cuanto a la **precisión**, la FDA establece que el valor de CV (%) no debe ser mayor del 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que el 20%. En el caso de antibióticos de análisis en sueros, para CFCD el método es preciso a medias concentraciones (12mg/L) y a altas concentraciones (20 mg/L). Para MEM es necesario optimizar la precisión en el futuro. En un estudio previo se obtuvo para concentraciones bajas (1 mg/L) una CV (%) de 2,02, para concentraciones medias (25 mg/L) de 1,74 y para altas concentraciones (50 mg/L) de 1,21 [30]. Lo que indica que es necesario optimizar las precisiones obtenidas. Para CFCD se obtuvo para bajas, medias y altas concentraciones 1,3%, 0,4% y 0,6%, respectivamente [31].
- En cuanto a la **exactitud**, se obtienen recuperaciones medias para los antibióticos y con % de error de repetibilidad de las tres réplicas menores del 20% que establece la FDA para el caso del MEM y CFCD. Esto indica que cuando se midan las muestras de pacientes se podrá aplicar un factor de corrección para todas ellas. En un estudio previo se obtuvo que la recuperación de meropenem con una concentración de 100 mg/L fue de 92,6 % con una desviación estándar de 0,5%.
- En cuanto a la especificidad/selectividad, podemos ver en la figura 27 que es posible medir adecuadamente el analito de interés sin interferencias de otros compuestos ya que no hay interferencias significativas en los tiempos de retención de los antibióticos de interés.
- En cuanto a los límites de detección (LOD), comparando con estudios previos, para MEM se obtuvo 0.01 mg/L y para CFCD 16,66 mg/L [31].

- En cuanto a los límites de cuantificación (LOQ), comparando con estudios previos, para MEM se obtuvo 0.05 mg/L y para CFCD 5 mg/L [33].

## 2. Análisis en aguas residuales:

El análisis de aguas residuales está en auge ya que cada vez se están realizando más estudios de detección de contaminantes o sustancias de desecho que pueden dar información acerca de los niveles de estos componentes y de cómo afectan a la contaminación de fauna y flora y seres humanos.

Para ello, se va a utilizar la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

### 2.1 *Optimización de las condiciones cromatográficas.*

En primer lugar se trató de desarrollar un método cromatográfico adecuado para separar patrones de diferentes familias de antibióticos, concretamente, fluoroquinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas.

A continuación se muestran algunos de los métodos desarrollados para realizar las pruebas de separación, los cuales fueron utilizados posteriormente para medir los patrones (**tabla 21 y 22**).

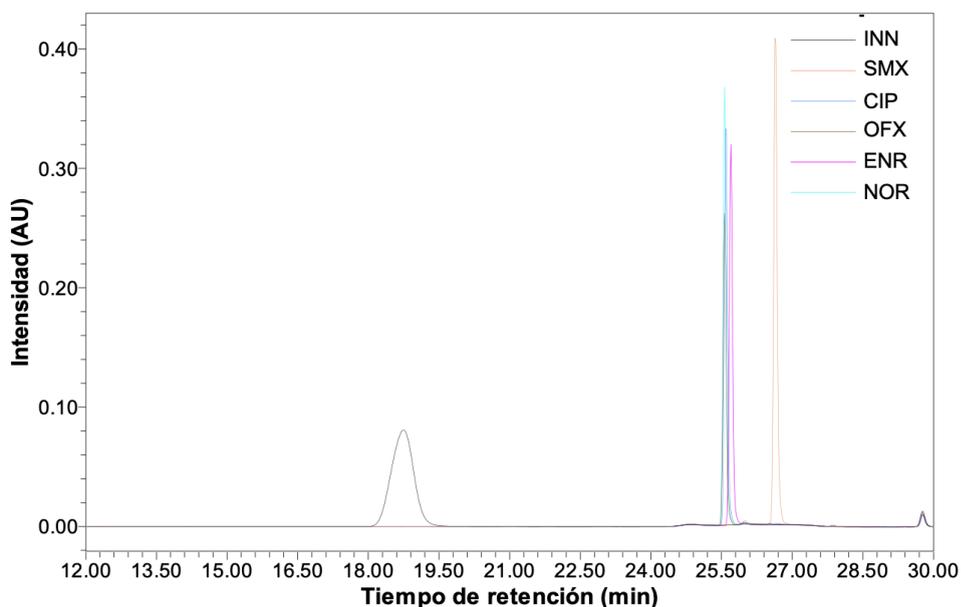
Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Velocidad de flujo (mL/min)
0	5	95	1
21,60	5	95	1
25,20	70	30	1
36	70	30	1
36,70	100	0	1
37,40	5	95	1
43,20	5	95	1

**Tabla 21.** Condiciones de los gradientes del Método Aguas 1 con fase móvil acuosa y orgánica con acetonitrilo. Siendo solvente A acetonitrilo y solvente B agua.

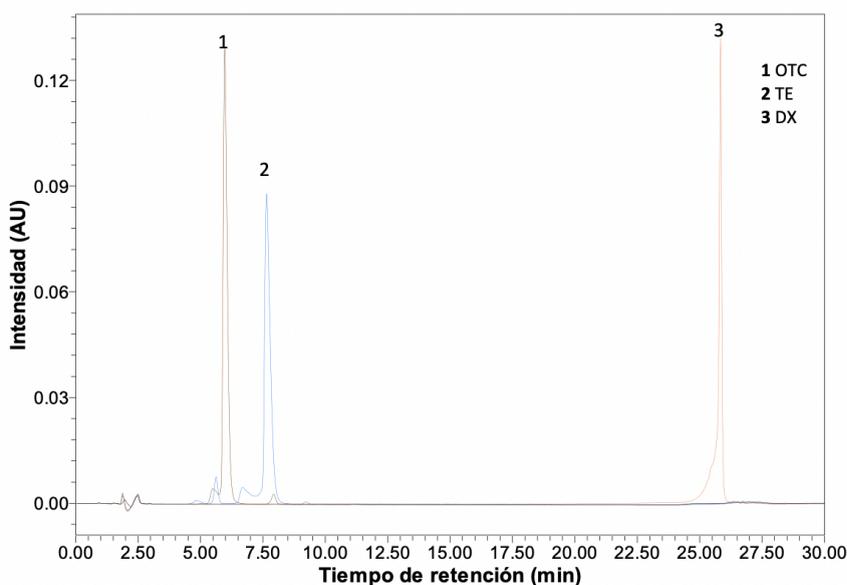
Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Velocidad de flujo (mL/min)
0	15	85	1
21,60	15	85	1
25,20	50	50	1
36	50	50	1
40	70	30	1
51	70	30	1
52	100	0	1
53	5	95	1
59	5	95	1

**Tabla 22.** Condiciones de los gradientes del Método Aguas 4 con fase móvil acuosa y orgánica con acetonitrilo. Siendo solvente A acetonitrilo y solvente B agua

Se encontró que las fluoroquinolonas CIP, OFX, ENR y NOR y las sulfonamidas SMX e INN se separan y tienen mejor resolución con el Método Aguas 1. Sin embargo, las tetraciclinas TE, DX, OTC y CTC lo hacen mejor con el Método Aguas 4. A continuación, se muestran los cromatogramas de las tetraciclinas medidas a 254 nm (**Figura 29**) y de las sulfonamidas y fluoroquinolonas medidas también a 254 nm (**Figura 28**).



**Figura 28.** Superposición de los cromatogramas de cada patrón de fluoroquinolonas y sulfonamidas disueltos en fase móvil (5% acetonitrilo y 95% agua), medidos por separado utilizando como fase móvil una fase acuosa y otra orgánica (Acetonitrilo ) con separación mediante HPLC en gradiente Método Aguas 1 con detección UV a 254 nm.



**Figura 29.** Superposición de los cromatogramas de cada patrón de tetraciclinas disueltos en fase móvil (15% acetonitrilo y 85% agua), medidos por separado utilizando como fase móvil una fase

acuosa y otra orgánica (Acetonitrilo ) con separación mediante HPLC en gradiente Método Aguas 4 con detección UV a 254 nm.

En la **tabla 23** se muestran los antibióticos detectados en los cromatogramas de las **figuras 28 y 29** y los tiempos de retención a los que eluyen.

Antibióticos	Tiempo de retención (minutos)
OTC	5,97
TE	7,65
INN	18,74
ENR	25,47
NOR	25,57
CIP	25,58
DX	25,92
OFX	25,6
SMX	26,75

**Tabla 23.** Tiempos de retención de las tetraciclinas disueltas en fase móvil (15% acetonitrilo y 85% agua), medidos utilizando como fase móvil una fase acuosa y otra orgánica (Acetonitrilo) con separación mediante HPLC en gradiente Método Aguas 4 con detección UV a 260 nm y de sulfonamidas y fluoroquinolonas disueltas en fase móvil (5% acetonitrilo y 95% agua), medidos utilizando como fase móvil una fase acuosa y otra orgánica (Acetonitrilo) con con separación mediante HPLC en gradiente Método Aguas 1 con detección UV a 260 nm.

Se observó que las familias de las fluoroquinolonas y las tetraciclinas se separaban peor, por ello se probó a medir las siguientes mezclas: Mezcla de fluoroquinolonas (OFX, NOR, ENR y CIP), mezcla de fluoroquinolonas (OFX, NOR, ENR y CIP) y sulfonamidas ( SMX e INN), mezcla de sulfonamidas (SMX e INN), mezcla de tetraciclinas ( TE, OTC,CTC, DX).

En el apartado de Anexos se muestran los cromatogramas obtenidos para las mezclas de Fluoroquinolonas y sulfonamidas (**Figura A.13 de Anexos**) y para la mezcla de Tetraciclinas (**Figura A.14 de Anexos**). Se separan todos los antibióticos en ambos cromatogramas excepto la familia de las fluoroquinolonas, las cuales aparecen superpuestas desde un tiempo de retención de 25,50 hasta 26 minutos.

Debido a que los picos no se separan adecuadamente, se procede a modificar el gradiente inicial, intentando aumentar el % de fase orgánica más lentamente (**Tabla A.1, A.2, A.3 de Anexos**).

Sin embargo, no observamos una separación adecuada de los picos. Por ello, probamos a medir con fase móvil tamponada a pH 4 con formiato amónico, la misma que se utiliza para medir los sueros. Inicialmente probamos a medir con el método que se muestra en **Tabla A.4 en el apartado de Anexos**.

En la **Figura A.15 de Anexos** se muestra el cromatograma obtenido en la medida de todos los patrones utilizando como fase móvil formiato amónico a pH 4. Como resultado se obtiene la separación de algunos de los antibióticos como INN, OTC, DX y SMX.

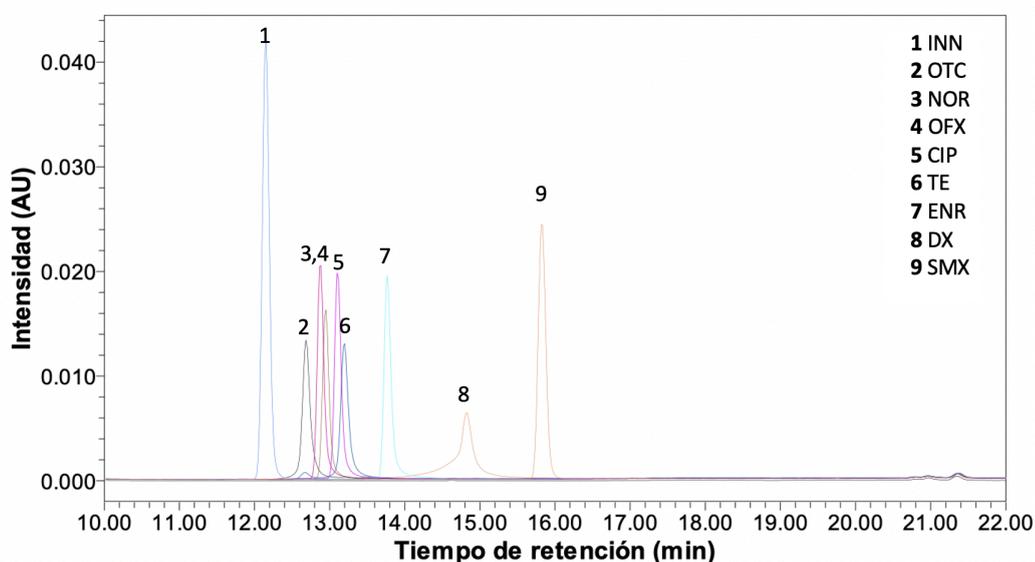
Sin embargo, no es muy buena la separación, por ello se crea otro método (**Tabla 24**), modificando el gradiente. Como vemos que los picos que no se separan eluyen entre 12,80 y 13,80, lo que hacemos es aumentar el porcentaje de acetonitrilo más lentamente, en vez

de subir directamente al 100%, para que se produzca la elución de estos antibióticos más lentamente.

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente D (%)	Velocidad de flujo (mL/min)
0	5	95	1
5	5	95	1
25	74	26	1
35	100	0	1
40	100	0	1
45	5	95	1
55	5	95	1

**Tabla 24.** Condiciones de los gradientes del Método Aguas 7 con fase móvil tamponada con formiato amónico a pH 4. Siendo solvente A acetonitrilo y solvente D formiato amónico.

Finalmente se obtiene el cromatograma de la **Figura 30** sin cambios significativos con respecto al cromatograma anterior, en el cual se puede concluir que se consiguen separar varios picos como los correspondientes a SMX, INN, OTC, ENR y DX. Sin embargo, los picos correspondientes a CIP, TE, OFX y NOR no se separan y eluyen desde un tiempo de retención de 14,60 hasta 15,20 minutos. Por ello, estos antibióticos que no se separan se detectarán juntos en las muestras de aguas residuales medidas posteriormente.



**Figura 30.** Superposición de los cromatogramas de los patrones de antibióticos disueltos en fase móvil con formiato amónico a pH 4 con separación mediante HPLC en gradiente Método Aguas 7 con detección UV a 260 nm.

En la **tabla 25** se muestran los antibióticos detectados en el cromatograma de las **figura 30** y los tiempos de retención a los que eluyen.

Antibióticos	Tiempo de retención (minutos)
INN	12,14
OTC	12,67
NOR	12,87
OFX	12,92
CIP	13,09
TE	13,17
ENR	13,75
DX	14,80
SMX	15,81

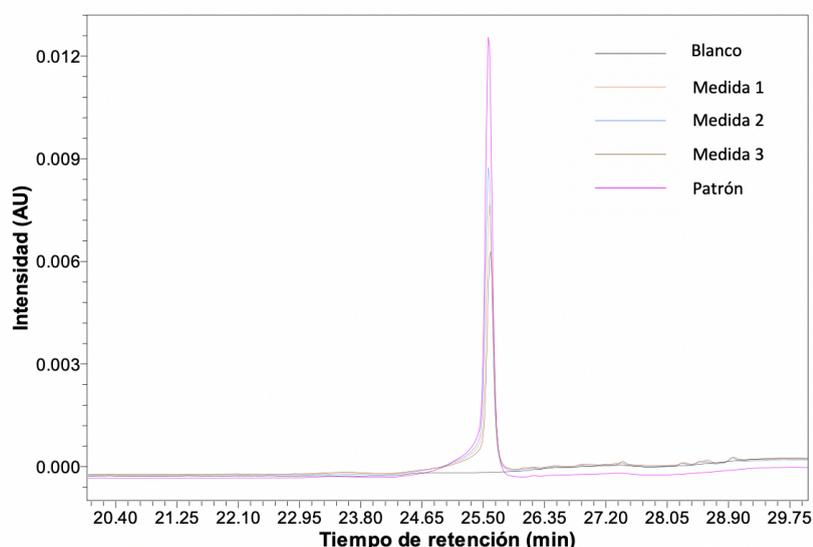
**Tabla 25.** Tiempos de retención de las las tetraciclinas, sulfonamidas y fluoroquinolonas disueltas en fase móvil tamponada con formiato amónico a pH 4 con separación mediante HPLC en gradiente Método Aguas 7 con detección UV a 260 nm.

## 2.2 Preparación de la muestra.

Previamente al análisis de las muestras por cromatografía líquida es necesario realizar una preparación mediante un proceso de extracción en fase sólida, ya que las muestras de aguas residuales presentan una baja concentración de antibióticos, por lo que es necesario para que el equipo pueda detectarlo, concentrar lo máximo posible el analito de interés.

Para ello se dispone de unos cartuchos Oasis HLB, funcionalizados con un adsorbente polimérico, a través de los cuales se pasa la muestra y se eluye el analito de interés tal y como se muestra en el apartado 4.4 de materiales y método. El proceso se realiza primero para cada antibiótico por separado (patrones) y posteriormente para las muestras de aguas residuales.

A continuación, se incluye el cromatograma obtenido tras medir lo obtenido tras el proceso de extracción con el cartucho Oasis HLB del antibiótico DX (**Figura 31**). Las muestras obtenidas tras el proceso de extracción con los cartuchos de las fluoroquinolonas y sulfonamidas se miden con el Método Aguas 1, mientras que los de las tetraciclinas se miden con el Método Aguas 4.

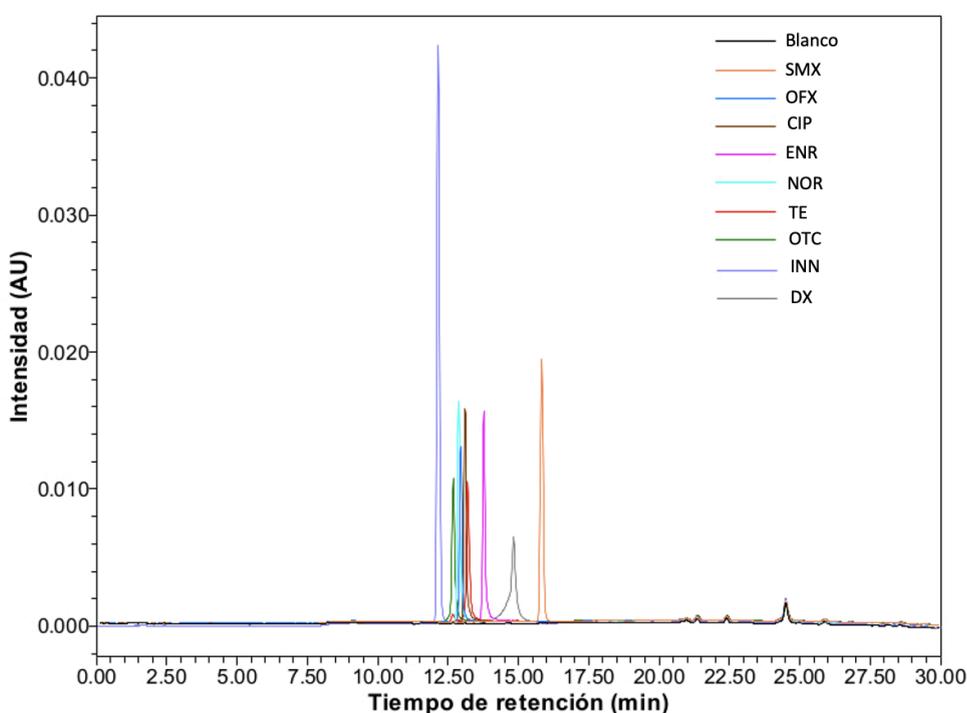


**Figura 31.** Superposición de cromatograma obtenidos al medir tres réplicas de DX tras su extracción con el cartucho Oasis HLB y el cromatograma del patrón DX con una concentración de 10 mg/L, y separación mediante HPLC con detección UV a 254 nm tal y como se describe en el apartado 4.4 de materiales y métodos.

### 2.3 Análisis de muestras de aguas residuales

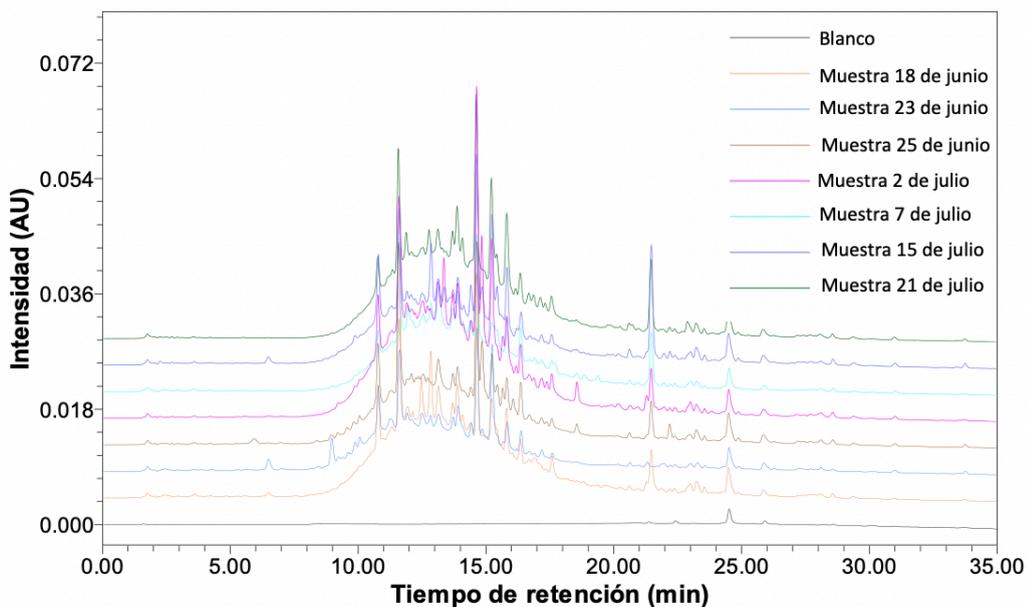
Respecto a las muestras de aguas residuales que vamos a medir son del barrio de la Bombarda, recogidas los días 18, 23 y 25 de junio y 2,7,15,21 y 25 de julio del año 2020. Para su preparación se realiza una extracción en fase sólida utilizando cartuchos, tal y como se indica en el apartado **4.4 de materiales y métodos**. Se realizan medidas con las condiciones de gradiente de los métodos indicados anteriormente, pero como no se aprecia una buena separación, se procede a medir con método Aguas 7 (**Tabla 24**) utilizando fase móvil tamponada a pH 4 con formiato amónico al igual que en sueros.

En primer lugar, se muestra el cromatograma (**Figura 32**) con los patrones de aguas residuales medidos con la fase móvil tamponada con formiato amónico a pH 4.

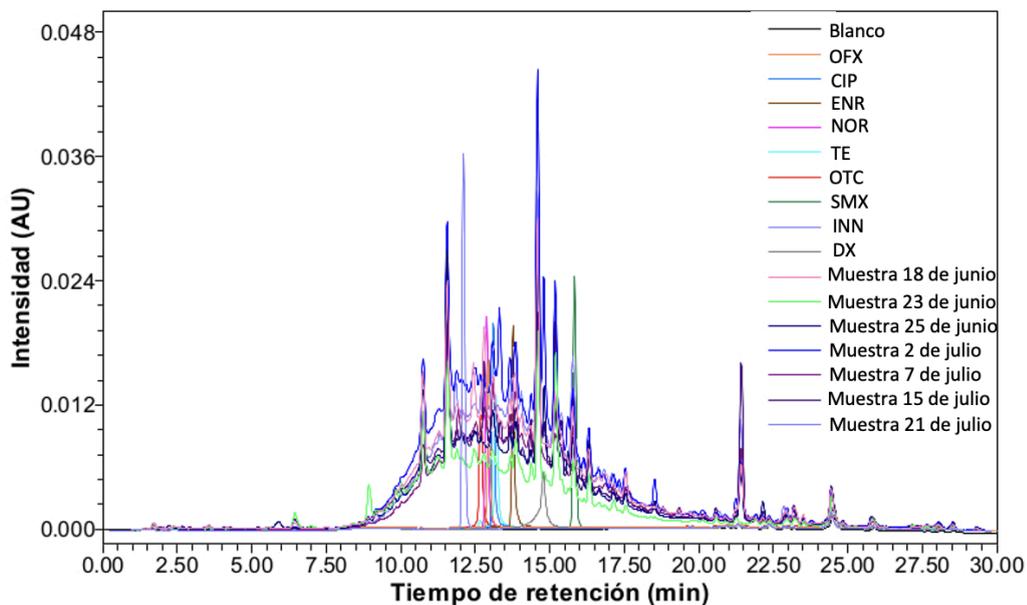


**Figura 32.** Superposición de los cromatogramas de cada patrón disueltos en fase móvil con formiato amónico a pH 4, medidos por separado utilizando como fase móvil formiato amónico a pH 4 con separación mediante HPLC en gradiente Método Aguas 7 con detección UV a 254.

A continuación, se muestra la superposición de los cromatogramas obtenidos de las muestras de aguas residuales (**Figura 33**) tras el proceso de extracción con los cartuchos Oasis HLB. También se incluye la superposición de cromatogramas de todas las muestras de aguas residuales tras el proceso de extracción y los cromatogramas con los patrones medidos por separado (**Figura 34**), disueltos en fase móvil tamponada a pH 4.

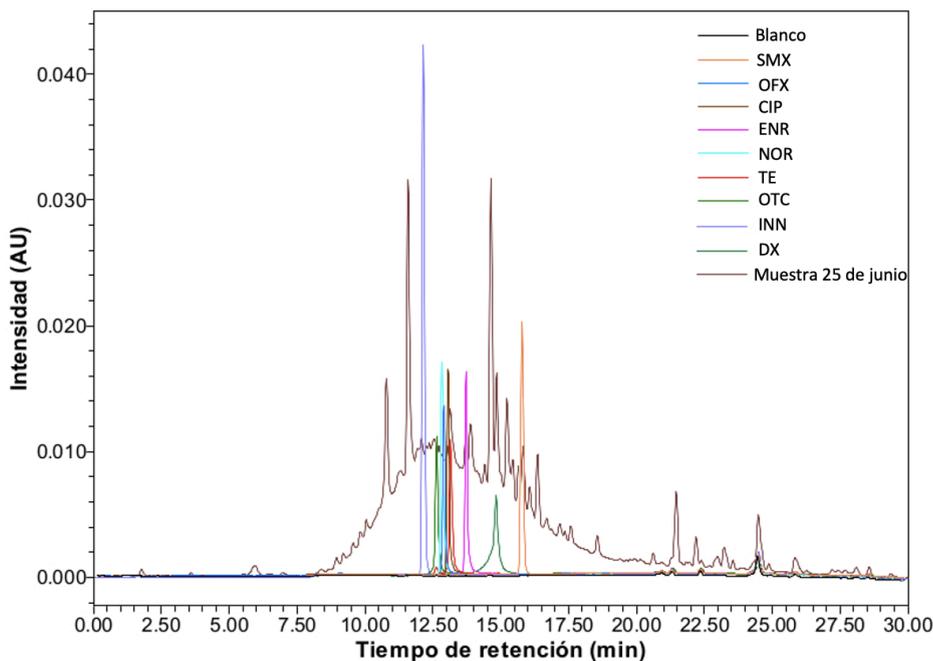


**Figura 33.** Superposición de cromatogramas obtenidos de las muestras de aguas residuales de la Bombarda recogidas en junio y julio, tras su extracción con el cartucho Oasis HLB y separación mediante HPLC con detección UV a 254 nm tal y como se describe en el apartado 4.4 de materiales y métodos.



**Figura 34.** Superposición de cromatogramas obtenidos de las muestras de aguas residuales de la Bombarda recogidas en junio y julio, tras su extracción con el cartucho Oasis HLB y los cromatogramas de los patrones medidos por separado con detección UV a 254 nm tal y como se describe en el apartado 4.4 de materiales y métodos.

También se muestra la superposición del cromatograma obtenido tras el proceso de extracción de las aguas residuales recogidas el 25 de junio de 2020 y los cromatogramas en los que aparecen los patrones medidos por separado (**Figura 35**).



**Figura 35.** Superposición de cromatogramas obtenidos de la muestra de aguas residuales de la Bombarda recogidas el 25 de junio, tras su extracción con el cartucho Oasis HLB y los cromatogramas de los patrones medidos por separado con detección UV a 254 nm tal y como se describe en el apartado 4.4 de materiales y métodos.

En los cromatogramas de los patrones de aguas residuales superpuestos con las muestras se identifica a un tiempo de retención de 15,85 minutos la presencia del antibiótico SMX, a 14,86 minutos DX, a 12,89 minutos una mezcla de NOR y OFX y a 13,11 minutos una mezcla de CIP y TE. Se procede a calcular la concentración obtenida de cada patrón en las muestras de aguas residuales tras el proceso de extracción en fase sólida el cual se presenta en la **tabla 26**. Para ello, se interpola el valor del área del pico de cada patrón en su recta y se calcula el valor de x, seguidamente se multiplica por el factor de dilución que es 0,01.

	Antibiótico	Tiempo de retención (min)	Área	Concentración calculada (mg/L)
<b>Bombarda 18/6/2020</b>	OFX y NOR	12,89	68624	0,0557
	CIP y TE	13,11	34632	0,0309
	SMX	15,81	36148	0,0286
<b>Bombarda 23/6/2020</b>	OFX y NOR	12,89	6863	8,59E-01
	CIP y TE	13,11	15535	0,0152
	DX	14,86	2797	0,0042

	SMX	15,81	21233	0,0185
<b>Bombarda 25/6/2020</b>	CIP y TE	13,11	23239	0,0215
	DX	14,86	39731	0,0361
	SMX	15,81	17379	0,0159
<b>Bombarda 2/7/2020</b>	CIP y TE	13,11	32794	0,0294
	DX	14,86	72768	0,0646
	SMX	15,81	27881	0,0230
<b>Bombarda 7/7/2020</b>	OFX y NOR	12,89	14316	0,0143
	CIP y TE	13,11	48555	0,0425
	SMX	15,81	33453	0,0268
<b>Bombarda 15/7/2020</b>	OFX y NOR	12,89	57119	0,0470
	CIP y TE	13,11	27185	0,0248
	DX	14,86	17668	0,0171
	SMX	15,81	54096	0,0407
<b>Bombarda 21/7/2020</b>	CIP y TE	13,11	22011	0,0205
	DX	14,86	1665	0,0033
	SMX	15,81	88496	0,0640

**Tabla 26.** Áreas de los picos correspondientes a patrones en las muestras recogidas en el barrio de la bomba durante los meses de junio y julio de 2020.

Se puede concluir que en todas las muestras se encuentra presente SMX con concentraciones que en general aumentan en el tiempo, sin embargo, para el resto de antibióticos hay más variaciones a lo largo de los días de recogida. En un estudio realizado por investigadores con el objetivo de detectar diferentes antibióticos en aguas residuales recogidas con origen doméstico y hospitalario en un municipio rural de Francia, se encontró que los antibióticos más frecuentemente detectados eran las fluoroquinolonas (79-100%), sulfonamidas (86-100%) y macrólidos (79-86%). Algunas moléculas como sulfametoxazol

indican que mostraron concentraciones más altas después del tratamiento de aguas residuales debido a la desconjugación de sus metabolitos, lo que restaura las moléculas originales. Los fluoroquinolonas OFX, NOR y CIP y la sulfonamida SMX se detectaron en casi todas las muestras con una concentración muy superior a 1 µg/L, llegando hasta 20 µg/L, sin embargo, tetraciclina TE fue encontrado en concentraciones más bajas desde unos ciento de ng/L hasta unos pocos µg/L. Fluoroquinolonas como ENR no fueron detectadas en entornos hospitalarios [32]. En otro estudio en el que se recogieron muestras de aguas residuales en el hospital de Kalmar, en Suecia, se recogieron las muestras siete veces en un periodo de 13 horas y observaron grandes variaciones en las concentraciones entre las diferentes veces que se tomaron las muestras. Se cree que esto es debido a que la estrategia de muestreo (cuándo y con qué frecuencia se toman las muestras) tiene una influencia muy fuerte en los resultados obtenidos en este tipo de investigación, pudiendo así obtener resultados fiables y reproducibles [33].

#### **2.4 Validación del método analítico**

Se tomaron en cuenta los parámetros recomendados por la guía de Food and Drug Administration (FDA) para la validación de los métodos bioanalíticos, en la cual se indica que los parámetros principales de validación son la selectividad, exactitud, precisión, recuperación y linealidad. La evaluación de los diferentes parámetros se realizó como se indica a continuación.

El estudio de la linealidad se realizó preparando tres rectas de calibrado con los estándares en el rango de concentraciones desde 1 mg/L a 20 mg/L (1,2,5,8,10,12,15,18,20 mg/L), tal y como se muestra en el apartado 2.1 de materiales y métodos. Obtenemos las rectas, el valor de R y R<sup>2</sup> y la desviación estándar relativa (RSD) de la recta.

Para estudiar la selectividad de la técnica se analizaron 6 blancos de suero de dos pacientes no sometidos a terapia con antibióticos adicionados, recogidos en días distintos.

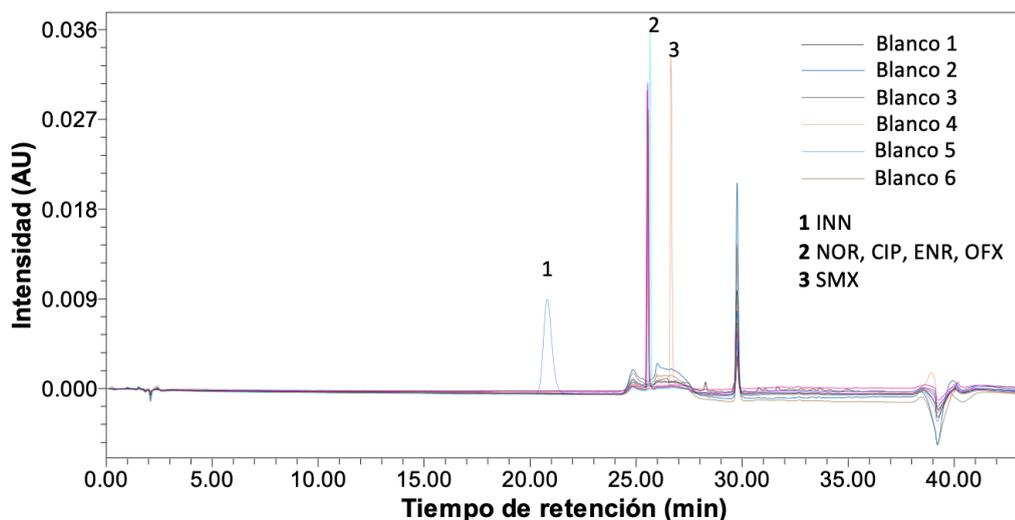
A partir de los datos del estudio de linealidad determinamos la exactitud de la técnica como porcentaje de recuperación tras el proceso de extracción en fase sólida. Las recuperaciones fueron calculadas obteniendo el área de los picos de los patrones en el tiempo de retención al que eluyen y llevándola a la ecuación de la recta de calibrado. Así se obtiene x que multiplicado por el factor de dilución, el cual es 100, será la recuperación obtenida del método.

En cuanto a la precisión, se estudió la repetibilidad, de forma que la misma persona preparó y analizó tres réplicas de sueros adicionados a concentraciones altas (20 mg/L), concentraciones medias (12 mg/L) y bajas (1mg/L), el mismo día, con los mismos reactivos y con el mismo equipo de medida.

También se calcularon los límites de cuantificación y detección.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

En cuanto a la selectividad de la técnica se comprobó analizando 6 blancos de diferentes orígenes, observándose que tal y como se muestra en la **Figura 35**, a los tiempos de retención de los patrones OFX, NOR, ENR, CIP, SMX e INN no aparecen picos fantasma correspondientes al blanco.



**Figura 35.** Superposición del cromatograma de seis blancos disueltos en fase móvil (5% acetonitrilo y 95% agua) y patrones de aguas (sulfonamidas y fluoroquinolonas) con separación mediante HPLC en gradiente Métodos Aguas 1 con detección UV a 254 nm.

En cuanto a la precisión se obtienen los valores de igual forma que lo indicado en el apartado 1.3 de sueros. En este caso se calcula el valor de CV (%) para SMX y NOR y se toman tres réplicas para SMX y 2 réplicas para NOR a cada concentración. Estos valores se muestran en la **tabla 27**.

Antibiótico		Área pico en 1 mg/L	Área pico en 12 mg/L	Área pico en 40 mg/L
SMX	Réplica 1	9371	58992	148063
	Réplica 2	9921	164072	289635
	Réplica 3	8484	73594	202993
	S	725,0560898	56922,89125	71375,50029
	Media	9258,666667	98886	213563,6667
	S/media	0,07831107	0,575641559	0,334211813
	CV (%)	7,831106961	57,56415594	33,42118133
NOR	Réplica 1	6869	202859	288563
	Réplica 2	6764	163329	144135
	S	74,24621202	27951,93106	102126,0182
	media	6816,5	183094	216349
	S/media	0,010892131	0,152664375	0,472042941
	CV (%)	1,089213116	15,26643749	47,20429408

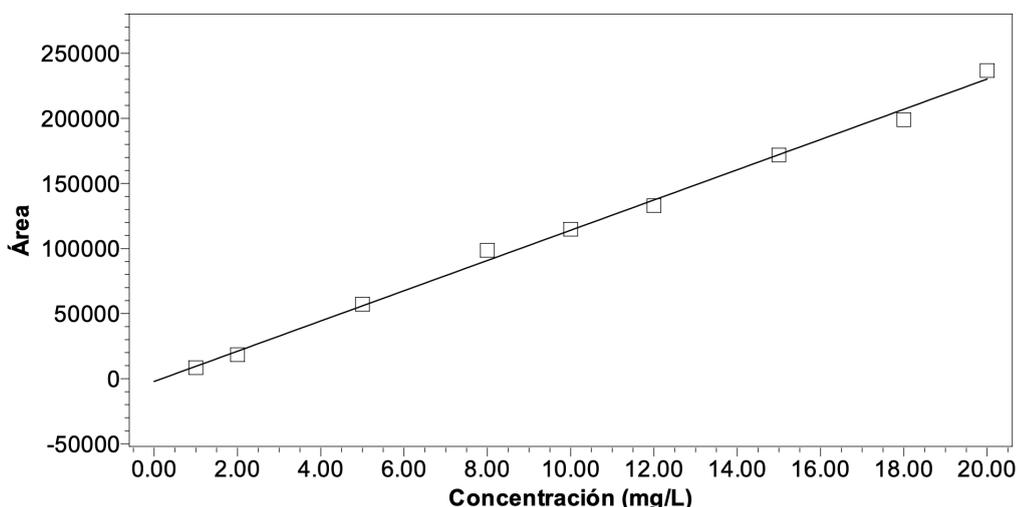
**Tabla 27.** Áreas de los picos obtenidas a bajas, medias y altas concentraciones y coeficientes de variación (CV) calculados para cada concentración.

Respecto a la linealidad, se obtiene una recta de calibrado para cada antibiótico, de las cuales se muestran en la **tabla 28** la ordenada en el origen, la pendiente y el valor del coeficiente de correlación ( $R^2$ ) en la tabla mostrada a continuación.

Antibiótico	Pendiente	Ordenada en el origen	Coefficiente de correlación ( $R^2$ )	RT (minutos)	RSD
OFX	1,31e4	-4,39xe3	0,992	25,59	6,682499
NOR	1,69e4	-4,96e3	0,997	25,53	4,43
ENR	1,39e4	+2,62E03	0,9930	25,66	6,072672
CIP	1,45e4	-1,34e4	0,9967	25,56	4,468343
INN	2,98e4	-7,36e3	0,993	21,8	8,704725
TE	1,21e4	-2,81e3	0,9957	7,84	6,249043
SMX	1,04e4	4,11e3	0,998	26,64	3,615609
OTC	1,44e4	-6,17e3	0,993	6,07	6,576902
DX	1,16e0,4	-2,14e3	0,996	25,84	4,607280

**Tabla 28.** Rectas de calibrado obtenidas para cada patrón de aguas residuales, indicando su pendiente, ordenada en el origen, el valor del coeficiente de correlación lineal, el tiempo de retención del pico (TR) y la desviación estándar relativa (RSD) de la recta.

A continuación, se muestra de forma representativa la recta de calibrado obtenida para el patrón DX (**Figura 36**). El resto de representaciones gráficas de las rectas se adjuntan en anexos (**Figura A.16-A.22**).



**Figura 36.** Se realizó una recta de calibrado de DX utilizando distintas concentraciones disueltas en fase móvil (15% acetonitrilo y 85% agua) con separación mediante HPLC en gradiente Método Aguas 4 con detección UV a 260 nm tal y como se describe en el apartado 4.1 de materiales y métodos. Se incluye el tiempo de retención (RT) del pico de DX el cual es 25,84, sus valores de correlación lineal ( $R$  y  $R^2$ ) los cuales son 0,998010 y 0,996025, respectivamente, la ecuación de la recta y la desviación estándar relativa (RSD) de la recta de calibrado la cual es 4,607280.

En cuanto a los resultados obtenidos para los límites de detección y cuantificación y la sensibilidad, se muestran a continuación (**tabla 29**).

Antibióticos	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Sensibilidad (pendiente curva calibración)
SMX	0,02078320607	0,06927735356	14800
INN	0,02833172808	0,09443909359	29800
OFX	0,08112835818	0,2704278606	13100
NOR	0,03201992971	0,106733099	15900
ENR	0,02106059046	0,0702019682	13900
CIP	0,04403568437	0,1467856146	14500
DX	0,05522747791	0,184091593	11600
TE	0,00192847304	0,006428243465	12100
OTC	0,00913346259	0,0304448753	14400

**Tabla 29.** Límites de detección y cuantificación y sensibilidad obtenidas para antibióticos de aguas residuales.

También se calcularon las recuperaciones obtenidas tras el proceso de extracción en fase sólida (SPE), con el objetivo de ver si el proceso de extracción es robusto, viendo si las recuperaciones obtenidas son siempre similares. Además también sabiendo la recuperación se podrá aplicar al medir las muestras.

Teniendo en cuenta que se han hecho diluciones con un factor de dilución 0,01 y se han calculado las recuperaciones por triplicado. En la **tabla 30**, se muestran la concentración real y calculada tras el proceso de extracción en fase sólida de los diferentes patrones, el área calculada de sus picos y su % de recuperación media.

Antibiótico	Concentración real (mg/L)	Concentración calculada (mg/L)	Área media	Recuperación (%)	Incertidumbre de las recuperaciones
SMX	0,1	0,0873	123106	87,3	27,87
INN	0,1	0,087	251143	86,73	8,79
OFX	0,1	0,0739	92473	73,9	4,36
NOR	0,1	0,0395	61958	39,5	6,56
ENR	0,1	0,0586	84186	58,6	12,58
CIP	0,1	0,0807	103785	80,8	13,01
DX	0,1	0,0596	63916	56,9	5,51

TE	0,1	0,0884	104210	88,4	15,13
OTC	0,1	0,066	89290	66,66	10,02

**Tabla 30.** Concentración real de los antibióticos previamente al proceso de extracción en fase sólida, áreas obtenidas de los picos detectados para MEM y CFCD y % de recuperación obtenidas tras el proceso de extracción en fase sólida. También se indica la incertidumbre de todas las medidas de recuperación.

Los valores analíticos obtenidos se comparan con los valores establecidos por la FDA (Food and Drug Administration) y con valores obtenidos en estudios previos en la bibliografía.

- En cuanto a la linealidad, se puede estudiar con los valores de coeficiente de correlación lineal. En algunos estudios se obtuvieron para OFX 0,987, para CIP 0,996, para ENR 0,997, para NOR 0,991, para TE 0,994, para DX 0,996, para OTC 0,990, para SMX 1 y para INN 0,999 [15]. La FDA establece que debe cumplirse que  $R^2 > 0,99$ , lo cual se cumple para los resultados obtenidos.
- En cuanto a la **precisión (repetibilidad)**, la FDA establece que el valor de CV (%) no debe ser mayor del 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que el 20%. En el caso de antibióticos de análisis en aguas, para SMX el método es preciso a bajas concentraciones (1mg/L) y para NOR es preciso para bajas (1mg/L) y medias concentraciones (12mg/L). En estudios previos se obtuvo una precisión (repetibilidad) para OFX de 4, para CIP de 4, para ENR de 6, para NOR de 3, para TE de 8, para DX de 12, para OTC de 7, para SMX de 3 y para INN de 4 [15].
- En cuanto a la **exactitud**, se obtienen recuperaciones altas para los antibióticos, la más baja es la obtenida para NOR que se obtiene 39,1%, lo que indicaría que hemos podido perder algo de antibiótico en el proceso del lavado. Como se trata de un valor de recuperación muy bajo que también se repite en las muestras de patrones, para calcular la concentración en las muestras se aplicará un factor de corrección del 60,9% con el objetivo de obtener el valor real de concentración en las muestras de aguas.
- En cuanto a la **especificidad/selectividad**, podemos ver en la **figura 35** que es posible medir adecuadamente el analito de interés sin interferencias de otros compuestos ya que no hay interferencias significativas en los tiempos de retención de los antibióticos de interés.
- En cuanto a los **límites de detección (LOD)**, comparando con estudios previos se obtuvo para OFX 0,302 mg/L, para CIP 0,5 mg/L, para ENR 0,098 mg/L, para NOR 1,09 mg/L, para TE 0,06 mg/L, para DX 1mg/L, para OTC 0,05 mg/L, para SMX 0,01 mg/L y para INN 0,02 mg/L [15].
- En cuanto a los **límites de cuantificación (LOQ)**, comparando con estudios previos se obtuvo para OFX 1 mg/L, para CIP 1,66 mg/L, para ENR 0,33 mg/L, para NOR 3,63 mg/L, para TE 0,2 mg/L, para DX 16,66 mg/L, para OTC 0,16 mg/L, para SMX 0,03 mg/L y para INN 0,06 mg/L [15].

## CONCLUSIONES

---

- Se ha conseguido optimizar un método de detección con HPLC para los antibióticos de aguas residuales con el que se obtiene una buena separación y resolución para SMX, INN, OTC, ENR y DX, para el resto se seguirá intentando obtener una mejor separación en el futuro.  
An HPLC detection method for antibiotics in wastewater has been successfully optimized, achieving good separation and resolution for SMX, INN, OTC, ENR, and DX. For the remaining antibiotics, further attempts will be made to improve separation in the future.
- Se ha conseguido optimizar un método de detección para los antibióticos de suero en sangre, con el que se obtiene una buena separación y resolución para todos los antibióticos medidos.  
A detection method for antibiotics in blood serum has also been successfully optimized, achieving good separation and resolution for all measured antibiotics.
- Se ha conseguido desarrollar un proceso de extracción en fase sólida (SPE) de los patrones de aguas residuales mediante el cual se consiguen obtener recuperaciones óptimas en la mayoría de los casos, exceptuando para NOR. En este caso, cuando se pasen a analizar las muestras de aguas residuales que contengan este antibiótico, se aplicará un factor de corrección del 60,9% con el objetivo de obtener el valor real de concentración en las muestras de aguas.  
A solid-phase extraction (SPE) process has been developed for the wastewater standards, obtaining optimal recoveries in most cases, except for NOR. In this case, when wastewater samples containing this antibiotic are analyzed, a correction factor of 60.9% will be applied to obtain the true concentration value in the water samples.
- Se ha conseguido desarrollar un proceso de extracción en fase sólida (SPE) de los patrones de sueros mediante el cual se consigue para el CFCD y MEM obtener recuperaciones óptimas con bajas incertidumbres de las réplicas extraídas, indicando que es un método reproducible.  
A solid-phase extraction (SPE) process has also been developed for the serum standards, achieving optimal recoveries with low uncertainty for the extracted replicates of CFCD and MEM, indicating that it is a reproducible method.
- En las muestras de aguas residuales recogidas del barrio de la Bombarda en diferentes días de los meses de junio y julio de 2020, el perfil cromatográfico permite identificar DX, OFX y NOR, CIP y TE a diferentes concentraciones y SMX que mantiene una concentración bastante constante a lo largo del periodo de tiempo estudiado. El resto de antibióticos, son más variables, habiendo días en los que no se detectan.  
In wastewater samples collected from the Bombarda neighborhood on different days in June and July 2020, the chromatographic profile allowed the identification of DX, OFX, NOR, CIP, and TE at various concentrations, as well as SMX, which maintained

a fairly constant concentration over the study period. The remaining antibiotics were more variable, with some days showing no detection.

- En las muestras séricas de dos pacientes a los que se les administró MEM, se obtuvieron niveles pico y valle con unas concentraciones altas para niveles pico y bajas para niveles valle, lo cual son resultados coherentes. Además comparando los resultados obtenidos en estudios previos, la concentración mínima total para el MEM es 8 mg/L, con lo cual para las muestras séricas analizadas de los dos pacientes, se supera esta concentración obtenida para los niveles pico, es decir se alcanza la concentración terapéutica objetivo.  
In serum samples from two patients who were administered MEM, peak and trough levels were obtained, showing high concentrations for peak levels and low concentrations for trough levels, which are consistent results. Furthermore, comparing the results obtained with previous studies, the minimum total concentration for MEM is 8 mg/L, and in the serum samples analyzed from the two patients, this concentration was exceeded for peak levels, meaning that the target therapeutic concentration was reached.
- Se calcularon los valores analíticos de linealidad, precisión, sensibilidad, selectividad, límites de detección y cuantificación de los antibióticos presentes en aguas residuales. Se obtuvieron valores adecuados de linealidad, para SMX el método es preciso en cuanto a repetibilidad a bajas concentraciones (1mg/L) y para NOR es preciso para bajas (1mg/L) y medias concentraciones (12mg/L), el método muestra ser específico, los límites de detección son más bajos para todos los antibióticos medidos que los mostrados en la bibliografía, excepto para el INN que coinciden, los límites de cuantificación son más bajos los de los patrones medidos que los de la bibliografía, excepto para el SMX e INN.  
Analytical values for linearity, precision, sensitivity, selectivity, detection limits, and quantification limits were calculated for the antibiotics present in wastewater. Adequate linearity values were obtained. For SMX, the method is precise in terms of repeatability at low concentrations (1 mg/L), and for NOR, it is precise at both low (1 mg/L) and medium concentrations (12 mg/L). The method proves to be specific. The detection limits are lower for all measured antibiotics than those reported in the literature, except for INN, where they are comparable. The quantification limits for the measured standards are lower than those in the literature, except for SMX and INN.
- Se calcularon los parámetros analíticos de linealidad, precisión, sensibilidad, selectividad, límites de detección y cuantificación de los antibióticos presentes en sueros de pacientes. La linealidad es adecuada para todos los patrones medidos excepto para IPM/CLN, para CFCD es preciso a medias y altas concentraciones, sin embargo, la precisión para MEM será necesario optimizarla en el futuro. En cuanto a los límites de detección el valor obtenido es inferior al mostrado en la bibliografía, sin embargo para MEM es superior, aún así está dentro de los parámetros establecidos. Los valores de límites de detección para ambos casos son superiores a los mostrados en la bibliografía, esto en parte se debe a que en el artículo miden utilizando un espectrofotómetro de masas acoplado a HPLC, cuya técnica presenta mayor sensibilidad. En cuanto a la exactitud, se obtiene tanto para MEM como para

CFCD un % de error de repetibilidad de las tres réplicas extraídas por debajo del 20%, lo cual cumple las indicaciones de la FDA.

Analytical parameters such as linearity, precision, sensitivity, selectivity, detection limits, and quantification limits were calculated for the antibiotics present in patient sera. Linearity is adequate for all measured standards except for IPM/CLN. For CFCD, the method is precise at medium and high concentrations; however, precision for MEM will need to be optimized in the future. As for detection limits, the value obtained is lower than reported in the literature, although for MEM it is higher, yet still within established parameters. The detection limits for both cases are higher than those reported in the literature, partly due to the fact that the article uses a mass spectrometer coupled to HPLC, which is a more sensitive technique. Regarding accuracy, both MEM and CFCD achieved a repeatability error percentage of less than 20% for the three extracted replicates, which meets FDA guidelines.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [1] K. Kümmerer, “Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I,” *Chemosphere*, vol. 75, no. 4, pp. 417–434, Apr. 2009, doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2008.11.086.
- [2] K. Pauter, M. Szultka-Młyńska, and B. Buszewski, “Determination and identification of antibiotic drugs and bacterial strains in biological samples,” Jun. 01, 2020, *MDPI AG*. doi: 10.3390/molecules25112556.
- [3] C. Suárez and F. Gudiol, “Beta-lactam antibiotics,” *Enferm Infecc Microbiol Clin*, vol. 27, no. 2, pp. 116–129, 2009, doi: 10.1016/j.eimc.2008.12.001.
- [4] J. Calvo and L. Martínez-Martínez, “Mecanismos de acción de los antimicrobianos,” *Enferm Infecc Microbiol Clin*, vol. 27, no. 1, pp. 44–52, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.eimc.2008.11.001.
- [5] J. Gómez, E. García-Vázquez, and A. Hernández-Torres, “Revisión,” 2015.
- [6] P. O. Pacheco, M. <sup>a</sup> Del Carmen Suárez-Arrabal, and J. Esparza Olcina, “Descripción general de los principales grupos de fármacos antimicrobianos. Antibióticos.” Available: <https://www.guia-abe.es>
- [7] J. F. Acar and G. Moulin, “Antimicrobial resistance: a complex issue,” 2012.
- [8] “Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations.”
- [9] A. P. Magiorakos *et al.*, “Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance,” *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 18, no. 3, pp. 268–281, 2012, doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- [10] D. S. Cabrera, “Uso racional y responsable de antimicrobianos,” 2009.
- [11] G. M. Currie, “Pharmacology, part 2: Introduction to pharmacokinetics,” *J Nucl Med Technol*, vol. 46, no. 3, pp. 221–230, Sep. 2018, doi: 10.2967/jnmt.117.199638.
- [12] R. Parthasarathy, C. E. Monette, S. Bracero, and M. S. Saha, “Methods for field measurement of antibiotic concentrations: Limitations and outlook,” Aug. 01, 2018, *Oxford University Press*. doi: 10.1093/femsec/fiy105.
- [13] Y. Luo *et al.*, “Detection methods for antibiotics in wastewater: a review,” 2024, *Springer Science and Business Media Deutschland GmbH*. doi: 10.1007/s00449-024-03033-0.
- [14] T. K. D. W. W. Tomoari Kuriyama, “Antimicrobial Chemotherapy: Significance to Healthcare,” *Biofilms in Infection Prevention and Control*, 2014, pp. 209–244. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397043-5.00013-X>.
- [15] M. Gros, S. Rodríguez-Mozaz, and D. Barceló, “Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry,” *J Chromatogr A*, vol. 1292, pp. 173–188, May 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2012.12.072.
- [16] J. Carlier *et al.*, “Screening approach by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the blood quantification of thirty-four toxic principles of plant origin. Application to forensic toxicology,” *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, vol. 975, pp. 65–76, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.jchromb.2014.10.028.

- [17] M. E. A. de Kraker, A. J. Stewardson, and S. Harbarth, “Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050?,” *PLoS Med*, vol. 13, no. 11, Nov. 2016, doi: 10.1371/journal.pmed.1002184.
- [18] C. Cháfer-Pericás, Á. Maquieira, and R. Puchades, “Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples,” Oct. 2010. doi: 10.1016/j.trac.2010.06.004.
- [19] J. Mula *et al.*, “Analytical validation of a novel UHPLC-MS/MS method for 19 antibiotics quantification in plasma: Implementation in a LC-MS/MS Kit,” *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 163, Jul. 2023, doi: 10.1016/j.biopha.2023.114790.
- [20] O. Vera Carrasco, “Normas y estrategias para el uso racional de antibióticos Rev Med La Paz,” 2012.
- [21] A. E. Muller, B. Huttner, and A. Huttner, “Therapeutic Drug Monitoring of Beta-Lactams and Other Antibiotics in the Intensive Care Unit: Which Agents, Which Patients and Which Infections?,” Mar. 01, 2018, *Springer International Publishing*. doi: 10.1007/s40265-018-0880-z.
- [22] P. López, M. Facultativo, E. Farmacia, and H. Mayo, “PROTOCOLO DE MONITORIZACIÓN FARMACOCINÉTICA DE VANCOMICINA PROTOCOLO PARA LA MONITORIZACIÓN FARMACOCINÉTICA DE VANCOMICINA EN ADULTOS.”
- [23] P. Díaz Ruíz Itamar González Perera Noemí Román González Marta Suárez González Enrique Tévar Alfonso Coordinador Enrique Tévar Alfonso, “Manual para la Monitorización de Antibióticos.”
- [24] S. Rodriguez-Mozaz *et al.*, “Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river,” *Water Res*, vol. 69, pp. 234–242, 2015, doi: 10.1016/j.watres.2014.11.021.
- [25] E. Tévar-Alfonso, M. D. Belles-Medall, M. D. Aumente-Rubio, S. Blanco-Dorado, and J. Edo-Peñarrocha, “Mapping the clinical pharmacokinetics and pharmacogenetic units operating in Spanish hospitals,” *Farmacia Hospitalaria*, vol. 45, pp. 102–108, 2021, doi: 10.7399/fh.11769.
- [26] S. Luque *et al.*, “Documento nacional de consenso de monitorización terapéutica de antibióticos y antifúngicos en el paciente pediátrico y neonatal de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH) y la Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP),” *An Pediatr (Engl Ed)*, vol. 101, pp. 190–207, 2024, doi: 10.1016/j.farma.2024.02.012.
- [27] C. Scharf *et al.*, “Therapeutic drug monitoring of meropenem and piperacillin in critical illness—experience and recommendations from one year in routine clinical practice,” *Antibiotics*, vol. 9, no. 3, Mar. 2020, doi: 10.3390/antibiotics9030131.
- [28] X. You *et al.*, “Therapeutic drug monitoring of imipenem/cilastatin and meropenem in critically ill adult patients,” *J Glob Antimicrob Resist*, vol. 36, pp. 252–259, Mar. 2024, doi: 10.1016/j.jgar.2024.01.004.
- [29] “HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION See full prescribing information for CRESEMBA®. CRESEMBA® (isavuconazonium sulfate) capsules, for oral use CRESEMBA® (isavuconazonium sulfate) for injection, for intravenous use.”. Available: [www.fda.gov/medwatch](http://www.fda.gov/medwatch).
- [30] K. Ikeda, K. Ikawa, N. Morikawa, M. Miki, S. I. Nishimura, and M. Kobayashi, “High-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for real-time therapeutic drug monitoring of meropenem in plasma,” *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, vol. 856, no. 1–2, pp. 371–375, Sep. 2007, doi: 10.1016/j.jchromb.2007.05.043.
- [31] T. Mernissi *et al.*, “An HPLC assay for the therapeutic drug monitoring of cefiderocol in critically ill patients,” Jun. 01, 2021, *Oxford University Press*. doi: 10.1093/jac/dkab051.

- [32] D. Quoc Tuc *et al.*, “Fate of antibiotics from hospital and domestic sources in a sewage network,” *Science of the Total Environment*, vol. 575, pp. 758–766, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.118.
- [33] R. Lindberg, P. Å. Jarnheimer, B. Olsen, M. Johansson, and M. Tysklind, “Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards,” *Chemosphere*, vol. 57, no. 10, pp. 1479–1488, Dec. 2004, doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.09.015.