

El laboratorio productor nos proveyó también de semita de trigo, de maduramicina amónica y de carbonato de calcio empleados como ingredientes de la formulación con los cuales se preparó una matriz o muestra blanco.

#### 3.5.3.1. Procedimiento de extracción

En primer lugar, las muestras comerciales se pulverizaron en un mortero al abrigo de la luz directa hasta obtener un polvo homogéneo. Luego se pesaron, de manera exacta, porciones de aproximadamente 500 mg de pulverizado y se transfirieron a matraces de 50.0 mL con 30 mL de DMF. Las suspensiones se sonicaron durante 20 min con episodios de agitación manual vigorosa cada 5 min a los fines de asegurar una efectiva extracción del compuesto. Finalmente los matraces se llevaron a volumen con el mismo solvente y aproximadamente 10.0 mL de las soluciones resultantes se centrifugaron durante 10 min a 2000 rpm. Del sobrenadante límpido obtenido en cada caso se tomó con pipeta volumétrica 1.00 mL y se diluyó a 20.0 mL con diluyente de muestra.

#### 3.5.4. Soluciones

Los solventes y soluciones preparadas para la fase móvil fueron filtrados por filtros de membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro antes de ser utilizados.

Las soluciones muestras y estándares fueron filtradas por filtro de membrana de nylon tipo jeringa en el momento previo a la inyección en el sistema cromatográfico.

##### 3.5.4.1. Fase móvil y diluyentes

Durante la primera etapa del desarrollo del método cromatográfico se prepararon soluciones de dihidrógeno fosfato de sodio en concentraciones de 10.0 y 100.0  $\text{mmol L}^{-1}$  a  $\text{pH}=3.0$  y  $7.0$  para cada una de ellas.

Para la etapa de optimización se prepararon varias soluciones reguladoras de 1-heptanosulfonato de sodio (HSS) y acetato de sodio (AS) en diferentes concentraciones y  $\text{pH}$ s de modo de cumplir con los niveles establecidos para cada experimento del diseño. Los diluyentes utilizados en esta etapa fueron obtenidos mezclando las diferentes soluciones reguladoras con ACN (50:50).

El **diluyente de muestra** empleado en la etapa de la validación del método fue finalmente una mezcla 50:50 de ACN y buffer 20.0 mmol L<sup>-1</sup> de AS y 10.0 mmol L<sup>-1</sup> de HSS a pH = 3.30.

#### 3.5.4.2. Soluciones estándar

Se prepararon las siguientes soluciones estándar:

- **Solución estándar concentrada** de NIC de 0.800 mg mL<sup>-1</sup> disolviendo una cantidad exactamente pesada del estándar en N,N-dimetilformamida (DMF). Esta solución demostró ser estable por lo menos durante 1 mes conservada en heladera a 4°C en frasco de vidrio color caramelo.
- **Solución estándar de trabajo** diluyendo adecuadamente la solución estándar concentrada con diluyente de muestra para obtener una concentración de 40.0 µg mL<sup>-1</sup> de NIC.
- **Soluciones estándar de calibración** en cinco niveles de concentración: 32.0, 36.0, 40.0, 44.0 y 50.0 µg mL<sup>-1</sup> de NIC, diluyendo volúmenes apropiados de la solución estándar concentrada en matraces volumétricos con diluyente de muestra. Este rango de calibración abarca un 80.0% a un 120.0% de la concentración de analito esperada en la solución muestra de ensayo.
- **Soluciones de matriz fortificadas con estándar** en tres niveles de concentración: 32.0, 40.0 y 50.0 µg mL<sup>-1</sup> de NIC correspondientes a 80.0, 100.0 y 120.0 % de la cantidad esperada del analito. Estas soluciones se prepararon utilizando la matriz y siguiendo el procedimiento indicado en 3.5.3.1. Luego de transferir al matraz la masa de matriz pesada se adicionaron volúmenes exactos y apropiados de la solución estándar concentrada obteniéndose de esta manera muestras artificiales con distintas concentraciones de analitos.

#### 3.5.4.3. Soluciones muestra

Siguiendo el procedimiento de extracción descrito en 3.5.3.1 se prepararon los siguientes tipos de soluciones:

- **Soluciones muestra de optimización** utilizando como diluyente final una mezcla 50:50 de la solución reguladora resultante del diseño experimental y ACN. La concentración de NIC en estas soluciones fue de 40.0 µg mL<sup>-1</sup>.
- **Soluciones muestra de ensayo** utilizando como diluyente final el diluyente de muestra. La concentración de NIC en estas soluciones fue de 40.0 µg mL<sup>-1</sup>.

- **Soluciones muestra blanco** procesando la matriz o muestra blanco.

Por otro lado se obtuvieron también:

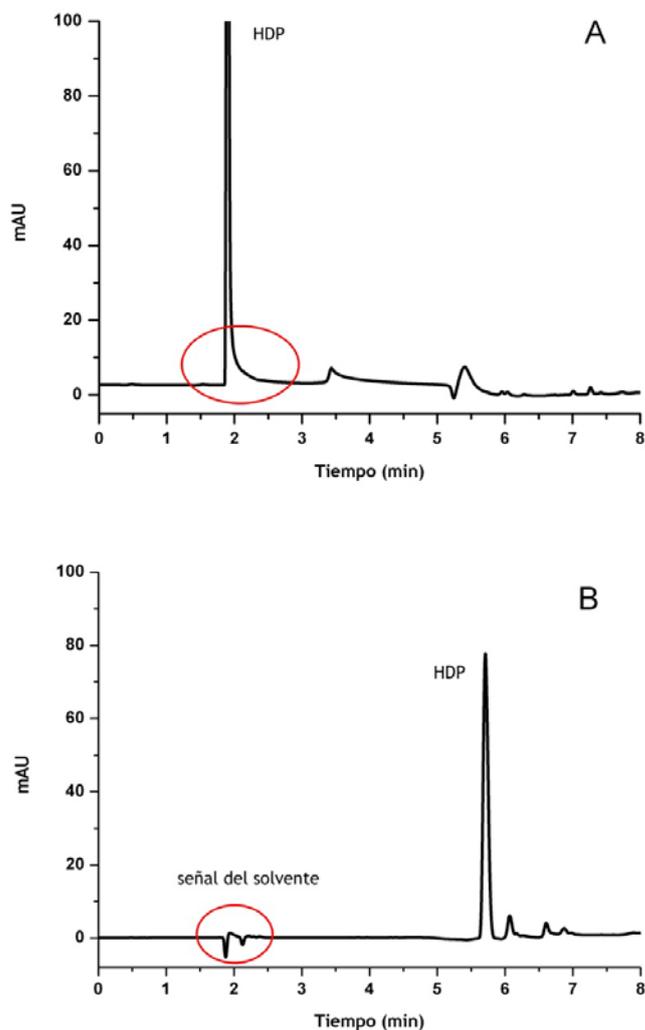
- **Soluciones muestra de materia prima** de la misma manera que la solución estándar de trabajo pero utilizando materias primas.

#### 3.5.5. Desarrollo del método cromatográfico

En experiencias preliminares se estudió la separación de NIC en distintas columnas que contenían como fase estacionaria octilsilano, octadecilsilano, cianoalquil sustituido y amino-alquil sustituido, todos ellos unidos químicamente a partículas porosas de sílice. En esta etapa se utilizó como componente acuoso de la fase móvil una solución reguladora de fosfato de sodio  $10.0 \text{ mmol L}^{-1}$  a pH= 3.00 y a pH 7.00 y se ensayaron las propiedades del MeOH y del ACN como modificadores orgánicos. Probando distintas proporciones en la mezcla de estos solventes y aún con sistemas de gradientes o cambios de pH y concentración salina de la fase móvil, no se logró obtener una buena retención para el compuesto HDP en ninguna de las columnas ensayadas. El factor de capacidad para este analito resultó ser siempre muy bajo y el *tailing* que se obtuvo fue inaceptable en todos los casos. En la Figura 3.2.A se muestra la porción correspondiente al pico de HDP de uno de los cromatogramas obtenidos en esta etapa.

Para mejorar la retención de HDP se ensayó entonces una CLAI utilizando una fase móvil con HSS como agente de apareamiento iónico. La fase móvil utilizada en esta experiencia previa consistió en una mezcla de una reguladora  $5.0 \text{ mmol L}^{-1}$  de HSS y  $10.0 \text{ mmol L}^{-1}$  de AS a pH=3.00 y ACN.

Figura 3.2: Cromatogramas de la etapa de desarrollo



A: Porción inicial de un cromatograma de solución muestra obtenido en una columna de octadecilsilano con una fase móvil consistente en una reguladora de fosfato de sodio  $10.0 \text{ mmol L}^{-1}$  a  $\text{pH}= 3.00$  y ACN. Se observa la escasa retención y el pronunciado *tailing* del HDP.  
 B: Porción inicial de un cromatograma de solución muestra obtenida en una columna de octadecilsilano con una fase móvil consistente en una reguladora  $5.0 \text{ mmol L}^{-1}$  de HSS y  $10.0 \text{ mmol L}^{-1}$  de AS a  $\text{pH}=3.00$  y ACN. Se observa una gran mejora en la retención de HDP, separándose de la señal del solvente de inyección y con una buena simetría de pico.

Como se muestra en la Figura 3.2.B, con esta estrategia y utilizando un 10.0 % del modificador orgánico en la fase móvil, se logró mejorar considerablemente la retención y forma del pico del HDP, logrando de esta manera, una correcta separación e integración del mismo.

Sin embargo, si se mantenían estas condiciones isocráticas, el DNC se retenía muy fuertemente en la columna y no lograba eluir de la misma. Por ello se estableció un gradiente de elución que permitiera, primero una adecuada retención del HDP y

luego la elución del DNC en un tiempo prudencial de análisis. En la Tabla 3.2 se presenta el gradiente utilizado.

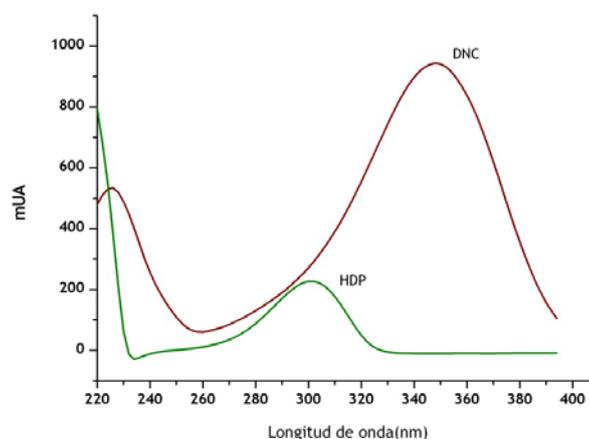
Tabla 3.2: Gradiente de elución para la separación de NIC

Tiempo (min)	% Reguladora	% ACN
0.0	90.0	10.0
2.0	90.0	10.0
8.0	20.0	80.0
12.0	20.0	80.0
15.0	90.0	10.0

La velocidad de flujo se mantuvo siempre en  $1.00 \text{ mL min}^{-1}$  y el tiempo total de análisis cromatográfico fue establecido en 18.0 min para permitir una adecuada reestabilización del sistema en las condiciones iniciales. El volumen de inyección fue de  $10.0 \mu\text{L}$ .

Para la selección de la longitud de onda del método se analizaron los espectros de absorción en el UV de los analitos en las condiciones de elución utilizando la información provista por el DAD (Figura 3.3). Debido a que HDP presentaba mucha menor absorptividad que DNC, se eligió el máximo de absorbancia del primer compuesto a  $300 \text{ nm}$  como longitud de onda de trabajo, ya que en estas condiciones se lograba una respuesta de sensibilidad comparable para ambos analitos.

Figura 3.3: Espectros de absorción de los analitos



Los demás parámetros cromatográficos se establecieron en función de los resultados obtenidos en el procedimiento de optimización que se describe a continuación.

### 3.5.6. Optimización

Una vez establecido el tipo de separación que iba a llevarse a cabo, se buscó optimizar el método en desarrollo a los fines de obtener los mejores parámetros cromatográficos posibles. Para ello se utilizó el Método de la Superficie de Respuesta (MSR) que fue presentado en la Introducción.

#### 3.5.6.1. Selección de las variables: respuestas y factores

Se seleccionaron las siguientes cinco respuestas ( $y$ ) a optimizar:

1. El factor de capacidad del pico de HDP ( $K'_{HDP}$ )
2. El *tailing* del pico de HDP ( $T_{HDP}$ )
3. La resolución del pico de HDP ( $R_{HDP}$ )
4. La resolución del pico de DNC ( $R_{DNC}$ )
5. El tiempo de retención del pico de DNC ( $t_{DNC}$ ) como marcador del tiempo de análisis.

Los factores ( $k$ ) que se incluyeron en el diseño, por considerarse los más influyentes para las respuestas en estudio fueron:

- A. La concentración de HSS en la fase móvil.
- B. La concentración de AS en la fase móvil
- C. El pH de la reguladora de la fase móvil
- D. La temperatura del horno de columna

#### 3.5.6.2. Selección del diseño de optimización

Los distintos tipos de diseños experimentales presentados en la Introducción: Diseño Factorial Completo en tres niveles (3-DFC), Diseño Central Compuesto (DCC), Diseño de Box-Behnken (DBB) y Matriz de Doehlert (DMD), fueron evaluados para el sistema en estudio. En la Tabla 3.3 se comparan estos diseños para el análisis de 4 factores.

Tabla 3.3: Comparación de diseños de superficie de respuesta

Diseño	Cálculo de $E$	$E$ ( $pc=1$ )	Eficiencia	Niveles para cada factor
3-DFC	$E=3^k$	81	0.18	(-1, 0, +1)
DCC	$E=2^k + 2k + pc$	25	0.60	( $-\alpha$ , -1, 0, +1, $+\alpha$ )
DBB	$E=2k(k-1) + pc$	25	0.60	(-1, 0, +1)
DMD	$E= k^2 + k + pc$	21	0.71	Variable para cada factor

Donde:  $k$  es el número de factores,  $pc$  es el número de puntos centrales y  $\alpha$  es la localización de los puntos estrella y  $E$  es el número de experimentos.

Analizando los aspectos antes señalados se seleccionó un DCC para realizar la optimización del método, ya que el mismo nos permitía estudiar cada variable en cinco niveles con la misma eficiencia que el DBB que implica el estudio de sólo 3 niveles para cada factor. Aunque el DMD hubiera resultado ligeramente más eficiente, el mismo no resultaba muy práctico debido a la variabilidad de niveles para cada factor. Además, otra ventaja considerada del DCC, fue que nos permitía trabajar en bloques. El bloqueo es una herramienta muy útil cuando se deben realizar muchos experimentos y los mismos no pueden llevarse a cabo en un único día de trabajo.

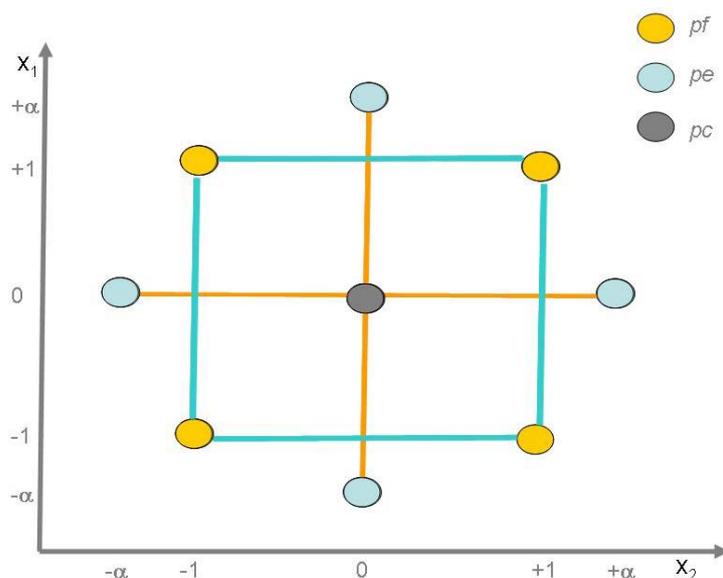
### 3.5.6.3. Construcción del DCC

Como se vio en la Introducción, un DCC incluye distintas clases de puntos dentro del dominio experimental:

- **Puntos factoriales ( $pf$ )**, que son aquellos que forman parte de un diseño factorial de dos niveles y tienen los factores en niveles -1 o +1.
- **Puntos axiales** o también llamados **puntos estrella ( $pe$ )**, que son aquellos que tienen todos los factores en el nivel 0 menos uno de los factores que se encuentra en un nivel  $\pm\alpha$ .
- **Puntos centrales ( $pc$ )**, que son aquellos que tienen todos los factores en nivel 0.

En la Figura 3.4 puede verse un esquema representativo de un DCC.

Figura 3.4: Esquema representativo de un DCC



### 3.5.6.3.1. Selección de los niveles

El rango ensayado para las concentraciones de los reactivos fue establecido respetando los niveles de concentración habitualmente utilizados en las fases móviles.

El pH se mantuvo dentro de un rango relativamente ácido para asegurar la ionización del HDP, logrando de esta manera una buena interacción con el agente de apareamiento iónico. La restricción para este parámetro fue de no superar el límite inferior de pH=2.50 para no afectar la integridad de la fase estacionaria.

La temperatura del horno de columna se estudió en un rango relativamente amplio.

Los niveles para cada factor correspondientes a los valores codificados +1 y -1 se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4: Niveles de los factores

Factor	-1	+1
HSS (mmol L <sup>-1</sup> )	10.0	20.0
AS (mmol L <sup>-1</sup> )	20.0	100.0
pH	3.00	4.00
Temp (°C)	25.0	40.0

#### 3.5.6.3.2. Selección del valor de $\alpha$

El valor de  $\alpha$  determina la ubicación de los puntos estrella y generalmente varía de un valor 1 a un valor  $\sqrt[k]{k}$  siendo el operador el que fija este valor de acuerdo a la región de interés y las condiciones de operabilidad del dominio experimental. Teniendo esto en cuenta, hay varios caminos para asignar un valor apropiado para  $\alpha$ . Si se fija el valor de  $\alpha = 1$  se crea un DCC centrado en las caras, lo que reduce a tres los niveles de cada variable. Si  $\alpha = \sqrt[k]{k}$ , los puntos factoriales y los puntos estrella quedan ubicados en una hiper-superficie con forma de hiper-esfera y en este caso el diseño se denomina esférico Finalmente cuando  $\alpha$  toma el valor de la raíz cuarta de  $f$ , siendo  $f$  el número de puntos factoriales, se dice que el diseño es **rotable**. La **rotabilidad** de un diseño es una propiedad del mismo que implica que el error en la predicción de la respuesta por parte del modelo ajustado es constante a una distancia dada desde el centro del diseño. Esta propiedad se puede comprobar obteniendo una gráfica de contornos perfectamente circulares cuando se representa el error estándar del diseño en función de las coordenadas experimentales.

Sin embargo, en los diseños esféricos y en los estrictamente rotables para varios factores los puntos estrella pueden quedar ubicados muy lejos del punto central. Esta distancia aumenta a medida que crece el número de factores y esto implica correr el riesgo de dejar toda una región intermedia sin investigar. O podría pasar que el valor de  $\alpha$  para algunos de los factores resulte en magnitudes imposibles de lograr por restricciones del dominio experimental (Dejaegher y Vander Heyden 2009b). En estos casos, otra opción aceptable es tomar un valor **práctico** para  $\alpha$ . En este caso  $\alpha$  se fija como la raíz cuarta de  $k$ . De esta manera se obtienen puntos estrella más cercanos al punto central y que en general resultan en experimentos que pueden realizarse sin inconvenientes. En esta situación el modelo obtenido con este diseño aún puede predecir las respuestas con una varianza más o menos semejante para una misma distancia del punto central. A este tipo de diseños se los denomina entonces **cuasi-rotable** (Meyer y Montgomery 2002).

Considerando los niveles estudiados para nuestros factores y teniendo en cuenta las restricciones operativas para el cuidado de la columna, elegimos para el diseño un valor práctico de  $\alpha = 1.414$ .

#### 3.5.6.3.3. Bloqueo

Debido a que el número de experimentos necesarios para completar el diseño era demasiado grande para poder ser realizados en un mismo día de trabajo, dividimos el diseño en tres bloques. Los experimentos de cada bloque fueron

realizados en días independientes y al evaluar los modelos que se construyeron para cada respuesta se analizó también en todos los casos el efecto bloque.

El bloque 1 y el bloque 2 incluyeron los experimentos que involucraban a los puntos factoriales y algunos puntos centrales. El bloque 3 estuvo formado por los puntos estrella y puntos centrales adicionales.

#### 3.5.6.3.4. Puntos centrales

Las réplicas que se realizan del punto central tienen dos objetivos principales:

1. Proporcionar una medida del **error puro**, es decir el error que puede esperarse en la respuesta de un experimento realizado en forma independiente.
2. Estabilizar la **varianza** de las respuestas predichas dentro de la región experimental del diseño.

Para cumplir el primero de estos objetivos la cantidad de puntos centrales necesarios dependerá en cada caso de la precisión esperada para las respuestas. Para el segundo caso se ha demostrado que los diseños rotables necesitan de 3 a 5 puntos centrales para evitar que se produzca una variabilidad muy grande en la varianza de las predicciones entre las zonas más o menos cercanas al centro del diseño (Almeida Bezerra y col 2008).

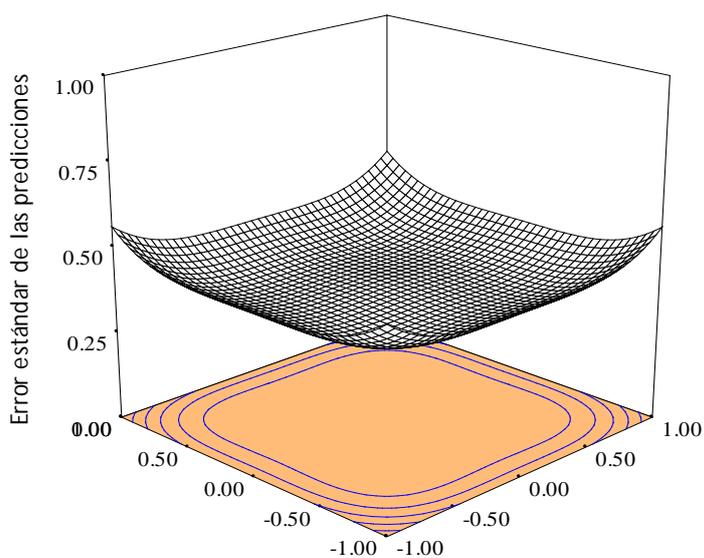
Considerando estos aspectos y para obtener además bloques balanceados incluimos un total de 6 puntos centrales en el diseño distribuidos equitativamente entre los bloques.

#### 3.5.6.4. Evaluación del diseño

El diseño construido consistió entonces en un DCC en tres bloques para  $k=4$ , con  $E=30$ ,  $pf=16$ ,  $pe=8$ ,  $\alpha=1.414$  y  $pc=6$ .

La evaluación del error estándar de las predicciones provistas por el diseño demostró, como puede verse en la Figura 3.5, que el mismo era relativamente pequeño y constante dentro de la región de interés. A su vez en la gráfica de contorno puede observarse que este error estándar es prácticamente constante a una misma distancia del centro del diseño, por lo que el mismo resultó ser cuasi-rotable.

Figura 3.5: Error estándar de las predicciones



El error estándar de las predicciones del diseño en función del entorno experimental para los niveles codificados (-1.0 a 1.0) de las variables. Se observa que el mismo es relativamente constante en la región estudiada.

---

#### 3.5.6.5. Experimentos y respuestas

En la Tabla 3.5 se presentan los experimentos realizados y las respuestas obtenidas en cada uno de ellos. Los mismos fueron realizados en un orden aleatorio para asegurar la independencia de los resultados minimizando el efecto de los factores no controlados.

Las resoluciones de los picos de HDP y DNC se obtuvieron en relación al pico más cercano que apareció en cada caso en los cromatogramas de optimización.

Tabla 3.5: Experimentos y respuestas

Exp.	Factores (k)					Respuestas				
	Bloque	HSS	AS	pH	Temp.	$K'_{HDP}$	$T_{HDP}$	$R_{HDP}$	$R_{DNC}$	$t_{DNC}$
1	1	20.0	20.0	3.00	25.0	4.47	1.09	8.74	2.21	10.48
2	1	15.0	60.0	3.50	32.5	2.49	1.51	5.79	1.09	10.28
3	1	20.0	20.0	4.00	40.0	2.21	1.38	1.21	2.29	10.22
4	1	20.0	60.0	4.00	25.0	1.75	1.15	13.23	1.54	9.94
5	1	10.0	20.0	3.00	40.0	3.29	1.03	5.09	1.11	10.17
6	1	10.0	100.0	4.00	40.0	1.69	1.18	0.97	2.24	10.49
7	1	20.0	100.0	4.00	40.0	2.04	1.19	0.98	2.14	10.44
8	1	10.0	20.0	4.00	25.0	2.38	1.10	1.02	8.26	10.52
9	1	10.0	100.0	3.00	25.0	1.67	1.02	16.36	1.43	10.22
10	1	15.0	60.0	3.50	25.0	1.79	1.65	8.27	7.34	10.28
11	2	15.0	60.0	3.50	32.5	2.48	1.40	8.77	1.76	10.27
12	2	10.0	100.0	3.00	32.5	1.56	1.02	6.17	0.92	9.95
13	2	10.0	20.0	4.00	40.0	1.96	1.44	1.54	6.99	10.21
14	2	20.0	20.0	4.00	40.0	2.65	1.17	1.02	9.23	10.51
15	2	20.0	20.0	3.00	40.0	4.03	0.77	6.25	1.51	10.17
16	2	10.0	100.0	4.00	25.0	1.85	1.13	1.01	1.90	10.41
17	2	20.0	100.0	3.00	25.0	2.01	1.05	12.13	1.02	10.24
18	2	20.0	100.0	4.00	40.0	1.84	1.26	1.00	1.47	10.15
19	2	15.0	60.0	3.50	32.5	1.84	1.51	8.11	8.23	10.27
20	2	10.0	20.0	3.00	25.0	3.88	0.95	2.48	1.99	10.45
21	3	22.1	60.0	3.50	32.5	2.86	1.05	3.68	1.31	10.27
22	3	15.0	116.6	3.50	32.5	1.84	1.15	12.38	1.16	10.15
23	3	15.0	60.0	4.21	32.5	1.98	1.27	1.07	3.10	10.33
24	3	15.0	60.0	3.50	21.9	2.84	1.07	5.93	2.13	10.49
25	3	15.0	60.0	3.50	43.1	2.31	1.37	7.57	6.92	10.10
26	3	15.0	3.4	3.50	32.5	4.62	1.14	1.79	1.94	10.39
27	3	15.0	60.0	3.50	32.5	2.55	1.22	7.60	1.626	10.29
28	3	15.0	60.0	3.50	32.5	2.16	1.39	4.73	8.18	10.29
29	3	7.9	60.0	3.50	32.5	2.11	1.20	13.61	1.02	10.24
30	3	15.0	60.0	2.79	32.5	1.73	1.09	9.19	1.31	9.96

Las concentraciones de HSS y AS están dadas en  $\text{mmol L}^{-1}$ , la temperatura en  $^{\circ}\text{C}$  y el tiempo de retención de DNC en minutos. Los demás parámetros son adimensionales.

### 3.5.7. Validación

La validación del método se realizó en las condiciones experimentales optimizadas y siguiendo los lineamientos de las guías ICH (ICH Q2-R1 2005).

#### 3.5.7.1. Adecuación del sistema

Las pruebas de adecuación del sistema se realizaron para verificar que el método desarrollado, el equipamiento y los reactivos utilizados eran adecuados para

obtener resultados confiables evaluando parámetros característicos de los picos de los analitos.

Esta evaluación se llevó a cabo inyectando por sextuplicado una solución muestra preparada como se indicó en 3.5.4.3.

#### 3.5.7.2. Selectividad

La selectividad del método se evaluó de varias maneras. En primer lugar se inyectaron tres soluciones muestras blanco preparadas en forma independiente y se evaluó la ausencia de picos en los tiempos de retención de los analitos. Esto se confirmó estudiando la pureza de pico de los analitos en soluciones muestra. En segundo lugar se sometió la NIC a distintas condiciones de estrés para obtener los posibles productos de degradación y estudiar su separación. Los ensayos de degradación forzada que se realizaron fueron los siguientes: ácido, alcalino, oxidante, reductor, térmico y lumínico. Para los cuatro primeros se preparó inicialmente una solución de trabajo de NIC  $0.80 \text{ mg mL}^{-1}$  en DMF. Alícuotas de 1.00 mL de esta solución se llevaron a erlenmeyers de 50.0 mL y se sometieron a los siguientes tratamientos:

A. **Ácido:** Se adicionó 1.0 mL de HCl  $1.0 \text{ mol L}^{-1}$  y se llevó a baño maría hirviendo por una hora bajo reflujo.

B. **Alcalino:** Se adicionó 1.0 mL de NaOH  $1.0 \text{ mol L}^{-1}$  y se llevó a baño maría hirviendo por una hora bajo reflujo.

C. **Oxidante:** Se adicionó 1.0 mL de peróxido de hidrógeno 1 % p/v y se llevó a baño maría hirviendo por una hora bajo reflujo.

D. **Reductor:** Se adicionó 1.0 mL de HCl  $1.0 \text{ mol L}^{-1}$ , una granalla de zinc metálico y se llevó a baño maría hirviendo por una hora bajo reflujo.

En todos los casos anteriores, la solución se enfrió a temperatura ambiente luego del tratamiento, se neutralizó con NaOH  $1.0 \text{ mol L}^{-1}$  o HCl  $1.0 \text{ mol L}^{-1}$  según correspondiera y se llevó a 20.0 mL con diluyente de muestra para obtener una concentración de NIC aproximada de  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

E. **Térmico:** una porción de NIC se llevó a estufa de  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 48 h.

F. **Lumínico:** otra porción se expuso a la luz solar directa durante 48 h totales.

Con las muestras sometidas a los dos últimos tratamientos se prepararon luego soluciones muestras tal como se describió en 3.5.4.3.

Finalmente se estudiaron también muestras envejecidas naturalmente por más de dos años y se evaluaron los productos de degradación y la pureza de los picos de los analitos.

#### 3.5.7.3. Linealidad, precisión y exactitud

La linealidad para ambos analitos se evaluó utilizando las soluciones estándar de calibración y estudiando en forma independiente cada nivel por triplicado. Se aplicaron las pruebas estadísticas para homogeneidad de la varianza y falta de ajuste que se describieron en la introducción.

La precisión se evaluó para el nivel de repetibilidad o variabilidad intra-ensayo analizando seis veces, en forma independiente, una muestra comercial. Para cada réplica se aplicó el procedimiento analítico completo en el mismo día por el mismo operador. La precisión intermedia o variabilidad inter-ensayo se estudió realizando otras seis réplicas de la misma muestra pero en otro día y por otro operador.

La exactitud se determinó analizando las matrices fortificadas con estándar. Cada nivel de fortificación se estudió por triplicado y se calcularon las recuperaciones de las cantidades de estándar adicionadas.

### 3.6. Resultados y discusión

#### 3.6.1. Optimización de la separación cromatográfica

##### 3.6.1.1. Ajuste de los modelos y obtención de las superficies de respuesta

Los resultados obtenidos en los experimentos del diseño se utilizaron para construir un modelo para cada respuesta ajustando un polinomio tal como se vio en la Introducción.

En cada modelo, los coeficientes fueron calculados por regresión múltiple aplicando la estrategia de eliminación por retroceso. Esta estrategia consiste en construir inicialmente un modelo completo y evaluar luego cada término a través de ANOVA para eliminar uno a uno los términos no significativos ( $\alpha = 0.10$ ). Esta iteración se detiene cuando todos los términos restantes cumplen con el nivel de probabilidad fijado. De esta manera se obtuvo para cada respuesta un modelo simplificado incluyendo en cada caso los términos significativos y aquellos términos necesarios

para mantener la jerarquía. Los modelos que mejor explicaban el comportamiento de las respuestas en función a los factores analizados fueron, en todos los casos, del tipo lineal con interacciones. Cada modelo se validó finalmente verificando que el mismo resultara significativo para la prueba de ANOVA con un  $p < 0.05$  y que su falta de ajuste fuera no significativa con un  $p > 0.05$ . En la Tabla 3.6 se muestran estos resultados.

Tabla 3.6: Términos y ANOVA de los modelos

Respuesta (y)	Términos Significativos ( $x_i$ )	Términos Jerárquicos ( $x_i$ )	ANOVA	
			Valor de probabilidad (p) <sup>a</sup> Modelo	Falta de ajuste
$K'_{HDP}$	D-CD	C	0.004	0.916
$T_{HDP}$	AC-AB	A-B-C	0.019	0.772
$R_{HDP}$	B-AC	A-C	0.015	0.995
$R_{DNC}$	AC	A-C	0.044	0.429
$t_{DNC}$	AC	A-C	0.016	0.422

Donde: A=HSS ( $\text{mmol L}^{-1}$ ), B=AS ( $\text{mmol L}^{-1}$ ), C= pH de la reguladora y D= Temp del horno de columna ( $^{\circ}\text{C}$ ).

<sup>a</sup> Un valor de  $p < 0.05$  indica que el parámetro evaluado es significativo.

Una vez propuesto cada modelo se aplicaron sobre los mismos varias pruebas estadísticas a los fines de comprobar que se cumplieran los supuestos del ANOVA:

- Prueba de normalidad:
  - Gráfico de los residuos en función de la probabilidad normal
  - Gráfico de Box-Cox
- Prueba de homocedasticidad:
  - Gráfico de los residuos en función de los valores predichos
  - Gráfico de los residuos en función de los niveles para cada factor
- Prueba de la independencia de las observaciones:
  - Gráfico de los residuos en función del orden de los experimentos

En todos los casos se comprobó que los modelos cumplían con estas pruebas.

Además, para determinar si dentro de los resultados de los experimentos había puntos demasiado influyentes en los modelos, conocidos por su nombre en inglés como *outliers*, y que debieran por lo tanto ser eliminados del mismo se estudiaron:

- Los residuos estudentizados externos
- El *leverage* o brazo de palanca

- La distancia de Cook

sin que se viera la necesidad de eliminar ninguno de los resultados experimentales en los modelos elaborados.

Finalmente se obtuvieron las superficies de respuesta para cada modelo en función de las variables estudiadas. En la Figura 3.6 se representan dichas superficies para los factores más significativos en cada caso y las ecuaciones de los modelos ajustados.

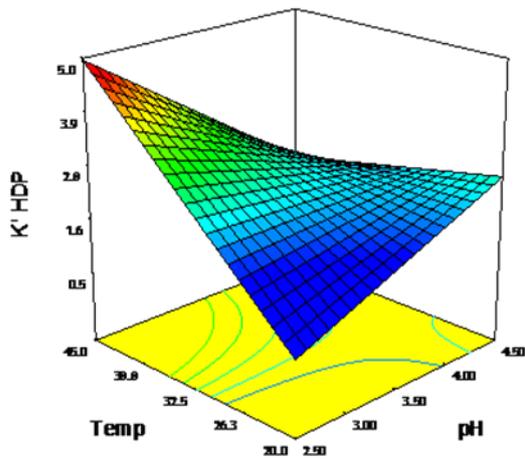
#### 3.6.1.2. Aplicación de la función Deseabilidad

Como puede apreciarse, con una simple inspección visual de las superficies de respuestas obtenidas no es posible encontrar las condiciones experimentales óptimas; es decir la mejor combinación de los niveles de los cuatro factores para alcanzar simultáneamente valores aceptables para las cinco respuestas evaluadas. En estos casos es de gran utilidad la aplicación de la **función Deseabilidad de Derringer** que se describió en la Introducción.

En primer lugar, se creó una función **deseabilidad individual** ( $d_i$ ) para cada respuesta utilizando el correspondiente modelo ajustado y seleccionando el criterio de optimización a lograr en cada caso. Los factores también fueron incluidos en el procedimiento de optimización simultánea a los fines de priorizar el uso de ciertas condiciones más convenientes dentro de la región experimental. En ambos casos se seleccionaron los rangos más deseables para las variables y se estableció si la misma debía maximizarse, minimizarse, mantenerse dentro de un rango o alcanzar un valor objetivo. Además, a cada uno de estos criterios se les asignó un **peso** ( $w_i$ ) o énfasis para alcanzar el objetivo.

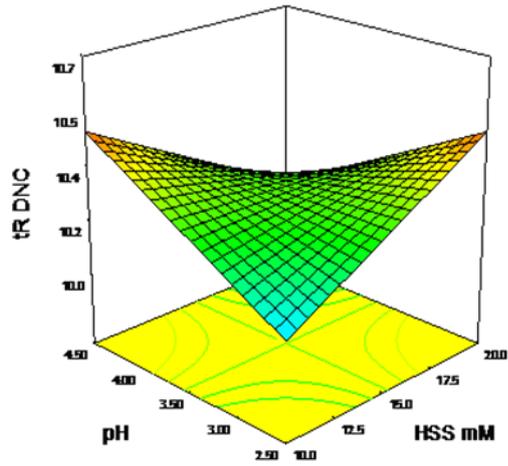
En segundo lugar, se obtuvo la función deseabilidad global ( $D$ ) utilizando la Ecuación 1.5 para lo cual se asignó a cada  $d_i$  un valor de **importancia relativa** ( $r_i$ ).

Figura 3.6: Superficies de respuesta y modelos ajustados



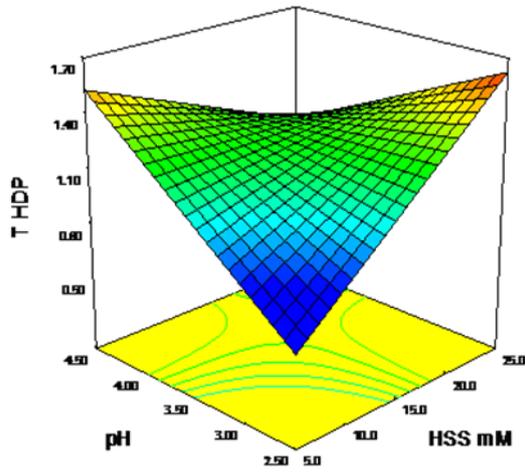
HSS=15.0 mmol L<sup>-1</sup> y AS=60.0 mmol L<sup>-1</sup>

$$K'_{HDP} = -10.8 + 3.1 \times \text{pH} + 0.44 \times \text{Temp} - 0.11 \times \text{pH} \times \text{Temp}$$



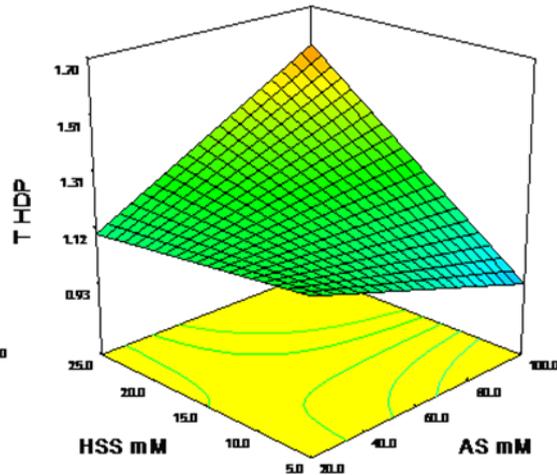
Temp = 32.5°C y AS=60.0 mmol L<sup>-1</sup>

$$t'_{DNC} = 8.2 + 0.13 \times \text{HSS} + 0.58 \times \text{pH} - 0.039 \times \text{HSS} \times \text{pH}$$

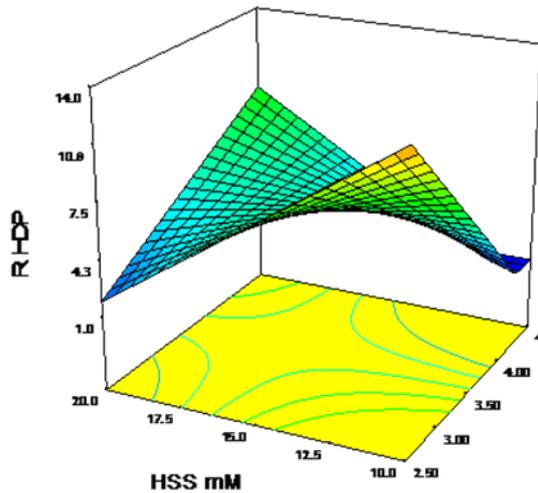


Temp = 32.5°C y AS=60.0 mmol L<sup>-1</sup>

$$T'_{HDP} = -0.99 + 0.12 \times \text{HSS} + 0.66 \times \text{pH} - 0.01 \times \text{AS} - 0.04 \times \text{HSS} \times \text{pH} + 0.01 \times \text{HSS} \times \text{AS}$$

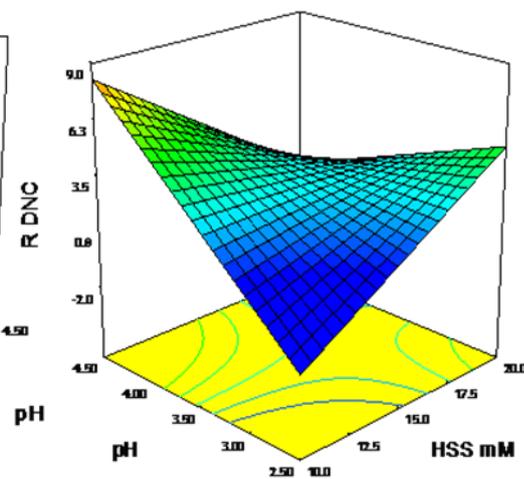


Temp = 32.5°C y pH=3.50



Temp = 32.5°C y AS=60.0 mmol L<sup>-1</sup>

$$R'_{HDP} = 67.5 - 3.9 \times \text{HSS} - 18.2 \times \text{pH} + 0.05 \times \text{SA} + 1.1 \times \text{HSS} \times \text{pH}$$



Temp = 32.5°C y AS=60.0 mmol L<sup>-1</sup>

$$R'_{DNC} = -38.4 + 2.4 \times \text{HSS} + 12.0 \times \text{pH} - 0.71 \times \text{HSS} \times \text{pH}$$

En la Tabla 3.7 se muestran los parámetros y criterios de optimización para cada variable.

Tabla 3.7: Criterios de optimización

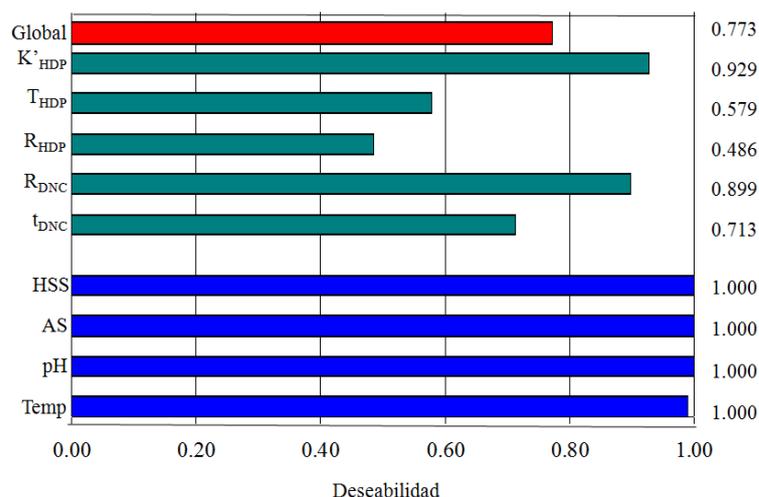
Variable	Criterio	Límite		Peso		Importancia
		Inferior	Superior	Inferior	Superior	
HSS	Minimizar	10.0	20.0	-	1	3
AS	Minimizar	20.0	100.0	-	1	3
pH	En rango	3.00	4.00	-	-	3
Temp	En rango	25.0	40.0	-	-	3
$K'_{HDP}$	Maximizar	1.60	4.62	0.5	-	5
$T_{HDP}$	Objetivo=1.0	0.77	1.65	0.5	0.5	5
$R_{HDP}$	Maximizar	2.00	16.30	0.5	-	3
$R_{DNC}$	Maximizar	2.00	9.20	0.2	-	3
$t_{DNC}$	Minimizar	9.94	10.52	-	0.1	2

Las concentraciones para HSS y AS están dadas en  $\text{mmol L}^{-1}$  y la temperatura en  $^{\circ}\text{C}$ .

Como puede observarse, además de optimizar las respuestas necesarias para obtener picos cromatográficos adecuados, también tratamos de minimizar la concentración de sales en la fase móvil a los fines de reducir costos de análisis y prolongar la vida útil de la columna. Debido a que  $K'_{HDP}$  y  $T_{HDP}$  eran los parámetros más críticos a optimizar para asegurar una buena retención de este compuesto; se les asignó a los mismos una importancia de 5. Por el contrario, a  $t_{DNC}$  se le asignó una importancia menor debido a la escasa variabilidad que había mostrado en los resultados de los experimentos. La importancia de las variables restantes se fijó en un valor intermedio.

La Figura 3.7 muestra las  $di$  obtenidas para cada variable en las condiciones experimentales optimizadas. Es destacable que estas condiciones óptimas se alcanzaron manteniendo en un valor mínimo las concentraciones de las sales en la fase móvil. Es por eso que tanto para HSS, como para AS se obtuvieron  $di=1.00$ .

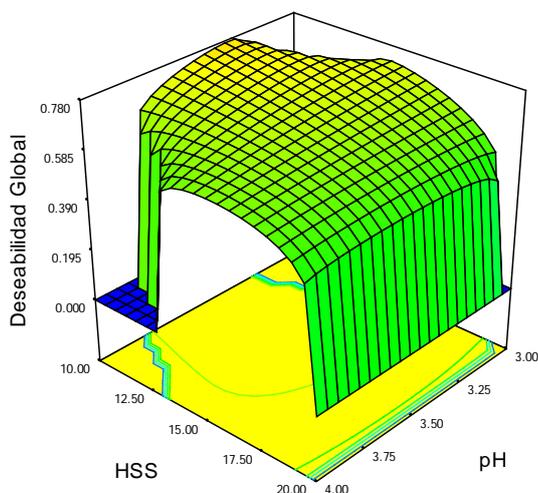
Figura 3.7: Deseabilidades individuales



Para evaluar el comportamiento global del sistema se calcularon con el programa Design Expert, numerosos valores de  $D$ . Para esto se utilizaron las funciones  $d_i$  creadas para cada respuesta y se obtuvieron los resultados de las mismas para muchas combinaciones diferentes de los factores en el espacio experimental.

La Figura 3.8 muestra la superficie de respuesta para  $D$ , graficando estos valores calculados en función de los factores más influyentes: HSS y pH, para valores fijos de las otras variables: 20.0 mmol L<sup>-1</sup> de AS y 40.0 °C de temperatura.

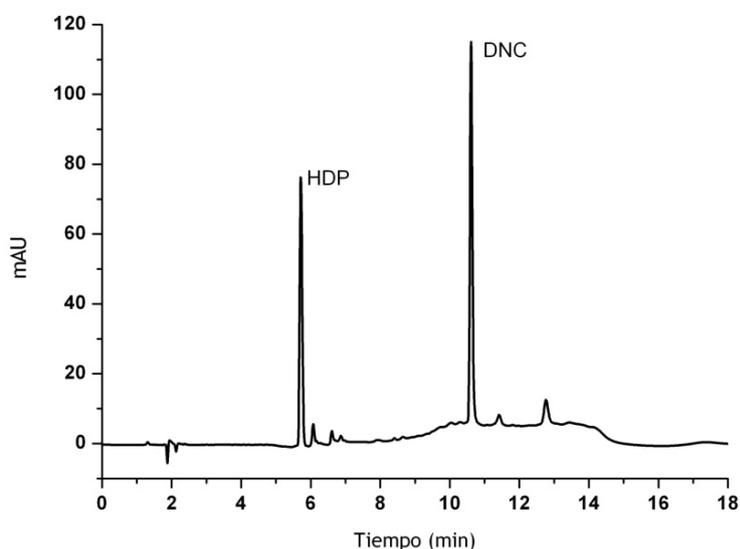
Figura 3.8: Deseabilidad global



Finalmente, se seleccionaron los valores de las variables que maximizaban  $D$  y se establecieron estos valores como las condiciones experimentales óptimas del sistema en estudio. Las mismas resultaron ser:  $10.0 \text{ mmol L}^{-1}$  para HSS,  $20.0 \text{ mmol L}^{-1}$  para AS,  $\text{pH} = 3.30$  y temperatura de  $40.0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para esta combinación de factores, los modelos ajustados predicen para cada respuesta los siguientes intervalos de confianza (95% CI):  $K'_{\text{HDP}} = 2.69\text{-}3.59$ ,  $T_{\text{HDP}} = 0.97\text{-}1.28$ ,  $R_{\text{HDP}} = 2.36\text{-}8.45$ ,  $R_{\text{DNC}} = 0.82\text{-}4.08$  and  $t_{\text{DNC}} = 10.18\text{-}10.30 \text{ min}$ . La deseabilidad global en estas condiciones, es igual a  $0.773$ , valor que puede considerarse altamente aceptable teniendo en cuenta el número de variables que se optimizaron simultáneamente.

Las respuestas obtenidas en las condiciones óptimas sugeridas por el modelo fueron corroboradas experimentalmente obteniéndose con ellas una señal cromatográfica como la que se muestra en la Figura 3.9. El análisis de los parámetros cromatográficos de los picos que se informan en la Tabla 3.8, permiten concluir que los modelos matemáticos ajustados por *MSR* poseen una muy buena capacidad predictiva.

Figura 3.9: Cromatograma de una muestra real en condiciones optimizadas



Señal de una solución muestra conteniendo  $40.0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de NIC, obtenida a  $300 \text{ nm}$  en fase móvil: HSS  $10.0 \text{ mmol L}^{-1}$ , AS  $20.0 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 3.30$  y temperatura de  $40.0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.6.2. Validación y cifras de mérito

Los resultados de la evaluación de la adecuación del sistema cromatográfico y del procedimiento de validación se encuentran resumidos en la Tabla 3.8.

#### 3.6.2.1. Selectividad

En primer lugar se verificó, que ni el diluyente de muestra, ni la solución muestra blanco, ni la maduramicina amónica producían picos en las regiones de los tiempos de retención de los analitos.

Además los resultados de las pruebas de degradación forzada indicaron, por un lado, que NIC es considerablemente estable en las condiciones de estrés sometidas, produciéndose la mayor proporción de degradación en condiciones reductoras. Por otro lado se verificó la gran selectividad lograda con el método desarrollado, ya que en todos los casos se obtuvieron resoluciones mayores a 2.0 para los picos de los analitos.

Finalmente la evaluación de pureza de pico en los cromatogramas de las muestras dio como resultado una alta homogeneidad de pico para ambos analitos, con un factor de pureza mayor a 99.9% y curvas de similitud por arriba del umbral en todos los casos.

#### 3.6.2.2. Linealidad y rango

Aplicando el método de los cuadrados mínimos se realizó la regresión lineal simple de las áreas de los picos de los analitos obtenidos con las soluciones estándares de calibración vs la concentración ( $\text{mg L}^{-1}$ ) nominal de cada uno de ellos. La homocedasticidad de los datos se evaluó en forma visual inspeccionando una gráfica de distribución de los residuos en función de los niveles de calibración y en forma estadística a través de una prueba  $F$  para comparación de varianzas en los extremos inferiores y superiores del rango. Como puede verse en la Tabla 3.8, la diferencia entre el valor observado y el valor crítico de  $F$  resultó ser no significativa ( $\alpha=0.05$ ). De la misma manera, puede verse que la falta de ajuste al modelo lineal no fue significativa.

Todos los parámetros de calibración obtenidos para los analitos, así como los criterios de aceptación empleados se muestran en la Tabla 3.8.

En virtud de que los rangos de concentración estudiados fueron del 80.0 al 120.0 % de las concentraciones esperadas para las muestras comerciales; tal como lo

establecen las guías ICH para componentes mayoritarios; en este trabajo no se determinaron LOD ni LOQ.

### 3.6.2.3. Precisión y exactitud

Los coeficientes de variación obtenidos para las réplicas de las series intra e inter-ensayo tienen valores muy por debajo del límite crítico, mientras que la prueba  $F$  ( $\alpha=0.05$ ) de comparación de series demostró que no hay diferencia estadística significativa entre las desviaciones estándar y los promedios de ambas series; lo que demuestra la alta precisión del método.

Tabla 3.8: Cifras de mérito

Parámetro	HDP	DNC	Criterio de aceptación
<b>Adecuación del sistema (<math>n=6</math>)</b>			
Tailing (T)	1.14 (0.5) <sup>a</sup>	1.13 (0.2) <sup>a</sup>	$\leq 2.0$
Factor de capacidad (K')	2.40 (0.1) <sup>a</sup>	5.25 (0.5) <sup>a</sup>	$\geq 2.0$
Resolución (R)	2.56 (0.4) <sup>a</sup>	4.68 (0.2) <sup>a</sup>	$\geq 2.0$
Coefficiente de variación de las áreas (CV)	0.14	0.12	$\leq 2.0$
<b>Linealidad</b>			
Rango ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	10.3 - 15.5	21.7 - 33.0	
Ordenada	-2.7 (5.8) <sup>b</sup>	-2.1 (8.8) <sup>b</sup>	
Intervalo de confianza de la ordenada (95% IC)	-2.7 $\pm$ 12.0	-2.1 $\pm$ 30.4	Incluye al 0
Pendiente	32.0 (0.4) <sup>b</sup>	20.5 (0.5) <sup>b</sup>	
S de los residuos	3.6	7.6	CV $\leq 2.0$
Homogeneidad de las varianzas	$F_{cal} = 1.05$	$F_{cal} = 2.25$	$F_{crit} 2,2 (0.05) = 19.00$
Falta de ajuste	$F_{cal} = 2.25$	$F_{cal} = 0.96$	$F_{crit} 13,10 (0.05) = 2.89$
R <sup>2</sup>	0.997	0.996	$\geq 0.99$
<b>Precisión</b>			
Intra-ensayo (CV)	0.38	0.46	$\leq 2.0$
Inter-ensayo (CV)	0.62	0.90	$\leq 2.0$
Varianza entre series	$F_{cal} = 5.22$	$F_{cal} = 2.25$	$F_{crit} 5,5 (0.05) = 7.39$
<b>Exactitud</b>			
Recuperación (%)			
Nivel=80.0% ( $n=3$ )	99.3 (0.9) <sup>a</sup>	101.4 (0.5) <sup>a</sup>	
Nivel=100.0% ( $n=3$ )	100.2 (1.4) <sup>a</sup>	98.0 (0.4) <sup>a</sup>	98.0 - 102.0 %
Nivel=120.0% ( $n=3$ )	99.1 (0.5) <sup>a</sup>	100.4 (0.7) <sup>a</sup>	CV $\leq 2.0$
Recuperación global (%) ( $n=9$ )	99.5 (1.0) <sup>a</sup>	99.9 (1.6) <sup>a</sup>	
Diferencia del 100.0%	$t_{cal} = 1.44$	$t_{cal} = 0.19$	$t_{crit} 8 (0.05) = 2.31$

<sup>a</sup> El valor entre paréntesis es el coeficiente de variación

<sup>b</sup> El valor entre paréntesis es la desviación estándar

Por otro lado, se calculó la recuperación de la cantidad adicionada de los componentes de NIC en las matrices fortificadas con estándar en cada nivel estudiado. Luego se obtuvo la recuperación global, involucrando a todos los experimentos de fortificación. Mediante una prueba  $t$  ( $\alpha=0.05$ ) se demostró, tal como se muestra en la Tabla 3.8, que esta recuperación global obtenida, no es estadísticamente diferente al valor teórico ideal de 100.0%.

Además, para verificar la ausencia de efecto matriz se realizó una regresión lineal por cuadrados mínimos de las áreas de los picos de los analitos obtenidos con las soluciones de matriz fortificadas vs las concentraciones de fortificación. Las pruebas de ANOVA ( $\alpha=0.05$ ) para comparación de pendientes y ordenadas al origen demostraron que no hay diferencias significativas entre estas regresiones y las obtenidas con las soluciones estándares, por lo que no existe efecto matriz.

Estos resultados nos permitieron comprobar que el método es capaz de cuantificar los analitos sin errores sistemáticos ni proporcionales considerables, aún utilizando un procedimiento de calibración externo.

### 3.6.3. Aplicaciones

El método desarrollado fue utilizado en la determinación de los componentes de NIC en varias muestras comerciales. Si bien la validación del método se llevó a cabo para la muestra “**Maduracimina-Nicarbazina**” de Laboratorios FACYT S.A., se ensayó la aplicación de este método al análisis de muestras menos complejas y de semejantes características a la empleada para la validación, como por ejemplo: materias primas y aditivos alimentarios conteniendo sólo NIC como principio activo.

Al analizar estas muestras encontramos variaciones considerables en la relación molecular DNC:HDP dentro de las mismas. Algunos de estos resultados se muestran en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9: Resultados obtenidos al analizar NIC en muestras comerciales

Muestra	DNC (% p/p)	HDP (% p/p)	Relación (DNC: HDP)	NIC (% p/p)
Materia Prima	1 68.0 (0.3) <sup>a</sup>	29.4 (0.2)	0.949 :1.00	97.4 (0.3)
	2 65.5 (0.4)	32.1 (0.2)	0.838: 1.00	97.6 (0.4)
	3 67.7 (0.4)	31.2 (0.3)	0.887 : 1.00	98.9 (0.4)
Aditivo alimentario NIC 25%	20.5 (0.5)	8.48 (0.08)	0.992: 1.00	29.0 (0.5)
Aditivo alimentario NIC 8%	6.18 (0.06)	2.52 (0.05)	1.01: 1.00	8.70 (0.05)

<sup>a</sup> Los valores entre paréntesis indican desviación estándar (n=3)

### 3.7. Conclusiones

En el presente capítulo se presentó el desarrollo, la optimización y la validación de un método simple y rápido basado en cromatografía de apareamiento iónico, para la determinación simultánea de HDP y DNC en aditivos alimentarios.

La utilización de herramientas quimiométricas, tales como el diseño experimental y la optimización multirrespuesta, permitieron de manera sencilla y eficiente, conocer a fondo el sistema en estudio, elaborar modelos matemáticos que explicaran su comportamiento y encontrar a través de ellos, las condiciones óptimas que aseguran un buen rendimiento del método.

El método presentado resulta muy útil en la realización de análisis de rutina para el control de calidad de muestras comerciales, en concordancia con la reglamentación vigente en nuestro país (SENASA Resolución 482/2002). El mismo permite obtener además, en el mismo procedimiento, la relación molecular (HDP:DNC) en las muestras analizadas. Esta es una ventaja considerable del nuevo método ya que permite una caracterización más completa de los productos comerciales, en comparación con la simple determinación de DNC que se venía haciendo hasta el momento.

Por otro lado, basados en los resultados de especificidad y de degradación forzada obtenidos, podemos concluir que el método puede ser utilizado también para los controles de estabilidad del producto. Estos controles permiten establecer fechas de vencimiento o períodos de aptitud de los productos, así como asegurar el buen estado de conservación de muestras almacenadas por largos periodos de tiempo.

# Capítulo 4

## Pteridinas en orina

Corrección de línea de base y  
aplicación de MCR-ALS

## 4.1. Pteridinas

### 4.1.1. Características físico-químicas

El término **pteridina** es un vocablo de raíz griega, derivado de la palabra “**pteron**”, que significa **ala** y fue creado en 1941 por Heinrich Wieland para designar a los pigmentos presentes en las alas de las mariposas. Luego de su descubrimiento, estos pigmentos, de color amarillo, naranja o rojo, se han aislado de numerosas fuentes naturales tales como plantas, microbios, ojos de insectos y pájaros, peces y anfibios, como así también de la orina humana y la de otros mamíferos superiores (Brown 1998, Martínez y Barbosa 2010).

Las pteridinas son una familia de compuestos heterocíclicos que tienen en común un doble anillo de diez átomos, de los cuales, cuatro de ellos son átomos de nitrógeno, por lo cual pueden definirse como tetra-azo-naftalenos. El heterociclo pteridínico está basado en un anillo pirimidínico y otro de pirazina y puede presentar una gran variedad de sustituciones, dando lugar a las distintas pteridinas naturales y sintéticas.

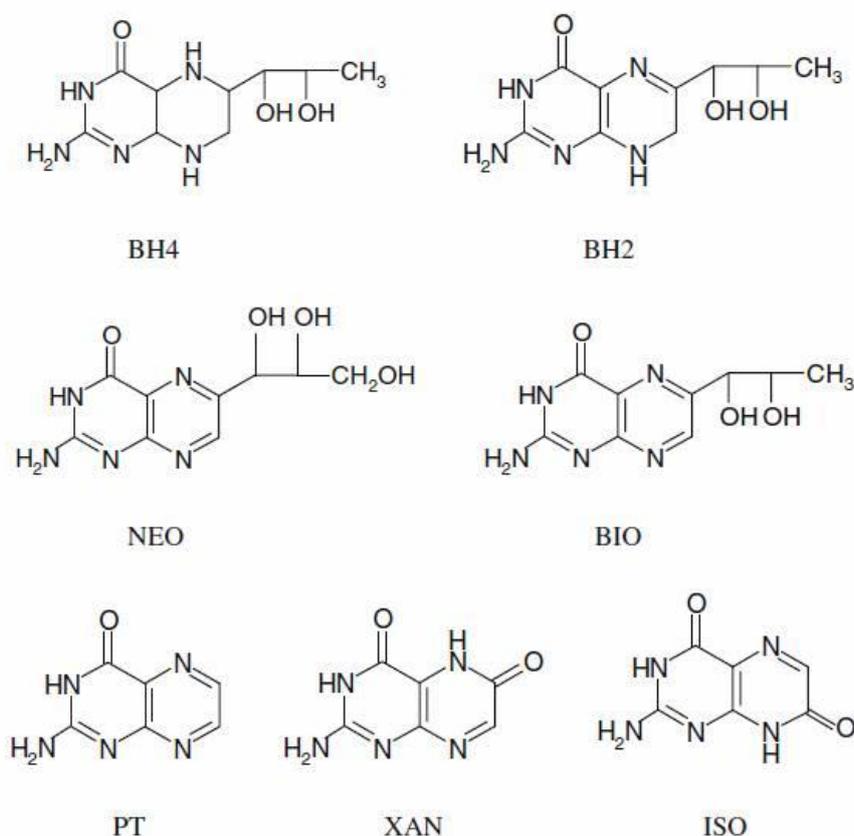
El ácido fólico (vitamina B9), precursor del ADN e implicado en diversas y relevantes rutas metabólicas, es posiblemente una de las pteridinas naturales más conocidas.

Por otro lado, la tetrahidrobiopterina (BH4) es la pteridina no conjugada más abundante en los fluidos biológicos humanos, siendo la dihidrobiopterina (BH2) y la biopterina (BIO) sus productos de oxidación directa (Bjelaković y col 2004). Otros metabolitos importantes de BH4 en humanos son el pterin (PT), el neopterin (NEO), el xantopterin (XAN) y el isoxantopterin (ISO), todos ellos en estado oxidado.

Una característica importante de las pteridinas oxidadas es que, además de poseer color y por lo tanto absorptividad de luz ultravioleta y visible, son compuestos intensamente fluorescentes, estando esta fluorescencia muy afectada por las condiciones de acidez del medio (Thomas y col 2002). Las especies reducidas BH2 y BH4 no presentan fluorescencia, por lo que deben oxidarse completamente para poder ser determinadas por técnicas de luminiscencia (Cañada-Cañada y col 2009b). En general, todas las pteridinas son muy sensibles a la luz (Durán Merás y col 2005).

En la Figura 4.1 se presentan las estructuras químicas de las principales pteridinas presentes en fluidos biológicos humanos, donde juegan un rol muy importante como cofactores enzimáticos del metabolismo celular.

Figura 4.1: Estructura química de las principales pteridinas de los fluidos biológicos humanos



#### 4.1.2. Funciones bioquímicas

El rol más importante de BH4 es el de actuar como cofactor en la reacción de hidroxilación de los aminoácidos cíclicos. También es un cofactor de las enzimas fenilalanina-4-hidroxilasa (PAH), tirosina-3-hidroxilasa (TH) y tryptofano-5-hidroxilasa (TPH), enzimas claves en la biosíntesis de aminas biogénicas (Scriver y col 1995). La síntesis de los neurotransmisores dopamina, noradrenalina y serotonina está regulada también por BH4 (Marletta 1993). El mecanismo de acción de BH4 es a través de la donación de electrones, oxidándose a BH2, que luego es reciclado a BH4 por acción de la enzima dihidropterinreductasa (DHPR) (Scriver y col 1995). El nivel plasmático adecuado de BH4 es entonces fundamental para el metabolismo celular y el correcto funcionamiento del sistema neuroendócrino.

También se ha informado sobre la acción que ejercen las pteridinas como moduladoras del estrés oxidativo, ya que estas moléculas son capaces de eliminar radicales libres (Martinez y Barbosa 2010).

#### 4.1.3. Las pteridinas como biomarcadores

Desde hace tiempo, se sabe que existe una cierta correlación entre niveles elevados de pteridinas en fluidos biológicos y tres grupos de desordenes en la salud: las hiperfenilalaninemias, las enfermedades malignas y los estados inflamatorios severos (Müller y col 1991). También se han reportado niveles aumentados de BIO en la orina de niños autistas (Messahel y col 1988) y concentraciones elevadas de NEO en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Blasco y col 2007).

Si bien NEO ha sido considerado desde un comienzo como un importante marcador de la evolución del cáncer, actualmente se emplean en el laboratorio clínico las cantidades relativas de las distintas pteridinas como marcadores de diagnóstico y seguimiento de las enfermedades malignas. Así, se sabe que los niveles de NEO, XAN y PT están aumentados en la orina de pacientes con cáncer y que la relación NEO/BIO excretado, que normalmente ronda en 1.4, sube a niveles mayores a 2.1, a la vez que se observa una disminución de la cantidad de ISO (Mullery col 1991, Han y col 1999). Más recientemente, otros autores han reportado aumentos en la excreción tanto de BIO, como de 6-hydroximetilpterin, PT, XAN e ISO en orinas de pacientes con cáncer de pulmón y de mama (Gamagedara y col 2011).

Por otro lado, las alteraciones en el metabolismo de BH4 dan lugar a distintas enfermedades. Se sabe, por ejemplo, que un defecto congénito de PAH genera la fenilcetonuria clásica, enfermedad caracterizada por altos niveles séricos de fenilalanina asociada a trastornos mentales. En cambio, cuando lo que está afectada es la síntesis o el reciclado de BH4, situación que puede darse por deficiencia congénita de alguna de las enzimas que intervienen en el ciclo metabólico de BH4, se da lugar a otro grupo de enfermedades a las que se denomina hiperfenilalaninemias, caracterizadas por bajos niveles de L-DOPA, serotonina y otros neurotransmisores (Rezvani 1996). El diagnóstico diferencial de estas patologías debe realizarse tempranamente en los recién nacidos, ya que cada una de ellas tiene un tratamiento y/o terapia sustitutiva diferente (Dhondt 2010). Actualmente se realiza este diagnóstico midiendo los niveles de pteridinas en fluidos biológicos, especialmente de NEO y BIO en orina (Bjelakovic y col 2004, Dhondt 2010), cuyos niveles varían de acuerdo a la enzima afectada (Cañada-Cañada y col 2009b).

El NEO y su forma reducida 7,8 dihidroneopterin, son también marcadores relacionados a la respuesta inmune, siendo producidos por los monocitos y los macrófagos activados, por ejemplo, durante una infección viral (Huber y col 1983, Murr y col 2002, Svoboda y col 2008).

## 4.2. Orina

La eliminación de productos de desecho potencialmente tóxicos para el organismo y la regulación de los equilibrios hidroeléctricos y acido-base, constituyen las principales funciones renales, llevadas a cabo mediante la formación de la orina. Para esto, los riñones filtran grandes volúmenes de plasma, reabsorben gran parte de lo filtrado y secretan algunas sustancias, formando de esta manera, una solución concentrada de desechos metabólicos, la orina, que es excretada por el sistema urinario (Kaplan y Pesce 2009).

Muchos fármacos y sus metabolitos, pigmentos, colorantes y otros componentes de los alimentos son eliminados también por este mecanismo.

La orina humana es un líquido acuoso, cuyo color puede variar de un amarillo muy pálido hasta muy oscuro, dependiendo fundamentalmente del volumen y la cantidad de solutos excretados. Un adulto sano puede producir entre 750 y 2000 mL de orina por día, cuya densidad varía entre 1.005 y 1.030 g mL<sup>-1</sup> y su pH entre 4.7 y 7.8. Normalmente, la orina contiene alrededor de un 96 % de agua y un 4% de sólidos en solución, siendo el más abundante de ellos la urea, el principal producto de degradación del metabolismo de las proteínas, con una concentración que ronda los 20 g L<sup>-1</sup>. Otros constituyentes mayoritarios de la orina normal son la creatinina, el ácido úrico y las sales conformadas fundamentalmente por cloruros, fosfatos, sulfatos, sodio, potasio, amonio, calcio y magnesio. Además, la orina contiene otras sustancias en muy bajas concentraciones, tales como ácido hipúrico, urobilinógeno, bilirrubina, glucosa, hormonas, vitaminas y pteridinas; y elementos en suspensión como células, cristales, moco y bacterias (Kaplan y Pesce 2009, Strasinger 2010).

## 4.3. El problema analítico

Como se vio, numerosas investigaciones han demostrado el gran potencial de las pteridinas como biomarcadores para el diagnóstico temprano del cáncer y para la diferenciación de las distintas clases de fenilcetonuria. Más aún, últimamente se han tenido también indicios de que cada tipo de tumor resulta en un patrón diferente en los perfiles de concentración de las distintas pteridinas (Gamagedara y col 2011). Es por esto, que se necesita contar con métodos analíticos confiables que permitan determinar fácilmente estos biomarcadores, tanto en personas sanas como en enfermos.

Es importante tener en cuenta también, que generalmente los pacientes son reticentes a los análisis que implican una toma de muestra invasiva, como por ejemplo, una extracción de sangre o de tejidos, sobre todo cuando se trata de un monitoreo preventivo. Por lo tanto, actualmente muchos investigadores se están avocando al desarrollo de medios de diagnóstico no invasivos para analizar los biomarcadores del cáncer. Una muy buena alternativa en estos casos, es el análisis de orina, muestra que es mucho más fácil de tomar y que predispone mejor al paciente para su recolección.

La concentración de pteridinas en la orina humana ronda generalmente 2-10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , siendo estos valores dependientes de la diuresis, por lo que, generalmente se normalizan sus concentraciones informándolas como la relación pteridina/creatinina.

La creatinina (CREA), se considera el mejor estándar interno natural para normalizar la excreción urinaria de muchos metabolitos (Salvatore y col 1983) y se encuentra en orina en concentraciones que rondan lo 0.90 a 1.20  $\text{mg mL}^{-1}$ . Con el objetivo de minimizar errores y producir mediciones comparables mediante esta estandarización, es por lo tanto deseable, disponer de métodos que determinen simultáneamente las pteridinas y la CREA presentes en la misma muestra de orina (Durán Merás y col 2005).

#### 4.3.1. Antecedentes

La principal técnica empleada para el análisis de pteridinas ha sido la CLAR en fase reversa con detección fluorescente, previa oxidación de las pteridinas reducidas. Las separaciones se han logrado empleando fases móviles preparadas con diferentes soluciones reguladoras de pH, tales como Tris-HCl a pH 6.8 (Espinosa Mansilla y col 2001a, Durán Merás y col 2005), citrato/ácido cítrico a pH 5.5 (Espinosa-Mansilla y col 2008, Cañada-Cañada y col 2009b) o fosfatos a pH 3.0 (Tomaucl y col 2003). Recientemente, se han determinado cuatro pteridinas (NEO, BIO, BH2 y 7,8-dihidroneopterin) utilizando una fase estacionaria hidrofílica en un sistema UPLC con detección fluorescente y espectroscopia de masa (Novakova 2010). Otra alternativa propuesta para determinar simultáneamente NEO en orina como marcador de respuesta inmune y 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina como marcador de estrés oxidativo, ha sido un sistema automatizado de cromatografía de intercambio iónico acoplada a fase reversa, con detección UV y fluorescente (Svoboda y col 2008).

También se ha desarrollado un método por electroforesis capilar acoplada a un sistema de detección de fluorescencia inducida por laser, para determinar varias pteridinas en orinas de pacientes con cáncer (Han 1999).

Por otro lado, se han empleado diferentes técnicas espectroscópicas acopladas a tratamiento quimiométrico de los datos para la determinación de pteridinas conjugadas y no conjugadas. Así, NEO, PT, XAN e ISO se han determinado espectroscópicamente en combinación con PLS (Espinosa-Mansilla y col 1998), y mezclas binarias de XAN/BIO y de ISO/XAN se analizaron utilizando datos de fluorescencia sincrónica procesados por PLS o HLA (del inglés, *hybrid linear análisis*) (Espinosa Mansilla y col 2001b). Otros investigadores han determinado las pteridinas en suero humano en presencia de los compuestos relacionados ácido fólico y ácido 5-metiltetrahidrofólico, procesando datos cinéticos medidos por fluorescencia por medio de métodos de calibración multivariada de segundo orden (Jiménez Girón y col 2008a) y datos de matrices de excitación-emisión en función del tiempo de irradiación procesados por algoritmos de tercer orden (Jiménez Girón y col 2008b).

La oxidación de las pteridinas reducidas BH4 y BH2 para transformarlas en la especie BIO fluorescente se ha llevado a cabo tradicionalmente con permanganato de potasio (Espinosa Mansilla y col 2001a, Durán Merás y col 2005) o con trióxido de potasio (Han 1999). Con este último reactivo Fukushima y Nixon desarrollaron una estrategia de oxidación diferencial, mediante la cual en medio ácido BH2 y BH4 se oxidan a BIO y en medio alcalino BH4 se oxida a PT, mientras que BH2 lo hace a BIO (Fukushima y Nixon y 1980). El contenido de BH4 y de BH2 en la muestra original puede calcularse entonces, por diferencia entre las cantidades de BIO obtenidas en la oxidación ácida, la oxidación alcalina y en la muestra sin oxidar.

Más recientemente, se ha propuesto la posibilidad de realizar una foto oxidación de los compuestos tanto en forma *off-line*, que logra la oxidación de BH4 y BH2 antes de ser separados cromatográficamente (Espinosa-Mansilla y col 2008), como *on-line* que oxida las pteridinas una vez separadas (Cañada-Cañada y col 2009b). Este último sistema logra cuantificar NEO, PT, BIO, BH2 y BH4 en una estrategia secuencial de doble inyección por muestra, una con y otra sin foto-irradiación.

#### 4.3.2. Situación actual

Si bien en los últimos años se han logrado considerables avances en la determinación de los niveles urinarios de distintas pteridinas, aún no se dispone de un método cromatográfico que logre cuantificar en forma simultánea y diferencial

todos los tipos presentes en los fluidos humanos. Esta limitación se debe fundamentalmente, a que la similitud estructural existente entre las distintas pteridinas, dificulta enormemente la completa separación de las mismas a los fines de lograr la selectividad necesaria para utilizar los métodos clásicos de calibración univariada.

El método de determinación por electroforesis capilar desarrollada por Henn (Henn 1999) es el que logra, hasta el momento, separar más cantidad de especies: BIO, ISO, PT; XAN, NEO, 6,7- dimetilpterin y ácido pterin 6-carboxílico (Gamagedara y col 2011); sin embargo el sistema de detección empleado es sumamente complejo, desarrollado por el laboratorio innovador y no disponible o accesible en laboratorios de rutina.

Aún se necesita entonces, de nuevos esfuerzos para desarrollar metodologías que logren cuantificar simultáneamente la mayor cantidad de especies en el menor tiempo posible, mediante técnicas sencillas, de fácil acceso e implementación y que permitan obtener la “**huella dactilar**” que caracterice a cada clase de cáncer en particular (Gamagedara y col 2011), como así también, que permitan contribuir al estudio de las distintas fenilcetonurias.

En este contexto, atendiendo al nuevo paradigma de la investigación biomédica, es esencial el logro de una medicina personalizada, lo que genera la necesidad de desarrollos creativos que provean de perfiles moleculares personales de cada paciente, los cuales contribuirán en la toma de decisión por parte de los profesionales de la salud (Lim y col 2011).

#### 4.3.3. Selección de la metodología

Basándonos en los desarrollos realizados por Espinosa-Mansilla, Cañada-Cañada y sus colaboradores; y en conjunto con este grupo de investigación, continuamos estudiando el sistema de separación cromatográfico de las pteridinas, incorporando el análisis quimiométrico de los datos generados por el detector de fluorescencia de barrido rápido (DF-BR) para resolver los picos solapados.

Hasta el momento se encuentran en la literatura unos pocos trabajos de procesamiento quimiométrico de datos de segundo orden provenientes de un DF-BR. Pueden destacarse el trabajo pionero de Appellof y Davidson utilizando videofluorimetría como detección de CLAR (Appellof y Davidson 1981), el uso de N-PLS y PARAFAC para la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Ferrer y col 1997, Beltrán y col 1998), la determinación de naftalensulfonatos por N-PLS (Gimeno y col 2000), la resolución de una mezcla de fluoroquinonas por PARAFAC

y N-PLS-RBL (Cañada Cañada y col 2009a) y finalmente, el análisis simultáneo de diez hidrocarburos policíclicos aromáticos (Bortolato y col 2009). Todos estos trabajos fueron desarrollados para muestras de agua, destinados al control de efluentes o de contaminación ambiental.

El algoritmo MCR-ALS, que gracias a la utilización de la ventaja de segundo orden, permite cuantificar analitos cuyas señales están altamente solapadas entre si o con interferencias de la matriz, no se había usado hasta ahora con datos de DF-BR provenientes de muestras biológicas.

Los resultados producidos por MCR-ALS al aplicarse en el procesamiento de datos cromatográficos o electroforéticos provenientes de detector de arreglo de diodos (Zhang y Li 2005, Pere-Trepat y Tauler 2006) permiten esperar un buen rendimiento de este algoritmo utilizado con datos de DF-BR.

#### 4.4. Objetivos

Los objetivos del presente capítulo de tesis fueron:

- Desarrollar un método cromatográfico acoplado a un procedimiento de **calibración multivariada de segundo orden** para determinar cinco pteridinas: NEO, ISO, XAN, BIO y PT como **biomarcadores** en orina humana en un corto tiempo de análisis.
- Utilizar **diseño experimental** a los fines de optimizar la separación de los analitos a un mínimo nivel de resolución cromatográfica, suficiente para la aplicación exitosa del algoritmo de calibración de segundo orden MCR-ALS.
- Evaluar el rendimiento de MCR-ALS al ser utilizado con datos cromatográficos provenientes de un detector de fluorescencia de barrido rápido utilizando distintas estrategias de procesamiento de datos.
- Aplicar el método desarrollado para el análisis pteridinas en muestras de orina de pacientes con diferentes patologías.

## 4.5. Materiales y métodos

### 4.5.1. Instrumental y *softwares*

Todas las experiencias se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo líquido Agilent Serie 1100 fabricado en Waldbron, Alemania. El mismo consta de una bomba cuaternaria, desgasificador de membrana, horno de columna termostaticado, inyector automático, un detector DAD y un detector DF-BR.

Para la adquisición y procesamiento de datos cromatográficos se utilizó el *software* Chemstation versión B 0103 de Agilent. Los datos tridimensionales generados por el DF-BR fueron exportados en formato ASCII por una macro desarrollada en nuestro laboratorio, para ser luego procesados por MCR-ALS.

La columna empleada como fase estacionaria fue una Eclipse XDB-C18, 250 x 4.6 mm, con un tamaño de partícula de 5 µm de Agilent Technology.

El programa Stat-Ease Design-Expert Versión 8.0.0 se utilizó para realizar el diseño experimental, el modelado de las superficies de respuesta y los cálculos de la función deseabilidad.

Las rutinas empleadas para la aplicación del algoritmo MCR-ALS de calibración multivariada de segundo orden están disponibles en Internet en la dirección: <http://www.ub.es/gesq/mcr/mcr.htm>.

### 4.5.2. Reactivos

Los estándares de NEO, XAN, BIO, ISO, PT y CREA se adquirieron en Sigma (Sigma- Aldrich Química, S.A., Madrid, España). El ácido cítrico y el hidróxido de sodio fueron suministrados por Anedra (San Fernando, Argentina). El aceonitrilo (ACN), de grado cromatográfico, se obtuvo de Merck (Darmstadt, Alemania), y el agua ultrapura de un Sistema Milli-Q Biocel (Millipore SAS, Molsheim, Francia).

### 4.5.3. Muestras

Para realizar los ensayos de validación se emplearon tres muestras de orina de personas sanas obtenidas en nuestro laboratorio. Por otro lado, siete muestras de orina de niños con diferentes patologías, se obtuvieron del Sanatorio Santa Fe de la ciudad de Santa Fe, Argentina, con el consentimiento de sus padres y se congelaron inmediatamente a - 18 °C hasta el momento de su análisis.

#### 4.5.4. Soluciones

Los solventes y soluciones preparadas para la fase móvil fueron filtrados por filtros de membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro antes de ser utilizados.

Las soluciones muestras y estándares fueron filtradas por filtro de membrana de nylon tipo jeringa en el momento previo a la inyección en el sistema cromatográfico.

##### 4.5.4.1. Fase móvil y diluyente

Como **diluyente** se utilizó una solución reguladora de ácido cítrico/citrato de sodio de 10  $\text{mmol L}^{-1}$  y  $\text{pH}=5.44$  preparada en agua ultrapura a partir de ácido cítrico e hidróxido de sodio.

La fase móvil para la cromatografía consistió en una mezcla de la solución reguladora de ácido cítrico/citrato de sodio de 10  $\text{mmol L}^{-1}$  y  $\text{pH}=5.44$  con ACN (94.5:5.5).

##### 4.5.4.2. Soluciones estándar

Se prepararon las siguientes soluciones estándar:

- **Soluciones estándar concentradas** de cada pteridina en una concentración de 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  disolviendo masas exactamente pesadas de cada estándar en volúmenes exactos de agua ultrapura. Estas soluciones, guardadas en heladera y protegidas de la luz se prepararon cada dos semanas, período durante el cual demostraron ser estables.
- **Solución estándar de optimización** por dilución de las soluciones estándares concentradas en diluyente, conteniendo las pteridinas en las siguientes concentraciones: NEO=0.5  $\text{ng mL}^{-1}$ , BIO=0.6  $\text{ng mL}^{-1}$ , PT=0.6  $\text{ng mL}^{-1}$ , XAN=4.0  $\text{ng mL}^{-1}$ , e ISO=0.5  $\text{ng mL}^{-1}$ .
- **Soluciones estándar de calibración** en forma aleatoria por diluciones convenientes de las soluciones estándares concentradas en diluyente para obtener las concentraciones especificadas en la Tabla 4.1. Los rangos de concentración para cada analito fueron: 0.5-10.5  $\text{ng mL}^{-1}$  para NEO, BIO y PT; 4.0-8.0  $\text{ng mL}^{-1}$  para XAN y 0.5-4.5  $\text{ng mL}^{-1}$  para ISO. Estos rangos se establecieron de acuerdo al rango lineal de fluorescencia en función de la concentración (Cañada-Cañada 2009b).
- **Solución estándar de CREA** de 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  disolviendo una masa exactamente pesada en un volumen exacto de agua ultrapura.

Tabla 4.1: Concentraciones de calibración

Calibrador	NEO	XAN	BIO	ISO	PT
1	8.0	4.0	3.0	3.5	3.0
2	0.5	5.0	8.0	3.5	3.0
3	10.5	7.0	0.5	1.5	8.0
4	10.5	6.0	5.5	0.5	8.0
5	8.0	8.0	3.0	2.5	0.5
6	10.5	6.0	8.0	4.5	5.5
7	5.5	5.0	8.0	1.5	3.0
8	5.5	7.0	10.5	3.5	10.5
9	0.5	8.0	0.5	0.5	5.5
10	3.0	4.0	10.5	2.5	0.5
11	8.0	8.0	10.5	2.5	0.5
12	5.5	6.0	5.5	4.5	10.5
13	3.0	5.0	5.5	0.5	8.0
14	0.5	7.0	0.5	1.5	10.5
15	3.0	4.0	3.0	4.5	5.5

Todas las concentraciones están dadas en  $\text{ng mL}^{-1}$

#### 4.5.4.3. Soluciones muestra

Se prepararon las siguientes soluciones muestra:

- **Solución muestra** diluyendo 100  $\mu\text{L}$  de orina a 25.0 mL con agua ultrapura en matraz volumétrico de color caramelo.
- **Soluciones muestra fortificadas** para los ensayos de validación. A los fines de obtener un set de validación con los niveles de fortificación que se presentan en la Tabla 4.2. Se prepararon a partir de tres orinas de adultos sanos adicionando a las soluciones muestras antes de llevar a volumen, alícuotas de 25.0, 50.0 y 75.0  $\mu\text{L}$  respectivamente, de una solución estándar mezcla concentrada de los analitos.

Tabla 4.2: Concentraciones de fortificación

Nivel	NEO	XAN	BIO	ISO	PT
1	1.12	1.84	1.80	0.50	1.92
2	2.24	3.68	3.60	1.00	3.84
3	3.36	5.52	5.40	1.50	5.76

Todas las concentraciones están dadas en  $\text{ng mL}^{-1}$

#### 4.5.5. Diseño experimental

En base al sistema cromatográfico de referencia (Cañada-Cañada 2009b), en el que se logra la separación de los analitos en 12 minutos con un solapamiento considerable de los picos de BIO, ISO y PT, se llevó a cabo la realización de un diseño experimental para optimizar el sistema, buscando fundamentalmente una reducción del tiempo de análisis. Para esto se programó alcanzar una resolución mínima de los analitos de manera de poder llevar a cabo una cuantificación adecuada de los mismos utilizando el algoritmo MCR-ALS de calibración multivariada. En este diseño se tuvo también en cuenta que NEO, BIO y PT presentan espectros de emisión prácticamente idénticos, por lo que debía existir una buena resolución entre ellos.

Dado el gran número de variables susceptibles de ser optimizadas en el sistema cromatográfico, se realizó primero un diseño de *screening* para evaluar el efecto de la concentración y el pH de la solución reguladora, la composición de la fase móvil, la velocidad de flujo y la temperatura del horno de columna. Para esto se utilizó un diseño factorial fraccionado con dieciséis experimentos en dos bloques. En base a la evaluación de los efectos y las interacciones resultantes entre los mismos, se fijaron la temperatura del horno de columna en 25°C y la concentración de la solución reguladora en 10.0 mmol L<sup>-1</sup>, siendo estos valores críticos para la obtención de picos con buena simetría. El resto de las variables: pH de la solución reguladora, porcentaje de ACN y velocidad de flujo, se estudiaron más a fondo mediante un diseño de superficie de respuesta para lograr su optimización.

El diseño de optimización seleccionado fue un central compuesto rotatable, con un valor de  $\alpha$  de 1.68, en dos bloques, con seis replicas en el punto central. Esto resultó en un total de veinte experimentos, en los cuales se evaluaron seis respuestas para optimizar: cuatro resoluciones, el tiempo total de análisis y la sensibilidad para XAN. Esta última respuesta debió evaluarse en virtud de la gran variabilidad de la fluorescencia de este analito en función del pH.

En la Tabla 4.3 se muestran los experimentos realizados y las respuestas obtenidas. Los rangos (-1,+1) utilizados para estudiar cada variable: pH entre 4.50 y 6.50, velocidad de flujo entre 0.70 y 1.00 mL min<sup>-1</sup> y el porcentaje de ACN entre 3.0 y 6.0%, se seleccionaron teniendo en cuenta los resultados de los experimentos preliminares, así como también las limitaciones operacionales, como por ejemplo, la estabilidad de la fase estacionaria.

Para la realización de esta optimización se prepararon varias soluciones reguladoras 10.0 mmol L<sup>-1</sup> ácido cítrico/citrato de sodio, ajustando su pH de acuerdo

al valor establecido en cada caso por el diseño. El porcentaje de ACN y la velocidad de flujo en cada experimento se fijaron como parámetros de funcionamiento de la bomba a través del *software* controlador del cromatógrafo. La solución de analitos empleada fue la solución estándar de optimización y los experimentos del diseño se llevaron a cabo en un orden aleatorio para minimizar el efecto de los factores no controlados.

Tabla 4.3: Experimentos de optimización

Exp.	Bloque	F1	F2	F3	R1	R2	R3	R4	R5	R6
1	1	3.00	4.50	0.70	11.59	1.75	1.18	0.58	8.45	12.1
2	1	4.50	5.50	0.85	4.35	1.70	0.91	1.33	5.42	402.4
3	1	4.50	5.50	0.85	4.28	1.68	0.92	1.32	5.41	345.4
4	1	6.00	6.50	0.70	2.55	0.00	0.84	1.86	5.19	1745.0
5	1	4.50	5.50	0.85	4.07	1.43	0.82	1.12	5.28	329.9
6	1	4.50	5.50	0.85	4.03	1.42	0.81	1.11	5.28	331.2
7	1	3.00	4.50	1.00	10.37	1.66	0.99	0.45	5.91	28.4
8	1	6.00	4.50	0.70	2.10	0.78	0.69	1.02	5.13	23.5
9	1	3.00	6.50	0.70	4.35	7.01	1.10	1.92	8.53	1741.4
10	1	6.00	6.50	1.00	2.10	0.00	0.83	1.84	3.65	1220.0
11	1	6.00	4.50	1.00	2.06	0.79	0.62	0.81	3.61	17.0
12	1	3.00	6.50	1.00	3.68	6.13	1.02	1.68	6.02	1241.0
13	2	4.50	7.18	0.85	----	----	----	1.83	4.99	----
14	2	4.50	5.50	0.85	3.86	1.51	0.75	1.13	5.28	188.0
15	2	4.50	5.50	0.85	3.76	1.50	0.75	1.13	5.24	186.0
16	2	4.50	5.50	1.10	3.31	1.50	0.65	0.99	4.06	146.8
17	2	1.98	5.50	0.85	11.64	4.53	0.28	0.48	----	----
18	2	7.02	5.50	0.85	2.85	----	0.00	1.26	3.92	----
19	2	4.50	5.50	0.60	3.88	1.62	0.91	1.35	7.31	249.8
20	2	4.50	3.82	0.85	----	2.00	1.06	0.81	5.21	----

F1: % de ACN en la fase móvil, F2: pH de la solución reguladora, F3: velocidad de flujo en mL min<sup>-1</sup>, R1: Resolución entre NEO y XAN, R2: Resolución entre XAN y BIO, R3: Resolución entre BIO e ISO, R4: Resolución entre ISO y PT, R5: Tiempo de retención para PT en min, R6: Área de pico de XAN.

Los casilleros con líneas de puntos corresponden a resultados anómalos.

#### 4.5.6. Sistema cromatográfico

La separación cromatográfica se llevó a cabo para las soluciones estándar de manera isocrática en las condiciones optimizadas, a una velocidad de flujo de 1.0 mL min<sup>-1</sup> en un tiempo total de 5.5 min. Para las soluciones muestras se utilizó un sistema de gradiente a partir de los 5.5 min (Tabla 4.4) a los fines de lograr la elución de todos los componentes de la matriz de la orina en un tiempo total de 16 min.

Tabla 4.4: Gradiente de elución para la separación de pteridinas

Tiempo (min)	% Reguladora	% ACN
0.0	94.5	5.5
5.5	94.5	5.5
9.0	75.0	25.0
11.0	75.0	25.0
14.0	94.5	5.5
16.0	94.5	5.5

El volumen inyectado fue de 20  $\mu$ L para cada solución. La longitud de onda del DAD para determinar CREA fue establecida en 256 nm, mientras que para el DF-BR se fijo la excitación de las pteridinas a 272 nm monitoreando la emisión a 445 nm.

#### 4.5.7. Adquisición y procesamiento de datos

Las matrices de datos de emisión generadas por el DF-BR a la longitud de onda de excitación de 272 nm en función del tiempo de retención, se recolectaron en el rango de 380 a 500 nm cada 1 nm y en los tiempos de 0 a 5.0 minutos cada 1 segundo. De esta manera cada matriz de emisión-tiempo (MET) generada tiene una dimensión de 121 x 300 datos.

El algoritmo de Eilers, basado en los cuadrados mínimos asimétricos, que se describió en la Introducción, fue aplicado para corregir la línea de base eliminando la señal de fondo presente en los cromatogramas, antes de procesar los datos para la calibración.

Debido a la coelución de componentes de la matriz con los picos de los analitos, que a su vez no se encontraban completamente resueltos entre si, se utilizó el algoritmo de segundo orden MCR-ALS a los fines de calibrar el sistema para obtener resultados cuantitativos. Las propiedades de este método de calibración multivariada y el gran aporte de la ventaja de segundo orden se presentaron en la Introducción.

Con el objetivo de estudiar el rendimiento y las potencialidades de MCR-ALS en la resolución de problemas complejos, como el que se presenta (componentes no modelados, baja resolución de analitos y espectros de emisión idénticos para tres de ellos), se diagramaron y aplicaron dos estrategias diferentes para el procesamiento de los datos y se compararon los resultados obtenidos.

En la Estrategia 1 (E1) se seleccionaron regiones apropiadas de la matriz de datos, de manera que los analitos con espectros idénticos (NEO, BIO y PT) quedaran separados, y se cuantificó cada analito en forma independiente elaborando en cada caso un modelo propio de MCR-ALS.

En la Estrategia 2 (E2), el problema de la igualdad de espectros se solucionó generando la matriz aumentada D en la dimensión espectral y se elaboró un único modelo de MCR-ALS que permitió cuantificar en forma simultánea todos los analitos.

Por otro lado, al observarse cambios en la sensibilidad por efecto de la matriz de la muestra para los analitos ISO y PT, se utilizó en estos casos el método de calibración interna o adición de estándar en combinación con la calibración multivariada.

## 4.6. Resultados y discusión

### 4.6.1. Optimización de la separación cromatográfica

Los resultados obtenidos en los experimentos del diseño se utilizaron para construir un modelo para cada respuesta ajustando un polinomio de segundo orden según la Ecuación (1.1).

En cada modelo, los coeficientes fueron calculados por regresión múltiple aplicando la estrategia de eliminación por retroceso y el mismo se validó verificando que resultara significativo para la prueba de ANOVA con un  $p < 0.05$  y que su falta de ajuste fuera no significativa con un  $p > 0.05$ .

La respuesta R6, el área de XAN, debió someterse a una transformación, utilizando la raíz cuadrada de los datos, a los fines de lograr el ajuste adecuado a un modelo.

En la Tabla 4.5 pueden verse los parámetros estadísticos alcanzados por los modelos para las seis respuestas analizadas. Los tres factores estudiados resultaron significativos en casi todos los modelos, a excepción de R2 y R4, en las que la velocidad de flujo no fue significativa y R6 que resultó independiente del % de ACN.

Tabla 4.5: Evaluación de los modelos

Respuesta	Modelo	R <sup>2</sup>	ANOVA del modelo		ANOVA de la falta de ajuste	
			p	conclusión <sup>a</sup>	p	conclusión <sup>a</sup>
R1	cuadrático	0.9964	<0.0001	significativo	0.219	no significativo
R2	cuadrático	0.9839	<0.0001	significativo	0.151	no significativo
R3	cuadrático	0.8403	<0.0001	significativo	0.097	no significativo
R4	lineal	0.6670	<0.0001	significativo	0.070	no significativo
R5	cuadrático	0.9962	<0.0001	significativo	0.361	no significativo
$\sqrt{R6}$	lineal con interacción	0.9801	<0.0001	significativo	0.066	no significativo

<sup>a</sup> considerado significativo cuando  $p < 0.05$

Una vez propuesto cada modelo, se aplicaron pruebas estadísticas sobre los mismos a los fines de comprobar que se cumplieran los supuestos del ANOVA y se verificó la existencia de puntos influyentes o anómalos, los que fueron eliminados (Tabla 4.3) para volver a realizar el ajuste. Finalmente, se obtuvieron las superficies de respuesta para cada modelo en función de las variables estudiadas.

Con los modelos ajustados se realizó una optimización simultánea utilizando la función deseabilidad de Derringer, para lo cual se establecieron los criterios especificados en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6: Criterios de optimización

Respuesta	Criterio	Límite inferior	Límite superior	Peso Inferior	Peso superior	Importancia
R1	minimizar	2.05	11.64	---	5	3
R2	minimizar	0.30	7.01	---	5	3
R3	objetivo=0.60	0.30	0.90	5	5	4
R4	objetivo=1.18	0.45	1.92	10	10	4
R5	minimizar	3.61	8.53	---	5	4
$\sqrt{R6}$	maximizar	12.1	1745.0	5	---	4

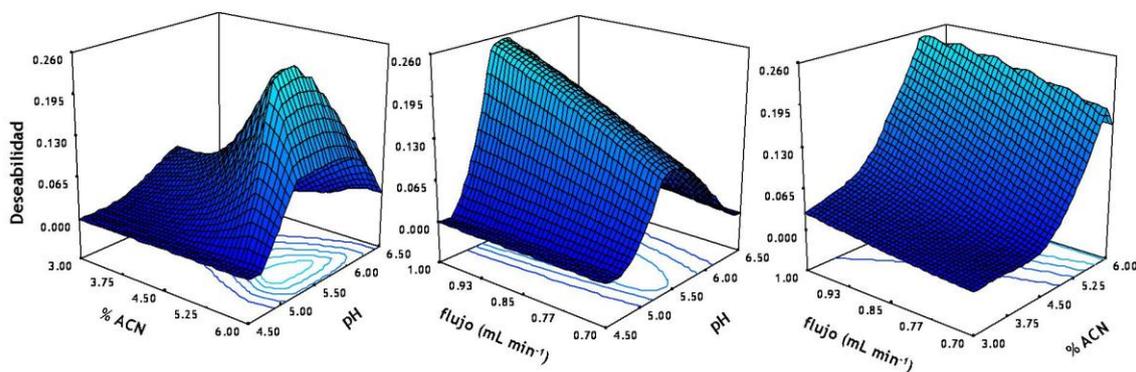
Como puede verse, tres de las respuestas fueron minimizadas con el objetivo de reducir el tiempo de análisis y el consumo de solventes: las dos primeras resoluciones y el tiempo de retención de PT, el último de los analitos en eluir. La resolución entre NEO y XAN corresponde a picos completamente resueltos entre si, mientras que la resolución de XAN y BIO involucra dos picos con espectros bien diferenciados capaces de ser resueltos por MCR-ALS. Por otro lado, las resoluciones entre BIO e ISO y entre ISO y PT se optimizaron buscando alcanzar valores objetivos

que, si bien no corresponden a resoluciones cromatográficas ideales, logran un valor mínimo sin superposición de analitos con igual espectro. Finalmente, se buscó maximizar la respuesta de XAN sabiendo, por estudios previos, que por debajo de  $\text{pH}=4.5$  su fluorescencia disminuye rápidamente hasta desaparecer, mientras que al aumentar el  $\text{pH}$  aumenta la señal. Otra limitante es que a  $\text{pH}$  superior a 7.2 el pico se desdobra imposibilitando una adecuada cuantificación.

Las superficies que representan la deseabilidad global ( $D$ ) obtenida en función de las variables estudiadas se muestran en la Figura 4.2.

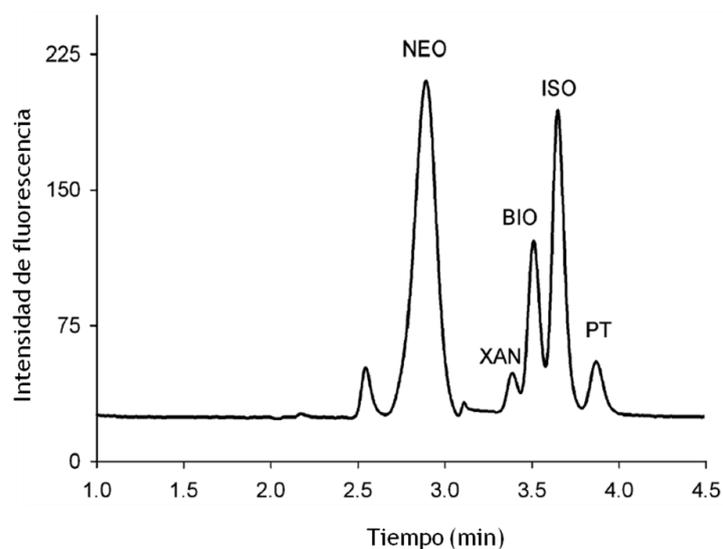
Como puede verse el valor máximo alcanzado por  $D$  es de alrededor de 0.25 en las mejores condiciones experimentales. Este valor bajo se debe a las condiciones restrictivas que se impusieron a los criterios de optimización, pero puede considerarse aceptable debido al gran número de respuestas optimizadas simultáneamente, habiendo alcanzado todas ellas buenos valores dentro de los deseables.

Figura 4.2: Superficies de respuesta para la deseabilidad



Los niveles de las variables que produjeron el mejor valor de  $D$  fueron:  $\text{pH}=5.44$ , porcentaje de  $\text{ACN}=5.5\%$  y velocidad de flujo= $1.0 \text{ mL min}^{-1}$ . Las respuestas predichas por los modelos en estas condiciones fueron:  $R_1=2.67$ ,  $R_2=0.35$ ,  $R_3=0.60$ ,  $R_4=1.26$ ,  $R_5=3.87 \text{ min}$  y  $R_6=220.3$  unidades de fluorescencia  $\text{min}$ . Estas predicciones se corroboraron experimentalmente obteniéndose el cromatograma presentado en la Figura 4.3, en donde puede verse que todos los analitos se resuelven en menos de 4.0 minutos, reduciéndose enormemente el tiempo de análisis en relación al sistema cromatográfico utilizado como referencia (Cañada-Cañada 2009b).

Figura 4.3: Resolución de analitos en condiciones optimizadas

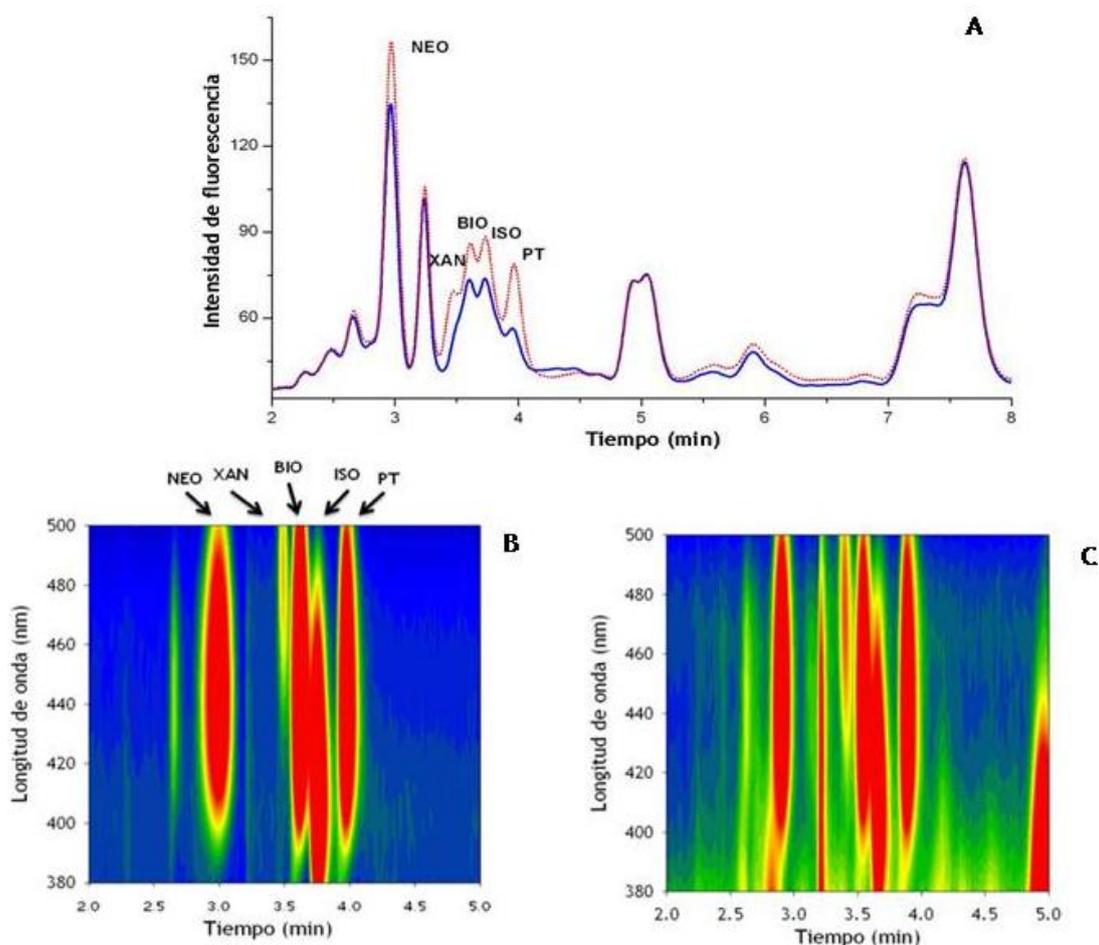


cromatograma de la solución calibradora 8 (Tabla 1) obtenido para  $\lambda_{\text{ex}}=272$  nm y  $\lambda_{\text{em}}=445$  nm en las condiciones optimizadas.

#### 4.6.2. Análisis de datos

En la Figura 4.4 puede apreciarse el alto grado de complejidad del sistema en estudio. En primer lugar, en A se observan los cromatogramas de una muestra basal de orina y la misma muestra fortificada con los cinco analitos, donde se ve claramente la aparición de un pico desconocido entre NEO y XAN, así como también otros picos menores procedentes de la matriz. En segundo lugar, en B y C se muestra una porción del mismo sistema representado como gráfico de contorno de las MET para una solución estándar y para una solución muestra respectivamente. Puede apreciarse la superposición de los perfiles de XAN, BIO e ISO a lo largo de todo el barrido espectral y la complejización del sistema en la muestra de orina.

Figura 4.4: Representación del sistema en estudio

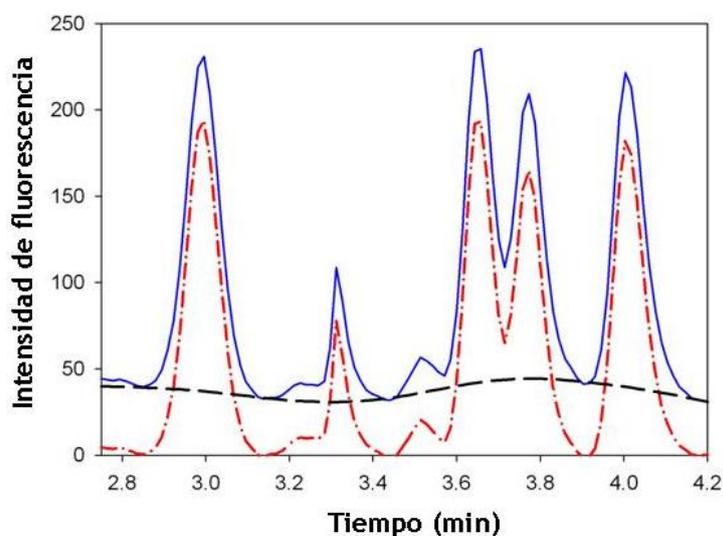


- A: Cromatograma de una solución muestra de orina, en azul la muestra basal y en rojo fortificada con los cinco analitos, obtenido a para  $\lambda_{ex}=272$  nm y  $\lambda_{em}=445$  nm.  
 B: Gráfico de contorno de la porción inicial de la matriz de datos obtenida con una solución estándar.  
 C: Gráfico de contorno de la porción inicial de la matriz de datos obtenida con una solución muestra.

#### 4.6.3. Corrección de línea de base

Mediante la aplicación del algoritmo de Eilers se obtuvo para cada MET una matriz de corrección de la señal de fondo utilizando funciones de base curva con un parámetro de regularización igual a 1. En la Figura 4.5 puede observarse, a modo de ejemplo, la corrección alcanzada para un cromatograma de una muestra de orina.

Figura 4.5: Corrección de línea de base por el algoritmo de Eilers



En azul se muestra un cromatograma de una muestra de orina fortificada con los cinco analitos registrado para  $\lambda_{\text{ex}} = 272 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 445 \text{ nm}$ . En negro la línea a base calculada por el algoritmo y en rojo el cromatograma corregido por sustracción de la señal de fondo.

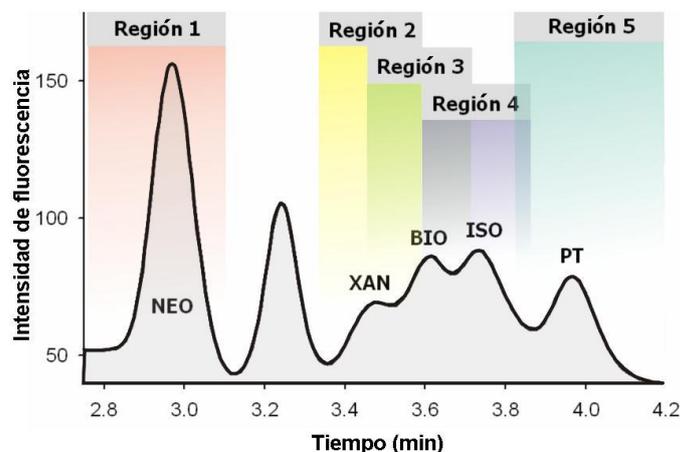
#### 4.6.4. Calibración por MCR-ALS

##### 4.6.4.1. Estrategia 1

En primer lugar, en esta estrategia, las MET fueron divididas en cinco regiones (Figura 4.6): la región 1 entre 2.15 y 3.12 min para la determinación de NEO, la región 2 entre 3.35 y 3.58 min para la determinación de XAN en presencia de BIO, la región 3 entre 3.45 y 3.74 min para la determinación de BIO en presencia de XAN y de ISO, la región 4 entre 3.58 y 3.87 min para la determinación de ISO en presencia de BIO y la región 5 entre 3.84 y 4.20 min para la determinación de PT en presencia de ISO.

Luego, la matriz de datos resultante para cada región, se aumentó en la dimensión temporal con las correspondientes regiones provenientes de las 15 matrices de los calibradores para obtener las matrices aumentadas  $D_t$ . Para los analitos ISO y PT las matrices aumentadas se construyeron con las regiones apropiadas de las matrices de las muestras de orina basales más tres muestras fortificadas para solventar el efecto matriz que afecta a estos analitos.

Figura 4.6: Regiones generadas en la estrategia 1



El número de componentes estimados en cada región fue calculado mediante SVD, y como puede verse en la Tabla 4.7, los mismos fueron dependientes tanto de la región analizada, como de la muestra particular en estudio. Si bien la cantidad de componentes en cada región fue más o menos constante, en todas las regiones se observaron mayor cantidad de compuestos que los calibrados. Este punto justifica claramente la necesidad de utilizar un algoritmo de calibración de segundo orden que permita trabajar en presencia de componentes particulares de cada nueva muestra analizada.

Tabla 4.7: Componentes estimados en cada región por SVD

Región	Analito cuantificado	Cantidad de pteridinas presentes	Cantidad de componentes estimados (N)		
			M1	M2	M3
1	NEO	1	3	3	3
2	XAN	3	4	4	4
3	BIO	3	4	5	4
4	ISO	2	3	4	3
5	PT	2	3	3	3

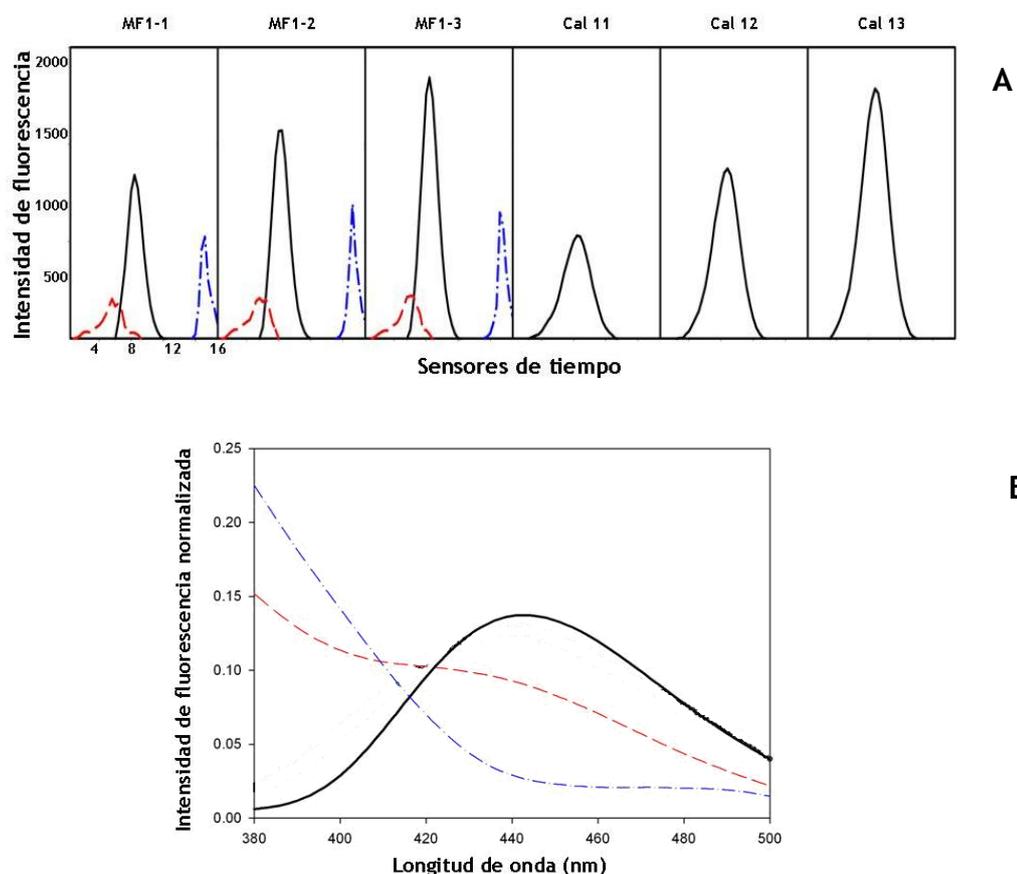
MCR-ALS se inicializó con los espectros puros de los analitos y de los componentes no calibrados de la muestra obtenidos por SIMPLISMA.

Finalmente, la descomposición de las matrices  $D_t$  se realizó imponiendo restricciones de no-negatividad en los perfiles espectrales y de unimodalidad y no-negatividad en los perfiles de concentración. Como resultado de la minimización de

la matriz del error  $E_t$  mediante cuadrados mínimos alternantes, se obtuvieron las matrices  $C_t$  y  $S_t^T$ , según la Ecuación (1.25). Donde  $C_t$  contiene los perfiles cromatográficos de los  $N$  componentes de cada región, dependientes de la concentración y  $S_t^T$  los espectros relacionados.

La implementación satisfactoria de esta estrategia requiere que los componentes del modelo, analitos e interferencias, tengan diferencias significativas en los perfiles espectrales, ya que la resolución de los mismos se logra en base a esta diferencia. Con la división de las MET en regiones se logró alcanzar esta condición necesaria.

Figura 4.7: Perfiles extraídos por MCR-ALS para la región 1 mediante E1



En negro las señales cromatográficas y espectrales de NEO, en rojo y azul dos componentes no modelados presentes en la muestra de orina

A: Perfiles cromatográficos dependientes de la concentración

B: Perfiles espectrales puros extraídos por MCR-ALS

En la Figura 4.7 se muestran, a modo de ejemplo, los perfiles extraídos por MCR-ALS para la región 1 de una de las muestras de orina fortificada en tres niveles y para tres de los calibradores (Tabla 4.1).

Como puede verse, en esta región coeluyen con NEO dos componentes desconocidos. En los perfiles cromatográficos se destacan las señales constantes en las tres muestras para los compuestos desconocidos y la señal creciente de NEO en las distintas fortificaciones. Estos perfiles puros aislados para NEO, dependiente de la concentración, se utilizaron para las predicciones cuantitativas relacionándolos con las señales de NEO en los calibradores.

De la misma manera fueron procesados los datos de las otras cuatro regiones, obteniéndose de esta manera cinco modelos MCR-ALS, uno para cada analito.

#### 4.6.4.2. Estrategia 2

En esta estrategia se creó un único modelo de calibración trabajando con una matriz aumentada en la dimensión espectral  $D_e$ , constituida por las matrices MET transpuestas. De esta manera, la identidad de los espectros de NEO, ISO y PT ya no constituyó un problema, siendo en esta estrategia la condición necesaria para la resolución de los analitos una diferencia significativa en los perfiles cromatográficos de los mismos. Aunque los picos de XAN, BIO e ISO estaban solapados en gran medida, las pequeñas diferencias en sus tiempos de retención fueron suficientes para que MCR-ALS lograra resolverlos. Esta estrategia fue posible gracias a que los datos procesados mantenían la trilinealidad (debido al corto tiempo de corrida cromatográfica no se produjeron corrimientos de los tiempos de retención entre las muestras ni cambios en las formas de los picos).

En esta estrategia se trabajó con una única región de las MET que abarcaba de 2.60 a 4.20 minutos y de 400 a 500 nm. El resto de los sensores originales no se utilizaron ya que no proveían de información relevante y de esta forma se logró simplificar un poco el sistema.

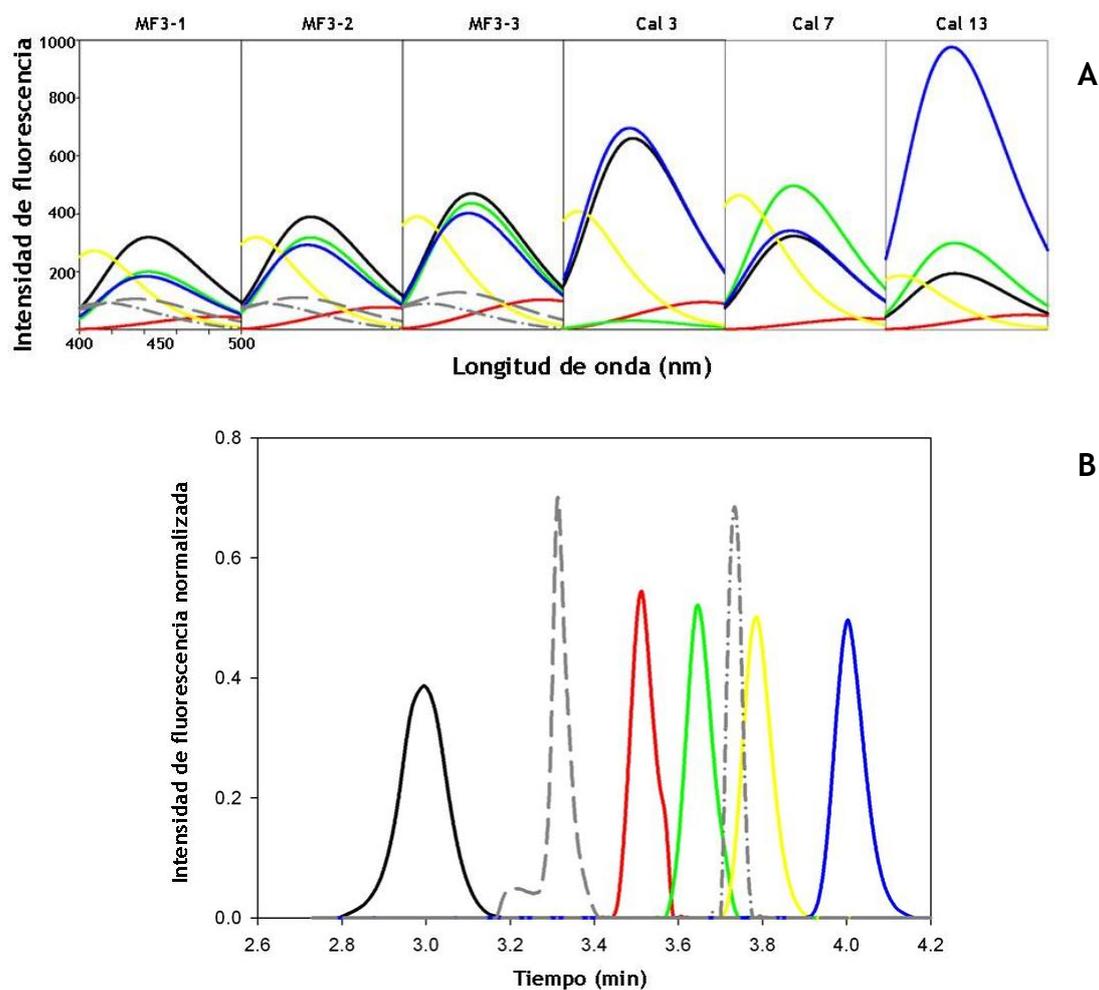
Igual que en E1 en primer lugar se calculó el número total de componentes del sistema y se inicializó MCR-ALS proveyendo estimaciones iniciales. En este caso las estimaciones fueron dadas como cromatogramas de los analitos puros por un lado, y como perfiles cromatográficos extraídos por SIMPLISMA para los componentes desconocidos.

Por descomposición de la matriz aumentada  $D_e$  y minimización de la matriz del error  $E_e$  se obtuvieron las matrices  $S_e$  y  $C_e^T$  según la Ecuación (1.28) en donde la información de concentración está contenida en  $S_e$  como área bajo los espectros y pudo ser utilizada para realizar las predicciones cuantitativas. Por su parte  $C_e^T$  contiene los perfiles cromatográficos puros de los  $N$  componentes presentes. Para

realizar la descomposición de  $D_e$  se impusieron las restricciones de no-negatividad, unimodalidad y trilinealidad a las matrices  $D_e$  y  $C_e^T$ , de manera de alcanzar las soluciones correctas

En la Figura 4.8 se presentan los perfiles extraídos por MCR-ALS en esta estrategia para una muestra fortificada en tres niveles de concentración y tres de los calibradores (Tabla 4.1).

Figura 4.8: Perfiles extraídos por MCR-ALS para la región completa mediante E2



En negro las señales de NEO, en rojo XAN, en verde BIO, en amarillo ISO, en azul PT y en gris dos componentes no modelados presentes en la muestra de orina

A: Perfiles espectrales dependientes de la concentración

B: Perfiles cromatográficos puros extraídos por MCR-ALS

Como puede verse, en este caso, MCR-ALS fue capaz de extraer los tres espectros idénticos pertenecientes a NEO, BIO y PT, asociados a los respectivos picos cromatográficos. Además extrajo los espectros de los otros dos analitos ISO y XAN, y

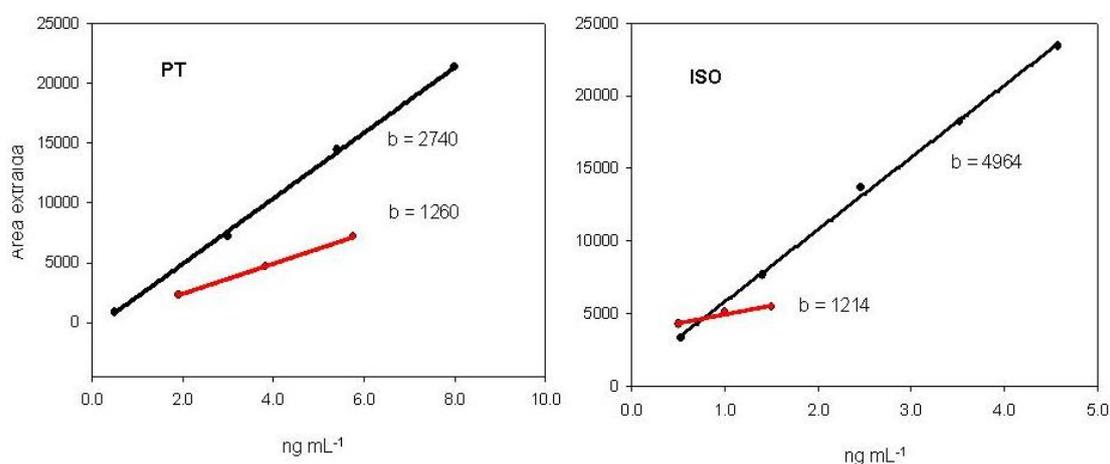
dos perfiles correspondientes a compuestos no modelados, uno de ellos con un espectro muy semejante a NEO, BIO y PT. Se podría suponer por las características espectrales, que este compuesto no modelado es otra pteridina oxidada que no fue tomada en cuenta en la calibración.

#### 4.6.4.3. Curvas de calibración pseudounivariadas

Finalmente, en ambas estrategias se construyeron las curvas de calibración pseudounivariadas para cada analito, utilizando la información extraída por MCR-ALS de las matrices de los 15 calibradores (área bajo los picos para E1 y área bajo los espectros para E2). Estas curvas se utilizaron para predecir las concentraciones de los analitos en las muestras basales y fortificadas a los fines de validar la metodología.

Para los analitos ISO y PT, en los que se observó efecto matriz, las predicciones se realizaron utilizando las curvas de adición de estándar obtenidas por regresión de las áreas extraídas por MCR-ALS de las muestras fortificadas en función de las concentraciones de fortificación.

Figura 4.9: Efecto matriz visualizado en las curvas de calibrado



En negro las curvas de calibrado pseudounivariadas obtenidas para los calibradores, en rojo las curvas de adición de estándar en las muestras de orina

b= pendientes de las curvas

En la Figura 4.9 se presentan las curvas de estos analitos obtenidas en E1 para los calibradores y para las adiciones de estándar en muestra de orina. Se observa el efecto matriz que disminuye fuertemente la señal de emisión fluorescente de PT y de

ISO. Sin embargo, la sensibilidad alcanzada en ambos casos fue suficiente para realizar las predicciones con buenas cifras de mérito.

#### 4.6.5. Validación y cifras de mérito

Los resultados obtenidos para las predicciones de las muestras fortificadas utilizadas para realizar la validación de la metodología en ambas estrategias se presentan en la Tabla 4.8.

Las Recuperaciones obtenidas estuvieron dentro de un rango de 80.4% a 154.3% para E1 y de 83.7% a 117.8 % para E2, valores que pueden considerarse como muy aceptables teniendo en cuenta la complejidad del sistema en estudio.

Además, para cada muestra se calculó el error estándar relativo de la predicción REP (del inglés, *relative error of prediction*) expresado de manera porcentual.

$$\text{REP}(\%) = \frac{1}{x_s} \sqrt{\frac{\sum (x_s - x_r)^2}{n}} \quad (4.1)$$

Donde  $x_s$  es la concentración de fortificación de cada muestra de validación,  $x_r$  es la concentración de analito predicha por una u otra estrategia,  $\bar{x}_s$  es el promedio de las concentraciones de fortificación y  $n$  el número de muestras fortificadas.

Los REP(%) obtenidos para cada muestra por una y otra estrategia fueron comparados estadísticamente utilizando un método de aleatorización de la prueba  $t$  basado en la simulación de Monte Carlo (van der Voet 1994). Como puede verse en los valores de  $p$  arrojados por esta prueba, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los REP(%) de las distintas estrategias para XAN, BIO e ISO, mientras que para NEO y PT, los REP(%) fueron más pequeños para E2 que para E1, indicando que para estos analitos, la E2 tuvo una mejor habilidad de predicción que E1.

Tabla 4.8: Predicciones de las muestras de validación

Muestra	Concentración del analito (ng mL <sup>-1</sup> )																	
	NEO			XAN			BIO			ISO			PT					
	F	E1	E2	F	E1	E2	F	E1	E2	F	E1	E2	F	E1	E2			
1 - 1	1.12	1.05	1.10	1.84	1.75	1.54	1.80	1.98	2.12	0.50	0.51	0.49	1.92	1.83	1.97			
		(93.8)	(98.2)		(95.1)	(83.7)		(110.0)	(117.8)		(102.0)	(98.0)		(95.3)	(102.6)			
1 - 2	2.24	1.98	2.27	3.68	3.73	3.91	3.60	3.89	4.12	1.00	1.04	0.92	3.84	4.06	3.86			
		(88.4)	(101.3)		(101.4)	(106.3)		(108.1)	(114.4)		(104.0)	(92.0)		(105.7)	(100.5)			
1 - 3	3.36	3.02	3.58	5.52	5.81	5.75	5.40	5.91	6.13	1.50	1.60	1.56	5.76	5.82	5.73			
		(89.9)	(106.5)		(105.3)	(104.2)		(109.4)	(113.5)		(106.7)	(104.0)		(101.0)	(99.5)			
2 - 1	1.12	0.99	1.02	1.84	2.39	2.05	1.80	1.97	1.91	0.50	0.48	0.42	1.92	1.88	1.88			
		(88.4)	(91.1)		(113.6)	(111.4)		(109.4)	(106.1)		(96.0)	(84.0)		(97.9)	(97.9)			
2 - 2	2.24	1.95	2.05	3.68	4.02	3.52	3.60	3.89	3.83	1.00	1.07	1.31	3.84	3.93	3.75			
		(87.1)	(91.5)		(109.3)	(95.7)		(108.1)	(106.4)		(107.0)	(131.0)		(102.3)	(97.7)			
2 - 3	3.36	3.12	3.12	5.52	5.97	5.51	5.40	5.94	6.01	1.50	1.45	1.32	5.76	4.88	5.83			
		(92.9)	(92.9)		(108.2)	(99.8)		(110.0)	(111.3)		(96.7)	(88.0)		(84.7)	(101.2)			
3 - 1	1.12	0.90	1.11	1.84	1.83	1.59	1.80	1.97	1.95	0.50	0.46	0.43	1.92	2.05	1.92			
		(80.4)	(99.1)		(99.5)	(86.4)		(109.4)	(108.3)		(92.0)	(86.0)		(106.8)	(100.0)			
3 - 2	2.24	1.91	2.29	3.68	3.83	3.65	3.60	4.09	4.00	1.00	1.54	0.99	3.84	3.60	3.83			
		(85.3)	(102.2)		(109.0)	(99.2)		(113.3)	(111.1)		(154.0)	(99.0)		(93.8)	(99.7)			
3 - 3	3.36	2.86	3.34	5.52	5.92	6.06	5.40	5.86	6.06	1.50	1.56	1.52	5.76	5.72	5.77			
		(85.1)	(99.4)		(107.2)	(109.8)		(108.5)	(112.2)		(104.0)	(101.3)		(99.3)	(100.2)			
REP (%)		5.0	2.3		5.2	4.3		8.8	11.0		18.7	12.9		8.3	1.2			
p-valor		<0.05			0.50			0.12			0.90			<0.05				

donde F es la concentración de fortificación, en E1 y E2 se informan las concentraciones predichas por cada estrategia y entre paréntesis las Recuperaciones

#### 4.6.6. Aplicaciones

Los modelos de calibración obtenidos con E1 fueron utilizados para predecir exitosamente las concentraciones de pteridinas en las orinas de siete niños enfermos. De manera simultánea se determinó el área del pico de CREA a 256 nm en cada una de las muestras de orinas y se obtuvo la concentración de este compuesto mediante calibración del sistema con la solución estándar de CREA analizada en las mismas condiciones. Los resultados de concentración de las PTs, normalizados en relación al nivel de CREA, que se informan en la Tabla 4.9, resultaron en niveles concordantes con los resultados informados en publicaciones anteriores para niños sanos y enfermos (Cañada-Cañada 2009b). No fue objetivo del presente trabajo correlacionar los niveles urinarios de pteridinas con las distintas patologías, sino explorar la aplicabilidad del método a la resolución de distintas muestras reales.

Tabla 4.9: Niveles de pteridinas en orinas de niños enfermos

Muestra	NEO/CREA	XAN/CREA	BIO/CREA	ISO/CREA	PT/CREA
1	1.052	0.131	0.040	0.183	0.022
2	0.314	0.049	0.108	0.039	0.020
3	0.294	0.057	0.108	0.029	0.018
4	0.568	0.172	0.096	0.148	0.021
5	0.088	0.026	0.084	0.007	0.002
6	0.063	0.018	0.060	0.005	0.001
7	0.162	0.068	0.296	0.036	0.046

Los resultados están informados como mmol de pteridina/mol de CREA

#### 4.6.7. Proyecciones

El método propuesto podría ser utilizado sin inconvenientes acoplado a un sistema de oxidación de BH4 y BH2, ya sea el químico de Fukushima y Nixon o alguna de las estrategias de oxidación fotoinducida de Espinosa-Mansilla y Cañada-Cañada, lo que permitiría completar el perfil urinario de los biomarcadores.

También sería interesante evaluar en un futuro, la resolución mediante este sistema de otros biomarcadores relacionados tales como 7,8 dihidroneopterin, 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, 6,7- dimetilpterin y ácido pterin 6-carboxílico.

## 4.7. Conclusiones

El análisis de datos de segundo orden, obtenidos generando matrices de emisión de fluorescencia en función del tiempo de retención cromatográfico, mediante la resolución multivariada de curvas con cuadrados mínimos alternantes, resulta una herramienta exitosa en la determinación de las pteridinas NEO, BIO, ISO, XAN, y PT en orinas normales y patológicas en presencia de compuestos solapados no modelados. Los datos se generaron en un sistema de separación cromatográfico rápido, optimizado para alcanzar una resolución mínima de los analitos en 4.5 minutos, lo que redujo ampliamente el tiempo de análisis y el consumo de solventes respecto a sistemas anteriores.

A través de la implementación de dos estrategias diferentes de procesamiento de datos para la aplicación de MCR-ALS, se demostró la versatilidad de este algoritmo para resolver problemas de falta de especificidad en cromatografía cuando los analitos a determinar tienen espectros idénticos. Se concluye que, utilizando regiones apropiadas de datos en la construcción de modelos individuales para cada analito, puede aplicarse MCR-ALS en la manera tradicional, obteniéndose buenos resultados de predicción para las pteridinas analizadas. Por otro lado, si no existe pérdida de trilinealidad en los datos a analizar, se puede realizar el aumento de la matriz  $\mathbf{D}$  en la dimensión espectral y extraer el área bajo los espectros como señal cuantitativa. De esta manera, al utilizarse los perfiles cromatográficos para identificar a los compuestos se logra solucionar el inconveniente de la identidad espectral de los analitos. Además, aplicando esta última estrategia es posible obtener una leve mejoría en los errores de predicción para NEO y PT respecto a la forma tradicional.

Finalmente, el recurso de combinar un método de calibración por adición de estándar con MCR-ALS, que ya se había empleado con éxito para la resolución conjunta de efecto matriz y coelución de compuestos para datos de CLAR-MS (Peré-Trepát y col 2009) y para datos de cinética de decaimiento de luminiscencia (Lozano y col 2009), demostró ser también efectivo en el procesamiento de datos provenientes de un DF-BR.

El método desarrollado se presenta como una alternativa prometedora, rápida, económica y con posibilidades de ampliar su aplicabilidad, para el monitoreo de pteridinas biomarcadoras en muestras de orina por parte de laboratorios especializados.

# Capítulo 5



## Tetraciclinas en aguas residuales

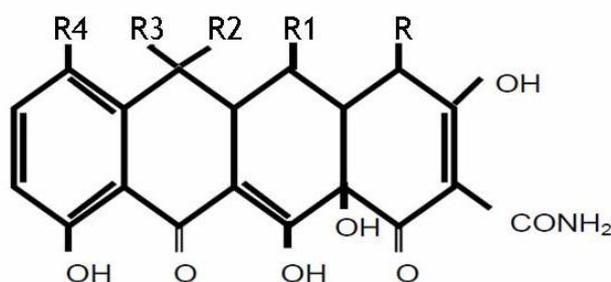
Transferencia de calibración y  
aplicación de U-PLS/RBL

## 5.1. Tetraciclinas

### 5.1.1. Características físico-químicas

Las **tetraciclinas** (TCs) son un grupo de sustancias cristalinas de color amarillo, sin olor y de sabor ligeramente amargo, con conocida actividad antimicrobiana. Tal como lo indica su nombre genérico, todas ellas tienen una estructura tetracíclica básica denominada naftacenocarboxiimida (Corcia y Nazzari 2002, Stolker y Brinkman 2005). En la Figura 5.1 se presenta esta estructura común a las tetraciclinas y los sustituyentes que dan lugar a las distintas clases.

Figura 5.1: Estructura química de las tetraciclinas



Compuesto	R	R1	R2	R3	R4
Clortetraciclina (CLTC)	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	OH	Cl
Oxitetraciclina (OXTC)	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	OH	H
Tetraciclina (TC)	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	OH	H
Demeclociclina (DEMC)	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H	OH	Cl
Minociclina (MINC)	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Doxiciclina (DOXC)	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H	H
Metaciclina (METC)	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	=CH <sub>2</sub>	---	H
Meclociclina (MEC)	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	=CH <sub>2</sub>	---	Cl

Los sustituyentes representados en la parte inferior de esta estructura son grupos funcionales de oxígeno, indispensables para asegurar las propiedades antimicrobianas del compuesto, ya que se ha demostrado que las modificaciones en esta región de la molécula conllevan a una pérdida de actividad biológica (Nelson 1998).

Sin embargo, las modificaciones sintéticas en la región superior de la estructura representada, dan lugar a moléculas que al tener diferentes tamaños, solubilidad, carga electrostática y polaridad, poseen distinta actividad y farmacocinética, ampliando el abanico de aplicación de estos compuestos.

En general las TCs poseen un comportamiento anfótero, ya que forman sales tanto con las bases como con los ácidos. Sus sales sódicas son solubles en agua, disminuyendo esta solubilidad al disminuir el pH. Son considerablemente estables en estado sólido, pero no tanto en solución, siendo particularmente inestables a pHs superiores a 10.0 o inferiores a 2.0 (El Korchi 2006).

### 5.1.2. Historia, mecanismo de acción y usos

El descubrimiento de las TCs fue producto de la búsqueda sistemática de microorganismos productores de antibióticos en muestras de tierra de diversas partes del mundo con el objetivo de encontrar alguna sustancia más segura que la estreptomycin que venía utilizándose en el tratamiento de la tuberculosis. Este trabajo fue llevado a cabo por el Dr. Duggar de la Universidad de Wisconsin en colaboración con los Laboratorios Lederle de Pearl River. Las primeras TCs en aislarse fueron, en 1945 la CLTC producida por *Streptomyces aureofaciens* y en 1950 la OXTC a partir del *Streptomyces rimosus*. Por otro lado la TC fue el primer producto sintético obtenido en 1953 a partir de CLTC por eliminación del átomo de cloro. Poco más tarde se aisló otra Tcs natural, la DEMC producida por una cepa mutante de *Streptomyces aureofaciens*. El resto de las TCs presentadas en la Figura 5.1 son derivados semisintéticos de los compuestos naturales obtenidos por sustitución de grupos funcionales en la década de 1960 (Goodman Gilman 1996).

Las TCs se clasifican como antibióticos de amplio espectro, ya que actúan tanto sobre microorganismos Gram positivos como negativos, y también sobre *Rickettsia*, *Mycoplasma* y *Chlamydia*. En términos generales, son agentes bacteriostáticos que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas al ligarse al ribosoma 30S, evitando así la unión del tRNA a su sitio de anclaje (Goodman Gilman 1996).

Estos antibióticos han sido usados ampliamente desde su descubrimiento en medicina veterinaria y humana para la prevención y el tratamiento de enfermedades infecciosas. Actualmente, aunque se continúan utilizando como fármacos terapéuticos veterinarios, su mayor aplicación es como aditivos alimentarios para promover el crecimiento de animales destinados al consumo humano (Riviere y Spoo

1995). Se administran tanto al ganado vacuno, como a cerdos, ovejas, aves de corral y peces (Debuf 1988). Otro uso masivo importante de TCs, junto con las sulfonamidas, es en la prevención de enfermedades causadas por el *Paenibacillus larvae* y el *Melissococcus pluton* que afecta a las abejas productoras de miel (Huq y col 2006).

### 5.1.3. Farmacocinética

Las TCs administradas por vía oral presentan una absorción muy variable entre las distintas formas químicas, dependiendo esto de su liposolubilidad. Así, por ejemplo, las más hidrosolubles como CLTC, OXTC y TC sólo se absorben en un 30%-40% y en forma muy lenta, mientras que MINC y DOXC, mucho más liposolubles, lo hacen prácticamente en un 100% y en forma mucho más rápida. La porción de dosis no absorbida es eliminada por heces sin metabolizar (Goodman Gilman 1996, El Korchi 2006).

Una vez absorbidas, las TCs se distribuyen en forma amplia por todo el cuerpo, tejido y secreciones de los animales, incluso en la orina, su principal vía de eliminación. La unión a proteínas plasmáticas también es variable dependiendo de la clase de TCs de que se trate. Finalmente, se acumulan en el hígado y se concentran en la bilis, siendo excretadas por medio de ella a intestino, donde pueden ser reabsorbidas parcialmente, sufriendo de esta manera recirculación enterohepática (Barrigon y col 1993). Otra vía de excreción importante es a través de la leche, tanto en humanos como en animales.

El hígado metaboliza las TCs en forma variable para cada clase, pero sin embargo, esta biotransformación siempre es mínima, siendo los compuestos detectados en heces, orina, leche y tejidos, la especie originalmente administrada.

## 5.2. Aguas residuales

Con el término **agua residual** se define al agua que, habiendo sido utilizada con algún propósito, quedó contaminada con algún tipo de sustancia tales como materia fecal, orina u otros componentes orgánicos, ya sean de origen humano o animal, o con desechos industriales. La palabra residual atiende a que esta agua constituye un residuo, es decir, un producto que no puede utilizarse en forma directa. Cualquiera sea su origen, estas aguas residuales requieren de un sistema de canalización, tratamiento y descarte, de manera de anular o al menos minimizar

problemas de contaminación. En las zonas urbanizadas estas aguas son generalmente recolectadas por un sistema de cloacas que recogen habitualmente, tanto aguas domésticas y de comercios, como residuos industriales. Muchas veces incluyen también aguas de alcantarillas que recolectan la lluvia y las infiltraciones de los terrenos vecinos.

La composición de estas aguas residuales es extremadamente variable, dependiendo del lugar y momento de su generación. Los tipos de contaminantes que pueden contener van desde sales inorgánicas de distinto grado de toxicidad a compuestos orgánicos, como detergentes, colorantes, sustancias nitrogenadas como urea, aminoácidos y restos proteicos, azúcares y grasas, ácidos orgánicos, solventes, pesticidas y fármacos, entre otros. También suelen contener gran cantidad de materiales en suspensión y agentes patógenos tales como virus, bacterias y parásitos.

En general, las aguas residuales urbanas son recolectadas y tratadas en **plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs)**, ya sea con la finalidad de un descarte adecuado en el medioambiente o para su reutilización, por ejemplo, en riego y/o fertilización de campos. La calidad del efluente de estas PTARs depende del tipo de tratamiento recibido y del ajuste a la normativa vigente en cada lugar (Iglesias Esteban y Ortega de Miguel 2008, Pedrero y col 2010).

### 5.3. El problema analítico

El suministro de agua potable de calidad a todos los seres humanos es un objetivo que, hoy en día, está muy lejos de alcanzarse. A pesar de los avances de la humanidad en los últimos tiempos, este objetivo pareciera cada vez más difícil de lograr; en especial atendiendo a factores tales como el incremento de la población, el desarrollo de la industria y los fenómenos de globalización que contribuyen a la aparición de nuevos contaminantes y patógenos y, en definitiva, de nuevas enfermedades y problemáticas transmitidas por el agua. En vistas a contribuir con la solución de este problema, se requiere por un lado, tanto de medidas políticas y económicas, como de educación de la población y, por otro lado, de una profundización del conocimiento sobre los contaminantes que aparecen en el agua, su persistencia y toxicidad.

Actualmente se observa una notable tendencia de la química analítica ambiental hacia el estudio de los contaminantes polares presentes en el medioambiente. Los compuestos orgánicos persistentes y los metales pesados, tan en el foco de interés y considerados como los contaminantes prioritarios en los estados desarrollados hasta hace muy poco tiempo, son hoy menos relevantes gracias a una

drástica reducción de su emisión al medio ambiente. Este gran avance se logró en virtud de la adopción de las medidas necesarias para un adecuado tratamiento y eliminación de los mismos y la regulación de acciones de control. El escenario se centra entonces hoy, en los nuevos contaminantes para los cuales aún no hay legislación regulatoria, son los conocidos como **contaminantes emergentes**, dentro de los cuales los fármacos juegan un papel muy importante (Richardson 2007, Petrovic y col 2010).

Los fármacos son introducidos en las aguas residuales, en sus formas nativas o en forma de metabolitos, tanto por parte de los consumidores a través de las excretas o por el descarte de medicamentos vencidos; como por parte de los hospitales, centros de salud y de las plantas productoras de los mismos al eliminar sus desechos. Otra enorme fuente de ingreso de antibióticos en el medio ambiente son los campos de cría de animales, en los cuales los desechos que los contienen pueden terminar tanto en aguas residuales para su tratamiento, como directamente en el medio ambiente.

Diversos estudios han demostrado que muchos de los fármacos que forman parte de las aguas residuales no son destruidos ni removidos durante el tratamiento en las PTARs, por lo que, a través de ellas pasan al medio ambiente contaminando aguas superficiales y subterráneas. Más aún, mucho de los fármacos que se eliminan del organismo en forma conjugada inactiva, se liberan de la conjugación en el proceso de tratamiento de agua devolviéndoles la actividad biológica. Estos motivos hacen que los fármacos se consideren hoy en día como contaminantes “**pseudo-persistentes**”, ya que son incorporados continuamente al medioambiente a través de las aguas residuales (Barceló 2007).

Numerosos estudios en distintas partes del mundo han detectado la presencia de los más diversos fármacos en aguas residuales, de ríos, lagunas y subterráneas e incluso en sedimentos de los cursos de agua, muchos de los cuales se han recuperado en preocupantes niveles que rondan los  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . (Kolpin y col 2002, Richardson 2007, Kostopoulou y Nikolaou 2008). Particularmente, es muy preocupante la presencia de antibióticos en estos ambientes, ya que mediante su persistencia a bajas dosis, pueden promover la aparición y proliferación de microorganismos resistentes, lo que constituye un serio problema para el futuro de la salud humana (Miao y col 2004, Yang y col 2005).

La gran preocupación por este tema promovió la creación en Europa en 2004, de una organización internacional denominada Proyecto EMCO (del inglés, *emerging contaminants*) cuya finalidad es abordar el estudio de este problema en forma

multidisciplinaria. En el segundo *workshop* de esta organización, llevado a cabo en Belgrado en abril de 2007 y denominado ‘Emerging Contaminants in Wastewaters: Monitoring Tools and Treatment Technologies’ generó la edición de un número especial de la revista *Trends in Analytical Chemistry*. En esta publicación se hace un fuerte hincapié en la necesidad de promover un adecuado monitoreo de estos contaminantes y del desarrollo de instrumentación analítica que permita investigar la incidencia y el comportamiento de los contaminantes emergentes en las PTARs. Se destaca también aquí la enorme complejidad que implica este desafío debida al tipo de matriz con la que se debe trabajar y a la gran diversidad de propiedades fisicoquímicas y toxicológicas de los fármacos a analizar (Barceló y Petrovic 2007).

A la luz de estas consideraciones, resulta evidente la necesidad de disponer de métodos analíticos confiables para la determinación de la concentración de antibióticos en aguas residuales, de manera que puedan llevarse a cabo controles de efluentes de las PTARs para asegurar una correcta eliminación de los mismos en el medio ambiente. Debido a su uso masivo, el amplio espectro de acción antimicrobiana y la escasa metabolización que sufren, las TCs son unos de los antibióticos que generan mayor necesidad de control.

#### 5.3.1. Antecedentes

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, o masas en *tándem* (MS-MS), vía interfaces de ionización a presión atmosférica (API, del inglés, *atmospheric pressure ionization*), ya sea por *electrospray* (ESI) o ionización química (APCI, del inglés, *atmospheric pressure chemical ionization*), ha resultado la técnica analítica de elección para la determinación de TCs en matrices medio ambientales tales como aguas naturales y/o residuales. Gracias a su gran sensibilidad y la propiedad de proveer información confirmatoria de la identidad de los compuestos en estudio, estas técnicas han llevado al desarrollo de numerosos métodos de análisis (Lindsey y col 2001, Zhu y col 2001, Hamscher y col 2002, Reverete y col 2003, Yang y col 2005, Choi y col 2007, Ye y col 2007, Kim y Carlson 2007, Ruyck y De Ridder 2007).

Sin embargo, un aspecto crítico en el análisis cuantitativo de analitos presentes en muestras complejas por medio de CLAR-MS, es la aparición de efecto matriz conocido particularmente como “supresión de la ionización” (Annesley 2003). Este efecto se produce por una deficiente ionización del analito debido a la presencia de compuestos no volátiles de la matriz que coeluyen con el mismo, lo que puede conducir a diferencias muy significativas en la respuesta de un analito en una

muestra en comparación con una solución de estándar en solvente puro. Para compensar este efecto debe recurrirse a largos procedimientos de extracción selectiva, a medios de *clean-up* efectivos, o a grandes diluciones que minimicen este problema. Otro recurso es utilizar métodos de calibración con estándar interno, calibración en matriz blanco (muy difíciles de conseguir para muestras ambientales), o por adición de estándar en la muestra (Stueber y Reemtsma 2004). La gran desventaja de estos métodos es que pueden requerir de costosos estándares internos marcados isotópicamente (Choi y col 2001), o consumir mucho tiempo y trabajo en la etapa preanalítica, conduciendo además a pérdida de sensibilidad por el efecto de supresión de la señal (Kloepfer y col 2005). Más aún, un grave inconveniente en estas situaciones es que, aunque se haya logrado un método adecuado para la determinación de los analitos de interés en una muestra de agua, la enorme variabilidad de las matrices ambientales, tanto en el tiempo, como por el lugar de la toma de muestra, hace que siempre se corra el riesgo de la aparición de nuevas interferencias. Esta realidad obliga a una continua adaptación del método, a veces, para cada muestra en particular, y otras veces imposible de lograr.

### 5.3.2. Selección de la metodología

Una alternativa interesante para abordar el problema de la cuantificación de fármacos contaminantes del agua de manera confiable y utilizando técnicas más sencillas y menos costosas que la CLAR-MS, puede ser el empleo de datos cromatográficos o electroforéticos de segundo orden obtenidos con detectores DAD o DF-BR.

Como se vio en la Introducción, el procesamiento de este tipo de datos por medio de algoritmos quimiométricos que permiten obtener modelos de calibración aprovechando la ventaja de segundo orden, posibilita el desarrollo de métodos capaces de obtener resultados de alta exactitud y precisión, aún en presencia de nuevos compuestos desconocidos en cada muestra.

MCR-ALS (De Juan y col 2000) es un algoritmo de calibración multivariada, que se aplica cada vez con más frecuencia como una alternativa para resolver sistemas complejos (De Juan y Tauler 2003, Comas y col 2004, Antunes y Esteves da Silva 2005, Mas y col 2007, Vosough y Salemi 2007, Jalali-Heravi y col 2007, Cañada-Cañada y col 2009a, Shariati-Rad y Hasani 2009, del Río y col 2010). Recientemente ha sido empleado también en el desarrollo de métodos para el análisis de muestras ambientales (Peré Trepát y col 2004, Peré Trepát y col 2005, Peré Trepát y Tauler 2006, Gil García y col 2009), por lo que se presenta como una herramienta muy útil

en el propósito de desarrollar un método analítico para la determinación de las distintas TCs en muestras de aguas residuales.

Por otro lado, el algoritmo U-PLS/RBL (Olivieri 2005a, Escandar y col 2007) es otra alternativa apropiada para procesar datos complejos conservando la ventaja de segundo orden, que ha sido utilizado fundamentalmente para calibrar métodos basados en espectroscopia de fluorescencia (Culzoni y col 2006, Gil y col 2006, Girón y col 2008, Bortolato y col 2008). Sin embargo, hasta el momento del desarrollo del presente trabajo de tesis, este algoritmo no había sido utilizado con datos provenientes de técnicas separativas tales como cromatografía o electroforesis. Por lo que, evaluando la complejidad de los datos a analizar y el rendimiento obtenido para este algoritmo en otros sistemas, se planteó la posibilidad de que el mismo fuera también adecuado para resolver las potenciales interferencias causadas por la matriz y los compuestos desconocidos en las muestras de agua residual.

Otro aspecto importante a tener en cuenta en el diseño de una metodología para el análisis de residuos en muestra ambientales es el de la preconcentración de los analitos de manera de lograr una sensibilidad adecuada para el propósito buscado. Basándonos en la experiencia desarrollada por Martínez Galera y Gil García en el tema de preconcentración de compuestos a partir de muestras de agua (Martínez Galera y col 2004, Gil García y col 2006a, Gil García y col 2006b, Barranco Martínez y col 2007, Santiago Valverde y col 2007), y en conjunto con este grupo de investigación, se seleccionó un sistema de extracción en fase sólida (EFS) en cartuchos para el tratamiento preanalítico de las muestras de agua residual.

#### 5.4. Objetivos

Los objetivos del presente capítulo de tesis fueron:

- Desarrollar un método cromatográfico con preconcentración y purificación mediante EFS, para determinar ocho tetraciclinas: TC, OXTC, CLTC, MINC, DEMC, METC; DOXC, MEC como contaminantes en aguas residuales.
- Aplicar métodos de pretratamiento de señal tales como corrección de línea de base para simplificar la complejidad de los datos y de transferencia de calibración para resolver problemas de recuperación en la etapa preanalítica.
- Obtener modelos de calibración multivariada de segundo orden utilizando los algoritmos MCR-ALS y U-PLS/RBL para resolver la contribución de los componentes no esperados en las muestras. Comparar el rendimiento de ambas herramientas quimiométricas en procesamiento de datos de muestras complejas.

## 5.5. Materiales y métodos

### 5.5.1. Instrumental y *softwares*

Para el desarrollo del método cromatográfico se utilizó un cromatógrafo líquido del Laboratorio de Hidrogeología y Química Analítica de la Universidad de Almería, España. El mismo consta de un sistema de bomba cuaternaria Modelo 600E y un DAD Modelo 2969 de Waters (Milford, Estados Unidos) y de una válvula de inyección de seis puertos Rheodyne 775 (Berkley, Estados Unidos). La adquisición y procesamiento de datos de este instrumento se realizó mediante el *software* Millennium 32 también de Waters.

Para la adquisición de los datos de segundo orden utilizados en la elaboración de los modelos de calibración y en la validación del método se utilizó un cromatógrafo líquido Agilent Serie 1100 (Waldbron, Alemania), de nuestro laboratorio. El mismo consta de una bomba cuaternaria, desgasificador de membrana, horno de columna termostatzado, inyector automático y un detector DAD y es controlado mediante el *software* Chemstation versión B 0103 de Agilent.

La columna utilizada fue una Aquasil C18 de Thermo Electron Corp., de 150 x 4.6 mm, conteniendo como fase estacionaria partículas de sílice de 5µm, unidas a octadesilsilano y un bloqueante de silanoles residuales con terminal hidrofílica, que permite mejorar notablemente la retención de compuestos polares y la utilización de fases móviles con alto contenido acuoso sin riesgos de colapso.

En la etapa de preconcentración de las muestras mediante EFS, se utilizó un sistema de vacío Vac V-500 con un controlador V-800 de Büchi (Suiza), conectado a un sistema *manifold* de Waters.

Las rutinas utilizadas para el manejo de los datos fueron escritas en MATLAB 6.0 (The Math Works, Natick, Estados Unidos, 2000). Para la corrección de la línea de base se utilizaron adaptaciones para datos de segundo orden de las rutinas publicadas por Paul Eilers (Eilers 2004) provistas por Jez Braga de Unicamp, Brazil. La aplicación de PDS se realizó a través de una rutina incluida en el PLS toolbox 3.5 (Wise y col 2005).

MCR-ALS se desarrolló a través de la interfaz gráfica provista por Romá Tauler en su página <http://www.ub.edu/mcr/welcome.html> (Jaumot y col 2005), mientras que U-PLS/RBL se implementó mediante las rutinas escritas por Alejandro Olivieri, incluidas en la interfaz gráfica MVC2 (Olivieri y col 2004).

### 5.5.2. Reactivos y cartuchos

Los estándares analíticos de clorhidrato de TC (97.3% p/p), clorhidrato de OXTC (96.2% p/p), clorhidrato de CLTC (85.7% p/p), clorhidrato hemidrato de DEMC (92.8%p/p) y clorhidrato de METC (99.6% p/p) se obtuvieron de Riedel-de Haën (Seelze, Alemania). El hidrato de DOXC (98.0% p/p) se obtuvo de Fluka (Buchs, Suiza), mientras que el sulfosalicilato de MEC (98.0% p/p) y el clorhidrato de MINC (90.0% p/p) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Munich, Alemania). Los solventes acetonitrilo (ACN) y metanol (MeOH) grado cromatográfico se obtuvieron de J.T. Baker (Deventer, Holanda). Los ácidos oxálico 2-hidrato (99%) y fórmico (85%) se obtuvieron de Panreac (Barcelona, España). El agua ultrapura utilizada en Almería se obtuvo de un sistema de purificación Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, Estados Unidos), y la utilizada en Santa Fe, de un equipo Milli-Q Biocel System de Millipore SAS (Molsheim, Francia).

Los cartuchos para EFS Oasis MAX de 6 cm<sup>3</sup> conteniendo 0.5 g de fase estacionaria y los cartuchos Oasis HLB 6 cm<sup>3</sup> conteniendo 200 mg de fase estacionaria, se obtuvieron de Waters (Milford, MA, Estados Unidos).

### 5.5.3. Muestras

Las muestras de agua residual efluente se recolectaron tanto de una PTAR en Almería, España, como de una PTAR de la Ciudad de Esperanza, Santa Fe, Argentina. En todos los casos, las muestras se centrifugaron a 5000 × g, se filtraron a través de membranas de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro y se almacenaron a 4°C en heladera por un período máximo de 2 días para minimizar la degradación microbiana.

### 5.5.4. Soluciones

Los solventes orgánicos para la fase móvil fueron filtrados por filtros de membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.45 μm de poro antes de ser utilizados, mientras que las soluciones acuosas se filtraron con membranas de acetato de celulosa del mismo tamaño de poro.

Las soluciones muestras y estándares fueron filtradas por filtro de PTFE tipo jeringa en el momento previo a la inyección en el sistema cromatográfico.

#### 5.5.4.1. Fase móvil y solvente de inyección

Como **solvente de inyección** de las soluciones de estándares y muestras preconcentradas se utilizó una solución de ácido fórmico 1% v/v.

Como fase móvil se utilizó una mezcla de una solución A consistente en ácido oxálico 10.0mmol L<sup>-1</sup> y una solución B constituida por una mezcla de ACN y MeOH (50:50, v/v).

#### 5.5.4.2. Soluciones estándar

Se prepararon las siguientes soluciones estándar:

- **Soluciones estándar concentradas** de cada TCs de 200 mg L<sup>-1</sup> pesando exactamente y disolviendo los compuestos correspondientes en MeOH. Estas soluciones se protegieron de la luz y se almacenaron a 4 °C en heladera, condiciones en las que resultaron estables por al menos 3 meses.
- **Soluciones estándar de trabajo** para la puesta a punto del sistema cromatográfico y del procedimiento de extracción. Se obtuvieron diariamente por diluciones adecuadas de alícuotas de las soluciones estándar concentradas en solvente de inyección para lograr soluciones combinadas de los ocho compuestos en las concentraciones necesarias.
- **Soluciones estándar de calibración** por diluciones convenientes de las soluciones estándares concentradas en solvente de inyección para obtener siete niveles de calibrado, cada uno de ellos por triplicado conteniendo 0.05 - 0.10 - 0.20 - 0.40 - 0.60 - 0.80 y 1.00 mg L<sup>-1</sup> de cada una de las TCs.

#### 5.5.4.3. Soluciones muestra

Se prepararon las siguientes soluciones muestra:

- **Solución muestra** acondicionando 250.0 mL de la muestra de agua residual centrifugada y filtrada con 1.0 mL de una solución de ácido etilendiaminotetracético disódico (EDTA), 285 mg de ácido cítrico y ácido clorhídrico (HCl) diluido hasta llegar a pH= 2.8. Este acondicionamiento se efectuó en el momento previo a la EFS.
- **Soluciones muestra fortificadas** para los ensayos de validación. Se obtuvo un set de validación consistente en seis soluciones con niveles de fortificación aleatoria para cada analito (M1-M6) y cuatro soluciones con igual concentración para todas TCs (R1-R4), estas últimas para evaluar la precisión del procedimiento de extracción. Los niveles de fortificación obtenidos para cada solución se presentan en la Tabla 5.1. En

todos los casos se prepararon a partir de soluciones muestra acondicionadas, agregando volúmenes adecuados de soluciones estándares concentradas.

Tabla 5.1: Composición de las muestras de validación

Muestra	Analito							
	MINC	OXTC	TC	DEMC	CLTC	METC	DOXC	MEC
M1	0.40	2.00	4.00	0.80	0.40	0.80	0.40	3.20
M2	0.80	0.40	1.60	2.40	1.60	2.00	0.80	4.00
M3	2.00	1.20	0.40	1.60	4.00	4.00	0.80	1.60
M4	3.20	0.80	1.60	0.00	0.80	0.40	4.00	1.20
M5	0.00	4.00	2.40	4.00	2.40	2.00	2.40	0.40
M6	4.00	1.60	0.80	0.40	0.00	1.20	3.20	1.60
R1-R4	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00

Todas las concentraciones están dadas en  $\mu\text{g L}^{-1}$

#### 5.5.5. Procedimiento de pretratamiento de muestra

A los fines de aumentar tanto la sensibilidad como la selectividad del método a desarrollar, se evaluaron dos procedimientos de pretratamiento de muestra basados en EFS. Mediante este tipo de extracciones se logra generalmente dos propósitos simultáneamente, preconcentrar los analitos y separarlos de algunos de los componentes de la muestra que pueden actuar como interferencias. El primer procedimiento evaluado se basó en el propuesto por Yang y su grupo de trabajo (Yang y col 2005) utilizando cartuchos Oasis HLB. Estos cartuchos para uso genérico, poseen un sorbente de fase reversa con dos tipos de terminales, unas hidrofílicas y otras lipofílicas, reteniendo de esta manera una amplia variedad de compuestos. A través de estos cartuchos, preacondicionados con 3.0 mL de MeOH, 3.0 mL de HCl 0.5 mol  $\text{L}^{-1}$  y 3.0 mL de agua ultrapura, se filtraron alícuotas de 120.0 mL de muestras de agua preacondicionadas, a una velocidad de 5.0 mL  $\text{min}^{-1}$ . Luego, los cartuchos con los analitos retenidos se lavaron con 3.0 mL de agua ultrapura para eliminar restos de la matriz. Finalmente, las TCs se eluyeron con 5.0 mL de MeOH y el extracto se concentró a 500  $\mu\text{L}$  por evaporación en corriente de nitrógeno y protegido de la luz, para luego filtrarlo e inyectarlo en el cromatógrafo.

En el segundo procedimiento se utilizaron cartuchos Oasis MAX, los que poseen un sorbente que actúa de modo mixto, como fase reversa y como

intercambiador aniónico, especial para la retención de compuestos ácidos. Estos cartuchos se preconditionaron con 5.0 mL de MeOH y 5.0 mL de agua ultrapura ajustada pH = 2.8 con HCl diluido. A continuación se pasaron a través de ellos 250.0 mL de muestra acondicionada, a una velocidad de flujo de 8 mL min<sup>-1</sup>. Después se lavaron con 15.0 mL de agua ultrapura (pH = 2.8), 5.0 mL de NH<sub>4</sub>OH 5% (p/v) y 10.0 mL de MeOH, y se secaron mediante una corriente de aire durante 20 min. Los analitos retenidos en el cartucho se eluyeron con 1.0 mL de ácido fórmico 1% (v/v) seguidos de 5.0 mL de MeOH para asegurar una buena recuperación. Finalmente los extractos se concentraron a 1.0 mL eliminando el MeOH por evaporación bajo una corriente de N<sub>2</sub> y se filtraron a través de membranas de PTFE de 0.45 µm antes de ser inyectados en el sistema cromatográfico.

La alta polaridad de algunas de las TCs dificulta su adecuada retención en los cartuchos de EFS, a pesar de la versatilidad de los sorbentes estudiados. La necesidad de preconcentrar volúmenes grandes de muestra para lograr la sensibilidad necesaria, llevó a que debiera establecerse el **volumen de rotura** de los cartuchos, es decir, el máximo volumen de muestra que puede filtrarse sin pérdida significativa de los analitos. Para esto se prepararon muestras de agua ultrapura preconditionadas de distintos volúmenes (100.0 a 1000.0 mL), todas ellas con la misma cantidad de TCs (1µg de cada una) y fueron filtradas por los cartuchos de EFS, obteniéndose extractos concentrados.

Además, para estudiar el efecto de la señal de fondo o efecto matriz proveniente del cartucho, se procesaron alícuotas de 250.0 mL de agua ultrapura acondicionándolas y filtrándolas de la misma manera que las soluciones muestra y se fortificaron los extractos con concentraciones exactas de estándares de TCs.

#### 5.5.6. Desarrollo del método cromatográfico

El método cromatográfico se desarrolló en base un método publicado por Cinquina y su grupo de trabajo para la determinación de cuatro TCs en leche y músculo de animales (Cinquina y col 2003). El mismo fue modificado a través de la implementación de un programa de gradiente, para adecuarlo a la separación de un número mayor de analitos.

Con el objetivo de alcanzar suficiente sensibilidad en la determinación de las TCs en aguas residuales se estudió también el efecto del volumen de inyección. Para ello se analizaron soluciones estándares conteniendo 80 ng de cada TCs en 5, 20, 50, 100, 150 y 200 µL.

Para la selección de la longitud de onda de monitoreo se estudiaron los espectros de absorción de los analitos en las condiciones de la separación, mediante la información provista por el DAD.

### 5.5.7. Adquisición y pretratamiento de datos

La adquisición de datos se realizó en el rango de 230 - 400 nm cada 1.5 nm y entre los 3.0 y los 16.0 min cada 0.4 segundos, por lo que se generaron matrices de datos de 1950 filas, correspondientes a los tiempos de elución, y 114 columnas correspondientes a las longitudes de onda.

A los fines de simplificar el análisis multivariado de estas muestras tan complejas, los datos obtenidos se dividieron en ocho regiones de manera de estudiar cada analito individualmente. En la Tabla 5.2 se informan las regiones espectrales y temporales utilizadas para el análisis de cada TCs.

Las matrices de datos obtenidas para cada analito fueron sometidas a dos pretratamientos antes de ser empleadas para calibrar y predecir los analitos de interés de manera adecuada.

Tabla 5.2: Regiones de las matrices de datos empleadas para el análisis de cada analito

Región	Analito	Región temporal	Región espectral
		Nº de sensores/ min	Nº de sensores/ nm
1	MINC	201-280	1-56
		4.3562-4.8628	272-354
2	OXTC	392-538	45-105
		5.6095-6.5828	285-354
3	TC	568-628	60-86
		6.7828-7.1828	361-400
4	DEMC	752-812	1-86
		8.0095-8.4095	272-400
5	CLTC	1037-1107	70-86
		9.9095-10.3762	375-400
6	METC	1220-1280	15-86
		11.1295-11.5295	293-400
7	DOXC	1321-1361	40-70
		11.8028-12.0695	330-376
8	MEC	1538-1658	1-86
		13.2495-14.0495	272-400

Como primera medida se aplicó un procedimiento de **transferencia de calibración** para corregir el efecto del volumen de rotura observado para los analitos más polares luego de la EFS (Feudale y col 2002, Santiago Valverde y col 2006). La estandarización de la señal se realizó mediante la aplicación del algoritmo PDS (Yang y col 1991) que se describió en la Introducción. Para ello se utilizaron matrices de datos correspondientes a los cromatogramas de tres soluciones estándares obtenidas en solvente de inyección, con concentraciones representativas del rango de calibrado (situación A) y de tres extractos de soluciones estándares diluidas preparadas en 250.0 mL de agua ultrapura, que luego de ser sometidos a la preconcentración deberían tener las mismas concentraciones que los estándares sin preconcentrar (situación B).

En segundo lugar, el algoritmo de Eilers, basado en los cuadrados mínimos asimétricos, fue aplicado para corregir la línea de base minimizando la enorme señal de fondo presente en los cromatogramas, y de esta manera contar con datos más sencillos para la calibración.

#### 5.5.8. Modelos de calibración

Debido a la coelución de componentes de la matriz con los picos de los analitos, se utilizaron los algoritmos de calibración de segundo orden MCR-ALS y U-PLS/RBL a los fines obtener resultados cuantitativos.

##### 5.5.8.1. MCR-ALS

###### 5.5.8.1.1. Obtención de los arreglos de datos

Cada analito fue modelado individualmente aumentando en cada caso las matrices de datos correspondientes a cada una de las regiones seleccionadas en la dimensión temporal para obtener las matrices  $D_{t,i}$ . Cada una de estas matrices aumentadas fue construida con las 21 submatrices correspondientes a los calibradores (siete niveles por triplicado) y la matriz de la muestra a analizar.

###### 5.5.8.1.2. Construcción de los modelos

En primer lugar, se determinó el número de componentes contribuyentes a la señal analítica en cada una de las regiones, aplicando SVD. Luego, se construyeron las estimaciones iniciales extrayendo la información espectral de cada componente mediante SIMPLSMA. Finalmente, dadas  $D_{t,i}$  y  $S^T$ , se aplicaron restricciones apropiadas

de no-negatividad, unimodalidad y trilinealidad con el objetivo de obtener la solución correcta en cada caso.

#### 5.5.8.2. U-PLS/RBL

Los modelos U-PLS se obtuvieron, tal como se describió en la Introducción, utilizando la información de las submatrices de los calibradores para cada región, las cuales fueron vectorizadas y agrupadas en respectivas matrices  $R_i$ . Las variables latentes de calibración fueron estimadas en cada región por la aplicación del método de validación cruzada (Haaland y Thomas 1998), y se obtuvieron los coeficientes de regresión. Luego, mediante RBL, se obtuvo el número de interferencias ( $N_{int}$ ) en cada región de las matrices de las muestras de agua residual, comparando los residuos de predicción con el ruido instrumental. Para el cálculo de los residuos de predicción ( $s_u$ ) se empleó la Ecuación (1.39).

### 5.6. Resultados y discusión

#### 5.6.1. Extracción en fase sólida

Si bien las recuperaciones de TCs a partir de agua ultrapura fueron comparables para ambos tipos de cartuchos ensayados, al procesar muestras de aguas residuales fortificadas con los analitos, se observó que los cartuchos Oasis HLB eran muy poco selectivos, obteniéndose extractos sumamente sucios. Los cromatogramas de estos extractos produjeron una señal de base extremadamente alta, en la que fue imposible diferenciar los picos de los analitos. Se seleccionaron, por lo tanto, los cartuchos Oasis MAX para la extracción, con los que se obtuvieron extractos considerablemente más limpios que en el caso anterior, los cuales, como se verá más adelante, produjeron cromatogramas con señal de base alta, pero en los que si se pudieron identificar los picos de los analitos.

Para establecer el volumen de rotura de los cartuchos Oasis MAX (500 mg/ 6 mL), se obtuvieron curvas de calibración univariada para cada analito utilizando las señales de soluciones estándares de calibración a 360 nm y se predijeron con ellas las concentraciones recuperadas de TCs, en cada uno de los experimentos realizados con las tres muestras de agua ultrapura fortificadas con 1  $\mu$ g de cada TCs.

El acondicionamiento de la muestra y de los cartuchos en el momento previo a la extracción a pH menor a 3.0 resultó un punto clave para optimizar la retención de las TCs, al mantener los compuestos por debajo de sus  $pK_a$  (3.3 - 9.5).

Los resultados obtenidos, que se presentan en la Tabla 5.3, muestran que las recuperaciones de los compuestos más polares, tales como MINC, OXTC y TC, disminuyen significativamente al aumentar el volumen de agua filtrado, mientras que para los demás compuestos, las recuperaciones se mantienen relativamente constantes, aún para volúmenes grandes de muestra.

En base a estos resultados se seleccionó 250.0 mL como volumen de muestra a procesar, obteniéndose una solución de compromiso a los problemas presentados por la pérdida de los analitos polares y la necesidad de obtener un alto factor de concentración para lograr una buena sensibilidad en el método. El factor de concentración para el pretratamiento de las muestras fue entonces de 250.

Por otro lado, el estudio del efecto del cartucho sobre la señal analítica, dio como resultado que no había cambios significativos en las señales de los analitos cuando las mismas provenían de extractos de agua ultrapura fortificada con respecto a las señales de los analitos que no habían pasado por el cartucho. De esta manera se confirmó ausencia de efecto matriz debido a la EFS.

Tabla 5.3: Recuperaciones en función del volumen preconcentrado

Volumen de agua (mL)	Recuperaciones (%)							
	MINC	OXTC	TC	DEMC	CLTC	METC	DOXC	MEC
100.0	70.2	85.2	86.6	89.2	98.7	100.1	99.1	97.8
250.0	70.0	84.5	87.3	88.8	88.7	96.5	99.0	87.2
350.0	50.8	73.6	71.0	92.8	95.0	123.1	131.7	91.3
500.0	48.7	68.2	71.3	90.3	105.9	109.2	111.4	87.4
1000.0	22.9	30.1	37.7	71.3	70.8	93.5	80.1	88.9

### 5.6.2. Sistema cromatográfico

La adecuada separación de los ocho analitos se logró en un sistema de gradiente, combinando variaciones en la velocidad de flujo y la composición de la fase móvil (Tabla 5.4).

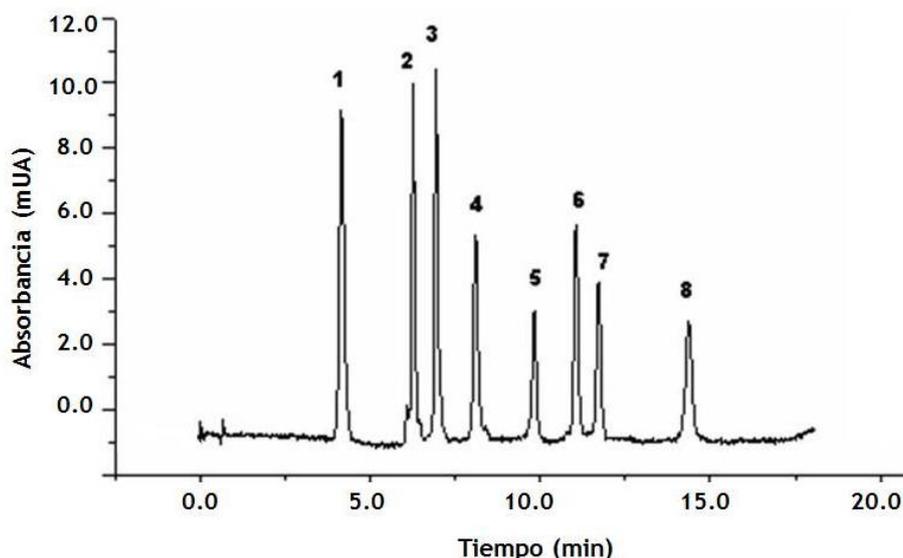
Tabla 5.4: Programa de gradiente para la separación cromatográfica de tetraciclinas

Tiempo (min)	Velocidad de flujo (mL min <sup>-1</sup> )	% A	% B
0.0	1.00	85	15
2.0	1.00	70	30
6.0	1.00	70	30
8.0	1.20	65	35
10.0	1.50	60	40
16.0	1.50	60	40
18.0	1.50	85	15
20.0	1.00	85	15

A: ácido oxálico 10 mmol L<sup>-1</sup>; B: MeOH:ACN (50:50, v/v)

La utilización de ácido fórmico al 1% (v/v) como solvente de elución en la EFS, condicionó el uso del mismo como solvente de inyección de los analitos en el sistema cromatográfico. La simetría y el ancho de pico fueron buenas para todos los analitos en este solvente de inyección, con rendimiento comparable a otros solventes investigados tales como mezclas agua:ACN, agua:MeOH y ácido oxálico:MeOH:ACN.

Figura 5.2: Señal cromatográfica de los analitos puros



Cromatograma registrado a 360 nm correspondiente a una solución estándar mezcla conteniendo 0.50 mg L<sup>-1</sup> de cada una de las TCs: (1) MINC, (2) OXTC, (3) TC, (4) DEMC, (5) CLTC, (6) METC, (7) DOXC y (8) MEC.

El estudio del volumen de inyección dio como resultados que el área y la forma de los picos se mantenían constantes hasta un volumen de inyección de 100  $\mu\text{L}$ . Por arriba de este volumen los picos se ensanchaban y deformaban perdiendo resolución. Por esta razón se eligió trabajar con 100  $\mu\text{L}$  como volumen de inyección, con lo que se logra buena sensibilidad sin perder rendimiento en la separación.

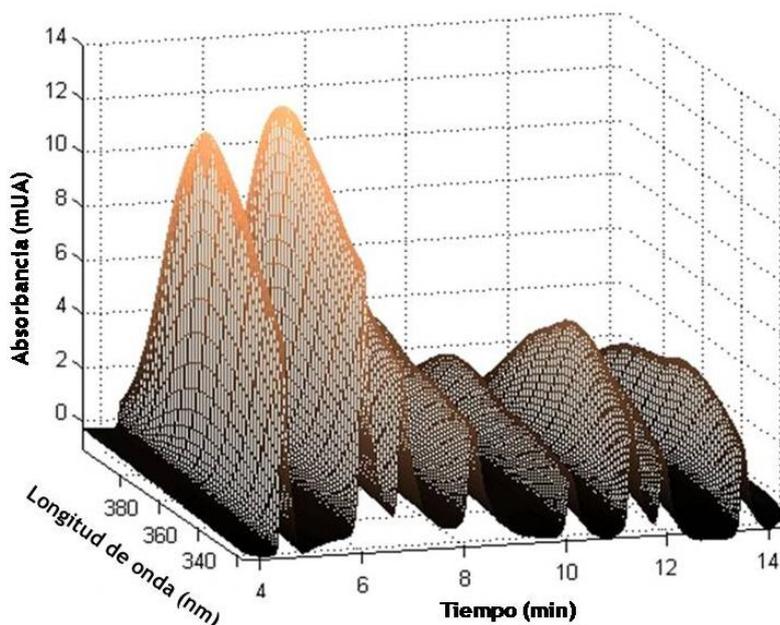
Como longitud de onda de monitoreo se utilizó la de 360 nm con ancho de banda de 4 nm, condiciones en las que todos los analitos presentaban buena señal.

En la Figura 5.2 se muestra la señal cromatográfica obtenida para las 8 TCs en estudio en las condiciones descritas. Como puede verse se logró una excelente retención y resolución para todos los analitos, obteniéndose en todos los casos buena forma y tamaño de pico en un tiempo total de análisis de 20 min.

### 5.6.3. Análisis y pretratamiento de los datos

Como puede observarse en la Figura 5.3, que representa la matriz de datos obtenida para una solución de estándares, todos los analitos están cromatográficamente separados y pueden identificarse por sus espectros y tiempos de retención.

Figura 5.3: Representación de la matriz de datos de los analitos puros

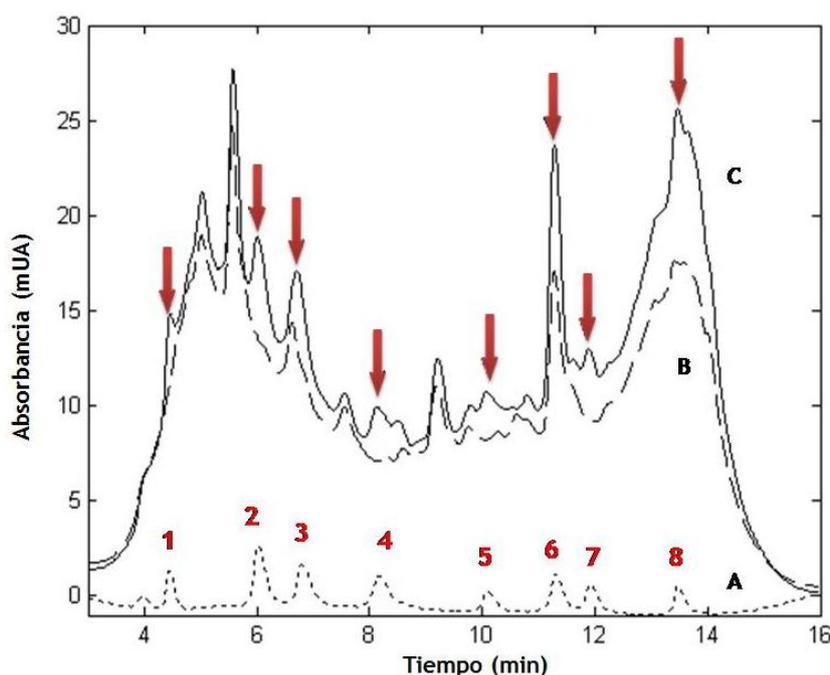


Señales cromatográficas y espectrales obtenidas con el DAD para una solución estándar combinada de las 8 TCs en una concentración de  $0.50 \text{ mg L}^{-1}$  para cada una de ellas.

Sin embargo, no ocurre lo mismo al analizar los datos de los extractos obtenidos a partir de aguas residuales. Los procedimientos de preconcentración, como la EFS, no necesariamente son selectivos para los analitos de interés y pueden retener y concentrar otros compuestos de la muestra con características similares a las de los analitos. En este caso, la gran complejidad del problema analítico en estudio se puede apreciar en la Figura 5.4, en donde se comparan cromatogramas correspondientes a una solución estándar, un extracto de una muestra de agua residual basal y un extracto de la misma muestra de agua residual luego de adicionarle  $2.00 \mu\text{g L}^{-1}$  de las ocho TCs, concentración cercana a la esperada en aguas residuales (Yang y col 2005, Karthikeyan y Meyer 2006).

Como se evidencia en esta figura, durante la EFS se retienen un gran número de compuestos desconocidos que coeluyen con los analitos y producen una gran señal de fondo. Debido a esto, resulta imposible realizar la identificación certera de las TCs en estos cromatogramas o la cuantificación de las mismas mediante calibración univariada, por lo que se recurrió a métodos de calibración de segundo orden.

Figura 5.4: Señal cromatográfica de los extractos de aguas residuales



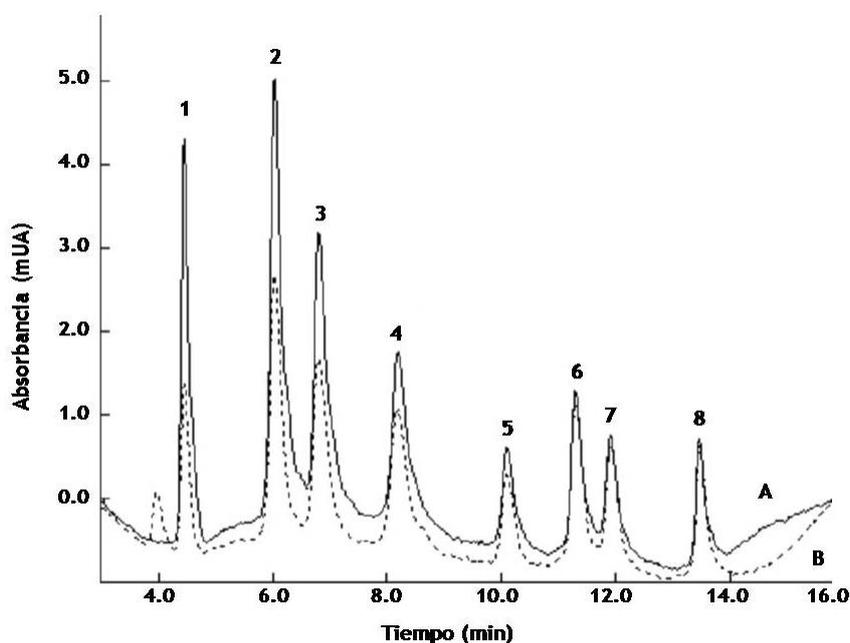
Cromatogramas registrados a  $\lambda = 360 \text{ nm}$  para  
 A: una solución estándar de las 8 TCs en concentración  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$   
 B: extracto de una muestra basal de agua residual.  
 C: extracto de una muestra de agua residual fortificada con  $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada TCs antes de ser sometida a EFS (factor de concentración = 250).

## 5.6.3.1. Transferencia de calibración

Como se confirmó en el análisis del volumen de rotura de los cartuchos, los analitos más polares se pierden parcialmente durante el procedimiento de preconcentración. En la Figura 5.5 puede apreciarse esta situación al comparar el cromatograma de un extracto de agua ultrapura fortificada con los analitos con el cromatograma de un extracto fortificado luego de la EFS. Como se ve, cinco de los analitos presentan problemas de recuperación, siendo la pérdida más pronunciada para los tres primeros.

Una estrategia para solucionar este problema podría haber sido someter todas las soluciones estándares a la EFS, sin embargo, esta opción requiere de mucho tiempo de procesamiento de muestra y resulta en costos adicionales. Para resolver este problema de manera eficiente se recurrió entonces, al uso de modelos de transferencia de calibración, para lo cual se necesita someter sólo un número reducido de calibradores al procedimiento de preconcentración y a partir de ellos construir un modelo que permita predecir las muestras tratadas.

Figura 5.5: Recuperación de analitos en la EFS



Cromatogramas registrados a  $\lambda = 360$  nm para

A: una solución estándar de las 8 TCs en concentración  $0.50 \text{ mg L}^{-1}$

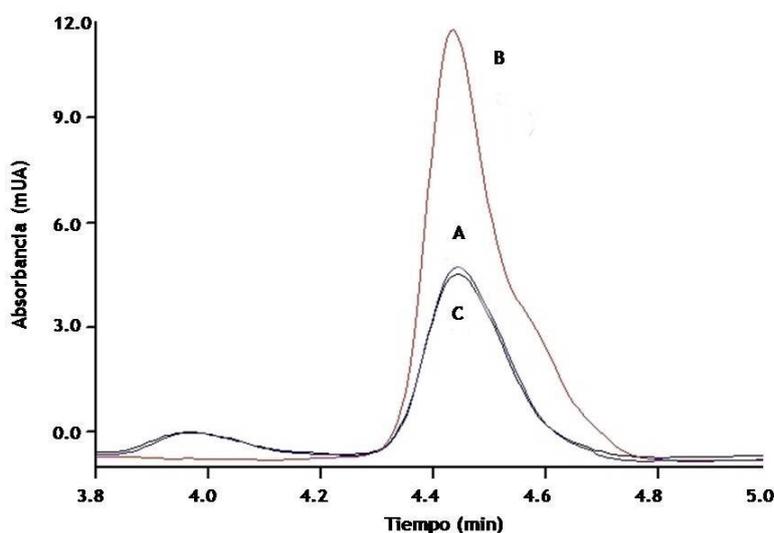
B: extracto de una muestra de 250.0 mL de agua ultrapura fortificada con  $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada TCs antes de ser sometida a EFS (factor de concentración = 250).

Mediante la aplicación de PDS se halló una matriz de transferencia que permitió convertir las señales originadas por las 21 soluciones calibradoras preparadas en solvente (situación A) a la señal esperada si los calibradores hubieran sido preconcentrados (situación B). Los parámetros óptimos empleados en la estandarización fueron una ventana igual a 3 y una tolerancia igual a 0.01.

El resultado de la estandarización para la MINC se puede apreciar, a modo de ejemplo, en la Figura 5.6.

Las señales estandarizadas de los calibradores obtenidas en este procedimiento, se utilizaron para construir los modelos de calibración multivariada que se emplearon para predecir las concentraciones de TCs en las muestras.

Figura 5.6: Transferencia de calibración



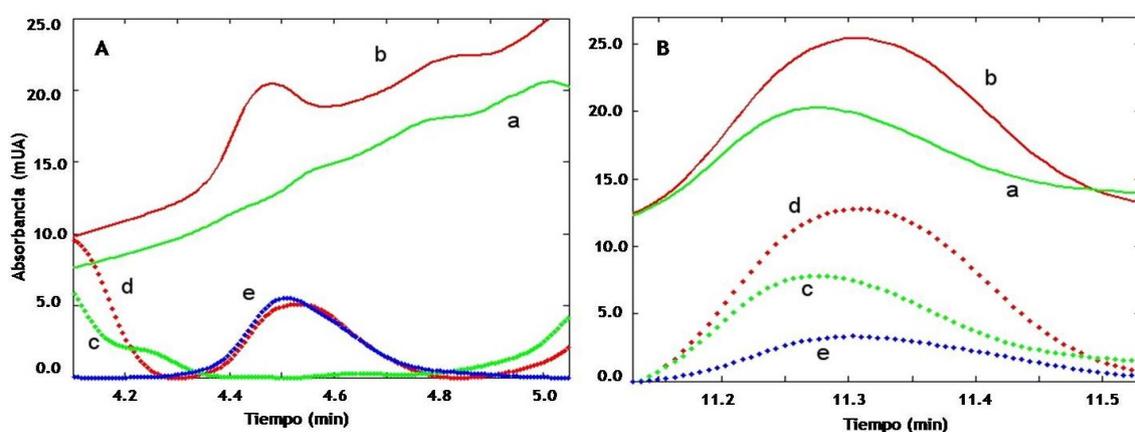
Región 1 de los cromatogramas registrados a  $\lambda = 360$  nm para  
 A: extracto de una muestra de 250.0 mL de agua ultrapura fortificada con  $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada TCs antes de ser sometida a EFS (factor de concentración = 250).  
 B: una solución estándar de las 8 TCs en concentración  $0.50 \text{ mg L}^{-1}$   
 C: señal B luego de ser sometida al procedimiento de estandarización para transferencia de calibración.

#### 5.6.3.2. Corrección de línea de base

La Figura 5.7 muestra el efecto de la corrección de la línea de base en la señal cromatográfica mediante el algoritmo de Eilers para dos de las regiones analizadas. Como se puede observar, en la región 1 la eliminación de la señal de fondo permitiría trabajar con un sistema en el que las interferencias prácticamente han desaparecido, siendo la señal resultante para la muestra fortificada, totalmente

correspondiente a la señal del estándar puro del analito. Si bien no todos los picos lograron corregirse con este tratamiento de esta manera tan categórica como el de MINC, el impacto de los componentes desconocidos fue disminuido de manera significativa en todas las regiones, permitiendo la simplificación del sistema y la resolución de los ocho analitos de manera razonable. En el caso más complejo de la Región 6, el pretratamiento de la señal logra restar señal de fondo, pero la señal resultante para la muestra fortificada aún difiere en gran medida con la señal del estándar puro de METC, indicando la persistencia de contribuciones de compuestos desconocidos.

Figura 5.7: Corrección de línea de base por el algoritmo de Eilers



Señales cromatográficas a 360 nm. A: Región 1; B: Región 6 para:

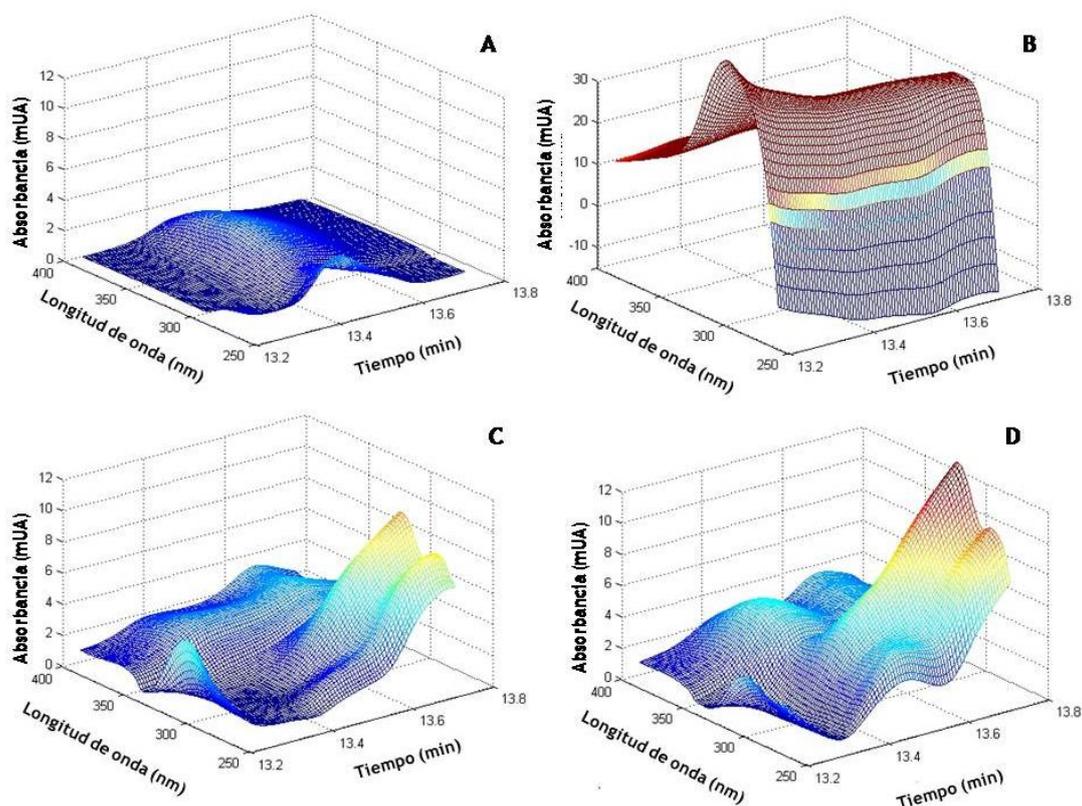
- a: extracto de una muestra de agua residual
- b: el mismo extracto fortificado con  $0.50 \text{ mg L}^{-1}$  de las TCs
- c: señal a corregida
- d: señal b corregida
- e: solución estándar conteniendo  $0.50 \text{ mg L}^{-1}$  de las TCs

La adaptación del algoritmo de Eilers para el procesamiento de datos tridimensionales permitió, además, corregir las matrices de datos de los extractos de las muestras de agua residual.

La complejidad inicial del sistema en estudio se evidencia observando la Figura 5.8 en la cual se muestran los datos de segundo orden correspondientes a la Región 8 donde eluye MEC, para distintas situaciones. Puede verse que, en esta región, la señal de base de la muestra de agua residual es muy importante (Figura B) y no logra corregirse completamente al ser procesada por el algoritmo de pretratamiento. Sin embargo, aunque la corrección alcanzada (Figura C) no es suficiente como para permitir el empleo de métodos de calibración univariada, si lo es para contribuir a la

simplificación del sistema, logrando una contribución importante del analito a la señal total resultante (Figura D).

Figura 5.8: Corrección de las matrices de datos



Datos de segundo orden correspondientes a la Región 8 registrados para:

A: solución estándar  $0.50 \text{ mg L}^{-1}$  de TCs

B: extracto de agua residual sin fortificar

C: señal corregida del mismo extracto

D: señal corregida del extracto fortificado con  $0.50 \text{ mg L}^{-1}$  de TCs

#### 5.6.4. Modelos de calibración

##### 5.6.4.1. Calibración univariada. Validación del sistema cromatográfico

A los fines de validar el sistema cromatográfico desarrollado se obtuvo un modelo de calibración univariado para cada analito empleando los datos de área de pico a  $360 \text{ nm}$  de las soluciones estándar de calibración.

Las cifras de mérito para estas calibraciones se presentan en la Tabla 5.5. Los LODs fueron calculados utilizando la Ecuación (1.19) procesando 10 blancos, mientras que los LOQs se establecieron según las Guías de EURACHEM (EURACHEM 2002) como

la menor concentración de analitos para la cual el CV de la señal es  $\leq 10\%$ . Estos límites se calcularon sólo a los fines de caracterizar el sistema cromatográfico para las soluciones estándar sin ser afectadas por el factor de concentración resultante de la EFS, ni tener en cuenta la transferencia de calibración, ya que esta calibración univariada no pudo utilizarse para la predicción de las muestras.

Los resultados de repetibilidad y precisión intermedia se obtuvieron del análisis de dos series de seis soluciones estándares cada una conteniendo  $0.4 \text{ mg L}^{-1}$  de cada TC en todos los casos, procesadas en días diferentes y por distinto operador.

Tabla 5.5: Cifras de mérito de la calibración univariada

Analito	Rango lineal ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$r^2$	CV (n=6)		LOD ( $\text{mg L}^{-1}$ )	LOQ ( $\text{mg L}^{-1}$ )
			Repetibilidad	Precisión intermedia		
MINC	0.03-1.00	0.993	1.5	6.6	0.01	0.03
OXTC	0.04-1.00	0.994	1.9	6.2	0.02	0.04
TC	0.04-1.00	0.997	0.4	8.7	0.02	0.04
DEMC	0.03-1.00	0.999	3.0	2.5	0.02	0.03
CLTC	0.05-1.00	0.997	2.4	4.5	0.01	0.05
METC	0.05-1.00	0.997	3.8	4.6	0.01	0.05
DOXC	0.04-1.00	0.996	2.0	3.5	0.02	0.04
MEC	0.05-1.00	0.993	0.9	6.5	0.01	0.05

Por otro lado, la prueba  $t$  para comparación de pendientes (Massart y col 1997), entre las curvas de regresión de los analitos preparados directamente en solvente y las curvas obtenidas en extractos de agua ultrapura obtenidos a partir de los cartuchos Oasis MAX, demostró ausencia de efecto matriz debido a la EFS.

#### 5.6.4.2. Calibración por MCR-ALS

##### 5.6.4.2.1. Contribución del algoritmo de corrección de línea de base

Siguiendo el procedimiento descrito en 5.5.8.1, se resolvieron por MCR-ALS las matrices de datos de cada región, correspondientes a una muestra de agua residual fortificada con  $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada TCs, con y sin pretratamiento para corrección de línea de base.

Los resultados presentados en la Tabla 5.6 demuestran la contribución del algoritmo de los cuadrados mínimos asimétricos a la simplificación del sistema en estudio, al reducir significativamente la cantidad de compuestos no modelados en

cada región y aumentar de esta manera la correlación entre los perfiles extraídos por MCR-ALS y los cromatogramas y espectros reales de los analitos.

Tabla 5.6: Componentes del sistema y correlación de los perfiles

Región	Analito	Componentes MCR-ALS		Correlación del perfil cromatográfico		Correlación del perfil espectral	
		Sin corrección	Con corrección	Sin corrección	Con corrección	Sin corrección	Con corrección
1	MINC	3	1	0.9811	0.9991	0.9809	0.9995
2	OXTC	3	2	0.9735	0.9826	0.9749	0.9867
3	TC	3	3	0.9875	0.9990	0.9894	0.9989
4	DEMC	2	1	0.9850	0.9997	0.9833	0.9990
5	CLTC	2	1	0.9897	0.9991	0.9855	0.9992
6	METC	4	4	0.9820	0.9899	0.9800	0.9911
7	DOXC	5	3	0.9768	0.9999	0.9817	0.9993
8	MEC	5	4	0.9821	0.9932	0.9803	0.9998

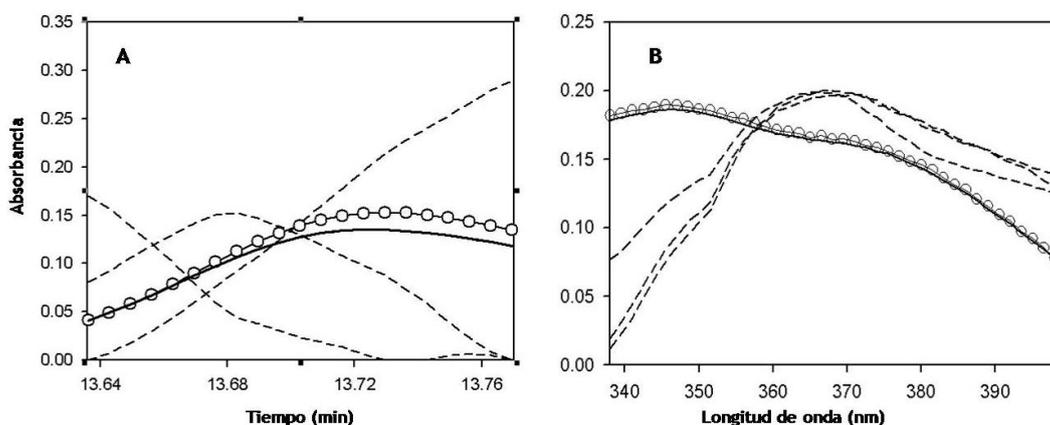
La correlación corresponde al  $r^2$  del perfil extraído por MCR-ALS respecto al perfil real normalizado de un estándar puro.

#### 5.6.4.2.2. Extracción de los perfiles

A modo de ejemplo se presentan en la Figura 5.9, los perfiles cromatográficos y espectrales extraídos por MCR-ALS para la región más compleja del sistema, la Región 8, para la muestra de agua residual fortificada R1.

Como puede verse, MCR-ALS fue capaz de extraer exitosamente los perfiles cromatográficos y espectrales del analito con excelente correlación respecto al perfil real, como así también, la información de los componentes no modelados.

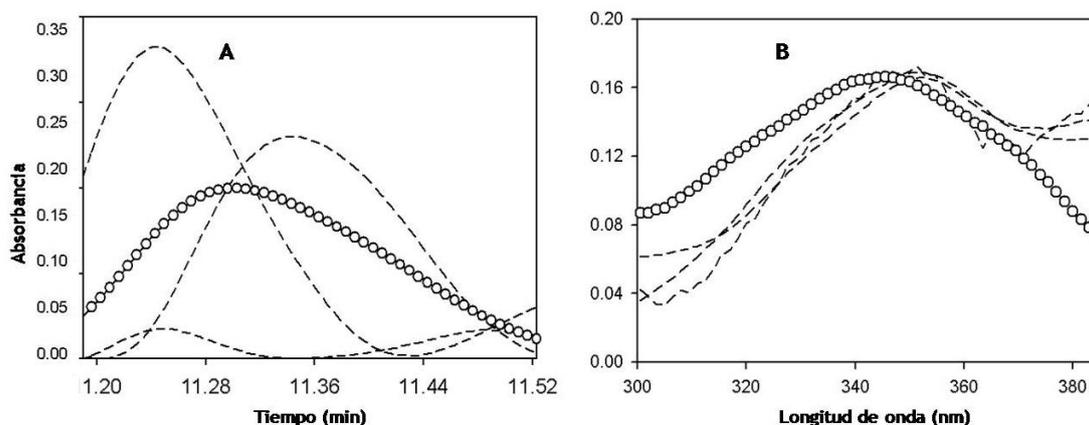
Figura 5.9: Perfiles cromatográficos y espectrales de MCR-ALS para la Región 8 de R1



A: Perfiles cromatográficos a 360 nm; B: Perfiles espectrales  
 Las líneas continuas representan los perfiles extraídos por MCR-ALS para el analito MEC, las líneas con círculos las señales normalizadas de una solución estándar y las líneas discontinuas los perfiles de los compuestos desconocidos.

La inspección visual de los cromatogramas presentados en la Figura 5.4 podría sugerir la presencia de TC y METC en las muestras basales de agua residual y despertar también la sospecha sobre la presencia de MEC. Sin embargo, los perfiles extraídos por MCR-ALS para la Región 6 (Figura 5.10) demuestran que los componentes de esta región no se corresponden realmente con el analito METC.

Figura 5.10: Perfiles cromatográficos y espectrales de MCR-ALS para la Región 6 de una muestra basal de agua residual



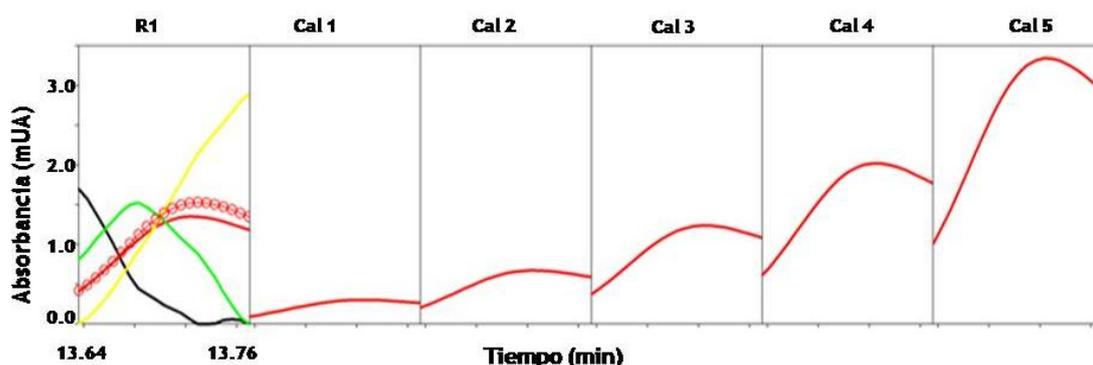
A: Perfiles cromatográficos a 360 nm; B: Perfiles espectrales  
 Las líneas con círculos las señales normalizadas de una solución estándar de METC y las líneas discontinuas los perfiles de los compuestos desconocidos.

Lo mismo ocurrió para las Regiones 3 y 8, en las cuales los perfiles extraídos de las muestras basales de agua residual no se correspondieron con los de los analitos.

#### 5.6.4.2.3. Regresión

La Figura 5.11 muestra los perfiles temporales sucesivos correspondientes al análisis cuantitativo por MCR-ALS de la Región 8 de la muestra R1. El primer recuadro corresponde a la muestra y los restantes cinco recuadros corresponden a cinco calibradores con 0.10 - 0.20 - 0.40 - 0.60 y 1.00 mg L<sup>-1</sup> de analito respectivamente. Empleando las áreas bajo la curva de los perfiles extraídos para los calibradores se construyeron las curvas de calibración pseudounivariada para predecir la concentración de los analitos en las muestras de validación.

Figura 5.11: Perfiles MCR-ALS empleados para la calibración



Perfiles cromatográficos a 360 nm extraídos para la Región 8 de R1 y cinco calibradores de 0.10 - 0.20 - 0.40 - 0.60 y 1.00 mg L<sup>-1</sup>.

En línea continua color rojo el perfil extraído para el analito MEC, en línea con círculos el cromatograma de una solución estándar. En verde, amarillo y azul los perfiles de los compuestos desconocidos presentes en R1.

#### 5.6.4.3. Calibración por U-PLS/RBL

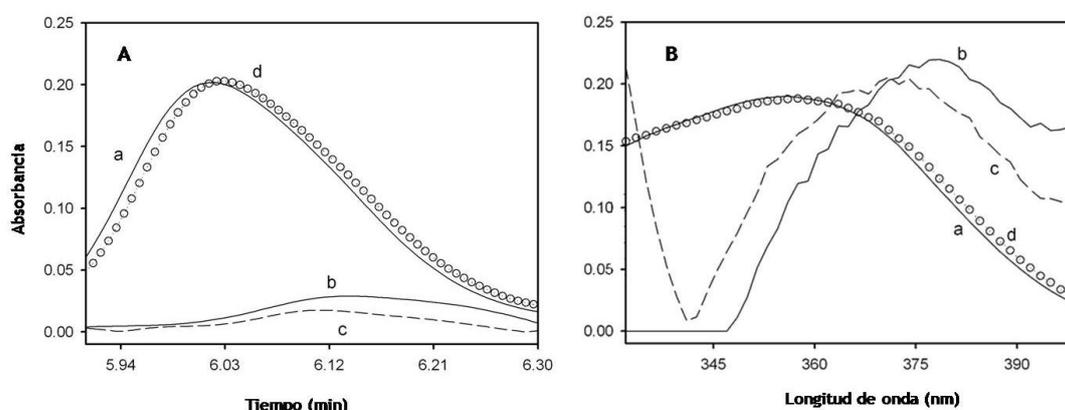
De la misma forma que para MCR-ALS, los modelos de U-PLS/RBL se utilizaron para extraer el número de componentes del sistema en cada región antes y después del pretratamiento de los datos para corrección de línea de base y se comprobó igualmente una significativa reducción de la complejidad del sistema y de la capacidad predictiva del algoritmo de calibración al utilizarse datos pretratados.

Mediante SVD se obtuvieron los perfiles de las interferencias y se aisló la señal específica del analito, hallando los scores de las muestras para lograr el modelo de calibración adecuado.

#### 5.6.4.4. Análisis comparativo de los modelos. Cifras de mérito

En la Figura 5.12 puede apreciarse una comparación del rendimiento de ambos algoritmos al extraer la información analítica de los datos de la muestra.

Figura 5.12: Perfiles cromatográficos y espectrales de MCR-ALS y de U-PLS/RBL extraídos para la Región 2



A: Perfiles cromatográficos a 360 nm; B: Perfiles espectrales

a: Perfil del analito OXTC extraído por MCR-ALS

b: Perfil de un componente desconocido extraído por MCR-ALS

c: Perfil de un componente desconocido extraído por U-PLS/RBL

d: Señal normalizada para una solución estándar

Como puede verse, los perfiles extraídos por U-PLS/RBL para la interferencia, tienen mucha similitud con los perfiles extraídos por MCR-ALS, confirmándose de esta manera, la habilidad de este algoritmo para utilizar la ventaja de segundo orden que le permite obtener la información de los componentes no modelados separándola de la señal analítica de interés. Sin embargo, como se vio en la Introducción, esta comparación de perfiles sólo puede realizarse cuando hay sólo un componente no modelado, ya que cuando el sistema es más complejo, los subsiguientes perfiles extraídos por U-PLS/RBL ya no se corresponden a información química real. Esta es una de las principales desventajas de U-PLS/RBL al comparar su rendimiento con el de MCR-ALS.

Por otro lado, las cifras de mérito obtenidas para ambas metodologías, que se muestran comparativamente en la Tabla 5.7, demuestran que la sensibilidad alcanzada es muy similar, aún cuando ambos algoritmos utilizan esquemas muy diferentes para su cálculo. Los LODs se obtuvieron, en este caso, para las soluciones originales, sin preconcentrar. Si bien los LODs alcanzados en la calibración univariada en estas condiciones rondan los  $0.08 \mu\text{g L}^{-1}$ , siendo en general menores que los obtenidos para las calibraciones multivariadas, estos últimos siguen siendo satisfactorios considerando la ventaja adicional del logro de selectividad y son alrededor de un orden de magnitud superior a las concentraciones encontradas en muestras reales de agua residual (Yang y col 2005, Karthikeyan y Meyer 2006)

Tabla 5.7: Cifras de mérito para los modelos MCR-ALS y U-PLS/RBL

Analito	Cifras de Mérito (MCR-ALS/U-PLS/RBL)		
	SEN	$\gamma^{-1}(\mu\text{g L}^{-1})$	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
MINC	3.5/12.1	0.02/0.03	0.23/0.09
OXTC	2.5/2.9	0.03/0.04	0.38/0.52
TC	2.7/0.43	0.02/0.03	0.24/0.09
DEMC	2.4/0.56	0.03/0.05	0.39/0.14
CLTC	2.9/0.36	0.02/0.06	0.23/0.19
METC	2.5/0.13	0.03/0.06	0.36/0.18
DOXC	5.4/0.63	0.004/0.01	0.06/0.05
MEC	4.0/56.2	0.005/0.01	0.10/0.06

#### 5.6.5. Predicciones

Los resultados de las concentraciones de TCs halladas en las muestras de validación se presentan en la Tabla 5.8 para MCR-ALS y en la Tabla 5.9 para U-PLS/RBL respectivamente. Estas predicciones se realizaron con los datos pretratados con la rutina de Eilers, ya que los intentos por predecir las concentraciones a partir de los datos no tratados, arrojaron resultados inaceptables.

Tabla 5.8: Predicciones obtenidas para las muestras de validación por MCR-ALS

Muestra	Analito ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )							
	MINC	OXTC	TC	DEMC	CLTC	METC	DOXC	MEC
Basal	-0.04	-0.06	0.02	0.15	0.04	0.06	0.30	0.03
M1	0.68 (170) <sup>a</sup>	0.64 (32)	2.60 (65)	0.76 (95)	0.44 (110)	1.04 (130)	0.47 (117)	0.48 (15)
M2	-0.08 (-)	-0.12 (-)	1.64 (102)	2.16 (90)	1.04 (65)	1.20 (60)	0.79 (99)	0.96 (24)
M3	0.76 (38)	0.64 (53)	1.12 (93)	1.32 (82)	2.84 (71)	3.24 (81)	0.16 (80)	1.48 (92)
M4	0.24 (7)	0.20 (23)	1.16 (72)	0.16 (-)	0.72 (90)	0.56 (140)	2.92 (73)	1.56 (130)
M5	0.54 (-)	2.04 (51)	1.92 (80)	2.56 (64)	1.40 (58)	1.44 (72)	1.72 (72)	1.08 (90)
M6	0.92 (23)	0.84 (52)	0.64 (80)	0.64 (160)	0.04 (-)	0.92 (77)	2.20 (69)	1.12 (70)
R1-R4 <sup>b</sup>	2.05 (103)	1.89 (95)	2.39 (120)	1.93 (97)	1.85 (93)	1.09 (55)	1.72 (86)	2.25 (112)
S <sup>c</sup>	0.38	0.38	0.44	0.13	0.10	0.11	0.24	0.24

<sup>a</sup> El valor entre paréntesis indica la recuperación porcentual de la cantidad adicionada a la muestra de validación

<sup>b</sup> Resultados promedios para las cuatro réplicas

<sup>c</sup> S: desviación estándar de las cuatro réplicas

Como puede verse, a pesar de la complejidad de las muestras analizadas, los resultados obtenidos fueron satisfactorios para la mayoría de las muestras y analitos, excepto para MINC, cuyas bajas recuperaciones, obtenidas por ambas metodologías, indican problemas de estabilidad del analito o de preparación de las muestras.

Analizando las recuperaciones obtenidas para las réplicas (R1-R4) puede verse que el rendimiento de U-PLS/RBL fue comparable al de MCR-ALS, mejorándolo aún en algunos casos.

Tabla 5.9: Predicciones obtenidas para las muestras de validación por U-PLS/RBL

Muestra	Analito ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )							
	MINC	OXTC	TC	DEMC	CLTC	METC	DOXC	MEC
Basal	-0.04	0.05	0.08	0.03	0.04	0.08	0.02	-0.04
M1	0.70 (175)	1.20 (60)	1.28 (32)	0.60 (75)	0.52 (130)	1.52 (190)	0.40 (100)	3.08 (96)
M2	-0.05 (-)	0.68 (170)	2.12 (132)	2.12 (88)	1.24 (78)	2.08 (104)	0.60 (75)	3.36 (84)
M3	0.74 (37)	1.36 (113)	1.24 (103)	1.24 (78)	3.16 (79)	3.28 (82)	1.04 (130)	0.76 (47)
M4	0.22 (7)	0.96 (120)	1.60 (100)	0.04 (-)	0.88 (110)	0.32 (80)	3.60 (90)	0.72 (60)
M5	0.64 (-)	3.80 (95)	2.48 (103)	3.48 (87)	1.68 (70)	2.20 (110)	2.52 (105)	1.20 (100)
M6	1.80 (45)	1.40 (87)	0.40 (50)	0.40 (100)	0.02 (-)	1.44 (120)	2.56 (80)	1.24 (78)
R1-R4 <sup>b</sup>	2.12 (106)	1.92 (96)	2.26 (113)	1.66 (83)	1.92 (96)	1.43 (71)	1.84 (92)	2.09 (105)
S <sup>c</sup>	0.25	0.17	0.12	0.12	0.17	0.21	0.28	0.21

<sup>a</sup> El valor entre paréntesis indica la recuperación porcentual de la cantidad adicionada a la muestra de validación

<sup>b</sup> Resultados promedios para las cuatro réplicas

<sup>c</sup> S: desviación estándar de las cuatro réplicas

## 5.7. Conclusiones

La utilización secuencial de varias herramientas quimiométricas para el procesamiento de datos cromatográficos de segundo orden permitió la resolución de un problema analítico de altísima complejidad.

En primer lugar, se confirmó la utilidad del algoritmo PDS para realizar transferencia de calibración cuando se presentan problemas de recuperación en los procedimientos de EFS. De esta manera, se simplificó enormemente la etapa experimental de la calibración, evitando la necesidad de someter todos los calibradores al procedimiento de extracción. Luego, la corrección de la línea de base y la eliminación de la señal de muchos compuestos de la matriz, mediante la aplicación del algoritmo de Eilers modificado para datos tridimensionales, logró simplificar el sistema mejorando en gran medida el rendimiento de los algoritmos de calibración. Se concluye, por lo tanto que un adecuado pretratamiento de los datos

es fundamental al desarrollar métodos cromatográficos acoplados a DAD para el análisis de muestras ambientales complejas.

Por otro lado se demostró, por primera vez, la utilidad de U-PLS/RBL al obtener la ventaja de segundo orden, en el procesamiento de datos cromatográficos obtenidos mediante un DAD. Se puede postular que el uso de la estructura de variable latente permite resolver datos de gran complejidad, que presentan leves desviación a la trilinealidad, y generar resultados de predicción comparables a los obtenidos con el ya conocido MCR-ALS.

En el análisis de este sistema se confirmó que, una de las ventajas más importantes de MCR-ALS es la de ser capaz de extraer información con significado físico de los datos. Sin embargo, este algoritmo involucra el manejo de un programa relativamente complejo y requiere siempre de la introducción de estimaciones iniciales de los espectros de los componentes o de sus perfiles temporales para alcanzar una descomposición satisfactoria. Por otra parte, U-PLS/RBL, con un procesamiento de datos más sencillo y rápido, presentó un rendimiento analítico muy aceptable. A pesar de que no es posible una interpretación física acabada del sistema con este algoritmo, desde un punto de vista analítico y considerando otras potencialidades, como su implementación en los *softwares* de procesamiento de datos de los instrumentos, U-PLS/RBL puede ser considerado como una alternativa de gran utilidad para trabajar con datos como los analizados en el presente estudio.

Finalmente, hemos demostrado la posibilidad de desarrollar métodos para el monitoreo de residuos de fármacos en aguas residuales alcanzando excelentes límites de detección, utilizando instrumentos sencillos y procedimientos mucho más económicos en comparación con la compleja y costosa cromatografía líquida acoplada a detector de masa.

# Capítulo 6



## Conclusiones generales

## 6. Conclusiones generales

Utilizando distintas modalidades de la cromatografía líquida de alta resolución, en combinación con diversas herramientas quimiométricas, se logró el desarrollo, la optimización y la validación de métodos analíticos para la determinación de sustancias de interés biológico que se encontraban presentes en muestras de composición compleja. Se demostró de esta forma la gran utilidad de esta disciplina matemática para mejorar de manera notable el rendimiento de la técnica separativa utilizando metodologías e instrumentación sencillas y de bajo costo.

El campo de aplicación de las estrategias analíticas presentadas y discutidas en la presente tesis es muy amplio, logrando la resolución de problemas de implicancias científico-tecnológica, como también económicas y sociales.

Se demostró, por ejemplo, la contribución de los estudios de pureza de pico para analizar la selectividad de un método cromatográfico desarrollado para el control de estabilidad de preparaciones farmacéuticas, como así también, la importancia de las pruebas estadísticas para consolidar los procedimientos de validación. La certeza y confiabilidad de los resultados obtenidos con métodos analíticos sometidos a estas pruebas de eficiencia son, cada vez más, una exigencia insalvable por parte de los organismos de control, para las industrias farmacéutica, alimentaria y agropecuaria.

Por otro lado, se verificó el valioso aporte de los métodos de diseño experimental para optimizar las variables del sistema cromatográfico, a los fines de reducir tiempos de análisis y consumo de solvente, obteniendo a la vez, métodos robustos y con buenos parámetros de separación para los analitos de interés. Este punto resulta fundamental, por ejemplo, cuando deben determinarse en forma simultánea compuestos con propiedades químicas muy diferentes entre sí. En este sentido, los diseños de segundo orden utilizados en conjunto con la función Deseabilidad, a través de la Metodología de la Superficie de Respuesta, demostraron ser sumamente eficientes para alcanzar la optimización simultánea multirespuesta, mediante la realización de unos pocos experimentos.

En el propósito de determinar sustancias presentes en muy baja concentración en muestras con matrices de gran complejidad por medio de cromatografía líquida acoplada a DAD o DF-BR, como por ejemplo, contaminantes en muestras medioambientales, la coelución de los analitos con una gran cantidad de otros componentes que contribuyen a la señal analítica es una realidad habitual. Otra

situación compleja de resolver en un tiempo prudente de análisis, es el logro de una adecuada resolución en la separación de compuestos con estructuras químicas prácticamente idénticas. En estos casos, en los que no se alcanza la selectividad necesaria para la aplicación de la tradicional calibración univariada, los algoritmos quimiométricos de calibración de segundo orden resultaron ser muy eficaces para aislar matemáticamente la señal de los analitos de interés, a partir de las matrices de datos generadas por el instrumento.

MCR-ALS demostró ser una metodología muy versátil para la resolución de este tipo de problemas, siendo capaz de producir resultados satisfactorios aún en la presencia de solapamiento extremo de los picos de interés, la coelución de varios compuestos desconocidos o la determinación de metabolitos con espectros idénticos. Además de la ventaja de proporcionar información cualitativa sobre todos los componentes del sistema, se comprobó la flexibilidad de este algoritmo para construir modelos de calibración aplicando distintas estrategias, capaces de resolver diferentes dificultades. Así, cuando se trata de determinar analitos con espectros idénticos, la obtención de un modelo basado en el aumento de las matrices de datos en la dimensión espectral, es una estrategia apropiada para generar la especificidad necesaria al utilizar los perfiles cromatográficos como señal cualitativa y el área bajo los espectros como señal cuantitativa. Se verificó también que, para que esta alternativa sea factible, debe existir una buena resolución cromatográfica entre los picos que presentan espectros idénticos y no debe haber pérdida de trilinealidad.

Por otro lado, se presentó la primera aplicación de U-PLS/RBL a la resolución de datos cromatográficos obteniéndose resultados de predicción y cifras de mérito comparables con los de MCR-ALS. Estando este algoritmo basado en la obtención de variables latentes, y siendo de sencilla aplicación, se presenta como una promisorio herramienta posible de ser incorporada en un futuro, a los *softwares* de procesamiento de datos de los instrumentos.

Finalmente, se comprobó también el valiosísimo aporte de los algoritmos de pretratamiento de señales para simplificar tanto el trabajo experimental, como el procesamiento de los datos. Así, PDS, utilizado para aplicar transferencia de calibración, permitió realizar una calibración externa sin necesidad de someter los estándares a la etapa de preconcentración que debía sufrir la muestra; mientras que la corrección de la línea de base por ALS redujo la complejidad de los datos de las muestras ambientales y biológicas posibilitando un mejor rendimiento de los algoritmos de calibración.

Por lo anteriormente expuesto se concluye que la quimiometría es una herramienta fundamental para el desarrollo de métodos analíticos de calidad destinados a la determinación de analitos presentes en muestras de composición compleja, capaces de abordar el estudio y la resolución de problemas actuales tales como la calidad de fármacos y alimentos, la contaminación ambiental o la necesidad de lograr perfiles de sustancias biomarcadoras en aras de alcanzar una medicina personalizada.



# Bibliografía

## Bibliografía

Agilent Technologies (2008). Agilent ChemStation for LC 3D Systems. Understanding your spectra module. Inc. 1994-2007. Waldbronn, Alemania.

Agrafiotou, P.; Ráfols, C.; Castells, C. B.; Bosch, E.; Rosés, M. (2011). Simultaneous effect of pH, temperature and mobile phase composition in the chromatographic retention of ionizable compounds. *J. Chromatogr. A*. En prensa.

Akay, C.; Özkan, S. A.; Sentürk, Z.; Cevheroglu, S. (2002). Simultaneous determination of metronidazole and miconazole in pharmaceutical dosage forms by RP-HPLC. *Il Farmaco* 57:953-957.

Al-Badr, A. A. (2005). Miconazole nitrate: comprehensive profile. Profiles of drug substances, excipients and related methodology. Volumen 32. Elsevier. Amsterdam, Holanda.

ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica). (2004). Disposición 2819/2004. Lineamientos generales de buenas prácticas de fabricación para elaboradores, importadores/exportadores de medicamentos.

Annesley, T. M. (2003). Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 49:1041-1044.

Antunes, M. C. G.; Esteves Da Silva, J. C. G. (2005). Multivariate curve resolution analysis excitation-emission matrices of fluorescence of humic substances. *Anal. Chim. Acta* 546:52-59.

Apellof, C. J.; Davidson, E. R. (1981). Strategies for analyzing data from video fluorimetric monitoring of liquid chromatographic effluents. *Anal. Chem.* 53:2053-2056.

Arancibia, J. A.; Olivieri, A. C.; Bohoyo Gil, D.; Espinosa Mansilla, A.; Durán-Merás, I.; Muñoz de la Peña, A. (2006). Trilinear least-squares and unfolded-PLS coupled to residual trilinearization: New chemometric tools for the analysis of four-way instrumental data. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 80:77-86.

Araujo, P. W.; Brereton, R. G. (1996). Experimental design III. Quantification. *Trends Anal. Chem.* 15(3):156-163.

Azzouz, T.; Tauler R. (2008). Application of multivariate curve resolution alternating least squares (MCR-ALS) to the quantitative analysis of pharmaceutical and agricultural samples. *Talanta* 74:1201-1210.

Barceló, D. (2007). Pharmaceutical-residue analysis. *Trends Anal. Chem.* 26: 454-455.

Barceló, D.; Petrovic, M. (2007). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the environment (*Editorial*). *Anal. Bioanal. Chem.* 387:1141-1142.

Barceló, D.; Petrovic, M. (2007). Emerging contaminants in wastewaters. *Trends Anal. Chem.* 26:1019.

Barranco Martínez, D.; Martínez Galera, M.; Parrilla Vázquez, P.; Gil García, M. D. (2007). Simple and rapid determination of benzoylphenylurea pesticides in river water and vegetables by LC-ESI-MS. *Chromatographia* 66:533-538.

Barrigon, S.; Montañés, P.; Lorenzo, P. (1993). Tetraciclinas y cloranfenicol. Macrólidos. En: Velaco, A.; Lorenzo, P.; Serrano, J. S.; Andrés-Trelles, F. *Farmacología Velásquez*. 16ª Edición. Editorial Interamericana-Mcgraw Hill. Madrid, España.

Beltrán, J. L.; Guiteras, J.; Ferrer, R. (1998). Three-way multivariate calibration procedures applied to high-performance liquid chromatography coupled with fast scanning fluorescence spectrometry detection. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Anal. Chem.* 70 1949-1955.

Bezerra, A. M.; Erthal Santelli, R.; Padua Oliveira, E.; Silveira Villar, L.; Escaleira, A. L. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76:965-977.

Bjelakovic, G.; Jevtovic-Stoimenov, T.; Bjelakovic, B.; Stajanovic, I. (2004). Biochemical functions and clinical importance of unconjugated pteridines. *FACTA UNIVERSITATIS: Medicine and Biology* 11:49-54.

Blasko, I.; Knaus, G.; Weiss, E.; Kemmler, G.; Winkler, C.; Falkensammer, G., Griesmacher, A.; Wurzmer, R.; Marksteiner, J.; Fuchs, D. (2007). Cognitive deterioration in Alzheimer's disease is accompanied by increase of plasma neopterin. *J. Psychiatr. Res.* 41:694-701.

Boix-Montanes, A. (2011). Relevance of equivalence assessment of topical products based on the dermatopharmacokinetics approach. *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* 42:173-179.

Bonazzi, D.; Cavrini, V.; Gatti, R.; Boselli, E.; Caboni, M. (1998). Determination of imidazole antimycotics in creams by supercritical fluid extraction and derivative UV spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18:235-240.

Booksh, K. S.; Kowalski, B. R. (1994). Theory of Analytical Chemistry. *Anal. Chem.* 66:782A-791A.

Booth, N. H.; McDonald, L. E. (1982). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Quinta Edición. The Iowa State University Press. Ames, Estados Unidos.

Bortolato, S. A.; Arancibia, J. A.; Escandar, G. M. (2008). Chemometrics-assisted excitation-emission fluorescence spectroscopy on nylon membranes. Simultaneous determination of benzo[a]pyrene and dibenz[a,h]anthracene at parts-per-trillion levels in the presence of the remaining EPA PAH priority pollutants as interferences. *Anal. Chem.* 80:8276-8286.

Bortolato, S. A.; Arancibia, J. A.; Escandar, G. M. (2009). Non-trilinear chromatographic time retention-fluorescence emission data coupled to chemometric algorithms for the simultaneous determination of 10 polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of interferences. *Anal. Chem.* 81:8074-8084.

Box, G. E.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S. (2005). *Statistics for Experimenters: Design, Innovation and Discovery*. Segunda Edición. Wiley Series in Probability and Statistic. New Jersey, Estados Unidos.

BP (British Pharmacopoeia). (2009). The Stationary Office. London.

Braga, J. W. B.; Bottoli, C. B. G.; Jardim, I.; Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C.; Poppi, R. J. (2007). Determination of pesticides and metabolites in wine by high performance liquid chromatography and second-order calibration methods. *J. Chromatogr. A* 1148(2):200-210.

Breitkreitz, M. C.; Jardim, I. C. S. F.; Bruns, R. E. (2009). Combined column-mobile phase mixture statistical design optimization of high-performance liquid chromatographic analysis of multicomponent systems. *J. Chromatogr. A* 1216:1439-1449.

Bro, R. (1997). PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38:149-171.

Brown, E. G. (1998). Ring nitrogen and key biomolecules: the biochemistry of N-heterocycles. Kluwer Academic Publisher. Springer. Dordrecht, Holanda.

Bruns, R. E.; Scarminio, I. S.; Neto, B. B. (2006). Statistical Design. Chemometrics. Elsevier. Amsterdam, Holanda.

Bynum, K. S.; Eisemann, J. D.; Weaver, G. C.; Yoder, C. A.; Fagerstone, K. A.; Miller, L. A. (2007). Nicarbazine ovo control G Bait reduces hatchability of eggs laid by resident Canada Geese in Oregon. *J. Wildlife Manage* 71(1):135-143.

Cañada Cañada, F.; Arancibia, J. A.; Escandar, G. M.; Ibañez, G. A.; Espinosa Mansilla, A.; Muñoz de la Peña, A.; Olivieri, A. C. (2009a). Second-order multivariate calibration procedures applied to high-performance liquid chromatography coupled to fastscanning fluorescence detection for the determination of fluoroquinolones. *J.Chromatogr. A* 1216:4868-4876.

Cañada-Cañada, F.; Espinosa-Mansilla, A.; Muñoz de la Peña, A.; Mancha de Llanos, A. (2009b). Determination of marker pteridins and biopterin reduced forms, tetrahydrobiopterin and didydrobiopterin, in human urine, using a post-column photoinduced fluorescence liquid chromatographic derivatization method. *Anal. Chim. Acta* 468:113-122.

Cannavan, A.; Ball, G.; Kennedy, D. G. (1999). Determination of nicarbazine in feeds using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Analyst* 124(10):1431-4.

Capurro, E.; Danaher, M.; Anastasio, A.; Cortesi, M. L.; O'Keefe, M. (2005). Efficient HPLC method for the determination of nicarbazine, as dinitrocarbanilide in broiler liver. *J.Chromatogr. B* 822:154-159.

Carr, P. W.; Stoll, D. R.; Wang, X. (2011). Perspectives on recent advances in the speed of High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 83:1890-1900.

Castells, C. B.; Ráfols, C.; Rosés, M.; Bosch, E. (2003). Effect of temperature on pH measurements and acid-base equilibria in methanol-water mixtures. *J. Chromatogr. A* 1002: 41-53.

Castells, C. B.; Gagliardi, L. G.; Ráfols, C.; Rosés, M.; Bosch, E. (2004). Effect of temperature on the chromatographic retention of ionizable compounds I. Methanol-water mobile phases. *J. Chromatogr. A* 1042:23-35.

Chen, Z. P., Wu, H. L.; Jiang, J. H.; Li, Y.; Yu, R. Q. (2000). A novel trilinear decomposition algorithm for second-order linear calibration. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 52:75-86.

Choi, B. K.; Hercules, D. M.; Gusev, A. I. (2001). LC-MS/MS signal suppression effects in the analysis of pesticides in complex environmental matrices. *Fresenius J. Anal. Chem.* 369:370-377.

Choi, K.J.; Kim, S.G.; Kim, C.W.; Kim, S.H. (2007). Determination of antibiotic compounds in water by on-line SPE-LC/MSD. *Chemosphere* 66:977-984.

Cinquina, A.L.; Longo, F.; Anastasi, G.; Giannetti, L.; Cozzani, R. (2003). Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J. Chromatogr. A* 987:227-233.

Comas, E.; Gimeno, R. A.; Ferré, J.; Marcé, R. M. N.; Borrull, F.; Rius, F. X. (2004). Quantification from highly drifted and overlapped chromatographic peaks using second-order calibration methods. *J. Chromatogr. A* 1035:195-202.

Costa Ferreira, S. L.; Bruns, R. E.; Paranhos da Silva, E. G.; Lopes dos Santos, W. N.; Quintella, C. M.; David, J. M.; Bittencourt de Andrade, J.; Breikreitz, M. C.; Sales Fontes Jardim, I. C.; Barros Neto, B. (2007). Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *J. Chromatogr. A* 1158:2-14.

Cuadros-Rodríguez, L.; Gámiz-Gracia, L.; Almansa-López, E. M. Bosque-Sendra, J. M. (2001). Calibration in chemical measurement processes. Part II: A methodological approach. *Trends Anal. Chem.* 20(11):620-636.

Cuckler, A. C.; Malanga, C. M.; Basso, A. J.; O'Neill, R. C. (1955). Antiparasitic activity of substituted carbanilide complexes. *Science* 122:244-245.

Cuesta Sánchez, F.; Toft, J.; van den Bogaert, B.; Massart, D. L. (1996). Orthogonal projection approach applied to peak purity assessment. *Anal. Chem.* 68:79-85.

Culzoni, M. J.; Goicoechea, H. C.; Pagani, A. P.; Cabezón, M. A.; Olivieri, A. C. (2006). Evaluation of partial least-squares with second-order advantage for the multi-way spectroscopic analysis of complex biological samples in the presence of analyte-background interactions. *Analyst* 131:718-723.

Danzer K., Currie L. A., (1998). Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part 1: Fundamentals and single component calibration. *Pure Appl. Chem.* 70:993-1014.

Daszykowski, M.; Danielsson, R.; Walczak. B. (2008). No-alignment-strategies for exploring a set of two-way data tables obtained from capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1192(1):157-165.

Daszykowski, M.; Walczak, B. (2006). Use and abuse of chemometrics in chromatography. *Trends Anal. Chem.* 25:108 -1096.

De Braekelee, K.; Torres-Lapasió, J. R.; Massart D. L. (2000). Improved purity assessment of high-performance liquid chromatography diode array detection data for overcoming the presence of the non-linearity artifact. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 52:45-59.

De Braekeleer, K.; Massart, D. L. (1997). Evaluation of the orthogonal projection approach (OPA) and the SIMPLISMA approach on the Windig standard spectral data sets. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 39:127-141.

De Juan, A.; Casassas, E.; Tauler, R. (2000). Soft modeling of analytical data. Meyers, R.A. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Editorial Wiley. Chichester, Reino Unido.

De Juan, A.; Tauler, R. (2003). Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures: Revisiting latest trends in multivariate resolution. *Anal. Chim. Acta* 500:195-210.

Debuf, Y. (Editor). (1988). *The Veterinary Formulary*. Pharmaceutical Press. Londres, Inglaterra.

Dejaegher, B.; Vander Heyden, Y. (2009a). Sequential Optimization Methods. *Comprehensive Chemometrics*. Volumen 1. Cap. 17:547-575. Elsevier. Oxford, Inglaterra.

Dejaegher, B.; Vander Heyden, Y. (2009b). The Use of Experimental Design in Separation Science. *Acta Chromatographica* 21:161-201.

del Río, V.; Soledad Larrechi, M.; Pilar Callao, M. (2010). Determination of sulphate in water and biodiesel samples by a sequential injection analysis-Multivariate curve resolution method. *Anal. Chim. Acta* 676:28-33.

Dhondt, J. L. (2010). Lessons from 30 years of selective screening for tetrahydrobiopterin deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 33:S219-S223.

Di Corcia, A.; Nazzari, M. (2002). Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. *J. Chromatogr. A* 974:53-89.

Di Pietra, A. M.; V. Cavrini, V.; Andrisano, V.; Gatti, R. (1992). HPLC analysis of imidazole antimycotic drugs in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10:873-879.

Dietz, C.; Sanz, J.; Cámara, C. (2006). Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques. *J. Chromatogr. A* 1103:183-192.

Dionex. (2000). *User's Guide to Chromeleon, Versión 6.11.* Sunnyvale, Estados Unidos.

Draisci, R.; Lucentini, L.; Boria, P.; Lucarelli, C. (1995). Micro high-performance liquid chromatography for the determination of nicarbazin in chicken tissues, eggs, poultry feed and litter. *J. Chromatogr. A* 697:407-414.

Durán Merás, I.; Espinosa-Mansilla, A.; Rodríguez Gómez, M. J. (2005) Determination of methotrexate, several pteridines and creatinine in human urine previous oxidation with potassium permanganate using HPLC with photometric and fluorimetric serial detection. *Anal. Biochem.* 346:201-209.

EC (European Community). (2003). Regulation EC No 1831/2003 of the European Parliament and Council on additives for use in animal nutrition. *Off. J. Eur. Comun.* L268:29-43.

EFSA (European Food Safety Authority). (2003). Opinion of the Scientific Panel on Additives and products or Substances Used in Animal Feed on the request from the Commission on the efficacy and safety of the coccidiostat Koffogran. *The EFSA Journal* 16:1-40.

Eichenfield, L. (2007). Comparative absorption of 0.25% and 2% miconazole nitrate preparations in infants with diaper dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* AB80.

Eilers, P. H. C. (2004). Parametric time warping. *Anal. Chem.* 76:404-411.

Eilers, P. H. C.; Currie, I. D.; Durbán, M. (2006). Fast and compact smoothing on large multidimensional grids. *Comp. Stat. Data Anal.* 50:61-76.

El Korchi, G. (2006). Farmacocinética y eficacia de oxitetracilina tras su administración intramuscular en bovinos. Depleción tisular. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, España.

EPA (United States Environmental Protection Agency). (2005). Nicarbazine Pesticide Fact Sheet. Conditional registration.

Ermer, J. (2001). Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24:75-767.

Escandar, G. M.; Damiani, P. C.; Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C. (2006). A review of multivariate calibration methods applied to biomedical analysis. *Microchem. J.* 82:29-42.

Escandar, G. M.; Faber, N. M.; Goicoechea, H. C.; Muñoz de la Peña, A.; Olivieri, A. C.; Poppi, R.J. (2007). Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications. *Trends Anal. Chem.* 26:752-765.

Espinosa-Mansilla, A.; Durán Meras, I.; Salinas, F. (1998). Simultaneous determination of pteridines in multicomponent mixtures using derivative spectrophotometry and partial least squares calibration. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17:1325-1334.

Espinosa-Mansilla, A.; Durán-Merás, I.; Galian, R. (2001b). Simultaneous fluorimetric determination of pteridin derivatives: comparison between synchronous, partial least squares and hybrid linear analysis methods. *Appl. Spectrosc.* 55:701-707.

Espinosa-Mansilla, A.; Durán-Merás, I.; Salinas, F. (2001a). Analysis of pteridines and creatinine in urine by HPLC with serial fluorimetric and photometric detectors. *Chromatographia* 53: 510-514.

Espinosa-Mansilla, A.; Muñoz de la Peña, A.; Cañada-Cañada, F.; Mancha de Llanos, A. (2008). LC determination of biopterin reduced forms by UV-photogeneration of biopterin and fluorimetric detection. *Talanta* 77:844-851.

EURACHEM (1998). The fitness for purpose of analytical methods. A Laboratory Guide to method validation and related topics. EURACHEM Secretariat. Teddington, Londres, Inglaterra.

EURACHEM (2002). Guide to Quality in Analytical Chemistry. An Aid to Accreditation. EURACHEM Secretariat. Teddington, Londres, Inglaterra.

Farré, M.; Pérez, S.; Goncalves, C.; Alpendurada, M.F.; Barcelo, D. (2010). Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment. *Trends Anal. Chem.* 29(11): 1347-1362.

Fatta-Kassinos, D.; Meric, S.; Nikolaou, A. (2011). Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Anal. Bioanal. Chem.* 399:251-275.

FDA (Food and Drugs Administration). (1985). *Inspection Technical Guide N°41: Expiration Dating and Stability Testing for Human Drug Products*. Rockville, Estados Unidos.

FDA (Food and Drugs Administration). (2000). *Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation*. U.S. Department of Health and Human Services. Rockville, Estados Unidos.

FDA (Food and Drugs Administration). (2001). *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services. Rockville, Estados Unidos.

Fekete, S.; Ganzler, K.; Fekete, J. (2011). Efficiency of the new sub-2 $\mu$ m core-shell (Kinetex<sup>TM</sup>) column in practice, applied for small and large molecule separation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54:482-490.

Felinger, A. (2011). Estimation of chromatographic peak shape parameters in Fourier domain. *Talanta* 83:1074-1078.

Ferrer, R.; Guiteras, J.; Beltrán, J. L. (1997). Development of fast-scanning fluorescence spectra as a detection system for high-performance liquid chromatography. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *J. Chromatogr. A* 779:123-130.

Feudale, R. N.; Woody, N. A.; Tan, H.; Myles, A. J.; Brown, S. D.; Ferré, J. (2002) Transfer of multivariate calibration models: a review. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 64:181-192.

Fourdinier, M.; Bostyn, S.; Delépée, R.; Fauduet, H. (2010). Interest of a chemometric approach in understanding the retention behaviour of three columns in hydrophilic interaction liquid chromatography: Application to the separation of glycerol carbonate, glycerol and urea. *Talanta* 81:1281-1287.

Francois, I. (2007). Investigating the role of reactive oxygen species in the mechanism of action of miconazole and effects on the treatment of diaper dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* AB77.

Fukushima, T.; Nixon, J.C. (1980). Analysis of reduced forms of bipterin in biological tissues and fluids. *Anal. Biochem.* 102:176-188.

Gagliardi, L. G.; Castells, C. B.; Ráfols, C.; Rosés, M.; Bosch, E. (2005). Effect of temperature on the chromatographic retention of ionizable compounds II. Acetonitrile -water mobile phases. *J. Chromatogr. A* 1077:159-169.

Gagliardi, L. G.; Castells, C. B.; Ráfols, C.; Rosés, M.; Bosch, E. (2006). Modeling retention and selectivity as a function of pH and column temperature in liquid chromatography. *Anal. Chem.* 78:5858-5867.

Gálvez, P.; Ruiz, A.; Clares, B. (2011). El futuro de la medicina clínica hacia nuevas terapias: génica y nanomedicina. *Medicina clínica*. En prensa.

Gamagedara, S.; Gibbons, S.; Ma, Y. (2011). Investigation of urinary pteridine levels as potential biomarkers for noninvasive diagnosis of cancer. *Clinica Chimica Acta* 412:120-128.

Gaona-Galdos, A. A.; García, P. L.; Aurora-Prado, M. S.; Rocha Miritello Santoro, M.I; Kedor-Hackmann, E.R.M. (2008). Simultaneous determination of econazole nitrate, main impurities and preservatives in cream formulation by high performance liquid chromatography. *Talanta* 77:673-678.

Garrido Frenich, A.; Torres-Lapasió, J. R., De Braekeleer, K.; Massart, D. L.; Martínez Vidal, J. L.; Martínez Galera, M. (1999). Application of several modified peak purity assays to real complex multicomponent mixtures by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J. Chromatogr. A* 855:487-499.

Gergely, A.; Horváth, P.; Noszál, B. (1999). Determination of peak homogeneity by dual detection. *Anal. Chem.* 71:1500-1503.

Gil García, M. D.; Cañada, F. C.; Culzoni, M. J.; Vera-Candioti, L., Siano, G. G.; Goicoechea, H. C.; Galera, M. M. (2009). Chemometric tools improving the determination of anti-inflammatory and antiepileptic drugs in river and wastewater by solid-phase microextraction and liquid chromatography diode array detection. *J. Chromatogr. A* 1216:5489-5496.

Gil García, M. D.; Barranco-Martínez, D.; Martínez-Galera, M., Parrilla-Vázquez, P. (2006b). Simple, rapid solid-phase extraction procedure for the determination of ultra-trace levels of

pyrethroids in ground and sea water by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectroscopy. *Rapid Commun. Mass Sp.* 20:2395-2403.

Gil García, M. D.; Martínez Galera, M.; Barranco Martínez, D.; Gisbert Gallego, J. (2006a). Determination of benzoylureas in ground water samples by fully automated on-line pre-concentration and liquid chromatography-fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 1103:271-277.

Gil, D. B.; De La Peña, A. M.; Arancibia, J. A.; Escandar, G. M.; Olivieri, A. C. (2006). Second-order advantage achieved by unfolded-partial least-squares/residual bilinearization modeling of excitation-emission fluorescence data presenting inner filter effects. *Anal.Chem.* 78:8051-8058.

Gimeno, R. A.; Beltrán, J. L.; Marce, R. M.; Borrull, F. (2000). Determination of naphthalenesulfonates in water by on-line ion-pair solid-phase extraction and ion-pair liquid chromatography with fast-scanning fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 890:289-294.

Girón, A. J.; Merás, I. D.; De La Peña, A. M.; Mansilla, A. E.; Cañada, F. C.; Olivieri, A. C. (2008). Photoinduced fluorimetric determination of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid in serum using the kinetic evolution of the emission spectra accomplished with multivariate second-order calibration methods. *Anal. Bioanal. Chem.* 391:827-835.

Goicoechea H. C., Olivieri A. C. (2007). *La calibración en química Analítica*. Ediciones UNL. Santa Fe, Argentina.

Goicoechea, H. C.; Culzoni, M. J.; Gil García, M. D.; Martínez Galera M. (2011). Chemometric strategies for enhancing the chromatographic methodologies with second-order data analysis of compounds when peaks are overlapped. *Talanta* 83:1098-1107.

Gómez, V.; Callao, M. P. (2008). Analytical applications of second-order calibration methods. *Anal. Chim. Acta* 67:169-183.

Gong, F.; Liang, Y. Z.; Xie, P. S.; Chau, F. T. (2003). Information theory applied to chromatographic fingerprint of herbal medicine for quality control. *J. Chromatogr. A* 1002:25-40.

Goodman Gilman, A. (1996). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Novena Edición, Volumen III, Sección IX. MacGraw-Hill Companies. México.

Gritti, F.; Guiochon, G. (2010). Performance of columns packed with the new shell Kinetex-C18 particles in gradient elution chromatography. *J. Chromatogr. A* 1217:1604-1615.

Guiochon, G. (2007). Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1168:101-168.

Haaland, D. M.; Thomas, E. V. (1988). Partial least-squares methods for spectral analyses. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. *Anal. Chem.*, 60:1193-1202.

Hamscher, G.; Sezesny, S.; Hoper, H.; Nau, H. (2002). Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high- performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74:1509-1518.

Han, F. T.; Huynh, B. H.; Shi, H. L.; Lin, B. C.; Ma, Y. F. (1999). Pteridine analysis in urine by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection. *Anal. Chem.* 71:1265-1269.

Hu, L. Q.; Wu, H. L.; Ding, Y. J.; Fang, D. M.; Xia, A. L.; Yu, R. Q. (2006). Alternating asymmetric trilinear decomposition for three-way data arrays analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 82:145-153.

Huber, C.; Fuchs, D.; Hausen, A.; Margreiter, R.; Reibnegger, G.; Spielberg, M.; Wachter, H. (1983). Pteridines as a new marker to detect human T cells activated by allogeneic or modified self major histocompatibility complex (MHC) determinants. *J. Immunol.* 130:1047-1050.

Huestis, M. A.; Smith M. L. (2006). Modern analytical technologies for the detection of drug abuse and doping. *Drug Discovery Today.* 3(1):49-57.

Huq, S.; Garriques, M.; Kallury, K. M. R. (2006). Role of zwitterionic structures in the solid-phase extraction based method development for clean up of tetracycline and oxytetracycline from honey. *J. Chromatogr. A* 1135:12-18.

ICH (International Conference on Harmonization). (2003). Stability Testing of New Drug, Substances and Products .Q1A (R2).

ICH (International Conference on Harmonization). (2005). Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use Validation of analytical procedures: Text and methodology. Q2(R1).

Iglesias Esteban, R.; Ortega de Miguel, E. (2008). Present and future of wastewater reuse in Spain. *Desalination* 218:105-119.

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). (1999). Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. Technical Report. *Prepared for publication by* Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R.; Fajgelj, A.; Willetts, P. *Pure Appl. Chem.* Vol. 71 (2):337-348.

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). (2002). Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. Technical Report. *Prepared for publication by* Thompson, M.; Ellison, S. L.R. ; Wood, R. *Pure Appl. Chem.* Vol. 74 (5):835-855.

Jalali-Heravi, M.; Zekavat, B. ; Sereshti, H. (2007). Use of gas chromatography-mass spectrometry combined with resolution methods to characterize the essential oil components of Iranian cumin and caraway. *J. Chromatogr. A* 1143:215-226.

Jaumot, J.; Gargallo, R.; De Juan, A.; Tauler, R. (2005). A graphical userfriendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 76:101-110.

JECFA (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives) (1995) Evaluation of certain veterinary drug residues in food.

Jiménez Girón, A.; Durán Merás, I.; Espinosa Mansilla, A.; Muñoz de la Peña, A.; Cañada Cañada, F.; Olivieri, A. C. (2008a). On-line photochemically induced excitation emission kinetic four way data. Analytical application for the determination of folic acid and its two main metabolites in serum by U-PLS and N-PLS/residual trilinearization (RTL) calibration. *Anal. Chim. Acta* 622:94-103.

Jiménez Girón, A.; Durán Merás, I.; Muñoz de la Peña, A.; Espinosa Mansilla, A.; Cañada Cañada, F.; Olivieri, A. C. (2008b). Photoinduced fluorimetric determination of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid using kinetic evolution of the emission spectra accomplished with second order calibration methods. *Anal. Bioanal. Chem.* 391:827-835.

Kaczmarek, K.; Walczak, B.; de Jong, S.; Vandginste, B. G. M. (2005). Baseline reduction in two dimensional gel electrophoresis images. *Acta Chromatogr.* 15:82-95.

Kaplan, L. A.; Pesce, A. J. (2009). *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*. Editorial Mosby/Elsevier. Ámsterdam, Holanda.

Karatapanis, A. E.; Fiamegos, Y.; Sakkas, V. A.; Stalikas, D. (2011). Effect of chromatographic parameters and detector settings on the response of HILIC- evaporative light-scattering detection system using experimental design approach and multicriteria optimization methodology. *Talanta* 83:1126-1133.

Karthikeyan, K. G.; Meyer, M.T. (2006). Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Sci. Total Environ.* 361:196-207.

Khashaba, P. Y.; El-Shabouri, S. R.; Emar, K. M.; Mohamed A. M. (2000). Analysis of some antifungal drugs by spectrophotometric and spectrofluorimetric methods in different pharmaceutical dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22:363-376.

Kim, S. C.; Carlson, K. (2007). Quantification of human and veterinary antibiotics in water and sediment using SPE/LC/MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 387:1301-1315.

Kloepfer, A.; Quintana, J. B.; Reemtsma, T. (2005). Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. *J. Chromatogr. A* 1067:153-160.

Kolpin, D. W.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Thurman, E. M.; Zaugg, S. D.; Barber, L. B.; Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999 - 2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36:1202-1211.

Kostopoulou, M.; Nikolaou, A. (2008). Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. *Trends Anal. Chem.* 27:1023-1035.

Krabel, B. J.; Dickson, D. A.; Zimmermann, A. G.; Coleman, M. R. (2000). Liquid chromatographic determination of nicarbazin in feeds. *J AOAC Int.* 83(5):1027-38.

Kuligowski, J.; Martínez Galera, M.; Gil García, M. D.; Culzoni, M. .; Goicoechea, H. C.; Garrigues, S.; Quintás, G.; de la Guardia, M. (2011). Science based calibration for the extraction of 'analyte-specific' HPLC-DAD chromatograms in environmental analysis *Talanta* 83:1158-1165.

Lalla, R. V.; Bensadoun, R. J. (2011). Miconazole mucoadhesive tablet for oropharyngeal candidiasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 9(1):13-17.

Leardi, R. (2009). Experimental design in chemistry: A tutorial. *Anal. Chim. Acta* 652:161-172.

LeDoux, M. (2011). Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. *J. Chromatogr. A.* 1218: 1021-1036.

Lim, M. D.; Dickherber, A.; Compton, C. C. (2011). Before you analyze a human specimen, think quality, variability and bias. *Anal. Chem.* 83:8-13.

Lindsey, M. L.; Meyer, M. T.; Thurman, E. M. (2001). Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 72:4640-4646.

Liu, K. K. C.; Sakya, S. M.; O'Donnell, C. J.; Flick, A. C.; Li, J. (2011). Synthetic approaches to the 2009 new drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19(3): 1136-1154.

Lobrutto, R.; Patel, T. (2007). HPLC for pharmaceutical scientists. Capítulo 9: Method Validation. Edited by Kazakevich, Y. y Lobrutto, R. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, Estados Unidos.

Lozano, V. A.; Ibañez, G. A.; Olivieri, A. C. (2008): Three-way partial least-squares/residual bilinearization study of second-order lanthanide-sensitized luminescence excitation-time decay data. Analysis of benzoic acid in beverage samples. *Anal. Chim. Acta* 610:186-195.

Lozano, V. A.; Tauler, R.; Ibañez, G. A.; Olivieri, A. C. (2009). Standard addition analysis of fluoroquinolones in human serum in the presence of the interferent salicylate using lanthanide-sensitized excitation-time decay luminescence data and multivariate curve resolution. *Talanta* 77:1715-1723.

MacNair, J. E.; Lewis, K. C.; Jorgenson, J. W. (1997). Ultrahigh-pressure reversed-phase liquid chromatography in packed capillary columns, *Anal. Chem.* 69:983-989.

MacNair, J. E.; Patel, K. D.; Jorgenson, J. W. (1999). Ultrahigh-pressure reversed-phase capillary chromatography. *Anal. Chem.* 71:700-708.

Macy, T. D.; Loh, A. (1984). Liquid chromatographic determination of nicarbazin in feeds and premixes. *J. AOAC Int.* 67(6):1115-1117.

Malkin, D. S.; Wei, B.; Fogiel, A. J.; Staats, S.L.; Wirth, M. J. (2010). Submicrometer plate heights for capillaries packed with silica colloidal crystals. *Anal. Chem.* 82: 2175-2177.

Marletta, M. A. (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 268:12231-12234.

Martinez Galera, M.; Gil García, M. D.; Culzoni, M. J.; Goicoechea, H. C. (2010). Determination of pharmaceuticals in river water by column switching of large sample volumes and liquid chromatography-diode array detection, assisted by chemometrics: An integrated approach to green analytical methodologies. *J. Chromatogr. A* 1217(13):2042-2049.

Martínez Galera, M.; Parrilla Vázquez, P.; Martínez Vidal, J. L.; Martínez Fernández, J.; Pascual Gómez, J. L. (2004). Large-volume direct injection for determining naphthalene derivative pesticides in water using a restricted-access medium column in RPLC-LC with fluorescence detection. *Chromatographia* 60:517-522.

Martínez, A.; Barbosa, A. (2010). Are pterins able to modulate oxidative stress? *Theor. Chem. Acc.* 127:485-492.

Mas, S.; Fonrodona, G.; Tauler, R.; Barbosa, J. (2007). Determination of phenolic acids in strawberry samples by means of fast liquid chromatography and multivariate curve resolution methods. *Talanta* 71:1455-1463.

Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Buydens, L. M. C.; De Jong, S.; Lewi, P. J.; Smeyers-Verbeke, J. (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Elsevier. Amsterdam, Holanda.

Matabudul, D. K; Crosby, N. T.; Sumar, S. (1999). A new and rapid method for the determination of nicarbazin residues in poultry feed, eggs and muscle tissue using supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatography. *Analyst* 124:499-502.

Matabudul, D. K; Lumley, I. D.; Points, J. S. (2002). The determination of 5 anticoccidial drugs (nicarbazin, lasalocid, monensin, salinomycin and narasin) in animal livers and eggs by liquid chromatography linked with tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Analyst* 127:760-768.

Mesa, M.; Guth, J. L.; Sierra L. (2005). Micron-sized spherical core-shell particles of mesoporous silica suitable for HPLC applications. *Stud. Surf. Sci. Catal.* 158(2):2065-2072.

Messahel, S.; Pheasant, A. E.; Pall, H.; Ahmed-Choudhury, J.; Sugum- Paliwal, R. S.; Vostanis, P. (1988). Urinary levels of neopterin and biopterin in Autism. *Neurosci. Lett.* 241:17-20.

Miao, X. S.; Bishay, F.; Chen, M.; Metcalfe, C. D. (2004). Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environ. Sci. Technol.* 38:3533-3541.

Miller, J. N. y Miller, J. C. (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica*. 4ta Edición. Prentice Hall. Madrid, España.

Muller, M. M.; Curtius, H.; Herold, M.; Huber, C. H. (1991). Neopterin in clinical practice. *Clin. Chim.* 201:1-16.

Muñoz, G.; De Juan A. (2007). pH- and time-dependent hemoglobin transitions: A case study for process modelling. *Anal. Chim. Acta* 595:198-208.

Murr, C.; Widner, B.; Wirleitner, B.; Fuchs, D. (2002). Neopterin as a marker for immune system activation. *Curr. Drug. Metab.* 3:175-187.

Musteata, F. M.; Pawliszyn, J. (2007). Bioanalytical applications of solid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry* 26:36-45.

Mutihac, L.; Mutihac, R. (2008). Mining in chemometrics. *Anal. Chim. Acta* 612:1-18.

Myers, R. H.; Montgomery, D. C. (2002). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. Wiley, Estados Unidos.

Nafee, N. A.; Ismail, F. A.; Boraie, N. A.; Mortada, L. A. (2003). Mucoadhesive buccal patches of miconazole nitrate: in vitro/in vivo performance and effect of ageing. *Int. J. Pharmacol.* 264:1-14.

Nelson, M. L. (1998). Chemical and biological dynamics of tetracyclines. *Adv. Dent. Res.* 12:5-11.

Ni, Y.; Lai, Y.; Brandes, S.; Kokot, S. (2009). Multi-wavelength HPLC fingerprints from complex substances: An exploratory chemometrics study of the *Cassia seed* example. *Anal. Chim. Acta* 647:149-158.

Novakova, L.; Kaufmannova, I.; Janska, R. (2010). Evaluation of hybrid hydrophilic interaction chromatography stationary phases for ultra-HPLC in analysis of polar pteridines. *J. Sep. Sci.* 33:765-772.

Nováková, L.; Matysová, L.; Solich, P. (2006). Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta* 68:908-918.

Öhman, J.; Geladi, P.; Wold, S. (1990a). Residual bilinearization. Part 1: Theory and algorithms. *J. Chemom.* 4: 79 - 90.

Öhman, J.; Geladi, P.; Wold, S. (1990b). Residual bilinearization. Part 2: Application to HPLC-diode array data and comparison with rank annihilation factor analysis. *J. Chemom.* 4:135-146.

Olejnik, M.; Szprengier-Juszkiewicz, T.; Jedziniak, P. (2009). Multi-residue confirmatory method for the determination of twelve coccidiostats in chicken liver using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216:8141-8148.

Olivieri, A. C. (2005). On a versatile second-order multivariate calibration method based on partial least-squares and residual bilinearization: Second order advantage and precision properties. *J. Chemom.* 19:253-265.

Ozyurt, E.; Toykulyeva, M. B.; Danilyans, I. L.; Morton, O.; Baktir G. (2001). Efficacy of 7-day treatment with metronidazole+miconazole (Neo-Penotran ) a triple-active pessary for the treatment of single and mixed vaginal infections. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 74:35-43.

Patel, K. D.; Jerkovich, A. D.; Link, J. C.; Jorgenson, J. W. (2004). In-depth characterization of slurry packed capillary columns with 1.0-microm nonporous particles using reversed-phase isocratic ultrahigh-pressure liquid chromatography. *Anal. Chem.* 76:5777-5786.

Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K. E. (2005). Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. *J. Chromatogr. B* 817:3-12.

Pedrero, F.; Kalavrouziotis, I.; Alarcón, J. J.; Koukoulakis, P.; Asano, T. (2010). Use of treated municipal wastewater in irrigated agriculture—Review of some practices in Spain and Greece. *Agricultural Water Management* 97:1233-1241.

Pere-Trepat, E.; Tauler, R. (2006). Analysis of environmental samples by application of multivariate curve resolution on fused high-performance liquid chromatography-diode array detection mass spectrometry data. *J. Chromatogr. A* 1131:85-96.

Peré-Trepat, E.; Lacorte, S.; Tauler, R. (2005). Solving liquid chromatography mass spectrometry coelution problems in the analysis of environmental samples by multivariate curve resolution. *J. Chromatogr. A* 1096:111-122.

Peré-Trepat, E.; Petrovic, M.; Barceló, D.; Tauler, R. (2004). Application of chemometric methods to the investigation of main microcontaminant sources of endocrine disruptors in coastal and harbour waters and sediments. *Anal. Bioan. Chem.* 378:642-654.

Peré-Trepat, E.; Tauler, R. (2006). Analysis of environmental samples by application of multivariate curve resolution on fused high-performance liquid chromatography-diode array detection mass spectrometry data. *J. Chromatogr. A* 1131:85-96.

Peré-Trepat, E.; Lacorte, S.; Tauler, R. (2007). Alternative calibration approaches for LC-MS quantitative determination of coeluted compounds in complex environmental mixtures using multivariate curve resolution *Anal. Chim. Acta* 595:228-237.

Petrovic, M.; Farré, M.; Lopez de Alda, M.; Perez, S.; Postigo, C.; Köck, M.; Radjenovic, J.; Gros, M.; Barceló, D. (2010). Recent trends in the liquid chromatography-mass spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples. *J. Chromatogr. A* 1217: 4004-4017.

Piel, G.; Evrard, B.; Fillet, M.; Llabres, G.; Delattre, L. (1998). Development of a non-surfactant parenteral formulation of miconazole by the use of cyclodextrins. *Int. J. Pharmacol.* 169:15-22.

Poole, C.F. (2003). *The Essence of Chromatography*. Elsevier. Amsterdam, Holanda.

Pravdova, V.; Walczak, B.; Massart, D. L. (2002). A comparison of two algorithms for warping of analytical signals *Anal. Chim. Acta* 456:77-92.

Ramis Ramos, G., García Álvarez-Coque, M. C. (2001). *Quimiometría*. Editorial Síntesis S.A. Madrid, España.

Reverete, S.; Borrull, F.; Pocurull, E.; Marce, R.M. (2003). Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography (electrospray) mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1010:225-232.

Rezvani, I. (1996). Defects in metabolism of aminoacids. En: Bechram, E.R.; Kliegman, R.; Arvin, A. (Eds.), *Nelson Textbook of pediatrics*. WB Saunders Company. Capítulo 71:329-335.

Richardson, S. D. (2007). Water analysis: Emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* 79 4295-4324.

Ridgway, K.; Lalljie, S. P. D.; Smith, R. M. (2007). Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *J. Chromatogr. A.* 1153:36-53.

Riviere, J. E.; Spoo, J. W. En: Adams, H. R. (Editor) (1995). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Séptima Edición. Capítulo 41:784-796.

Rogers, E. F.; Brown, R. D.; Brown, J. E.; Kazazis, D. M.; Leanza, W. J.; Nichols, J. R.; Ostlind, D.A.; Rodino, T.M. (1983). Nicarbazin complex yields dinitrocarbanilide as ultrafine crystals with improved anticoccidial activity. *Science* 222: 630-632.

Rubinson, J. F.; Rubinson, K. (2000). *Química analítica contemporánea*. Capítulo 4: Tratamiento de la muestra, interferencias y estándares. Primera Edición. Prentice Hall. México.

Ruckebusch, C.; De Juan, A.; Duponchel, L.; Huvenne, J.P. (2006). Matrix augmentation for breaking rank-deficiency: A case study. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 80:209-214.

Ruyck, H.; De Ridder, H. (2007). Determination of tetracycline antibiotics in cow's milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Mass Spectrom.* 21:1511-1520.

Salem, A. A.; Mossa, H. A.; Barsoum, B. N. (2006). Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy for quantitative analysis of miconazole, metronidazole and sulfamethoxazole in pharmaceutical and urine samples . *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41:654-661.

Salvatore, F.; Colonna, A.; Costanzo, F.; Russo, T.; Esposito, F. Cimino, F.; Nass, G. (Editor) (1983). *Recent Results on Cancer Research* 84. Springer. Nueva York, Estados Unidos.

Sanchez, E.; Kowalski, B. R. (1986). Generalized rank annihilation factor analysis. *Anal Chem.* 58:496-499.

Sanchez, E.; Kowalski, B. R. (1990). Tensorial resolution: A direct trilinear decomposition. *J. Chemom.* 4:29-45.

Santiago Valverde, R.; Gil García, M. D.; Martínez Galera, M.; Goicoechea, H. C. (2006). Determination of tetracyclines in surface water by partial least squares using multivariate calibration transfer to correct the effect of solid phase pre-concentration in photochemically induced fluorescence signals. *Anal. Chim. Acta* 562:85-93.

Santiago Valverde, R.; Sánchez Pérez, I.; Franceschelli, F.; Martínez Galera, M.; Gil García, M. D. (2007). Determination of photoirradiated tetracyclines in water by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection based reaction of rhodamine B with cerium (IV) *J. Chromatogr. A* 1167:85-94.

Scriver, R. C.; Kauffman, S.; Risensmith, K. C.; Woo, S. L. C. (1995) En: Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D. (Editores). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill. Nueva York, Estados Unidos.

Shariati-Rad, M.; Hasani, M. (2009). Application of multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) for secondary structure resolving of proteins. *Biochimie* 91:850-856.

Sinkov, N. A.; Harynuk, J. J. (2011). Cluster resolution: A metric for automated, objective and optimized feature selection in chemometric modeling. *Talanta* 83:1079-1087.

Smith, R. M. (2003). Before the injection, modern methods of sample preparation for separation techniques. *J. Chromatogr. A* 1000:3-27.

Stahl, M. (2004). Peak purity analysis in HPLC and CE using diode-array technology. Agilent Technologies Publication Number 5988-8647EN.

Stahl, R. S.; Johnston, J. J. (2002). High-performance liquid chromatography-based determination of nicarbazin excretion in waterfowl. *J. Chromatogr. B* 775:103-108.

Steinmann, D.; Ganzera, M. (2010). Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. *J. Pharm. Biom. Anal.* En prensa.

Stolker, A. A. M.; Brinkman, U. A. T. (2005). Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review. *J. Chromatogr. A* 1067:15-53.

Strasinger, S. K. (2010). *Análisis de orina y de los líquidos corporales*. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Stueber, M.; Reemtsma, T. (2004). Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 378:910-916.

Svoboda, P.; Ko, H. S.; Cho, B. L.; Yoo, S. H.; Choi, S. W.; Ye, S. K.; Kasai, H.; Chung, M. H. (2008). Neopterin, a marker of immune response, and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress, correlate at high age as determined by automated simultaneous high-performance liquid chromatography analysis of human urine. *Anal. Biochem.* 383: 236-242.

Swartz, M.E. (2005). UPLC: an introduction and review. *J. Liq. Chromatogr.* 28:1253-1263.

Synovec, R. E. (2011). Enhancing chemical separations with chemometric data analysis. *Talanta* 83(4):1067.

Thevis, M.; Kohler, M.; Schänzer, W. (2008). New drugs and methods of doping and manipulation. *Drug Today.* 13(1-2):59-66.

Thomas, A.H.; Lorente, C.; Capparelli, A.L.; Pokhrel, M.R.; Braun, A.M.; Oliveros, E. (2002). Fluorescence of pterin, 6-formylpterin, 6-carboxypterin and folic acid in aqueous solution: pH effects. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1:421- 426.

Thompson, J. .; Brown, J. S.; Carr, P. W. (2001). Dependence of thermal mismatch broadening on column diameter in high-speed liquid chromatography at elevated temperatures. *Anal Chem.* 73:3340-3347.

Tomaudl, J.; Talloja, J.; Tomandlova, M.; Palyza, V. (2003). Determination of total oncopterin, neopterin and biopterin in human urine by high performance liquid chromatography with solid phase extraction. *J. Sep. Sci.* 26:674-678.

USP 32 (United States Pharmacopeia 32<sup>th</sup> Edition). (2008). Rockville, MD, Estados Unidos.

Valcarcel, M. (1999). *Principios de Química Analítica*. Springer-Verlag Ibérica S.A., Barcelona, España.

van der Voet, H. (1994). Comparing the predictive accuracy of models using a simple randomization test. *Chemometr. Intell. Lab.* 25:313-323.

van Mispelaar, V. G. (2005). *Chromametrics*. Tesis doctoral presentada en la universidad de Ámsterdam, Holanda.

van Nederkassel, A. M.; Daszykowski, M. Eilers, P. H. C.; Vander Heyden, Y. (2006). A comparison of three algorithms for chromatograms alignment. *J. Chromatogr, A* 1118(2):199-210.

Vosough, M.; Salemi, A. (2007). Second-order standard addition for deconvolution and quantification of fatty acids of fish oil using GC-MS. *Talanta* 73:30-36.

Walters, F. H.; Parker, L. R.; Morgan, S. L.; Deming, S. N. (1991). *Sequential simplex optimization. A technique for improving quality and productivity in research, development and manufacturing*. CRC Press. Florida, Estados Unidos.

Wang, Y. D.; Veltkamp, D. J.; Kowalski, B. R. (1991). Multivariate instrument standardization. *Anal. Chem.* 63(23):2750-2756.

Wardencki, W.; Curylo, J.; Namiesnik, J. (2007). Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70:275-288.

Waters Corporation. (2004). *Ultra Performance LCTM by design.720000880EN LL & LW-UL*.

Windig, W.; Guilment, J. (1991). Interactive self-modeling mixture analysis. *Anal. Chem.* 63:1425-1432.

Wise, B. M.; Gallagher, N. B.; Bro, R.; Shaver, J. M.; Windig, W.; Koch, R. S. (2005). *PLS\_Toolbox Version 3.5 for use with MATLAB*. Eigenvector Research, Inc. 830 Wapato Lake Road, Manson, WA 98831, Estados Unidos.

Wise, S. A.; Barceló, D.; Garrigues, P.; Turle, R. (2006). Advances in analytical techniques for environmental analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 386:765-767.

Wold, S.; Geladi, P.; Esbensen, K.; Öhman, J. (1987). Multiway principal components and PLS analysis. *J. Chemom.* 1:41-56.

Wrobel, Kaz.; Wrobel, Kat.; de la Garza Rodriguez, I. M.; López de Alba, P. L.; López Martinez, L. (1999). Determination of miconazole in pharmaceutical creams using internal standard and second derivative spectrophotometry *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20:99-105.

Wu, H. L.; Shibukawa, M.; Oguma, K. (1998). An alternating trilinear decomposition algorithm with application to calibration of HPLC-DAD for simultaneous determination of overlapped chlorinated aromatic hydrocarbons. *J.Chemom.* 12:1-26.

Wu, N.; Dempsey, J.; Yehl, P.M.; Dovletoglou, A.; Ellisoa, D.; Wyvratt J. (2004). Practical aspects of fast HPLC separations for pharmaceutical process development using monolithic columns. *Anal. Chim. Acta* 523:149:156.

Wu, N.; Lippert, J. A.; Lee, M.L. (2001). Practical aspects of ultrahigh pressure capillary liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 911:1-12.

Xia, A. L.; Wu, H. L.; Fang, D. M.; Ding, Y. J.; Hu, L. Q.; Yu, R. Q. (2005). Alternating penalty trilinear decomposition algorithm for second-order calibration with application to interference-free analysis of excitation-emission matrix fluorescence data. *J. Chemom.* 19:65-76.

Xu, L.; Tang, L. J.; Cai, C. B.; Wu, H. L.; Shen, G. L.; Yu, R. K. Jiang, J. H. (2008). Chemometric methods for evaluation of chromatographic separation quality from two-way data—A review. *Anal. Chim. Acta* 613:121-134.

Yakkundi, S.; Cannavan, A.; Elliott, C. T.; Lovgren, T.; Kennedy, D. G. (2001). Development and validation of a method for the confirmation of nicarbazin in chicken liver and eggs using LC-electrospray MS-MS according to the revised EU criteria for veterinary drug residue analysis. *Analyst* 126:1985-1989.

Yang, S.; Cha, J.; Carlson, K. (2005). Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1097:40-53.

Ye, Z.; Weinberg, H. S.; Meyer, M. T. (2007). Trace analysis of trimethoprim and sulfonamide, macrolide, quinolone, and tetracycline antibiotics in chlorinated drinking water using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 79:1135-1144.

Zhang, F.; Li, H. (2005). Resolution of overlapping capillary electrophoresis peaks by using chemometric analysis: Quantification of the components in compound reserpine tablets. *Electrophoresis* 26:1692-1702.

Zhang, Z. M.; Chen, S.; Liang, Y. Z. (2011). Peak alignment using wavelet pattern matching and differential evolution. *Talanta* 83:1108-1117.

Zhu, J.; Snow, D. D.; Cassada, D. A.; Monson, S. J.; Spalding, R. F. (2001). Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 928:177-186.

Zissis, K. D.; Brereton, R. G.; Dunkerley, S.; Escott, R. A. E. (1999). Two-way, unfolded three-way and three-mode partial least squares calibration of diode array HPLC chromatograms for the quantitation of low-level pharmaceutical impurities. *Anal. Chim. Acta* 384:71-81.

Zygler, A.; Wasik, A.; Namiesnik, J. (2009). Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. *Trends in Anal. Chem.* 28(9):1082-1102.