

## DETERMINACIÓN DE OCTOPAMINA EN ABEJAS MELÍFERAS: USO DE HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS PARA OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA

Gregoret, Santiago<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría, FBCB, UNL

Directora: Carla Teglia  
Codirectora: Celina Junges

Área: Ciencias Naturales

Palabras claves: Octopamina, HPLC, Quimiometría

### INTRODUCCIÓN

La *p*-octopamina (OA) es una hormona presente en invertebrados con función neurotransmisora y neuromoduladora, capaz de modificar muchas de las funciones vitales de los mismos. El presente trabajo se centra en las abejas domésticas (*Apis mellifera*), donde la hormona interviene en la respuesta de lucha o huida, comportamiento que busca aumentar las posibilidades de supervivencia de las abejas frente a una amenaza o perturbación externa. Trabajos previos reconocen la participación de la OA en eventos de amenaza aguda, pero muy poco se conoce sobre su comportamiento cuando las abejas se exponen a estresores de manera repetida y/o crónica, o frente a la combinación de estresores. Es por esto que se propuso el desarrollo de un método de detección sensible y específico a partir del cual lograr la cuantificación de OA en muestras de abejas adultas y de estadios inmaduros, con el fin máximo de analizar el posible efecto de diversos estresores sobre la modulación de la hormona.

### OBJETIVOS

- Aplicar herramientas quimiométricas para el desarrollo de métodos de extracción de las muestras recibidas.
- Desarrollar un método de detección para la cuantificación de octopamina.
- Validar las metodologías desarrolladas para, finalmente, realizar la cuantificación de la misma.

**Título del proyecto:** Generación y modelado quimiométrico de nuevos datos multidimensionales. Desarrollo de estrategias para optimizar el análisis de muestras altamente complejas

**Instrumento:** PICT (N° 2017-0340)

**Año convocatoria:** 2017

**Organismo financiador:** ANPCyT

**Director:** Goicoechea, Héctor

## METODOLOGÍA

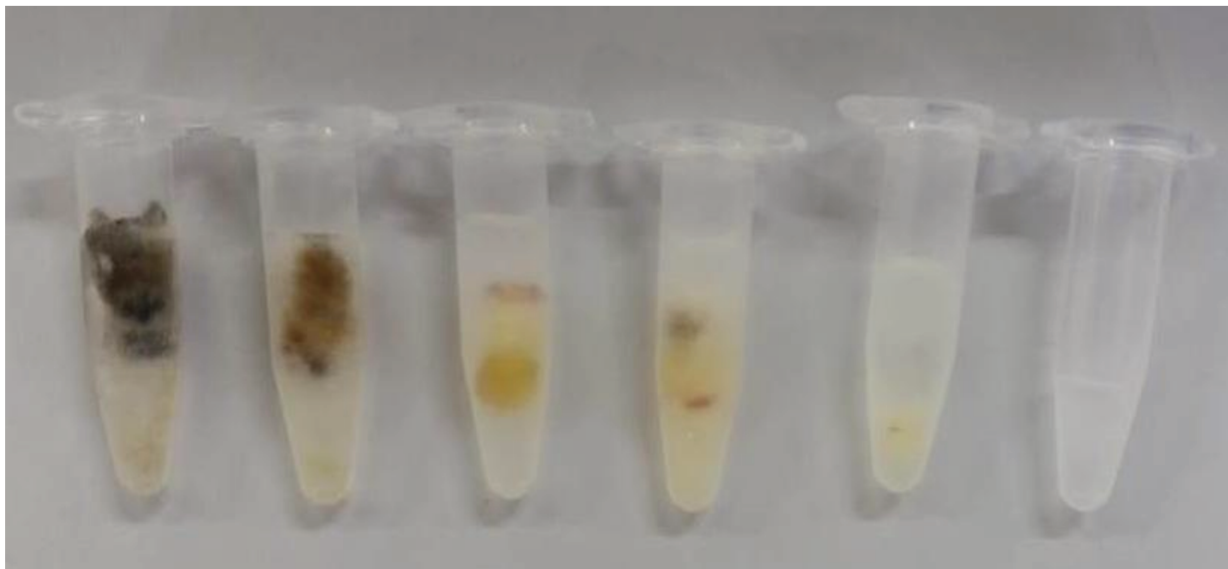
### Análisis intrínseco de la hormona

En una primera instancia, se procedió a realizar el estudio fisicoquímico de la hormona. Para comenzar, partiendo del estándar sólido (pureza  $\geq 95\%$ ), se procedió al análisis de solubilidad del compuesto, con el fin de tomar decisiones sobre posibles métodos de cuantificación y condiciones para la misma. Posteriormente, se observó que la hormona posee fluorescencia nativa, determinándose así el método de cuantificación. La separación de los compuestos de la muestra se realizó utilizando Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC).

### Procesamiento de las muestras y detección de OA

A continuación, se buscaron las condiciones óptimas de detección, estableciendo relación entre solventes, tiempos de corrida, volumen de inyección y temperatura.

Una vez obtenidas las muestras (Figura 1), se investigó la mejor forma de eliminar todas aquellas sustancias que puedan interferir, o bien obstaculizar, el proceso cromatográfico y la cuantificación. Para este punto, se decidió utilizar una extracción líquido-líquido, seleccionando distintos solventes, con el posterior análisis de su rendimiento. Debido a la multiplicidad de factores, las condiciones finales se obtuvieron luego de la construcción y análisis de diseños de experimentales, factoriales y de superficie de respuesta, mediante softwares correspondientes.



**Figura 1:** Distintos tipos de muestras utilizadas: de izquierda a derecha se observan abejas con estadio de madurez decreciente. El extremo derecho corresponde a hemolinfa extraída de abeja completamente desarrollada.

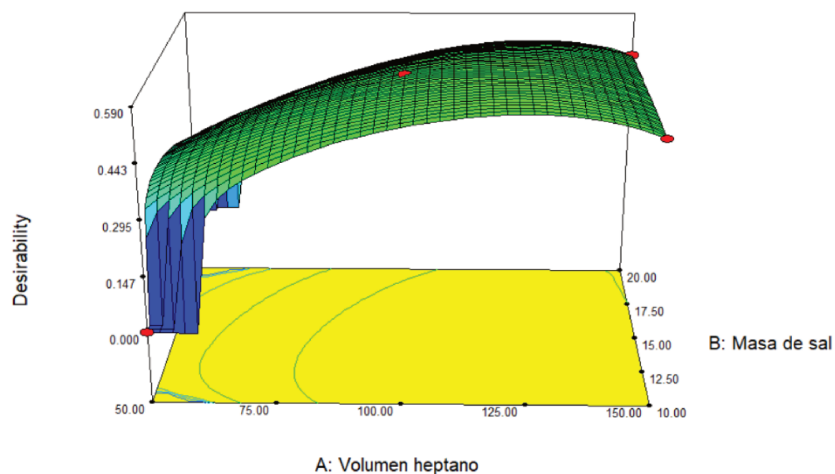
## Análisis final

Para concluir se realizó la validación del método, consistente en determinar parámetros que muestren su sensibilidad y especificidad, a fin de demostrar que los resultados de las muestras reales sean confiables.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

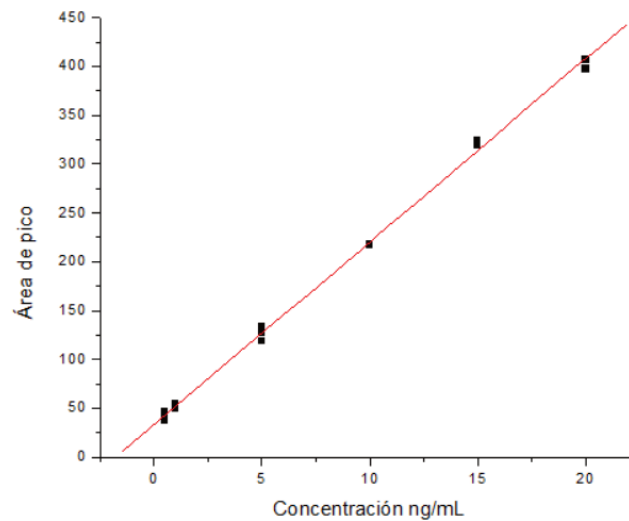
En primer lugar, la fluorescencia del compuesto se analizó mediante sus espectros de excitación y emisión, observándose picos a 220nm y 314nm respectivamente.

Para el análisis cromatográfico se seleccionaron Ácido trifluoroacético 0.05% y Acetonitrilo como solventes de corrida (fase móvil). El análisis del diseño central compuesto (superficie de respuesta) (Figura 2) arrojó que el uso de heptano y el agregado de sulfato de magnesio fueron las condiciones óptimas finales de extracción.



**Figura 2:** Superficie de respuesta. Valor de deseabilidad en función del volumen de solvente y la masa de sal adicionada

Para finalizar, a partir de la validación del método se obtuvieron los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) (LOD = 0.06 ng/mL y LOQ = 0.20 ng/mL) y la curva de calibrado (Figura 3) arrojó valores de ordenada al origen de 33.63, una pendiente de 18.68 y un  $r^2$  de 0.99912, para un rango lineal de 0.05ng/mL a 20ng/mL.



**Figura 3:** Curva de calibrado

Con los resultados obtenidos se logró obtener un método factible, práctico y confiable para la determinación de *p-octopamina* en muestras de abejas.

A partir de esta investigación pudo sentarse una base para la cuantificación de *p-octopamina* en *Apis mellifera*, método crucial para monitorear el comportamiento de las mismas bajo situaciones de estrés como, por ejemplo, la exposición a temperaturas extremas o a ciertos parásitos. Esto posibilitaría a futuro, promover la protección de su ecosistema y/o fortalecer sus condiciones de crianza en el entorno apícola.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

**Candioti, L.V.; De Zan, M.M.; Camara M.S.; Goicoechea, H.C.**, 2014. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development, *Talanta*, 124, 123-138

**Garrido, P.M.; Martín, M.L; Negri, P.; Eguaras, M.J.**, 2013. A standardized method to extract and store haemolymph from *Apis mellifera* and the ectoparasite *Varroa destructor* for protein analysis. *Journal of Apicultural Research*, 52, 67-68

**Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Crouch, S.R.**, 2008. Principios de análisis instrumental. Editorial Cengage Learning Editoriales. México.

**Teglia, C.M.; Gil García, M.D.; Galera, M.M.; Goicoechea H.C.**, 2014. Enhanced high-performance liquid chromatography method for the determination of retinoic acid in plasma. Development, optimization and validation, *J. Chromatogr. A*, 1353, 40-80