

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

“Desarrollo de estrategias analíticas basadas en técnicas cromatográficas y modelado quimiométrico para la determinación de ácido retinoico y principios activos de uso veterinario en muestras de interés biológico”

Lic. Carla Mariela Teglia

Dra. María Julia Culzoni
Director de Tesis

Dr. Héctor C. Goicoechea
Co-director de Tesis

Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría (LADAQ) – Cátedra de Química Analítica I –
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas – Universidad Nacional del Litoral

-2017-

AGRADECIMIENTOS



Todo comienzo tiene un final... y hoy, este final tiene sabor a principio... a esfuerzo y dedicación... a metas cumplidas... y porque no a 'sangre, sudor y gloria...!.

En este camino que resulta ser mi vida, y especialmente en este momento que esta pronto a llegar, resulta importante decir 'Gracias'.

Y para comenzar, es casi imposible resumir en pocas palabras mi gratitud, porque cada una de las personas que forman parte de mí vida aportó su granito de arena para poder concluir esta hermosa etapa de superación personal.

A mamá, papá, Cele, Pablo, nona Celia, abuela Chola y abuelo Juan...

Gracias por el apoyo incondicional, por permitirme tomar mis decisiones y acompañarme en el proceso. Por ser las personas que ponen cara de 'interesadas' cuando cuento que es lo que hago día a día, que se apasionan y preguntan y cuestionan y simplemente siempre están.

A Ema...

Gracias amor por entender que esto es lo que me gusta hacer. Gracias por hacer mis días más divertidos, por cada momento, por tus días de preguntas al por mayor y tus mil expresiones en respuesta... gracias por compartir nuestras vidas. Gracias recordar que aunque vengamos de 'mundos distintos' podemos encontrar en el otro el soporte necesario para continuar. Por esto y por mucho más, gracias.

A Sil, Mel, Dani y Ceci...

Gracias a mis amigas/hermanas, con las que crecí y sigo creciendo, a esas personas que conozco más de lo que me conozco, con las cuales siempre cuento, sin importar las distancias. Gracias por ser parte de mi familia.

A Luli, Nori y Sole

Estaría mil años escribiendo las anécdotas que tengo con ustedes y la forma en que el universo conspira para que nos mantengamos juntas. Y aunque algunas hayan 'emigrado' y ya no nos veamos tan seguido agradezco enormemente su amistad.

A la ASB

A ese grupo de gente que no pensé que 'juntaríamos', gracias por las reuniones 'formales' que casi siempre terminan en más charla que 'soluciones', gracias por el apoyo incondicional, las ideas locas y las risas al por mayor.

'The Ladies Group

Nada mejor que nuestro grupo para confirmar el dicho 'Dios los cría y el viento los amontona'. Gracias por tener siempre un momento para reunirnos y hablar sin un orden lógico sobre lo primero que se nos ocurra. Gracias por esas cenas, idas al cine, gracias por ser de esas amigas que parece que se conocen de toda la vida, y con las que no hace falta más que un gesto para saber qué es lo que están pensando.

AGRADECIMIENTOS



Al LADAQ

La mejor forma de trabajar es rodeada de personas que, aunque no compartan todos los pensamientos, siempre tienen un minuto para la charla, un aliento que dar, un momento de risas y alegrías, y porque no, algún que otro almuerzo 'científico'. Gracias a cada uno de ustedes por hacerme sentir 'como en casa'.

A Merce, Yami, Silvia, Marisi y Gonza

Gracias por todas las oportunidades, enseñanzas y vivencias. Por permitirme crecer como profesional, y por sobre todas las cosas como persona. Por cada charla, viaje, sábado de 'trabajo', muchas gracias por cada experiencia y por cada consejo.

A Juli y Héctor

Hasta el día de la fecha recuerdo el momento en el que tomé coraje y decidí hablar para comenzar con la 'odisea doctorado'. Esa fue una de las decisiones más difíciles de mi vida, pero viéndola en retrospectiva una de las mejores.

Héctor, agradezco de corazón tu predisposición, tu tiempo, el escuchar cada locura que quise hacer y dejar que lo intentara, gracias por abrirme la puerta de lo que hoy es parte de mi hogar.

Juli, gracias por acompañarme en este proceso, por aceptar y seguir con mis ideas, por aprender juntas cosas que nunca imaginamos. Por incentivarme a crecer... por compartir no solo trabajo... por cada charla, cada momento... gracias por todo.

A la FBCB

Gracias a la institución que me abrió las puertas, me formó como Licenciada en Biotecnología y que me permitió realizar mi postgrado. Gracias al comité académico del doctorado por su trato, por escucharme y brindarme toda su experiencia.

Como dije, la lista de 'Gracias' resulta interminable, así que para todas las personas que forman parte de mi vida nada mejor que un



*¡Gracias
totales!*



LA PRESENTE TESIS DIO LUGAR A LAS SIGUIENTES PUBLICACIONES



Enhanced high-performance liquid chromatography method for the determination of retinoic acid in plasma. Development, optimization and validation. Carla M. Teglia, María D. Gil García, María Martínez Galera, Héctor C. Goicoechea. *Journal of Chromatography A*, 1353 (2014) 40-48.

Rapid determination of retinoic acid and its main isomers in plasma by second-order high-performance liquid chromatography data modeling. Carla M. Teglia, María S. Cámara, Héctor C. Goicoechea. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (2014) 7989-7998.

Plasma retinoids concentrations in *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: *Leptodactylidae*) from rice agroecosystems, Santa Fe province, Argentina. Carla M. Teglia, Andrés M. Attademo, Paola M. Peltzer, Héctor C. Goicoechea, Rafael C. Lajmanovich. *Chemosphere* 135 (2015) 24-30.

A novel approach based on capillary electrophoresis coupled to augmented multivariate curve resolution-alternating least squares modeling for the determination of pKa of 2-hydroxy-4,6-dimethylpyrimidina in nicarbazin. Carla M. Teglia, Romina Brasca, Luciana Vera-Candioti, Héctor C. Goicoechea. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 150 (2016) 1-8.

Simultaneous multi-residue determination of twenty one veterinary drugs in poultry litter by modeling three-way liquid chromatography with fluorescence and absorption detection data. Carla M. Teglia, Paola M. Peltzer, Silvia N. Seib, Rafael C. Lajmanovich, María J. Culzoni, Héctor C. Goicoechea. *Talanta* 167 (2017) 442-452.

Determination of six veterinary pharmaceuticals in egg by liquid chromatography: chemometric optimization of a novel air assisted-dispersive liquid-liquid microextraction by solid floating organic drop. Carla M. Teglia, Lucia Gonzalo, María J. Culzoni, Héctor C. Goicoechea. *Food Chemistry* (en prensa).

ÍNDICE



Abreviaturas y símbolos	Pág. 01
Resumen	Pág. 03
Abstract	Pág. 06
1. Introducción	Pág. 09
1.1. Química verde	Pág. 11
1.2. Avances en cromatografía siguiendo directrices de la “química verde”	Pág. 11
1.3. Uso de la quimiometría con el fin de resolver problemas analíticos	Pág. 12
1.4. Algoritmos quimiométricos y terminología	Pág. 13
1.4.1. Estructura de los datos instrumentales de segundo orden	Pág. 14
1.4.2. Resolución multivariada de curvas por cuadrados mínimos alternantes	Pág. 14
1.5. Optimización	Pág. 18
1.6. ¿Cómo aplicamos los principios de la “química verde” durante el proceso analítico?: utilizamos técnicas de extracción eco-compatibles	Pág. 20
1.7. Desafíos a vencer: objetos de estudio y su problemática medioambiental	Pág. 21
1.8. Validación de métodos y descripción de propiedades analíticas	Pág. 23
1.8.1. Cifras de mérito	Pág. 26
Objetivos generales	Pág. 33
Objetivos específicos	Pág. 33
Capítulo 1: Análisis de Ácido retinoico en plasma. Desarrollo de métodos cromatográficos con detección de arreglo de diodos	Pág. 35
1.1. Objetivos	Pág. 37
1.2. Introducción	Pág. 37
1.3. Metodología	Pág. 41
1.3.1. Aparatos y software	Pág. 41
1.3.2. Sustancias y reactivos	Pág. 42
1.3.3. Estándar de ácido retinoico	Pág. 42
1.3.4. Muestras	Pág. 43
1.3.5. Preparación de la muestra	Pág. 45
1.3.6. Consideraciones generales	Pág. 46
1.3.7. Desarrollo de métodos cromatográficos	Pág. 46
Resultados y discusiones	
1.4. Resultados y discusiones. Método 1: separación cromatográfica de ácido retinoico y sus isómeros	Pág. 51
1.4.1. Optimización de la separación cromatográfica	Pág. 53
1.4.2. Validación del método	Pág. 57
1.4.3. Estudio de estabilidad	Pág. 65
1.4.4. Aplicaciones	Pág. 66
1.4.5. Discusión	Pág. 70

1.5. Resultados y discusiones. Método 2: análisis quimiométrico de ácido retinoico y sus isómeros	Pág. 73
1.5.1. Análisis mediante MCR-ALS	Pág. 76
1.5.2. Validación del método	Pág. 77
1.5.3. Análisis de muestras reales	Pág. 80
1.5.4. Comparación de métodos	Pág. 81
1.6. Conclusiones	Pág. 82
Capítulo 2: Determinación de principios activos de uso veterinario en muestras de interés biológico. Análisis de las características fisicoquímicas con posterior desarrollo de métodos de extracción y cuantificación.	Pág. 85
2.1. Objetivos	Pág. 87
2.2. Introducción	Pág. 87
2.3. Metodología	Pág. 91
2.3.1. Reactivos	Pág. 91
2.3.2. Software	Pág. 92
2.3.3. Determinación de constantes de acidez mediante EC-DAD	Pág. 92
2.3.4. Extracción de principios activos en huevo monitorizada mediante CLAR con DAD y FSFD	Pág. 94
2.3.5. Determinación de principios activos en cama de pollo mediante CLAR con DAD y FSFD	Pág. 99
2.4. Resultados y discusiones. Determinación de constantes de acidez mediante EC-DAD	Pág. 105
2.4.1. Análisis de la movilidad electroforética	Pág. 107
2.4.2. Análisis por MCR-ALS	Pág. 111
2.5. Resultados y discusiones. Extracción de principios activos en huevo monitorizada mediante CLAR con DAD y FSFD	Pág. 115
2.5.1. Optimización del método AA-DLLME-SFO	Pág. 117
2.5.2. Optimización del DLLME	Pág. 119
2.5.3. Rendimiento analítico del método cromatográfico	Pág. 122
2.5.4. Evaluación de los métodos de extracción	Pág. 123
2.6. Determinación de principios activos en cama de pollo mediante CLAR con DAD y FSFD	Pág. 125
2.6.1. Consideraciones generales	Pág. 127
2.6.2. Optimización del método cromatográfico	Pág. 128
2.6.3. Optimización del procedimiento de extracción	Pág. 131
2.6.4. Corrección de línea de base	Pág. 134
2.6.5. Análisis multivariado	Pág. 136
2.6.6. Estudio de linealidad, precisión y recuperación	Pág. 140
2.6.7. Análisis de muestras reales	Pág. 142
2.7. Conclusiones	Pág. 146
3. Conclusiones generales	Pág. 149
4. Bibliografía	Pág. 153

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

+	Matriz pseudoinversa (como superíndice)
$\hat{}$	Valor estimado
γ	Sensibilidad analítica
α	Nivel axial de un diseño
$\ \cdot \ $	Norma Euclidea de un vector
AA-DLLME-SFO	Microextracción dispersiva líquido-líquido con solidificación en una gota asistida por aire
ANOVA	Análisis de la Varianza
CCD	Diseño Central Compuesto
CFA	Coficiente de Factor Animal
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
CV%	Coficiente de Variación
D	Deseabilidad Global
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
DLLME	Microextracción dispersiva líquido-líquido
EC	Electroforesis Capilar
EJCR	Test de la región elíptica de confianza conjunta
FFD	Diseño Factorial Fraccionado
FSFD	Detector de Fluorescencia de Barrido Rápido
k	Factor estudiado mediante un diseño experimental
GC	Cromatografía Gaseosa
LOD	Límite de Detección
LOQ	Límite de Cuantificación
MCR-ALS	Resolución Multivariada de Curvas mediante Cuadrados Mínimos Alternantes
MDL	Método de Detección Límite
MRL	Límite Máximo de Residuo
MS	Espectroscopia de Masas
p_c	Puntos centrales
PCA	Análisis de Componentes Principales
REP%	Error relativo de la predicción
p_e	Puntos estrella o puntos axiales de un diseño

p_f	Puntos factoriales de un diseño
RMSE	Raíz cuadrada del error medio
RSM	Metodología de Superficie de Respuesta
SEN	Sensibilidad
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
SIMPLISMA	Análisis de mezclas que estima número de componentes y espectros puros
S/N	Relación señal/ruido
SLD	Diseño de mezclas de <i>Simplex Lattice</i>
s_R	Desviación estándar de la recuperación
SVD	Descomposición en Valores Singulares
T	Matriz transpuesta (como superíndice)
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
X	Arreglo tridimensional formado por diferentes matrices

RESUMEN

El Capítulo 1 contiene el desarrollo de métodos para la determinación de ácido retinoico en plasma. El ácido retinoico, retinoide proveniente de la vitamina A, es responsable de varios pasos en los procesos de diferenciación celular y crecimiento. En la sección “*Método 1: Separación cromatográfica de ácido retinoico y sus isómeros*”, se describe el desarrollo analítico necesario para obtener la separación cromatográfica del ácido retinoico y sus isómeros con detección UV-Vis. La optimización se llevó a cabo mediante un diseño de experimentos. El método se validó completamente, analizándose los parámetros selectividad, límites de cuantificación y detección, efecto matriz, rango lineal y de trabajo, repetitividad y precisión intermedia, recuperación y robustez. Luego del análisis de los datos se obtuvieron resultados aceptables, concluyéndose, por un lado, la falta de efecto matriz en el rango de trabajo y, por el otro, la bondad del método en términos de precisión y recuperación. A su vez, se profundizó en la determinación de los límites de detección, analizándose la factibilidad de utilizar una variedad de técnicas aceptadas por diferentes normativas. El método desarrollado y validado permitió el análisis de ácido retinoico en muestras de plasma de *Leptodactylus chaquensis*. Para el estudio los individuos se recolectaron en dos zonas, una zona de referencia y un campo de arroz. Como conclusión, las diferencias en las concentraciones de ácido retinoico y 13-*cis*-ácido retinoico, y la falta de diferencias entre los valores de retinol, permite suponer que los contaminantes a los que los anfibios estuvieron expuestos afectan la vía del ácido retinoico en un paso posterior a la conversión a retinol. Estas diferencias hacen necesario el monitoreo constante de las poblaciones, con el fin de estudiar el mecanismo por el cual los contaminantes influyen en la vía de señalización de los retinoides.

Por su parte, en la sección “*Método 2: Análisis quimiométrico de ácido retinoico y sus isómeros*”, se utilizó el algoritmo MCR-ALS con el objetivo de determinar retinoides a partir de datos obtenidos cuando hay separaciones parciales entre los componentes participantes. Para el análisis se construyó la matriz aumentada en modo temporal, a partir de matrices con dimensiones 201 × 102 (modo temporal y espectral, respectivamente), correspondientes al corte en tiempos 2.8 y 4.6 minutos y longitudes de onda 240 y 442 nm. En este apartado se determinaron los compuestos 9,13-*di-cis*-ácido retinoico, 13-*cis*-ácido retinoico, 9-*cis*-ácido retinoico y ácido retinoico. Como restricciones se utilizaron no negatividad en concentración y espectros, unimodalidad en concentración, y normalización de espectros, con buenos valores de porcentaje de varianza y falta de ajuste. Por su parte, luego de la validación del método se calcularon las concentraciones de estos retinoides en pacientes en tratamiento con Isotretinoína, medicamento empleado para el control del acné severo. Del análisis de 25 pacientes, se observó que las especies predominantes

corresponden, en orden de magnitud, a 13-*cis*-ácido retinoico, ácido retinoico, 9,13-di-*cis*-ácido retinoico y 9-*cis*-ácido retinoico. Los resultados obtenidos resultan de suma importancia en el monitoreo de los retinoides en pacientes con el fin de realizar tratamientos específicos, ajustando las concentraciones administradas, y logrando de este modo disminuir sus problemas teratogénicos. Al final del presente capítulo se realizó una comparación entre los métodos mediante la aplicación del test EJCR. Como conclusión, las herramientas quimiométricas permiten determinar en forma simultánea los componentes de la matriz y los analitos de interés, pudiéndose cuantificar los compuestos retinol y 9-*cis*-ácido retinoico, los que coeluyen en el método separativo. Por esta razón, las ventajas del análisis quimiométrico hacen posible la determinación de los compuestos de interés, aún en presencia de componentes no calibrados.

El Capítulo 2 muestra el desarrollo de métodos para la determinación de principios activos de uso veterinario presentes en matrices complejas como huevo y cama de pollo. El capítulo está organizado de manera de mostrar el avance en complejidad, desde el estudio fisicoquímico de los analitos de interés, la optimización de métodos de extracción y el desarrollo de un sistema cromatográfico para la determinación de multianalitos, con posterior utilización de herramientas quimiométricas. En la sección “*Determinación de constantes de acidez mediante EC-DAD*”, se analizó la factibilidad del uso de dos estrategias para determinar valores de pK_a : la construcción de curvas de movilidad electroforética versus pH y el análisis de matrices UV-Vis mediante MCR-ALS. Las dos metodologías resultaron acordes para la obtención de valores de pK_a aparente del componente de nicarbazina HDP. Por su parte, MCR-ALS brinda la ventaja de obtener las diferentes especies de los analitos presentes durante las corridas electroforéticas.

En la sección “*Determinación de principios activos en huevo monitorizada mediante CLAR con DAD y FSFD*” se presenta el desarrollo de dos estrategias de microextracción con el objetivo de analizar seis principios activos de uso veterinario en huevo. Para poder llevar a cabo la extracción, se analizaron diferentes diseños de experimentos, optimizándose los volúmenes de los solventes necesarios para un método de microextracción dispersiva líquido-líquido con solidificación de la gota del solvente asistido por aire y los volúmenes de solvente extractante y dispersivo de un método de microextracción dispersiva líquido-líquido. Posteriormente, se realizó un diseño para obtener los solventes necesarios para la resuspensión de los analitos. Para completar el estudio, se analizó la influencia que ejercen el sistema de extracción y la matriz de la muestra. Mediante los resultados obtenidos fue posible concluir que las diferencias fisicoquímicas de los analitos determinan la factibilidad del uso de un método de extracción sobre el otro. Se concluyó que resulta de suma importancia el estudio del efecto que ejerce el sistema de extracción sobre las recuperaciones de los analitos; efecto que es independiente de la matriz en estudio. Además, el uso rutinario de estos métodos permite reducir los volúmenes de solventes involucrados en el proceso.

Por último, en la sección “*Determinación de principios activos en cama de pollo mediante CLAR con DAD y FSFD*”, se realizó el desarrollo completo del sistema cromatográfico, estudiando, en una primera instancia, la influencia que ejerce el pH sobre los tiempos de retención de los 21 analitos en estudio. Posteriormente se analizaron los factores solvente orgánico, gradiente de elución, flujo y temperatura del sistema, con el objetivo de obtener un método cromatográfico que posea la mayor resolución entre los analitos. En este punto, el objetivo principal fue separar temporalmente los analitos que comparten características espectrales. Por su parte, mediante el uso de diseños de experimentos se optimizó el método de extracción, tanto en los porcentajes de solvente necesario como en el tiempo total de extracción. En esta sección, debido a la complejidad de la matriz, la validación se realizó en matriz adicionada, por lo tanto, para la obtención de los analitos de interés, se procedió al análisis utilizando herramientas quimiométricas. Entonces, primero se realizó una corrección de línea de base, disminuyéndose considerablemente la complejidad de los datos, con la posterior separación de las matrices en regiones, para finalizar el análisis mediante MCR-ALS. El modelado de los datos por MCR-ALS proporcionó resultados cualitativos y cuantitativos satisfactorios, lo que apoyó su aplicación a la resolución de picos altamente superpuestos en presencia de compuestos de la matriz. Durante la validación del método se obtuvieron buenos rangos lineales y excelentes recuperaciones y precisiones. El método se aplicó con éxito a la determinación de principios activos en muestras de diferentes granjas comerciales. Durante el análisis de estas muestras se confirmó la presencia de una variedad de principios activos, observándose la necesidad de realizar un monitoreo constante en los sistemas productivos aviares, con el fin de mantener la inocuidad de los sistemas aledaños.

ABSTRACT

The Chapter one includes the development of methods to determine retinoic acid in plasma. The retinoid acid, a derivative of vitamin A, is responsible for several steps in cell differentiation and growth. In the section "*Method 1: Chromatographic separation of retinoic acid and its isomers*", the analytical development necessary to obtain the chromatographic separation of retinoic acid and its isomers using a liquid chromatograph coupled to a UV-Vis array detector was described. The optimization of the chromatographic system was carried out using experimental design. The method was fully validated through the analysis of the parameters selectivity, limits of quantification and detection, matrix effect, linear and working range, repetitively and intermediate accuracy, recovery and robustness. After the analysis, acceptable results were obtained, concluding about lack of matrix effect and goodness of the method in terms of precision and recovery. At the same time, the determination of detection limits was deepened by analyzing the feasibility of using a variety of techniques accepted by different regulations. This method allowed the study of retinoic acid in plasma of *Leptodactylus chaquensis*. The individuals were collected from two zones, a reference zone and a rice field. In conclusion, the differences in the concentration of 13-*cis*-retinoic acid and retinoic acid, but the lack of differences in retinol between the zones, suggest that the contaminants affect a part of the retinoic acid pathway following the conversion to retinol. These differences require the constant monitoring of the populations, in order to study the mechanism by which the contaminants influence the signaling pathway of retinoic acid.

On the other hand, the use of MCR-ALS was analyzed in the section "*Method 2: Chemometric analysis of retinoic acid and its isomers*" in order to deal with the determination of compounds with partial separation between themselves and the matrix compounds. In order to perform the analysis, the augmented matrix was constructed in the temporal mode, from matrices with dimensions 201 × 102 (temporal and spectra, respectively), corresponding to the restriction at 2.8 to 4.6 minutes and 240 to 420 nm wavelengths, with the aim of analyzing the presence of 9,13-*di-cis*-retinoic acid, 13-*cis*-retinoic acid, 9-*cis*-retinoic acid, retinoic acid. Non-negativity in concentration and spectra, unimodality in concentration, and normalization of spectra were used as restriction, and good values of percentage of variance and lack of fit were obtained. After the validation of the method, the concentration of retinoids in patients treated with Isotretinoin, a medication used for the control of severe acne, was continued. From the analysis of 25 patients, it was observed that the predominant species correspond, in order of magnitude, to 13-*cis*-retinoic acid, retinoic acid, 9,13-*di-cis*-retinoic acid and 9-*cis*-retinoic acid. The result were of great importance in the monitoring of the plasma concentrations of patients undergoing treatment, in order to perform specific treatments,

adjusting the concentrations administered, and thus reducing the teratogenic problems. At the end of the present chapter a comparison between the methods through the study of the EJCR test was made. As a conclusion, when using the chemometric tools, the method is able to simultaneously determine the components of the matrix and the analytes of interest, being able to quantify the retinol and 9-*cis* retinoic acid compounds, retinoids that co-elute in the separative method. For this reason, the advantages of the chemometric analysis make it possible to determine the compounds of interest, even in the presence of non-calibrated components.

Chapter two emphasizes the developed of methods for the determination of veterinary active ingredients, with the aim of their implementation in complex matrix such as egg and poultry litter. The information included in the chapter goes from the simplest to the most complicated; from the study of the physicochemical characteristic of the analytes, the development of the extraction method and finally the development of a chromatographic method for the multi analytes determination, using the advantages of the chemometric tools. In the "*Determination of acid constants through EC-DAD*" section, the feasibility of two strategies to determine pK_a values were analyzed: the construction of electrophoretic mobility versus pH curves and the analysis of UV-Vis matrices using MCR-ALS. As a result, the two methodologies were consistent to obtain apparent pK_a values of the HDP nicarbazina component. Besides, the advantage of using MCR-ALS is to obtain the different species present during the electrophoresis runs.

In the section "*Determination of active ingredients in eggs monitored through CLAR with DAD and FSFD*" the development of two strategies of micro-extraction with the objective of analyzing six active principles of veterinary use in egg is presented. In this sense, in order to carry out the extraction, different designs of experiment were analyzed, by means of which the volumes of solvents necessary for the air assisted-dispersive liquid-liquid micro-extraction based on solidification of floating organic drop method, and the volume of extractante and dispersive solvent for the dispersive liquid-liquid micro-extraction method with the subsequent development of a design to obtain the solvents necessary for the re-suspension of the analytes were performed. Hence, to complete the study, the influence produced by the extraction system and by the matrix on the extraction of the analytes was individually analyzed. The result showed that the physical differences of the analytes determine the feasibility of the use of one method of extraction over the other. As conclusion, it is extremely important to study the effect of the extraction system on analyte recoveries, which is independent of the matrix under study. Further, the routine use of these methods allows reducing the volume of solvents involved in the process.

Eventually, in the section "*Determination of active ingredients in poultry litter through CLAR with DAD and FSFD*", the complete development of the chromatographic system was carried out, studying firstly the influence of the pH on the retention times of the twenty-one analytes under study.

Subsequently the organic solvent, elution gradient, flow and temperature of the system were analyzed with the objective of obtaining a chromatographic method that keeps the highest resolution among the analytes. At this point, the main objective was to temporarily separate the analytes that share spectral characteristics. On the other hand, through the use of experimental designs, the extraction method was optimized, in the required solvent percentages and in the total extraction time. In this section, due to the complexity of the matrix, the validation was performed in an added matrix, so that, to obtain the analytes of interest, the analysis was performed using chemometric tools. Thereby, a baseline correction was performed to considerably reduce the complexity of the data. Then the arrays were separated into regions and a last step of analysis by MCR-ALS. The modeling of the data by MCR-ALS provided satisfactory qualitative and quantitative results, which supported its application to the resolution of highly superimposed peaks in the presence of matrix compounds. Therefore, during the validation of the method good linear ranges and excellent recoveries and precisions were obtained. The method was successfully applied to the determination of active principles in samples from different commercial farms. During the analysis of these samples the presence of a variety of active principles was confirmed, observing the need for a constant monitoring in the avian productive systems, in order to maintain the safety of the surrounding systems.

1.



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1.1. *Química verde*

Las actividades que el ser humano realiza, en mayor o menor medida, generan en el medioambiente impactos, tanto positivos como negativos. En este contexto, estos resultados han generado un problema sociopolítico importante, ya que afectan tanto a las políticas públicas como a la sociedad en su conjunto. En la actualidad, para mediar y hacer frente a este problema, los países desarrollados han comenzado a crear “políticas verdes” [1], tendientes a disminuir el impacto de las actividades del ser humano en el medioambiente.

A nivel científico, en las últimas décadas se delineó lo que actualmente se conoce como “*química verde*”, la cual se utiliza en varios campos de investigación e integra principios de desarrollo sustentable y “*economías verdes*” [1,2]. La expresión “*química verde*” fue propuesta por Paul T. Anastas y John C. Warner (Estados Unidos, 1991) [3,4], siendo su idea general la de desarrollar iniciativas para prevenir la polución en las comunidades científica, empresarial y regulatoria. En síntesis, se busca diseñar productos químicos y procesos que reduzcan o eliminen el uso o la generación de sustancias perjudiciales [3,5]. Es importante remarcar que la meta de la “*química verde*” es realizar procesos químicos más seguros, limpios y energéticamente eficientes [6].

En este contexto, Sandra y colaboradores definieron a la “*química analítica verde*” como “el uso de técnicas y metodologías analíticas que reducen o eliminan solventes, reactivos, conservantes y otros químicos que son peligrosos tanto para la salud humana como para el medioambiente y que, por otro lado, generen análisis rápidos y eficientes sin comprometer el desempeño de los procesos” [7,8].

Hoy en día, el desarrollo de sistemas que utilicen solventes sustentables o disminuyan los volúmenes de los solventes orgánicos tóxicos empleados es quizás el área más activa de la “*química verde*”, ya que el uso frecuente de estas sustancias representa la gran mayoría de los desperdicios que se producen durante los procesos analíticos. En efecto, muchos principios de la “*química verde*” y la “*química analítica verde*” refieren directa o indirectamente a este problema [9].

1.2. *Avances en cromatografía siguiendo directrices de la “química verde”*

Desde su inserción como técnica analítica en la década del 60, la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), acoplada a detectores de arreglo de diodos (DAD, del inglés *diode array detector*) y de fluorescencia de barrido rápido (FSFD, del inglés *fast-scanning fluorescence detector*), evolucionó

con el objetivo de lograr mayor eficiencia en la resolución cromatográfica. En síntesis, se aumentó la selectividad y la rapidez del análisis, con la subsecuente disminución de los volúmenes utilizados tanto en la preparación de la muestra como en la cantidad de fase móvil requerida. Estos avances van de la mano de la implementación de técnicas de producción de partículas más pequeñas, con soportes de mejor calidad, la introducción de columnas monolíticas de alto rendimiento y la utilización de nuevos instrumentos que soportan altas presiones y temperaturas [7,10].

1.3. Uso de la quimiometría con el fin de resolver problemas analíticos

En algunos sistemas, lograr la separación completa de los analitos de interés y los componentes de la matriz, resulta un trabajo arduo que requiere un consumo elevado de solventes y reactivos, y por lo tanto largos tiempos de análisis. En estos casos, si se emplean métodos quimiométricos basados en la extracción matemática de la señal pura de los analitos, la resolución cromatográfica se puede conseguir con tiempos de análisis corto y, en algunos casos, pueden resolverse picos completamente superpuestos. La disminución de los tiempos cromatográficos, se refleja, en un menor consumo de solventes. En estos casos, lo único necesario es contar con datos tridimensionales generados con detectores DAD, FSD o de espectrometría de masas (MS, del inglés *mass spectrometry*), entre otros.

En estos sistemas, durante el análisis cromatográfico se pueden adquirir diferentes tipos de datos, que dependen, por un lado, de las posibilidades que brinde el detector y, por el otro, del objetivo que el analista desee cumplir.

En este sentido, los datos se pueden clasificar según su orden, es decir el número de dimensiones que presentan para una única muestra, en [11,12]:

- *Datos de orden cero.* Los datos de orden cero se obtienen cuando para cada muestra se genera una respuesta simple (sensor de orden cero). Ejemplos de este tipo de datos son la lectura de la absorbancia de un analito a una dada longitud de onda, la lectura de un electrodo ion selectivo y el área bajo la curva o la altura del pico de interés extraído de un cromatograma.
- *Datos de primer orden.* Se obtienen datos de primer orden para una muestra a partir de un arreglo de datos (vector de orden uno). Como ejemplo, se pueden mencionar espectros, tanto UV-Vis como de fluorescencia, o cromatogramas de una muestra registrados a una determinada longitud de onda.
- *Datos de segundo orden.* Los datos de segundo orden consisten en matrices de datos por cada muestra, es decir datos registrados en dos dimensiones, por ejemplo usando un instrumento simple, como un espectrofluorímetro, registrando matrices de excitación-emisión o un espectrofotómetro de arreglo de diodos siguiendo la cinética de una reacción química. A su

vez, se pueden obtener datos de segundo orden registrando los espectros de absorción, emisión de fluorescencia o masas para cada tiempo de retención de un cromatograma. Cuando los datos de segundo orden para un grupo de muestras se juntan en un único arreglo tridimensional, el objeto resultante se conoce como arreglo de tres vías. El término vía indica el número de dimensiones que tiene un arreglo de datos formado por la agrupación de un cierto número de muestras, por lo que los datos de segundo orden también se conocen como datos de tres vías.

- *Datos de tercer orden.* En este caso, la incorporación de un modo extra en los datos conduce a datos de orden superior. Ejemplos de arreglos de cuatro vías son los obtenidos al seguir la cinética registrando matrices de excitación-emisión de fluorescencia.

Como se comentó previamente, existe un gran número de posibles interacciones de la quimiometría con la cromatografía, siendo una de las más utilizadas la de resolver matemáticamente picos solapados, logrando de esta manera la selectividad necesaria para una adecuada identificación y cuantificación de los compuestos [13]. Esta resolución puede lograrse realizando el procesamiento de datos de segundo orden mediante algoritmos quimiométricos apropiados. El procesamiento de estas matrices de datos permite obtener la denominada “ventaja de segundo orden”, consistente en la determinación de analitos en muestras que contienen interferencias no calibradas sin necesidad de eliminarlas previamente [14-16]. Otras aplicaciones útiles son las de corregir líneas de base, ruidos debidos al gradiente de elución, corrimientos de tiempo de retención y formas de picos [17].

Dentro de los algoritmos quimiométricos más utilizados para modelar datos de segundo orden se puede mencionar al Análisis Paralelo de Factores (PARAFAC, del inglés *parallel factor analysis*) [18], a la Resolución Multivariada de Curva por Cuadrados Mínimos Alternantes (MCR-ALS, del inglés *multivariate curve resolution-alternating least-squares*) [19], a los métodos basados en bilinealización residual (RBL, del inglés *residual bilinearization*) [20,21]; y a los algoritmos acoplado a diferentes Redes Neuronales Artificiales [22,23].

1.4. Algoritmos quimiométricos y terminología

¿Qué pretende el analista al utilizar algoritmos para procesar matemáticamente los datos de segundo orden?

Cuando se trabaja con datos de segundo orden, lo que se busca es aislar la información intrínseca de un analito, independientemente de las posibles interferencias que existan en la matriz en la que está inmerso. Esta propiedad evita tener que realizar remociones físicas de los posibles interferentes y proporciona información exclusiva del analito de interés [24]. Por lo tanto, se supera

tanto la necesidad de que los sistemas de medición sean selectivos como la de disponer de muestras de calibración que contengan los potenciales interferentes.

1.4.1. Estructura de los datos instrumentales de segundo orden

En general, se puede expresar a una matriz de datos \mathbf{Z} ($J \times K$) para un componente puro en ausencia de ruido como el producto interno de dos vectores:

$$\mathbf{Z} = \mathbf{x}\mathbf{y}^T \quad (1)$$

donde \mathbf{x} ($J \times 1$) e \mathbf{y} ($K \times 1$) denotan los perfiles en ambas dimensiones. Idealmente, los perfiles de \mathbf{x} e \mathbf{y} son independientes uno del otro. Este tipo de datos se denomina "bilineal", es decir, lineal en una variable cuando la otra está fija.

Cuando una matriz de datos se agrupa en un arreglo de tres vías, la resultante se puede expresar como:

$$M_{ijk} = x_i y_j z_k \quad (2)$$

donde M_{ijk} es un elemento del arreglo \mathbf{M} de tres vías (de tamaño $I \times J \times K$) y x_i , y_j y z_k son los elementos de los perfiles de una dimensión \mathbf{x} , \mathbf{y} y \mathbf{z} que describen el comportamiento de la señal medida en cada una de las dimensiones de los datos. En este caso el arreglo de datos se conoce como trilineal, indicando que existe una relación interna entre cada una de las matrices y que, en general, la descomposición de estos arreglos es única [15,25].

1.4.2. Resolución multivariada de curvas por cuadrados mínimos alternantes

El algoritmo MCR-ALS permite obtener los perfiles de respuestas puros (espectros, cinéticas, perfiles de elución, etc.) de cada constituyente químico o especie dentro de una mezcla de componentes no resuelta, hecho que beneficia al investigador cuando no se dispone de información previa acerca de la naturaleza o composición de la muestra.

MCR-ALS posee la capacidad de procesar múltiples matrices de datos simultáneamente reduciendo ambigüedades intrínsecas del análisis de factores y/o deficiencias de rango presentes en los datos. Se considera que una matriz es deficiente de rango cuando el número de contribuciones químicas detectadas por los métodos de análisis de factores, es menor que el número de componentes químicos presentes en el sistema, lo cual puede deberse a similitudes muy marcadas entre los espectros de las especies que intervienen o en sus perfiles de concentración [26].

En química analítica, y en especial en sistemas cromatográficos, la utilización de MCR-ALS es amplia, debido, entre otras cosas, a su capacidad de tener en cuenta cambios en la forma y/o posición de los perfiles de los componentes de muestra a muestra [11,27]. En este sentido, MCR-ALS

es capaz de analizar juegos de datos que se desvían de la trilinealidad ya que, en vez de procesarse un arreglo de tres vías, se apilan las matrices en el modo donde se sospecha la pérdida de trilinealidad; por ejemplo, si ocurre una variación de los perfiles temporales de matriz a matriz, se crea una matriz aumentada en este sentido [28].

La descomposición bilineal de la matriz aumentada se realiza de acuerdo a:

$$\mathbf{D} = \mathbf{C} \mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (3)$$

donde las filas de \mathbf{D} contienen los espectros de absorción medidos en función del tiempo (u otro tipo de señal de segundo orden), las columnas de \mathbf{C} contienen los perfiles temporales de los componentes involucrados en el proceso, las columnas de \mathbf{S} sus espectros, y \mathbf{E} es la matriz de los residuos no ajustados por el modelo. Las dimensiones apropiadas de \mathbf{D} , \mathbf{C} , \mathbf{S} y \mathbf{E} son $K(1+l) \times J$, $K(1+l) \times N$, $J \times N$ y $K(1+l) \times J$, respectivamente, siendo l el número de muestras de calibración, J el número de longitudes de onda, N el número de componentes que dan respuestas y K el número de tiempos de elución asumiendo una sola muestra incógnita.

La descomposición de \mathbf{D} se logra a través de la minimización por ALS de la norma de \mathbf{E} , que permite, a través de la implementación de un método iterativo, la obtención de estimaciones de las matrices \mathbf{C} y \mathbf{S} , denominados $\hat{\mathbf{C}}$ y $\hat{\mathbf{S}}$, respectivamente [19,29], según:

$$\hat{\mathbf{S}}^T = \mathbf{C}^+ \mathbf{D} = (\hat{\mathbf{C}}^T \hat{\mathbf{C}})^{-1} \hat{\mathbf{C}}^T \mathbf{D} \quad (4)$$

$$\hat{\mathbf{C}} = \mathbf{D} \mathbf{S}^{T+} = \mathbf{D} \hat{\mathbf{S}} (\hat{\mathbf{S}}^T \hat{\mathbf{S}})^{-1} \quad (5)$$

donde ‘ \wedge ’ indica una matriz estimada y ‘+’ representa la pseudoinversa de la matriz. Es importante mencionar que MCR-ALS requiere ser inicializado con información del sistema lo más cercana posible al resultado final.

En este sentido, las estimaciones iniciales pueden obtenerse directamente a partir del conjunto de datos originales o pueden generarse aplicando métodos quimiométricos auxiliares. En algunos casos, como, por ejemplo, datos de CLAR con detección DAD, se pueden utilizar como estimaciones iniciales para \mathbf{S}^T los espectros observados en los picos de los cromatogramas.

Por su parte, cuando el conocimiento *a priori* es escaso o cuando se prefieren procedimientos matemáticos para obtener las estimaciones iniciales se pueden utilizar métodos quimiométricos como por ejemplo el análisis de componentes principales (PCA, del inglés *principal component analysis*) [30], SIMPLISMA (del inglés *simple-to-use interactive self-modeling mixture analysis*) [19,31] u OPA (del inglés *orthogonal projection approach*) [32]. En general, estos métodos tienen por objeto describir la varianza máxima del conjunto de datos, suponiendo que un conjunto de datos puede describirse con un número de contribuciones de MCR igual al número de componentes estimados considerados. En este contexto, se utiliza, en general, el examen de la magnitud de los valores

singulares, teniendo en cuenta que los valores singulares relacionados con las contribuciones químicas de los compuestos son valores grandes, mientras que los relacionados con el ruido son pequeños y similares entre ellos. Los métodos empleados para la generación de estimaciones iniciales tienen el objetivo común de seleccionar las filas o columnas más disímiles en el conjunto de datos original **D** y proporcionan, como consecuencia, estimaciones iniciales de espectros o perfiles de concentración, respectivamente [28,33].

En el caso de SIMPLISMA, el algoritmo selecciona de manera secuencial las variables en la dirección de las filas o las columnas que poseen menor información en común [31,34]. Cuando se usan este tipo de métodos, en donde se seleccionan las variables más puras, se obtienen mejores estimaciones si la búsqueda se realiza en la dirección en donde existe información con menor grado de solapamiento.

La etapa de minimización mediante ALS permite la introducción de una serie de restricciones, las cuales se pueden aplicar tanto a los perfiles de **C** como a los espectros contenidos en **S**, de manera conjunta o independiente.

El procedimiento mediante MCR-ALS incluye los siguientes pasos [35]:

- 1- Determinación del número de componentes de **D**.
- 2- Generación de las estimaciones iniciales.
- 3- Cálculo de **S^T** bajo restricciones.
- 4- Cálculo de **C** bajo restricciones.
- 5- Generación de **D** a partir del producto de **C** y **S^T**.
- 6- Repetición del paso 3 hasta alcanzar la convergencia.

Entre las posibles restricciones para aplicar durante la minimización por ALS se encuentran [36-38]:

- No negatividad: evita la presencia de valores negativos en los perfiles. Esta restricción se aplica a los perfiles de concentración y espectrales UV-Vis y de fluorescencia, ya que se espera que sus valores sean siempre positivos.
- Unimodalidad: fuerza los datos a la presencia de un único máximo en el perfil de una especie. Se aplica a procesos en donde los perfiles dependientes de la concentración muestran una forma de aparición-desaparición. En cromatografía, por ejemplo, se espera que cada pico corresponda a una única especie.
- Cierre (balance de masa): se relaciona con ecuaciones de balance de masa en sistemas cerrados. Se aplica cuando la concentración total de las especies detectables en cada etapa del proceso es constante, pudiéndose fijar a un valor único o variable.

- Trilinealidad: es la restricción de tres vías más esencial, ya que, cuando se aplica, asegura que los resultados sean únicos.
- Correspondencia entre especies: se aplica en el caso del análisis de varias matrices de manera simultánea. Fija la presencia o ausencia de un componente en una matriz particular.

La Figura 1 muestra en forma esquemática en qué consisten las restricciones de no negatividad, unimodalidad y cierre.

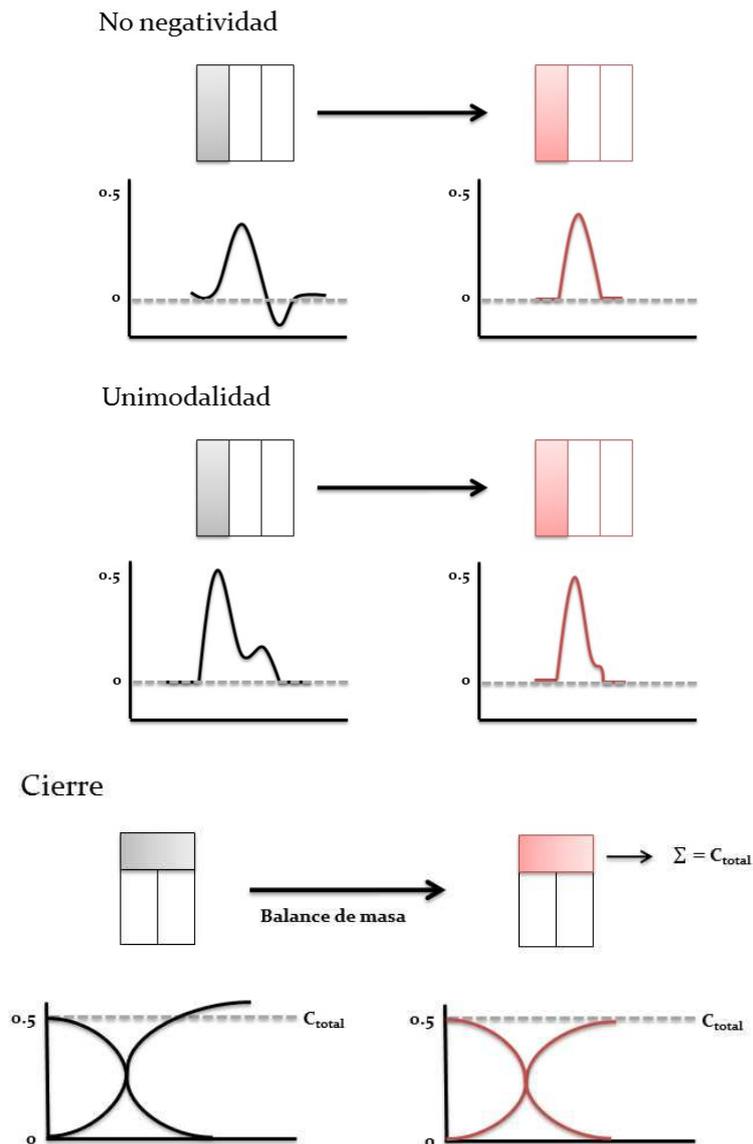


Figura 1. Visualización gráfica de las restricciones más utilizadas en MCR-ALS: no negatividad, unimodalidad y cierre. Los perfiles en negro y en rojo corresponden a los resultados obtenidos sin la aplicación de restricciones y luego de las restricciones, respectivamente.

Una vez finalizado el proceso de optimización, los resultados se observan como perfiles de concentraciones, perfiles espectrales y calidad del ajuste del modelo (varianza explicada o falta de ajuste) [28,33]. Para fines cuantitativos, luego de la descomposición de **D** mediante MCR-ALS, la

información de concentración de los analitos contenida en **C** puede utilizarse para realizar predicciones. Esto se efectúa construyendo un gráfico de calibración pseudounivariada con las concentraciones relativas de las muestras de calibración contenidas en la matriz optimizada **C**. Entonces, dado un componente de interés particular, se seleccionan los elementos de **C** correspondientes a las *l* mezclas de calibración desde $C_{1,n}$ hasta $C_{lK,n}$. Entonces, cada serie de valores *K* corresponden, para una muestra en particular, al perfil en la dimensión temporal (tiempos de elución). Si el área bajo el perfil es proporcional a la concentración del componente, se construye un modelo según:

$$\left\{ \sum_{k=1}^K C_{kn} \mid \sum_{k=1}^K C_{(k+K)n} \mid \dots \dots \mid \sum_{k=1}^K C_{[k+K(I-1)]n} \right\} = k_{MCR} \mathbf{Y} \quad (6)$$

donde la sumatoria de cada grupo de *K* elementos de **C** corresponden a un componente en particular en una muestra de calibración dada, e **y** es el vector de las concentraciones de calibración.

Mediante la interpolación de los valores provistos por la muestra desconocida puede obtenerse la concentración del analito de interés y_u , es decir:

$$y_u = \frac{\sum_{k=1}^K C_{(k+IK)n}}{k_{MCR}} \quad (7)$$

1.5. Optimización

El desarrollo de un método analítico involucra una gran variedad de factores los cuales tienen la potencialidad de afectar el rendimiento de los resultados. Por lo tanto, es habitual que para el análisis de muestras complejas se requiera la aplicación de un procedimiento de optimización que permita obtener la mejor combinación de variables experimentales, con el fin de maximizar las respuestas en estudio. En la actualidad, para mejorar el rendimiento de un proceso, el investigador puede realizar la optimización de múltiples factores de forma simultánea mediante el uso de la metodología de superficie de respuesta (RSM, del inglés *response surface methodology*).

La RSM utiliza una serie de técnicas matemáticas y estadísticas para la construcción de un modelo que responda al ajuste de los datos experimentales [39]. A modo sintético, el modelo seleccionado debe ser capaz de describir de forma adecuada el comportamiento de los datos con el objetivo de realizar predicciones estadísticas. Entonces, cuando las respuestas dependen de varios factores se puede realizar la optimización simultánea de los niveles que deben alcanzar las variables [40]. Por estas razones, para modelar la curvatura del sistema y obtener mejores resultados cada factor debe estudiarse en varios niveles.

A nivel práctico, cuando se construye un modelo se busca que se cumplan ciertas condiciones, como, por ejemplo, que proporcione un buen ajuste de los datos y una estimación del error, que no requiera demasiados niveles para cada factor, que sea fácil de interpretar y llevar a cabo

experimentalmente, que asegure la posibilidad de calcular todos los coeficientes requeridos para el modelo, que sea robusto frente a la presencia de resultados anómalos (*outliers*), que no requiera un número elevado de experimentos y que tenga rotabilidad, es decir, que posea la propiedad de predecir las respuestas con una variancia que sea sólo función de la distancia del punto experimental al centro del diseño y no de la dirección, entre otras [41].

En general, los diseños de experimentos pueden separarse, según sus características, en dos grandes grupos: diseños de *screening* y de optimización. Dentro de esta clasificación, en la presente tesis se utilizaron:

- 1- *Diseños de screening*: permiten el análisis de factores con el objetivo de seleccionar los que influyen en las respuestas seleccionadas, es decir, generalmente se utilizan en los pasos de selección de factores. En este grupo se encuentran los diseños factoriales fraccionados (FFD, del inglés *fractional factorial design*) y diseño *Plackett-Burman*.
- 2- *Diseños de optimización*: permiten obtener datos experimentales que luego pueden ser modelados con el propósito de caracterizar una superficie de respuesta y, mediante la optimización, encontrar los valores que deben tener los factores para que las respuestas lleguen a su óptimo. Dentro de esta clasificación se encuentran el diseño central compuesto (CCD, del inglés *composite central design*) y el diseño de mezclas.

Como se comentó previamente, los diseños factoriales se utilizan ampliamente en las primeras etapas del desarrollo analítico, en las que se desea definir el número de factores influyentes en el sistema. En el desarrollo de estos diseños existe la opción de realizar un fraccionamiento donde se efectúan solo un subconjunto de los experimentos incluidos en un diseño completo. Estos diseños son una opción de elección cuando los recursos son limitados o el número de factores incluidos en el diseño es grande. Para lograr un diseño fraccionado de un diseño factorial 2^k se debe escoger un bloque que sea una fracción de $1/p$ del total de combinaciones de los tratamientos (con $p < k$), por lo que se utiliza la simbología 2^{k-p} para designar un experimento fraccionado. En estos diseños se eligen p generadores independientes y se obtienen k factores a 2 niveles cada uno.

Por su parte, el diseño central compuesto incluye distintas clases de puntos dentro del dominio experimental: puntos factoriales (p_f), puntos en los niveles correspondientes (-1) y (+1), puntos axiales o puntos estrellas (p_e) (para modelar la curvatura con respecto a cada factor) y puntos centrales (p_c). Para poder modelar y obtener valores de falta de ajuste generalmente se realizan réplicas del punto central. El número de experimentos es $2^k + 2k + p$, y cada factor se encuentra en cinco niveles.

Durante el desarrollo de un método analítico, se debe recordar que cuando los factores estudiados son componentes de una mezcla, sus niveles no son independientes uno del otro. En

estas situaciones se recurre al uso de diseños de mezclas [41], en los que el dominio es una figura regular que tiene tantos vértices como componentes [42,43]. A modo ilustrativo, la representación gráfica correspondiente a un diseño para tres componentes es un triángulo equilátero cuyos vértices corresponden al 100% de uno de los componentes. Para evaluar el efecto de los factores correlacionados en la respuesta deseada, en general se usan diseños de mezclas como el diseño de mezclas *simplex lattice* (SLD, del inglés *simplex-lattice design*). En SLD, se supone que la respuesta medida depende sólo de la proporción de los constituyentes presentes en la mezcla, y la suma de todas las proporciones de los factores es siempre igual a la unidad [44,45].

Una vez obtenidas las respuestas correspondientes a los puntos del diseño y luego de modelar cada una de ellas, para encontrar las condiciones óptimas se recurre a la denominada “función de deseabilidad de Derringer” [40]. Con este propósito, primero se crea una función deseabilidad parcial (d_i) para cada respuesta, utilizando los modelos que mejor describen las respuestas y estableciendo los criterios de la optimización. En este momento, se definen los parámetros de optimización, es decir se decide si los factores o respuestas deben maximizarse, minimizarse, mantenerse en el rango o alcanzar un valor predeterminado. A su vez, con el fin de darle la importancia necesaria, teniendo en cuenta las características del sistema y el objetivo final, se aplica a cada parámetro un peso (w_i) o énfasis. Finalmente, se obtiene una función “Deseabilidad Global” (D) utilizando:

$$D = (d_1^{r_1} \times d_2^{r_2} \times \dots \times d_n^{r_n})^{\frac{1}{\sum r_i}} = (\prod_{i=1}^n d_i^{r_i})^{\frac{1}{\sum r_i}} \quad (8)$$

donde n es el número de variables incluidas en el proceso de optimización y r_n es la importancia relativa de cada factor o respuesta con respecto a las otras.

De esta manera, se puede obtener una serie de combinaciones de los factores que cumplen con los requisitos previamente establecidos.

1.6. ¿Cómo aplicamos los principios de la “química verde” durante el proceso analítico?: utilizamos técnicas de extracción eco-compatibles

En la década del 90 el avance de la “química verde” comenzó a sembrar incertidumbre en el ámbito científico debido a la cantidad de desperdicios químicos que los métodos generaban [46].

En la actualidad, los investigadores pueden disminuir el impacto negativo de los métodos analíticos si se realizan cambios con el objetivo de:

- 1- reducir la cantidad de solventes orgánicos requeridos en el pretratamiento de las muestras,
- 2- reducir la cantidad y los solventes tóxicos empleados durante la medición, especialmente mediante la automatización y miniaturización, y

- 3- desarrollar metodologías analíticas alternativas que no requieran solventes o reactivos contaminantes.

Durante el desarrollo experimental, uno de los inconvenientes que los analistas deben enfrentar es el preprocesamiento de la muestra. La preparación de la muestra es la tarea más complicada y en donde, por lo general, se consume la mayor cantidad de tiempo y reactivos. Durante la etapa de preprocesamiento, las principales razones para realizar una extracción son preconcentrar la muestra, eliminar sustancias interferentes y mejorar los límites de detección [47].

Con el avance de la “química verde”, se volvió indispensable el desarrollo de nuevas técnicas de extracción. Hoy contamos con diversas técnicas que siguen este lineamiento, las cuales utilizan microondas [48-50], fluidos supercríticos [51,52], extracción en fase sólida con variantes de miniaturización [53-55] y una gran variedad de extracciones líquido-líquido [53,56]. En 2006, Assadi y colaboradores [57] desarrollaron el método de microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME, del inglés *dispersive liquid-liquid micro-extraction*). Este método se basa en un sistema terciario de solventes en los que tanto el solvente de extracción inmiscible en agua mezclado con el solvente dispersivo son inyectados rápidamente en las soluciones acuosas por medio de una jeringa o micropipeta. En la mezcla se forma una solución turbia o microemulsión inestable (agua/solvente dispersivo/solvente extractante), y debido a la gran superficie de contacto entre las dos fases inmiscibles se consigue una gran eficiencia en un tiempo relativamente corto [57-59]. Entre las ventajas de esta técnica se incluyen simplicidad, una rápida extracción y un factor de enriquecimiento alto [60,61].

En este punto, es importante recalcar que tanto la naturaleza del analito como la de la matriz de la muestra determinan las técnicas de separación y detección a implementar.

En la actualidad, existen un sinnúmero de variantes, en las que, por ejemplo, la dispersión puede asistirse mediante ultrasonido, agitación utilizando vórtex o corrientes de aire, o utilizando solventes de características especiales. Entre estas variantes, se destaca la microextracción dispersiva líquido-líquido con solidificación en una gota (DLLME-SFO, del inglés *dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop*), en la que, a diferencia de la metodología DLLME, el solvente extractante solidifica a una temperatura definida, permitiendo su separación del sistema mediante una cuchara, y la microextracción dispersiva líquido-líquido asistida por aire (AA-DLLME, del inglés *air assisted-dispersive liquid-liquid microextraction*), en la que una corriente de aire permite la interacción continua entre el solvente extractante y los analitos, aumentando de esta manera la superficie de contacto[62].

1.7. Desafíos a vencer: objetos de estudio y su problemática medioambiental

En la actualidad, muchas áreas de las Ciencias Biológicas hacen uso de métodos analíticos para determinar analitos (biomarcadores, productos de degradación, etc.), los que se encuentran inmersos en muestras de composición compleja y, en muchos casos, en niveles de concentración bajos. Por esta razón, existe una demanda continua de métodos analíticos que generen datos fehacientes, con el objetivo de obtener resultados de calidad que permitan solucionar los problemas analíticos planteados.

Dentro de este ámbito, debido a la amplia necesidad de métodos que permitan determinar trazas de principios activos de uso veterinario y biomarcadores, la química analítica puede aportar herramientas necesarias para hacer frente a estos problemas. Como sistemas, la utilización masiva de agroquímicos, como así también de conservantes y principios activos de uso veterinario, demuestran la necesidad de un avance en la legislación regulatoria, garantizando la seguridad de la población; cambio que debe ir de la mano del desarrollo de métodos analíticos [63,64].

Entre los contaminantes ambientales, en la actualidad, el uso creciente de glifosato ha generado preguntas, en particular centradas en el análisis de los efectos que la exposición a este compuesto podría causar en diversas vías metabólicas de la fauna circundante.

En bibliografía se pueden encontrar trabajos que demuestran la influencia que generan los agroquímicos en el ecosistema. Entre los efectos observados se destaca el trabajo de Bérubé y colaboradores [65], donde se relaciona la declinación en el número de anfibios y el aumento en las malformaciones con estresores ambientales que interrumpen las vías reguladas por retinoides. Por su parte, el estudio *in vitro* de Paganelli y colaboradores [66] permitió dilucidar que, luego de la exposición a glifosato, existen desbalances en las concentraciones de ácido retinoico en animales. Entre los efectos teratogénicos observados en vertebrados se pueden citar malformaciones craneofaciales, además de acortamiento del tronco embrionario [66,67].

Debido a los datos recolectados, y teniendo en cuenta que hasta la fecha se desconoce si estos efectos pueden observarse en personas expuestas y sus descendientes, resulta de suma importancia monitorizar las concentraciones de retinoides. En este sentido, se debe contar con métodos de análisis rápidos y confiables, con el fin de estudiar estos compuestos en plasma.

Por su parte, el uso de principios activos de uso veterinario es una tarea cotidiana durante la crianza intensiva de una variedad de animales de granja [68]. En general, estos compuestos pueden utilizarse para diversos propósitos; por ejemplo, para controlar enfermedades o como promotores de crecimiento [69]. Dentro de los sistemas intensivos de crianza, la industria avícola es una de las más grandes del país, y, entre los productos derivados de esta industria, los huevos son los más comercializados, debido a su bajo costo y versatilidad. A su vez, dada su composición, constituyen una comida nutricionalmente completa, aportando proteínas, lipoproteínas, vitaminas y minerales [68].

Debido al alto crecimiento de la industria, los productores se enfrentan a una serie de problemas ambientales complejos y difíciles de afrontar, muchos de ellos relacionados con el tamaño de estos sistemas productivos, y, por ende, con las grandes cantidades de estiércol generado [70]. Para abordar esta problemática, los productores mezclan las heces con materiales tales como virutas de madera, cáscaras de arroz, aserrín y paja, junto con el alimento que no ha sido consumido, formando lo que se conoce comúnmente como cama de pollo [71,72]. Normalmente, este producto se utiliza como barrera aislante entre las aves y el suelo [73], como fertilizante orgánico [74] o para la producción de biogás [70,72].

En estos sistemas, un problema en aumento es la aparición de principios activos en tejidos y desechos biológicos, como, por ejemplo, huevo, heces y orina, debido a que hasta el momento no se conoce a ciencia cierta el impacto que estos compuestos pueden tener en las personas y el medioambiente circundante [75].

A nivel regulatorio, para poder controlar la inocuidad de un alimento, la Comisión del Codex Alimentarius (comisión creada por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud) establece límites máximos de residuos (MRL, del inglés *maximum residue limits*), que especifican la concentración máxima de residuos permitida en un alimento de origen animal de manera de garantizar que sean saludables y puedan comercializarse [76]. Dentro de las normativas, casos extremos son los compuestos potencialmente cancerígenos, genotóxicos o inmunotóxicos, donde se implementa una tolerancia cero. Por lo tanto, muchos países monitorizan los niveles de estos compuestos en los productos de origen animal [68].

Independientemente de las definiciones del Codex, cada país posee su propio código y sus propios MRL. En nuestro país, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) establece y ejecuta las medidas necesarias para mantener la inocuidad de los alimentos [77]. En este contexto, el avance en las normativas con el fin de mantener la seguridad alimenticia genera la necesidad de contar con métodos fáciles de implementar, que permitan alcanzar límites de detección y cuantificación cada vez menores.

Por lo antes expuesto, resulta necesario contar con métodos analíticos confiables que permitan cuantificar tanto ácido retinoico como principios activos de uso veterinario en diversas matrices. El uso cotidiano de estos métodos permitiría realizar un monitoreo constante de los analitos, con el fin de coordinar esfuerzos y delimitar la posible influencia que poseen, tanto en la fauna circundante como en los seres humanos.

1.8. Validación de métodos y descripción de propiedades analíticas

Validar un método es documentar su calidad, para lo que es necesario verificar experimentalmente que dicho procedimiento cumple con los criterios establecidos. En el momento

de validar un método se pueden analizar diferentes propiedades analíticas, y su selección depende de los requisitos que el operador le impone al método. Entre ellas podemos encontrar:

- 1- precisión o incertidumbre, que describe la magnitud de los errores aleatorios;
- 2- exactitud o sesgo, que establece la magnitud de los errores sistemáticos,
- 3- límite de detección y cuantificación;
- 4- intervalo dinámico o intervalo de concentración en el que es posible establecer un modelo de calibración;
- 5- selectividad, que indica hasta qué punto es posible aislar la señal debida al analito de las señales debidas a otros componentes de la muestra; y
- 6- robustez experimental, que es la sensibilidad de la señal frente a pequeñas modificaciones de las condiciones experimentales.

Dentro de las propiedades antes mencionadas, la calibración es una de las más importantes. Realizar la calibración de un método implica caracterizar la respuesta de un instrumento en función de las propiedades de un analito o un grupo de analitos. Es decir, se basa en establecer una relación inequívoca entre la señal y la concentración de la sustancia en estudio [78]. En sistemas complejos, a la hora de establecer esta relación, surgen inconvenientes que dependen tanto del analito en estudio, de la muestra y del procedimiento de pretratamiento. Por estas razones existen diferentes criterios de calibración, que se pueden diferenciar por la cantidad de niveles de concentración analizados, la forma de preparar los estándares, el tipo de estándares utilizados, la estructura de los datos y los tipos de algoritmos utilizados [79].

Con respecto a la estructura de los datos, la calibración univariada puede aplicarse siempre y cuando se haya demostrado (en el estudio de selectividad) que la señal medida es específica del analito y no existen interferencias.

Luego de obtener los datos, el analista debe poder construir un modelo de regresión y verificar la adecuación del método [80-82]. Una manera de medir el ajuste del método es a través de la relación que existe entre la varianza de la regresión y la varianza del ruido instrumental. La prueba estadística que se utiliza para determinar la falta de ajuste al modelo lineal es la prueba F de una cola, en la que se calcula un valor "experimental" de F , dado por:

$$F_{exp} = \frac{(s_{y/x})^2}{(s_y)^2} \quad (9)$$

donde s_y es el ruido instrumental dado por:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^r (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{m-p}} \quad (10)$$

donde m es el número de datos de la recta, p es el número de niveles de concentración estudiados, r es el número de réplicas en cada punto, y_{ij} es la respuesta correspondiente a cada punto en el nivel i y la réplica j , \bar{y}_i es el promedio de las respuestas de las réplicas para un mismo nivel. El valor F calculado se compara con el de tabla para $m - 2$ y $m - p$ grados de libertad, y un determinado nivel de confianza. Si $F_{exp} < F_{tab}$ se acepta que los datos se comportan linealmente.

Para que esta prueba F sea válida es necesario corroborar con anterioridad que se verifiquen dos condiciones. Por un lado, los errores de las concentraciones de los calibradores deben ser menores que los errores de las respuestas, lo que debe asegurarse preparando soluciones estándares con poca incertidumbre; en segundo lugar, debe cumplirse la homocedasticidad de los datos, que puede verificarse mediante otra prueba F para comparación de las varianzas de los niveles extremos del rango de calibración. Si estas varianzas son comparables, se acepta la homocedasticidad de los datos. Otro estudio pertinente es la inspección visual de la gráfica de distribución de los residuos en función de los niveles de calibración. Una distribución aleatoria de los residuos en torno al cero indica homocedasticidad. Esta gráfica también es útil para detectar puntos anómalos y puntos niveladores, así como tendencias de distribución que indican falta de linealidad.

Por su parte, la exactitud se define como “el grado de concordancia entre el resultado de una medida y el valor verdadero de la cantidad que se ha medido”. Un problema básico en los estudios de exactitud es conocer con confianza el “valor verdadero”. En este sentido, para evaluar la exactitud de un método existen varias alternativas: se pueden comparar los resultados obtenidos por el método en desarrollo con los resultados obtenidos por un método de referencia; o se pueden comparar los resultados obtenidos entre laboratorios, o emplear materiales de referencia certificados [78]. A nivel de expresión de resultados, existen varios términos que caracterizan la exactitud de un método: veracidad, sesgo y recuperación [81]. Para determinar la exactitud de un método, se pueden analizar los resultados mediante una prueba t :

$$t = \frac{|100 - \bar{R}|}{s_R} \sqrt{n} \quad (11)$$

donde \bar{R} es el promedio de las recuperaciones en cada nivel, s_R es la desviación estándar de la recuperación y n es el número de réplicas en cada nivel.

De esta manera, se calcula un valor de t experimental con $n - 1$ grados de libertad y un nivel de confianza determinado, y se compara con el valor de t de tabla [82].

Es importante remarcar, que aunque durante la validación de un método no resulte común realizar un estudio de robustez, resulta de suma importancia verificar este parámetro en casos donde la resolución de los analitos es crítica. El objetivo del estudio es evaluar la influencia de pequeños cambios en las condiciones experimentales, y analizar cómo estos cambios afectan a las respuestas [83,84].

1.8.1. Cifras de mérito

Un paso importante en el desarrollo de un método analítico es el estudio de las cifras de mérito, parámetros que califican a un método y permiten la comparación de sus propiedades con las de otros.

Dentro de las cifras de mérito se encuentran:

- Sensibilidad (SEN), correspondiente a la pendiente de la curva de calibrado: $SEN = a$
- Sensibilidad analítica (γ), y su inversa (γ^{-1}) que tiene unidades de concentración, correspondiente al cociente entre la sensibilidad de calibración y la desviación estándar de la medida, la que permite comparar los resultados obtenidos con diferentes técnicas: $\gamma = SEN/s_y$
- Límite de detección (LOD, del inglés *limit of detection*), correspondiente a la menor concentración de analito que puede detectarse en una muestra, pero no necesariamente cuantificarse, en las condiciones establecidas.
- Límite de cuantificación (LOQ, del inglés *limit of quantification*), correspondiente a la menor concentración de analito que puede cuantificarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas.

Los LOD y LOQ son parámetros importantes en el desempeño de un método, ya que se utilizan tanto para caracterizar el método analítico como para poder interpretar los resultados. Actualmente, aunque la comunidad científica tiene en claro la importancia que estos revisten, no existe consenso en la manera de estimarlos.

En este sentido, existe una variedad de normativas y metodologías que permiten al investigador calcular los límites mencionados. Dentro de estos procedimientos existen complejidades diferentes que dependen no solo del sistema, sino también de la metodología en sí. Muchas publicaciones científicas tratan de aclarar estas confusiones, dando recomendaciones sobre diferentes enfoques para la realización de los cálculos, revisando aspectos fundamentales de cada estimación o sugiriendo nuevas formas de realizarlas. A nivel regulatorio, podemos hallar una gran diversidad de guías propuestas por organizaciones internacionales, que a menudo tienen diferentes puntos de vista sobre las estimaciones (e incluso en algunos casos sobre el significado) de los LOD y LOQ. Esto, deja espacio a interpretaciones subjetivas, y, por sobre todo, se pueden extraer malas conclusiones sobre las capacidades reales que pueden tener los métodos analíticos y los resultados deseados [85-87]. Una forma común de determinar esta propiedad es utilizando la relación señal ruido (S/N), en donde la concentración del LOD se define como la concentración de analito que genera una señal tres veces superior al nivel de ruido ($S/N = 3$) [88,89]. Para poder realizar este cálculo, en una primera instancia, se determina el nivel de ruido del instrumento. En el caso de los

métodos cromatográficos se debe tener en cuenta el ruido generado por el instrumento, el solvente de inyección y la matriz de la muestra en el tiempo de retención del analito de interés.

Por otro lado, la IUPAC propone estimar el LOD por medio de la expresión [90,91]:

$$Y_{LOD} = Y_{blanco} + 3.3 s_{blanco} \quad (12)$$

donde Y_{LOD} es la respuesta generada por el LOD, Y_{blanco} es el promedio de la señal del blanco y s_{blanco} es su desviación estándar.

Una segunda forma de calcular el LOD, es a partir de la curva de calibrado usando la desviación estándar de la regresión (s_y) mediante la expresión [81,88]:

$$LOD = \frac{3.3 s_y}{b} \quad (13)$$

Otra metodología no muy usada es el cálculo del Método de Detección Límite (MDL, del inglés *method detection limit*), que se define como “la mínima concentración de una sustancia que puede ser identificada, medida e informada con un 99% de confianza de que la concentración del analito es mayor que cero y se determina a partir del análisis de muestras en una matriz que contenga al analito”. Entonces, el MDL se obtiene como:

$$MDL = t_{0.01;n-1} \times s \quad (14)$$

donde t es el valor de t -Student (de una cola) con $n - 1$ grados de libertad y un $\alpha = 0.01$ y s es la desviación estándar de n réplicas del estándar o la muestra con bajas concentraciones del analito. Para esta metodología, luego de la primera aproximación del MDL mediante la Ec. 14, se procede realizar una comprobación experimental, obteniendo una segunda desviación estándar. Posteriormente, se comparan las varianzas obtenidas en la primera aproximación y la posterior comprobación (s_A y s_B), mediante una prueba F :

$$F = \frac{s_A^2}{s_B^2} \quad (15)$$

En este punto se calcula una desviación estándar combinada como:

$$s_{pooled} = \left[\frac{(n_A-1)s_A^2 + (n_B-1)s_B^2}{(n_A-1) + (n_B-1)} \right]^{1/2} \quad (16)$$

El último paso en la determinación del MDL necesita del cálculo:

$$MDL = t_{[12,(1-\alpha)=0.99]} \times s_{pooled} \quad (17)$$

En esta determinación, el término “método de detección límite” resulta arbitrario, ya que el valor obtenido depende no solamente del método, sino también de la sensibilidad del instrumento, la naturaleza de las muestras y la habilidad del analista [92].

Por otro lado, para obtener los LOQ, el método de S/N permite determinar la concentración de analito que genera una señal de diez veces el nivel del ruido ($S/N = 10$) [88].

Mediante el criterio IUPAC [90] este parámetro puede estimarse usando la expresión $Y_{LOD} = Y_{blanco} + 10 s_{blanco}$

A su vez, el LOQ se calcula a partir de la regresión lineal, tal como se describió para el LOD, pero utilizando un factor igual a 10: $LOQ = \frac{10 s_y}{b}$

Otra metodología no tradicional para el cálculo del LOQ sigue las directrices de la guía EURACHEM. Por este medio, el LOQ se obtiene al analizar las desviaciones estándar de réplicas utilizando concentraciones decrecientes del analito, definiendo el valor de LOQ como la concentración de analito en la que el coeficiente de variación (CV%) no sobrepase un valor umbral definido en forma arbitraria por el analista, teniendo en cuenta la técnica utilizada para la determinación. Por ejemplo, en sistemas cromatográficos el valor de CV% se fija, generalmente, en 10% [93].

Con respecto a las estimaciones en sistemas multivariados se debe tener en cuenta que la SEN puede determinarse por el uso de la Ec. 18 [94]:

$$SEN = s_n \left\{ \delta_n^T \left[\mathbf{Z}_{cal}^T (\mathbf{I} - \mathbf{Z}_{unx} \mathbf{Z}_{unx}^+) \mathbf{Z}_{cal} \right]^{-1} \delta_n \right\}^{-1/2} \quad (18)$$

en la cual s_n es la pendiente de la curva pseudounivariada, δ_n es un vector columna (tamaño $N_{cal} \times 1$) con ceros excepto en la posición del analito de interés donde se pone un '1' (N_{cal} es el número de componentes, retribuidos por el algoritmo utilizado, presentes en el set de calibración), \mathbf{Z}_{cal} son los perfiles de los datos en el modo no aumentado para los componentes presentes en el set de calibración y \mathbf{Z}_{unx} son los perfiles de los datos en el modo no aumentado para los componentes no esperados presentes en el set de muestras. Cabe destacar que dependiendo del algoritmo utilizado existen variaciones en las descripciones de los componentes de la Ec. 18.

En este sentido, de acuerdo con Bauza y colaboradores [95], la expresión correcta para estimar la SEN cuando se aplica MCR-ALS es:

$$SEN_{MCR} = m_n [J(\mathbf{S}^T \mathbf{S})_{nn}^{-1}]^{-1/2} \quad (19)$$

donde n es el índice para el analito de interés en una mezcla de múltiples componentes, m_n es la pendiente de la gráfica de calibración pseudounivariada de MCR para este analito, \mathbf{S}^T es la matriz que contiene los perfiles de todos los componentes de la muestra en la dirección de MCR no aumentada, y J es el número de canales en la matriz de la muestra de validación en la dirección de aumento de MCR.

Por otra parte, se puede calcular la sensibilidad analítica (γ) según:

$$\gamma_n = SEN_n / \|\delta r\| \quad (20)$$

donde $\|\delta r\|$ es la medida del ruido instrumental, que puede estimarse a través del análisis estadístico de réplicas de una muestra blanco. Por su parte, su inversa (γ^{-1}) establece la mínima diferencia de concentración que el método puede discriminar estadísticamente a lo largo del rango dinámico, considerando como única fuente de error al ruido instrumental.

Entonces, en sistemas multivariados, el LOD se determina según:

$$\text{LOD} = 3.3 \sigma_0 (\text{SEN}^{-2} \sigma_x^2 + h_0 \text{SEN}^{-2} \sigma_x^2 + h_0 \sigma_{y_{\text{cal}}}^2)^{1/2} \quad (21)$$

donde h_0 es el efecto palanca de una muestra blanco y se obtiene de acuerdo a:

$$h_0 = \frac{1}{I_{\text{cal}}} + \frac{\bar{y}_{\text{cal}}^2}{\sum_{i=1}^{I_{\text{cal}}} (y_i - \bar{y}_{\text{cal}})^2} \quad (22)$$

Y el LOQ se obtiene mediante la Ec. 23:

$$\text{LOQ} = 10 (\text{SEN}^{-2} \sigma_x^2 + h_0 \text{SEN}^{-2} \sigma_x^2 + h_0 \sigma_{y_{\text{cal}}}^2)^{1/2} \quad (23)$$

Durante el presente trabajo de tesis los valores de LOD y LOQ se determinaron siguiendo diferentes metodologías y guías, con el fin de realizar una comparación entre ellas para concluir sobre su utilización teniendo en cuenta los sistemas en estudio.

2.



OBJETIVOS



OBJETIVOS GENERALES

- 1) Utilizar técnicas separativas (con detección de arreglo de diodos o fluorescencia de barrido rápido) y algoritmos quimiométricos de modelado y pretratamiento de señales para desarrollar estrategias analíticas globales destinadas a la determinación de residuos de antibióticos e indicadores de contaminación en muestras ambientales y biológicas.
- 2) Validar los métodos desarrollados por comparación de los resultados con los obtenidos por métodos de referencia.
- 3) Evaluar las ventajas relativas de los métodos desarrollados frente a los considerados de referencia en el análisis de especies químicas de origen farmacéutico de relevancia ambiental y marcadores de contaminación, con el objeto de desarrollar métodos de determinación rápidos, simples, con bajos límites de detección, con bajo impacto ambiental, alternativos a los existentes (generalmente basados en CLAR-MS), ventajosos por su accesibilidad y costo, y que puedan ser fácilmente implementados en laboratorios de control.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Generar datos de orden superior, empleando cromatografía líquida acoplada a detectores de arreglo de diodos y fluorescencia de barrido rápido, para ser aplicados a la determinación de: a) trazas de coccidiostatos en muestras biológicas y b) valores basales y de exposición del ácido retinoico en vertebrados como posible marcador de exposición al glifosato.
- 2) Aplicar algoritmos de preprocesamiento de la señal analítica para mejorar la calidad de los datos.
- 3) Investigar las propiedades de los algoritmos quimiométricos aplicables a datos de orden superior, con el objeto de contribuir al conocimiento de su estructura y habilidad para explotar la ventaja de segundo orden.
- 4) Aportar a la comunidad científica métodos eficientes de análisis, validados según normas internacionales, para su aplicación en áreas de interés agropecuario.

CAPÍTULO 1



ANÁLISIS DE ÁCIDO RETINOICO EN PLASMA. DESARROLLO DE MÉTODOS
CROMATOGRÁFICOS CON DETECCIÓN DE ARREGLO DE DIODOS

1.1. Objetivos:

- 1) Desarrollar métodos analíticos empleando cromatografía líquida con detección de arreglo de diodos para determinar ácido retinoico y sus isómeros en plasma.
- 2) Generar datos de orden superior y aplicar algoritmos quimiométricos para procesarlos.
- 3) Validar los métodos según normas internacionales, para su aplicación en áreas de interés.
- 4) Analizar plasmas de animales expuestos a agrotóxicos y evaluar la posible influencia de estos compuestos en la vía metabólica del ácido retinoico.
- 5) Analizar plasmas de pacientes en tratamiento con Isotretinoína Roaccutan para evaluar las concentraciones plasmáticas de los diferentes isómeros luego de la ingesta.

1.2. Introducción:

Al igual que muchos nutrientes, las vitaminas son compuestos químicos esenciales para el crecimiento y la salud de los individuos. Dentro de los complejos vitamínicos, la vitamina A participa en una serie de procesos regulatorios y, debido a que los animales son incapaces de sintetizar vitamina A de *novo* y deben incorporarla en la dieta, es indispensable la regulación de su ingesta diaria. La vitamina A ingresa al organismo como retinil ésteres o como provitamina A (carotenoides) dependiendo esta diferenciación de la fuente dietaria. Las principales fuentes son aceites de pescado, huevos, leche, manteca y plantas [96].

La vitamina A y sus derivados son compuestos solubles en grasas, por lo que se almacenan en el hígado y los tejidos adiposos como retinil ésteres y circulan en la sangre unidos a un complejo proteico [67].

Por su parte, a la familia de compuestos naturales o sintéticos estructuralmente relacionados con la vitamina A se los denomina normalmente retinoides, los cuales juegan un rol importante en una variedad de funciones biológicas tales como la visión, el desarrollo, la reproducción y la diferenciación celular [97]. Dentro de esta familia, el compuesto más estudiado es el ácido retinoico (RA, del inglés *retinoic acid*). La bioconversión de la vitamina A en RA tiene lugar, sucesivamente (ver Figura 2), primero en el intestino, luego en el hígado y finalmente en las células blanco con el apoyo de varias proteínas de unión [67].

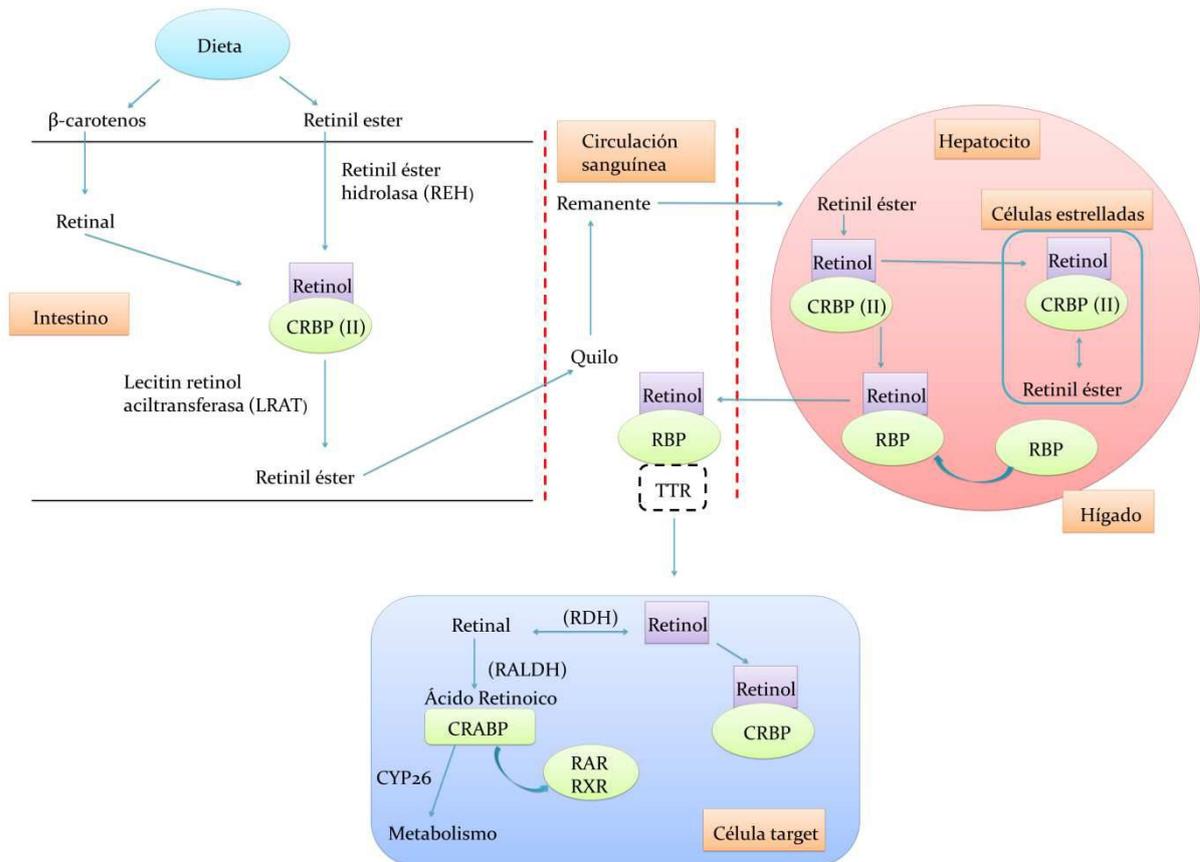


Figura 2. Conversión bioquímica de carotenos y retinoides para formar ácido retinoico (Figura modificada de Das y col., 2014). CRBP: proteína celular de unión a retinol; LRAT: lecitin-retinol aciltransferasa; RBP: proteína de unión a retinol; TTR: transtiretina; REH: retinil éster hidrolasa; RDH: retinol dehidrogenasa; RALDH: retinaldehído dehidrogenasa; RAR y RXR: receptores nucleares.

Independientemente del proceso, en la biotransformación de vitamina A en RA intervienen una serie de enzimas y proteínas de unión, las que permiten que en el intestino se formen, en primera instancia, los retinil ésteres, los cuales viajarán vía sanguínea al hígado para dar origen al precursor principal del RA, el retinol (ROH). Este compuesto puede transformarse en el hígado en el RA o ir a la circulación e incorporarse en las células blanco donde se transforma en RA. Por esta razón, en la circulación pueden encontrarse tanto el RA como el ROH y posiblemente una serie de isómeros de estos compuestos [67,98-100].

Como muchos compuestos, el RA puede sufrir diferentes isomerizaciones. En este sentido, existe como diferentes formas estereoisoméricas, predominando las formas *all-trans*-RA y *13-cis*-RA, aunque también se puede encontrar su forma menos estable, el *9-cis*-RA. *In vitro*, estos isómeros se generan fácilmente en presencia de luz y calor excesivo. En la naturaleza, el RA es el compuesto termodinámicamente más estable y es el principal isómero [101].

Aunque los pasos enzimáticos responsables de la formación de *all-trans*-RA están descritos en forma precisa (Figura 2), poco se conoce sobre la formación del *9-cis*-RA en células y tejidos. *In vivo*, el *9-cis*-RA puede formarse por tres vías enzimáticas posibles. Estas vías incluyen: (1) oxidación

enzimática secuencial del 9-*cis*-ROH al 9-*cis*-RA, una vía similar a la oxidación del all-*trans*-ROH al all-*trans*-RA, (2) la oxidación del 9-*cis*-retinal generado por el clivaje del 9-*cis* β -carotenos, y (3) la isomerización del all-*trans* retinoides a los 9-*cis* isómeros [102].

En la naturaleza, los isómeros más importantes en las vías de señalización son el all-*trans*-RA y el 9-*cis*-RA, los cuales poseen receptores nucleares específicos; el RAR para el all-*trans*-RA y el RXR para el 9-*cis*-RA. En la actualidad se sabe que, a nivel molecular, el RA regula la expresión de una variedad de genes, mientras que sus isómeros exhiben afinidades diferenciales por estos receptores. Así, el 9-*cis*-RA posee alta afinidad por su receptor específico el RXR, mientras que el 13-*cis*-RA no se une bien a esta clase de receptores y posee una afinidad 100 veces menor que el RA o el 9-*cis*-RA [101].

Una vez dentro de las células blanco, el RA se comporta como un morfógeno, es decir un activador transcripcional que juega un rol fundamental en la regulación de la diferenciación neuronal durante el desarrollo [103]. El RA regula numerosos procesos tanto en el desarrollo embrional y morfológico, como en la homeostasis de los tejidos adultos, la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. Por esta razón, debido a sus efectos pleiotrópicos, la acción del RA deber ser fuertemente regulada a nivel espacial y temporal, a través de acciones coordinadas de biosíntesis y degradación enzimática [104].

En anfibios, los desbalances en las concentraciones de RA y sus isómeros generan un gran rango de anormalidades, incluyendo defectos en el sistema nervioso central, ojos, cara, dientes, oídos, extremidades, sistema urogenital, pulmones, corazón y defectos en el arco aórtico, lesiones dérmicas, cambios en las características sexuales secundarias, susceptibilidad a enfermedades, inmunosupresión, inhibición de la espermatogénesis, deformidades, desarrollo embrionario anormal, y un número de efectos sobre la reproducción [65,103,105]. Aunque se tiene conocimiento sobre el efecto que generan los desbalances de los retinoides en los individuos, todavía no se tiene certeza de las causas que ocasionan estos cambios, aunque existen evidencias de que en la fauna silvestre, la homeostasis de los retinoides se ve afectada por ciertos pesticidas [65]. Como ejemplo, se han observado concentraciones anormales de ROH en aves expuestas a agrotóxicos, dejando planteado el interrogante de qué punto de la vía metabólica se ve afectado durante o luego de la exposición [106,107].

A nivel ambiental, los agrotóxicos escurren a los cuerpos de agua más cercanos, generando problemas en los ecosistemas nativos, en especial en la fauna circundante, por lo que los anfibios pueden resultar sensibles a estos compuestos, principalmente durante los estadios acuáticos de embriogénesis y larval [108-110]. Por esta razón, durante la presente tesis se determinaron las concentraciones de RA y sus isómeros en plasmas de *Leptodactylus chaquensis*, pertenecientes a dos sitios de muestreo; un sitio de actual actividad agrícola y uno control.

Como se comentó previamente, el 13-*cis*-RA no es un compuesto activo *per se*, sin embargo, este isómero es efectivo cuando se administra en grandes dosis farmacológicas, induciendo las respuestas mediadas por retinoides especialmente en condiciones dermatológicas. Entonces, se piensa que muchas de las acciones del 13-*cis*-RA son mediadas por el all-*trans*-RA, o posiblemente por el 9-*cis*-RA, luego de su isomerización [111]. Es decir, el 13-*cis*-RA funciona como una prodroga, generando RA vía isomerización, aunque no se excluye otro mecanismo de acción [101]. A su vez, las acciones teratogénicas del 13-*cis*-RA se asocian a la posibilidad que posee el compuesto de activar enzimas claves del proceso lipídico y de la regulación redox [101].

En el campo dermatológico, para tratar desórdenes dermatológicos severos se administran análogos sintéticos del all-*trans*-RA, el 13-*cis*-RA y el 9-*cis*-RA, pero debido a que los retinoides son compuestos tóxicos y teratogénicos en grandes dosis, se deben realizar controles exhaustivos sobre los pacientes en tratamiento. Actualmente, se administran análogos del 9-*cis*-RA para combatir ciertos tipos de psoriasis [97], y análogos del RA y el 13-*cis*-RA para el tratamiento de acné, psoriasis, cáncer de piel, fotoenvejecimiento, la regulación del crecimiento y la diferenciación de las células epiteliales, la producción de cebo y la síntesis de colágeno [112,113].

A nivel fisicoquímico, los isómeros del RA son isobáricos y poseen espectros de absorción similares, y, por lo tanto, la detección por espectrometría de masa y/o detección a una longitud de onda única no permite la distinción entre los isómeros si existe coelución. Por esta razón, la determinación requiere como mínimo una separación temporal entre los compuestos que compartan características [114].

Durante el desarrollo de un método analítico, una de las dificultades es optimizar en forma conjunta la fase móvil de un sistema cromatográfico con otros parámetros. Es decir cuando estamos en presencia de un sistema con componentes dependientes, en los que la suma de los porcentajes de la fase móvil no debe exceder el 100%. En estos casos, la alternativa propuesta por Morris y colaboradores resulta interesante [115], debido a que la composición de la fase móvil se describe como coordenadas esféricas. Entonces, la cantidad y composición del modificador orgánico para un sistema ternario puede expresarse como:

$$r^2 = r^2 \sin \theta + r^2 \cos \theta \quad (25)$$

donde cada término en esta ecuación representa uno de los solventes orgánicos en la fase móvil y r^2 es la cantidad total de los solventes orgánicos. Es decir, la Ec. 25, describe un círculo en el plano xy, que permite representar la relación entre el solvente y la fase móvil usando solo dos parámetros, r y θ , el radio del círculo y el ángulo, respectivamente.

De acuerdo con esto, la composición de una fase ternaria puede calcularse definiendo los solventes a utilizar como: fase acuosa = $1 - r^2$, A (solvente orgánico 1) = $r^2 \cos \theta$ y B (solvente orgánico 2) = $r^2 \sin \theta$.

De esta manera se pueden considerar a los componentes r^2 y θ como factores (k) dentro de un CCD, pudiéndose analizar la composición de la fase móvil con otros parámetros cromatográficos, y de esta manera superar la “dependencia de volumen” de los solventes.

La medición de analitos y la validación de métodos bioanalíticos en matrices biológicas (como plasma, suero, sangre, orina y saliva) es un aspecto importante del desarrollo de productos medicinales. En este sentido, la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos perteneciente a la Agencia Europea de Medicina es una de las guías más utilizadas, en la que se recomiendan los pasos a seguir y los parámetros a determinar en la validación de un método [116].

La validación de un método bioanalítico es relativamente sencilla si se cuenta con una matriz libre del analito de interés y de un estándar del analito. En este sentido en sistemas con analitos endógenos, resulta difícil, aunque no imposible, obtener muestras de matrices libres de analito o con una concentración de analito conocida. Entonces, las muestras de referencia, como las utilizadas para construir la curva de calibrado y las muestras control, pueden prepararse fácilmente mezclando alícuotas de matriz libre de analito con concentraciones conocidas de estándar de referencia [117]. Sin embargo, en el desarrollo experimental del presente capítulo, al ser el RA un compuesto endógeno, la determinación cuantitativa es más complicada.

Hasta el día de la fecha, no existen guías oficiales que se ocupen de la validación de métodos cromatográficos para analitos endógenos. En general, las existentes para compuestos farmacéuticos y xenobióticos se han adaptado para compuestos endógenos. Por esta razón, algunos autores aplican los métodos validados para la determinación de drogas, emitidos por entes internacionales como la US FDA [118].

En el presente trabajo de tesis, en la etapa de validación, se siguió la propuesta de Schmidt y colaboradores [119], que incluye la obtención del área del analito en la muestra basal y, posteriormente, la resta de esta información a cada muestra adicionada, evitando así errores relacionados con el cálculo de la concentración basal.

1.3. Metodología

1.3.1. Aparatos y software

Todos los experimentos se realizaron en un cromatógrafo líquido Agilent serie 1100 equipado con una bomba cuaternaria, membrana desgasificadora, compartimento de columna termostatzado, inyector automático y detector de arreglo de diodos (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania).

Los cromatogramas se registraron a 350 nm, obteniéndose los espectros en un rango de 200 a 500 nm. Para la adquisición y el procesamiento de los datos se utilizó la versión B 0103 del programa Chemstation.

Todos los algoritmos se implementaron en MATLAB 7.10 [120]. Aquellos para aplicar MCR-ALS están disponibles en internet en <http://www.mcrals.info/>. Para los diseños experimentales, el modelado de la superficie de respuesta y el cálculo de la función deseabilidad se utilizó el programa Stat-Ease Design-Expert 8.0.0 [121]. Para el análisis estadístico se utilizó Minitab® 16.2.4 [122].

1.3.2. Sustancias y reactivos

El RA (CAS 302-79-4) se obtuvo de Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Isotretinoína Roaccutan fue suministrado por Roche (R.P. Scherer, Eberbach, Alemania). Tanto el hexano p.a. y como el acetato de etilo p.a. fueron suministrados por Anedra (San Fernando, Argentina), y el tetrahidrofurano p.a. y el ácido acético p.a. por Cicarelli (San Lorenzo, Argentina). El acetonitrilo (ACN) y el metanol (MeOH) grado CLAR fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). El agua Milli-Q se obtuvo mediante un sistema Milli-Q Biocel (Millipore, Molsheim, Francia).

Las soluciones y los solventes usados para la preparación de la fase móvil se filtraron a través de filtros de nylon de 0.45 µm. Las soluciones estándares y muestras se filtraron a través de filtros jeringa de 0.20 µm antes de la inyección.

1.3.3. Estándar de ácido retinoico

El estándar de RA sufre isomerización durante el pretratamiento, formando los isómeros: 33.1% all-*trans*-RA, 35.6% 13-*cis*-RA, 14.8% 9-*cis*-RA, y 16.5% 9,13-di-*cis*-RA y un quinto isómero (11-*cis*-RA), pero con un porcentaje de conversión no significativo (< 1%). La precedente afirmación se comprobó realizando el pretratamiento sobre diferentes soluciones estándares (conteniendo diferentes concentraciones iniciales de RA) en diferentes días. Del análisis de los resultados se concluyó que una vez pasados 10 minutos desde la preparación del estándar, el porcentaje de conversión se mantiene constante.

Por otro lado, se preparó una solución de Isotretinoína Roaccutan 1.0 µg mL⁻¹ por pesada y disolución de la droga en MeOH, para identificar el pico correspondiente al principio activo del medicamento, el 13-*cis*-RA.

De aquí en adelante, con el propósito de simplificar la descripción, al compuesto all-*trans*-RA se lo denominará como RA.

1.3.4. Muestras

Método 1: Especie de anuro seleccionado: *Leptodactylus chaquensis*

L. chaquensis se distribuye cerca de Paraguay, Bolivia, Uruguay y los ecosistemas del río Paraná [123]. En Argentina, esta rana es categorizada como “especie no amenazada” [124] y se distribuye en las provincias de Buenos Aires, Formosa, Chaco, Corrientes, Santiago del Estero, Tucumán, Jujuy, Salta, Entre Ríos y Santa Fe. *L. chaquensis* es una rana de gran tamaño que pertenece al grupo de *Leptodactylus latrans* [125]. La selección de esta especie se debe a que es fácil encontrar a los individuos en campos de arroz, zonas donde están expuestos a diferentes agrotóxicos. De esta manera, se puede analizar la influencia que tiene la exposición a agrotóxicos sobre las concentraciones de RA y sus isómeros en la misma especie de anfibios [126,127]. Otro punto que se consideró en la selección de la especie proviene de la observación durante los últimos 10 años de anomalías en individuos recogidos en los sitios agrícolas [128], hecho que aumenta la hipótesis de la existencia de variaciones en las concentraciones de retinoides [129]. Los individuos se recolectaron durante la noche (22:00 y 24:00 horas) en caminos no pavimentados cercanos a los campos.

Área de estudio

La expansión de la producción de arroz, particularmente en Santa Fe, Entre Ríos y Corrientes, involucra la deforestación y destrucción de bosques nativos. En la provincia de Santa Fe, el arroz se produce principalmente sobre las llanuras de inundación del río Paraná [130] y esta agricultura intensiva ha llevado a incrementar el uso de herbicidas, como, por ejemplo, glifosato o atrazina [131] e insecticidas del tipo organofosforados, carbamato, y piretroides (CASAFE, 2005). En general, los campos de arroz están rodeados por varios fragmentos de bosques caracterizados por vegetación nativa de los deltas e islas del río Paraná y de la ecorregión espinal [132].

En el presente trabajo, el área de recolección de los especímenes se centró en la provincia de Santa Fe. Con este propósito, se seleccionaron dos sitios (Figura 3), que involucraban una zona de referencia y un campo de arroz. La zona de referencia se localiza en una reserva nativa de la llanura inundable del río Paraná situada en Cayastá, departamento Garay, Provincia de Santa Fe (31°10' 21.10" S-60°15'31.73" W). Se considera que la zona de referencia es libre de pesticidas debido a que no se observaron actividades agrícolas en las áreas cercanas [133]. Por su parte, el campo de arroz se sitúa en una plantación arrocería (*Oryza sativa*) localizada en el departamento San Javier (30°01' 5.92" S-59° 50'35.7" W).

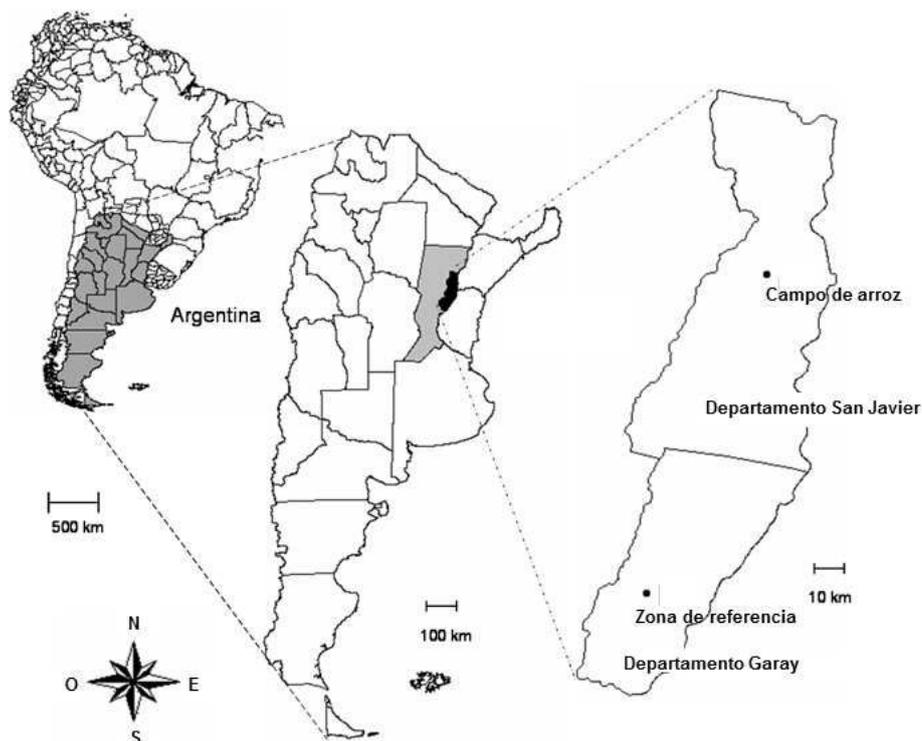


Figura 3. Localización y sitio de muestreo.

El 15 de enero de 2012 el Laboratorio de Ecotoxicología de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral recolectó veintisiete machos adultos de *L. chaquensis* en las áreas de muestreo (campo de arroz = 15 y zona de referencia = 12). Luego de la captura, los animales se transportaron hacia el laboratorio en cubos oscuros conteniendo agua para minimizar el estrés. El número de anfibios en estudio cumple el protocolo sobre el número de muestras necesario para realizar el estudio del efecto *in situ* de pesticidas en campos [134,135]. Para el posterior análisis, las muestras de sangre (0.4 mL) se recolectaron por punción cardíaca usando una jeringa heparinizada [136,134]. No se utilizó anestesia dado que puede ser más estresante para los anfibios que la punción cardíaca [137,138]. La sangre se centrifugó a 10000 rpm por 15 min, se separó el plasma e inmediatamente se llevó a -80°C . Como factores inherentes a los individuos se realizaron determinaciones de la longitud hico-cloaca y de la masa, parámetros que se utilizaron para calcular el coeficiente de factor animal (CFA) [139]:

$$\text{CFA} = 100 \times \left(\frac{\text{peso del animal (g)}}{\text{largo (cm)}} \right)^3 \quad (24)$$

El coeficiente de factor animal es un indicador del estado de salud, por lo que el análisis de las variaciones de este indicador se utiliza para demostrar el efecto de diferentes factores, como la calidad del medio ambiente y los recursos alimenticios [140]. Luego de la determinación de su estado de salud, las ranas fueron devueltas a los sitios de capturas.

Previo al estudio de los datos se comprobaron los supuestos de normalidad utilizando el método propuesto por Kolmogorov y Smirnov.

Con el fin de no sesgar los resultados, el laboratorio de Ecotoxicología rotuló las muestras y hasta el momento de extraer conclusiones no se tuvo acceso a su descripción.

Método 2

Para comprobar la factibilidad del método, se procesaron veinticinco muestras de plasma de diferentes pacientes humanos en tratamiento con 20-40 mg diarios de Isotretinoína Roaccutan.

Los pacientes se encontraban en diversos estadios de su tratamiento de acné severo, con dosificaciones diferenciales teniendo en cuenta peso y edad. Según los datos del compuesto en estudio, a nivel farmacológico, la Isotretinoína es muy eficaz en la terapéutica del acné porque actúa sobre todos los factores etiológicos de la enfermedad, producción de sebo, comedogénesis, colonización del conducto con *Propionibacterium acnes*. La absorción de la Isotretinoína en el tracto gastrointestinal es variable; la absoluta biodisponibilidad no ha sido determinada, dado que el compuesto no está disponible como preparación intravenosa para su uso en humanos.

Hasta el momento no hay registro del estudio de retinoides durante el transcurso del tratamiento dermatológico. En la actualidad la dosificación se ajusta, al analizar parámetros fisiológicos y actividad del compuesto en la zona afectada. El estudio de las concentraciones en los pacientes seleccionados permite analizar las variaciones existentes durante el tratamiento, con la posibilidad de generar terapias específicas para cada individuo.

Comparación de métodos

Posteriormente, las veinticinco muestras utilizadas para verificar la factibilidad del *Método 2* se analizaron mediante el *Método 1*. Subsecuentemente, se calcularon las concentraciones provistas por ambos métodos y los resultados se compararon mediante el uso del test EJCR.

1.3.5. Preparación de la muestra

Las muestras de plasma (50 µL) se transfirieron a un tubo de centrifuga de 1.5 mL y se les adicionaron 100 µL de ACN. Luego, se procedió a agitar mediante vórtex por 10 segundos y se adicionaron 300 µL de una mezcla (1:1) de acetato de etilo:hexano. Finalmente, las muestras se agitaron mediante vórtex por 10 segundos, se centrifugaron a 600 rpm por 2 minutos, y la fase orgánica se transfirió a un tubo de vidrio. La extracción se repitió tres veces y las fases orgánicas se combinaron para luego evaporarse hasta sequedad bajo una corriente de nitrógeno gaseoso. El residuo se disolvió en 50 µL de ACN y se inyectaron en el cromatógrafo 15 µL de la solución final.

1.3.6. Consideraciones generales

Para verificar la estabilidad de los componentes de las muestras en las condiciones de almacenamiento, tres porciones de plasma se mantuvieron en tubos de plástico a 4 °C y -20 °C durante tres períodos de tiempo diferentes: 24 horas, 7 días y 14 días, y luego se procesaron como se describió previamente.

1.3.7. Desarrollo de métodos cromatográficos

Método 1: Separación cromatográfica de RA y sus isómeros

Para este método, se utilizó una columna Zorbax C18 (4.6 mm × 75 mm, 3.5 μm de tamaño de partícula) marca Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania).

Diseño experimental y optimización

Para obtener las mejores condiciones cromatográficas se procedió al uso de un CCD, mediante el cual se analizaron cuatro respuestas: (a) área bajo los picos, (b) cantidad de picos, (c) tiempo de análisis y (d) resolución entre el primer pico principal y el siguiente. En este sentido, como se pretendía analizar la fase móvil del sistema junto con otros parámetros, se procedió a seguir la opción descrita por Morris y colaboradores [115].

Sistema cromatográfico

Luego de la optimización, la fase móvil utilizada en modo isocrático fue MeOH:ACN:solución acuosa ácida (ácido acético 2% + tetrahidrofurano 5%) (83.4:0.6:16.0). La temperatura de la columna se mantuvo a 37.1 °C y el flujo a 0.68 mL min⁻¹.

Soluciones estándares y muestras para el estudio de validación

El desarrollo del método y su posterior validación se refieren al análisis de RA. Por lo tanto, se preparó una solución stock de RA de 0.600 mg mL⁻¹ por pesada de una masa exacta y posterior disolución en MeOH. Esta solución se conservó a 4 °C en frascos color ámbar y se dejó alcanzar temperatura ambiente previo a su uso. Las soluciones estándares se prepararon en el momento de ser utilizarlas por medio de diluciones de la solución stock en MeOH, obteniéndose concentraciones de RA (teniendo en cuenta su porcentaje de conversión) en el rango de 0.005-20.06 μg mL⁻¹.

A su vez, una alícuota de 10 μL de cada solución stock se adicionó a 40 μL de plasma blanco para obtener concentraciones de RA en el rango de 0.007-4.95 μg mL⁻¹. Luego estas soluciones estándares adicionadas se procesaron de la misma manera que las muestras.

Validación del método: selectividad, LOD, LOQ, efecto matriz, linealidad, precisión, recuperación y robustez

La selectividad se evaluó (sobre la inyección de 10 plasmas basales), analizando la presencia de picos cromatográficos coincidentes con el tiempo de retención del analito, pero que no comportan características espectrales, haciendo uso del estudio de pureza de pico.

Los LOD y LOQ se calcularon siguiendo los criterios S/R [88,89], IUPAC [90,91], curva de calibrado usando la desviación estándar de la regresión [81,88] y EURACHEM [93]. A su vez, se calculó el MDL siguiendo el criterio USEPA [92].

Por su parte, el efecto matriz se evaluó mediante la comparación de las curvas de calibración preparadas a partir de plasma y solvente, con concentraciones de RA de 0.007, 0.010, 0.41, 0.83, 4.13, 8.26, 10.40 y 12.39 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para estudiar el rango lineal, se procesaron por triplicado soluciones estándares de RA en MeOH con concentraciones de 0.005, 0.10, 0.99, 4.95, 10.16, 12.63 y 15.11 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Por otro lado, para determinar el rango de trabajo las concentraciones analizadas fueron 0.007, 0.035, 0.10, 0.50, 0.99, 1.65, 2.48, 3.54 y 4.95 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estas soluciones se analizaron en forma aleatoria y la construcción de la curva se realizó con las áreas del analito. Para el estudio de reproducibilidad se realizaron inyecciones repetidas ($n = 6$) de una solución estándar en cuatro niveles de concentración (LOQ = 0.007 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $3 \times \text{LOQ} = 0.015 \mu\text{g mL}^{-1}$, 50% de la curva de calibrado = 2.48 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 75% de la curva de calibrado = 3.72 $\mu\text{g mL}^{-1}$) preparadas por adición de un volumen adecuado de solución de trabajo a plasma basal. Para la precisión entre días se repitió el procedimiento antes descrito durante 4 semanas. Como parámetro de análisis en todos los casos se calculó el CV%. Por su parte, se evaluó la recuperación de los analitos usando las mismas soluciones utilizadas en el estudio de precisión.

Con respecto a la robustez del método, se construyó un diseño Plackett-Burman, mediante el cual se variaron diferentes parámetros cromatográficos, y se registró la influencia de estas variables sobre las respuestas (área, número de picos, tiempo final y resolución). En este caso se realizaron doce experimentos considerando pequeñas variaciones en r^2 , θ , flujo y temperatura de la columna. Se debe tener en cuenta que las variaciones en r^2 y θ repercuten en la composición de la fase móvil.

Método 2: Análisis quimiométrico de RA y sus isómeros

En el desarrollo de este método se utilizó una columna Poroshell 120 EC-C18 (3.0 mm \times 30 mm, 2.7 μm de tamaño de partícula) marca Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Para obtener las condiciones cromatográficas finales se tuvieron en cuenta las condiciones cromatográficas desarrolladas en el *Método 1*. Sin embargo, el objetivo del nuevo método era la reducción del tiempo de análisis, por lo tanto, la fase móvil (modo isocrático) resultó ser MeOH:ACN:solución acuosa ácida (ácido acético 2% + tetrahidrofurano 5%) (76.5:1:22.5). La

temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C y el flujo a 0.60 mL min⁻¹. Los cromatogramas para cada muestra se registraron en 5.5 minutos. La región seleccionada para el análisis por MCR-ALS fue de 2.3-5.0 minutos y 240-442 nm, generándose matrices de tamaño 201 × 102 para cada muestra.

Las restricciones impuestas al sistema fueron no negatividad en concentración y espectros, unimodalidad en concentración y normalización de espectros. El porcentaje de varianza explicada resultó ser 97.98% y el error (en términos de falta de ajuste) fue del 4.16%.

Preparación de soluciones estándares y muestras para el estudio de validación

Una solución stock de RA de 0.500 mg mL⁻¹ se preparó por pesada exacta y disolución de la cantidad apropiada del estándar en MeOH. Debido a la isomerización que sufre el estándar durante el procesamiento, se estimaron las concentraciones de los cuatro analitos partiendo de una solución de RA. Por lo tanto, las soluciones estándares para la calibración se prepararon al momento del uso al diluir un volumen apropiado de la solución stock antes mencionada con MeOH, cubriendo concentraciones en el rango de 0.25-7.55 µg mL⁻¹ para RA, 0.27-8.12 µg mL⁻¹ para 13-*cis*-RA, 0.11-3.37 µg mL⁻¹ para 9-*cis*-RA y 0.12-3.76 µg mL⁻¹ para 9,13-di-*cis*-RA. Alícuotas de 10 µL de cada solución stock se adicionaron a 40 µL de plasma basal para generar concentraciones de los isómeros en los mismos rangos que los de las soluciones preparadas en MeOH, con el fin de proporcionar soluciones estándares preparadas en la matriz de la muestra. Todas las soluciones estándares se procesaron de la misma manera que las muestras.

Validación del método: LOD, LOQ, linealidad, precisión, exactitud y robustez

Los LOD y LOQ se calcularon usando los datos de la curva de calibrado (enfoque univariado) y aplicando las ecuaciones presentadas por Bauza y colaboradores cuando se procesaron datos de segundo orden mediante MCR-ALS [95].

Para estudiar el rango lineal, los estándares de calibración se prepararon por triplicado en MeOH a concentraciones entre 0.25 y 7.55 µg mL⁻¹ (RA), 0.27 y 8.12 µg mL⁻¹ (13-*cis*-RA), 0.11 y 3.37 µg mL⁻¹ (9-*cis*-RA) y 0.11 y 3.76 µg mL⁻¹ (9,13-di-*cis*-RA). Estas soluciones estándares se analizaron en orden aleatorio. Finalmente, se construyeron las curvas de calibrado mediante la regresión de las áreas de los picos en función de la concentración para cada analito.

La repetitividad se evaluó al analizar réplicas ($n = 10$) de una solución estándar a dos niveles de concentración (LOQ y 100% de la curva de calibrado), preparadas al adicionar alícuotas de la solución estándar a plasmas basales durante tres semanas consecutivas. En ambos estudios de precisión se obtuvo el CV%.

La recuperación se evaluó mediante el análisis de réplicas ($n = 3$) de muestras adicionadas a cinco niveles de concentración entre (RA: 0.76 y 6.44 µg mL⁻¹; 13-*cis*-RA: 0.82 y 6.95 µg mL⁻¹; 9-*cis*-RA:

0.34 y 2.90 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 9,13-di-*cis*-RA: 0.38 y 3.22 $\mu\text{g mL}^{-1}$), preparadas al agregar un volumen conveniente de solución estándar al plasma basal. Luego se realizó el siguiente análisis:

- 1- se estudió la linealidad (área del pico vs concentraciones nominales);
- 2- se compararon las pendientes obtenidas con las correspondientes a las curvas de calibrado obtenidas para analitos puros en solvente;
- 3- se graficaron, para cada analito, las concentraciones predichas en función de las concentraciones nominales y se aplicó el test EJCRC [82,141]; y
- 4- se calcularon las recuperaciones.

Para evaluar la robustez del método se construyó un diseño Plackett-Burman [44] considerando pequeñas variaciones en el porcentaje de MeOH (76-77%), ACN (0.5-1.5%) y la solución acuosa ácida (cantidad necesaria para llegar al 100%), el flujo (0.55-0.65 mL min^{-1}) y la temperatura de la columna (29-31 $^{\circ}\text{C}$).

RESULTADOS Y DISCUSIONES



MÉTODO 1: SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE ÁCIDO RETINOICO Y SUS ISÓMEROS

“Divide y triunfarás”

1.4.1. Optimización de la separación cromatográfica

Para llevar a cabo el diseño experimental, en una primera instancia se definieron los componentes de la fase móvil como: (A) porcentaje de MeOH, (B) porcentaje de ACN y $(1 - r^2)$ porcentaje de solución acuosa ácida, según lo propuesto por Morris y colaboradores [115]. Los demás factores cromatográficos implicados en la optimización fueron el flujo y la temperatura.

Para este ensayo se construyó un CCD completo, con seis puntos centrales, y un α de 1.60. Por su parte, los rangos para cada factor se fijaron en: 0.8-0.9 para r^2 , 5-85 para θ , 0.7-1.3 (mL min^{-1}) para el flujo y 22-38 °C para la temperatura de la columna (Tabla 1).

Tabla 1. Diseño central compuesto. Experimentos, factores y respuestas.

Corrida	Factores (k)				Respuestas ^a			
	r^2	θ	Flujo (mL min^{-1})	Temperatura (°C)	R1	R2	R3	R4
1	0.90	20	1.20	35	227.6	3	2.86	0.85
2	0.90	70	0.80	35	347.3	3	3.50	1.64
3	0.85	45	0.70	30	401.7	4	8.47	1.39
4	0.90	70	1.20	25	232.9	2	2.77	1.57
5	0.90	20	0.80	25	340.8	4	5.44	1.04
6	0.85	45	1.00	30	274.4	4	5.79	1.27
7	0.85	45	1.00	30	273.1	4	5.79	1.28
8	0.90	70	1.20	35	233.4	2	2.32	1.55
9	0.80	70	1.20	35	230.0	4	4.57	1.31
10	0.90	20	0.80	35	343.2	4	4.27	1.08
11	0.77	45	1.00	30	275.0	5	12.48	1.34
12	0.80	70	0.80	25	352.2	4	8.48	1.36
13	0.85	5	1.00	30	257.7	5	7.94	1.41
14	0.80	20	1.20	35	229.4	5	9.84	1.38
15	0.85	45	1.00	30	278.6	4	5.77	1.28
16	0.85	45	1.30	30	211.9	4	4.38	1.16
17	0.90	20	1.20	25	230.7	4	3.61	0.88
18	0.93	45	1.00	30	281.8	3	2.67	1.17
19	0.80	20	0.80	25	344.7	5	19.16	1.51
20	0.85	85	1.00	30	287.6	3	3.50	1.77
21	0.80	70	0.80	25	344.7	4	6.91	1.46
22	0.80	70	1.20	25	237.4	3	5.68	1.27
23	0.80	20	1.20	25	234.1	5	12.71	1.32
24	0.85	45	1.00	30	283.5	4	5.81	1.28
25	0.80	20	0.80	35	348.1	5	14.89	1.60
26	0.85	45	1.00	30	284.1	4	5.80	1.28
27	0.85	45	1.00	22	283.4	4	6.97	1.11
28	0.85	45	1.00	30	282.9	4	5.83	1.27
29	0.90	70	0.80	25	364.2	2	4.20	1.62
30	0.85	45	1.00	38	285.1	4	4.86	1.18

^aR1: área; R2: número de picos; R3: tiempo de análisis (min); R4: resolución entre el pico 3 y el pico 4

La Tabla 1 muestra las combinaciones obtenidas y las respuestas seleccionadas: (R1) área del pico RA; (R2) número de picos; (R3) tiempo de análisis en minutos y (R4) resolución entre el pico 3 y el pico 4.

Una vez obtenidas las respuestas, se procedió a la construcción de los modelos, que se analizaron mediante ANOVA, y se aplicó un procedimiento de regresión *backward* para eliminar los factores no significativos ($\alpha = 0.10$). Esta información se resume en la Tabla 2.

Tabla 2. Modelos ajustados para cada respuesta.

Respuesta	Modelo	Transformación ^a	ANOVA ^b	
			Modelo	Falta de ajuste
Área RA	Cuadrático	Ninguna	<0.0001	0.728
Número de picos	Lineal	Potencia (2.3)	<0.0001	0.051
Tiempo de análisis	Cuadrático	Logaritmo	<0.0001	0.190
Resolución entre el pico 3 y el pico 4	Cuadrático	Potencia (1.56)	<0.0001	0.131

^a El valor entre paréntesis corresponde al valor de *lambda*: Potencia: $y' = (y + k)^{lambda}$; con $k = 0$.

^b Un valor de *p* menor a 0.05 indica que el parámetro evaluado es significativo

Luego de obtenerse los modelos que mejor explican la relación existente entre las variables y las respuestas, es clave definir el criterio y la importancia que se les debe dar a cada una de estas últimas. En este caso, se decidió mantener los factores en el rango de trabajo y maximizar las respuestas R1 (área), R2 (número de picos) y R4 (resolución entre el pico 3 y el pico 4), mientras que se determinó minimizar la respuesta R3 (tiempo de análisis). Finalmente, se seleccionaron las condiciones experimentales óptimas, que maximizan la función deseabilidad, obteniéndose un valor $D = 0.656$ para los factores r^2 de 0.84, θ de 5.00, flujo de 0.68 mL min⁻¹ y temperatura de la columna de 37.1°C. Al convertir los valores de r^2 y θ en valores experimentales de porcentajes de solventes, la fase móvil final corresponde a la combinación de 83.4% de MeOH, 0.6% de ACN y 16.0% de solución acuosa ácida.

La Figura 4 representa la superficie de respuesta generada en función de los factores r^2 y θ , dejando los demás términos en sus valores óptimos.

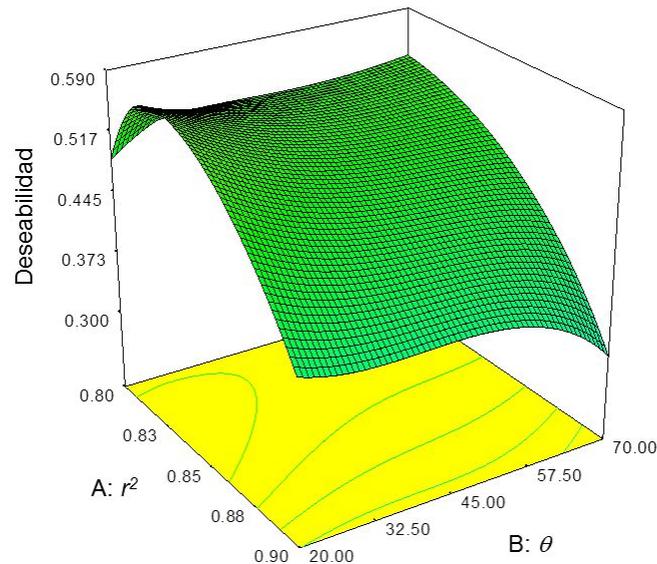


Figura 4. Superficie de respuesta de la función deseabilidad cuando se optimizan simultáneamente las cuatro respuestas. Los factores que no se grafican se mantienen en el valor óptimo: flujo a 0.68 ml min^{-1} y temperatura a $37.1 \text{ }^\circ\text{C}$.

De acuerdo a la estimación provista por el modelado realizado, y teniendo en cuenta la combinación de los factores que maximizan D , el área de RA debería estar comprendida en el rango de 386.1-403.8, la cantidad de picos entre 4.7-5.2, el tiempo de análisis entre 10.2-10.5 minutos y la resolución entre 1.56-1.68.

Para corroborar la veracidad de la optimización, se procedió a la comprobación experimental, analizando una solución estándar en las condiciones cromatográficas antes descritas. El cromatograma de la Figura 5 corresponde a una solución de RA de $0.328 \mu\text{g mL}^{-1}$, procesada como se describió previamente utilizando el sistema cromatográfico establecido. Del análisis de este cromatograma se desprende que se cumple con los valores definidos en la etapa de optimización ya que el área de RA de la solución ensayada es de 390.5, se pueden observar 5 picos provenientes del estándar, el tiempo de análisis es de 10.2 minutos y la resolución entre el pico 3 y el 4 es de 1.65. A su vez, la Figura 6 muestra los espectros correspondientes a cada pico cromatográfico presente en la Figura 5.

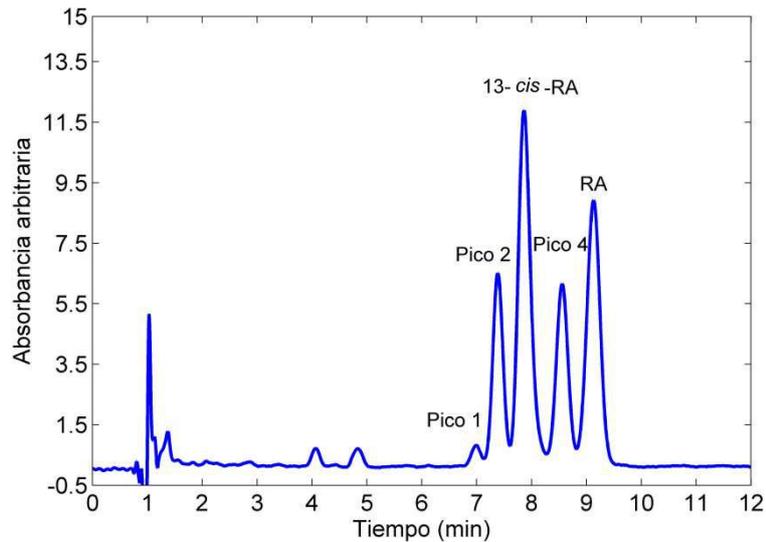


Figura 5. Cromatograma registrado a 350 nm correspondiente a una solución estándar de RA $0.328 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando el método cromatográfico establecido luego de la optimización.

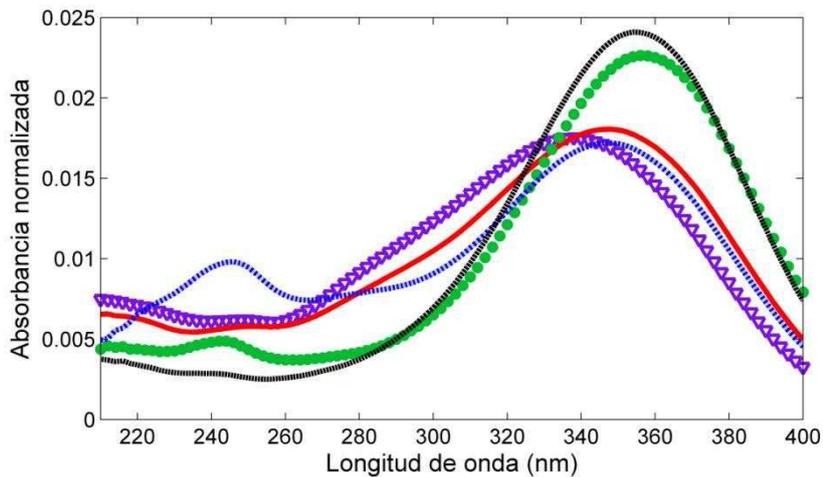


Figura 6. Espectros correspondientes a cada sustancia separada en el cromatograma presentado en la Figura 5. Pico 1: triángulos violetas; pico 2: línea sólida roja; 13-*cis*-RA: puntos verdes; pico 4: puntos azules; y RA: línea negra.

En este punto, para poder caracterizar los picos obtenidos, solo se contaba con el estándar de RA y con una muestra de Isotretinoína, nombre comercial del 13-*cis*-RA. Por esto, luego de la inyección cromatográfica de la solución del compuesto farmacéutico se identificó al tercer compuesto en orden de migración, como el 13-*cis*-RA (ver Figura 5). Para caracterizar a los demás compuestos se recurrió a la comparación de espectros y tiempos de retención según bibliografía. En este punto, durante el análisis de los demás componentes, se tuvieron en cuenta las características que presentaron los compuestos ya caracterizados el 13-*cis*-RA y el RA. En este sentido, en la Figura 6 se puede observar que el compuesto 13-*cis*-RA posee un máximo de absorbancia en 356 nm, mientras que el RA tiene su máximo a 352 nm. La Tabla 3 lista los máximos de absorción para una variedad de compuestos. Del análisis de la Tabla 3 y los resultados experimentales, se concluye que existe una diferencia de dos nanómetros entre los valores, hecho que se fundamenta por las diferentes

condiciones experimentales en las que se analizaron los compuestos. Esta variación se tuvo en cuenta en la posterior caracterización de los demás picos.

En este sentido, de acuerdo con Gundersen y colaboradores [142], los demás picos pueden asignarse de la siguiente manera: pico 1, 11-*cis*-RA (máximo de absorción a 341 nm); pico 2, 9,13-di-*cis*-RA (máximo de absorción a 346 nm) y pico 4, 9-*cis*-RA (máximo de absorción a 347 nm). Esta asignación se justifica luego del análisis de los espectros de absorción de cada compuesto, comparando los máximos de absorción con datos provenientes de tablas de estándares puros [142,143].

Tabla 3. Retinoides, y sus máximos de absorción y coeficientes de extinción molar (ϵ)

Retinoide	$\lambda_{m\acute{a}x}$	ϵ
all- <i>trans</i> -ROH	325	48305
13- <i>cis</i> -ROH	328	51770
11- <i>cis</i> -ROH	319	34890
9- <i>cis</i> -ROH	323	42300
all- <i>trans</i> -retinal	383	42880
13- <i>cis</i> -retinal	380	24835
11- <i>cis</i> -retinal	380	24935
9- <i>cis</i> -retinal	373	36100
all- <i>trans</i> -RA	350	45300
13- <i>cis</i> -RA	354	39750
11- <i>cis</i> -RA	342	27780
9- <i>cis</i> -RA	345	36900
9,13-di- <i>cis</i> -RA	346	34500

A su vez, se realizó un análisis de los tiempos de retención aparentes de los analitos, es decir, el estudio del orden de migración, lo que permitió confirmar las afirmaciones realizadas [65,105,144-146].

1.4.2. Validación del método

Selectividad

Para analizar este parámetro se procesaron 10 plasmas basales, registrándose los espectros de absorción, con el fin de determinar la homogeneidad y pureza de los picos. Luego del análisis se obtuvieron, en todos los casos, valores de pureza de picos mayores a 0.99 (Figura 7).

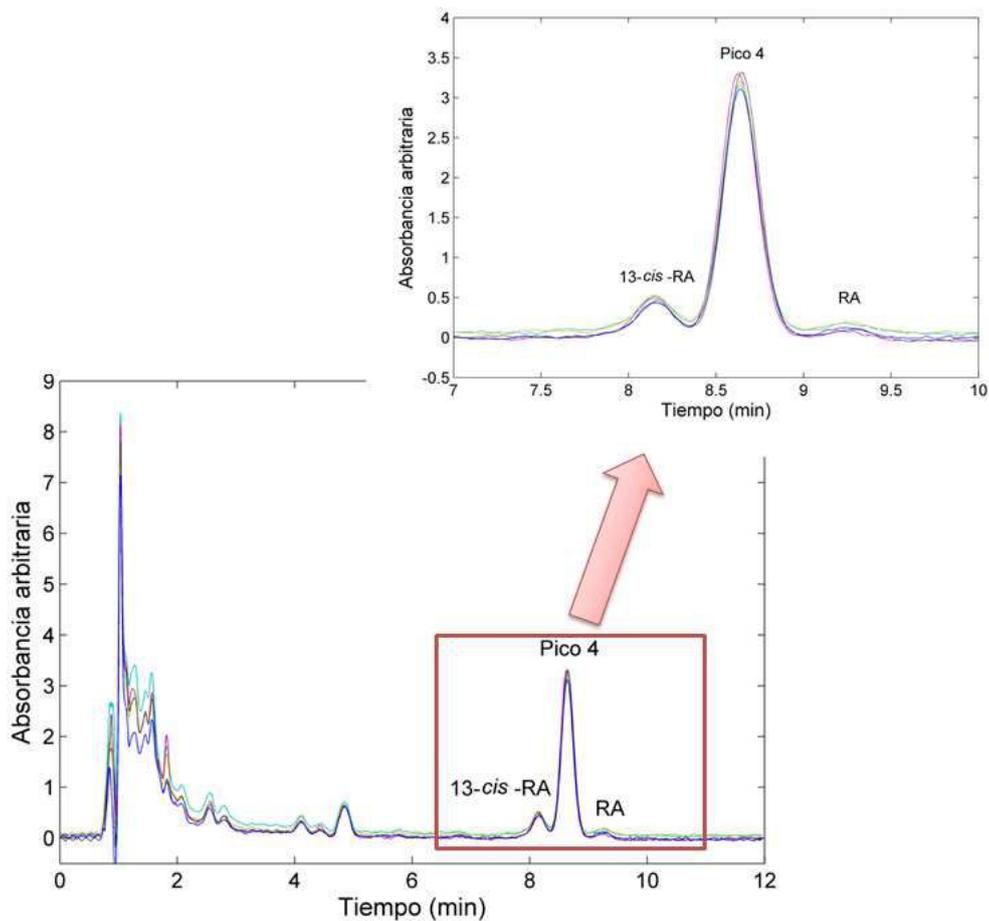


Figura 7. Cromatograma de diez plasmas basales procesados en las condiciones cromatográficas optimizadas.

Al analizar el espectro del analito correspondiente al pico 4, se observó que no posee concordancia con el espectro del analito *9-cis*-RA. Cabe recordar que durante el análisis de la solución estándar se definió que el pico 4 (según su espectro y orden de migración) correspondía al compuesto *9-cis*-RA. En este momento se recurrió nuevamente a bibliografía y se definió que el pico presente en el plasma basal correspondía al compuesto ROH, con un máximo de absorbancia cercano a 325 nm. Por lo tanto, en el sistema cromatográfico propuesto el compuesto ROH coeluye con el compuesto *9-cis*-RA. La Figura 8 muestra los espectros de los analitos en cuestión.

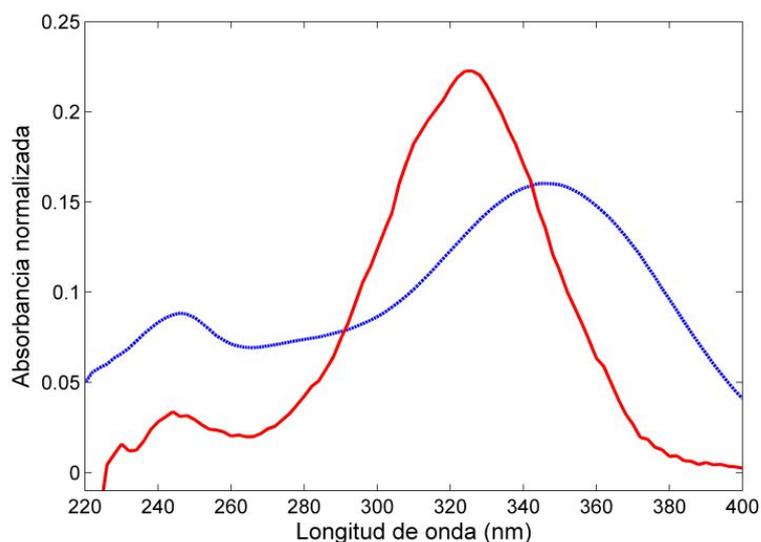


Figura 8. Espectros correspondientes a 9-*cis*-RA en puntos azules y ROH en línea roja.

Límite de detección y cuantificación

Los valores de LOD se calcularon siguiendo las metodologías de S/N [88,89], IUPAC [90,91] y curva de calibrado usando la desviación estándar de la regresión [81,88]. En los primeros dos casos se utilizó para tal fin una solución estándar de RA ($0.110 \mu\text{g mL}^{-1}$) preparada en solvente y otra en plasma basal.

Posteriormente, se realizó el cálculo del MDL utilizando el enfoque estadístico establecido por la USEPA [92] y luego de la comparación mediante la prueba F , como el valor de $F = s_A^2/s_B^2 = 1.644$ resultó ser menor que el F tabulado (5.820), se procedió el cálculo final del MDL mediante la Ec. 17.

Los valores de LOD y MDL obtenidos se muestran en la Tabla 3, donde se puede ver que, cuando se trabaja con plasma basal, tanto los valores de LOD, obtenidos siguiendo el criterio IUPAC (3.5 ng mL^{-1}), como de MDL (3.8 ng mL^{-1}) presentan el mismo orden de magnitud y resultan ligeramente menores al LOD calculado utilizando los parámetros de la regresión (4.5 ng mL^{-1}). Por otro lado, el valor basado en la relación S/N (1.3 ng mL^{-1}) resultó ser el límite más bajo. Por su parte, cuando se utilizan soluciones estándares, el valor calculado con la regresión lineal (4.0 ng mL^{-1}) es mayor que el MDL (1.9 ng mL^{-1}) y el LOD basado en la relación S/N (1.3 ng mL^{-1}), mientras que el obtenido siguiendo el criterio de la IUPAC se encuentra entre los valores calculados por las demás técnicas. Finalmente, los valores de LOD obtenidos cuando se trabaja con plasma basal resultaron ser mayores que los obtenidos cuando se utilizan soluciones estándares; hecho que se esperaba comprobar, debido a la complejidad de la matriz en estudio.

Para obtener los LOQ, en una primera instancia, se siguió el método que involucra la relación S/N [88,89]. Para este ensayo se utilizó la misma solución estándar preparada en solvente y en plasma basal que se utilizó para el cálculo de LOD. A su vez, este parámetro se estimó en una

solución estándar y en el plasma mediante el criterio establecido por la IUPAC [90,91]. Adicionalmente, el LOQ se calculó a través de los parámetros obtenidos en la regresión lineal, tal como se hizo con el LOD, pero utilizando un factor igual a 10.

Por otro lado, se siguió el criterio de la guía EURACHEM [93], procesando por quintuplicado soluciones estándares y en plasma con concentraciones de RA de 45.9, 23.3, 9.18, 7.39, 4.89 y 3.82 ng mL⁻¹. Una vez registradas las áreas correspondientes a estas soluciones, se calcularon los CV%, obteniéndose valores de 2.8%, 3.1%, 6.2%, 8.5%, 10.0% y 12.3% para las soluciones estándares y 5.8%, 6.9%, 8.5%, 9.9%, 13.5% y 15.3% para las soluciones en plasma. La elección del valor máximo de CV% se fijó en 10%, por lo que el LOQ mediante esta técnica corresponde a la concentración de RA de 4.89 ng mL⁻¹ con un CV% = 10.0% en el caso de la solución estándar y 7.39 ng mL⁻¹, con un CV% = 9.9% para las soluciones en plasma. Los valores de LOQ obtenidos luego de aplicar las técnicas antes descriptas se reportan en la Tabla 3. Puede observarse que cuando se trabaja con plasma basal, el menor valor de LOQ corresponde al dado por la relación S/N (3.2 ng mL⁻¹). El valor obtenido siguiendo el criterio establecido por la IUPAC (10.5 ng mL⁻¹) es ligeramente menor que el obtenido usando los parámetros de la regresión (12.0 ng mL⁻¹), mientras que el LOQ obtenido siguiendo el criterio de la EURACHEM se encuentra en el mismo orden pero es un poco más bajo (7.4 ng mL⁻¹). Por otra parte, cuando el cálculo remite a las soluciones estándares, los LOQ siguen el patrón descrito en el cálculo de LOD, resultando menores que los obtenidos en plasma basal.

Tabla 3. Valores de LOD y LOQ obtenidos siguiendo diferentes guías.

	Estándar (ng mL ⁻¹) ^a	Plasma basal (ng mL ⁻¹) ^b	Referencia
<u>LOD</u>			
Relación S/R	1.3	1.3	[93,119,145]
IUPAC	2.5	3.5	[93,145]
Curva de calibración	4.0	4.5	[92,119]
MDL	1.9	3.8	[92]
<u>LOQ</u>			
Relación S/R	4.4	3.2	[93,119,145]
IUPAC	5.3	10.5	[93,145,147]
Curva de calibración	11.2	12.0	[119]
EURACHEM	4.9	7.4	[93,148]

^aValores obtenidos cuando se procesaron estándares puros.

^bValores obtenidos cuando se procesaron plasmas basales adicionados con estándar puro.

Este análisis pone en evidencia la gran variedad de técnicas disponibles para obtener valores de LOD y LOQ, y que la decisión de aplicar una u otra técnica depende tanto del método analítico desarrollado como de la muestra en cuestión. En el sistema en estudio se obtienen menores valores cuando se trabaja con soluciones estándares que con plasma. Si bien la selección del método y la normativa a utilizar quedan a criterio del investigador, es importante tener en cuenta en qué

contexto se realiza esta determinación y cuál es el fin del método desarrollado. Es conveniente seguir normativas que generen valores cercanos a la realidad, que produzcan resultados que puedan reproducirse a nivel experimental, por lo que se recomienda que luego de la obtención de estos parámetros, independientemente de la técnica seleccionada, se realice en forma experimental la confirmación del resultado.

Efecto matriz

Para determinar la presencia o ausencia de efecto matriz se compararon, mediante una prueba *t*, las pendientes de los gráficos de calibración obtenidos cuando se procesaron, por un lado, soluciones estándares y, por el otro, plasma basal adicionado con soluciones estándares en los mismos niveles de concentración [79]. Para este estudio se analizaron por triplicado soluciones en las siguientes concentraciones: 0.007, 0.010, 0.413, 0.826, 4.13, 8.26, 10.40 y 12.39 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Luego del análisis se obtuvo un valor de $p > 0.1$, lo que significa que no existe efecto matriz en el rango estudiado.

Rango lineal y de trabajo

Para determinar el rango lineal de un analito se debe definir, en primera instancia, el límite inferior, es decir el primer punto de la curva de calibración. En este sentido, resulta imperativo determinar el límite de cuantificación del método, para poder utilizarlo como primer punto. Cabe aclarar que para calcular el LOQ solo pueden utilizarse las metodologías antes propuestas que no necesiten de curvas de calibrado, por lo que la elección se reduce a seleccionar el valor obtenido mediante S/R, IUPAC o EURACHEM. Luego de analizar los valores de LOQ obtenidos con las diferentes técnicas, el límite inferior de la curva se estableció teniendo en cuenta la guía EURACHEM, debido a que este parámetro provee una descripción más real del sistema en estudio, generando no solo una concentración de RA sino también una incertidumbre asociada a la medición. Posteriormente, se debe definir el punto final y establecer el rango lineal, por lo que la señal del límite superior debió seguir la premisa establecida por la guía EURECHEM, en donde se considera que el último punto de una curva es el que se desvía de la linealidad entre un 3 y un 5% [93]. Entonces, se construyó una curva ($n = 3$) considerando 9 niveles de concentración en un rango entre 0.005 y 20.06 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 9 A). Al graficar los puntos obtenidos, se observó que el rango lineal ($r^2 > 0.999$) estaba comprendido entre los puntos 1 y 7, es decir 0.005 y 15.11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 9 B), por lo que los parámetros de calibración, listados en la Tabla 4, se establecieron dentro del rango de concentraciones comprendidas entre 0.005 y 15.11 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

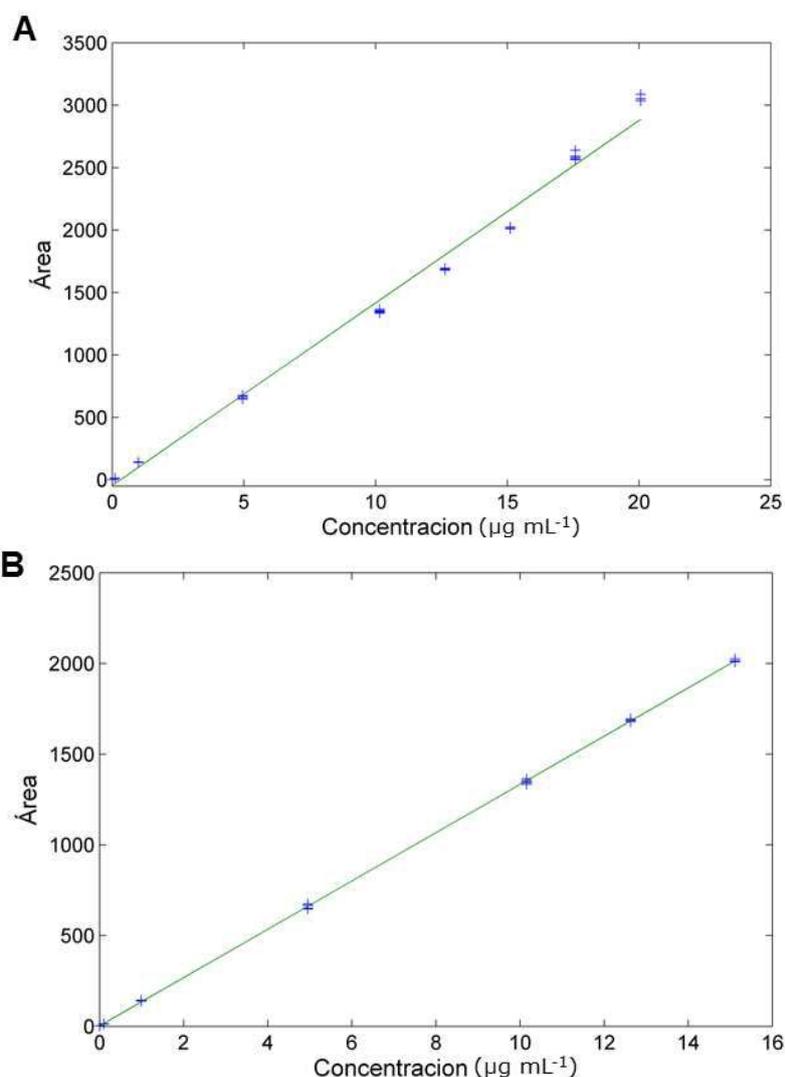


Figura 9. **A)** Curva de calibrado completa, conteniendo los puntos 1 al 9. **B)** Curva de calibrado parcial, conteniendo los puntos 1 al 7. Como puede apreciarse, a partir del punto 8 se pierde linealidad.

Como se comentó en la introducción, para evaluar la linealidad de un método analítico el cálculo del coeficiente de regresión no resulta suficiente, y se debe proceder a calcular la bondad del ajuste. En este caso, el modelo de calibración resultó adecuado debido a que el F_{exp} (1.188) fue menor que el F_{tab} (4.314), el cual se corroboró por el valor p obtenido (0.229), a un nivel de confianza de 0.01 (Tabla 4).

Sin embargo, teniendo en cuenta un análisis previo del sistema, en donde las concentraciones esperadas en las muestras comúnmente no superarían la mitad del rango lineal, y teniendo como guías la USP y la IUPAC [92], en las que se establece que el nivel superior de una curva de calibración no debe ser mayor a un 150% de las concentraciones esperadas del analito en las muestras, se decidió acortar el rango de trabajo y definir el último punto de la curva en el valor de $4.95 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para llevar a cabo este análisis se construyó una segunda curva de calibrado a 10 niveles de concentraciones ($n = 3$) en el rango de concentración comprendido entre 0.007 y $4.95 \mu\text{g mL}^{-1}$. La selección de este nuevo límite inferior se justifica al observar que el LOQ en plasma, siguiendo la

guía EURACHEM, es $0.007 \mu\text{g mL}^{-1}$, y como el objetivo del trabajo es determinar RA en plasma, el rango de trabajo se redujo a las concentraciones habituales y cuantificables en esta matriz (Figura 10A). Los datos relacionados con la calibración se listan en la Tabla 4. En este caso, el F_{exp} (1.517) fue menor al F_{tab} (3.185) con un valor de $p = 0.118$.

Tabla 4. Rango lineal y parámetros de calibración

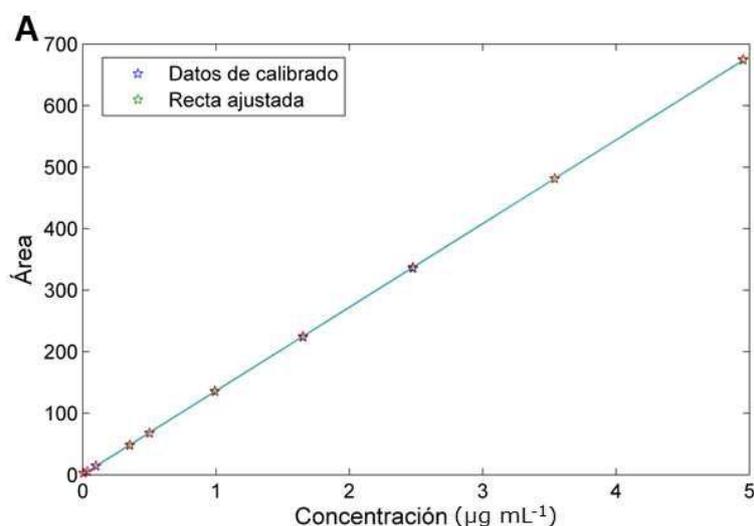
Parámetro	Valor experimental ^a	
	Rango completo	Rango de trabajo
Rango lineal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.005-15.11	0.007-4.95
Ordenada al origen	2.6 (1.9)	0.7 (0.2)
Pendiente	133.1 (0.2)	135.9 (0.1)
F_{exp} ^b	1.188	1.517
F_{tab} ^b	4.314	3.185
r^2	99.999	99.998
Falta de ajuste (valor p) ^c	0.229	0.118

^aValores entre paréntesis indican desviación estándar.

^bPrueba F para determinar linealidad.

^cDebido a que el valor de p de la falta de ajuste es mayor o igual que 0.10, el modelo seleccionado es adecuado para la información obtenida.

Por otro lado, la homocedasticidad del sistema se comprobó al aplicar el test estadístico de Bartlett, demostrando la falta de diferencias estadísticas entre las varianzas de las diferentes concentraciones ($p > 0.05$), indicando homocedasticidad en los datos [149]. A su vez, este parámetro se corroboró mediante análisis de la gráfica que se observa en la Figura 10 B. Este análisis permitió confirmar la homocedasticidad de los datos, ya que los valores residuales se distribuyen aleatoriamente sin experimentar tendencia alguna sobre la línea de regresión [149].



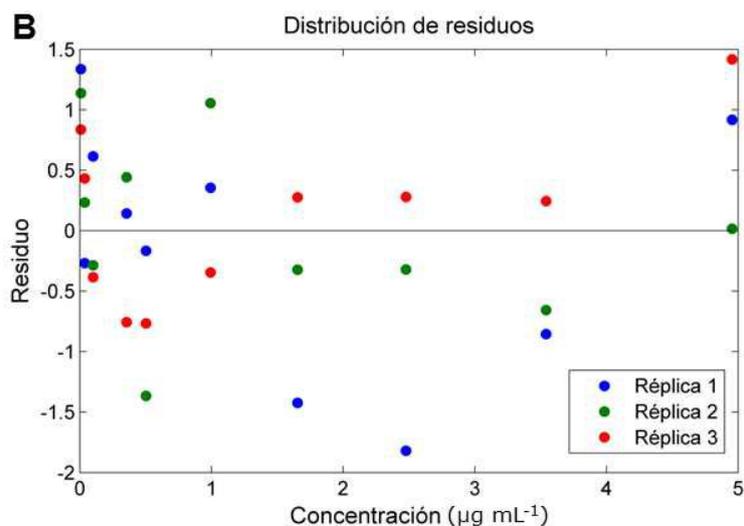


Figura 10. A) Curva de calibrado en el rango de trabajo. **B)** Gráfica de distribución de los residuos en función de los niveles de calibración.

Repetitividad y precisión intermedia

Para analizar los resultados de precisión se calculó, en todos los casos, el CV%. Tal como se esperaba, las variaciones más altas corresponden a las concentraciones bajas. En este sentido, el criterio de aceptación se estimó según normas EMEA [116], regulación que establece que el CV% no debe superar un valor de 15%, aceptándose un CV% de 20% para el menor valor estudiado (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de precisión y exactitud.

Parámetro	Nivel ^a			
	LOQ	3 × LOQ	50% de la curva	75% de la curva
<u>Precisión</u>				
Precisión intraensayo (CV%)	7.6	4.3	3.4	1.9
Precisión interensayo (CV%)	7.0	4.2	3.4	3.2
<u>Exactitud</u>				
Recuperación (%)	102.0	106.8	99.5	99.9
Sesgo (%)	2.0	6.8	-0.5	-0.1

^a “LOQ” = 0.007 µg mL⁻¹, “3 × LOQ” = 0.015 µg mL⁻¹, “50% de la curva de calibrado” = 2.48 µg mL⁻¹ y “75% de la curva de calibrado” = 3.72 µg mL⁻¹.

Por otro lado, mediante el análisis de la varianza para las recuperaciones en cada concentración durante las cuatro semanas, se concluyó que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las recuperaciones en las condiciones ensayadas (con un nivel de confianza de 0.05), debido a que el valor de *p* obtenido (0.476) resultó ser mayor a 0.05.

Como se comentó previamente, en la Tabla 5 se observa que tanto la precisión intra como interensayo aumentan a medida que disminuye la concentración, con valores de 7.6% y 7.0% para la

concentración de LOQ. Esto se debe a que cuanto más pequeña sea la concentración, más complicado resulta definir el área y, por ende, la concentración de los analitos.

Recuperación

Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 5, donde se observan excelentes recuperaciones (entre 99.5 y 106.8%), incluso en el nivel correspondiente al LOQ.

Robustez

Luego de realizar los cambios descriptos en la Tabla 6, el análisis de las respuestas permitió llegar a la conclusión de que pequeñas variaciones en el flujo, la composición de la fase móvil y la temperatura de la columna generan efectos significativos en dos respuestas: el tiempo final de análisis, que varía de 8.0 a 11.6 min, y la resolución entre 13-*cis*-RA y el pico 4, que varía entre 1.52-1.65 ($p < 0.05$, nivel de confianza).

Tabla 6. Estudio de robustez. Variaciones de los parámetros cromatográficos y las respuestas obtenidas.

Corrida	Factores (<i>k</i>)				Respuestas ^a			
	r^2	θ	Flujo (mL min ⁻¹)	Temperatura (°C)	R1	R2	R3	R4
1	0.83	4.99	0.63	36.1	603.7	5	11.6	1.65
2	0.85	4.99	0.63	38.1	597.8	5	8.8	1.53
3	0.85	5.01	0.71	36.1	600.2	5	8.3	1.53
4	0.85	5.01	0.71	36.1	601.5	5	8.3	1.53
5	0.83	4.99	0.71	36.1	600.0	5	10.7	1.63
6	0.83	4.99	0.71	38.1	597.5	5	10.3	1.63
7	0.83	5.01	0.63	36.1	608.2	5	11.6	1.65
8	0.85	4.99	0.71	38.1	598.7	5	8.0	1.52
9	0.85	5.10	0.63	38.1	603.3	5	8.7	1.53
10	0.83	5.01	0.71	38.1	598.1	5	10.2	1.63
11	0.85	4.99	0.63	36.1	609.3	5	9.0	1.54
12	0.83	5.01	0.63	38.1	694.7	5	10.4	1.65
13	0.83	4.99	0.63	36.1	603.7	5	11.6	1.65

^a R1: área; R2: número de picos; R3: tiempo de análisis (min); R4: resolución entre 13-*cis*-RA y el pico 4.

Sin embargo, independientemente de los efectos observados, el RA puede cuantificarse en todos los experimentos.

1.4.3. Estudio de estabilidad

Para verificar la estabilidad, un grupo de plasmas basales se mantuvieron a 4 °C y -20 °C durante un periodo variable de tiempo y se analizaron con el procedimiento establecido para las muestras. Luego del procesamiento no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la concentración de RA. A su vez, los perfiles cromatográficos obtenidos con estas muestras son

similares a los obtenidos al inicio de la experimentación (13-*cis*-RA, pico 4 y RA), demostrando que las muestras pueden mantenerse a -20°C durante un tiempo considerable (al menos por 14 días).

1.4.4. Aplicaciones

Con el objetivo de conocer las concentraciones de retinoides *in vivo*, se obtuvieron plasmas de *L. chaquensis* de dos sitios diferentes, una zona libre de actividad humana, que se denominó zona de referencia, y un campo en el que habitualmente se cultiva arroz, que se denominó campo de arroz (ver Figura 3 en Metodología, apartado 1.3.4.).

Al comienzo del análisis se establecieron las características generales de los animales mediante el coeficiente de factor animal (CFA, ver Ec. 14), que relaciona el peso y el largo del animal. Es importante recordar que el coeficiente de factor animal es un indicador del estado de salud, y el análisis de sus variaciones se utiliza para demostrar el efecto que causan diferentes factores, tales como la calidad del medioambiente y los recursos alimenticios.

El promedio del CFA en el sitio control (10 ± 2) fue similar al sitio agrícola (11 ± 3). La comprobación de la falta de diferencia entre las zonas analizadas se llevó a cabo mediante el uso de una prueba *t* ($t = 1.94$, $p = 0.17$). Debido que el valor de *p* fue mayor a 0.05 se corroboró que los grupos en estudio no presentan diferencias estadísticas. Por esta razón se infirió que los animales no presentaban diferencias nutricionales.

En este punto es importante recordar que las concentraciones basales de RA están directamente correlacionadas con la ingesta de vitamina A y, por ende, de su precursor el ROH. Por lo tanto, durante el análisis de las muestras se procedió al cálculo de la concentración de ROH y 13-*cis*-RA teniendo en cuenta las áreas relativas de estos analitos con RA. Dado que el compuesto ROH coeluye con el 9-*cis*-RA, previamente al análisis se estudiaron los espectros de los picos correspondientes al tiempo de retención de los compuestos, verificándose en todos los casos la aparición de ROH con purezas mayores a 0.999.

Las concentraciones de ROH obtenidas en los individuos de los dos sitios de estudios fueron similares ($90 \pm 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $70 \pm 7 \mu\text{g mL}^{-1}$ para los individuos del campo de arroz y la zona de referencia, respectivamente). Al igual que en el ensayo anterior, se realizó una prueba *t*, ($t = 1.54$, $p = 0.14$) demostrando que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de las zonas en estudio.

Por su parte, las concentraciones de RA y 13-*cis*-RA resultaron más altas en los individuos recolectados en el campo de arroz ($94 \pm 9 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $132 \pm 9 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) que en la zona de referencia ($66 \pm 9 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $100 \pm 10 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Mediante la aplicación del test *t*, se comprobó que las concentraciones de 13-*cis*-RA y RA varían significativamente de acuerdo a la

zona, en el caso de RA con valores de $t = 2.32$ y de $p = 0.027$; y en el de 13-*cis*-RA con valores de $t = 2.57$ y de $p = 0.015$.

Para independizarse del peso del animal, se analizaron las concentraciones de los analitos por gramo. La Tabla 7 muestra los valores obtenidos para cada retinoide, y para ayudar a la comprensión, la Figura 11 muestra los resultados en forma gráfica. Del análisis de los resultados se confirman las estimaciones previas, no observando diferencias entre las concentraciones de ROH ($t = 0.42$, $p = 0.675$), e indicando diferencias en las concentraciones de 13-*cis*-RA y RA ($t = 2.87$, $p = 0.008$ y $t = 2.22$, $p = 0.036$, respectivamente), entre las zonas en estudio.

Tabla 7. Resultados obtenidos al analizar los plasmas de *L. chaquensis* en los sitios de estudio.

Peso ^a	ROH ^a	\bar{x}	13- <i>cis</i> -RA ^a	\bar{x}	RA ^a	\bar{x}	13- <i>cis</i> -RA/ROH	\bar{x}	RA/ROH	\bar{x}
<u>Zona de referencia</u>										
49.3	1.77		1.54		0.55		0.87		0.31	
24.8	0.87		0.28		0.08		0.32		0.09	
46.0	4.70		3.61		3.29		0.77		0.70	
47.6	2.27		3.45		2.18		1.52		0.96	
24.0	3.90		5.80		4.27		1.49		1.09	
40.3	2.50	2.47	3.08	2.67	2.32	1.96	1.23	1.09	0.93	0.78
29.8	2.84		3.23		2.19		1.14		0.77	
39.9	2.12		1.90		1.42		0.90		0.67	
42.5	3.34		2.13		1.95		0.64		0.59	
37.8	2.74		3.33		2.28		1.21		0.83	
31.7	0.87		1.43		1.10		1.64		1.27	
37.1	1.69		2.32		1.92		1.38		1.14	
<u>Campo de arroz</u>										
28.2	3.68		5.82		5.35		1.58		1.45	
38.9	1.68		1.27		1.45		0.75		0.86	
24.5	4.89		6.27		6.39		1.28		1.31	
58.5	1.34		2.78		2.15		2.07		1.60	
28.4	1.16		4.32		2.72		3.72		2.34	
41.0	2.35		4.79		2.92		2.04		1.24	
27.8	4.52		5.79		4.15		1.28		0.92	
32.2	1.16	2.26	5.00	4.13	2.85	3.05	4.30	2.19	2.46	1.53
37.1	1.84		3.19		1.80		1.73		0.98	
24.9	4.46		5.58		3.87		1.25		0.87	
36.0	1.78		4.27		3.04		2.40		1.71	
30.2	1.53		4.16		2.99		2.72		1.95	
39.2	0.95		2.34		1.44		2.46		1.51	
38.4	1.66		3.28		2.58		1.97		1.55	
31.8	0.90		3.03		1.96		3.37		2.18	

^aPeso del animal en gramos.

^bConcentraciones en ng por gramo de animal.

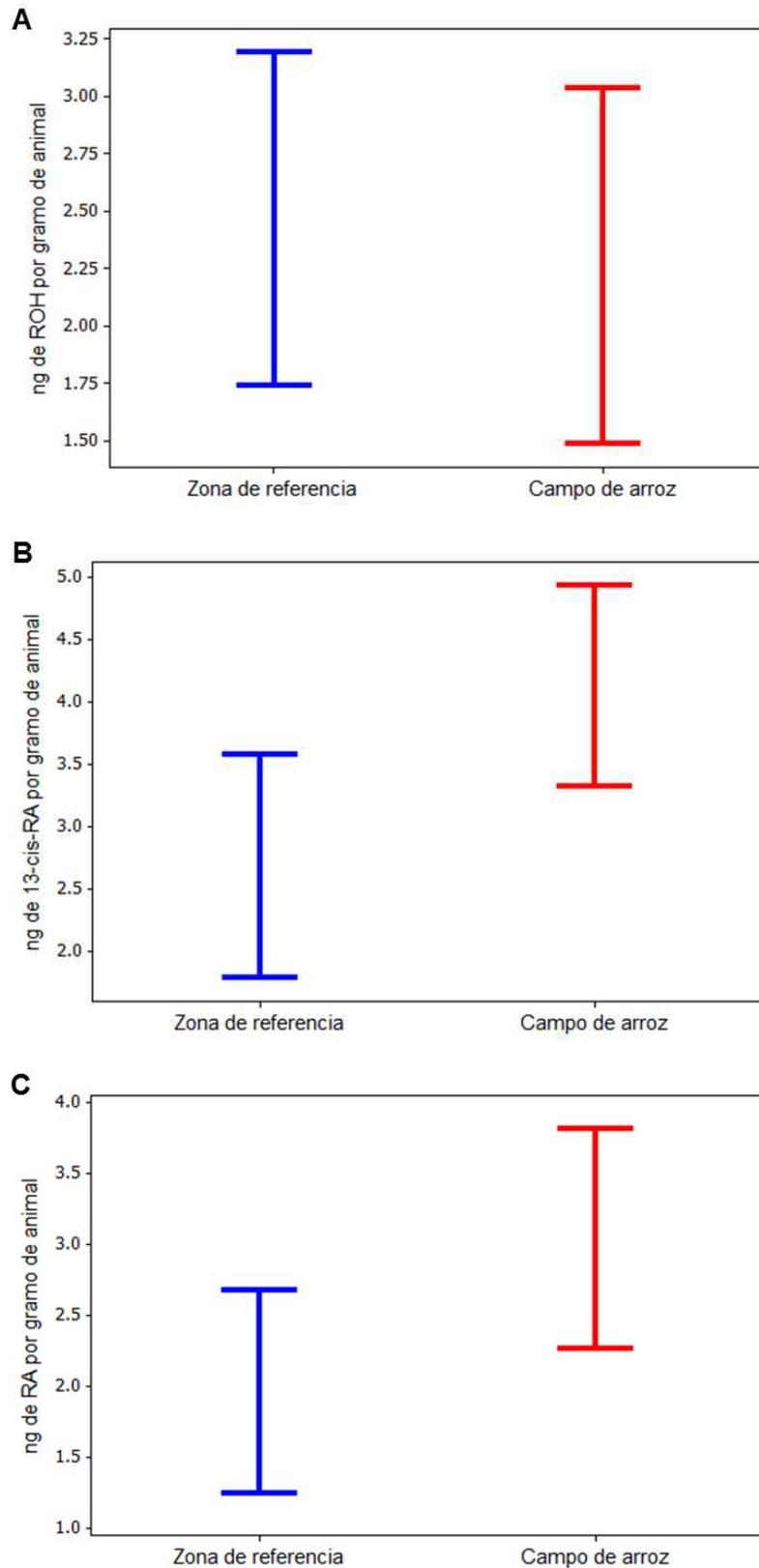


Figura 11. A) ng de ROH por gramo de animal. **B)** ng de 13-cis-RA por gramo de animal. **C)** ng de RA por gramo de animal. En azul, zona control; en rojo, campo de arroz.

Por otro lado, como se comentó previamente, debido a que las concentraciones de RA y 13-cis-RA están directamente relacionadas con las concentraciones de ROH presentes en el organismo, se

realizó el análisis de estas relaciones, es decir 13-*cis*-RA/ROH y RA/ROH, observando un aumento de las diferencias entre zonas. En este sentido, los resultados mostraron relaciones de 13-*cis*-RA/ROH de 2.2 ± 0.2 , y de RA/ROH de 1.5 ± 0.1 , en el campo de arroz; y de 13-*cis*-RA/ROH de 1.09 ± 0.08 y de RA/ROH de 0.78 ± 0.06 , en la zona control. Mediante la aplicación del test *t*, se comprobó que las relaciones de 13-*cis*-RA/ROH y RA/ROH varían significativamente de acuerdo a la zona, en el caso de 13-*cis*-RA/ROH con valores de $t = 4.20$ y de $p = 0.0004$; y en el de RA/ROH con valores de $t = 4.60$ y de $p = 0.0001$ (Figura 12 A y 12 B).

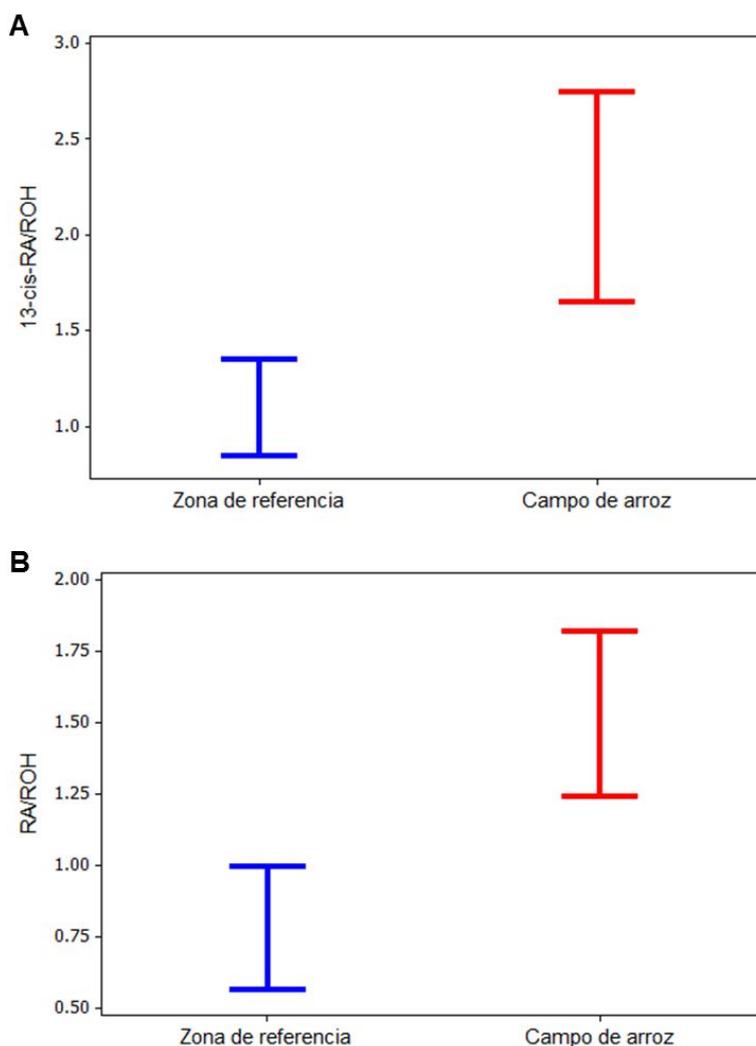


Figura 12. A) Relación entre las concentraciones de 13-*cis*-RA y ROH. **B)** Relación entre las concentraciones de RA y ROH. En azul, zona control; en rojo, campo de arroz.

La Figura 13 muestra los cromatogramas de una muestra perteneciente a la zona de referencia y otra al campo de arroz.

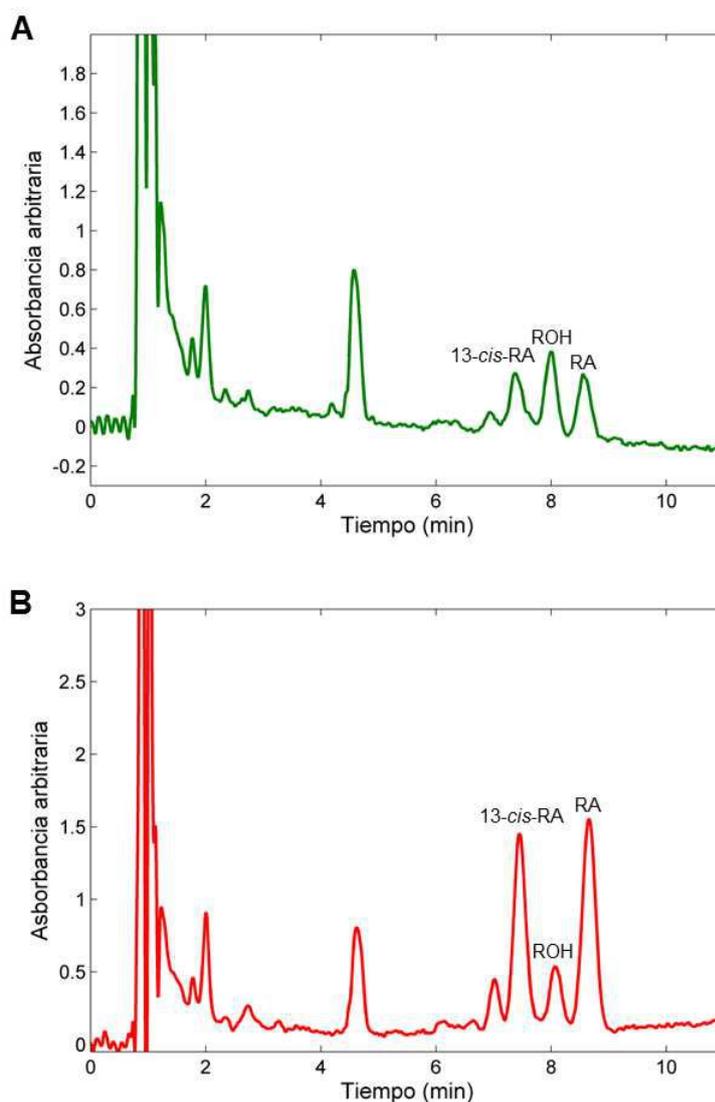


Figura 13. A) Plasma de una muestra de *L. chaquensis* perteneciente a la zona de referencia. **B)** Plasma de una muestra de *L. chaquensis* perteneciente al campo de arroz.

1.4.5. Discusión

Una especie bioindicadora puede definirse como cualquier organismo doméstico o silvestre, animal o vegetal, que puede utilizarse como un indicador del estado de los recursos y la calidad del medio, teniendo en cuenta su sensibilidad, posición en una comunidad, la probabilidad de exposición, su distribución geográfica y ecológica. De acuerdo a estas características, los anfibios se consideran buenos indicadores de la salud del ecosistema, ya que su ciclo de vida bifásico (agua-tierra), la permeabilidad de su piel, su restringida área de acción y sus limitadas habilidades de dispersión, los hace especialmente vulnerables a las perturbaciones o modificaciones del ambiente [150-152].

En los últimos años, el estudio de retinoides en diferentes sistemas, mamíferos, aves y peces, demostró que las variaciones en las concentraciones de estos compuestos generan problemas

asociados con inhibición del crecimiento, disminución de la supervivencia embrionaria y anomalías morfológicas, junto con varios efectos sobre la reproducción y las funciones fisiológicas en adultos [153,154]. Sin embargo, hasta el momento se evidencian pocos estudios de esta índole en anfibios [155,156].

De los resultados obtenidos en la presente tesis, se puede concluir que la concentración de ROH tanto en la zona de referencia como en el campo de arroz no varía significativamente. En este sentido, se puede inferir que los valores normales, en individuos adultos de la especie *L. chaquensis*, de ROH en circulación rondan los valores mencionados, e, independientemente de la zona de donde provengan los individuos y de su ingesta, las concentraciones de ROH se mantendrían constantes y en los niveles informados. Como primera aproximación, se puede concluir la exposición a los contaminantes en esta zona generan cambios en la vía del ácido retinoico en etapas de la vía posteriores a la generación de ROH [157].

Con respecto a las concentraciones de RA, se observó un aumento marcado en los individuos pertenecientes a la zona de cultivo. Este metabolito, cuya formación proviene directamente de ROH, es fundamental durante el camino de señalización en embriones, y su incremento tiene consecuencias en procesos teratogénicos [158]. En este punto, existen evidencias científicas del efecto que ejercen ciertos contaminantes ambientales sobre la vía de señalización del ácido retinoico tanto en ambientes acuáticos como terrestres [159]. Por ejemplo, Lemaire y colaboradores [160] concluyen que los compuestos endosulfán, dieldrina y aldrin son capaces de unirse a los receptores del ácido retinoico (RAR) e inducir la transcripción génica, por lo que a nivel plasmático se observaría un aumento en la concentración de RA, ya que su metabolización mediada por receptores estaría disminuida. En este sentido, Paganelli y colaboradores [66] demostraron que la exposición de renacuajos *Xenopus laevis* a formulaciones de herbicidas, como el glifosato y compuestos basados en glifosato, incrementa la actividad endógena de RA y, posteriormente, estos desbalances se relacionaron con efectos teratogénicos y carcinógenos. En efecto, experimentos en los que se expuso a sapos comunes Europeos (*Rana temporaria*) a *p,p'*-DDE (del inglés *dichlorodiphenyldichloroethylene*) mostraron un incremento en la dosis/respuesta del RA hepático [161]. Por otro lado, el triamifon, un fungicida sintético, produce malformaciones craneofaciales en *Xenopus laevis* por alteración de la señalización del RA [162]. A su vez, la atrazina produce efectos teratogénicos y disminuye la concentración de la transcriptasa *cyp26* en renacuajos de *Xenopus*, sugiriendo que este herbicida también desbarata el camino de señalización del RA [163,164].

A pesar de que muchos de estos estudios se llevaron a cabo bajo condiciones de laboratorio, permiten inferir acerca de la relación de la concentración de RA con la exposición a diferentes contaminantes y estimar las concentraciones de RA en *L. chaquensis* en campo.

Además, en las muestras analizadas se observó un aumento de las concentraciones del compuesto 13-*cis*-RA. Como se comentó previamente, los isómeros de RA son intermediarios en la activación o desactivación del RA. Mayoritariamente, los incrementos en las concentraciones de estos isómeros están ligados a inhibiciones de la función del ciclo visual, produciendo ceguera nocturna en mamíferos [165,166]. Hasta la fecha existen pocos estudios sobre los efectos del incremento de los isómeros *cis* en anfibios, y los resultados expresan efectos tóxicos agudos, alta teratogenicidad en embriones, e inducción de diferentes fenotipos de malformaciones mediante la interrupción de las señales mediadas por RA [155,167]. Por esta razón, resulta de sumo interés el estudio conjunto de las isoformas de RA, tanto como el estudio de ROH y RA *per se*, no solamente en embriones y larvas, sino también en anfibios adultos.

Por otro lado, el análisis de la relación entre RA o 13-*cis*-RA y ROH resulta interesante, ya que las variaciones en las concentraciones de RA o 13-*cis*-RA pueden deberse tanto a: 1) un deterioro en su metabolización, 2) la sobreproducción a través de la conversión de ROH o 3) la falta de unión a los receptores específicos de RA (RAR), eventos que consecuentemente alteran la cascada de señalización [66]. Los valores de las relaciones RA/ROH y 13-*cis*-RA/ROH obtenidos durante el análisis de las muestras refuerza la diferenciación existente entre las zonas en estudio.

A pesar de que el número de individuos analizados es moderado, los resultados demuestran que las ranas que habitan en campos de arroz poseen alteraciones en las concentraciones de retinoides en circulación, proponiéndose que estas alteraciones pueden estar relacionadas con la exposición de los animales a ciertos pesticidas. Es importante resaltar que los compuestos habitualmente utilizados durante los cultivos pueden asemejarse estructuralmente a una variedad de componentes que regulan la cascada de señalización de RA, siendo posibles causales de las modificaciones encontradas [66]. Estos resultados en campo ponen en evidencia la necesidad de realizar un monitoreo exhaustivo de los potenciales perturbadores de la vía de señalización de RA ampliando el estudio a otras zonas y especies autóctonas.

RESULTADOS Y DISCUSIONES



MÉTODO 2: ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO DE ÁCIDO RETINOICO Y SUS ISÓMEROS

“¿Qué pasa si nos juntamos?”

1.5. Método 2: análisis quimiométrico de ácido retinoico y sus isómeros

El objetivo general del siguiente desarrollo cromatográfico fue disminuir el tiempo total del cromatograma, sin perder la capacidad de diferenciar los isómeros del RA mediante la utilización de herramientas quimiométricas. A su vez, como se decidió analizar tanto RA como sus isómeros, se utilizó la información previamente recabada relacionada con los valores de concentración de cada compuesto.

Con base en las condiciones cromatográficas optimizadas en el *Método 1*, se realizaron cambios en los parámetros cromatográficos para obtener picos superpuestos, y recurrir a la resolución matemática mediante modelado quimiométrico. La implementación de las condiciones descritas en la sección Metodología (apartado 1.3.7), dio origen a cromatogramas en los que se observan superposiciones temporales entre los analitos y la matriz, con un tiempo final de análisis de 5.5 minutos. La Figura 14 muestra el gráfico de una matriz de datos de una muestra de plasma conteniendo $4.99 \mu\text{g mL}^{-1}$ de RA, $5.37 \mu\text{g mL}^{-1}$ de 13-*cis*-RA, $2.23 \mu\text{g mL}^{-1}$ de 9-*cis*-RA y $2.49 \mu\text{g mL}^{-1}$ de 9,13-di-*cis*-RA. Esta matriz de datos de segundo orden se obtuvo al recolectar los espectros en función de los tiempos de elución. Como puede apreciarse entre los 2.8 y 4.6 minutos existe una superposición de los cuatro analitos entre sí y con componentes del plasma, es decir existe una separación parcial de los componentes de la muestra.

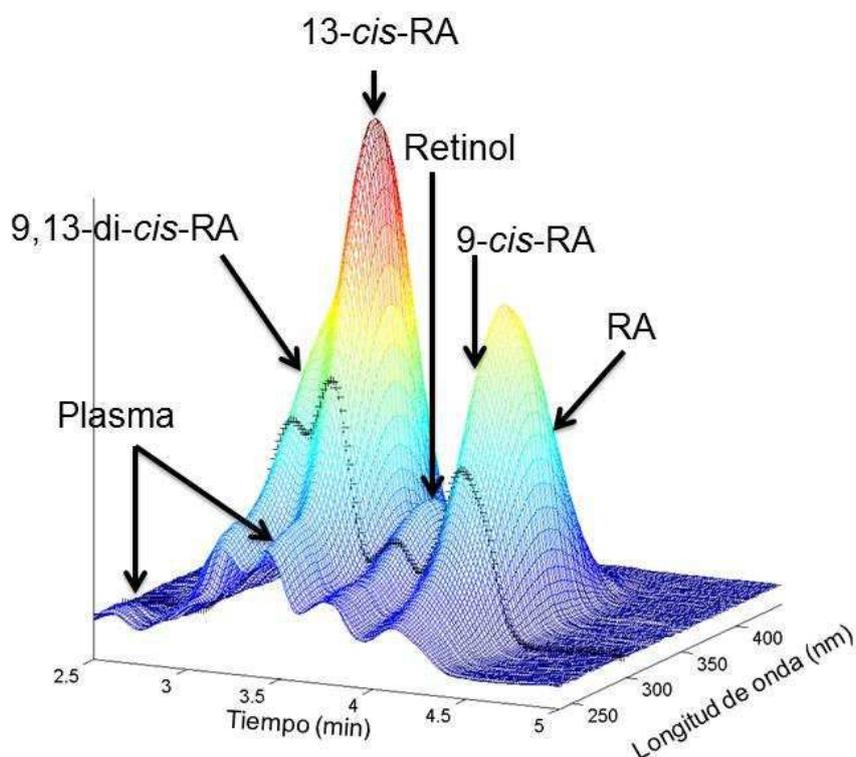
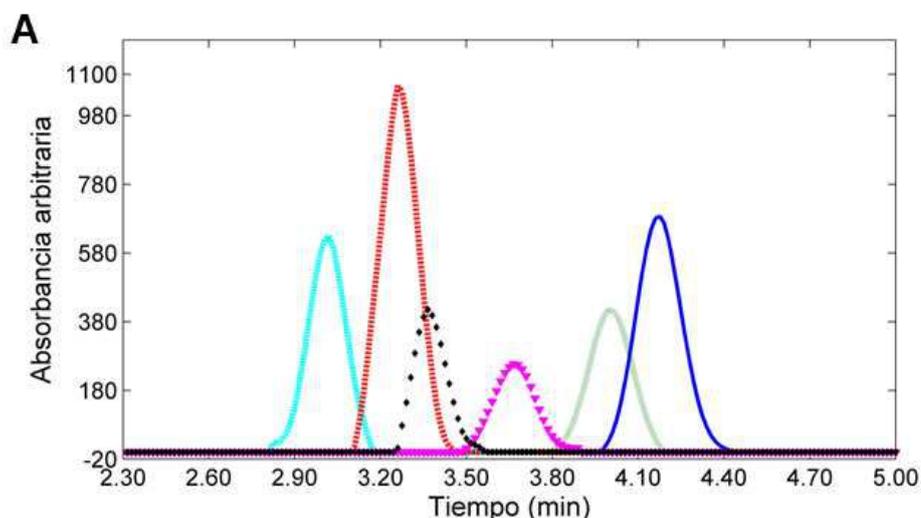


Figura 14. Gráfica de datos de segundo orden correspondiente a una muestra de plasma adicionado con una solución estándar para llegar a concentraciones de RA de $4.99 \mu\text{g mL}^{-1}$, 13-*cis*-RA de $5.37 \mu\text{g mL}^{-1}$, 9-*cis*-RA de $2.23 \mu\text{g mL}^{-1}$ y 9,13-di-*cis*-RA de $2.49 \mu\text{g mL}^{-1}$. La línea negra corresponde al cromatograma recolectado a 280 nm.

1.5.1. Análisis mediante MCR-ALS

Para poder analizar los datos a través del algoritmo MCR-ALS, el primer paso en el modelado consistió en la construcción de la matriz de datos aumentada (\mathbf{D}_{aug}) en el modo temporal, apilando las matrices de datos correspondientes a cada muestra de validación seguidas por aquellas de los estándares de cada analito. Consecuentemente, las dimensiones de cada matriz aumentada construida fueron 5025×102 , donde 5025 es el producto de 25 (24 matrices de las soluciones estándares para ocho niveles de concentración, por triplicado, más una matriz correspondiente a la muestra incógnita) por 201 (número de puntos temporales del cromatograma) y 102 es el número de longitudes de onda registradas mediante DAD.

Las estimaciones iniciales en espectro necesarias para comenzar la resolución mediante MCR-ALS se obtuvieron mediante la selección de los espectros puros [31]. Por su parte, el número de especies contribuyentes al sistema determinada por SVD fue siempre igual al número real de componentes, es decir cuatro componentes para los estándares (ver más abajo), y seis para las muestras de plasma adicionadas, correspondientes a los 4 analitos en estudio, el ROH y un componente extra del plasma. La Figura 15 A muestra el perfil de concentraciones de los seis componentes mencionados y la Figura 15 B los espectros correspondientes. Como se puede apreciar, ocurre un solapamiento importante, especialmente en los espectros de RA y 13-*cis*-RA. Sin embargo, el modelado de MCR-ALS permite obtener resultados aceptables debido a que estos componentes tienen una diferenciación temporal completa y el solapamiento espectral no es completo.



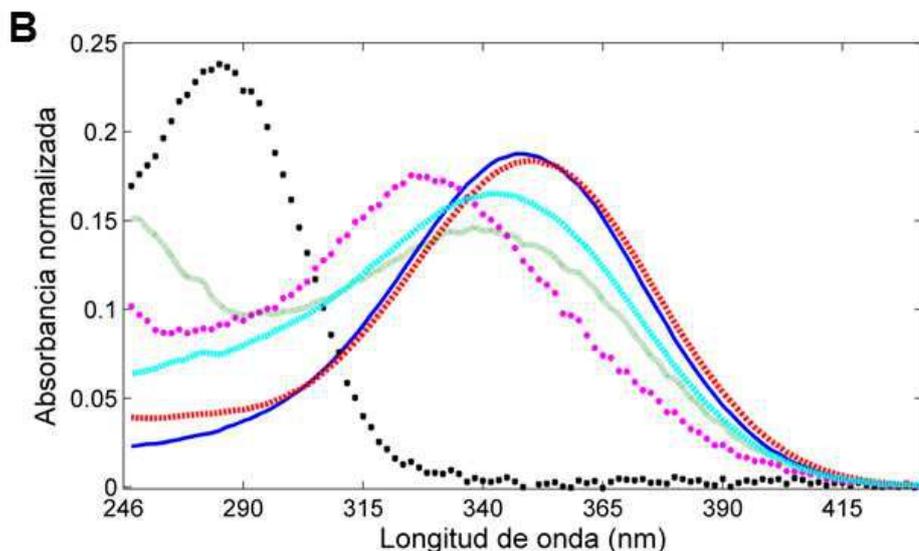


Figura 15. A) Perfiles de concentración y B) perfiles espectrales obtenidos por MCR-ALS. Referencias: 9,13-di-cis-RA, línea celeste); 13-cis-RA, línea discontinua roja; ROH, triángulos magentas; 9-cis-A, puntos verdes; RA, línea azul; y un interferente del plasma, puntos negros.

Luego de la descomposición de la matriz D_{aug} , se construyeron las curvas de regresión pseudounivariada de las áreas vs las concentraciones de los analitos.

1.5.2. Validación del método

Rango lineal

Para evaluar linealidad, las curvas se construyeron en ocho niveles ($n = 3$). El análisis se realizó utilizando las áreas bajo la curva de los perfiles de concentración obtenidos mediante MCR-ALS, mostrando en todos los casos una relación lineal satisfactoria ($r^2 > 0.999$) entre 0.25 y 7.55 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para RA, 0.27 y 8.14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 13-cis-RA, 0.11 y 3.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 9-cis-RA, y 0.11 y 3.79 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 9,13-di-cis-RA; los resultados de calibración se listan en la Tabla 8. Con el propósito de verificar la linealidad se realizó un test F de falta de ajuste [147,168].

Tabla 8. Resultados de calibración.

Variable	Valor experimental ^a			
	RA	13-cis-RA	9-cis-RA	9,13-di-cis-RA
Rango lineal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.25-7.55	0.27-8.12	0.11-3.37	0.12-3.76
Ordenada al origen	-133.6 (6.0)	-1.6 (7.4)	77.3 (7.6)	6.6 (3.1)
Pendiente	571.3 (1.4)	578.6 (1.6)	535.9 (4.0)	512.0 (3.1)
F_{exp}^b	2.25	2.20	1.56	2.23
r^2	0.999	0.999	0.999	0.999
Falta de ajuste (valor p) ^c	0.113	0.114	0.339	0.144

^a El valor entre paréntesis indica la desviación estándar.

^b $F_{tab}=3.80$.

^c Debido a que el valor de p de la falta de ajuste es mayor o igual a 0.10, el modelo resulta ser adecuado para los datos evaluados.

Para verificar la homocedasticidad de los datos de calibración, para cada analito, se aplicó el *test de Levene*, revelando no diferencias significativas entre las varianzas de las diferentes concentraciones de los estándares ($p > 0.05$), confirmando homocedasticidad de los datos. A su vez, la homocedasticidad se comprobó al observar la gráfica de residuos, debido a que los valores residuales se distribuyeron aleatoriamente sobre la línea de regresión sin mostrar tendencia [169].

Límites de detección y cuantificación

Para realizar el cálculo de los límites de detección y cuantificación se utilizaron dos técnicas, determinación mediante la curva de calibrado [81,88] y siguiendo los lineamientos de Bauza y colaboradores [95], los resultados se resumen en la Tabla 9. Los LOD y LOQ obtenidos resultan adecuados para medir los niveles de RA y 13-*cis*-RA requeridos, teniendo en cuenta estudios de biodisponibilidad que indican que las concentraciones esperadas se encontrarían entre 0.20 y 1.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [170].

Tabla 9. Valores de LOD y LOQ

Parámetro	Criterio	Valor experimental ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
		RA	13- <i>cis</i> -RA	9- <i>cis</i> -RA	9,13-di- <i>cis</i> -RA
LOD	Curva de calibrado	0.071	0.086	0.037	0.041
	MCR-ALS	0.080	0.090	0.041	0.056
LOQ	Curva de calibrado	0.207	0.251	0.108	0.119
	MCR-ALS	0.240	0.273	0.125	0.169

Precisión

Los resultados obtenidos se listan en la Tabla 10. De este estudio se puede concluir que la precisión del método es excelente, considerando que, como se comentó previamente, para bioanálisis los valores aceptables de CV% son $\leq 15\%$, excepto para el LOQ, que debe ser $\leq 20\%$ [116].

Tabla 10. Resultados obtenidos en el estudio de precisión

Variable	Valor experimental para nivel bajo (B) y alto (A)							
	RA		13- <i>cis</i> -RA		9- <i>cis</i> -RA		9,13-RA	
	B	A	B	A	B	A	B	A
Precisión intraensayo CV%	3.5	3.1	3.5	1.5	4.6	2.7	5.2	2.7
Precisión interensayo CV%	3.8	3.0	2.9	2.4	3.2	2.9	3.6	3.2
Valor de p^a	0.353	0.261	0.186	0.499	0.258	0.825	0.072	0.223

^a Debido a que el valor de p es mayor o igual a 0.05, no hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores promedios.

De igual manera que durante la validación del *Método 1*, para evaluar la precisión interensayo se analizó la varianza, obteniéndose valores de $p < 0.05$ (Tabla 10), lo que permitió concluir, con un nivel de confianza de 0.95, que no existen diferencias estadísticamente significativas para cada

analito en las tres semanas estudiadas. Además, la homocedasticidad se corroboró aplicando el test estadístico de Bartlett, según el cual no existen diferencias significativas entre las varianzas ($p > 0.05$) [149].

Exactitud

La recuperación se evaluó en plasmas basales adicionados con una cantidad conocida de solución estándar al comienzo del procedimiento de preparación [119].

Para el análisis de esta propiedad analítica, se prepararon cinco niveles de concentración por triplicado con el objetivo de construir curvas de calibración en matriz, y de esta manera poder comparar las pendientes de las curvas con las obtenidas durante la calibración. La Figura 16 muestra las gráficas correspondientes a las curvas de las soluciones estándares junto con las obtenidas considerando la matriz. Mediante este estudio se comprobó por un lado la linealidad, y debido a que la comparación de las pendientes en ambas situaciones no presentó diferencias significativas, se concluyó que la matriz no interfiere en la determinación de los analitos.

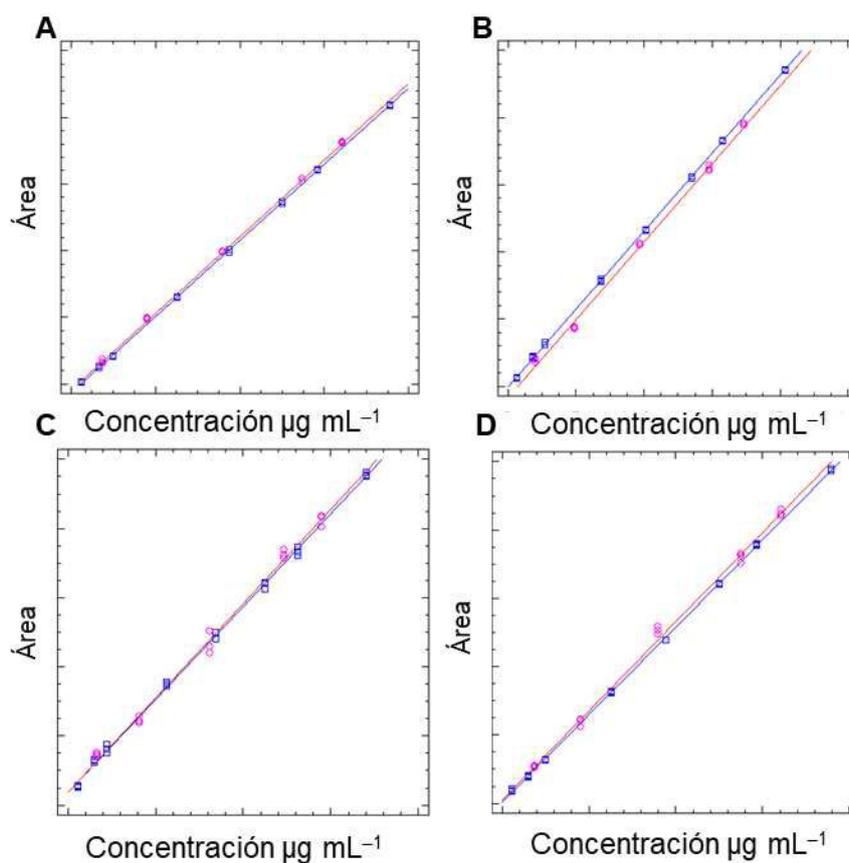


Figura 16. Curvas de calibrado correspondientes a: **A)** RA, **B)** 13-*cis*-RA, **C)** 9-*cis*-RA y **D)** 9,13-di-*cis*-RA. En azul, estándar en metanol; en magenta, soluciones correspondientes al estudio de exactitud.

A continuación, se evaluaron las concentraciones nominales vs los valores predichos de acuerdo al test E]CR [82]. Como se puede apreciar en la Figura 17, el dominio elíptico para cada

analito contiene a los valores teóricos de pendiente (1) y ordenada al origen (0), lo que indica la ausencia de tendencia.

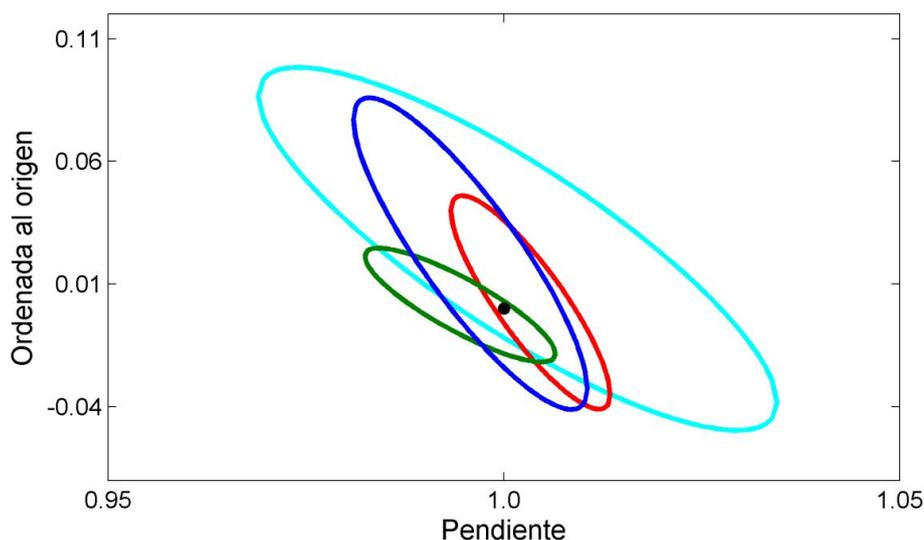


Figura 17. Test EJC para la predicción de los resultados del ensayo de exactitud considerando los valores nominales versus los predichos. Referencias: 9,13-*cis*-RA, línea celeste; 13-*cis*-RA, línea roja; 9-*cis*-RA, línea verde; y RA, línea azul.

Robustez

Luego de realizar los experimentos sugeridos por el diseño experimental Plackett-Burman, se registraron como respuestas el número de picos y el tiempo final. Durante el análisis de las respuestas se concluyó que las pequeñas variaciones en los cuatro factores tienen un efecto significativo sobre el tiempo final del cromatograma, aunque el número de picos no varía. Sin embargo, a pesar del efecto sobre el tiempo de análisis, los perfiles de los analitos pudieron ser correctamente recuperados y cuantificados en todos los experimentos, lo que permitió concluir que el método es robusto en los límites evaluados.

1.5.3. *Análisis de muestras reales*

Para verificar la aplicabilidad del método se analizaron 25 muestras pertenecientes a pacientes en tratamiento con Isotretinoína. El análisis de las concentraciones de los analitos revela que las especies predominantes son: 13-*cis*-RA (35.8-53.4%), RA (23.2-43.4%), 9,13-di-*cis*-RA (10.2-20.1%) y 9-*cis*-RA (2.6-13.0%). Este hallazgo es consistente con el hecho de que el ingrediente activo del fármaco (13-*cis*-RA) sigue la vía del RA [67]. A su vez, las concentraciones de 13-*cis*-RA se encuentran en el rango de 0.20 y 1.30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, niveles que se condicen con los reportados por Wu y colaboradores al analizar plasma humano por cromatografía líquida con espectrometría de masas [171]. Mediante este estudio preliminar es posible concluir sobre los beneficios del estudio de las concentraciones de retinoides en pacientes en tratamiento, ya que se observaron diferencias tanto en las

concentraciones como en los compuestos encontrados. Este análisis plantea la necesidad de realizar estudio multidisciplinarios, con el objetivo de generar terapias particulares para los pacientes.

1.5.4. Comparación de métodos

Finalmente, con el objetivo de comparar las dos metodologías desarrolladas (*Método 1* y *Método 2*) se analizaron los 25 plasmas de pacientes en tratamiento con Isotretinoína Roaccutan y, posteriormente, se utilizó el test EJC [82] para realizar la comparación. En este sentido, resulta interesante observar que durante el análisis por el *Método 1* el analito 9-*cis*-RA no pudo ser cuantificado adecuadamente, debido a la superposición de este pico con ROH. Por lo que solamente tres elipses contienen los valores teóricamente predichos de la pendiente (1) y la ordenada al origen (o) (Figura 18). Esta observación indica que ambos métodos proveen resultados comparables para RA, 13-*cis*-RA y 9,13-di-*cis*-RA, no así para 9-*cis*-RA, que solo puede ser correctamente cuantificado mediante el *Método 2*. La Tabla 11 muestra los resultados obtenidos.

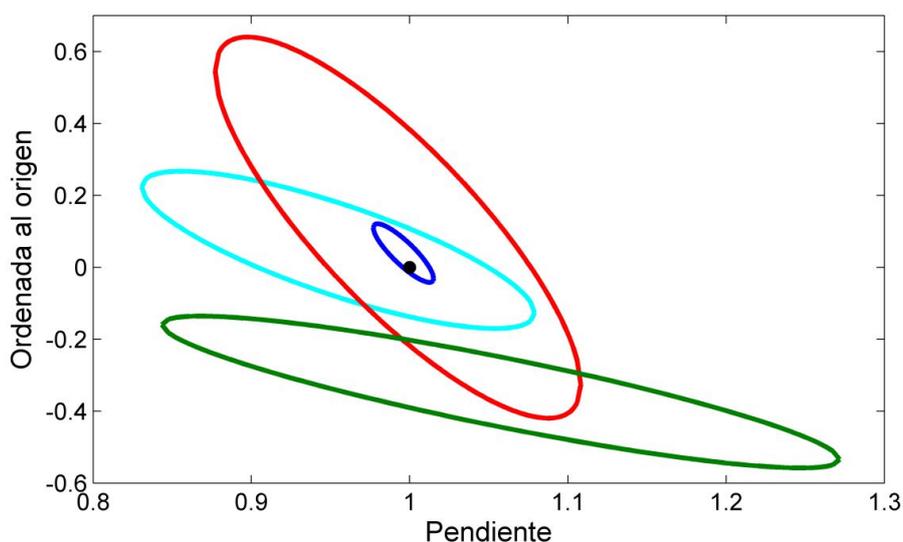


Figura 18. Test de la región elíptica de confianza conjunta para la predicción de los resultados de 25 muestras reales cuando se comparan los métodos desarrollados. Referencias: 9,13-*cis*-RA, línea celeste; 13-*cis*-RA, línea roja; 9-*cis*-RA, línea verde; y RA, línea azul.

Tabla 11. Concentraciones obtenidas luego de analizar 25 muestras de pacientes en tratamiento mediante ambos métodos desarrollados.

Muestras	RA		13- <i>cis</i> -RA		9- <i>cis</i> -RA		9,13-di- <i>cis</i> -RA	
	Mét. 1	Mét. 2	Mét. 1	Mét. 2	Mét. 1	Mét. 2	Mét. 1	Mét. 2
1	0.895	0.793	1.203	1.411	0.352	0.151	0.361	0.288
2	0.886	0.940	1.173	1.355	0.290	0.160	0.509	0.439
3	1.546	1.336	2.018	1.620	0.574	0.200	0.578	0.650
4	1.466	1.640	1.881	1.892	0.775	0.196	0.498	0.560
5	1.398	1.637	1.782	1.944	0.741	0.226	0.534	0.430
6	1.690	1.785	2.241	2.030	0.613	0.120	0.650	0.578
7	4.900	4.624	6.086	5.581	1.384	1.179	1.900	2.678
8	0.662	0.598	0.707	0.734	0.459	0.146	0.334	0.355
9	0.795	0.922	0.977	1.083	0.484	0.182	0.488	0.540
10	0.889	0.893	0.980	1.015	0.421	0.331	0.398	0.307
11	1.158	1.324	1.646	1.766	0.543	0.212	0.668	0.612
12	1.453	1.648	2.067	2.018	0.598	0.228	0.859	0.981
13	1.780	2.085	2.173	2.292	0.573	0.152	0.815	0.846
14	1.559	1.816	2.171	2.371	0.553	0.139	0.871	0.760
15	1.970	2.068	3.672	3.695	0.753	0.292	1.226	1.163
16	7.033	6.388	7.274	7.886	1.798	1.173	3.693	3.541
17	6.298	5.356	6.894	7.699	1.427	1.088	2.662	2.491
18	2.654	2.405	4.636	3.642	0.674	0.204	1.212	1.529
19	7.565	6.664	8.200	7.981	1.787	1.686	3.703	3.082
20	4.108	3.487	6.974	7.854	1.336	1.259	2.710	2.437
21	4.456	5.347	3.950	4.414	0.835	0.834	1.533	1.722
22	5.879	7.346	8.839	7.349	1.329	0.943	2.356	1.897
23	2.364	2.843	2.963	3.488	0.716	0.529	1.203	1.119
24	5.980	6.195	7.845	8.023	1.664	1.633	3.397	3.653
25	5.012	6.546	6.056	7.338	1.189	1.201	2.834	2.174

1.6. Conclusiones

Debido a sus características teratogénicas, el control de ácido retinoico y sus isómeros resulta de sumo interés en sistemas biológicos. En este sentido, durante el presente capítulo se planteó el desafío de desarrollar métodos cromatográficos que permitan cuantificar retinoides en plasma, tanto de anfibios (*L. chaquensis*) como de pacientes humanos bajo tratamiento dermatológico.

En principio, para cumplir con los objetivos planteados se desarrolló un método cromatográfico que permitió la separación completa del ácido retinoico y sus isómeros. En este punto se realizó la validación completa del método, haciendo hincapié en las diferentes técnicas existentes en la literatura para la obtención de los límites de detección y cuantificación. Como conclusión, resulta importante resaltar que los parámetros necesarios para realizar una validación dependen exclusivamente de los objetivos que persiga el analista. Con respecto a la determinación de los límites de determinación y cuantificación, se debe recordar que existe una variedad de técnicas aceptadas, pero resulta importante que el analista defina una metodología que se acerque a las limitaciones instrumentales y al sistema en estudio. Por último, la definición final del LOD y del LOQ debe realizarse comprobando en forma experimental el valor obtenido, para asegurar la objetividad y la veracidad de los datos informados.

En este punto, la validación del método permitió su posterior aplicación para cuantificar retinoides en muestras de *L. chaquensis* pertenecientes a una zona control y un campo de arroz, llegándose a las siguientes conclusiones:

- 1- Las concentraciones de retinol no presentan diferencias significativas entre las zonas, por lo que posiblemente los individuos estuvieron expuestos a compuestos que no actúan en la vía del ácido retinoico antes de la generación de retinol. A su vez, es probable que los valores de retinol encontrados en las dos zonas correspondan a los valores normales de retinol de esta especie.
- 2- El aumento en las concentraciones de ácido retinoico y 13-*cis*-ácido retinoico en las muestras tomadas en el campo de arroz, se deben a la influencia de los compuestos sobre la vía de conversión del ácido retinoico. En este sentido, los estresores posiblemente interactúen con los receptores celulares o en etapas de la cascada posterior a la conversión de la vitamina A en retinol.
- 3- Debido a la dependencia entre los compuestos retinol-ácido retinoico, el análisis de las relaciones ácido retinoico/retinol y 13-*cis*-ácido retinoico/retinol permitió realizar un estudio minucioso sobre la tasa de conversión de retinoides. Por lo tanto, el aumento de la concentración de 13-*cis*-RA y RA puede estar relacionado con un aumento en la tasa de conversión o con un problema en la degradación de los retinoides, efectos que desatan mecanismos teratogénicos.

Por otra parte luego de la optimización de las condiciones cromatográficas del *Método 2*, gracias a las ventajas del algoritmo quimiométrico utilizado, se detectaron y cuantificaron tanto ácido retinoico como sus isómeros en presencia de compuestos inesperados. En este sentido, en presencia de compuestos inesperados, el análisis de datos de segundo orden resulta una herramienta exitosa en la determinación de ácido retinoico y sus isómeros en plasma. A nivel experimental, se redujo el tiempo de análisis, generándose cromatogramas en 5.5 minutos, lo que permitió disminuir considerablemente el consumo de solventes respecto al primer sistema desarrollado. La principal ventaja que se obtuvo luego de la aplicación de MCR-ALS fue la capacidad de detectar y cuantificar en forma simultánea retinol y 9-*cis*-ácido retinoico, compuestos que coelúan cuando se aplicaba el *Método 1*.

Con respecto al estudio de las concentraciones de ácido retinoico y sus isómeros en pacientes en tratamiento con Isotretinoína Roaccutan, resulta de suma importancia realizar su monitoreo y seguimiento, sobre todo teniendo en cuenta los efectos teratogénicos que estos compuestos pueden generar. En la actualidad, los pacientes en tratamiento deben realizar un monitoreo mensual de los niveles de enzimas hepáticas, triglicéridos, colesterol y un análisis bioquímico completo, incluyendo para las mujeres un test de embarazo, que de resultar positivo, obliga al médico tratante a la

suspensión del tratamiento. De los resultados, un aumento en los componentes analizados genera la suspensión inmediata del tratamiento. Por estos motivos, el estudio de las concentraciones de retinoides debería realizarse en forma rutinaria con el fin de poder definir concentraciones óptimas y evitar los problemas relacionados con su teratogeneidad. En conclusión, el método desarrollado se presenta como una alternativa rápida, económica y con posibilidad de aplicación para el monitoreo de retinoides en muestras de plasma por parte de laboratorios especializados.

CAPÍTULO 2



DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE USO VETERINARIO EN MUESTRAS DE INTERÉS BIOLÓGICO. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS CON POSTERIOR DESARROLLO DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

2.1. Objetivos:

- 1) Desarrollar métodos analíticos empleando cromatografía líquida con detección de arreglo de diodos y fluorescencia de barrido rápido para determinar principios activos de uso veterinario en matrices complejas como cama de pollo y huevo.
- 2) Implementar estrategias de extracción optimizadas mediante diseño de experimentos.
- 3) Aplicar algoritmos de preprocesamiento de la señal para mejorar la calidad de los datos.
- 4) Generar datos de orden superior y procesarlos con algoritmos quimiométricos apropiados.
- 5) Validar los métodos según normas internacionales, para su aplicación en áreas de interés.

2.2. Introducción:

Durante las últimas décadas, la crianza intensiva de animales se vio estimulada por las necesidades alimenticias de la población. Independientemente de los efectos beneficiosos de este tipo de crianzas, uno de los problemas que debe afrontar esta práctica es el control de epidemias. Dentro de las enfermedades recurrentes que afectan el sistema aviar, la coccidiosis, enfermedad amebiode contagiosa producida por protozoos *Eimeria sp.* que afecta comúnmente a animales jóvenes, es la más común [172,173]. Para prevenir su expansión se administran coccidiostatos [174], como nicarbazina (NICA), mezcla equimolecular de *N,N'*-bis(4-nitrofenil)urea, también conocida como 4,4'-dinitrocarbanilida (DNC), y 2-hidroxy-4,6-dimetilpirimidina (HDP) [173]. DNC es el principio activo, mientras que HDP juega un rol en su biodisponibilidad [175], ya que cumple la función de incrementar la absorción intestinal de DNC, permitiendo que el complejo DNC:HDP sea 10 veces más potente en el control de *Eimeria sp.* que DNC por si solo [176,177].

Generalmente durante la crianza se administran, no solo coccidiostatos, sino también una variedad de medicamentos veterinarios, que representan un grupo variado de compuestos diseñados para prevenir, curar y tratar enfermedades e infecciones [178]. A su vez estos compuestos pueden utilizarse para mejorar la eficiencia de la alimentación y actuar como promotores de crecimiento [179,180].

Al estudiar el sistema digestivo aviar, resulta interesante destacar que la mayoría de los principios activos administrados por vía oral no se absorben en el intestino y, en consecuencia cantidades sustanciales (hasta un 90%) se excretan sin cambios en orina y heces [179,181].

Debido a la utilización de una variedad de compuestos, en concentraciones también variables, un tema en continuo estudio es la determinación de trazas de estos principios activos en productos para consumo humano, ya que hasta el momento no se sabe a ciencia cierta cómo se ven afectados los consumidores luego de su ingesta. En algunos casos se estima que la presencia de diversos compuestos puede provocar reacciones alérgicas o inducir la resistencia a patógenos [69,182]. Es

importante mencionar que resulta pertinente extender la evaluación de los residuos de principios activos, no solo a tejidos o productos alimentarios, sino también a diferentes matrices ambientales, en particular suelo, agua y sedimentos acuáticos, ya que varios estudios han demostrado la presencia de numerosas clases de compuestos en estos sistemas [183-185]. En el suelo, estos se introducen principalmente a través de la aplicación de abono o lodos conteniendo heces [185,186], y la mayoría se absorben y no se degradan fácilmente [186]. Además, los principios activos pueden ingresar a las plantas mediante el sistema radicular, lo que implica riesgos potenciales para su crecimiento, y para la fauna terrestre que las consume [187]. La disposición de los principios activos en el ambiente es variable y depende de varias circunstancias, las cuales se ejemplifican en la Figura 19.

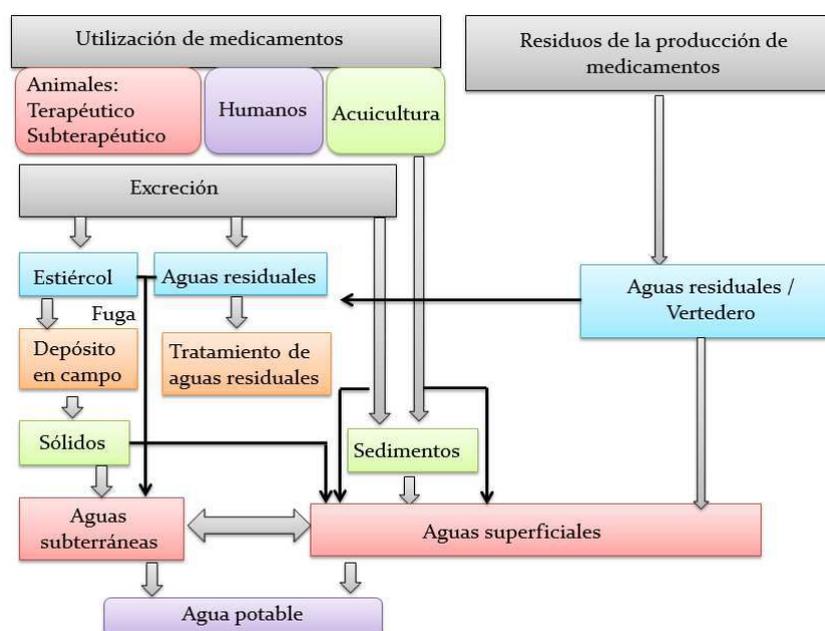


Figura 19. Circuito de principios activos desde su producción hasta su disposición final.

Por su parte, el conocimiento de las características fisicoquímicas de los principios activos evaluados resulta de suma importancia, ya que esta información permite seleccionar el sistema cromatográfico óptimo y las condiciones necesarias para extraerlos de las matrices en las que se encuentran. Dentro de las características fisicoquímicas propias de un compuesto, las constantes de disociación ácida permiten entender y cuantificar fenómenos químicos tales como tasas de reacción, actividades biológicas, y destinos ambientales. A su vez, su conocimiento permite, por un lado, caracterizar a los ácidos y las bases débiles y por el otro predecir la distribución de las especies químicas de una droga en tejidos [188-190].

Existen diferentes metodologías que permiten determinar constantes de disociación, incluyendo el uso de titulaciones potenciométricas [191,192], espectroscopia UV-Vis [188,193], electroforesis capilar [194-196], cromatografía líquida [197,198], y ¹H-NMR [199]. En este rango de alternativas, la electroforesis capilar (EC) resulta conveniente para la caracterización de una

variedad de compuestos [189,196]. Un problema que presenta esta técnica es la adsorción de ciertos analitos y la baja reproducibilidad en el tiempo de migración, el cual se resuelve utilizando capilares recubiertos. En este sentido, existen diferentes procedimientos de recubrimiento para trabajar a valores bajos de pH [189,200]; entre los que se encuentran los recubrimientos dinámicos que pueden prepararse fácilmente adicionando el agente de recubrimiento al buffer de corrida (BGE, por *background electrolyte*) [189,201]. El uso de capilares recubiertos asegura un flujo electro osmótico alto y relativamente constante a cualquier valor de pH.

El método clásico para determinar los valores de pK_a mediante EC comprende el cálculo de la movilidad efectiva (μ_{eff}) de cada compuesto ionizable a diferentes valores de pH:

$$\mu_{eff} = \frac{L_d L_t}{V} \left[\frac{1}{t_a} - \frac{1}{t_{\text{flujo electroosmótico}}} \right] \quad (26)$$

donde L_d es el largo efectivo del capilar (es decir, la distancia en centímetros desde el inyector hasta el detector), L_t es el largo total del capilar (centímetros), V es el voltaje aplicado (Volt), t_a y $t_{\text{flujo electroosmótico}}$ son los tiempos de migración (segundos) del analito y del flujo electroosmótico, respectivamente [202]. Para estimar el tiempo de migración del flujo electroosmótico, se utilizan marcadores de movilidad neutra (sustancias que se comportan como compuestos neutros), como lo son acetona, metanol, dimetilformamida o dimetilsulfóxido. Posteriormente, los datos de μ_{eff} se ajustan a un modelo teniendo en cuenta los grupos ionizables del analito [190,203].

Entre los compuestos utilizados para realizar el recubrimiento del capilar se encuentra el cloruro de polidialildimetilamonio (PDDA, del inglés *poly(diallyldimethylammonium chloride)*) [204]; polímero lineal saturado polielectrolítico positivo transparente en la mayoría de las longitudes de onda del rango UV-Vis. Los capilares preparados con este compuesto tienen un flujo electroosmótico aniónico y estables entre valores de pH de 2.5 y 12.0, permitiendo tener tiempos de análisis cortos [205].

Como se comentó previamente, su versatilidad y sus características hacen de MCR-ALS una herramienta útil para extraer información cuantitativa y cualitativa de reactivos, intermediarios de reacción, y productos presentes en una reacción química [206]. Dado un sistema en el que los espectros de las especies ácidas, neutras y básicas son diferentes, es posible utilizar MCR-ALS para determinar valores de pK_a a partir de datos generados con gradientes de pH y detección DAD [207,208]. En estos casos, los parámetros de la Ec. 3 se definen teniendo en cuenta que, las filas de **D** contienen los perfiles UV-Vis (K longitudes de onda) en función del pH (J valores de pH), las columnas de **C** los perfiles de concentraciones de las N especies involucradas en el proceso, las columnas de **S** sus espectros relativos, y **E** es la matriz de los residuos [209].

En el presente caso, los datos experimentales se obtuvieron mediante EC con detección DAD, utilizando soluciones buffer a diferentes valores de pH durante las corridas electroforéticas. Como

se comentó previamente, debido a que MCR-ALS es incapaz de resolver la deficiencia de rango de los sistemas usando solo una matriz de datos, es necesario aumentar las matrices [210]. En esta oportunidad, el aumento se realizó en forma temporal, es decir, las matrices individuales correspondientes a las corridas electroforéticas (*I* tiempos) a pH fijos, se colocaron una encima de la otra. Las áreas bajo los perfiles de concentración, contenidas en las sub-matrices *C*, se utilizaron para conocer la distribución de especies a diferentes valores de pH y, consecuentemente, los pK_a de los analitos en estudio. En este caso, los espectros de las especies puras (ácida, neutra y básica) no cambian entre las corridas electroforéticas, mientras que los perfiles temporales en las diferentes submatrices *C* varían.

La tarea más difícil durante el proceso de extracción de principios activos en muestras biológicas es separar los analitos de los componentes de la matriz, particularmente en matrices como huevo, en donde se debe romper la unión de los analitos con los lípidos y las proteínas. Además, debido a las diferentes características fisicoquímicas de los principios activos, la extracción simultánea de una gran variedad de componentes es un verdadero reto [69].

Aunque las técnicas de microextracción son versátiles y pueden emplearse para la extracción de un gran número de analitos, en general se limitan a muestras acuosas, debido a que la extracción de analitos utilizando DLLME (o sus variantes) en muestras biológicas resulta complicada [211]. En muestras complejas, el desafío consiste en obtener una gota orgánica separada de los demás componentes, debido a la interacción de los componentes de la matriz con los solventes orgánicos [212]. Por estas razones, en la presente tesis se planteó la optimización de métodos de microextracción con el objetivo de aplicarlos en sistemas biológicos. En este sentido se desarrolló un DLLME convencional y un método de microextracción dispersivo líquido-líquido con solidificación en una gota asistida por aire (AA-DLLME-SFO).

En general, durante el análisis cromatográfico de matrices complejas se obtiene una resolución pobre entre los picos correspondientes a los analitos y a los compuestos de la muestra [213,214]. A su vez, se encuentran inconvenientes tales como líneas de base altas, relaciones S/N bajas, corrimientos en los tiempos de retención y solapamientos de picos [215,216]. Por lo tanto, la implementación de un preprocesamiento apropiado es de extrema importancia para garantizar la calidad de las señales instrumentales, lo que a su vez determina la calidad de los resultados finales. Como ejemplos de preprocesamiento se pueden mencionar la corrección o mejoramiento de las señales, y la eliminación del ruido, la línea de base, y la contribución de los componentes inesperados en las muestras [17], con el fin final de limpiar los datos y favorecer el aumento de la sensibilidad y la selectividad.

En la literatura se proponen diferentes estrategias para la corrección de la línea de base, siendo el método de cuadrados mínimos asimétricos propuesto por Eilers el seleccionado en este trabajo

[217,218]. Este algoritmo consiste en la estimación de una matriz de fondo \mathbf{F} ($J \times K$) a partir de la matriz original de datos \mathbf{M} ($J \times K$), en donde J es el número de longitudes de onda registradas y K el número de tiempos de retención. Para lograr este objetivo, se utilizan dos matrices de base curva \mathbf{B} , una a lo largo de las filas de la matriz \mathbf{M} ($L \times J$) y otra a lo largo de las columnas de \mathbf{M} ($M \times K$). Generalmente se utilizan 10 funciones base para generar estas matrices, por lo que $L = M = 10$. Luego del procesamiento se obtiene una matriz \mathbf{C} corregida sustrayendo la matriz \mathbf{F} a la matriz \mathbf{M} [219].

Durante el análisis multivariado de los datos, resulta de suma importancia el cálculo de dos parámetros para obtener medidas cuantitativas de la concordancia entre los valores nominales y los predichos. Por un lado, la raíz cuadrada del error medio (RMSE, del inglés *root-mean-square error*), definida como:

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{1}{I} \sum_1^I (c_{t,\text{nom}} - c_{t,\text{pred}})^2} \quad (27)$$

donde $c_{t,\text{nom}}$ y $c_{t,\text{pred}}$ son las concentraciones nominales y predichas para un determinado analito en la t th muestras, e I el número total de muestras ensayadas. El RMSE tiene unidades de concentración, por lo que para una mejor comparación con valores de referencia, es común utilizar el error relativo de la predicción (REP%, del inglés *relative error of prediction*):

$$\text{REP\%} = 100 \times \frac{\text{RMSE}}{\bar{c}} \quad (28)$$

donde \bar{c} es la concentración media de la calibración del analito de interés. Los valores de REP% se consideran excelentes cuando son menores al 2%, buenos en el caso de encontrarse entre 5-10% y malos si son mayores al 10% [220].

2.3. Metodología

2.3.1. Reactivos

Trimetoprima (TMP), ceftiofur (CTF), pirantel palmoato (PYR), fenbendazol (FBZ) y betametasona 17-valerato (BMV) se obtuvieron de Vetranal (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA). Imidacloprid (IMD), clortetraciclina (CTC) y oxitetraciclina (OTC) fueron suministradas por Pestranal (Sigma-ALdrich Inc, St Louis, USA). Nicarbazina (CAS 330-95-0, 68.0% m/m DNC, 28.9% m/m HDP), clenbuterol (CLB), cloranfenicol (CAP), flumequina (FLU), prednisolona (PSL), albendazol (ABZ), flunixin meglumina (FXN), diazepam (DZP), diclofenac (DCF), ibuprofeno (IBU), membutona (MBT) y progesterona (PGN) se obtuvieron de Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, USA). Enrofloxacin (ENR) y difloxacin (DIF) fueron suministrados por Fluka (Buchs, Suiza). Robenidina grado farmacéutico (ROB) se obtuvo de FACYT S.R.L (Santa Fe, Argentina).

Borato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), sulfato de zinc (ZnSO_4), fosfato de sodio mono ácido (Na_2HPO_4), fosfato de sodio diácido (NaH_2PO_4), ácido fosfórico (H_3PO_4) e hidróxido de sodio (NaOH) fueron suministrados por Cicarelli (San Lorenzo, Argentina). Dimetilformamida (DMF), acetona (ACE), diclorometano (DCM) e isopropanol (IPA) se obtuvieron de Cicarelli (San Lorenzo, Argentina). 1-dodecanol fue suministrado por Sigma (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA). El cloruro de polidialildimetilamonio fue suministrado por Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, USA).

2.3.2. Software

Para el control y la adquisición de datos para la determinación de las constantes de acidez se utilizó el software de la ChemStation de EC (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania).

Para la corrección de línea de base se utilizaron rutinas basadas en el algoritmo de Eilers [217] y para inicializar el algoritmo ALS se utilizaron rutinas escritas en el laboratorio, basadas en los principios de SIMPLISMA [31]. Todos los algoritmos se implementaron en MATLAB 7.10 [120]. Aquellos para aplicar MCR-ALS están disponibles en internet en <http://www.mcrals.info/>.

2.3.3. Determinación de constantes de acidez mediante EC-DAD

Preparación de soluciones buffer y estándares

Las soluciones BGE se prepararon mezclando volúmenes iguales de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ y Na_2HPO_4 o NaH_2PO_4 para cubrir el rango de pH entre 2.48 y 11.66, ajustando los valores con H_3PO_4 o NaOH según correspondía. La Tabla 12 muestra en detalle las concentraciones y la forma en la que se prepararon estas soluciones.

Tabla 12. Detalle sobre la preparación de los diferentes BGE.

Rango de pH	Solución stock y concentración ^a	Volumen de la solución stock adicionada
2.48-8.52	0.1 mol L ⁻¹ NaH_2PO_4	1.00 mL
	0.1 mol L ⁻¹ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	1.00 mL
	0.2 mol L ⁻¹ H_3PO_4	0.05-0.20 mL
8.72-11.66	0.1 mol L ⁻¹ Na_2HPO_4	1.00 mL
	0.1 mol L ⁻¹ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	1.00 mL
	0.1 mol L ⁻¹ NaOH	0.05-0.10 mL

^a Los volúmenes correspondientes de las soluciones buffer se mezclaron, de ser necesario se ajustó al pH exacto, y finalmente se diluyeron a un volumen final de 10.0 mL. La fuerza iónica final es 0.02 mol L⁻¹.

Por su parte, como marcador de flujo electroosmótico se utilizó una solución de DMF 0.1% (v/v). Para la determinación del pK_a de NICA, se preparó una solución stock (1.0 mg L⁻¹) disolviendo una masa adecuada de la droga en DMF. Para verificar la veracidad de la propuesta se utilizó al coccidiostato ROB como compuesto de referencia, el cual posee un valor de pK_a de 3.50 [221], y se

preparó una solución estándar (1.0 mg L^{-1}) disolviendo una masa exacta de la droga en ACN. Estas soluciones se guardaron a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Las soluciones de trabajo ($50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) se prepararon diariamente diluyendo la solución stock en una en una solución de ACN:agua (1:1).

Condiciones instrumentales y experimentales

Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo en un equipo de EC marca Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con un detector DAD. La separación se realizó en polaridad reversa (es decir, cátodo en la entrada y ánodo en la salida), empleando un capilar de sílice fundida recubierto (MicroSolv Technology Corporation, Eatontown, USA) con un diámetro interno de $75 \text{ } \mu\text{m}$ y un largo total de 40 cm (31.5 cm al DAD), aplicando un potencial variable considerando no exceder una corriente de $100 \text{ } \mu\text{A}$. El voltaje se varió entre -25 , -22 y -19 kV para soluciones buffer de pH 2.48 a 5.89, 6.53 a 7.87 y 8.52 a 11.66, respectivamente. En estas condiciones, la ley de Ohm se cumple en todos los casos. El capilar se termostató a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las muestras se introdujeron hidrodinámicamente, aplicando 30 mbar de presión por 10 segundos. Para calcular la constante de disociación, los electroferogramas de HDP, DNC y el flujo electroosmótico se registraron a 280 , 350 y 200 nm , respectivamente, obteniéndose los tiempos de migración necesarios para el posterior cálculo de las μ_{eff} . A su vez, para realizar el modelado por MCR-ALS se registró la información espectral cada 2 nm entre 200 y 500 nm . Las soluciones de trabajo de NICA se analizaron por triplicado. La misma metodología se aplicó para calcular la constante de disociación de ROB.

Para su recubrimiento, en una primera instancia, el capilar se acondicionó con 1 mol L^{-1} de NaOH, se enjuagó con agua MilliQ y luego con una solución de PDDA 1%. Finalmente, se enjuagó con la solución de BGE. Entre corridas, el capilar se enjuagó secuencialmente con 0.1 mol L^{-1} de NaOH, agua MilliQ y BGE.

El pH de las soluciones se determinó empleando un potenciómetro Orion 410 A equipado con un electrodo combinado (Hanna Instruments, Inc., Woonsocket, USA).

MCR-ALS

Para la determinación del valor de pK_a de los componentes de NICA, se realizaron corridas electroforéticas a 23 valores de pH en el rango de 2.48 a 11.66 , registrándose en todos los casos los espectros de las especies intervinientes. Para el posterior análisis, la información se restringió en sentido espectral de 246 a 500 nm y en sentido temporal de 1.66 a 4.15 min . Por lo tanto, se obtuvieron 23 matrices de tamaño 601×128 . La descomposición de la matriz aumentada de tamaño 13823×128 permitió conocer el número de componentes presentes en los picos y sus

correspondientes espectros. El número de especies contribuyentes en el sistema en estudio, obtenido mediante SVD, resultó ser cinco, uno correspondiente a DMF, uno a DNC y tres a HDP.

En la resolución mediante MCR-ALS se aplicaron las restricciones de no negatividad en los espectros y las concentraciones, unimodalidad en las concentraciones, y normalización de espectros.

En el caso de ROB, los espectros se acotaron al rango de longitudes de onda de 246 a 500 nm y los electroferogramas en el rango de 1.87 a 3.94 min, generándose una matriz aumentada de tamaño 11523×128 . Cuando se aplicó la descomposición por valores singulares, el número de especies contribuyentes resultaron ser tres, una correspondiente a DMF, y dos a ROB. Las restricciones aplicadas fueron las mismas que para HDP.

2.3.4. Extracción de principios activos en huevo monitorizada mediante CLAR con DAD y FSFD

Condiciones cromatográficas

La fase móvil consistió en MeOH:ACN:solución buffer ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 10 mmol L^{-1} (pH = 3.50) (7.5:7.5:85), y se implementó el gradiente de elución que se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Gradiente de elución para la determinación de principios activos en huevo

Tiempo (min)	%Buffer ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$)	%MeOH	%ACN
1	85	7.5	7.5
7	60	20	20
12	20	40	40
13	20	40	40
14	85	7.5	7.5

El flujo se mantuvo en 0.65 mL min^{-1} y la columna a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, con un tiempo total de 16 minutos. El volumen de inyección fue $25 \text{ } \mu\text{L}$. Los cromatogramas se registraron a 240, 280, 300 y 350 nm para determinar TMP, CAP y ABZ, OTC y DNC, respectivamente. La emisión de fluorescencia se registró excitando a 280 nm y emitiendo a 450 y 350 nm para ENR y ABZ, respectivamente, y la ganancia del detector fue de 14.

Soluciones stock

Las soluciones stock se prepararon pesando y disolviendo una masa exacta de ENR (1.11 mg mL^{-1}) y OTC (1.07 mg mL^{-1}) en MeOH, TMP (0.94 mg mL^{-1}) y CAP (1.14 mg mL^{-1}) en ACN, y DNC (1.00 mg mL^{-1}) y ABZ (0.96 mg mL^{-1}) en DMF. Estas soluciones se guardaron a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ en recipientes resistentes a la luz y se dejaron alcanzar temperatura ambiente antes de utilizarse. Cuando fue necesario, se prepararon soluciones estándares de trabajo diluyendo (1:10 o 1:100) cada solución stock en MeOH.

Procedimientos y evaluación de los métodos de extracción

Una porción de 1.00 g de huevo homogeneizado se transfirió a un tubo de centrífuga de 10 mL conteniendo una proporción apropiada de cada solución estándar para obtener concentraciones de ABZ de 0.48 y 1.42 $\mu\text{g g}^{-1}$, DNC de 2.40 y 7.10 $\mu\text{g g}^{-1}$, OTC de 2.35 y 7.17 $\mu\text{g g}^{-1}$, ENR de 0.046 y 0.142 $\mu\text{g g}^{-1}$, TMP de 2.35 y 7.14 $\mu\text{g g}^{-1}$ y CAP de 2.39 y 7.07 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Para aplicar el método AA-DLLME-SFO, se agregaron a la muestra 1140 μL de agua y 125 mg de ZnSO_4 , y se mezcló por 1 minuto. Luego, se agregaron 1175 μL de ACN, 1200 μL de MeOH y 740 μL de ACE y se mezcló utilizando un agitador vórtex durante 1 minuto, se centrifugó a 5000 g por 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo de vidrio (con una relación solvente:muestra igual a 3). Luego se adicionaron 50 μL de 1-dodecanol y la mezcla de solventes se redujo al tercio mediante la utilización de una corriente de nitrógeno. Para obtener la gota del solvente extractante solidificada, el tubo conteniendo los solventes se mantuvo a 10 $^{\circ}\text{C}$ (teniendo en cuenta que la temperatura de fusión del 1-dodecanol es 24 $^{\circ}\text{C}$), y se removió la gota con una espátula. Finalmente, el solvente se calentó a 37 $^{\circ}\text{C}$, y se agregaron 10 μL de metanol para mantener a la solución en estado líquido.

Para aplicar el método DLLME, se agregaron a la muestra 1840 μL de ACN y 160 μL de DCM y se mezcló por 1 minuto (relación solvente:muestra igual a 2). Luego, el sobrenadante se evaporó con una corriente de nitrógeno. Por último, el residuo se resuspendió en 50 μL de una mezcla de ACN:solución buffer ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 10 mmol L^{-1} pH = 3.50 (30:70 v/v).

Por otro lado, para evaluar el rendimiento de los dos sistemas de extracción desarrollados, se procesaron con ambos métodos dos porciones de 1.00 mL de solución acuosa conteniendo los mismos analitos en las dos concentraciones mencionadas previamente.

Diseños experimentales y optimización

Método AA-DLLME-SFO

En una primera instancia, se construyó un diseño experimental factorial fraccionado (FFD) para analizar los factores que influyen en la extracción de los analitos considerando: (a) volumen de ACN 500 o 1000 μL , (b) volumen de MeOH 500 o 1000 μL , (c) volumen de IPA 500 o 1000 μL , (d) volumen de ACE 500 o 1000 μL , (e) volumen de agua 500 o 1000 μL y (f) cantidad de sal 100 o 500 mg (ZnSO_4). Para esto, se construyó un diseño factorial fraccionado al cuarto con $2^{6-2} = 16$ experimentos, fundamentándose la selección del diseño fraccionado en el gran número de factores (6). Para la optimización se analizaron las respuestas: (R1) área de CAP, (R2) área de DNC, (R3) área de ABZ y (R4) pureza de CAP. La Tabla 14 muestra el FFD construido.

Tabla 14. Diseño factorial 2^{6-2}

Corrida	Factores (<i>k</i>)						Respuestas			
	ACN ^a	MeOH ^a	IPA ^a	ACE ^a	Agua ^a	ZnSO ₄ ^b	CAP ^c	ABZ ^c	DNC ^c	Pureza CAP
1	1000	1000	500	500	500	500	2790.3	641.5	2893.5	0.860
2	1000	1000	500	1000	500	100	7028.6	907.9	4327.3	0.999
3	500	1000	500	1000	1000	100	10503.2	2117.8	7624	0.953
4	1000	1000	1000	500	1000	100	12569.7	2712.8	5809.1	0.937
5	500	500	1000	500	1000	500	9196.6	1705.5	3366.6	0.977
6	500	500	500	500	500	100	13679.5	1572.9	4132.1	0.994
7	500	1000	500	500	1000	500	6517.3	809.8	3213.9	0.907
8	1000	500	1000	500	500	500	7970.3	1556	4566.4	0.965
9	1000	500	500	500	1000	100	15076.2	3209.2	7338.8	0.946
10	1000	500	1000	1000	500	100	12159.3	1531.0	5053.1	0.816
11	500	50	500	1000	500	100	8072.1	1078.3	2493.0	0.839
12	500	1000	1000	500	500	100	3004.4	762.2	3277.0	0.922
13	500	1000	1000	1000	500	500	11012.2	1649.2	4920.1	0.840
14	1000	1000	1000	1000	1000	500	7774.0	902.9	3921.6	0.731
15	500	500	1000	1000	1000	100	10753.1	2197.7	7456.8	0.789
16	1000	500	500	1000	1000	500	12757.2	1428.3	4268.8	0.830

^a Volúmenes en μL

^b mg de ZnSO₄

^c Áreas de los analitos

El examen de las gráficas de Pareto permitió seleccionar los factores influyentes, y determinar que IPA es el único factor que no posee una influencia significativa sobre la extracción.

Con esta información, se construyó un diseño central compuesto con tres puntos centrales fraccionado al cuarto (CCD). Los niveles para cada factor en sus correspondientes valores codificados -1 y $+1$ fueron: 500 y 1000 μL para ACN, MeOH, ACE y agua, y 150 y 300 mg para ZnSO₄. El valor de α utilizado en este diseño es compatible con una distribución rotatable de la varianza predicha. Los valores finales para los 24 experimentos sugeridos por el diseño se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Diseño central compuesto para AA-DLLME-SFO

Corridas	Factores (<i>k</i>)					Respuestas		
	ACN ^a	MeOH ^a	ACE ^a	Agua ^a	ZnSO ₄ ^b	CAP ^c	ABZ ^c	DNC ^c
1	750	750	750	1205	225	3461.5	583.2	1326.7
2	1000	1000	1000	500	150	5032.0	480.3	2042.7
3	750	750	750	750	225	3552.9	485.9	1230.1
4	750	750	750	750	225	4823.3	692.5	475.0
5	750	750	1205	750	225	4453.0	572.0	2144.6
6	1000	500	1000	1000	150	3938.8	667.0	1121.6
7	1000	1000	500	500	300	4123.7	398.0	1419.6
8	500	500	500	500	150	4881.9	450.0	1388.5
9	1000	500	500	1000	300	3637.1	503.6	635.7
10	750	750	750	750	88	04738	755.1	1839.8
11	500	1000	500	1000	300	4414.2	506.1	861.3
12	295	750	750	750	225	4101.8	430.1	1322.8
13	750	295	750	750	225	4970.7	556.9	1633.3
14	750	750	750	750	360	4529.9	402.9	987.4
15	1000	500	1000	500	300	4025.0	400.2	1856
16	750	1205	750	750	225	4134.6	485.5	1313.2
17	750	750	295	750	225	4134.6	485.5	1313.2
18	500	1000	1000	500	300	3932.8	412.9	2248.2
19	500	500	1000	1000	300	4253.0	511.6	1062.0
20	750	750	750	295	225	4770.9	412.8	1752.1
21	750	750	750	750	225	4302.5	563.1	1333.4
22	1205	750	750	750	225	4302.5	563.1	1333.4
23	500	1000	1000	1000	150	3451.6	570.0	1571.5
24	1000	1000	500	1000	150	3790.3	664.4	2730.8

^a Volúmenes en μL ^b mg de ZnSO₄^c Áreas de los analitos

Método DLLME

La construcción del CCD completo (con tres puntos centrales) arrojó once experimentos, que tenían como objetivo optimizar el volumen del solvente dispersivo (ACN) y extractante (DCM) del sistema. Los niveles para cada factor en sus correspondientes valores codificados -1 y $+1$ se establecieron en: 2000 y 4000 μL para ACN, y 200 y 400 μL para DCM. Al igual que en el diseño anterior, el valor de α utilizado fue compatible con una distribución rotatable. Los experimentos se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Diseño central compuesto para DLLME

Corridas	Factores (<i>k</i>)				Respuesta			
	Volumen ACN ^a	Volumen DCM ^a	TMP ^b	ENR ^b	CAP ^b	ABZ ^b	OTC ^b	DNC ^b
1	4000	200	8996.6	1497.2	963.5	10.5	97.3	41.4
2	3000	300	22371.7	5984.4	3385.1	55.1	359.1	121.1
3	1580	300	23282.4	5940.0	3329.5	5500.1	284.4	34.7
4	2000	200	22359.9	892.3	3378.6	1701.7	1066	296.2
5	3000	300	17269.6	3930.2	2559.3	818.9	520.8	251.3
6	3000	440	25177.5	5549.4	1057.1	1594.4	365.8	163.7
7	2000	400	20470.2	5927.3	3217.3	271.9	372.4	84.1
8	4400	300	25212.4	8400.0	3812.1	257.8	1097.8	175.4
9	4000	400	20296.4	5677.1	3351.1	177.4	667.0	199.4
10	3000	300	3765.3	744.4	690.4	55.2	28.0	11.1
11	3000	160	25446.1	6692.9	3081.4	272.1	1099.0	238.2

^aVolúmenes en μL .^bÁreas de los analitos.

Para mejorar la resuspensión de los analitos, se construyó un diseño con catorce experimentos teniendo en cuenta combinaciones de ACN, MeOH y solución buffer ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 10 mmol L^{-1} pH = 3.50, y considerando como respuestas el área de todos los analitos y el ancho de los picos conflictivos OTC, CAP y TMP (ver Tabla 17). Para evaluar estos parámetros, se realizó la resuspensión (con 50 μL) de los residuos de una solución estándar, previamente llevada a sequedad, conteniendo a todos los analitos.

Tabla 17. Diseño de mezclas *Simplex Lattice* para el DLLME

Corridas	Factores (<i>k</i>)				Respuestas							
	MeOH	Buffer ^a	ACN	TMP ^b	OTC ^b	ENR ^b	CAP ^b	ABZ ^b	DNC ^b	Ancho OTC	Ancho CAP	Ancho TMP
1	0.167	0.667	0.167	1090.2	311.3	2111.0	509.6	347.5	396.2	0.266	0.219	0.297
2	0.500	0.500	0.000	918.7	309.6	1645.6	449.1	137.2	203.9	0.245	0.122	0.211
3	0.667	0.167	0.167	503.4	204.7	1192.9	467.1	338.7	1178.4	0.265	0.187	0.345
4	0.000	0.500	0.500	382.0	152.7	989.2	488.1	205.8	1108.1	0.332	0.242	0.293
5	0.000	0.000	1.000	133.9	1.8	221.9	273.4	321.2	1245.6	0.241	0.251	0.289
6	0.000	1.000	0.000	849.3	228.6	1399.2	430.4	78.9	12.0	0.224	0.115	0.147
7	0.000	0.000	1.000	165.4	4.0	305.9	195.6	59.9	1371.1	0.250	0.238	0.291
8	1.000	0.000	0.000	457.2	165.4	984.2	319.1	378.8	1409.9	0.308	0.234	0.301
9	0.500	0.000	0.500	198.6	52.1	941.0	335.3	449.5	1563.4	0.340	0.217	0.377
10	0.167	0.167	0.667	220.2	106.4	611.9	535.3	364.5	1127.0	0.304	0.234	0.258
11	1.00	0.000	0.000	512.3	186.6	1375.1	373.0	426.2	1485.0	0.271	0.230	0.302
12	0.000	1.000	0.000	989.1	269.0	1494.2	478.6	82.2	10.4	0.209	0.122	0.149
13	0.333	0.333	0.333	408.2	231.2	1782.2	508.4	369.6	980.4	0.355	0.132	0.415
14	0.500	0.500	0.000	818.1	225.1	1427.4	419.4	102.4	81.8	0.240	0.222	0.360

Los valores de MeOH, Buffer y ACN corresponden a porcentajes.

^aSolución buffer ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 10 mmol L^{-1} pH = 3.50.^bÁreas de los analitos.

Luego, del análisis de las respuestas se establecieron los modelos, se obtuvieron los coeficientes por regresión múltiple *backward* y se validaron por ANOVA ($p < 0.05$). Finalmente, cada factor se optimizó por medio de la función deseabilidad.

Curva de calibrado

Para realizar el estudio de linealidad, se preparó cada solución utilizando cantidades apropiadas de las soluciones stock ($n = 3$) para obtener concentraciones de 0.10, 0.19, 0.50, 1.00, 1.50 y 1.92 $\mu\text{g g}^{-1}$ para ABZ; 0.50, 1.04, 2.70, 4.99, 7.28 y 9.36 $\mu\text{g g}^{-1}$ para DNC; 0.54, 1.07, 2.78, 5.14, 7.49 y 9.36 $\mu\text{g g}^{-1}$ para OTC; 0.011, 0.022, 0.049, 0.102, 0.151 y 0.200 $\mu\text{g g}^{-1}$ para ENR; 0.47, 0.94, 2.44, 5.08, 7.52 y 9.96 $\mu\text{g g}^{-1}$ para TMP y 0.52, 1.04, 2.70, 4.99, 7.28 y 9.36 $\mu\text{g g}^{-1}$ para CAP, llevando a volumen con la mezcla de resuspensión optimizada.

Los LOD y LOQ se calcularon mediante los parámetros obtenidos por regresión lineal. A su vez, las recuperaciones se calcularon a partir de las muestras fortificadas descriptas previamente.

2.3.5. Determinación de principios activos en cama de pollo mediante CLAR con DAD y FSFD

Procedimiento

La optimización del sistema cromatográfico se explicará en detalle en el apartado Resultados y Discusiones. La fase móvil final consistió en una mezcla de MeOH:ACN:solución bufer ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 10 mmol L^{-1} (pH = 3.50) (2.5:2.5:95), siguiendo el gradiente que se muestra en la Tabla 18.

Tabla 18. Gradiente de elución para la determinación de principios activos en cama de pollo

Tiempo (min)	% Buffer ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$)	% Metanol	% Acetonitrilo
1	95	2.5	2.5
18	20	40	40
21	20	40	40
23	95	2.5	2.5

El flujo se mantuvo en 0.65 mL min^{-1} , la temperatura de la columna a 40 °C, y se inyectaron 100 μL de cada solución. En estas condiciones la duración de los cromatogramas fue de 25 minutos.

Generación de datos y software

Los datos de absorción UV-Vis se registraron en un rango espectral de 200 a 500 nm, en el periodo de tiempo de elución de 0.0 a 25.0 minutos, por lo que se generaron matrices de 1868 \times 151, cuyos tamaños indican tiempo de elución y dimensiones espectrales, respectivamente.

Por otro lado, las matrices de tiempo-emisión de fluorescencia se registraron en un rango de emisión espectral entre 310 y 600 nm, con una longitud de onda de excitación fija a 280 nm, seleccionada como longitud de onda de compromiso considerando los máximos de excitación de cada analito, en el periodo de elución de 0.0 a 25.0 minutos. La ganancia del detector se mantuvo en

10, y la velocidad del barrido fue de 180 nm s^{-1} . En este sentido, las matrices de fluorescencia contienen 940×291 sensores para tiempo de elución y espectros de emisión, respectivamente.

La resolución por MCR-ALS se llevó a cabo utilizando la interfaz gráfica para MATLAB `mv2_gui`, [222]. Por su parte, se aplicaron rutinas basadas en el algoritmo Eilers para realizar la corrección de línea de base de los datos de segundo orden [217].

Preparación de soluciones estándares

Las soluciones stock se prepararon por pesada de una masa exacta de cada estándar y posterior disolución en MeOH para CTF (1.10 mg mL^{-1}), CLB (0.98 mg mL^{-1}), ENR (1.10 mg mL^{-1}), IMD (1.19 mg mL^{-1}), DIF (1.05 mg mL^{-1}), CTC (1.01 mg mL^{-1}), FLU (0.99 mg mL^{-1}), DCF (1.07 mg mL^{-1}), PGN (0.98 mg mL^{-1}) y DZP (1.04 mg mL^{-1}); en ACN para TMP (1.10 mg mL^{-1}), BMV (0.98 mg mL^{-1}), IBU (1.10 mg mL^{-1}), MBT (1.19 mg mL^{-1}), PSL (1.17 mg mL^{-1}) y CAP (1.12 mg mL^{-1}); en agua para FXN (1.02 mg mL^{-1}), y en DMF para DNC (0.75 mg mL^{-1}), PYR (0.96 mg mL^{-1}), FBZ (1.07 mg mL^{-1}) y ABZ (1.11 mg mL^{-1}). Estas soluciones se mantuvieron a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en envases oscuros y se dejaron alcanzar temperatura ambiente antes de su uso. Cuando fue necesario, las soluciones de trabajo se prepararon mediante dilución (1:10 o 1:100) de cada solución stock en MeOH.

Optimización de la extracción

Para mejorar la eficiencia en la extracción de los analitos presentes en la matriz cama de pollo se construyó un diseño SLD, con combinaciones de tres componentes: MeOH, ACN y solución buffer ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) (ver Tabla 19), considerando el rendimiento en la extracción de cada analito como respuesta.

Para evaluar estos parámetros, a 1.00 g de cama de pollo conteniendo los analitos en estudio (en concentraciones aproximadas a $10 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$) se le adicionaron 5.00 mL de la combinación de cada solvente provista por el diseño. Luego de la inyección en el cromatógrafo líquido, la eficiencia en la extracción se calculó al comparar las áreas de los analitos extraídos de las muestras con las de los estándares. Los experimentos se realizaron en forma aleatoria para asegurar su independencia y minimizar los efectos de los factores no controlados. Luego, las veintinueve respuestas se ajustaron a diferentes modelos (lineal, cuadrático, cúbico especial y cúbico), y los coeficientes se calcularon por regresión múltiple *backward* y se validaron mediante un test ANOVA. Finalmente, los factores se optimizaron por medio de la función deseabilidad.

Tabla 19. Experimentos correspondientes al diseño de mezclas *Simplex Lattice*.

Corrida	Factores (<i>k</i>)		
	MEOH	ACN	Buffer ^a
1	0	100	0
2	100	0	0
3	16.7	16.7	66.7
4	66.7	16.7	16.7
5	16.7	66.7	16.7
6	50	0	50
7	0	0	100
8	33.3	33.3	33.3
9	0	50	50
10	50	50	0
11	0	100	0
12	50	50	0
13	100	0	0
14	0	0	100

Los valores de MeOH, Buffer y ACN corresponden a porcentajes.

^a Solución buffer (H₃PO₄/NaH₂PO₄) 10 mmol L⁻¹ (pH = 3.50).

Por otro lado, para optimizar el tiempo de extracción se construyó un diseño central compuesto con tres puntos centrales y un α rotable, constituido por 13 experimentos, utilizando como factores el tiempo de agitación con vórtex entre 2 y 5 minutos, el tiempo de sonicado entre 10 y 30 minutos y el tiempo de agitación en bandeja entre 10 y 30 minutos. La selección de estos factores se fundamenta en experimentos previos, y para simplificar el análisis solo se registraron las concentraciones de seis analitos como respuestas (DNC, CAP, DCF, ABZ, FXN and IMD), teniendo en cuenta en la selección compuestos de diferentes familias (ver Tabla 20). Para estos experimentos, 1.00 g de cama de pollo se adicionó con un volumen apropiado de solución estándar para obtener concentraciones aproximadas a 10 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Tabla 20. Experimentos correspondientes al diseño central compuesto para la optimización del tiempo de extracción.

Corrida	Factores (<i>k</i>)		
	Agitación con vórtex	Sonicado	Agitación en bandeja
1	2.00	10.00	10.00
2	5.00	30.00	10.00
3	5.62	20.00	20.00
4	3.50	20.00	20.00
5	3.50	20.00	34.14
6	5.00	10.00	30.00
7	3.50	20.00	20.00
8	3.50	20.00	5.86
9	1.38	20.00	20.00
10	3.50	20.00	20.00
11	3.50	5.86	20.00
12	3.50	34.14	20.00
13	2.00	30.00	30.00

Muestras de calibración y validación

Debido a la complejidad de la muestra, el desarrollo de la validación se realizó sobre la matriz de una muestra blanco en la que se corroboró ausencia de los analitos en estudio.

En este punto se prepararon por triplicado muestras de calibración agregando a 1.00 g de cama de pollo blanco, volúmenes de las soluciones stock o de trabajo apropiadas para generar concentraciones entre 0.27-10.96 $\mu\text{g g}^{-1}$ para TMP, 0.06-0.59 $\mu\text{g g}^{-1}$ para ENR, 0.31-10.95 $\mu\text{g g}^{-1}$ para IMD, 0.44-10.39 $\mu\text{g g}^{-1}$ para CLB, 0.04-0.56 $\mu\text{g g}^{-1}$ para DIF, 0.57-10.34 $\mu\text{g g}^{-1}$ para CFT, 0.57-10.30 $\mu\text{g g}^{-1}$ para CAP, 0.38-14.53 $\mu\text{g g}^{-1}$ para CTC, 0.20-2.54 $\mu\text{g g}^{-1}$ para FLU, 0.59-11.06 $\mu\text{g g}^{-1}$ para PSL, 0.37-13.18 $\mu\text{g g}^{-1}$ para PYR, 0.28-10.76 $\mu\text{g g}^{-1}$ para MBT, 0.17-5.51 $\mu\text{g g}^{-1}$ para ABZ, 0.60-11.80 $\mu\text{g g}^{-1}$ para FXN, 0.32-10.40 $\mu\text{g g}^{-1}$ para DZP, 0.36-13.49 $\mu\text{g g}^{-1}$ para FBZ, 0.50-19.88 $\mu\text{g g}^{-1}$ para DNC, 0.22-11.27 $\mu\text{g g}^{-1}$ para DCF, 0.33-9.64 $\mu\text{g g}^{-1}$ para IBU, 0.38-9.80 $\mu\text{g g}^{-1}$ para BMV y 0.62-10.88 $\mu\text{g g}^{-1}$ para PGN. A continuación, se procesaron de la misma manera que las muestras.

Con respecto al set de validación se prepararon nueve muestras, en tres niveles de concentración diferentes a los utilizados para la calibración. Estas muestras se procesaron de igual manera que las de calibración.

Procesamiento de las muestras

Las muestras reales se recolectaron en seis granjas diferentes y se procesaron por triplicado. Las muestras M1 (Crespo, Entre Ríos), M2 (Barrancas, Santa Fe), M3 (Crespo, Entre Ríos), M5 (Barrancas, Santa Fe) y M6 (Esperanza, Santa Fe) corresponden a granjas comerciales, y la muestra M4 (Barrancas, Santa Fe) a una granja orgánica (ver Figura 20).



Figura 20. Localización y sitio de muestreo.

Para el análisis de cada muestra, se pesó 1.00 g de cama de pollo en un tubo de centrifuga plástico. Luego, se adicionaron 5.00 mL de la solución extractante, conformada por MeOH:Solución buffer ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 10 mmol L^{-1} a pH = 3.50 (33:67 v/v) y se procedió a agitar con vórtex durante 2 min, sonicar durante 18 min, agitar en bandeja durante 6 minutos, y centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos. Luego del filtrado del sobrenadante, se inyectaron 100 μL en el cromatógrafo líquido.

Estudio de precisión y recuperación

Para el ensayo de repetitividad se analizaron por triplicado muestras adicionadas en dos niveles de concentración (30 y 60% del rango considerado para la construcción de la curva de calibrado). La precisión intermedia se evaluó realizando mediciones repetidas de las mismas muestras durante dos semanas consecutivas y en ambos casos se calculó el CV%. Por su parte, la exactitud se evaluó calculando la recuperación obtenida al analizar las mismas soluciones utilizadas en el estudio de precisión.

RESULTADOS Y DISCUSIONES



DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE ACIDEZ MEDIANTE EC-DAD

“Lo importante es conocerse”

2.4.1. Análisis de la movilidad electroforética

En una primera instancia, se analizó la factibilidad de la obtención de valores de pK_a de los componentes de NICA, DNC y HDP. Al analizar la estructura química de DNC, y tratándose de un derivado de la urea simétricamente disustituido (Figura 21), se espera que sea capaz de perder un protón en condiciones básicas fuertes (es decir, $pH > 12$). En el rango de pH estudiado, DNC se comportaría como un compuesto neutro y, consecuentemente, migraría con el flujo electroosmótico. Por esta razón, no es posible determinar un valor de pK_a aparente de este compuesto. En contraste, HDP contiene un anillo de pirimidina y un sustituyente hidroxilo (Figura 21), por lo que se espera que pueda ionizarse en el rango de pH estudiado.

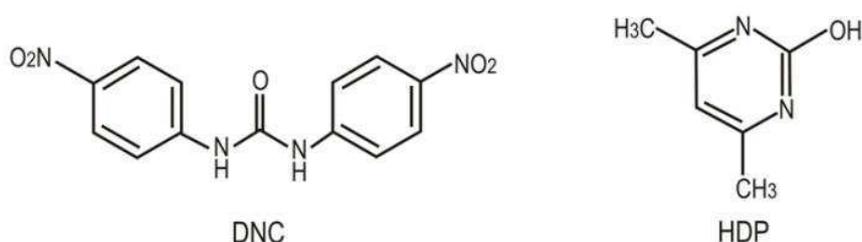


Figura 21. Estructura química de los componentes de NICA

Cabe recordar que para determinar la constante de disociación de HDP, en una primera instancia, se obtienen los valores de μ_{eff} , según la Ec. 26, teniendo en cuenta las movilidades electroforéticas del compuesto, el marcador del flujo electroosmótico, el voltaje aplicado y las características del capilar. Luego las μ_{eff} se grafican en función del pH del electrolito, y los datos se ajustan usando modelos de regresión no lineal (en este caso, modelos sigmoidales) (Figura 22 A) [223]. La ecuación que se utiliza para fijar la μ_{eff} en función del pH generalmente se construye teniendo en cuenta los grupos ácidos o básicos de los compuestos en estudio, y de esta manera se obtiene la secuencia de ionización dentro del rango de pH .

Como se observa en la Figura 22 A, la variación de la μ_{eff} de HDP en función del pH exhibe dos regiones con forma de "S", y puede representarse mediante una función logística. Es decir, HDP está presente en forma catiónica a valores bajos de pH , por lo que la μ_{eff} es negativa. Cuando la forma neutra de HDP está presente, la μ_{eff} es cero y HDP migra con el flujo electroosmótico. Por otro lado, a valores de pH altos, HDP está cargado negativamente y se observa una μ_{eff} con valores positivos. Por su parte, mediante el análisis de cada punto de inflexión se obtienen los valores de pK_a aparente [223]. A su vez, estos valores pueden corroborarse al dividir la curva en dos, y aplicar a los datos la primera y segunda derivada. La Figura 22 B y 22 C ejemplifican lo antes mencionado.

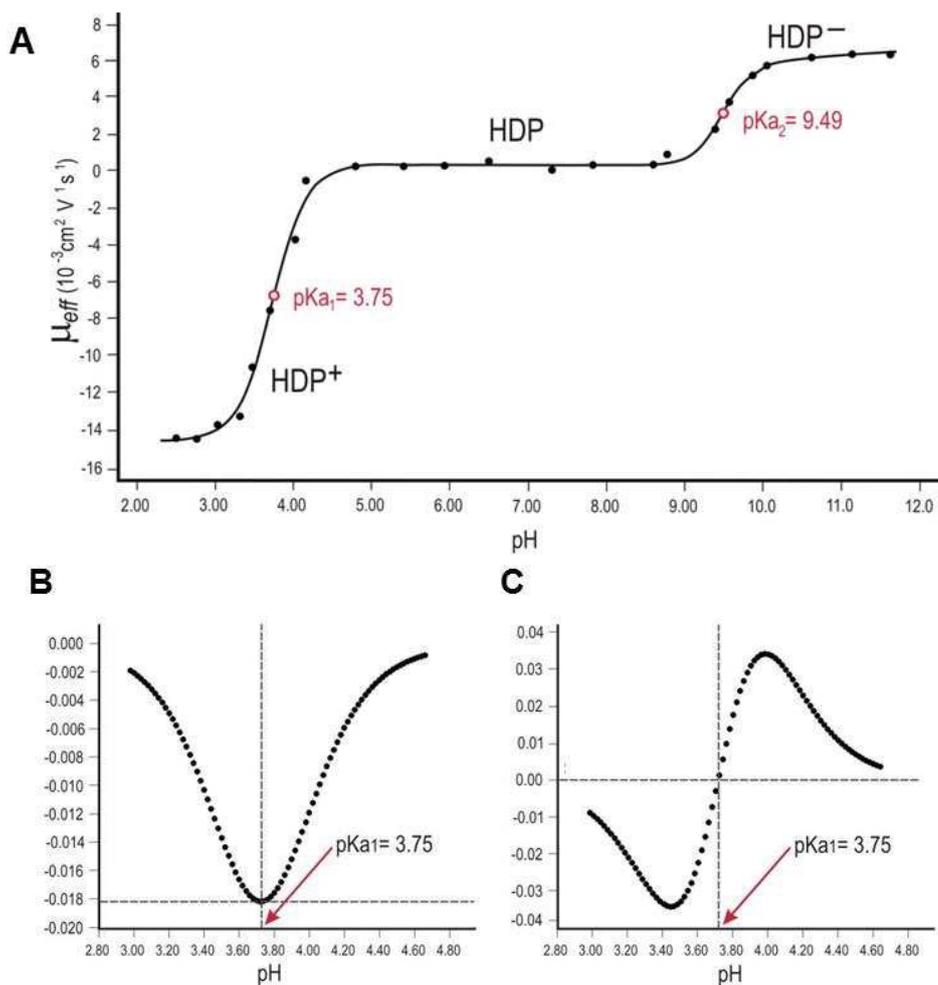


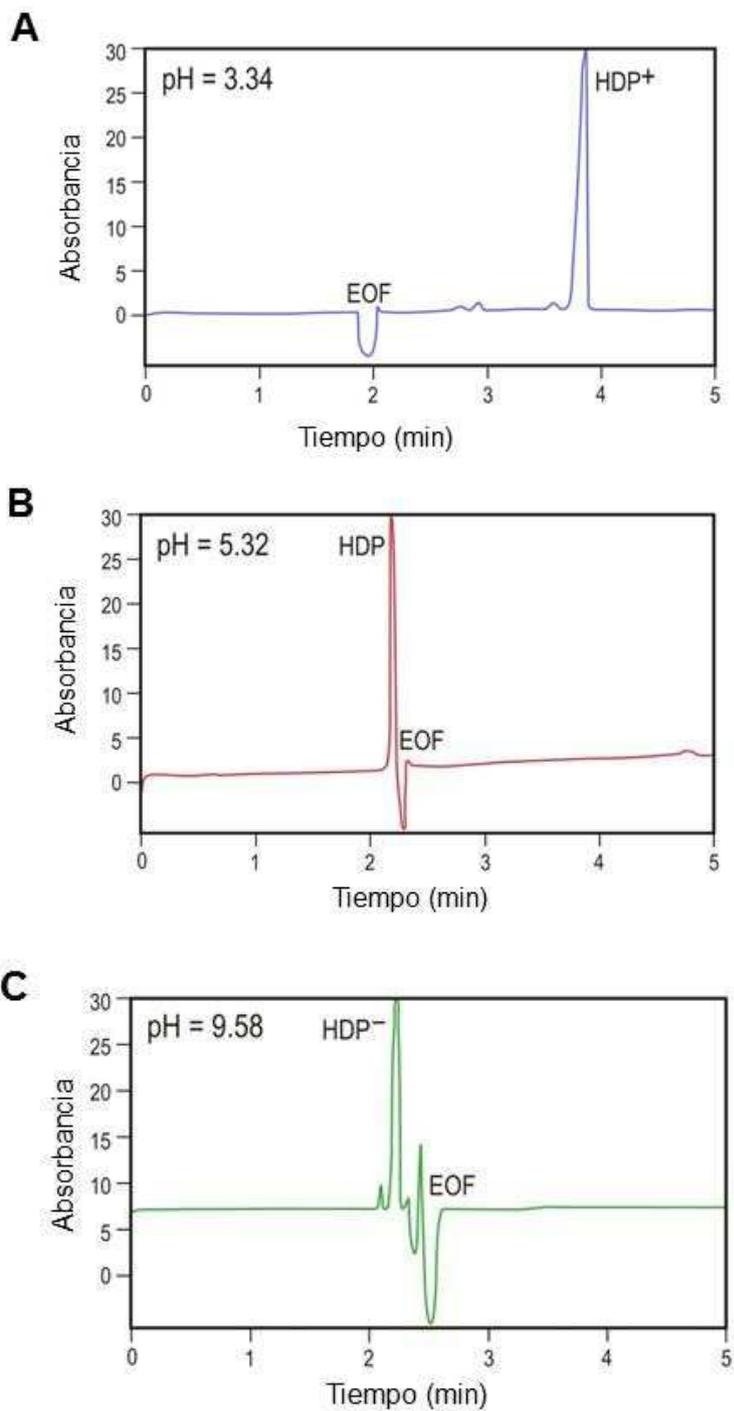
Figura 22. A) Relación experimental (círculos) y predictiva (líneas) entre la μ_{eff} del HDP y el pH de los BGE. **B)** Primera derivada de los datos de μ_{eff} . **C)** Segunda derivada de los datos de μ_{eff} .

El ajuste de los datos experimentales permite obtener los valores de pK_a aparente de las sustancias. En el caso de HDP, se obtienen dos valores, con un buen ajuste de los resultados experimentales ($r^2 > 0.999$).

La Figura 23 contiene los electroferogramas obtenidos para HDP a valores de pH de 3.34, 5.32 y 9.58. Los picos marcados como HDP⁻, HDP y HDP⁺ indican la especie predominante de HDP al valor de pH registrado. A pH = 3.34, el HDP migra más lento que el flujo electroosmótico debido a que tiene carga positiva (Figura 23 A). A pH = 5.32, HDP migra junto con el flujo electroosmótico (Figura 23 B), mientras que a pH = 9.58 HDP migra más rápido que el flujo electroosmótico (a pH mayores que el valor de pK_{a2}) debido a que está cargado negativamente (Figura 23 C). La señal correspondiente al flujo electroosmótico aparece como un pico negativo debido a que el marcador (DMF) absorbe menos que el BGE en la longitud de onda de 280 nm. El hecho de que el flujo electroosmótico no presenta cambios significativos en el tiempo de migración, tanto en condiciones ácidas como moderadamente básicas se debe al uso de PDDA. En este sentido, la movilidad del flujo

electroosmótico en el rango de pH estudiado varía entre -0.029 y $-0.011 \text{ cm}^2 (\text{V min})^{-1}$, lo que se corresponde con tiempos de migración entre 1.78 y 3.90 min.

Por otro lado, en todas las corridas realizadas la movilidad electroforética de DNC es cero, debido a que este compuesto está presente en una forma no ionizada en el rango de pH en estudio (Figura 23 D).



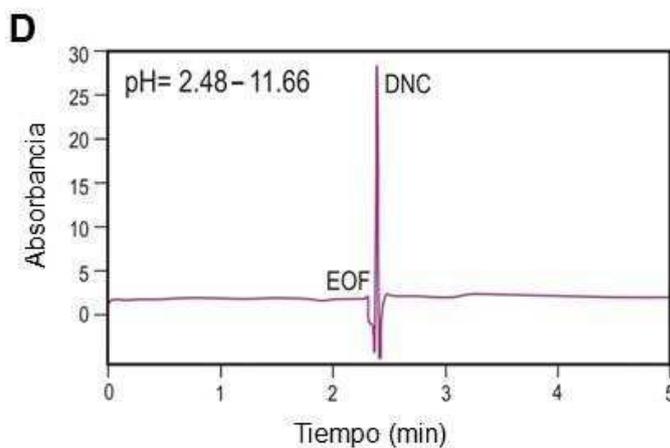


Figura 23. Electroferogramas para HDP (longitud de onda de 280 nm) a diferentes valores de pH: **A)** 3.34, **B)** 5.32 y **C)** 9.58, y **D)** electroferograma para DNC (longitud de onda de 350 nm).

Con los datos experimentales se supone sobre los sitios de ionización de HDP. La Figura 24 muestra las posibles especies presentes durante el análisis.

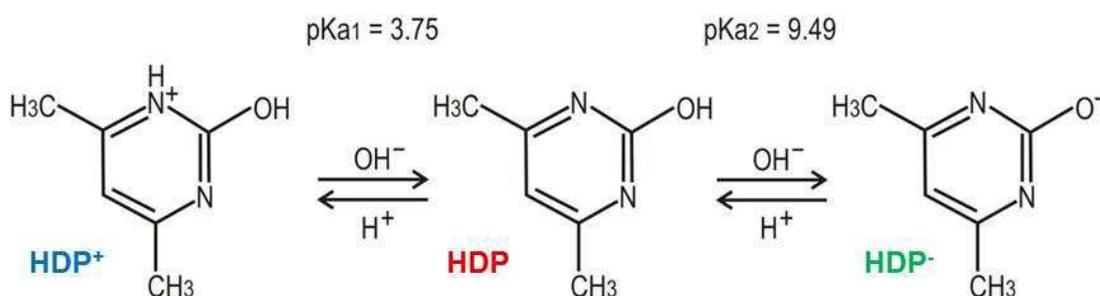


Figura 24. Posibles sitios de ionización de HDP

Con el fin de corroborar la factibilidad del método, se aplicó esta metodología para estimar el pK_a aparente de ROB, compuesto que posee un valor de $pK_a = 3.50$ [221]. La Figura 25 muestra la movilidad electroforética efectiva en función del pH, y como se aprecia en la figura, su equilibrio involucra la partición entre dos especies, la forma neutra y la catiónica de ROB.

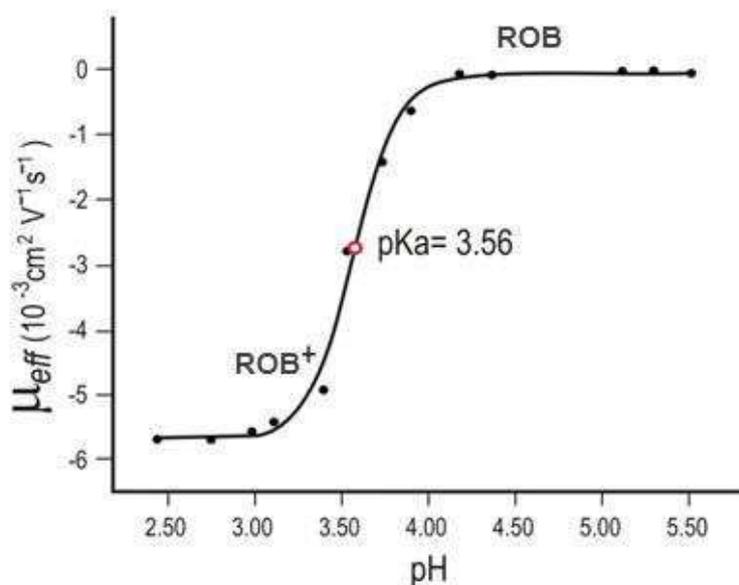


Figura 25. Relación experimental (círculos) y predictiva (líneas) entre la μ_{eff} de ROB y el pH de los BGE. La detección del analito se realizó a 280 nm.

2.4.2. Análisis por MCR-ALS

La implementación del algoritmo MCR-ALS permite obtener el perfil de concentraciones de las especies presentes en cada valor de pH, con sus respectivos espectros. Para demostrar las variaciones encontradas, la Figura 26 muestra los perfiles temporales observados en un grupo de valores de pH. En la figura no se grafica la señal del flujo electroosmótico para poder enfatizar las variaciones que sufre HDP. Durante el análisis están presentes cuatro o cinco componentes a diferentes valores de pH, que corresponden a DMF (no se observa en la figura pero está presente en todas las corridas), DNC y tres especies de HDP.

A pH bajos, están presentes DNC (línea punteada violeta) y HDP en su forma neutra y protonada (puntos rojos y línea azul sólida, respectivamente). A pH = 3.34, DNC migra a 2.04 min, HDP⁻ a 3.84, y HDP⁺ a 3.86 min (Figura 26 A). Por otro lado, a pH = 3.70 (Figura 26 B), que corresponde al primer valor de pK_a, los picos obtenidos para ambas especies (HDP y HDP⁺) tienen la misma área, y su tiempo de migración es 1.94 min (HDP) y 1.97 (HDP⁺).

A pH = 5.32 (Figura 26 C) HDP y HDP⁺ exhiben tiempos de migración similares (2.14 y 2.16 min, respectivamente), y el pico de HDP se superpone completamente con el pico de DNC. Esta superposición con DNC ocurre en la mayoría de las corridas electroforéticas (en el rango de pH entre 4.74 y 8.55), en las que predomina la especie neutra de HDP.

A valores de pH mayores a 9.00 (pH = 9.38 en la Figura 26 D), están presentes cuatro especies, que corresponden a DNC (líneas punteadas violetas) y HDP en la forma desprotonada, neutra y protonada (líneas y puntos verdes, puntos rojos y línea azul sólida, respectivamente).

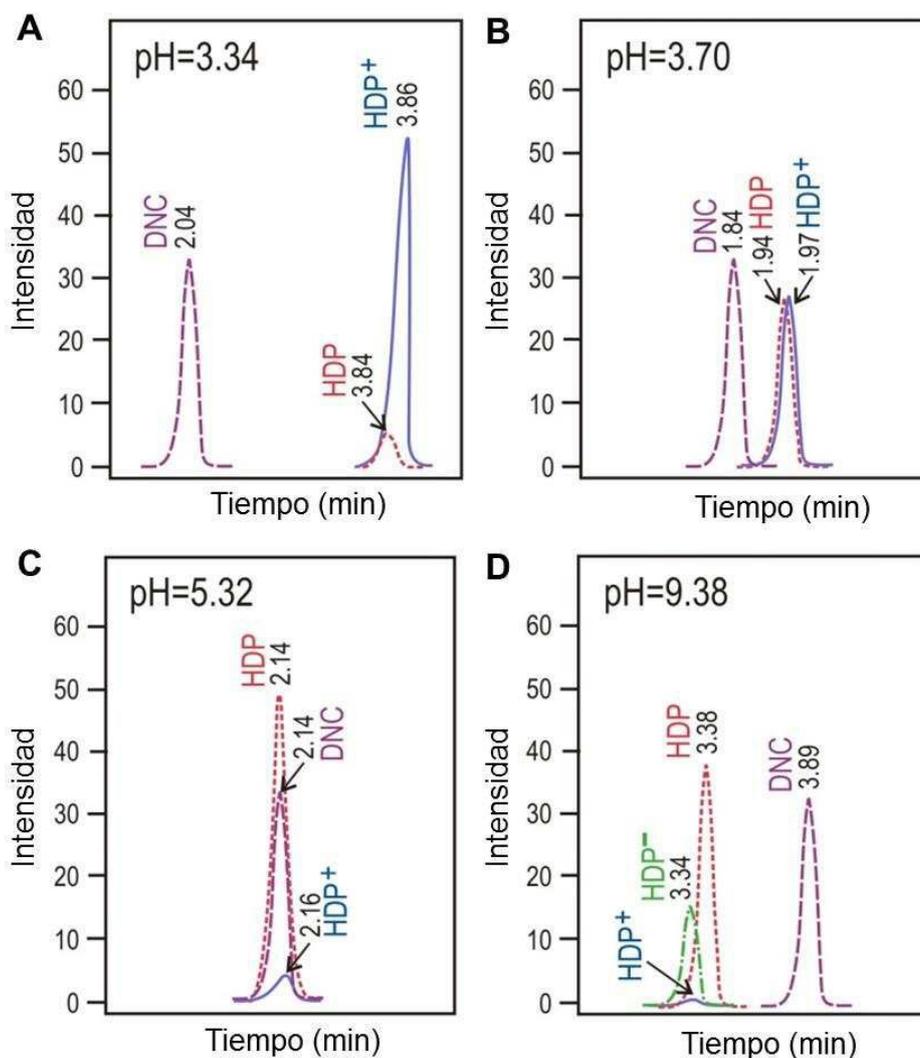


Figura 26. Los perfiles retribuidos por MCR-ALS corresponden a las diferentes especies: HDP⁺ (línea azul sólida), HDP (puntos rojos), HDP⁻ (líneas y puntos verdes), y DNC (líneas punteadas violetas).

Por su parte, la Figura 27 A muestra los espectros normalizados de cada especie obtenidos mediante MCR-ALS. Como se puede observar, DNC exhibe un máximo de absorción a 350 nm y las tres especies de HDP tienen diferentes espectros de absorción, presentando sus máximos a 298 nm (HDP⁻), 301 nm (HDP), y 308 nm (HDP⁺). Para corroborar la calidad del ajuste, los espectros obtenidos en forma experimental se compararon con los obtenidos por MCR-ALS a los valores de pH de 3.05, 6.52 y 9.92, obteniéndose valores de r^2 iguales a 0.968 para HDP⁻, 0.972 para HDP y 0.995 para HDP⁺.

Finalmente, en la Figura 27 B se muestra el diagrama de distribución de especies de HDP⁻, HDP y HDP⁺, el que se obtuvo al calcular las áreas bajo los perfiles recuperados en cada uno de los pH contenidos en la matriz C. Mediante el uso de MCR-ALS se calcularon dos valores de pK_a aparentes para HDP, que se corresponden con la protonación del anillo pirimida ($pK_a = 3.75$) y la desprotonación del sustituyente hidroxilo ($pK_a = 9.74$) (ver Figura 24); los resultados se resumen en la Tabla 21.

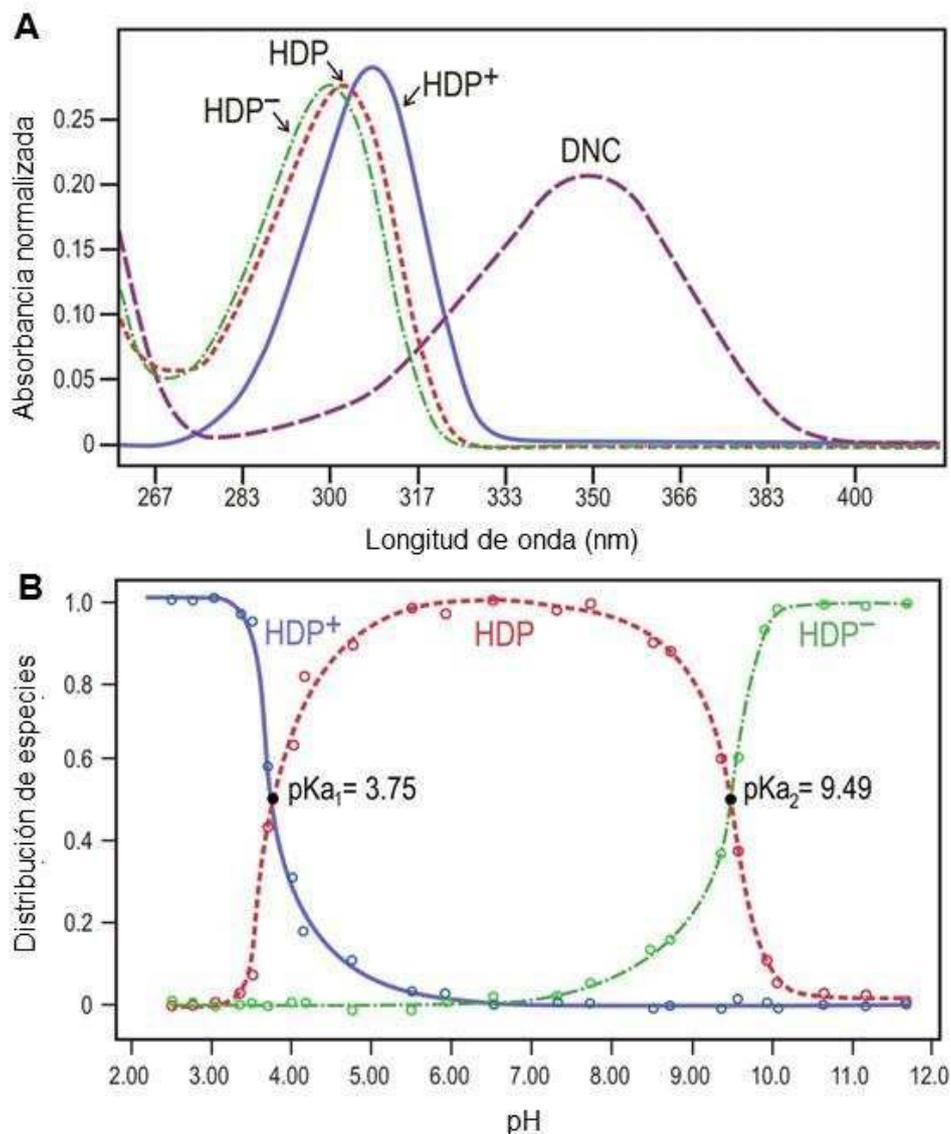


Figura 27. A) Espectros experimentales de absorción normalizados de DNC y cada especie de HDP obtenidos por MCR-ALS. **B)** Distribución de las tres especies de HDP en función del pH (HDP⁻ en verde, HDP en rojo y HDP⁺ en azul) obtenida por MCR-ALS.

Para corroborar la factibilidad del método, se determinó el valor de pK_a de ROB mediante MCR-ALS. Del análisis de las matrices solo se obtuvo un valor de $pK_a = 3.60$, debido a que en el rango de pH estudiado están presentes dos o tres componentes, correspondientes a DMF, ROB y ROB⁺.

La Tabla 21 resume los valores de pK_a obtenidos mediante las metodologías desarrolladas.

Como puede observarse en la Tabla 21, las diferencias entre los valores de pK_a utilizando las dos metodologías propuestas son menores a 0.05 unidades de pH, y están por debajo de la desviación estándar de la metodología. La confirmación de que no existen diferencias significativas entre ambos valores obtenidos se obtuvo a través de la aplicación de un test t .

En el caso de ROB también se compararon los resultados con el valor de pK_a informado en la literatura ($pK_a = 3.50$), concluyéndose que no hay diferencias estadísticamente significativas entre

ellos. Estas observaciones avalan la factibilidad del método propuesto para obtener valores de pK_a de una variedad de compuestos.

Tabla 21. Valores de pK_a aparente para ROB y HDP obtenidos mediante el cálculo de la μ_{eff} y MCR-ALS.

Analito	Método	Valor de pK_a
ROB	μ_{eff}	3.56
	MCR-ALS	3.60
	[221]	3.50 ^a
HDP ^b		3.75
	μ_{eff}	9.49
	MCR-ALS	3.70
		9.47

^aValor de pK_a informado en literatura a 25 °C.

^bNo se encontró un valor informado para este compuesto.

Resulta importante destacar que MCR-ALS es capaz de proveer, a pesar de su completa superposición, las especies presentes dentro de un pico electroforético, siempre y cuando exista una diferenciación espectral entre las especies en sus formas positiva, neutra y negativa. Cuando se comparan los resultados obtenidos al calcular las movilidades electroforéticas con la nueva estrategia presentada en esta tesis basada en MCR-ALS, este último provee mayor información, que puede ser útil para realizar un análisis químico verosímil del sistema en estudio; por ejemplo, se pueden obtener espectros de especies puras envueltas en el equilibrio y sus perfiles de distribución relativos.

RESULTADOS Y DISCUSIONES



EXTRACCIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN HUEVO MONITORIZADA MEDIANTE **CLAR** CON **DAD** Y **FSFD**

“A poner las manos en la masa”

2.5.1. Optimización del método AA-DLLME-SFO

En el presente trabajo se planteó la posibilidad de mejorar una técnica de microextracción líquido-líquido con solidificación de la gota del solvente [212], utilizando un sistema de aireación para aumentar la superficie de contacto entre los solventes y la muestra.

Para identificar los factores que afectan la eficiencia de la extracción se construyó un FFD con dieciséis combinaciones de los factores ACN, MeOH, ACE, IPA, agua y ZnSO₄ (Tabla 14). Para evaluar estos parámetros, a 1.00 g de huevo homogeneizado, conteniendo los seis analitos en estudio, OTC, TMP, ENR, ABZ, DNC y CAP, se le adicionó el volumen de cada solvente según lo descrito en la Tabla 14. Posteriormente, el sistema se sometió a agitación por 1 min y centrifugación a 5000 rpm por 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo de vidrio, se agregaron 50 µL de 1-dodecanol (solvente extractante) y el sistema se puso bajo corriente de nitrógeno hasta que los solventes dispersivos se redujeron al tercio.

Debido a las características tanto del solvente extractante como de los analitos en estudio, solo tres de los principios activos ensayados pueden extraerse mediante esta técnica, por lo que las respuestas analizadas fueron las áreas de CAP, DNC y ABZ y la pureza de CAP. La selección de la pureza de CAP se fundamenta en la observación de los resultados experimentales, debido a la presencia de interferentes de la matriz que coeluyen con este analito.

Durante el análisis se consideró que las respuestas que superaban el límite estadístico de Bonferroni eran significativas. Por lo tanto, el análisis del gráfico de Pareto y el estudio individual de las respuestas permitió establecer que los factores a analizar en un futuro diseño serían ACN, MeOH y ACE como solventes dispersivos, y agua y ZnSO₄ para mejorar la separación de fases.

El análisis individual de las respuestas permitió inferir que el MeOH es el factor que influye en la recuperación de CAP ($p = 0.0363$), mientras que en su pureza influyen el factor ACE ($p = 0.0029$) y las combinaciones MeOH:ACE ($p = 0.0201$) y MeOH:ZnSO₄ ($p = 0.0151$); en la extracción de ABZ influyen los factores MeOH ($p = 0.0438$), agua ($p = 0.0086$), ZnSO₄ ($p = 0.0100$) y la combinación de ACN:ACE ($p = 0.0074$). Por su parte, en la extracción de DNC influyen los factores agua ($p = 0.0062$), ZnSO₄ ($p = 0.0009$) y la combinación ACN:ACE ($p = 0.0056$).

Con la información recabada, se construyó un CCD con veinticuatro experimentos (Tabla 15). Los factores seleccionados en su rango de estudio fueron: 500-1000 µL de ACN, 500-1000 µL de MeOH, 500-1000 µL de ACE, 500-1000 µL de agua y 150-300 mg ZnSO₄, evaluándose como respuestas las áreas de los analitos.

Para el análisis se utilizaron los modelos cuadrático, lineal y lineal con interacción con $p < 0.05$, para las áreas de CAP, ABZ y DNC, respectivamente, y se obtuvieron en todos los casos valores de falta de ajuste menores a 0.05 (Tabla 22). En el caso del área de ABZ, se efectuó una transformación de la respuesta para mejorar el ajuste.

Tabla 22. Ajuste de los modelos para las respuestas analizadas

Respuesta	Modelo	Término significativo ^{a,b}	Transformación ^c	ANOVA (valor p^b)		r_{adj}^2
				Modelo	Falta de ajuste	
Área CAP	Cuadrático	B (0.0011)	Ninguna	0.0153	0.956	0.951
		D (0.013)				
		AB (0.0049)				
		AE (0.0125)				
		CE (0.0180)				
Área ABZ	Lineal	B ² (0.0021)	Potencia (-1.72)	<0.0001	0.864	0.962
		D (0.0003)				
		E (0.0234)				
Área DNC	2FI	AB (0.0049)	Ninguna	0.0020	0.877	0.917
		CD (0.0010)				
		DE (0.0015)				

^a A: ACN; B: MeOH; C: ACE; D: agua; E: ZnSO₄. El número entre paréntesis corresponde al valor de p .

^b Un valor de p menor a 0.05 indica que el parámetro evaluado es significativo.

^c Entre paréntesis valor de λ : Potencia: $y' = (y + k)^{\lambda}$, con $k = 0$.

El criterio utilizado para la optimización simultánea de las tres respuestas fue la maximización, dándose más importancia a la respuesta con menor recuperación (ABZ). Bajo estos criterios, las condiciones experimentales correspondientes al máximo en la función deseabilidad ($D = 1.00$, ver Figura 28) fueron: 1140 μL de agua, 125 mg de ZnSO₄, 1175 μL de ACN, 1200 μL de MeOH y 740 μL de ACE, utilizándose 1.00 g de huevo homogeneizado y 50 μL de 1-dodecanol como solvente extractante.

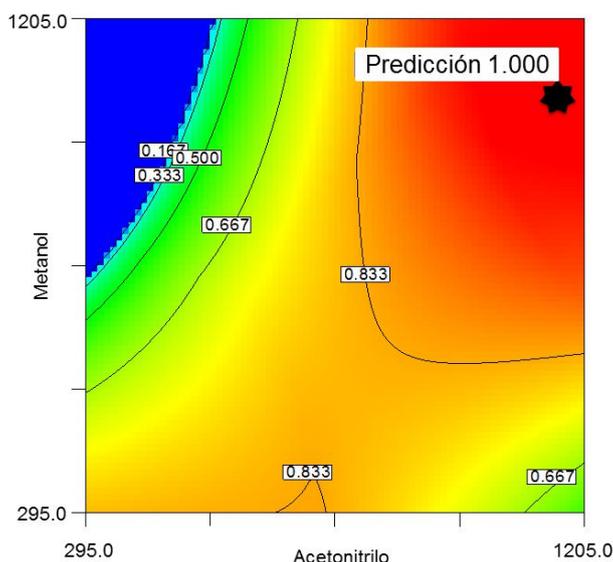


Figura 28. Superficie de contorno para el método AA-DLLME-SFO. Gráfica en función de los volúmenes de MeOH y ACN, mientras los demás factores se encuentran en sus valores óptimos: 740 μL de ACE, 1140 μL de agua y 125 mg de ZnSO₄. La estrella representa la combinación que genera el mejor valor de D .

Con el método de extracción optimizado se obtienen cromatogramas como el de la Figura 29.

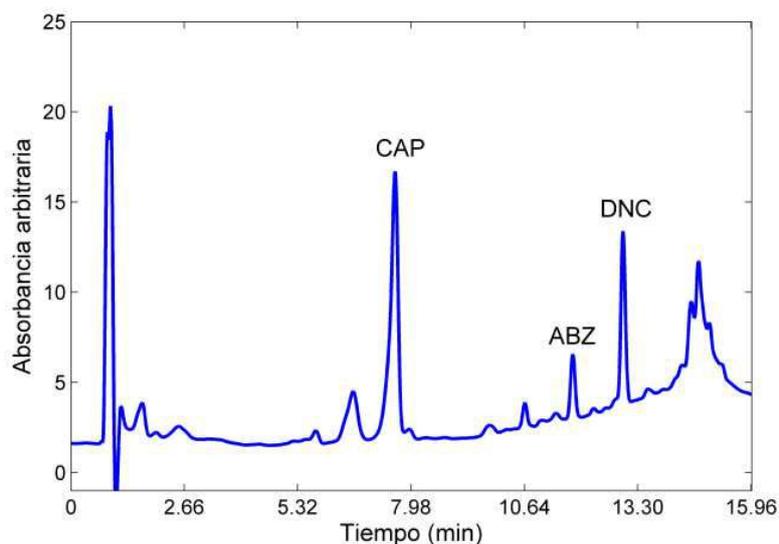


Figura 29. Cromatograma de una muestra de $0.48 \mu\text{g g}^{-1}$ de ABZ, $2.40 \mu\text{g g}^{-1}$ de DNC, $2.35 \mu\text{g g}^{-1}$ de OTC, $0.046 \mu\text{g g}^{-1}$ de ENR, $2.35 \mu\text{g g}^{-1}$ de TMP y $2.39 \mu\text{g g}^{-1}$ de CAP luego de realizar el procedimiento de extracción AA-DLLME-SFO (longitud de onda de 280 nm).

2.5.2. Optimización del DLLME

La selección de los factores influyentes se basó en experiencias previas, por lo que se omitió la realización de un diseño factorial. La optimización de los parámetros se enfocó en la selección de los volúmenes de los solventes extractante y dispersivo. El CCD construido arrojó las combinaciones descritas en la Tabla 16. La Tabla 23 muestra los modelos que ajustan las respuestas.

Debido a las características de los analitos y el sistema, la utilización de este método permite realizar la extracción simultánea de los seis principios activos.

Tabla 23. Ajuste de los modelos para las respuestas del CCD

Respuesta	Modelo	Término significativo ^{a,b}	Transformación ^c	ANOVA (valor p^b)		r_{adj}^2
				Modelo	Falta de ajuste	
Área TMP	Media		Ninguna	<0.0001	0.846	
Área ENR	Media		Ninguna	<0.0001	0.619	
Área CAP	Media		Ninguna	<0.0001	0.747	
Área ABZ	2FI	B (0.0463)	Logaritmo (o)	0.0463	0.613	0.959
Área OTC	2FI	A (0.0056) AB (0.0299)	Ninguna	<0.0001	0.086	0.913
Área DNC	2FI	AB (0.0074)	Logaritmo	0.0404	0.594	0.916

^a A: ACN; B: DCM. El número entre paréntesis corresponde al valor de p .

^b Un valor de p menor a 0.05 indica que el parámetro evaluado es significativo.

^c Entre paréntesis valor de k : Logaritmo: $y' = \log_{10}(y + k)$.

Como criterio de optimización se definió la maximización de las respuestas, dando mayor peso a los compuestos con áreas menores: ABZ, OTC y DNC. Luego del análisis, las condiciones experimentales correspondientes a un máximo en la función deseabilidad ($D = 0.629$) fueron 1840 μL de ACN como solvente dispersivo y 160 μL de DCM como solvente extractante (ver Figura 30).

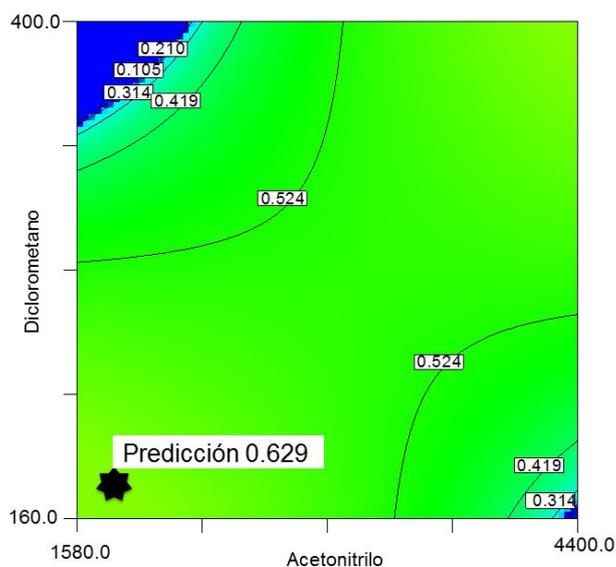


Figura 30. Superficie de contorno para DLLME. Gráfica en función de los volúmenes de DCM y ACN. La estrella representa la combinación que genera el mejor valor de D .

Un parámetro importante en los sistemas de extracción es el análisis de la mezcla de solventes necesaria para la resuspensión de los analitos. En este caso, se construyó un SLD con el objetivo de realizar el análisis conveniente (ver Tabla 17).

Luego del análisis de los cromatogramas, con el fin de poder seleccionar las mejores respuestas, se observó que no solo el área varía durante la experimentación, sino que también existen variaciones en el ancho de alguno de los picos cromatográficos. Por lo tanto, en el paso de optimización se tuvieron en cuenta el área de TMP, OTC, ENR, CAP, ABZ y DNC y el ancho del pico de OTC, CAP y TMP. Los resultados del análisis de las respuestas se muestran en la Tabla 24.

En las condiciones óptimas, se obtuvieron cromatogramas como los que se muestran en las Figuras 32 A y 32 B. Como puede apreciarse, al aplicar este método de extracción todos los analitos son extraídos.

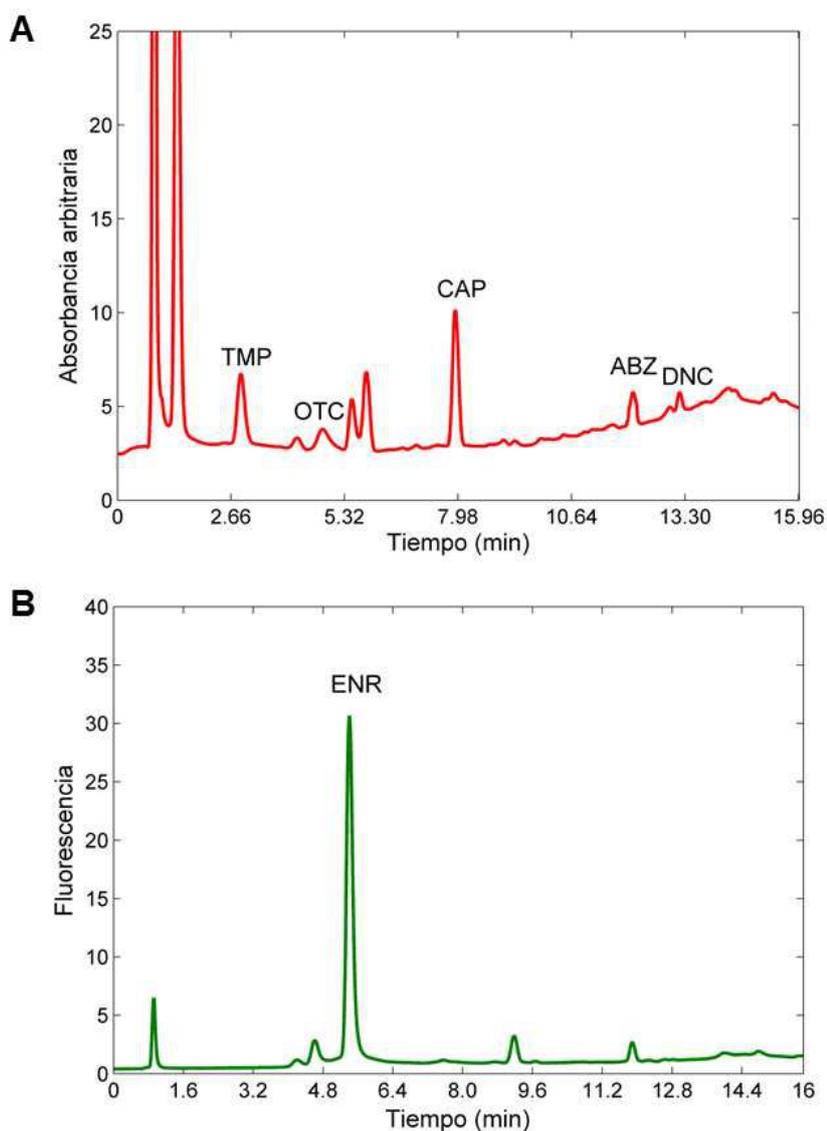


Figura 32. Cromatograma de una muestra de $0.48 \mu\text{g g}^{-1}$ de ABZ, $2.40 \mu\text{g g}^{-1}$ de DNC, $2.35 \mu\text{g g}^{-1}$ de OTC, $0.046 \mu\text{g g}^{-1}$ de ENR, $2.35 \mu\text{g g}^{-1}$ de TMP y $2.39 \mu\text{g g}^{-1}$ de CAP, utilizando el procedimiento de extracción DLLME, registrados a **A)** longitud de onda 280 nm y **B)** longitud de onda de emisión 450 nm.

2.5.3. Rendimiento del método cromatográfico

Con el fin de comparar los sistemas desarrollados, se construyeron curvas de calibrado, con las cuales se calcularon las recuperaciones de los sistemas extractantes. Las características del rendimiento analítico se muestran en la Tabla 25. Para la evaluación de linealidad se verificó la bondad del ajuste comparando la varianza de la falta de ajuste con la varianza del error puro, y la adecuación de cada modelo se estimó mediante la aplicación de una prueba F recomendada por IUPAC [80].

Tabla 25. Parámetros de calibración.

Analito	Rango lineal ^a	Ordenada al origen	Pendiente	LOD ^a	LOQ ^a	F_{exp} ^b
TMP	0.38-9.96	-16.91	69.00	0.13	0.37	1.00
CAP	0.34-9.36	-1.42	69.19	0.12	0.34	1.14
OTC	0.92-9.36	-27.35	46.59	0.32	0.92	1.53
DNC	0.61-9.00	-34.92	82.78	0.22	0.62	2.06
ABZ	0.077-1.92	-7.19	487.53	0.027	0.077	3.25
ENR	0.016-0.200	-24.73	5307.0	0.0056	0.016	2.14

^aConcentración en $\mu\text{g g}^{-1}$.

^b $F_{tab}=5.112$.

2.5.4. Evaluación de los métodos de extracción

En esta parte del desarrollo experimental se planteó el estudio, por un lado, del efecto que ejerce el sistema de extracción sobre la cuantificación de los analitos y, por el otro, el efecto que ejerce la matriz “huevo” sobre la extracción.

Para cumplimentarlo, se analizaron soluciones estándares y muestras de huevo adicionadas a dos niveles de concentración, por quintuplicado, utilizando los dos métodos de extracción optimizados. Luego de obtener las áreas, se calcularon las recuperaciones utilizando los datos de la curva de calibrado de cada analito. La Tabla 26 resume los resultados obtenidos.

Tabla 26. Recuperaciones obtenidas mediante los métodos de extracción optimizados. Las muestras analizadas corresponden a soluciones estándares y muestras de huevo adicionadas.

Método	Nivel	Muestra	ABZ	DNC	TMP	CAP	ENR	OTC
AA-DLLME-SFO	1	Estándar	86.7 (5.7)	96.9 (8.0)		95.2 (3.8)		
		Huevo	81.9 (5.3)	85.7 (4.9)		92.3 (9.3)		
	2	Estándar	89.1 (6.7)	96.5 (3.4)		98.7 (3.6)		
		Huevo	85.4 (0.8)	87.1 (3.0)		95.2 (6.3)		
DLLME	1	Estándar	84.6 (2.0)	63.1 (5.8)	67.3 (2.2)	94.6 (2.2)	95.2 (4.8)	41.6 (5.0)
		Huevo	57.6 (8.9)	26.2 (9.7)	53.3 (4.6)	67.7 (8.0)	76.7 (7.4)	34.9 (6.5)
	2	Estándar	81.0 (4.2)	62.5 (2.8)	65.7 (3.4)	98.3 (2.1)	93.9 (2.5)	40.9 (5.9)
		Huevo	54.4 (6.4)	24.1 (9.6)	54.2 (8.3)	68.4 (9.1)	75.9 (8.9)	33.3 (4.0)

Los números entre paréntesis corresponden a los CV%.

Del análisis de la Tabla 26 se pueden extraer varias conclusiones. En general, se observa la presencia de efecto matriz, fundamentada en la disminución de las recuperaciones obtenidas para todos los sistemas y analitos estudiados. Cabe aclarar que el efecto no es uniforme, y que se observan diferencias tanto entre analitos como entre sistemas.

Al analizar la extracción de DNC mediante el método AA-DLLME-SFO, el analito tiene una recuperación de un 96% en la solución estándar mientras que en huevo es del 86%. Estos resultados permiten inferir que el método empleado no afecta la extracción del compuesto, pero sí lo hace la matriz, aunque no con demasiada influencia, obteniendo recuperaciones dentro del rango aceptado por regulaciones ($\pm 20\%$) [116]. Para los demás analitos extraídos con el método AA-DLLME-SFO no existen diferencias en su determinación.

Cuando se considera la extracción de DNC con el método DLLME, la recuperación en la solución estándar es de aproximadamente 63%, mientras que en huevo es del 26%. En este caso, el método de extracción solo permite obtener aproximadamente un 60% del analito, mientras que el efecto que produce la matriz reduce la extracción otro 40%. Como conclusión, la disminución de la extracción hasta un valor de aproximadamente un 25% en huevo se debe a una combinación entre el efecto que ejerce el método de extracción y la matriz.

Como se viene remarcando en diferentes apartados, las diferencias en el rendimiento de los métodos de extracción se pueden atribuir a las propiedades fisicoquímicas de los analitos. En este sentido, con el método AA-DLLME-SFO es posible extraer los compuestos más hidrofóbicos, es decir, ABZ, CAP y DNC, con recuperaciones mayores al 80%. Por el contrario, el método DLLME puede implementarse para extraer los compuestos más hidrofílicos, como ENR u OTC. Pero independientemente del analito en cuestión, la utilización del sistema DLLME genera dos tipos de disminuciones en las recuperaciones, una debida al sistema de solventes utilizados y otra a la matriz en la que se encuentran.

Luego de la extracción, teniendo en cuenta la relación entre los volúmenes iniciales y finales, puede aplicarse para los dos métodos desarrollados un factor de enriquecimiento de hasta 20. Un rasgo importante de los métodos desarrollados es la relación de volúmenes entre solventes y muestras, las cuales resultaron ser menores a 3, lográndose una mejora importante en comparación con los métodos que se encuentran en bibliografía [224-226].

RESULTADOS Y DISCUSIONES



DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN CAMA DE POLLO MEDIANTE CLAR CON DAD Y FSFD

“Houston: tenemos un problema... o quizás varios...”

2.6.1. Consideraciones generales

Durante el desarrollo de esta sección se planteó el desafío de analizar en forma simultánea una serie de analitos, no solo con características fisicoquímicas diferentes, sino también pertenecientes a familias diferentes. En este sentido, la Figura 33 muestra una clasificación de los compuestos en estudio. Mediante este análisis se verificó otro parámetro de complejidad, ya que los compuestos que en la Figura 33 comparten color presentan semejanzas espectrales.

Antiinflamatorios y antihistamínicos	Flunixin Diclofenac Ibuprofeno	Prednisolona Betametasona
Antimicrobianos	Trimetoprima Clortetraciclina Enrofloxacin Cloranfenicol	Ceftiofur Difloxacin Flumequina
Aparato respiratorio	Clenbuterol	
Antiparasitarios externos	Imidacloprid	
Antiparasitarios internos	Albendazol Pirantel	Fenbendazol
Aparato digestivo	Mebutona	
Hormonales	Progesterona	
Coccidiostatos	Nicarbazina	
Ansiolítico (sedante)	Diazepam	

Figura 33. Analitos en estudio y sus respectivas familias

Con respecto a la validación, las metodologías más aplicadas implican realizar la calibración en solvente puro o realizar adiciones de los analitos a una matriz libre de los analitos de interés. La metodología a seleccionar se define luego del análisis de una variedad de factores, como lo son el efecto matriz, la complejidad del sistema, la factibilidad de contar con una muestra libre de analitos, entre otros. En el presente trabajo, debido a la complejidad de la matriz, se tomó la decisión de realizar la validación utilizando una matriz adicionada con analitos.

Otro inconveniente de la alta complejidad del sistema es la falta de una completa resolución cromatográfica, y, por esta razón, en esta etapa se definió la necesidad de generar datos de segundo orden y su posterior análisis mediante el uso de algoritmos quimiométricos, con el fin de obtener resultados cuali y cuantitativos.

2.6.2. Optimización del método cromatográfico

Debido a las diferentes características de los analitos en estudio, para poder generar una separación temporal reproducible, el análisis cromatográfico requiere de un control estricto del pH de la fase móvil.

Por lo antes mencionado, se realizaron una serie de experimentos que involucraron la construcción de curvas de pH vs tiempo de retención de los analitos en estudio, con el objetivo de conocer el valor de pH en el que la mayoría de los compuestos se encuentran en forma neutra.

Entonces, en una primera instancia, se definieron las condiciones cromatográficas para que los analitos eluyan en un rango de tiempo acorde al sistema en estudio. Con este propósito, se definieron los porcentajes de solventes orgánicos necesarios para la correcta elución de los compuestos, dividiendo al grupo de veintidós analitos en dos, con el fin de implementar diferentes métodos isocráticos. En síntesis, para caracterizar a los compuestos ENR, IMD, CLB, TMP y DIF se utilizó una fase móvil compuesta por solución buffer 10 mmol L⁻¹:ACN (85:15), flujo de 1.00 mL min⁻¹, y temperatura de 25 °C (Método A). Por el otro, para caracterizar a los compuestos CTC, CTF, ABZ, PSL, FXN, BMV, MBT, DNC, PYR, FBZ, CAP, FLU, DZP, DCF, IBU y PGN se utilizó una fase móvil compuesta por solución buffer 10 mmol L⁻¹:ACN (55:45), flujo de 1.00 mL min⁻¹, y temperatura de 25 °C (Método B).

Una vez establecidos los métodos cromatográficos, se definió el rango de pH. Todas las soluciones buffer se prepararon con fosfato diácido de sodio 10 mmol L⁻¹, ajustando el valor de pH a 2.11, 2.51, 2.74, 3.05, 3.25, 3.51, 3.79, 4.00, 4.27, 4.55, 4.78, 5.04, 5.30, 5.58, 5.78 y 6.00. La selección de los valores se debió a las características de los analitos y las limitaciones propias de la columna y el equipo cromatográfico utilizado.

Cabe recordar que los valores de pH corresponden a la medición de las soluciones buffer previa utilización en el cromatógrafo, y que los valores de pH a los que se enfrentan los analitos durante las corridas están condicionados por los solventes orgánicos y sus porcentajes en la fase móvil [227]. Entonces, aunque este estudio está suscripto a las características cromatográficas de la fase móvil en estudio, cuando se trabaja con una gran variedad de analitos, resulta de suma importancia realizar un análisis de los tiempos de retención vs pH, con el fin de definir un valor de pH adecuado. La Figura 34 muestra las gráficas de tiempo de retención vs pH luego de analizar las corridas cromatográficas obtenidas con el Método A y B.

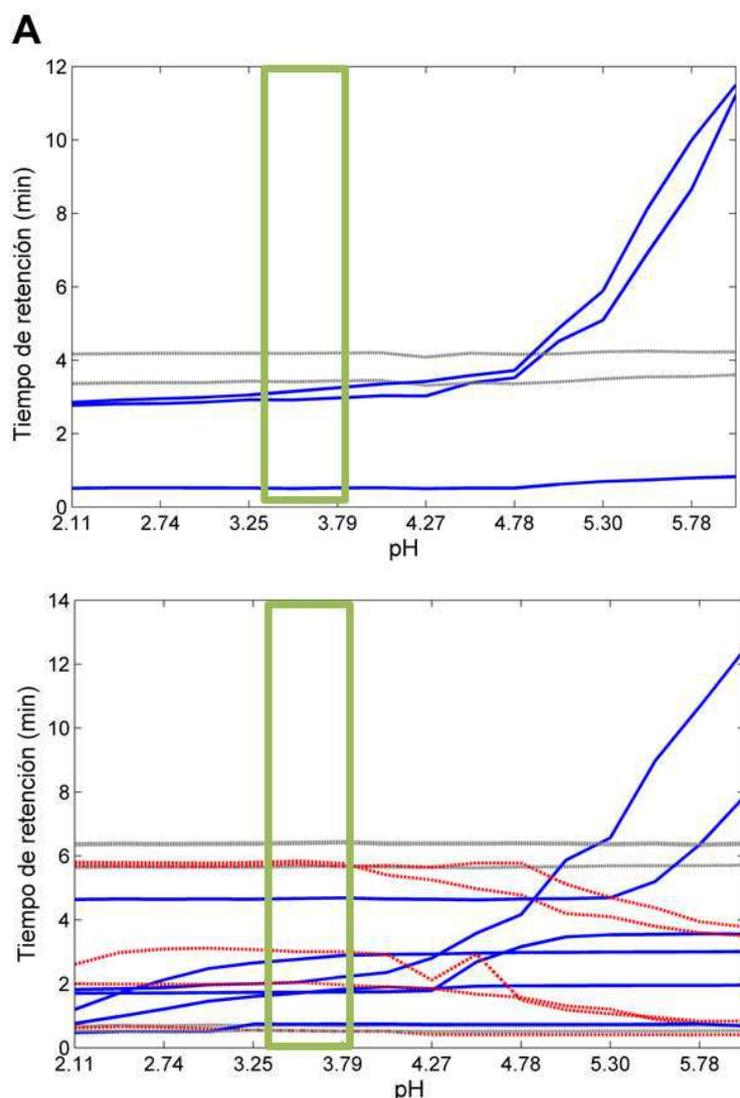


Figura 34. Gráficas de tiempo de retención versus pH: **A)** Método A. **B)** Método B. En azul, compuestos que aumentan su afinidad por la fase estacionaria al aumentar el valor de pH; puntos grises, compuestos que se comportan en forma neutra; puntos rojos, compuestos que aumentan su afinidad por la fase móvil al aumentar el valor de pH.

En el rango de pH entre 3.30 y 3.80, los tiempos de retención de los analitos se mantienen constantes, ya que la mayoría se encuentran en su forma neutra. Además, del análisis de las gráficas se concluye que algunos analitos aumentan su afinidad por la fase estacionaria, reaccionando como compuestos más hidrofóbicos (aumento del tiempo de retención, líneas azules), mientras que otros aumentan su afinidad por la fase móvil, (quizás ionizándose) comportándose como compuestos más hidrofílicos (disminución del tiempo de retención, puntos rojos). Este análisis avala la necesidad de fijar el pH en un valor apropiado. Por lo tanto, en el presente trabajo, el pH de la solución buffer ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) se fijó en 3.50.

Una vez definido el pH de trabajo, y teniendo presente la complejidad de la matriz, se definió la fase orgánica a utilizar y la factibilidad de realizar la experimentación en forma isocrática o mediante un gradiente de elución. En este punto se realizaron diferentes experimentos variando la

composición de la fase móvil en términos de la naturaleza del solvente orgánico. Las pruebas consistieron en realizar cambios utilizando ACN y MeOH en forma individual o combinados, en sistemas isocráticos o fijando un solvente y realizando un gradiente de elución con el otro, o realizando gradientes con los dos solventes en forma simultánea. Finalmente, luego del análisis de los cromatogramas, se llegó a la conclusión de que la combinación de MeOH y ACN como componente orgánico, con gradiente de elución variando los dos solventes genera los mejores resultados en concepto de separación.

Por último, una vez definidos los componentes de la fase móvil, se procedió a optimizar el gradiente de elución, el flujo y la temperatura. La optimización se realizó variando las condiciones en forma independiente, ya que llegada esta instancia se contaba con mucha información acerca de las características de los analitos. Tanto el gradiente final como las demás condiciones cromatográficas se describieron previamente en Metodología (ver Tabla 13).

La Figura 35 corresponde a un cromatograma de una solución estándar en las condiciones experimentales finales. Como puede observarse, a pesar del ajuste de los parámetros, existe una superposición temporal entre los picos cromatográficos de los analitos y las perturbaciones provenientes del gradiente de elución. En el inserto de la figura se muestra la complejidad del sistema a nivel espectral. Como se comentó previamente, algunos analitos comparten semejanzas a nivel espectral UV-Vis: ENR y DIF, ABZ y FBZ, PSN y BMV, CBT y CAP, por lo que se priorizó su separación temporal. Las flechas en la Figura 35 muestran las posiciones aproximadas de los analitos antes mencionados.

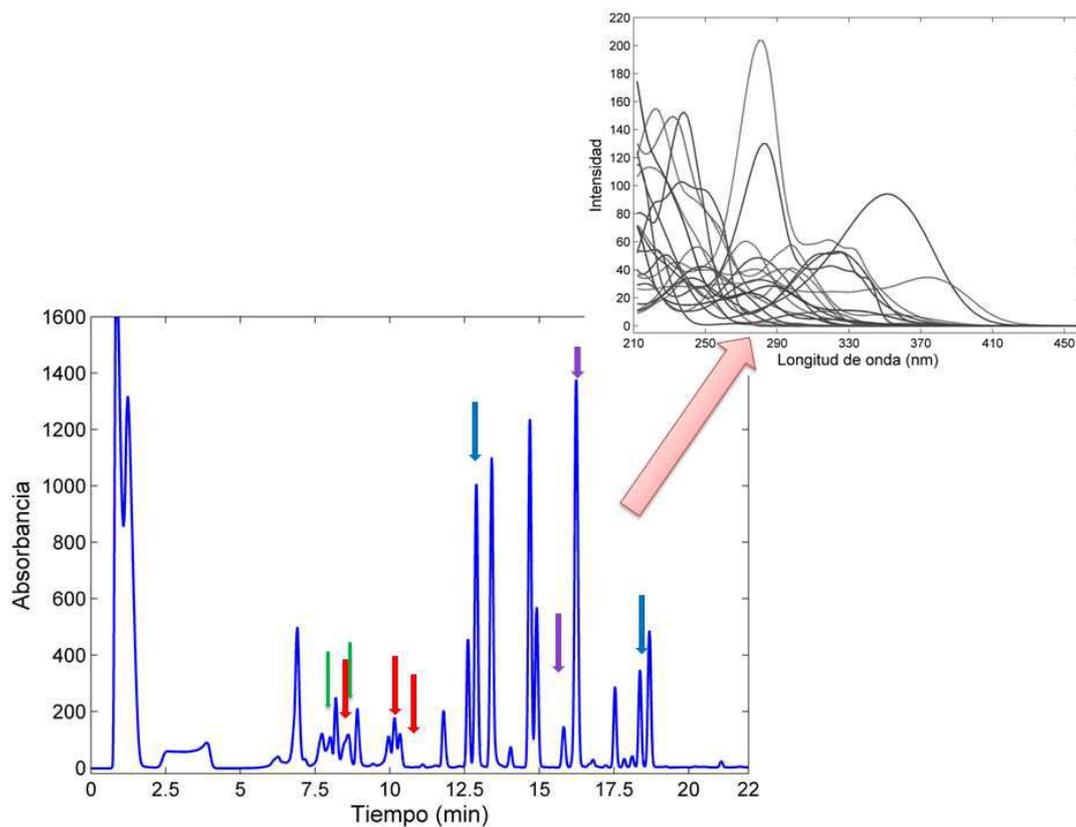


Figura 35. Cromatograma de una solución estándar (CLAR-DAD) registrado a 240 nm. Las flechas indican los analitos que poseen semejanzas espectrales, y cada color refiere a los analitos que las comparten.

2.6.3. Optimización del procedimiento de extracción

Con el propósito de obtener la mejor combinación de solventes que generen la máxima recuperación de los analitos en estudio, se construyó un diseño experimental de mezclas, teniendo en cuenta el uso de MeOH, ACN y, solución buffer (H_3PO_4/NaH_2PO_4) como sistema extractante, y registrando como respuestas las recuperaciones de los analitos. En este punto es importante remarcar que las áreas se obtuvieron analizando las matrices mediante MCR-ALS, como se describirá posteriormente. Luego del trabajo experimental y el análisis de los resultados, se procedió al ajuste de los modelos, los cuales de resumen en la Tabla 27.

Tabla 27. Modelos ajustados para cada respuesta

Respuesta	Modelo	Transformación ^a	ANOVA ^b	
			Modelo	Falta de ajuste
TMP	Cúbico	Raíz cuadrada (0.5)	<0.0001	0.446
IMD	Cúbico	Ninguna	<0.0001	0.165
CLB	Cuadrático	Logaritmo (0)	0.0002	0.329
ENR	Cuadrático	Ninguna	<0.0001	0.165
DIF	Cuadrático	Logaritmo (0.711)	<0.0001	0.124
CTC	Lineal	Logaritmo (0.331)	<0.0001	0.415
CAP	Cuadrático	Inversa de la raíz cuadrada (-0.5)	<0.0001	0.577
CFT	Lineal	Ninguna	<0.0001	0.176
PYR	Cuadrático	Logaritmo	<0.0001	0.303
FLU	Lineal	Inversa de la raíz cuadrada (-0.5)	0.027	0.235
PSL	Cuadrático	Logaritmo (0)	<0.0001	0.450
MBT	Cuadrático	Ninguna	<0.0001	0.313
ABZ	Cuadrático	Ninguna	<0.0001	0.728
FBZ	Cuadrático	Ninguna	<0.0001	0.711
DZP	Cuadrático	Potencia (-1.44)	<0.0001	0.375
FXN	Lineal	Ninguna	0.0420	0.726
DNC	Cuadrático	Logaritmo (0)	<0.0001	0.490
IBU	Cúbico	Raíz cuadrada (0)	<0.0001	0.601
DCF	Lineal	Ninguna	0.0004	0.296
PGN	Cúbico especial	Ninguna	0.0063	0.063
BMV	Cúbico	Inversa de la raíz cuadrada (0)	<0.0001	0.851

^a El valor entre paréntesis corresponde al valor de λ o k según corresponda:

Potencia: $y' = (y + k)^{\lambda}$ con $k = 0$;

Logaritmo: $y' = \log_{10}(y + k)$ con $\lambda = 0$;

Raíz cuadrada: $y' = \sqrt{y + k}$ con $\lambda = 0.5$;

Inversa de la raíz cuadrada: $y' = \frac{1}{\sqrt{y+k}}$ con $\lambda = -0.5$.

^b Un valor de p menor a 0.05 indica que el parámetro evaluado es significativo.

Para verificar la idoneidad de los modelos, se aplicó un test ANOVA que arrojó valores de p menores a 0.05 con p de falta de ajuste entre 0.063 y 0.851, lo que pone de manifiesto el ajuste adecuado de los modelos.

En el análisis de las respuestas se decidió maximizar las recuperaciones, asignándoles un peso mayor (igual a 5) a las más bajas, a saber, CTC, CTF y PYR.

Luego de la optimización, como puede observarse en la Figura 36, la combinación que genera la mayor deseabilidad ($D = 0.611$), corresponde a la mezcla de MeOH y solución buffer (H_3PO_4/NaH_2PO_4), en una proporción de 33 y 67% v/v, respectivamente.

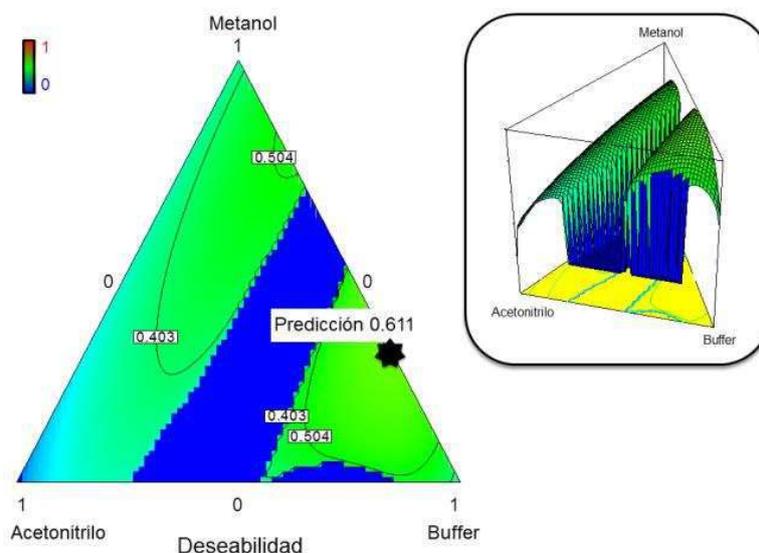


Figura 36. Superficie de contorno para el SLD. La estrella representa la combinación que genera el mayor valor de D .

Para continuar con la optimización del proceso de extracción, un punto clave, que en general no suele optimizarse, es el tiempo de extracción necesario para que los compuestos abandonen la matriz y pasen a la solución extractante. Para el análisis de estos factores se construyó un CCD teniendo en cuenta el tiempo de agitación con vórtex, sonicado y agitación en bandeja. En este sentido, las condiciones impuestas al sistema fueron minimizar los factores y maximizar las respuestas (recuperaciones) de los analitos en estudio. La Tabla 28 muestra los modelos ajustados y los factores que influyen en la extracción.

Tabla 28. Modelos ajustados para cada respuesta

Respuesta	Modelo	Factores influyentes ^{a,b}	ANOVA ^b	
			Modelo	Falta de ajuste
DNC	2FI	AB(0.0063)	0.0259	0.243
CAP	Media			0.996
DCF	Cuadrático	AC(0.0290) A ² (0.0300)	0.0053	0.748
ABZ	2FI	AC(0.0331)	0.0079	0.658
FXN	Cuadrático	AC(0.0221)	0.0059	0.592
IMD	Cuadrático	A ² (0.0243)	0.0268	0.840

A: agitación con vórtex; B: sonicado; C: agitación en bandeja.

^aValores entre paréntesis refieren a los valores de p .

^bUn valor de p menor a 0.05 indica que el parámetro evaluado es significativo.

La mejor combinación de los factores, que genera un valor de $D = 0.820$, se relaciona con los siguientes valores de los factores: 2.00 minutos de agitación con vórtex, 18 minutos de sonicado y 6 minutos de agitación en bandeja, finalizando la extracción en un tiempo de 26 minutos.

La Figura 37 muestra el proceso de medida químico completo, desde la toma de la muestra hasta la obtención de los resultados.

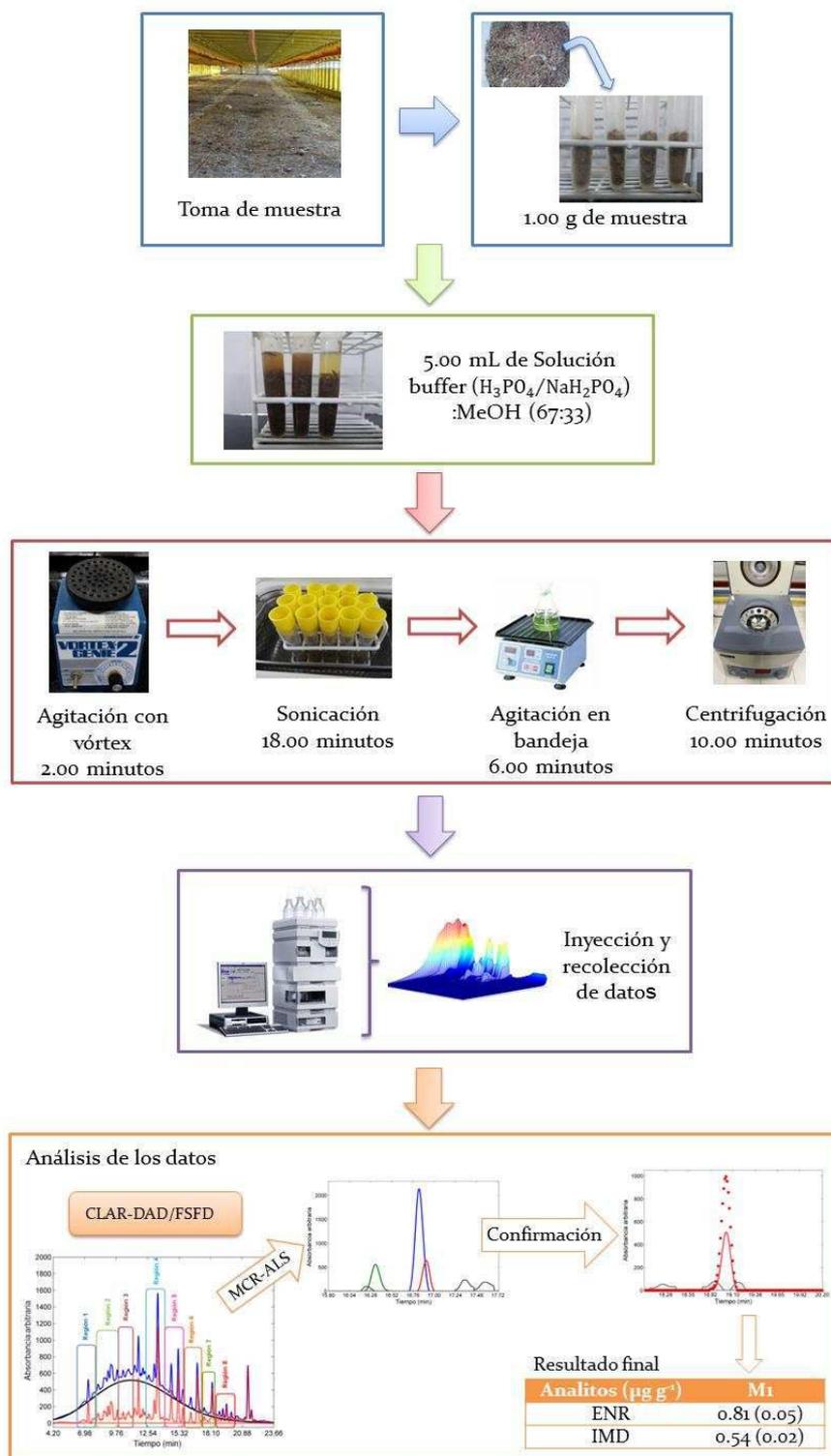


Figura 37. Diagrama del proceso de medida químico.

2.6.4. Corrección de línea de base

La Figura 38 muestra el cromatograma obtenido al adicionar a la matriz un volumen adecuado de los estándares y realizar el proceso de extracción. En este caso se observa que la superposición

entre los analitos y los componentes de la matriz es completa, presentando una línea de base elevada.

Durante el presente trabajo de tesis, para reducir la línea de base se aplicó la metodología propuesta por Eilers [218]. La reducción en la complejidad de los datos resulta evidente al observar la Figura 38, en la cual el cromatograma original, su línea de base calculada y el cromatograma corregido al restar la matriz de fondo se superponen gráficamente.

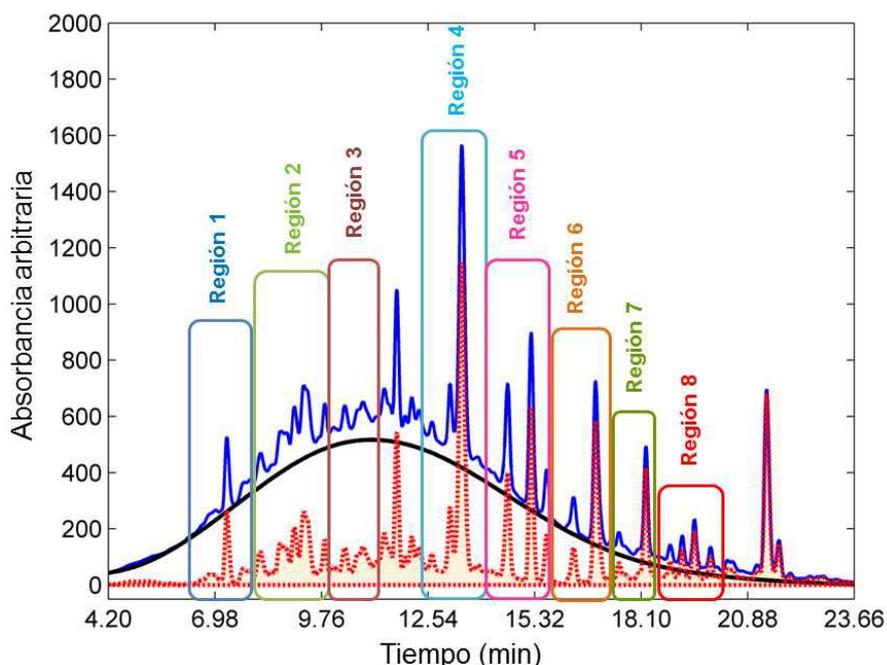


Figura 38. El cromatograma original (CLAR-DAD) registrado a 240 nm se observa en línea azul, la línea negra corresponde a la línea de base estimada y el trazado de puntos rojo corresponde al cromatograma corregido obtenido al restar la línea de base de la matriz. Posteriormente, para simplificar el análisis se dividió el cromatograma en regiones.

Para poder simplificar el análisis posterior, los cromatogramas se dividieron en ocho regiones, las que contienen diferentes analitos (Figura 38). La selección de las regiones, tanto a nivel temporal como espectral, se realizó luego del análisis de los tiempos de retención y los espectros de los analitos, teniendo en cuenta dejar a los analitos que poseen similitudes espectrales en regiones diferentes. Es importante remarcar que, aunque los analitos ENR y DIF poseen superposiciones espectrales en la región UV-Vis, sus espectros de emisión son diferentes, por lo que el análisis de estos se realizó en una misma región. La Tabla 29 resume los analitos analizados en cada región y la longitud de las matrices en término de sensores temporales y espectrales. A su vez, se describen las características del análisis de MCR-ALS en valores de porcentaje de varianza y falta de ajuste.

Tabla 29. Regiones del cromatograma, analitos implicados, número de sensores, componentes obtenidos por SVD, porcentaje de varianza y falta de ajuste.

Región	Analitos	Región en tiempo ^a	Región espectral	Número de componentes (SVD)	Porcentaje de varianza	Falta de ajuste
<u>Detección DAD</u>						
1	TMP	450-560 (6.3-7.8)	5-110 (210-420)	3	91.59	9.13
2	IMD y CLB	560-702 (7.8-9.8)	5-115 (210-430)	6	90.78	8.26
3	CTC, CAP y CFT	687-810 (9.6-11.3)	10-120 (220-440)	5	91.79	7.68
4	PYR y PSL	895-1030 (12.5-14.4)	5-115 (210-430)	4	91.07	2.43
5	MBT	1020-1150 (14.2-16.0)	5-115 (210-430)	4	96.38	9.65
6	FBZ, DZP y FXN	1130-1230 (15.8-17.2)	10-110 (220-440)	4	96.80	7.31
7	DNC	1230-1290 (17.2-18.0)	20-120 (240-440)	5	90.37	9.64
8	IBU, DCF, PGN y BMV	1290-1450 (18.0-20.2)	10-80 (220-360)	5	92.47	2.60
<u>Detección FSFD</u>						
2	ENR y DIF	280-350 (7.4-9.3)	45-260 (355-570)	4	95.45	9.06
4	FLU	450-500 (12.0-13.3)	10-160 (320-470)	3	96.42	8.50
5	ABZ	540-600 (14.4-16.0)	10-130 (320-440)	3	96.07	8.20

^a Entre paréntesis N° de sensores en minutos

^b Entre paréntesis N° de sensores en nm

2.6.5. Análisis multivariado

Luego de obtener las matrices de cada región (ver Tabla 29), se procedió a realizar el análisis del set de calibración y validación mediante el algoritmo MCR-ALS.

Debido a las variaciones en los tiempos de retención de cada analito entre corridas, el aumento de las matrices se realizó en modo temporal [27].

El número de componentes espectrales para cada región se estimó mediante descomposición de valores singulares (SVD) (ver Tabla 29). Posteriormente, para construir las estimaciones iniciales, se llevó a cabo el análisis de los espectros más puros usando rutinas basadas en la metodología SIMPLISMA [31].

Finalmente, con el propósito de conducir el procedimiento ALS para la generación de soluciones químicamente interpretables, se aplicaron las siguientes restricciones: correspondencia entre especies, no negatividad en ambos modos y unimodalidad en modo temporal. Luego del modelado, para construir las gráficas pseudounivariadas, en cada muestra de calibración se aislaron las áreas bajo la curva correspondientes a cada analito. Del análisis, se observó la existencia de una

relación lineal entre las áreas obtenidos por MCR-ALS y las concentraciones de todos los analitos, hecho que se verificó realizando un test de linealidad [222].

La Figura 39 muestra los perfiles temporales y espectrales correspondiente a la resolución de la muestra de validación 2, en las regiones 5, 7 y 8, pertenecientes a matrices obtenidas mediante DAD o FSD.

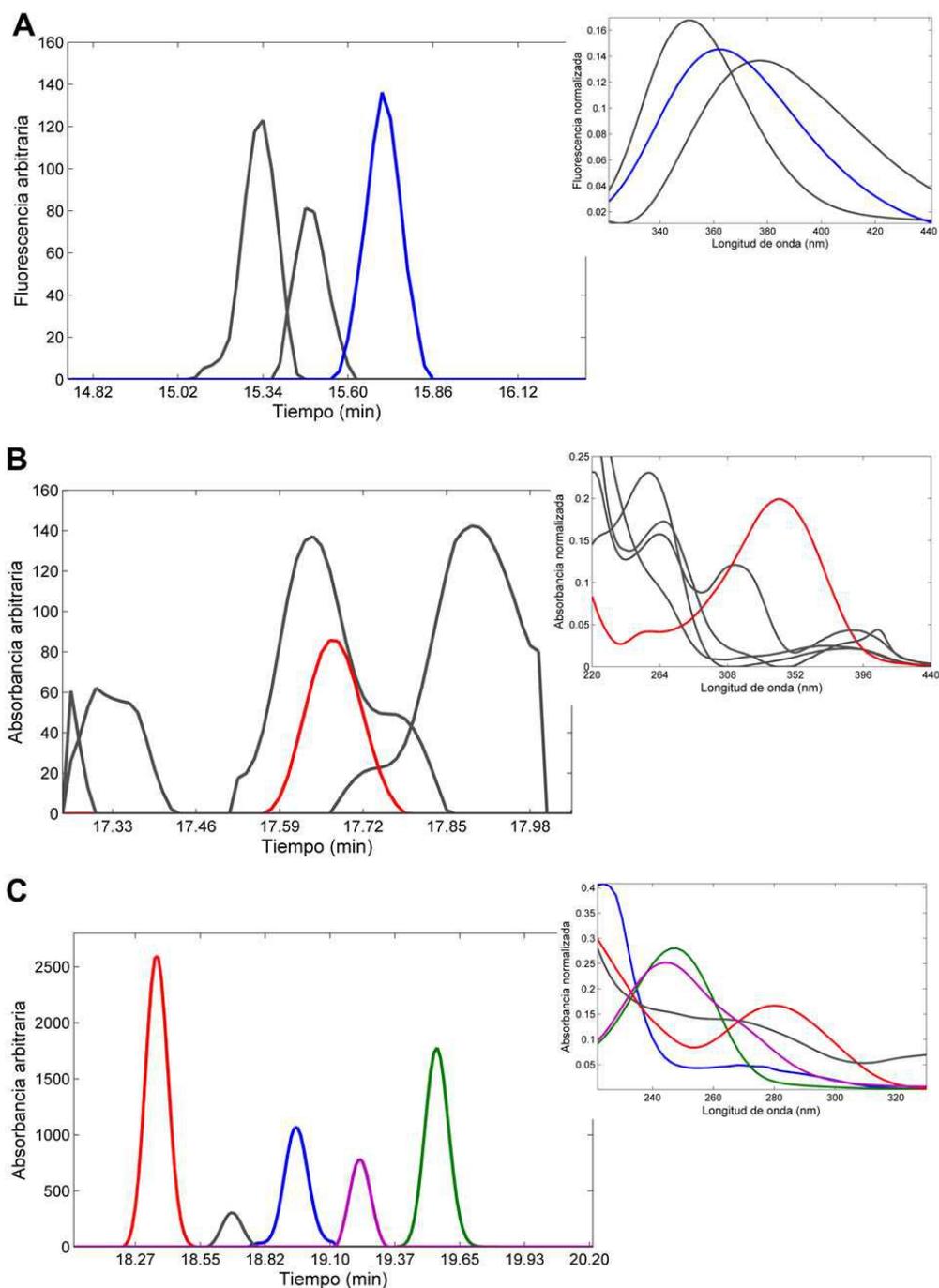


Figura 39. Perfiles de elución y espectros resueltos por MCR-ALS: **A)** para albendazol (línea azul) y dos interferentes (líneas grises) presentes en la región cinco de la muestra de validación 2 (FSD), **B)** para DNC (línea roja) y cuatro interferentes (líneas grises) presentes en la región siete, y **C)** para diclofenac (línea roja), ibuprofeno (línea azul), betametasona (línea violeta), progesterona (línea verde) y un interferente (línea gris) presentes en la región ocho de la muestra de validación 2 (DAD).

La Figura 39 A muestra los perfiles temporales y espectrales de fluorescencia resueltos por MCR-ALS para la región cinco. En esta figura, las tres contribuciones se identificaron como ABZ (línea azul sólida) y dos componentes de cama de pollo. Otro ejemplo de la complejidad de los datos resulta evidente en la Figura 39 B, la cual contiene los resultados de MCR-ALS para las matrices de la región siete obtenidas con DAD, y representan cinco contribuciones independientes identificadas como DNC (línea roja sólida) y cuatro componentes desconocidos de cama de pollo. Por su parte, la Figura 39 C, muestra los perfiles temporales y espectrales de la sección ocho, en la que se aprecia solo un interferente y los analitos en estudio diclofenac (línea roja sólida), ibuprofeno (línea azul sólida), betametasona (línea fucsia sólida) y progesterona (línea verde sólida), demostrándose, por un lado, que la complejidad de la matriz no es constante durante el tiempo de análisis y, por el otro, que MCR-ALS es capaz de extraer la señal de los analitos en presencia de una variedad de interferentes.

Con respecto al análisis del set de validación utilizando para validar el modelo multivariado, la Tabla 30 resume los resultados de predicción correspondientes. Como puede observarse, en todos los casos los valores de REP% son menores al 10%, demostrándose una buena predicción. A su vez, se realizó un test t según la Ec. 29, con un nivel de confianza del 95%, resultando los valores de t_{exp} para cada analito menores al valor crítico $t_{(0.028,8)}$ de 2.306, indicándose que las recuperaciones no son estadísticamente diferentes al 100%.

Tabla 30. Predicciones de las muestras de validación al modelar los datos de segundo orden.

Analito	1		2		3		4		5		6		7		8		9		RMSE ^a	REP% ^b	\bar{R}_{exp} ^c	s _R ^d	t _{exp} ^e
	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P					
TMP	2.10	1.91	8.15	8.38	8.15	7.94	6.25	6.16	2.10	2.20	2.10	2.00	6.25	6.41	8.15	8.22	6.25	6.51	0.26	3.09	99.7	4.6	0.19
IMD	4.52	4.24	9.59	9.53	9.59	9.65	2.52	2.51	9.59	9.88	2.52	2.17	4.52	2.32	4.52	4.49	4.52	4.30	0.21	3.72	96.6	5.3	1.96
CLB	0.98	1.10	4.51	4.70	8.04	8.00	4.51	4.74	4.51	4.17	0.98	1.12	8.04	8.17	8.04	8.12	0.98	0.93	0.17	3.71	101.8	6.3	0.86
ENR	0.40	0.42	0.15	0.16	0.15	0.18	0.40	0.39	0.15	0.17	0.28	0.26	0.28	0.28	0.28	0.24	0.40	0.40	0.021	7.52	102.3	10.4	0.68
DIF	0.28	0.29	0.28	0.29	0.40	0.41	0.40	0.47	0.15	0.15	0.15	0.16	0.40	0.42	0.28	0.28	0.15	0.13	0.026	9.35	102.6	8.1	0.96
CTC	12.34	12.17	5.25	5.27	12.34	11.73	8.79	8.93	5.25	5.23	5.25	5.21	8.79	9.31	8.79	9.63	12.34	11.84	0.33	3.75	99.4	3.2	0.60
CAP	8.06	8.00	5.48	5.00	5.48	5.01	1.90	1.87	1.90	1.69	5.48	5.53	8.06	8.44	1.90	1.64	8.06	8.22	0.29	5.57	95.9	6.5	1.88
CFT	7.92	8.34	1.10	1.13	1.10	1.00	7.92	8.59	1.10	1.26	4.40	4.31	4.40	4.92	4.40	4.82	7.92	8.16	0.36	8.13	104.9	7.3	2.03
PYR	8.06	8.57	4.42	4.47	4.42	4.88	2.26	2.49	2.26	2.56	4.42	4.01	8.06	7.90	2.26	2.30	8.06	7.93	0.30	6.18	103.4	7.3	1.38
FLU	1.50	1.51	0.80	0.79	0.80	0.74	2.20	2.46	1.50	1.65	2.20	2.24	2.20	2.35	0.80	0.76	1.50	1.41	0.12	8.00	101.2	7.2	0.48
PSL	4.45	4.79	4.45	4.08	7.96	7.39	7.96	7.64	1.17	1.17	1.17	1.29	7.96	7.71	4.45	4.70	1.17	1.28	0.30	6.70	101.1	7.2	0.47
MBT	8.09	8.38	0.75	0.79	0.75	0.78	8.09	8.15	0.75	0.68	4.52	4.74	4.52	4.73	4.52	5.01	8.09	7.50	0.29	6.59	101.9	6.4	0.91
ABZ	2.20	2.19	2.20	2.31	5.00	4.52	5.00	5.06	0.80	0.82	0.80	0.81	5.00	4.92	2.20	2.38	0.80	0.85	0.85	6.71	101.4	5.2	0.81
FBZ	7.92	8.51	1.07	1.13	1.07	1.04	9.72	8.47	1.07	0.95	4.49	4.70	4.49	4.57	4.49	4.57	7.92	8.07	0.31	6.87	100.8	6.6	0.34
DZP	7.90	8.07	1.04	1.03	1.04	1.12	7.90	7.60	1.04	1.14	4.58	4.78	4.58	4.85	4.58	4.45	7.90	8.29	0.22	4.78	103.0	4.7	1.92
FXN	7.96	8.13	4.49	4.19	4.49	4.83	1.02	0.92	1.02	0.94	4.49	4.68	7.96	7.63	1.02	0.96	7.96	8.48	0.27	6.08	98.5	6.7	0.69
DNC	8.23	8.77	3.44	3.50	5.83	5.30	8.23	8.09	8.23	8.53	3.44	3.20	3.44	3.44	5.83	5.52	5.83	5.60	0.32	5.44	98.3	5.2	0.99
IBU	4.40	4.79	7.92	7.79	7.92	7.78	1.10	0.95	4.40	4.72	1.10	1.04	4.40	4.09	7.92	8.21	1.10	0.97	0.23	5.23	97.5	7.8	0.95
DCF	4.49	5.09	4.49	4.60	7.92	8.16	7.92	8.21	1.07	0.94	1.07	1.14	7.92	8.07	4.49	4.31	1.07	1.09	0.26	5.71	101.9	7.0	0.82
PGN	7.92	7.57	1.06	1.14	1.06	1.11	7.92	8.80	1.06	0.98	4.58	4.08	4.58	4.23	4.58	4.42	7.92	8.45	0.30	6.71	98.6	7.1	0.57
BMV	8.04	8.13	4.21	3.83	4.21	3.86	0.98	1.11	0.98	0.97	4.21	4.51	8.04	8.13	0.98	1.13	8.04	8.08	0.22	4.87	102.2	8.4	0.79

Los números corresponden a la muestra de validación y los valores se expresan en $\mu\text{g g}^{-1}$. N: concentraciones nominales; P: concentraciones predichas.

^aRMSE: Raíz cuadrada del error medio donde $l = 9$.

^bREP: Error relativo de la predicción.

^c \bar{R}_{exp} : Recuperación promedio.

^ds_R: Desviación estándar de la recuperación.

^eValor crítico $t_{(0.028,8)} = 2.306$

Para definir las cifras de mérito del sistema en estudio, los LOD y LOQ se calcularon siguiendo los lineamientos de Bauza y colaboradores (Tabla 31) [95]. Los valores de LOD se encuentran entre 0.005 y 0.20 $\mu\text{g g}^{-1}$ y los de LOQ entre 0.01 y 0.61 $\mu\text{g g}^{-1}$ para los analitos DIF y PGN, respectivamente.

Tabla 31. Cifras de mérito calculadas modelando los datos de segundo orden

Analito	Cifra de mérito			
	Sensibilidad ($\times 10^3$)	γ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)
TMP	1.97	102.4	0.04	0.12
IMD	2.06	36.4	0.12	0.36
CLB	1.60	30.2	0.14	0.43
ENR	21.59	1623.1	0.006	0.02
DIF	21.10	1582.2	0.005	0.01
CTC	2.73	125.9	0.03	0.10
CAP	0.56	19.7	0.19	0.59
CFT	0.81	26.3	0.16	0.46
PYR	2.31	76.6	0.05	0.16
FLU	0.15	113.8	0.04	0.10
PSL	0.65	21.7	0.18	0.55
MBT	0.88	84.6	0.05	0.15
ABZ	0.11	82.8	0.05	0.14
FBZ	0.70	81.8	0.05	0.15
DZP	0.66	81.8	0.05	0.16
DNC	0.25	66.8	0.12	0.31
FXN	0.33	39.2	0.11	0.33
IBU	0.31	21.9	0.19	0.58
DCF	1.10	78.3	0.08	0.23
PGN	0.29	20.8	0.20	0.61
BMV	0.41	28.2	0.15	0.45

γ : sensibilidad analítica; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación [95].

2.6.6. Estudio de linealidad, precisión y recuperación

Como se comentó previamente, con las áreas de las muestras de calibración se construyeron las gráficas pseudounivariadas, y del ajuste se obtuvieron los parámetros de la recta. La Tabla 32 muestra los resultados y, al igual que en todas las validaciones presentadas hasta el momento, se realizó una prueba F para corroborar la linealidad del ajuste.

Tabla 32. Análisis de linealidad

Analito	Parámetro					
	Rango lineal ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Ordenada al origen ^a	Pendiente ^a	F_{exp} ^b	r^2	Falta de ajuste ^c
TMP	0.12 – 10.96	19990 (20)	14800 (100)	2.078	0.999	0.156
IMD	0.36 – 10.95	400 (30)	3380 (40)	1.416	0.998	0.195
CLB	0.43 – 10.39	4100 (100)	1590 (20)	0.624	0.997	0.624
ENR	0.017 – 0.594	430 (30)	18900 (400)	0.943	0.994	0.546
DIF	0.014 – 0.564	650 (10)	10700 (200)	2.227	0.997	0.111
CTC	0.10 – 14.53	670 (70)	996 (9)	1.631	0.999	0.149
CAP	0.59 – 10.30	8800 (200)	840 (30)	2.463	0.987	0.106
CFT	0.48 – 10.34	990 (90)	810 (10)	1.009	0.996	0.417
PYR	0.16 – 13.18	8900 (700)	3530 (90)	0.936	0.991	0.561
FLU	0.11 – 2.54	251 (6)	231 (4)	1.608	0.997	0.153
PSL	0.55 – 11.06	5260 (80)	700 (10)	1.990	0.997	0.119
MBT	0.15 – 10.76	1100 (300)	2966 (4)	0.905	0.998	0.637
ABZ	0.14 – 5.51	680 (10)	200 (3)	0.911	0.997	0.622
FBZ	0.15 – 13.49	1260 (50)	299 (6)	2.467	0.994	0.107
DZP	0.16 – 10.40	-100 (300)	2350 (50)	1.481	0.995	0.384
DNC	0.37 – 19.88	192 (9)	68.9 (0.8)	1.076	0.998	0.320
FXN	0.33 – 11.80	-100 (200)	990 (30)	1.029	0.992	0.177
IBU	0.58 – 9.64	-900 (80)	1220 (10)	1.544	0.999	0.190
DCF	0.23 – 11.27	1400 (200)	1780 (20)	1.499	0.998	0.173
PGN	0.61 – 10.88	3100 (40)	320 (7)	0.947	0.994	0.536
BMV	0.46 – 9.80	1400 (60)	893 (9)	1.723	0.999	0.136

^aValores entre paréntesis indican desviación estándar.

^bTest F para determinar linealidad. $F_{tab} = 2.892$.

^cDebido a que los valores de p de falta de ajuste son mayores o iguales a 0.10, el modelo es adecuado para los datos.

La Tabla 33 contiene los resultados correspondientes al estudio de precisión en términos de repetitividad y precisión intermedia. Del análisis de los CV% se puede concluir que la metodología propuesta es precisa con un nivel de confianza del 95% [88]. Por otra parte, se llevó a cabo un análisis de la varianza de las recuperaciones obtenidas para cada concentración durante dos semanas de manera que se tuvieron en cuenta tanto las variaciones dentro como entre condiciones. Los valores de ($p < 0.05$) permiten concluir, con un nivel de confianza del 95%, que no existen diferencias significativas entre las medias de las recuperaciones para cada nivel en las semanas de estudio. Eventualmente, se puede afirmar que el método es exacto a la luz de los resultados expresados en términos de sesgo (%) y recuperación (%), variando estos últimos entre 90.3 y 105.6%.

Tabla 33. Resultados de precisión y exactitud

Analito	Precisión						Exactitud			
	Intraensayo ^a		Interensayo ^a		Valor <i>p</i> ^b		Recuperación		Sesgo	
	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S
TMP	3.8	3.0	4.8	4.9	0.374	0.264	103.2	97.7	3.2	-2.3
IMD	7.6	5.2	5.8	4.3	0.838	0.782	99.8	96.4	-0.2	-3.6
CLB	9.4	7.6	8.6	4.1	0.523	0.586	101.0	99.1	1.0	-0.9
ENR	3.2	6.6	5.3	3.7	0.118	0.191	93.5	93.4	-6.4	-6.6
DIF	5.9	6.3	6.6	5.9	0.419	0.703	98.5	96.8	-1.5	-3.2
CTC	5.3	6.8	5.8	6.3	0.099	0.212	93.8	97.8	-6.2	-2.2
CAP	5.3	5.7	6.5	3.5	0.229	0.477	99.3	99.0	-0.7	-1.0
CFT	9.2	5.5	8.2	6.1	0.450	0.596	98.7	94.7	-1.6	-5.7
PYR	5.7	5.5	2.0	3.9	0.639	0.110	103.7	102.3	3.7	2.3
FLU	2.8	2.7	3.3	4.5	0.620	0.275	98.7	101.3	-1.3	1.3
PSL	5.5	5.9	5.2	5.7	0.148	0.458	99.7	96.8	-0.3	-3.2
MBT	3.2	3.9	2.5	4.4	0.151	0.744	92.2	96.7	-7.8	-3.3
ABZ	3.9	4.4	2.9	4.0	0.069	0.109	101.3	90.0	1.3	-10.0
FBZ	5.6	3.2	2.1	4.6	0.0715	0.575	101.4	92.0	1.4	-8.0
DZP	1.3	3.8	3.3	3.0	0.743	0.663	105.6	97.5	5.6	-2.5
FXN	2.4	7.0	3.1	5.5	0.192	0.266	100.1	97.5	0.1	-2.5
DNC	5.2	2.1	5.4	4.1	0.338	0.876	101.6	100.0	1.6	0.0
IBU	6.3	3.3	5.9	5.0	0.421	0.184	97.2	101.3	-2.8	1.3
DCF	4.0	3.2	3.6	3.9	0.564	0.353	105.4	94.8	5.4	-5.2
PGN	7.2	4.6	4.5	5.5	0.111	0.381	94.4	94.1	-5.6	-5.9
BMV	7.8	8.5	5.5	5.5	0.0588	0.781	90.3	103.0	-9.7	3.0

Los valores están expresados en CV%. I: nivel inferior; S: nivel superior.

^aCriterio de aceptación: CV% \pm 15% [116].

^bDebido a que el valor de *p* es mayor que 0.05, no existen diferencias estadísticas entre los valores medios.

2.6.7. Análisis de muestras reales

Antes de comenzar con el análisis de muestras, cabe recordar que SENASA es el ente encargado de establecer los MRL para cada principio activo de uso veterinario en tejidos de animales de consumo. Para el caso de aves, los MRL establecidos en tejidos como huevo o carne se encuentran en un rango entre 0.02 y 6.00 $\mu\text{g g}^{-1}$ [77], pero hasta el momento no existe una normativa que regule los MRL en cama de pollo. Debido a la información recabada en torno al metabolismo de las aves y los períodos de obtención de la muestra [179], los límites obtenidos con la metodología propuesta resultan acordes para el análisis de estos componentes en cama de pollo, y su estudio genera indicios tanto sobre la posible contaminación de las zonas aledañas a los criaderos de animales, como de los lugares en donde se tenga como práctica la utilización de cama de pollo como abono.

Para verificar la aplicabilidad de la metodología propuesta, se analizaron seis muestras reales, recolectadas de diferentes granjas de la provincia de Entre Ríos y Santa Fe.

La inspección visual de las gráficas de contorno de cada muestra revela diferentes patrones relacionados con su origen. En este sentido, la Figura 40, contiene la superficie de contorno para una muestra proveniente de una granja comercial y la muestra proveniente de la granja orgánica. Como era de esperar, la comparación de las señales instrumentales registradas para ambas demuestran que

la cama de pollo proveniente de la granja orgánica presenta un fondo más limpio y la presencia de menos picos cromatográficos, lo que puede atribuirse, por un lado, a diferencias en la alimentación de las aves y, por el otro, a los principios activos utilizados en cada establecimiento.

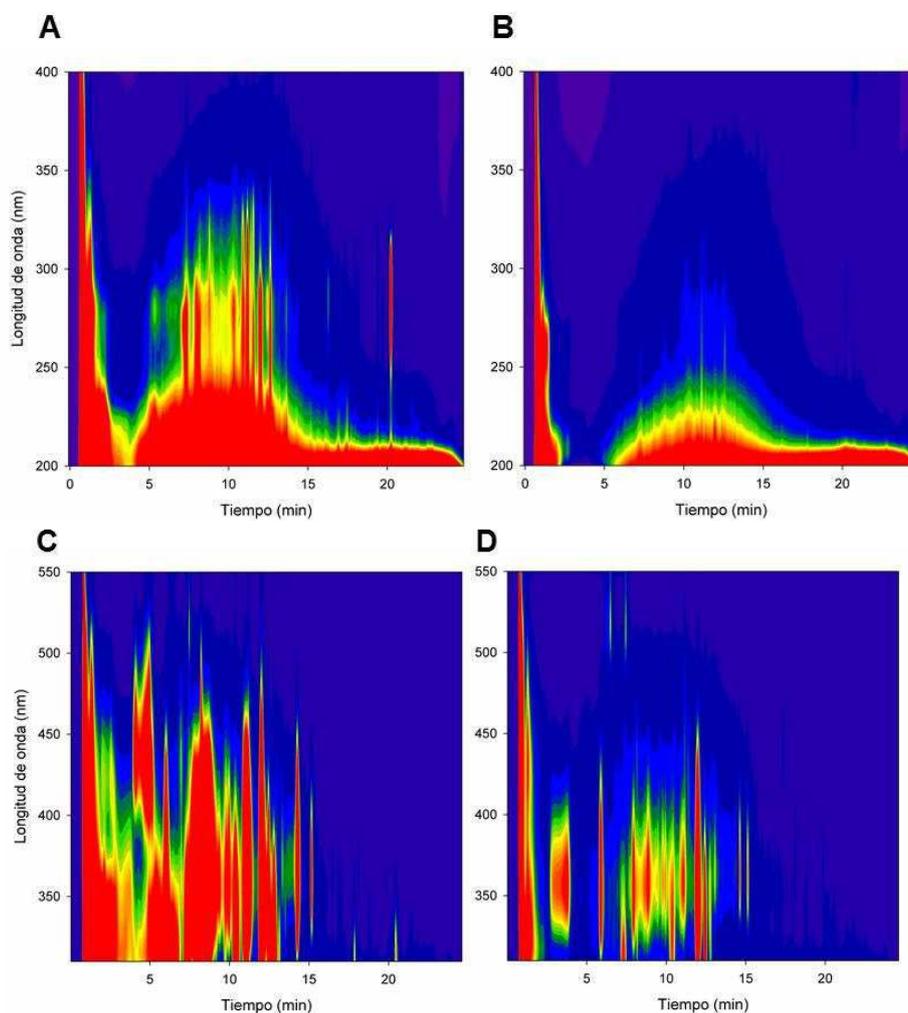
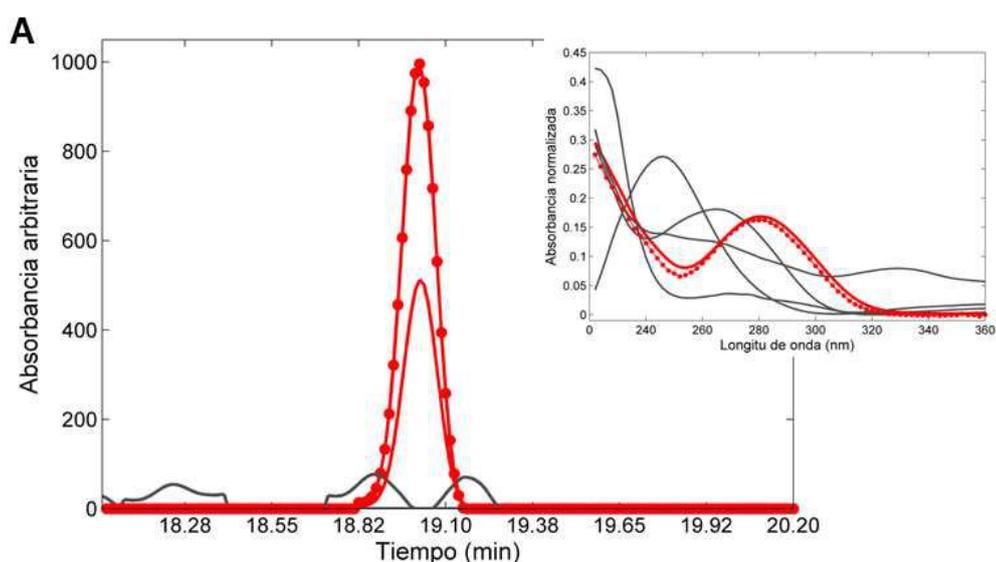


Figura 40. A) Superficie de contorno de la muestra M3 (granja comercial) registrada con DAD y C) FSFD, y B) de la muestra M4 (granja orgánica) registrada con DAD y D) FSFD.

Posteriormente, se procedió al análisis de las muestras ($n = 3$), procesando las matrices, luego de su corrección de línea de base y separación en regiones, mediante MCR-ALS. Los resultados obtenidos durante este procedimiento permitieron sospechar la presencia de varios principios activos en diferentes muestras, tales como: trimetoprima en M2, enrofloxacina en M1 y M6, imidacloprid en M1 y M5, cloranfenicol en M3 y M6, flumequine en M5 y M6, albendazol en M2, M3 y M5, flunixinina en M1, diclofenac en M1 y nicarbazina en M6. En el caso de enrofloxacina, en un primer análisis se observó una saturación de la señal, por lo que las muestras se diluyeron 1:5 para alcanzar concentraciones contenidas en los límites de la curva de calibrado.

Como paso posterior, para confirmar la presencia de estos compuestos, a cada muestra se le adicionó un volumen adecuado de cada solución estándar del principio activo, y se procesaron como

muestras adicionadas. Se analizaron tanto los tiempos de retención como los espectros obtenidos para estas soluciones, comparándolos con las muestras originales. En este sentido, las Figuras 41 A y 41 B muestran los perfiles cromatográficos de la muestra M1 y la confirmación de la presencia de diclofenac, y los perfiles cromatográficos de la muestra M6 y la confirmación de la presencia de enrofloxacin. Como puede observarse en el inserto de la Figura 41 B, además del espectro de enrofloxacin aparece el espectro de un componente altamente similar, pero desconocido. Este hecho sugiere la presencia en la muestra de otra clase de fluoroquinolona, que no compromete la resolución de los datos por MCR-ALS debido a las diferencias en los tiempos de retención de ambos compuestos. Para verificar la calidad del ajuste se analizaron los coeficientes de correlación entre el espectro del estándar y el obtenido por MCR-ALS, obteniéndose en todos los casos valores aceptables (en el ejemplo de la Figura 41, 0.998 y 0.999 para diclofenac y enrofloxacin, respectivamente). Los resultados de las predicciones en las muestras reales se resumen en la Tabla 34. Es importante recalcar que en la muestra proveniente de la granja orgánica (M4) no se observa la presencia de los analitos en estudio.



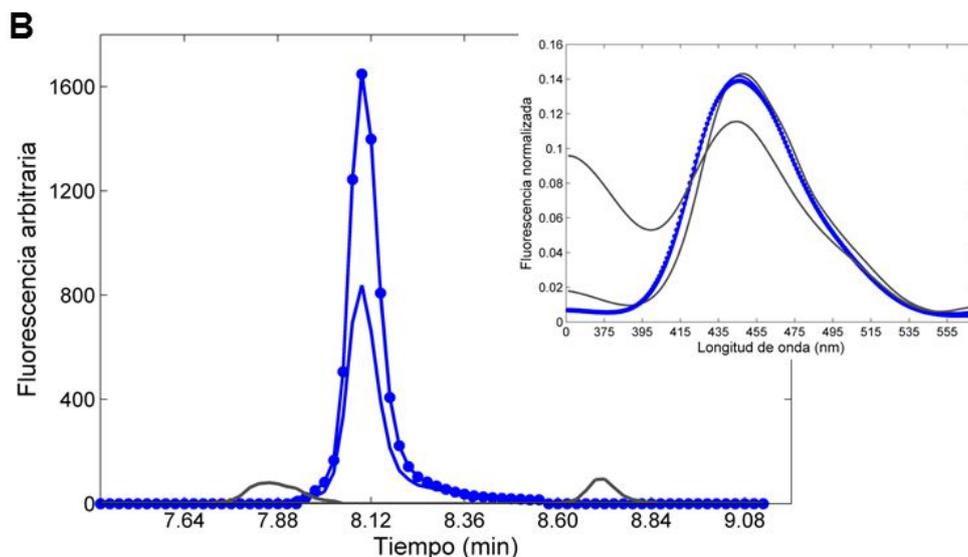


Figura 41. Resolución de MCR-ALS para las muestras: **A)** M1; pico cromatográfico de diclofenac (línea sólida roja), confirmación de su presencia (puntos y línea rojos), y componentes desconocidos de la matriz de cama de pollo (líneas grises); el inserto contiene los espectros DAD obtenido por MCR-ALS de diclofenac (línea sólida roja), los componentes desconocidos (líneas grises) y el espectro del analito puro (puntos rojos). **B)** M6; pico cromatográfico de enrofloxacin (línea azul), confirmación de su presencia (puntos y línea azules), y componentes desconocidos de la matriz de cama de pollo (líneas grises); el inserto contiene los espectros FSFD obtenido por MCR de enrofloxacin (línea sólida azul), los componentes desconocidos (líneas grises) y el espectro del analito puro (puntos y línea azules).

Tabla 34. Determinación de principios activos de uso veterinario en muestras reales recolectadas en cinco granjas comerciales y una granja orgánica.

Analitos ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a	M1	M2	M3	M4	M5	M6
TMP	-	0.79 (0.06)	-	-	-	-
ENR ^b	0.81 (0.05)	-	-	-	-	1.73 (0.05)
IMD	0.54 (0.02)	-	-	-	0.64 (0.04)	-
CAP	-	-	0.70 (0.02)	-	0.64 (0.05)	-
FLU	-	-	-	-	0.15 (0.01)	1.39 (0.07)
ABZ	-	0.24 (0.01)	0.86 (0.06)	-	0.21 (0.01)	-
FXN	0.63 (0.05)	-	-	-	-	-
DNC	-	-	-	-	-	3.7 (0.2)
DCF	0.48 (0.04)	-	-	-	-	-

Entre paréntesis se muestra la desviación estándar.

^a Las líneas indican concentraciones no detectables.

^b Las muestras fueron diluidas 1:5 para obtener concentraciones dentro de los límites de la curva de calibrado.

2.7. Conclusiones

Previo a cualquier determinación analítica, resulta de suma importancia caracterizar de la mejor manera posible a los analitos en estudio. En este sentido, en una primera etapa se desarrolló un método electroforético con detección de arreglo de diodos para determinar los valores de pK_a aparentes. Los valores se calcularon siguiendo dos estrategias; por un lado, se utilizaron las movilidades electroforéticas de los compuestos, y, por el otro, se analizaron los datos obtenidos luego del procesamiento con el algoritmo MCR-ALS. Con respecto a la problemática experimental, se concluyó que la estrategia de recubrimiento con un polielectrolito como PDDA permite obtener un flujo electroosmótico más o menos constante en un amplio rango de pH, generando tiempos de análisis cortos y reproducibles. Del análisis del analito nicarbazina, debido al rango de pH de trabajo y a su capacidad de ionizarse, sólo se obtuvieron datos de pK_a aparentes de su componente HDP. Como resultado, de las gráficas de movilidad electroforética vs pH se obtuvieron dos valores de pK_a aparente. Por su parte, mediante el uso de MCR-ALS fue posible obtener los perfiles de concentraciones de las especies envueltas en el equilibrio y sus espectros de absorción. Como conclusión de la comparación de los valores obtenidos mediante las dos estrategias, se observa que no existen diferencias entre ellos, lo que abre un amplio abanico de posibilidades con respecto al uso de estas técnicas para caracterizar analitos. Cabe recordar que para la utilización de MCR-ALS, el único requisito necesario es que los componentes o las especies a analizar exhiban diferencias en los espectros de absorción correspondientes.

Luego de la caracterización de los analitos, se desarrollaron dos métodos de extracción para verificar la factibilidad de su aplicación en la determinación de seis principios activos en huevo. Por un lado, un método de microextracción líquido-líquido con gota solidificada y asistencia de aire (AA-DLLME-SFO) y, por el otro, un método de microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME). Para conseguir la combinación óptima de los factores intervinientes se utilizaron herramientas de diseño de experimentos. Los resultados mostraron diferencias en cuanto a los analitos capaces de extraerse con los sistemas desarrollados y a las recuperaciones obtenidas, concluyéndose que la elección de la metodología para realizar la extracción dependerá de las características fisicoquímicas de los analitos. En este sentido, es posible extraer los analitos más hidrófobos mediante el uso del método de extracción AA-DLLME-SFO, mientras que los más hidrofílicos son mejor extraídos con el DLLME. Por su parte, resulta de sumo interés realizar un estudio independiente para verificar el efecto que ejerce por un lado el método de extracción y por el otro la matriz. Por lo tanto, en el sistema en estudio, queda en evidencia la necesidad de realizar validaciones en matriz al utilizar el método DLLME, mientras que es posible utilizar estándares puros en la validación del método AA-DLLME-SFO. A su vez, la utilización de diseños de experimentos permitió la reducción de los volúmenes de los solventes utilizados en la extracción, en concordancia con los principios de la "química verde".

Por último, durante el desarrollo del método analítico para la determinación de veintiún principios activos de uso veterinario, a pesar de su alta complejidad, la utilización secuencial de varias herramientas quimiométricas para el procesamiento de los datos permitió resolver el problema. En general, en los sistemas cromatográficos, si lo que se busca es obtener las condiciones óptimas, existen diferentes variables que el investigador debe corroborar; gradiente de elución, temperatura, flujo, entre otros. En este contexto, en sistemas de análisis de multianalitos, donde se encuentran compuestos con marcadas diferencias fisicoquímicas, resulta de suma importancia el estudio de las variaciones de los tiempos de retención en función del pH de trabajo. Mediante este estudio se seleccionó el valor de pH del sistema, permitiendo mantener a los analitos en su forma neutra durante las corridas cromatográficas. Por su parte, el posterior análisis de los demás factores generó un método cromatográfico adecuado para lograr la mayor separación entre los analitos, teniendo en cuenta obtener separaciones temporales de los analitos que comparten características espectrales. A su vez, en sistemas complejos, una parte importante del desarrollo es la selección del método de extracción. En este sentido, mediante la optimización del diseño de mezclas *Simplex Lattice* se consiguió obtener la combinación de solventes que generaban el máximo de recuperación de los analitos en estudio. Por su parte, la utilización de un diseño central compuesto para definir el tiempo del procedimiento permitió realizar la extracción de los analitos en un tiempo considerablemente menor al empleado en un principio.

Con respecto al uso de herramientas quimiométricas, la simplificación del sistema al aplicar corrección de línea de base y eliminación de la señal de muchos compuestos de la matriz, mediante el algoritmo de Eilers permitió mejorar el posterior análisis de los datos. En este sentido, se debe tener en cuenta que al trabajar con datos complejos, ya sea por la matriz o la cantidad de información recabada durante su toma, resulta de suma importancia realizar un pretratamiento adecuado. Por su parte, la de separar los datos en regiones, permitió obtener resultados satisfactorios en el análisis de componentes que comparten características espectrales. A su vez, mediante esta estrategia se disminuye considerablemente la complejidad de la muestra. Posteriormente, el modelado de los datos de segundo orden mediante MCR-ALS proporcionó resultados cualitativos y cuantitativos satisfactorios, lo que apoyó su aplicación a la resolución de picos altamente superpuestos en presencia de compuestos de la matriz. Cabe resaltar que en la mayoría de los casos, los límites de detección alcanzados para los principios activos son comparables con los obtenidos mediante el uso de espectrometría de masas. A nivel validación, se obtuvieron resultados satisfactorios dando lugar a rangos lineales apropiados y excelentes recuperaciones y niveles de precisión. Para verificar su factibilidad, el método se aplicó con éxito a la determinación de principios activos en muestras de diferentes orígenes. Como resultado, se encontraron nueve principios activos en las muestras analizadas, en concentraciones entre 0.15 y 3.7 $\mu\text{g g}^{-1}$. En las

muestras se cuantificaron los analitos trimetoprima, enrofloxacin, imidacloprid, cloranfenicol, flumequine, albendazol, flunixin, DNC y diclofenac, mostrándose la variabilidad de principios activos utilizados durante la crianza de los animales, lo que permite arribar a la conclusión de que, con el objetivo de mantener la inocuidad de los sistemas aledaños, se necesita realizar un monitoreo constante en los sistemas productivos aviares.

3.



CONCLUSIONES GENERALES



CONCLUSIONES GENERALES

Durante la presente tesis doctoral se desarrollaron diversas estrategias con el fin de mejorar la determinación de ácido retinoico y principios activos de uso veterinario en muestras de interés biológico.

De los resultados obtenidos se rescatan la importancia y la utilidad del uso de diseño de experimentos con el fin de optimizar diferentes pasos del proceso de medida químico. En este sentido, la utilización de diferentes tipos de diseños permitió obtener condiciones cromatográficas óptimas y mejorar los sistemas de extracción en las matrices en estudio, obteniéndose en todos los casos sistemas en los que se priorizó: (1) la obtención de las mejores características cromatográficas, poniendo énfasis en maximizar la recuperación de los analitos, (2) la disminución de los tiempos de análisis y (3) la reducción de los solventes orgánicos utilizados durante el proceso, siguiendo los lineamientos de la “química verde”.

Por su parte, se puso en evidencia que la validación completa de los métodos bioanalíticos es un paso necesario previo a la realización de determinaciones cotidianas. Dado que son parámetros fundamentales del proceso de validación, se debe evaluar el modo de obtención de los valores de límite de detección y cuantificación. Debido a que los límites definen la eficiencia y las capacidades de los sistemas, la estrategia empleada en su determinación debe siempre estar en concordancia con las limitaciones y las características propias de los métodos, cumpliéndose en todos los casos el objetivo final de definir valores experimentales que sean acordes a la técnica utilizada.

Además, el estudio previo de las características fisicoquímicas de los analitos debe ser un paso obligatorio en todo desarrollo analítico. En este sentido, el análisis exhaustivo de los componentes que intervienen en un sistema permite disminuir las variaciones entre muestras, ayudando a reducir la complejidad del análisis por medio de la generación de sistemas robustos. En la presente tesis, el desarrollo, por un lado, de un método electroforético y, por el otro, de un método cromatográfico para determinar valores de pK_a y el pH óptimo de la fase móvil, respectivamente, permitió dilucidar características de los analitos de interés. Como conclusión, el estudio de la influencia del pH en la determinación de los analitos de interés permite conocer los posibles cambios temporales que sufren los componentes al variar el pH del sistema. Este efecto incide de forma negativa en la resolución de los compuestos, y pueden generar la no visualización de los componentes en estudio en sistemas complejos.

Con respecto a la utilización de herramientas quimiométricas, es importante remarcar que su uso permite la determinación y cuantificación de los analitos en sistemas de alta complejidad, en los que se cuenta con resoluciones bajas o nulas entre los analitos y la matriz. En concordancia, el pretratamiento de los datos permite, en gran medida, disminuir la complejidad de los sistemas. Por último, el modelado de los datos mediante MCR-ALS permite obtener resultados confiables, independientemente de las variaciones propias del sistema tanto a nivel temporal como debidas a la presencia de componentes interferentes que varían entre muestras. Por lo tanto, este algoritmo resulta apropiado para la determinación de una variedad de compuestos en matrices complejas como plasma o cama de pollo.

A nivel biológico, el desarrollo de métodos analíticos confiables es un desafío a superar. De los resultados obtenidos se concluye que resulta indispensable la monitorización de ácido retinoico en anfibios, con el fin de caracterizar y determinar la influencia que los contaminantes ejercen sobre los individuos expuestos. Gracias a estudios de esta índole se podrían definir y correlacionar las concentraciones presentes en individuos de diferentes zonas con los efectos morfológicos observados en la población. Por su parte, el estudio de los retinoides en pacientes en tratamiento dermatológico permite establecer las concentraciones máximas en circulación, con el objetivo de analizar la influencia del aumento de sus niveles en los pacientes. La monitorización mensual de estos compuestos tendría un impacto positivo en el tratamiento, ya que permitiría evidenciar los casos en los que las concentraciones administradas son las adecuadas y aquellos en los que se debería retirar la medicación para no generar problemas en otros niveles biológicos.

Por último, resulta indispensable la monitorización de las concentraciones de principios activos de uso veterinario, tanto en huevo como en cama de pollo. Aunque en la actualidad SENASA realiza la monitorización de las trazas de varios compuestos en huevo, los métodos desarrollados con este propósito se caracterizan por la determinación de compuestos únicos. Por el contrario, el presente desarrollo es una alternativa viable para el estudio de multianalitos. Finalmente, el control de las concentraciones de principios activos de uso veterinario en cama de pollo resulta de suma importancia a la luz de la contaminación que estos compuestos pueden generar en los sistemas aledaños. Esta monitorización constante permitiría mantener la inocuidad de los sistemas en contacto, a través del trazado de estrategias de aplicación de los compuestos, el estudio de los depósitos generados y su posible disposición final.

4.



BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- [1] AS Makarova, DV Baurin, MG Gordienko, EI Kudryavtseva (2017) Green chemistry for the optimum technology of biological conversion of vegetable waste. *Sustainable Production and Consumption* 10:66-73.
- [2] JA Tickner, M Becker (2016) Mainstreaming green chemistry: The need for metrics. *Curr Opin Green Sustainable Chem* 1:1-4.
- [3] PT Anastas, JC Warner (1998) *Green chemistry: theory and practice*. Oxford University Press, New York.
- [4] M Wiczerzak, J Namieśnik, B Kudłak (2016) Bioassays as one of the Green Chemistry tools for assessing environmental quality: A review. *Environ Int* 94:341-361.
- [5] D Çelik, M Yıldız (2017) Investigation of hydrogen production methods in accordance with green chemistry principles. *Int J Hydrogen Energy* 42 (36):23395-23401.
- [6] K Sanderson (2011) Chemistry: It's not easy being green. *Nature* 469 (7328):18-20.
- [7] K Sandra, G Vanhoenacker, F David, P Sandra, AS Pereira (2010) Green chromatography (Part 1): introduction and liquid chromatography. *LC-GC Eur* 23:242.
- [8] R Jędrkiewicz, A Orłowski, J Namieśnik, M Tobiszewski (2016) Green analytical chemistry introduction to chloropropanols determination at no economic and analytical performance costs? *Talanta* 147:282-288.
- [9] M Espino, M de los Ángeles Fernández, FJV Gomez, MF Silva (2016) Natural designer solvents for greening analytical chemistry. *Trac-Trends Anal Chem* 76:126-136.
- [10] PW Carr, DR Stoll, X Wang (2011) Perspectives on Recent Advances in the Speed of High-Performance Liquid Chromatography. *Anal Chem* 83 (6):1890-1900.
- [11] GM Escandar, HC Goicoechea, A Muñoz de la Peña, AC Olivieri (2014) Second- and higher-order data generation and calibration: A tutorial. *Anal Chim Acta* 806:8-26.
- [12] AC Olivieri, GM Escandar (2014) Chapter 1 - Calibration Scenarios. En: *Practical Three-Way Calibration*, Elsevier, Boston, p. 1-9.
- [13] L Xu, L-J Tang, C-B Cai, H-L Wu, G-L Shen, R-Q Yu, J-H Jiang (2008) Chemometric methods for evaluation of chromatographic separation quality from two-way data—A review. *Anal Chim Acta* 613 (2):121-134.
- [14] JL Beltrán, J Guiteras, R Ferrer (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 (9):1949-1955.
- [15] GM Escandar, AC Olivieri, NM Faber, HC Goicoechea, A Muñoz de la Peña, RJ Poppi (2007) Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications. *Trac-Trends Anal Chem* 26 (7):752-765.
- [16] J Ghasemi, A Niazi (2005) Two- and three-way chemometrics methods applied for spectrophotometric determination of lorazepam in pharmaceutical formulations and biological fluids. *Anal Chim Acta* 533 (2):169-177.
- [17] M Daszykowski, B Walczak (2006) Use and abuse of chemometrics in chromatography. *Trac-Trends Anal Chem* 25 (11):1081-1096.
- [18] R Bro (1997) PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemometr Intell Lab* 38 (2):149-171.
- [19] R Tauler (1995) Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemometr Intell Lab* 30 (1):133-146.
- [20] AC Olivieri (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 (4):253-265.
- [21] NR Marsili, A Lista, BS Fernandez Band, HC Goicoechea, AC Olivieri (2005) Evaluation of complex spectral-pH three-way arrays by modified bilinear least-squares: Determination of four different dyes in interfering systems. *Analyst* 130 (9):1291-1298.
- [22] EPPA Derks, MSS Pastor, LMC Buydens (1995) Robustness analysis of radial base function and multi-layered feed-forward neural network models. *Chemometr Intell Lab* 28 (1):49-60.

- [23] M] Culzoni, HC Goicoechea (2007) Determination of loratadine and pseudoephedrine sulfate in pharmaceuticals based on non-linear second-order spectrophotometric data generated by a pH-gradient flow injection technique and artificial neural networks. *Anal Bioanal Chem* 389 (7-8):2217-2225.
- [24] KS Booksh, BR Kowalski (1994) Theory of Analytical Chemistry. *Anal Chem* 66 (15):782A-791A.
- [25] R Bro (1998) *Multi-way analysis in the food industry: models, algorithms, and applications*. Universiteit van Amsterdam, Amsterdam
- [26] C Ruckebusch, A De Juan, L Duponchel, JP Huvenne (2006) Matrix augmentation for breaking rank-deficiency: A case study. *Chemometr Intell Lab* 80 (2):209-214.
- [27] R Tauler, M Maeder, A de Juan (2009) Multiset data analysis: extended multivariate curve resolution. En: *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Oxford, p. 473-506.
- [28] A de Juan, R Tauler (2016) Chapter 2 - Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares for Spectroscopic Data. En: *Data Handling in Science and Technology*, Elsevier, p. 5-51.
- [29] R Tauler, A Smilde, B Kowalski (1995) Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution. *J Chemom* 9 (1):31-58.
- [30] I Jolliffe (2005) Principal Component Analysis. En: *Encyclopedia of Statistics in Behavioral Science*, John Wiley & Sons.
- [31] W Windig, J Guilment (1991) Interactive self-modeling mixture analysis. *Anal Chem* 63 (14):1425-1432.
- [32] F Cuesta Sánchez, B van den Bogaert, SC Rutan, DL Massart (1996) Multivariate peak purity approaches. *Chemometr Intell Lab* 34 (2):139-171.
- [33] R Tauler, A de Juan (2015) Chapter 5 - Multivariate Curve Resolution for Quantitative Analysis. En: *Data Handling in Science and Technology*, Elsevier, p. 247-292.
- [34] B-V Grande, R Manne (2000) Use of convexity for finding pure variables in two-way data from mixtures. *Chemometr Intell Lab* 50 (1):19-33.
- [35] A de Juan, SC Rutan, R Tauler (2009) 2.19 - Two-Way Data Analysis: Multivariate Curve Resolution – Iterative Resolution Methods. En: *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Oxford, p. 325-344.
- [36] J Jaumot, R Gargallo, A de Juan, R Tauler (2005) A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. *Chemometr Intell Lab* 76 (1):101-110.
- [37] A de Juan, R Tauler (2003) Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures: Revisiting latest trends in multivariate resolution. *Anal Chim Acta* 500 (1-2):195-210.
- [38] G Muñoz, A de Juan (2007) pH- and time-dependent hemoglobin transitions: A case study for process modelling. *Anal Chim Acta* 595 (1-2):198-208.
- [39] D Robinson (2006) *Statistical Design: Chemometrics By R. E. Bruns, I. S. Scaramino, and B. De Barros Neto*. American Chemical Society.
- [40] MA Bezerra, RE Santelli, EP Oliveira, LS Villar, LA Escaleira (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76 (5):965-977.
- [41] L Vera Candioti, MM De Zan, MS Cámara, HC Goicoechea (2014) Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta* 124:123-138.
- [42] R Leardi (2009) Experimental design in chemistry: A tutorial. *Anal Chim Acta* 652 (1-2):161-172.
- [43] SLC Ferreira, RE Bruns, EGP da Silva, WNL dos Santos, CM Quintella, JM David, JB de Andrade, MC Breitzkreitz, ICSF Jardim, BB Neto (2007) Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *J Chromatogr A* 1158 (1-2):2-14.
- [44] DC Montgomery (2000) *Design and analysis of experiments*. John Wiley & Sons Inc, Somerset, New Jersey, U.S.A.
- [45] CL Handa, FS de Lima, MFG Guelfi, SR Georgetti, El Ida (2016) Multi-response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. *Food Chem* 197:175-184.
- [46] S Armenta, S Garrigues, M de la Guardia (2008) Green Analytical Chemistry. *Trac-Trends Anal Chem* 27 (6):497-511.
- [47] B Barfi, A Asghari, M Rajabi, N Mirkhani (2015) Dispersive suspended-solidified floating organic droplet microextraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: comparison of suspended droplet-based and dispersive-based liquid-phase microextraction methods. *RSC Adv* 5 (129):106574-106588.
- [48] F-GC Ekezie, D-W Sun, J-H Cheng (2017) Acceleration of microwave-assisted extraction processes of food components by integrating technologies and applying emerging solvents: A review of latest developments. *Trends Food Sci Technol* 67:160-172.

- [49] MM Moreira, MF Barroso, A Boeykens, H Withouck, S Morais, C Delerue-Matos (2017) Valorization of apple tree wood residues by polyphenols extraction: Comparison between conventional and microwave-assisted extraction. *Ind Crops Prod* 104:210-220.
- [50] A-M Galan, I Calinescu, A Trifan, C Winkworth-Smith, M Calvo-Carrascal, C Dodds, E Binner (2017) New insights into the role of selective and volumetric heating during microwave extraction: Investigation of the extraction of polyphenolic compounds from sea buckthorn leaves using microwave-assisted extraction and conventional solvent extraction. *Chem Eng Process Process Intensif* 116:29-39.
- [51] Y Song, L Zheng, X Zhang (2017) Kinetics model for supercritical fluid extraction with variable mass transport. *Int J Heat Mass Transfer* 112:876-881.
- [52] AdP Sánchez-Camargo, E Ibáñez, A Cifuentes, M Herrero (2017) Chapter Two - Bioactives Obtained From Plants, Seaweeds, Microalgae and Food By-Products Using Pressurized Liquid Extraction and Supercritical Fluid Extraction. En: *Comprehensive Analytical Chemistry*, p. 27-51.
- [53] V Pérez-Fernández, L Mainero Rocca, P Tomai, S Fanali, A Gentili (2017) Recent advancements and future trends in environmental analysis: Sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 983:9-41.
- [54] J Płotka-Wasyłka, N Szczepańska, K Owczarek, J Namieśnik (2017) Chapter Ten - Miniaturized Solid Phase Extraction. En: *Comprehensive Analytical Chemistry*, p. 279-318.
- [55] J Płotka-Wasyłka, N Szczepańska, M de la Guardia, J Namieśnik (2015) Miniaturized solid-phase extraction techniques. *Trac-Trends Anal Chem* 73:19-38.
- [56] NN Hidayah, SZ Abidin (2017) The evolution of mineral processing in extraction of rare earth elements using solid-liquid extraction over liquid-liquid extraction: A review. *Miner Eng* 112:103-113.
- [57] M Rezaee, Y Assadi, M-R Milani Hosseini, E Aghaee, F Ahmadi, S Berijani (2006) Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J Chromatogr A* 1116 (1-2):1-9.
- [58] I Timofeeva, S Timofeev, L Moskvin, A Bulatov (2017) A dispersive liquid-liquid microextraction using a switchable polarity dispersive solvent. Automated HPLC-FLD determination of ofloxacin in chicken meat. *Anal Chim Acta* 949:35-42.
- [59] DA Ramirez, DA Locatelli, CA Torres-Palazzolo, JC Altamirano, AB Camargo (2017) Development of garlic bioactive compounds analytical methodology based on liquid phase microextraction using response surface design. Implications for dual analysis: Cooked and biological fluids samples. *Food Chem* 215:493-500.
- [60] P Liang, J Xu, Q Li (2008) Application of dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of three phthalate esters in water samples. *Anal Chim Acta* 609 (1):53-58.
- [61] H Farahani, P Norouzi, R Dinarvand, MR Ganjali (2007) Development of dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry as a simple, rapid and highly sensitive method for the determination of phthalate esters in water samples. *J Chromatogr A* 1172 (2):105-112.
- [62] M Rahmani, E Ghasemi, M Sasani (2017) Application of response surface methodology for air assisted-dispersive liquid- liquid microextraction of deoxynivalenol in rice samples prior to HPLC-DAD analysis and comparison with solid phase extraction cleanup. *Talanta* 165:27-32.
- [63] K Ridgway, SP Lalljie, RM Smith (2007) Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *J Chromatogr A* 1153 (1-2):36-53.
- [64] A Zygler, A Wasik, J Namieśnik (2009) Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. *Trac-Trends Anal Chem* 28 (9):1082-1102.
- [65] VE Bérubé, MH Boily, C DeBlois, N Dassylva, PA Spear (2005) Plasma retinoid profile in bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural intensity of sub-watersheds in the Yamaska River drainage basin, Quebec, Canada. *Aquat Toxicol* 71 (2):109-120.
- [66] A Paganelli, V Gnazzo, H Acosta, SL López, AE Carrasco (2010) Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chem Res Toxicol* 23 (10):1586-1595.
- [67] BC Das, P Thapa, R Karki, S Das, S Mahapatra, TC Liu, I Torregroza, DP Wallace, S Kambhampati, P Van Veldhuizen, A Verma, SK Ray, T Evans (2014) Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. *Bioorg Med Chem* 22 (2):673-683.
- [68] M Piatkowska, P Jedziniak, J Zmudzki (2016) Multiresidue method for the simultaneous determination of veterinary medicinal products, feed additives and illegal dyes in eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem* 197, Part A:571-580.

- [69] A Garrido French, MdM Aguilera-Luiz, JL Martínez Vidal, R Romero-González (2010) Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 661 (2):150-160.
- [70] G Markou (2015) Improved anaerobic digestion performance and biogas production from poultry litter after lowering its nitrogen content. *Bioresour Technol* 196:726-730.
- [71] MW Dunlop, J McAuley, PJ Blackall, RM Stuetz (2016) Water activity of poultry litter: Relationship to moisture content during a grow-out. *J Environ Manage* 172:201-206.
- [72] Y Huang, M Anderson, D McIlveen-Wright, GA Lyons, WC McRoberts, YD Wang, AP Roskilly, NJ Hewitt (2015) Biochar and renewable energy generation from poultry litter waste: A technical and economic analysis based on computational simulations. *Appl Energy* 160:656-663.
- [73] MW Dunlop, PJ Blackall, RM Stuetz (2015) Water addition, evaporation and water holding capacity of poultry litter. *Sci Total Environ* 538:979-985.
- [74] BP Kelleher, JJ Leahy, AM Henihan, TF O'Dwyer, D Sutton, MJ Leahy (2002) Advances in poultry litter disposal technology – a review. *Bioresour Technol* 83 (1):27-36.
- [75] ME Dasenaki, NS Thomaidis (2015) Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 880:103-121.
- [76] Codex Alimentarius (2006) Codex Alimentarius, Roma, Tercera Edición, <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-home/es/>.
- [77] SENASA (2011) Límites de residuos en alimentos de origen animal, Resolución 559/2011, <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-559-2011-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>.
- [78] M Valcarcel (1999) *Principios de Química Analítica*. Springer-Verlag Ibérica S.A., Barcelona, España.
- [79] DL Massart, BGM Vandeginste, LMC Buydens, S De Jong, PJ Lewi, J Smeyers-Verbeke (1997) *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Elsevier, Amsterdam, p. 422–423.
- [80] K Danzer, LA Currie (1998) Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and Applied Chemistry* 70 (4):993-1014.
- [81] JN Miller, JC Miller (2010) *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Ashford Colour Press Ltd, Gosport, UK.
- [82] HC Goicoechea, AC Olivieri (2007) Capítulo II: Regresión lineal parte I: calibración univariada. En: *La calibración en química Analítica*, Ediciones UNL, Santa Fe, Argentina, p. 9-20.
- [83] Y Vander Heyden, A Nijhuis, J Smeyers-Verbeke, BG Vandeginste, DL Massart (2001) Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J Pharm Biomed Anal* 24 (5-6):723-753.
- [84] C von Holst, A Müller, E Björklund, E Anklam (2001) In-house validation of a simplified method for the determination of PCBs in food and feedingstuffs. *Eur Food Res Technol* 213 (2):154-160.
- [85] H Evard, A Kruve, I Leito (2016) Tutorial on estimating the limit of detection using LC-MS analysis, part I: Theoretical review. *Anal Chim Acta* 942:23-39.
- [86] A Forootan, R Sjöback, J Björkman, B Sjögreen, L Linz, M Kubista (2017) Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomol Detect Quantif* 12:1-6.
- [87] M Belter, A Sajnog, D Barakiewicz (2014) Over a century of detection and quantification capabilities in analytical chemistry – Historical overview and trends. *Talanta* 129:606-616.
- [88] International conference on harmonization (ICH) (2005) Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1), Geneva, Switzerland, [http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2\(R1\).PDF](http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2(R1).PDF).
- [89] E Voigtman (1997) Comparison of Signal-to-Noise Ratios. *Anal Chem* 69 (2):226-234.
- [90] LA Currie (1999) Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Anal Chim Acta* 391 (2):105-126.
- [91] LA Currie (1999) Detection and quantification limits: Origins and historical overview. *Anal Chim Acta* 391 (2):127-134.
- [92] CFR Appendix B to part 136 (1999) Definition and procedure for the determination of the method detection limit in USEPA Protocol for EPA Approval of New Methods for Organic and Inorganic Analytes in Wastewater and Drinking Water, Washington, DC, <http://www.gpo.gov/fdsys/granule/CFR-2011-title40-vol23/CFR-2011-title40-vol23-part136-appB/content-detail.html>.

- [93] EURACHEM (2002) Guide to Quality in Analytical Chemistry. Prepared jointly by CITAC (The Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry) and EURACHEM (A Focus for Analytical Chemistry in Europe), http://www.citac.cc/CITAC_EURACHEM_GUIDE.pdf.
- [94] AC Olivieri (2014) Analytical figures of merit: from univariate to multiway calibration. *Chem Rev* 114 (10):5358-5378.
- [95] MC Bauza, GA Ibanez, R Tauler, AC Olivieri (2012) Sensitivity equation for quantitative analysis with multivariate curve resolution-alternating least-squares: theoretical and experimental approach. *Anal Chem* 84 (20):8697-8706.
- [96] J Marill, N Idres, CC Capron, E Nguyen, GG Chabot (2003) Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Curr Drug Metab* 4 (1):1-10.
- [97] GE Magoulas, SE Bariamis, CM Athanassopoulos, A Haskopoulos, PG Dedes, MG Krokidis, NK Karamanos, D Kletsas, D Papaioannou, G Maroulis (2011) Syntheses, antiproliferative activity and theoretical characterization of acitretin-type retinoids with changes in the lipophilic part. *Eur J Med Chem* 46 (2):721-737.
- [98] EH Harrison, MM Hussain (2001) Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A. *J Nutr* 131 (5):1405-1408.
- [99] DC Berry, SM O'Byrne, AC Vreeland, WS Blaner, N Noy (2012) Cross talk between signaling and vitamin A transport by the retinol-binding protein receptor STRA6. *Mol Cell Biol* 32 (15):3164-3175.
- [100] R Blomhoff, HK Blomhoff (2006) Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol* 66 (7):606-630.
- [101] JL Armstrong, CPF Redfern, GJ Veal (2005) 13-*cis* Retinoic acid and isomerisation in paediatric oncology—is changing shape the key to success? *Biochem Pharmacol* 69 (9):1299-1306.
- [102] H Brodeur, M Parisotto, S Chagnon, S Mader, PV Bhat (2007) Isomer-specific retinoic acid biosynthesis in HeLa cells expressing recombinant class I aldehyde dehydrogenases. *Biochim Biophys Acta* 1770 (11):1548-1556.
- [103] MV Duprey-Diaz, JM Blagburn, RE Blanco (2016) Optic nerve injury upregulates retinoic acid signaling in the adult frog visual system. *J Chem Neuroanat* 77:80-92.
- [104] R Bchini, V Vasiliou, G Branlant, F Talfournier, S Rahuel-Clermont (2013) Retinoic acid biosynthesis catalyzed by retinal dehydrogenases relies on a rate-limiting conformational transition associated with substrate recognition. *Chem Biol Interact* 202 (1-3):78-84.
- [105] MH Boily, VE Bérubé, PA Spear, C DeBlois, N Dassylva (2005) Hepatic retinoids of bullfrogs in relation to agricultural pesticides. *Environ Toxicol Chem* 24 (5):1099-1106.
- [106] SD Shaw (1998) *Organochlorines and biomarkers of immune and endocrine effects in Pacific Harbour seals and Northern elephant seal pups*. Columbia University, New York.
- [107] L Champoux (2000) *Évaluation d'indicateurs biochimiques chez le grand héron, Ardea herodias, et le bihoreau gris, Nycticorax nycticorax, en relation avec la contamination du fleuve Saint-Laurent*. Environnement Canada, Ottawa.
- [108] MD Boone, RD Semlitsch, EE Little, MC Doyle (2007) Multiple stressors in amphibian communities: effects of chemical contamination, bullfrogs, and fish. *Ecol Appl* 17 (1):291-301.
- [109] PM Peltzer, RC Lajmanovich, JC Sanchez-Hernandez, MC Cabagna, AM Attademo, A Basso (2008) Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. *Ecotoxicol Environ Saf* 70 (1):185-197.
- [110] RM Mann, RV Hyne, CB Choung, SP Wilson (2009) Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environ Pollut* 157 (11):2903-2927.
- [111] WS Blaner (2001) Cellular metabolism and actions of 13-*cis*-retinoic acid. *J Am Acad Dermatol* 45 (5):S129-S135.
- [112] G Ioele, E Cione, A Risoli, G Genchi, G Ragno (2005) Accelerated photostability study of tretinoin and isotretinoin in liposome formulations. *Int J Pharm* 293 (1-2):251-260.
- [113] AF Ourique, A Melero, C de Bona da Silva, UF Schaefer, AR Pohlmann, SS Guterres, CM Lehr, KH Kostka, RC Beck (2011) Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: development of a semisolid nanomedicine. *Eur J Pharm Biopharm* 79 (1):95-101.
- [114] MA Kane (2012) Analysis, occurrence, and function of 9-*cis*-retinoic acid. *BBA-Mol Cell Biol L* 1821 (1):10-20.
- [115] V Morris, J Hughes, P Marriott (2003) Spherical coordinate representations of solvent composition for liquid chromatography method development using experimental design. *J Chromatogr A* 1008 (1):43-56.

- [116] EMEA (2012) Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), London, http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000094.jsp.
- [117] NC van de Merbel (2008) Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques. *Trac-Trends Anal Chem* 27 (10):924-933.
- [118] Bioanalytical Method Validation (2014) US FDA, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
- [119] CK Schmidt, A Brouwer, H Nau (2003) Chromatographic analysis of endogenous retinoids in tissues and serum. *Anal Biochem* 315 (1):36-48.
- [120] MATLAB 7.10 (2010) Natick Massachusetts, The Math Works Inc.
- [121] Design Expert 8.0.5 (2010) Minneapolis, USA, Stat-Ease Inc.
- [122] Minitab® 16.2.4 (2013) Pennsylvania, USA, Minitab Inc. .
- [123] JM Cei (1980) *Amphibians of Argentina*, Italy, p. 609.
- [124] M Vaira, Akmentin, A M., B M., D., D Barrasso, S Barrionuevo, N Basso, B Blotto, S Cairo, R Cajade, J Céspedes, V Corbalán, P Chilote, M Duré, C Falcione, D Ferraro, FR Gutierrez, MR Ingaramo, C Junges, R Lajmanovich, JN Lescano, F Marangoni, L Martinazzo, R Marti, L Moreno, GS Natale, JM Pérez Iglesias, P Peltzer, L Quiroga, S Rosset, E Sanabria, L Sanchez, E Schaefer, C Úbeda, V Zaracho (2012) *Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina.*, p. 131-159.
- [125] DR Frost (2007) *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. American Museum of Natural History, New York.
- [126] MI Duré, AI Kehr, EF Schaefer, F Marangoni (2008) Diversity of amphibians in rice fields from northeastern Argentina. *Interciencia* 33:528-531.
- [127] AM Attademo, M Cabagna-Zenklusen, RC Lajmanovich, PM Peltzer, C Junges, A Basso (2011) b-esterase activities and blood cell morphology in the frog *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Leptodactylidae) on rice agroecosystems from Santa Fe Province (Argentina). *Ecotoxicology* 20 (1):274-282.
- [128] PM Peltzer, RC Lajmanovich, LC Sanchez, AM Attademo, CM Junges, CL Bionda, AL Martino, B Agustín (2011) Morphological abnormalities in amphibian populations from the mid-eastern region of Argentina. *Herpetol Conserv Biol* 6 (3):432-442.
- [129] J Novak, M Benisek, J Pachernik, J Janosek, T Sidlova, H Kiviranta, M Verta, JP Giesy, L Blaha, K Hilscherova (2007) Interference of contaminated sediment extracts and environmental pollutants with retinoid signaling. *Environ Toxicol Chem* 26 (8):1591-1599.
- [130] A Alvisio (1998) *Arroz. Modelos zonales de producción en el movimiento CREA: región litoral Norte*, p. 141-145.
- [131] SL López, D Aiassa, S Benítez-Leite, R Lajmanovich, F Mañas, G Poletta, N Sánchez, MF Simoniello, AE Carrasco (2012) Chapter Two - Pesticides used in South American GMO-based agriculture. A review of their effects on humans and animal models. En: *Advances in Molecular Toxicology*, Elsevier, Amsterdam, p. 41-75.
- [132] R Burkart, NO Barbaro, RO Sánchez, DA Gómez (1999) *Eco-regiones de la Argentina*. PRODIA, Buenos Aires, Argentina.
- [133] RC Lajmanovich, P Peltzer, AM Attademo, MC Cabagna, CM Junges, A Basso (2012) Amphibia, Anura, Hylidae, *Argenteohyla siemersi pedersenii* first record and some hematological data in Santa Fe Province, Argentina. *Check List* 8:790-791.
- [134] AM Attademo, PM Peltzer, RC Lajmanovich, M Cabagna, G Fiorenza (2007) Plasma b-esterase and glutathione S-transferase activity in the toad *Chaunus schneideri* (Amphibia, Anura) inhabiting rice agroecosystems of Argentina. *Ecotoxicology* 16 (8):533-539.
- [135] AM Attademo, PM Peltzer, RC Lajmanovich, A Basso, C Junges (2014) Tissue-Specific variations of esterase activities in the tadpoles and adults of *Pseudis paradoxa* (Anura: Hylidae). *Water Air Soil Pollut* 225 (3):1903.
- [136] RC Lajmanovich, JC Sanchez-Hernandez, G Stringhini, PM Peltzer (2004) Levels of serum cholinesterase activity in the rococo toad (*Bufo paracnemis*) in agrosystems of Argentina. *Bull Environ Contam Toxicol* 72 (3):586-591.
- [137] A Vernadakis, CO Rutledge (1973) Effects of ether and pentobarbital anaesthesia on the activities of brain acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in young adult rats. *J Neurochem* 20 (5):1503-1504.
- [138] MJ Tyler (1999) Frogs and toads as experimental animals. *ANZCCART News* 12 (1):1-4.
- [139] TB Bagenal, FW Tesch (1978) *Methods for assessment of a fish production in fresh 376 waters*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 101-136.

- [140] G Guidelli, WL Tavechio, RM Takemoto, GC Pavanelli (2011) Relative condition factor and parasitism in anostomid fishes from the floodplain of the Upper Parana River, Brazil. *Vet Parasitol* 177 (1-2):145-151.
- [141] J Riu, FX Rius (1997) Method comparison using regression with uncertainties in both axes. *Trac-Trends Anal Chem* 16 (4):211-216.
- [142] TE Gundersen, R Blomhoff (2001) Qualitative and quantitative liquid chromatographic determination of natural retinoids in biological samples. *J Chromatogr A* 935 (1-2):13-43.
- [143] HC Furr, AB Barua, JA Olson (1994) *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. Raven Press, New York, p. 179-209.
- [144] TE Gundersen, E Lundanes, R Blomhoff (1997) Quantitative high-performance liquid chromatographic determination of retinoids in human serum using on-line solid-phase extraction and column switching. Determination of 9-*cis*-retinoic acid, 13-*cis*-retinoic acid, all-*trans*-retinoic acid, 4-oxo-all-*trans*-retinoic acid and 4-oxo-13-*cis*-retinoic acid. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 691 (1):43-58.
- [145] V Van Merris, E Meyer, K De Wasch, C Burvenich (2002) Simple quantification of endogenous retinoids in bovine serum by high-performance liquid chromatography – diode-array detection. *Anal Chim Acta* 468 (2):237-244.
- [146] C Lanvers, G Hempel, G Blaschke, J Boos (1996) Simultaneous determination of all-*trans*-, 13-*cis*- and 9-*cis*-retinoic acid, their 4-oxo metabolites and all-*trans*-retinol in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 685 (2):233-240.
- [147] GA González, ÁM Herrador (2007) A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trac-Trends Anal Chem* 26 (3):227-238.
- [148] DA El-Hady, HM Albishri (2012) Hyphenated affinity capillary electrophoresis with a high-sensitivity cell for the simultaneous binding study of retinol and retinoic acid in nanomolars with serum albumins. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 911:180-185.
- [149] MS Ortiz, MS; Sarabia, LA (2009) Quality of Analytical Measurements: Univariate Regression. En: *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Oxford., p. 127-169.
- [150] A Jansen, M Healey (2003) Frog communities and wetland condition: relationships with grazing by domestic livestock along an Australian floodplain river. *Biol Conserv* 109 (2):207-219.
- [151] WA Hopkins (2007) Amphibians as models for studying environmental change. *ILAR journal* 48 (3):270-277.
- [152] DB Wake, VT Vredenburg (2008) Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (Suppl 1):11466-11473.
- [153] R Blomhoff, K Wake (1991) Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB J* 5 (3):271-277.
- [154] A Romert, P Tuvendal, A Simon, L Dencker, U Eriksson (1998) The identification of a 9-*cis* retinol dehydrogenase in the mouse embryo reveals a pathway for synthesis of 9-*cis* retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (8):4404-4409.
- [155] M Boily, J Thibodeau, M Bisson (2009) Retinoid metabolism (LRAT, REH) in the liver and plasma retinoids of bullfrog, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural contamination. *Aquat Toxicol* 91 (2):118-125.
- [156] L Yu, X Zhang, J Yuan, Q Cao, J Liu, P Zhu, H Shi (2011) Teratogenic effects of triphenyltin on embryos of amphibian (*Xenopus tropicalis*): a phenotypic comparison with the retinoid X and retinoic acid receptor ligands. *J Hazard Mater* 192 (3):1860-1868.
- [157] RD Clugston, WS Blaner (2014) Vitamin A (Retinoid) Metabolism and Actions: What We Know and What We Need to Know About Amphibians. *Zoo Biol* 33 (6):527-535.
- [158] J Thibodeau, S Filion, P Spear, J Paquin, M Boily (2012) Oxidation of retinoic acids in hepatic microsomes of wild bullfrogs *Lithobates catesbeianus* environmentally-exposed to a gradient of agricultural contamination. *Ecotoxicology* 21 (5):1358-1370.
- [159] D Gardiner, A Ndayibagira, F Grün, B Blumberg (2003) Deformed frogs and environmental retinoids. *Pure and Applied Chemistry* 75 (11-12):2263.
- [160] G Lemaire, P Balaguer, S Michel, R Rahmani (2005) Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by organochlorine pesticides. *Toxicol Appl Pharmacol* 202 (1):38-49.
- [161] À Leiva-Presa, Jenssen, B.M. (2006) Effects of *p,p'*-DDE on retinoid homeostasis and sex hormones of adult male European common frogs (*Rana temporaria*). *J Toxicol Environ Health* 69:2051-2062.
- [162] E Papis, G Bernardini, R Gornati, E Menegola, M Prati (2007) Gene expression in *Xenopus laevis* embryos after Triadimefon exposure. *Gene Expression* 7 (1-2):137-142.
- [163] JR Lenkowski, JM Reed, L Deininger, KA McLaughlin (2008) Perturbation of organogenesis by the herbicide atrazine in the amphibian *Xenopus laevis*. *Environ Health Perspect* 116 (2):223-230.

- [164] JR Lenkowski, G Sanchez-Bravo, KA McLaughlin (2010) Low concentrations of atrazine, glyphosate, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and triadimefon exposures have diverse effects on *Xenopus laevis* organ morphogenesis. *J Environ Sci (China)* 22 (9):1305-1308.
- [165] DR Gollapalli, P Maiti, RR Rando (2003) RPE65 operates in the vertebrate visual cycle by stereospecifically binding all-*trans*-retinyl esters. *Biochemistry* 42 (40):11824-11830.
- [166] JO Sass, G Tzimas, MM Elmazar, H Nau (1999) Metabolism of retinaldehyde isomers in pregnant rats: 13-*cis*- and all-*trans*-retinaldehyde, but not 9-*cis*-retinaldehyde, yield very similar patterns of retinoid metabolites. *Drug Metab Dispos* 27 (3):317-321.
- [167] P Costaridis, C Horton, J Zeitlinger, N Holder, M Maden (1996) Endogenous retinoids in the zebrafish embryo and adult. *Dev Dyn* 205 (1):41-51.
- [168] P Araujo (2009) Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877 (23):2224-2234.
- [169] J Inczédy, T Lengyel, AM Ure, A Gelencsér, A Hulanicki (2000) *Compendium of Analytical Nomenclature IUPAC*, United Kingdom, p. 50.
- [170] C Wu, V Njar, A Brodie, M Borenstein, I Nnane (2004) Quantification of a novel retinoic acid metabolism inhibitor, 4-(1H-imidazol-1-yl)retinoic acid (VN/14-1RA) and other retinoids in rat plasma by liquid chromatography with diode-array detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 810 (2):203-208.
- [171] L Wu, J Wu, K Zhou, F Cheng, Y Chen (2011) Determination of isotretinoin in human plasma by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 56 (2):324-329.
- [172] JLCM Dorne, ML Fernández-Cruz, U Bertelsen, DW Renshaw, K Peltonen, A Anadon, A Feil, P Sanders, P Wester, J Fink-Gremmels (2013) Risk assessment of coccidiostats during feed cross-contamination: Animal and human health aspects. *Toxicol Appl Pharmacol* 270 (3):196-208.
- [173] MM De Zan, CM Teglia, JC Robles, HC Goicoechea (2011) A novel ion-pairing chromatographic method for the simultaneous determination of both nicarbazin components in feed additives: Chemometric tools for improving the optimization and validation. *Talanta* 85 (1):142-150.
- [174] S Nász, L Debreczeni, T Rikker, Z Eke (2012) Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for determination of eleven coccidiostats in milk. *Food Chem* 133 (2):536-543.
- [175] V Gaudin, M Laurentie (2009) Application of total error approach to assess the performance of a biological method (ELISA) to detect nicarbazin residues in eggs. *J Chromatogr B* 877 (23):2358-2362.
- [176] CA Yoder, LA Miller, KS Bynum (2005) Comparison of nicarbazin absorption in chickens, mallards, and Canada geese. *Poult Sci* 84 (9):1491-1494.
- [177] AC Cuckler, CM Malanga, AJ Basso, RC O'Neill (1955) Antiparasitic activity of substituted carbanilide complexes. *Science (New York, NY)* 122 (3162):244-245.
- [178] D Mutavdžić Pavlović, T Pinušić, M Periša, S Babić (2012) Optimization of matrix solid-phase dispersion for liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of 12 pharmaceuticals in sediments. *J Chromatogr A* 1258:1-15.
- [179] M Sollicc, A Roy-Lachapelle, M-O Gasser, C Coté, M Génereux, S Sauvé (2016) Fractionation and analysis of veterinary antibiotics and their related degradation products in agricultural soils and drainage waters following swine manure amendment. *Sci Total Environ* 543, Part A:524-535.
- [180] S-C Kim, K Carlson (2005) LC–MS2 for quantifying trace amounts of pharmaceutical compounds in soil and sediment matrices. *Trac-Trends Anal Chem* 24 (7):635-644.
- [181] K Kumar, SC Gupta, SK Baidoo, Y Chander, CJ Rosen (2005) Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *J Environ Qual* 34 (6):2082-2085.
- [182] D Zhang, J-A Park, D-S Kim, S-K Kim, S-J Shin, J-H Shim, SC Shin, J-S Kim, AM Abd El-Aty, H-C Shin (2016) A simple extraction method for the simultaneous detection of tetramisole and diethylcarbamazine in milk, eggs, and porcine muscle using gradient liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem* 192:299-305.
- [183] M Gbylik-Sikorska, A Posyniak, T Sniegocki, J Zmudzki (2015) Liquid chromatography–tandem mass spectrometry multiclass method for the determination of antibiotics residues in water samples from water supply systems in food-producing animal farms. *Chemosphere* 119:8-15.
- [184] K-R Kim, G Owens, S-I Kwon, K-H So, D-B Lee, YS Ok (2011) Occurrence and Environmental Fate of Veterinary Antibiotics in the Terrestrial Environment. *Water Air Soil Pollut* 214 (1):163-174.
- [185] N Kemper (2008) Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol Indic* 8 (1):1-13.
- [186] K Kumar, S C. Gupta, Y Chander, AK Singh (2005) Antibiotic Use in Agriculture and Its Impact on the Terrestrial Environment. En: *Advances in Agronomy*, Academic Press, p. 1-54.

- [187] V Furtula, L Huang, PA Chambers (2009) Determination of veterinary pharmaceuticals in poultry litter and soil by methanol extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Environ Sci Health B* 44 (7):717-723.
- [188] M Bordbar, AY Faal, MM Ahari-Mostafavi, M Gharagozlou, R Fazaeli (2013) Multi-wavelength spectrophotometric determination of acidity constants of some salicylaldehyde derivatives. *J Mol Liq* 178:70-77.
- [189] L Geiser, Y Henchoz, A Galland, PA Carrupt, JL Veuthey (2005) Determination of pKa values by capillary zone electrophoresis with a dynamic coating procedure. *J Sep Sci* 28 (17):2374-2380.
- [190] SK Poole, S Patel, K Dehring, H Workman, CF Poole (2004) Determination of acid dissociation constants by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 1037 (1-2):445-454.
- [191] M Meloun, Z Ferenčíková, A Vrána (2011) Determination of the thermodynamic dissociation constant of capecitabine using spectrophotometric and potentiometric titration data. *J Chem Thermodyn* 43 (6):930-937.
- [192] Z Qiang, C Adams (2004) Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water Res* 38 (12):2874-2890.
- [193] MM Pandey, A Jaipal, A Kumar, R Malik, SY Charde (2013) Determination of pKa of felodipine using UV-Visible spectroscopy. *Spectrochim Acta A* 115:887-890.
- [194] H Ren, L Wang, X Wang, X Liu, S Jiang (2013) Measurement of acid dissociation constants and ionic mobilities of 3-nitro-tyrosine and 3-chloro-tyrosine by capillary zone electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal* 77:83-87.
- [195] E Fuguet, C Ràfols, E Bosch, M Rosés (2009) Fast high-throughput method for the determination of acidity constants by capillary electrophoresis: I. Monoprotic weak acids and bases. *J Chromatogr A* 1216 (17):3646-3651.
- [196] E Fuguet, C Ràfols, M Rosés (2011) A fast high throughput method for the determination of acidity constants by capillary electrophoresis. 3. Basic internal standards. *J Chromatogr A* 1218 (25):3928-3934.
- [197] A Talay, EÇ Demiralay, Y Doğan Daldal, Z Üstün (2015) Investigation of thermodynamic acidity constants of some statins with RPLC method. *J Mol Liq* 208:286-290.
- [198] P Wiczling, W Struck-Lewicka, Ł Kubik, D Siluk, MJ Markuszewski, R Kalisz (2014) The simultaneous determination of hydrophobicity and dissociation constant by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 94:180-187.
- [199] J Bezençon, MB Wittwer, B Cutting, M Smieško, B Wagner, M Kansy, B Ernst (2014) pKa determination by ¹H NMR spectroscopy – An old methodology revisited. *J Pharm Biomed Anal* 93:147-155.
- [200] F Steiner, M Hassel (2003) Control of electroosmotic flow in nonaqueous capillary electrophoresis by polymer capillary coatings. *Electrophoresis* 24 (3):399-407.
- [201] W-L Tseng, S-M Chen, C-Y Hsu, M-M Hsieh (2008) On-line concentration and separation of indolamines, catecholamines, and metanephrines in capillary electrophoresis using high concentration of poly(diallyldimethylammonium chloride). *Anal Chim Acta* 613 (1):108-115.
- [202] D Heiger (2000) Chapter 2 En: *Principles of capillary electrophoresis, high performance capillary electrophoresis*.
- [203] E Jiménez-Lozano, I Marqués, D Barrón, JL Beltrán, J Barbosa (2002) Determination of pKa values of quinolones from mobility and spectroscopic data obtained by capillary electrophoresis and a diode array detector. *Anal Chim Acta* 464 (1):37-45.
- [204] Q Liu, F Lin, RA Hartwick (1997) Poly(diallyldimethylammonium chloride) as a Cationic Coating for Capillary Electrophoresis. *J Chromatogr Sci* 35 (3):126-130.
- [205] JS Fritz, SA Steiner (2001) Effect of a soluble ionic polymer on the separation of anions by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 934 (1-2):87-93.
- [206] H Pindstrup, C Fernández, JM Amigo, LH Skibsted (2013) Multivariate curve resolution of spectral data for the pH-dependent reduction of ferrylmyoglobin by cysteine. *Chemometr Intell Lab* 122:78-83.
- [207] A Checa, VG Soto, S Hernández-Cassou, J Saurina (2005) Fast determination of pKa values of reverse transcriptase inhibitor drugs for AIDS treatment by using pH-gradient flow-injection analysis and multivariate curve resolution. *Anal Chim Acta* 554 (1-2):177-183.
- [208] MR Alcaráz, AV Schenone, MJ Culzoni, HC Goicoechea (2014) Modeling of second-order spectrophotometric data generated by a pH-gradient flow injection technique for the determination of doxorubicin in human plasma. *Microchem J* 112:25-33.
- [209] MJ Culzoni, HC Goicoechea, GA Ibañez, VA Lozano, NR Marsili, AC Olivieri, AP Pagani (2008) Second-order advantage from kinetic-spectroscopic data matrices in the presence of extreme spectral

- overlapping: A multivariate curve resolution—Alternating least-squares approach. *Anal Chim Acta* 614 (1):46-57.
- [210] H Abdollahi, H Babamoradi (2009) Rank deficiency in spectrophotometric study of acid dissociation equilibria in mixed solvent media. *Chemometr Intell Lab* 98 (1):58-64.
- [211] SOS Mookantsa, S Dube, MM Nindi (2016) Development and application of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of tetracyclines in beef by liquid chromatography mass spectrometry. *Talanta* 148:321-328.
- [212] P Viñas, N Campillo, V Andruch (2015) Recent achievements in solidified floating organic drop microextraction. *Trac-Trends Anal Chem* 68:48-77.
- [213] M] Culzoni, A Mancha de Llanos, MM De Zan, A Espinosa-Mansilla, F Cañada-Cañada, A Muñoz de la Peña, HC Goicoechea (2011) Enhanced MCR-ALS modeling of HPLC with fast scan fluorimetric detection second-order data for quantitation of metabolic disorder marker pteridines in urine. *Talanta* 85 (5):2368-2374.
- [214] E Salvatore, M Cocchi, A Marchetti, F Marini, A de Juan (2013) Determination of phenolic compounds and authentication of PDO Lambrusco wines by HPLC-DAD and chemometric techniques. *Anal Chim Acta* 761:34-45.
- [215] V Boeris, JA Arancibia, AC Olivieri (2014) Determination of five pesticides in juice, fruit and vegetable samples by means of liquid chromatography combined with multivariate curve resolution. *Anal Chim Acta* 814:23-30.
- [216] M Vosough, H Mashhadiabbas Esfahani (2013) Fast HPLC-DAD quantification procedure for selected sulfonamids, metronidazole and chloramphenicol in wastewaters using second-order calibration based on MCR-ALS. *Talanta* 113:68-75.
- [217] PH Eilers (2004) Parametric time warping. *Anal Chem* 76 (2):404-411.
- [218] PH Eilers, ID Currie, M Durbán (2006) Fast and compact smoothing on large multidimensional grids. *Comput Stat Data An* 50 (1):61-76.
- [219] K Kaczmarek, B Walczak, S de Jong, BGM Vandginste (2005) Baseline reduction in two dimensional gel electrophoresis images. *Acta Chromatogr* 15:82-95.
- [220] AC Olivieri, GM Escandar (2014) Chapter 5 - Parallel Factor Analysis: Trilinear Data. En: *Practical Three-Way Calibration*, Elsevier, Boston, p. 65-92.
- [221] EPoAPoSuiAF (FEEDAP) (2011) Scientific Opinion on safety and efficacy of Cycostat® 66G (robenidine hydrochloride) for rabbits for breeding and fattening. *EFSA Journal* 9 (3):2102-2134.
- [222] AC Olivieri, H-L Wu, R-Q Yu (2009) MVC2: A MATLAB graphical interface toolbox for second-order multivariate calibration. *Chemometr Intell Lab* 96 (2):246-251.
- [223] M Carrillo, JM González (2002) A new approach to modelling sigmoidal curves. *Technol Forecasting Social Change* 69 (3):233-241.
- [224] JMKJK Premarathne, DA Satharasinghe, ARC Gunasena, DMS Munasinghe, P Abeynayake (2017) Establishment of a method to detect sulfonamide residues in chicken meat and eggs by high-performance liquid chromatography. *Food Control* 72:276-282.
- [225] I Varenina, N Bilandzic, BS Kolanovic, D Bozic, M Sedak, M Dokic, I Varga (2016) Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of sulfonamides, trimethoprim and dapsona in muscle, egg, milk and honey. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 33 (4):656-667.
- [226] Z Zhang, Y Wu, X Li, Y Wang, H Li, Q Fu, Y Shan, T Liu, X Xia (2017) Multi-class method for the determination of nitroimidazoles, nitrofurans, and chloramphenicol in chicken muscle and egg by dispersive-solid phase extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem* 217:182-190.
- [227] MW Dong (2006) Basic Terms and Concepts. En: *Modern HPLC for Practicing Scientists*, John Wiley & Sons, Inc., p. 15-46.