



**Universidad de Chile.**

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéutica.

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA  
ANALÍTICA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA  
DE ALTA EFICIENCIA PARA RESIDUOS DE  
AZADIRACTINA EN MÚSCULO DE VACUNO.**

Profesor patrocinante:

Dra. María Nella Gai Hernández.

Químico Farmacéutico.

Director de memoria:

Dra. María Nella Gai Hernández.

Químico Farmacéutico.

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico.

Alumno: Christian Enrique Álvarez Barraza.

**Santiago, Chile.**

**Junio de 2006.**

*A mi familia.*

## Agradecimientos.

Gracias a Raúl Venegas quien detectó la falta de información en el campo de estudio y permitió el desarrollo de esta memoria.

Gracias al proyecto FIA “Desarrollo de un sistema de control de la mosca de los cuernos *Ahematobia irritans* (L) mediante la utilización del extracto del árbol *Azadirachta indica* (nim) en rebaños productores de carne bovina” PI-C-2004-1-P-025 sin cuyo aporte no hubiera sido posible la materialización de este trabajo.

Gracias a mis profesores, en especial a Alejandro Álvarez y María Nella Gai, que con sus conocimientos y paciencia contribuyeron enormemente al desarrollo de esta memoria y de mi formación profesional.

A mi familia, que con su cariño incondicional me animaron en los momentos de dudas e incertidumbres siendo mi apoyo y fortaleza.

A mis amigos que supieron regalar la necesaria dosis de descanso.

Finalmente agradecer a Dios y a María por no soltar mi mano mientras recorríamos este camino.

# Tabla de contenidos.

	Pág.
Dedicatoria.	<b>¡Error!</b>
<b>Marcador no definido.</b>	
Agradecimientos.	3
Tabla de contenidos.	4
Índice de ilustraciones y cuadros.	6
Resumen.	8
Summary.	10
Glosario.	11
Introducción.	12
Objetivos.	15
Objetivos generales.	15
Objetivos específicos.	15
Materiales y métodos.	16
Materiales.	16
Métodos.	17

Desarrollo de la metodología analítica.	18
Estudio de parámetros cromatográficos.	20
Desarrollo de la metodología de extracción.	22
Resultados.	26
Desarrollo de la metodología analítica	26
Estudio de parámetros cromatográficos	26
Desarrollo de la metodología de extracción.	31
Conclusiones.	58
Bibliografía.	62

## Índice de ilustraciones y cuadros.

	Pág.
Figura 1. Estructura de azadiractina A.	13
Figura 2 : Estructura de azadiractina B.	13
Tabla 1: Porcentajes de recuperación con DCM y hexano.	32
Tabla 2 : Tabla de resultados porcentajes de extracción por número de ciclos.	32
Figura 3: Esquema de extracción desde solución stock.	31
Figura 4: Cromatograma de una solución de CBZ 200 µg/mL.	33
Figura 5: Cromatograma de una solución de CBZ y AZD.	34
Figura 6: Esquema de extracción y filtrado de una solución stock.	35
Figura 7: Esquema general de purificación de muestras en cartuchos OASIS®.	36
Figura 8: Esquema de extracción desde carne <sup>I</sup> .	37
Figura 9: Esquema de extracción desde carne <sup>II</sup> .	38
Figura 10: Cromatograma soln. stock almacenada en tubos de polipropileno.	39
Figura 11: Cromatograma comparado soln. stock vs. matriz blanco.	40
Figura 12: Cromatograma comparado sellos de goma vs. soln. stock.	41
Figura 13: Cromatograma comparado extracción con cloroformo vs. DCM <sup>I</sup> .	42

Figura 14: Cromatograma comparado extracción con cloroformo vs. DCM <sup>II</sup> .	43
Figura 15: Cromatograma comparado H <sub>2</sub> O vs. NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>I</sup> .	44
Figura 16: Cromatograma comparado H <sub>2</sub> O vs. NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>II</sup> .	45
Tabla 3: Comparación porcentajes de extracción 16 mL × 3 vs. 10 mL × 4.	45
Figura 17: Esquema de extracción de AZD desde músculo de vacuno.	46
Tabla 4 : Concentración de CBZ, AZD A y AZD B en las soluciones madre.	47
Tabla 5: Áreas de los picos endógenos de la matriz.	48
Tabla 6: Cálculo del porcentaje de recuperación.	48
Tabla 7: Áreas curva de calibración y puntos control.	49
Tabla 8: Áreas extracción concentración 6 diluida.	50
Tabla 9 : Relación de áreas curva calibración y puntos control.	51
Figura 18: Curva de calibración para AZD A y B.	51
Tabla 10: Evaluación de resultados, puntos control.	52
Tabla 11: Evaluación del error en la interpolación de datos.	52
Figura 19: Cromatograma carne blanco.	53
Figura 20: Cromatograma carne cero.	54
Figura 21: Cromatograma extracción CONC. 1	55
Figura 22: Cromatograma extracción CONC. 3.	56
Figura 23: Cromatograma extracción CONC. 6.	57

## Resumen.

El crecimiento y descanso saludable del ganado son fundamentales en animales de producción, siendo necesaria la administración de fármacos, en algunos casos, para evitar la aparición de plagas de moscas.

Azadiractina ha demostrado ser un quimioterápico eficaz en el control de algunas plagas de moscas, interrumpiendo el crecimiento de éstas. Es por ello que se está evaluando la dosis de azadiractina que debe ser administrada al ganado para lograrlo.

Al no existir una metodología analítica que permita la cuantificación precisa y exacta de residuos de azadiractina en músculo de vacuno, se hace necesaria la creación de ésta.

Este trabajo tuvo como objetivo desarrollar una metodología analítica y una de extracción que permitiera identificar y cuantificar de manera precisa y exacta los residuos de azadiractina en músculo de vacuno.

Se utilizó cromatografía líquida de alta eficiencia como método analítico, una de extracción líquido – líquido como método de extracción y se evaluó la utilidad de purificar las muestras con cartuchos de purificación en fase sólida.

Se desarrolló una metodología analítica por HPLC utilizando una columna C<sub>18</sub> de 250 mm de largo, acetonitrilo: agua (27.5:72.5) como fase móvil, velocidad de flujo de 1 mL/min, 45 °C como temperatura de trabajo y detector UV a 215 nm.

Se determinó que azadiractina no puede estar en contacto con tubos de polipropileno pues se adsorbe sobre éste. Las jeringas, puntas de micropipetas, Swinnex®; filtros separadores de fase y solventes no ceden interferentes a la matriz. Sin embargo, los sellos de goma de los tubos tapa rosca de vidrio de 50 mL para centrífuga no pueden estar en contacto con el solvente de extracción pues contaminan la muestra.



La metodología de purificación desarrollada se aplica a un homogenizado acuoso de carne el que es extraído con diclorometano: Isopropanol con agitación en Ultraturax<sup>®</sup>. Este extracto es filtrado, evaporado a sequedad y redissuelto en MeOH: H<sub>2</sub>O para inyección a HPLC.

Estas metodologías de extracción y análisis permiten identificar y cuantificar de manera precisa y exacta azadiractina tomando como límite inferior de cuantificación la inyección de 4,5 ng de azadiractina A extraídos desde la matriz biológica.

## Summary.

### DEVELOPMENT OF A HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY ANALYTIC METHOD FOR AZADIRACHTIN RESIDUES IN CATTLE MEAT

The aim of this study was the development of an analytic and extraction method for azadirachtin from cattle meat.

High performance liquid chromatography was used for developing the analytical method. Liquid – liquid extraction and solid phase purification was used for the clean-up of the biological matrix.

HPLC conditions were: C<sub>18</sub> 4,5×250 mm column, acetonitrile: water (27.5:72.5) as mobile phase, 1 mL/min as flow rate, 45 °C column temperature and UV detector at 215 nm.

The use of polypropylene tubes must be avoided, since it was demonstrated that azadirachtin is adsorbed by this material. Syringes, micropipette tips, Swinnex<sup>®</sup>, phase separator filters and solvents did not show interferences with biological matrix. However rubber seals of glass tubes give a wide range of interferences so it can't be in contact with the extraction solvent.

The extraction method was set as follows: from an aqueous homogenized of cattle meat, the extraction with dichloromethane: isopropanol was made by stirring up with Ultraturrax<sup>®</sup>, filtered by phase separator and redissolved in MeOH: H<sub>2</sub>O for injection in HPLC.

The extraction and analytical method developed in this work allows the quantitation of azadirachtin with precision and accuracy, establishing a lower limit of quantification of 4,5 ng of azadirachtin A, extracted from the biological matrix.

## Glosario.

1PS: Filtro tratado con silicona, permite separar la fase orgánica de la acuosa.

ACN: Acetonitrilo.

AZD: Azadiractina.

CBZ: Carbamazepina.

DCM: Diclorometano.

H<sub>2</sub>O: Agua.

IPOH: Isopropanol.

MeOH: Metanol

Swinnex<sup>®</sup>: Sistema de sujeción de filtros con tamaño de poro de 0,22 μm.

Ultraturrax<sup>®</sup>: Sistema de agitación de alta fuerza de corte.

## Introducción.

Se sabe que la ausencia de moscas hace más saludable el crecimiento y descanso del ganado de consumo. Éstos son dos parámetros de importancia en los animales de producción, por lo que en ocasiones se hace necesaria la administración de fármacos al ganado bovino para estos fines.

Azadiractina ha demostrado ser un agente quimioterápico eficaz en el control de algunas plagas de moscas como la de los caballos, de los establos, de los cuernos y de la fruta, por nombrar algunas (Ruiz, 1996).

Este fármaco es eficaz en el control de estas plagas pues interrumpe el ciclo vital de las moscas en dos puntos: en primer lugar impide el crecimiento de los huevos a larvas y en segundo lugar impide el paso de larvas a moscas (Gaaboub, 1984).

Azadiractina pertenece a la familia de los triterpenos siendo, más específicamente, un tetranortriterpenoide de carácter neutro e insoluble en agua (Miller, 1998).

Se encuentra en hojas, semillas, tallos, raíces, tronco y frutos de *Azadirachta indica* Juss también conocido como *Melia indica*, *Melia azadirachta*, nim, margosa, limba, mimba, nimba, kohomba, y lila india (Ruiz, 1996).

Azadiractina posee dos estructuras químicas diferentes, siendo ambas tetranortriterpenoides (Figuras 1 y 2) y se denominan azadiractina “A” y “B” (Fortune bio-tech, 2005).

Figura 1. Estructura de azadiractina A (Cambridgesoft, 2002).

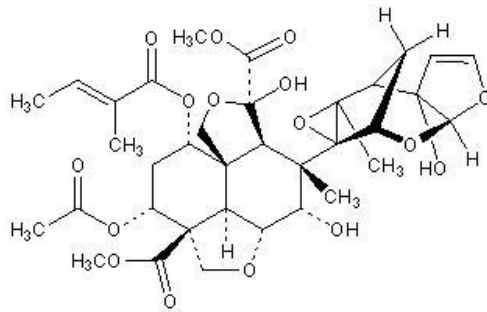
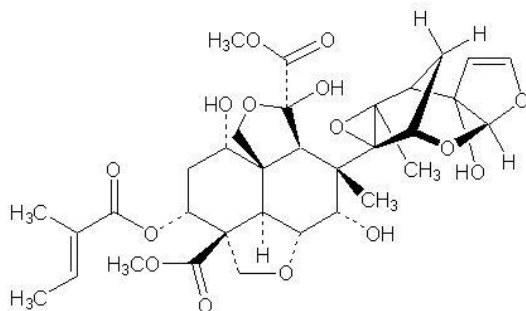


Figura 2 : Estructura de azadiractina B (Govindachari, 2002)



En la antigüedad, los aborígenes de la India trituraban las hojas de nim y las aplicaban sobre las heridas para eliminar las larvas que habían crecido en éstas (Farries, 1996).

En la actualidad se administra un triturado de semillas en el alimento del ganado bovino para prevenir el crecimiento de moscas en las heces del ganado, pues es ahí donde las moscas ponen los huevos (Farries, 1996).

También se ha aplicado el extracto oleoso del nim (aceite de nim) sobre la piel de ganado ovino, como medida precautoria y de control de ataques de moscas a la producción (Farries, 1996).

Por disposición del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de Chile y de ciertas entidades internacionales, se debe declarar la cantidad de residuos de fármacos contenidos en las carnes y/o vísceras que se importan o exportan al y del país. Si bien para algunos de los fármacos administrados a los animales no existen especificaciones de límites máximos, todos los fármacos administrados al ganado deben ser declarados y especificada la cantidad de éste, contenida en el producto a ser exportado o importado.

Considerando que no existe una metodología analítica para cuantificar los residuos de azadiractina en músculo de vacuno, que los animales de producción están siendo tratados con este fármaco y que el producto cárneo está pensado para ser exportado y, por lo tanto, debe declarar la cantidad de residuos de azadiractina contenidos, se hace necesario el desarrollo de una metodología analítica que permita la extracción, identificación y cuantificación de los residuos de azadiractina contenidos en músculo de vacuno.

# Objetivos.

## **Objetivos generales.**

- Desarrollar una metodología analítica vía cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para cuantificar azadiractina (AZD).
- Desarrollar una metodología de extracción de azadiractina desde tejido muscular de vacuno.

## **Objetivos específicos.**

- Estudiar los parámetros cromatográficos que permiten identificar y separar azadiractina “A” y “B” del resto de los componentes de la matriz biológica.
- Estudiar los parámetros que permiten una extracción selectiva y cuantitativa de azadiractina “A” y “B” desde músculo de vacuno.

# Materiales y métodos.

## **Materiales.**

- Acetonitrilo grado HPLC.
- Agua bidestilada.
- Baño termo regulado.
- Cartuchos para purificación en fase sólida OASIS<sup>®</sup> HLB<sup>®</sup> 3 mL.
- Centrífuga.
- Cloroformo grado p.a.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiencia.
  - AutoSampler LaChrom L – 7250 Merck-Hitachi.
  - Bomba Intelligent Pump L – 6200 Merck-Hitachi.
  - Detector UV – VIS L – 4250 Merck-Hitachi.
  - Horno para columna LaChrom L – 7350 Merck.
  - Integración mediante software HMS versión 4.0 Merck-Hitachi.
  - Interfase D – 6000 A Merck-Hitachi.
- Diclorometano grado HPLC.
- Filtros GVWP Millipore<sup>®</sup>.
- Hexano grado HPLC.
- Homogenizador Ultraturrax<sup>®</sup>.
- Isopropanol grado p.a.



- Metanol grado HPLC.
- Micropipetas.
- Papel filtro separador de fases.
- Pipetas Pasteur.
- Tubos de ensayo de vidrio.
- Tubos de vidrio de centrífuga de 50 mL.

## **Métodos.**

- Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).
- Extracción líquido – líquido. Se ensayaron diferentes solventes para la extracción, seleccionándose el que presente el mayor porcentaje de recuperación del analito.
- Purificación por fase sólida. Se ensayó para reducir la interferencia de la matriz biológica en el cromatograma.

## Desarrollo de la metodología analítica.

Para desarrollar una metodología analítica que permita identificar y separar azadiractina A y B de la matriz biológica, carne de vacuno, se tomó como base la metodología que se utiliza para el análisis de azadiractina como materia prima (Fortune bio-tech, 2005).

Ésta establece los siguientes parámetros:

Columna:	Waters® Spherisorb® ODS2 250 x 4,6 mm.
Fase móvil:	acetonitrilo: agua (35:65)
Velocidad de flujo:	1,00 mL/min.
Longitud de onda:	215 nm.
Tiempo de retención:	azadiractina A 12,134 min, azadiractina B 12,959 min.
Concentración de solución estándar:	4 µg/mL
Volumen de inyección:	20 µL.

Cuando la solución estándar se prepara con materia prima de azadiractina se debe conocer la pureza de ésta para preparar una solución que contenga 4 µg/mL.

Al no disponer de azadiractina estándar, se trabajará con azadiractina materia prima. La pureza de esta materia prima es 14,32% de azadiractina A y 2,73% de azadiractina B, es decir 17,05% de azadiractina según certificado de análisis.

Al no disponer de una columna Waters® Spherisorb® ODS2 250 x 4,6 mm, se evalúan algunas de las distintas columnas C<sub>18</sub> existentes en el mercado nacional. Se busca información de columnas Merck® LiChrospher®, Merck® LiChrosorb® y Merck® Superspher®, Agilent® ZORBAX® Eclipse XDB®, Agilent® ZORBAX® Stable Bond®, Agilent® ZORBAX® SB 300®, Fisher Sci.® Wacosil II®, Waters® Novapack®, Waters®

$\mu$ Bondapak<sup>®</sup>, Waters<sup>®</sup> Symmetry 300<sup>®</sup> y Waters<sup>®</sup> Symmetry<sup>®</sup>. Todas estas columnas corresponden a columnas de fase reversa, C<sub>18</sub> y de 250 mm de largo. La comparación de estas columnas se realiza en función de: diámetro y forma de partícula, tamaño de poro, actividad de silanol, si son columnas EndCapped o no y el costo de la columna.

Se decide trabajar con una columna Waters<sup>®</sup> Symmetry<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 250 x 4,6 mm, diámetro de partícula de 5  $\mu$ m, partículas esféricas, poro de 100 Å, baja actividad silanol, columna EndCapped, por costos y ventajas comparativas entre diferentes columnas de distintos proveedores y del mismo proveedor.

La velocidad de flujo de la fase móvil se mantendrá en 1,00 mL/min y la longitud de onda de detección se fijará en 215 nm. Se trabajó, inicialmente, a temperatura ambiente sin estar ésta regulada.

## **Estudio de parámetros cromatográficos.**

### **Polaridad de la fase móvil.**

Se evaluó el efecto de cambios en la polaridad de la fase móvil, variando la proporción de acetonitrilo y agua y adicionando metanol.

### **pH de la fase móvil.**

La fase móvil constituida por acetonitrilo: H<sub>2</sub>O (33:67) presenta un pH levemente ácido, cercano a 6.

Cabe destacar que el rango operativo de pH para la columna Waters<sup>®</sup> Symmetry<sup>®</sup> C<sub>18</sub> es entre 2 y 8. Si se trabajase con un pH superior a 8, la vida útil de la columna se reduciría considerablemente.

Es por estos motivos que se evaluó la influencia del pH en la separación de los picos de AZD A y B a pH 3, 5 y 8.

### **Fuerza iónica.**

Se decidió evaluar un buffer biftalato de potasio 0,02M a pH 3 y un buffer citrato de sodio 0,02M a pH 3.

### **Temperatura.**

Hasta este punto se ha trabajado con el sistema a temperatura ambiente, estando sujetos a los cambios en la presión del equipo debidos a las variaciones de temperatura de la fase móvil.

Como la temperatura de trabajo puede ser un parámetro importante en la separación de los picos de AZD A y B, se ensayaron aumentos en la temperatura del sistema con delta de 5 °C comenzando en 25 °C y terminando en 45 °C.

### **Modificación de fase móvil por posible cambio de detector.**

Cabe la posibilidad de que el sistema de detección UV no sea suficientemente sensible y/o específico para cuantificar residuos en concentraciones muy bajas. Si éste fuera el caso, la solución podría ser cambiar el sistema de detección.

El sistema de detección más factible para esta metodología sería un detector de masa. El inconveniente de utilizar este detector es la fase móvil, que no puede contener sales.

### **Longitud de onda de detección.**

Cuando se ensayaron las extracciones desde una solución de materia prima y desde la matriz biológica, se presentó el inconveniente de interferencia en la zona cercana a los picos del estándar interno y analito.

Como una forma de disminuir la interferencia en el cromatograma se decidió variar la longitud de onda de detección. Se ensayó a dos longitudes diferentes más: 230 y 240 nm.

## Desarrollo de la metodología de extracción.

Para desarrollar una metodología de extracción de AZD desde el tejido muscular de vacuno, se partió evaluando la viabilidad de una extracción líquido – líquido.

Se sabe que AZD es una molécula de carácter ácido – base neutro, insoluble en agua y soluble en cloroformo y metanol. Por experiencia se sabe que es soluble en acetonitrilo, diclorometano y hexano.

### **Esquema de extracción en solución stock.**

Se propuso un esquema de extracción desde una solución hidroalcohólica de AZD, que contenía alrededor de 27 µg/ml de AZD A.

### **Influencia del pH.**

Luego se procedió a evaluar la influencia del pH de la fase acuosa en la extracción del analito. Se evaluó la extracción desde una solución stock a pH 10, 8, 6, 4 y 2.

### **Estimación del porcentaje de extracción desde solución stock.**

Se decidió evaluar cuántos procesos de extracción son necesarios para recuperar el 100% de AZD, o la cantidad más cercana posible a este valor.

### **Elección de estándar interno.**

Una vez que se establecieron las líneas generales del proceso de extracción, se hizo necesaria la elección de un estándar interno para poder minimizar los errores en la metodología una vez que se comenzara a trabajar con la matriz biológica.

Para la elección de este estándar se deben considerar sus propiedades fisicoquímicas y evaluar sus propiedades cromatográficas. Las propiedades fisicoquímicas deben ser semejantes a las del analito y sus propiedades cromatográficas deben permitir su identificación y cuantificación, sin interferir con los picos del analito.

### **Purificación en fase sólida de solución stock.**

Para evaluar los beneficios de la purificación en fase sólida se utilizaron los cartuchos OASIS<sup>®</sup> HLB<sup>®</sup> de la empresa Waters. Se eligieron los cartuchos de 3 mL por su volumen, que permite una manipulación más conveniente de las muestras.

### **Extracciones de carne blanco (matriz).**

Se hizo una comparación entre la dosis administrada de enrofloxacino y las concentraciones de éste en la carne de un vacuno, para extrapolar los resultados a la dosis administrada de AZD. Se comparó con este antibiótico pues presenta una de las más bajas concentraciones de analito en carne en función de la dosis administrada.

El límite inferior de cuantificación de AZD en materia prima para la metodología analítica ensayada sería cercano a inyectar 80 µg de AZD calculados en función de la concentración de la solución madre y el volumen de inyección.. Suponiendo que éste es el límite inferior de cuantificación de AZD en carne de vacuno y, extrapolando con los datos de enrofloxacino, la cantidad de carne necesaria para realizar el análisis de una muestra sería de 5 g. Es por ello que para los ensayos sucesivos se tomaron 5 g de carne de vacuno para cada muestra.

### **Purificación en fase sólida de carne blanco.**

Se ensayó la purificación en fase sólida de una muestra extraída de carne blanco, bajo el esquema general de purificación de muestras que proporciona el fabricante de los cartuchos.

### **Extracción desde la matriz biológica adicionada con solución stock de AZD y CBZ.**

Se evaluó la extracción de AZD y CBZ desde la matriz biológica, trabajando con muestras que representaran el 100% (las que fueron extraídas, evaporadas y al momento de su redisolución se adicionó la solución stock que contiene AZD y CBZ) y muestras a ser extraídas (que fueron adicionadas con solución stock antes de la homogenización en Ultraturrax®).

### **Variación de solventes de homogenización y extracción.**

Se cambiaron algunos parámetros del esquema de extracción y luego se procedió a realizar la extracción desde la matriz biológica.

Basándose en una metodología de extracción de CBZ desde plasma humano, en vez de utilizar buffer fosfato a pH 6 para homogenizar la muestra, se decidió probar con una solución saturada de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y comparar la eficiencia ante  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada.

Además se ensayó en paralelo extracciones con DCM: IPOH (95:5), cloroformo: IPOH (95:5) pues la literatura describe que AZD es soluble en cloroformo.



### **Estimación del porcentaje de extracción desde la matriz biológica.**

Utilizando la información adquirida se diseñó un nuevo esquema de extracción para realizar la estimación del porcentaje de extracción.

Las muestras que representarán el 100% fueron extraídas y, antes de su evaporación se les adicionó la solución stock que contiene AZD y CBZ en las concentraciones y cantidades requeridas.

Las muestras a ser extraídas se les adicionó solución stock antes de la homogenización en Ultraturrax®.

### **Selectividad, recuperación, precisión, exactitud y linealidad de la relación concentración respuesta de la metodología.**

Para evaluar estos parámetros se ensayaron las siguientes extracciones desde la matriz biológica: matriz blanco (carne blanco), muestra zero (carne blanco que fue adicionada con una solución de estándar interno antes de ser extraída), muestras al 100% de tres concentraciones (baja, media y alta) que servirán para calcular la recuperación, y extracciones a seis concentraciones crecientes.

Para evaluar la selectividad de la técnica, se procesaron seis muestras de carne blanco provenientes de diferentes animales.

Para evaluar la recuperación se prepararon muestras a las que después de la extracción se les agregó solución stock. Se ensayaron tres concentraciones.

Para evaluar la relación que existe entre la respuesta del equipo y la concentración de la muestra, se preparó una curva de calibración con las siguientes concentraciones: 57, 114, 228, 457, 857 y 1715  $\mu\text{g}$  de AZD A/mL.

Para evaluar la precisión y exactitud de la muestra se realizaron duplicados de las muestras, para cada punto de la curva.

# Resultados.

## **Desarrollo de la metodología analítica**

Al ensayar la metodología analítica para materia prima (Fortune bio-tech, 2005), es decir, fase móvil compuesta por acetonitrilo: H<sub>2</sub>O (35:65), velocidad de flujo 1,00 mL/min y longitud de onda de detección de 215 nm, no hubo una separación adecuada de los picos de AZD "A" y "B", los que salen superpuestos alrededor de los 16 min. Frente a esta dificultad se decide evaluar cómo influyen los parámetros cromatográficos en la separación de los picos.

## **Estudio de parámetros cromatográficos**

### **Polaridad de la fase móvil.**

Lo primero que se intentó fue aumentar en un 5% la proporción de agua, acetonitrilo: H<sub>2</sub>O (30:70). Como resultado se obtuvo un desplazamiento del peak hacia la derecha, es decir un aumento en el tiempo de retención. El nuevo tiempo de retención es cercano a los 28 minutos. Los picos de AZD A y B no se separan.

Luego se probó con una fase móvil constituida por acetonitrilo: H<sub>2</sub>O (37:63). Esto produjo una disminución en los tiempos de retención, cercana a los 14 min, y una pequeña separación de los picos de AZD A y B.

Posteriormente se trabajó con una fase móvil formada por acetonitrilo: H<sub>2</sub>O (33:67). Los tiempos de retención llegaron cerca de los 19 min pero con una separación incompleta de los picos.

En seguida se evaluó una fase móvil constituida por acetonitrilo: H<sub>2</sub>O (40:60). El resultado fue una disminución en los tiempos de retención, cercanos a los 11 min, y una separación incompleta de los picos.

Después se probó una fase móvil formada por acetonitrilo: H<sub>2</sub>O (50:50). Nuevamente los tiempos de retención bajaron a cerca de 6 min, pero los picos no se separaron del todo.

Es entonces cuando se decidió evaluar el efecto de un tercer solvente en la fase móvil: metanol. Se ensayó con una fase constituida por acetonitrilo: MeOH: H<sub>2</sub>O (30:3:67). El tiempo de retención llegó a los 31 min pero no se logró separar completamente los picos de AZD A y B.

A continuación se probó una fase móvil formada por acetonitrilo: MeOH: H<sub>2</sub>O (23:10:67). El resultado fue poco satisfactorio, un tiempo de retención de 50 min y un solo peak para ambas azadiractinas.

Antes de evaluar la influencia del pH en la separación de los picos se decidió trabajar con la fase acetonitrilo: H<sub>2</sub>O (33:67), ya que dio tiempos de retención aceptables para ensayos con matrices biológicas.

#### **pH de la fase móvil.**

Para evaluar la influencia del pH básico de la fase móvil en la separación de los picos de AZD se preparó fase móvil y se ajustó a pH 8 con una solución de NaOH 1N. La separación de los picos no presenta un cambio importante.

Para probar la influencia de un pH ácido, se preparó fase móvil y se ajustó a pH 5 con una solución de ácido fosfórico 1N la mencionada fase. Si bien se logró una mayor separación de éstos, no llegó a ser completa.

Luego se procedió a llevar la fase hasta pH 3 con una solución de ácido fosfórico 1N. Se logró una mayor separación de los picos sin ser completa.

Siendo a pH 3 cuando se logró una mejor separación de los picos, se decidió trabajar a este pH para evaluar el parámetro cromatográfico siguiente.

### **Fuerza iónica.**

La fase móvil ensayada estaba compuesta por acetonitrilo: buffer biftalato de potasio 0,02M a pH 3 (33:67). Al preparar la fase móvil no se apreciaron incompatibilidades y, para asegurar la integridad de los pistones, se filtró la fase. Cuando se ambientó el cromatógrafo con esta fase móvil, el equipo no fue capaz de compensar línea base, presentando una absorbancia de 1,700 U.A. Se midió la absorbancia a 215 nm de la fase móvil con buffer biftalato de potasio utilizando como blanco acetonitrilo: agua (33:67) el equipo entregó una lectura que varió entre 2,8 y 3,0 U.A.

Como conclusión se determinó que el buffer biftalato de potasio 0,02M a pH 3 no es viable como constituyente de la fase móvil.

Luego se cambió el tamponante y la fase móvil quedó constituida por acetonitrilo: buffer citrato de sodio 0,02M a pH 3 (33:67). Nuevamente no se observaron incompatibilidades pero para mayor seguridad del equipo y la columna se filtró.

Al trabajar con esta fase móvil no se observó un aumento significativo en la separación de los picos de AZD A y B, pero se siguieron evaluando los parámetros cromatográficos utilizando esta solución.

### **Temperatura.**

Cuando se aumentó la temperatura, aumentó la separación de los picos de AZD A y B, encontrándose a 45 °C una separación completa de los picos, permitiendo una identificación y cuantificación de ambas azadiractinas a esta temperatura.

Se decidió trabajar a 45 °C para evaluar los parámetros restantes.

### **Modificación de la fase móvil por posible cambio de detector.**

Pensando en un posible cambio de detector y, como habiendo probado ya la extracción desde la matriz biológica se ha encontrado interferencia de ésta con los picos del analito y del estándar interno, se evaluó la separación de los picos de AZD A y B en una fase móvil compuesta por acetonitrilo: H<sub>2</sub>O (30:70) a 45 °C.

Se utilizó esta fase móvil, pues permitirá cambiar de detector sin mayores inconvenientes y aumentó los tiempos de retención de CBZ y AZD, lo que permitió una mejor separación de los interferentes propios de la matriz biológica.

Cuando se ensayó esta fase móvil a la temperatura indicada se logró una separación total de los picos de AZD A y B, con tiempos de retención cercanos a 29 min.

### **Longitud de onda de detección.**

Los cromatogramas ensayados a 240 nm muestran una reducción de área muy grande: sólo exhibe un 40% del área a 215 nm.

Los cromatogramas ensayados a 230 nm presentan una reducción de área menor, muestran áreas de un 70% del área a 215 nm.

Sin embargo, los picos de interferencia no disminuyen significativamente, por lo cual se decidió mantener la longitud de onda en 215 nm.

### **Variación de la fase móvil por presencia de interferentes.**

Como los cromatogramas exhibieron picos de interferencia en la zona cercana al estándar interno y analitos, se decidió modificar la fase móvil para aumentar los tiempos de retención y distanciar los analitos de los interferentes. Se varió a una proporción acetonitrilo: H<sub>2</sub>O (27,5:72,5)

### **Condiciones cromatográficas finales.**

Después de haber realizado una evaluación de los parámetros cromatográficos, se fijaron las condiciones analíticas para la metodología de cuantificación de azadiractina:

Columna:	Waters® Symmetry® C <sub>18-e</sub> 250 x 4,6.
Fase móvil:	Acetonitrilo: H <sub>2</sub> O (27,5:72,5)
Velocidad de flujo:	1,00 mL/min.
Longitud de onda:	215 nm.
Temperatura:	45 °C.

## Desarrollo de la metodología de extracción.

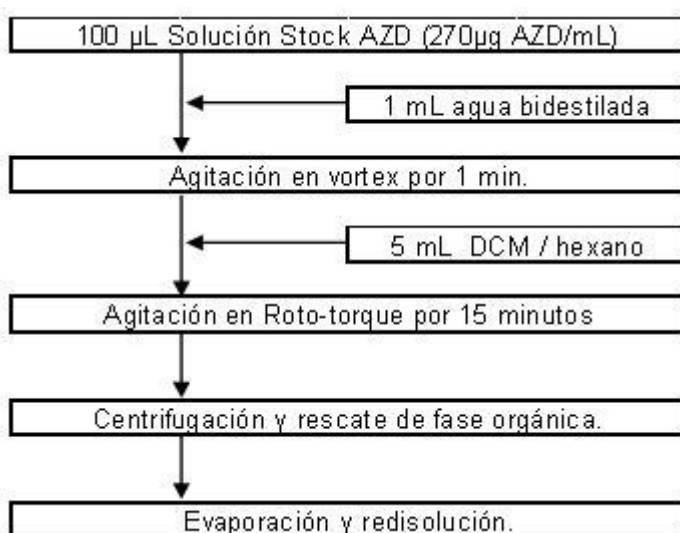
Lo primero fue evaluar la eficiencia de los posibles solventes de extracción desde una solución stock de AZD en H<sub>2</sub>O: MeOH (99:1). Los solventes evaluados fueron diclorometano, hexano y cloroformo.

Se preparó una solución stock de AZD en MeOH: H<sub>2</sub>O (90:10) de tal manera que contuviera alrededor de 270 µg/ml de AZD A.

### Esquema de extracción en solución stock.

Se propuso el siguiente esquema de extracción (Figura 3).

Figura 3: Esquema de extracción desde solución stock.



Se debe tomar una solución hidroalcohólica de AZD pues el analito es insoluble en agua. Se adicionaron 5 mL de diclorometano, a un grupo, y 5 mL de hexano, a otro. El extracto seco se redisolvió con 1 mL de MeOH: H<sub>2</sub>O (90:10), filtró por Swinnex<sup>®</sup> e inyectó al cromatógrafo.

Si bien se apreció una mayor recuperación con diclorometano (Tabla 1), el trabajar con hexano también es factible, por lo que se decidió evaluar la influencia del pH en la extracción con ambos solventes.

Tabla 1: Porcentajes de recuperación con DCM y hexano.

Nº de ciclos	% de Extracción	d.e.
1	74,0%	±0,8%
2	70,0%	±1,2%

### **Influencia del pH de la fase acuosa.**

La solución acuosa de AZD presenta pH 6, por lo cual no fue necesario modificarlo para su evaluación. Para llevar a pH 8 y 10 se utiliza una solución de NaOH 0,1 N y para llevar a pH 2 y 4 se utiliza una solución de HCl 0,1 N.

Una vez ajustado el pH de la solución acuosa de AZD se procedió a la extracción con diclorometano y hexano, utilizando en esquema antes mencionado.

Al no haber una diferencia significativa en los porcentajes de extracción a los diferentes pH se decidió trabajar a pH 6. Se realizaron ensayos con una solución buffer fosfato a pH 6 y finalmente se optó por trabajar solo con H<sub>2</sub>O bidestilada que, junto con la matriz biológica, presenta pH 6.

### **Estimación del porcentaje de extracción desde solución stock.**

Para la evaluación de este parámetro se probó la recuperación con un ciclo de extracción, con dos ciclos y finalmente con tres ciclos (Tabla 2).

Tabla 2 : Tabla de resultados porcentajes de extracción por número de ciclos.

Nº de ciclos	% de Extracción	d.e.
1	74,0%	±0,8%
2	92,5%	±1,0%
3	98,0%	±0,9%



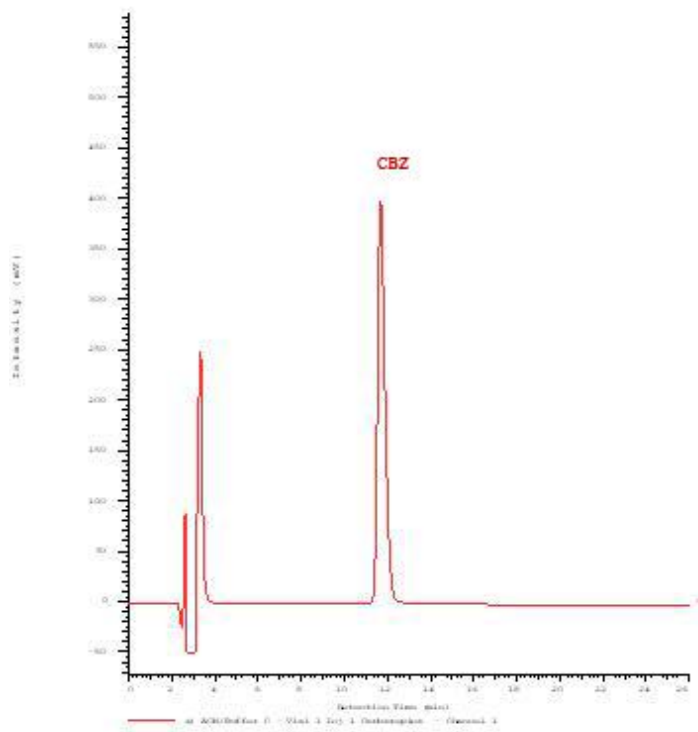
Cuando se llega a tres ciclos de extracción, se obtuvo un porcentaje de extracción de  $98,0 \pm 0,9\%$ .

### **Elección del estándar interno.**

Considerando las propiedades fisicoquímicas del analito. se pensó en utilizar Carbamazepina (CBZ) como estándar interno por ser una molécula de carácter ácido – base neutro, insoluble en agua y soluble en MeOH.

Para la evaluación de sus propiedades cromatográficas se preparó una solución que contenía  $30 \mu\text{g/mL}$  de CBZ. Se tomaron 10 mL de ésta y se llevó a un volumen final de 50 mL con MeOH: H<sub>2</sub>O (90:10). Esta solución fue inyectada al HPLC dando el siguiente cromatograma (Figura 4).

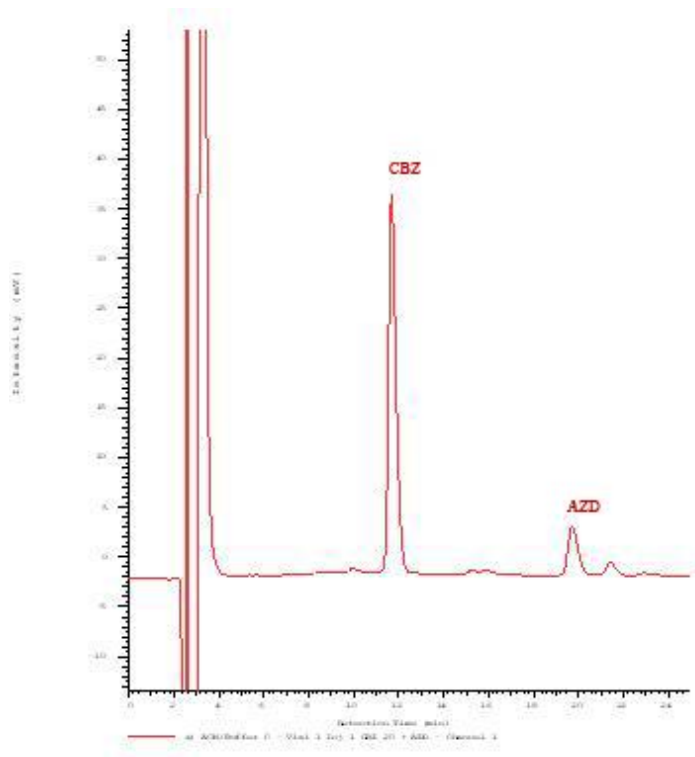
Figura 4: Cromatograma de una solución de CBZ  $200 \mu\text{g/mL}$ .



Para la evaluación de selectividad de la técnica analítica se tomaron 10 mL de una solución que contenía 30  $\mu\text{g/mL}$  de CBZ, se adicionaron 10 mL de una solución que contenía 280  $\mu\text{g/mL}$  de AZD A y se llevó a un volumen final de 50 mL con MeOH: H<sub>2</sub>O (90:10).

Cuando se realizó una cromatografía de la solución así preparada, en las condiciones cromatográficas establecidas para el análisis de AZD, CBZ presenta un peak bien definido y en un tiempo de retención cercano a los 16 minutos, que no interfiere con AZD (Figura 5).

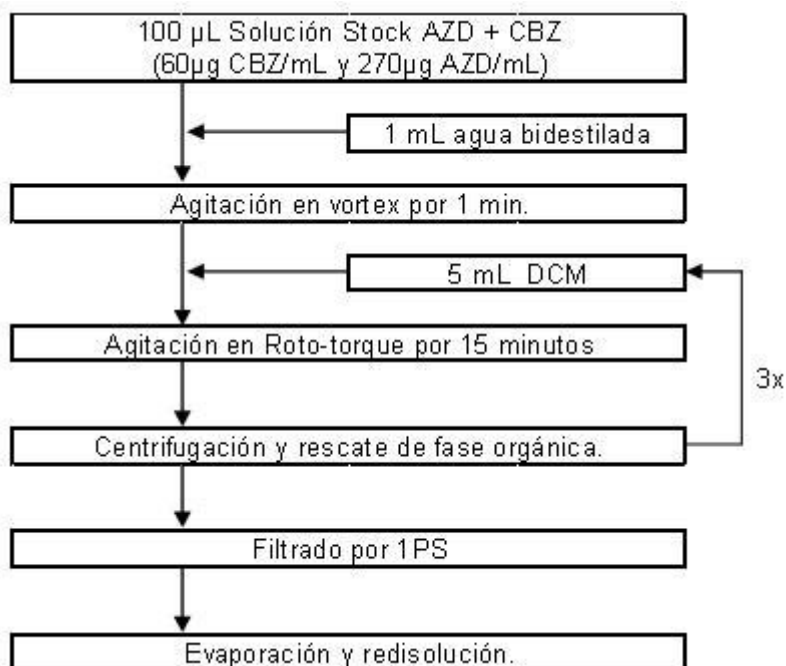
Figura 5: Cromatograma de una solución de CBZ 20  $\mu\text{g/mL}$  y AZD MP 200  $\mu\text{g/mL}$ .



Sin embargo, por estar trabajando con AZD materia prima en vez de estándar de AZD, el cromatograma exhibió varios picos de interferencia. Se decidió evaluar si esta interferencia persistía después del proceso de extracción.

Para ello se realizó el siguiente procedimiento (Figura 6):

Figura 6: Esquema de extracción y filtrado de una solución stock de CBZ y AZD.



El extracto seco fue redisoluelto con 1 mL de MeOH: H<sub>2</sub>O (90:10), filtrado por Swinnex<sup>®</sup> e inyectado al cromatógrafo.

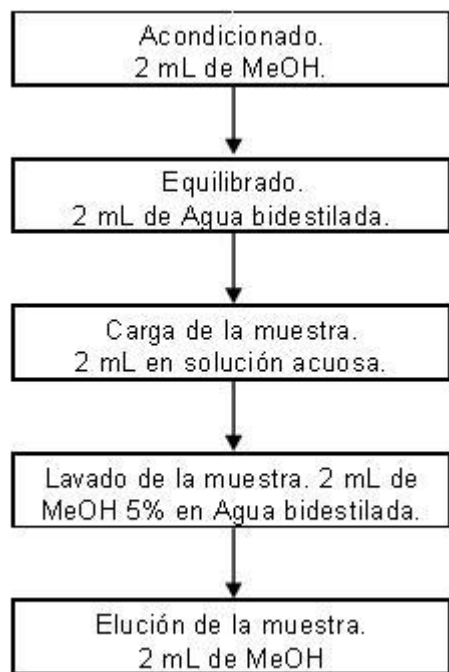
Como la solución presentó varios picos de interferencia se decidió evaluar la viabilidad de la purificación en fase sólida.

#### **Purificación en fase sólida de solución stock.**

Para purificar las muestras se tomaron éstas una vez evaporado el extracto orgánico. Luego fueron redisueltas en 250 µL de MeOH el que luego es concentrado a una gota. Después se adicionaron 2 mL de H<sub>2</sub>O para luego pasar esta solución por el cartucho de purificación.

La muestra fue tratada según la metodología general de purificación de los cartuchos (Figura 7):

Figura 7: Esquema general de purificación de muestras en cartuchos OASIS®.



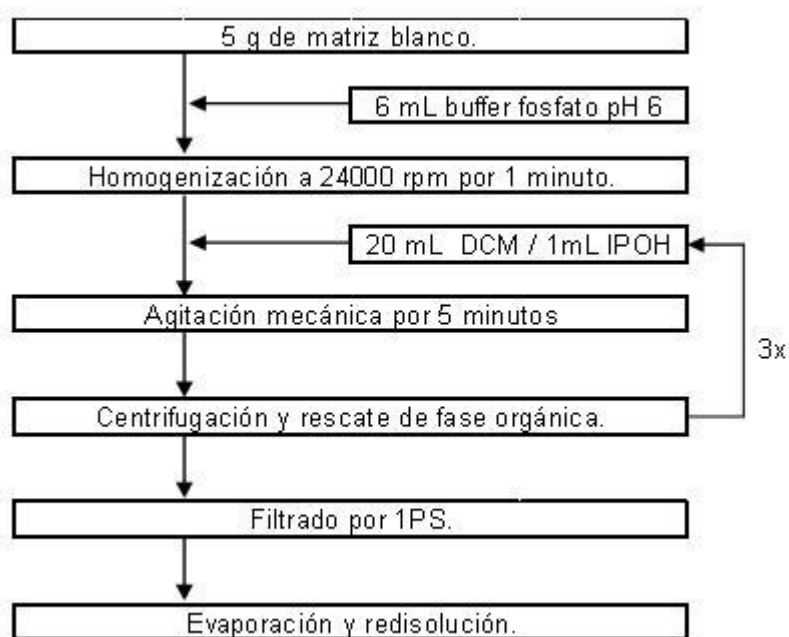
El eluido fue llevado a sequedad en baño termostático a 40 °C con corriente de nitrógeno, redissuelto en 1 mL de MeOH: H<sub>2</sub>O (90:10), filtrado por Swinnex® e inyectado al cromatógrafo.

Una vez que se hubo comprobado una recuperación satisfactoria del analito (87,5 ±0,9%) y estándar interno, junto con una remoción de los interferentes de la materia prima, se procedió a realizar la extracción desde carne para ver las interferencias de la matriz.

### Extracción de carne blanco (matriz).

La extracción desde la matriz blanco se realizó de la siguiente manera (Figura 8):

Figura 8: Esquema de extracción desde carne <sup>1</sup>.



Las muestras fueron redisueltas en 500  $\mu$ L de MeOH: H<sub>2</sub>O (90:10), filtradas por Swinnex® e inyectadas al cromatógrafo.

### Purificación en fase sólida de carne blanco.

En paralelo se trabajó la purificación de la matriz blanco. Se realizó el mismo proceso de extracción antes descrito, hasta la evaporación del extracto orgánico. Luego el extracto seco se disolvió en 1 mL de MeOH, se concentró hasta una gota en baño termostático a 40 °C con corriente de nitrógeno, se adicionaron 2 mL de H<sub>2</sub>O y se purificó la muestra con el protocolo general de purificación de los cartuchos OASIS® HLB®. La muestra purificada se llevó a sequedad en baño termostático a 40 °C con corriente de nitrógeno y se redisolvió en 500  $\mu$ L de MeOH: H<sub>2</sub>O (90:10), filtró por Swinnex® e inyectó al cromatógrafo.

El resultado de la purificación no fue satisfactorio, la muestra saturó el cartucho a tal punto que apenas fue posible eluirlo.

### **Estimación del porcentaje de extracción desde la matriz biológica.**

Para realizar esta evaluación se utilizó el siguiente protocolo de extracción (Figura 9):

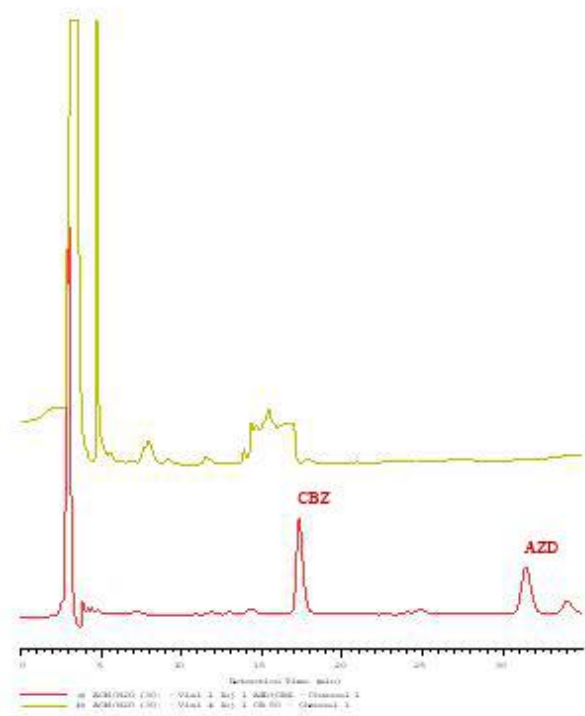
Figura 9: Esquema de extracción desde carne <sup>II</sup>.



Al trabajar con este esquema se obtuvo una recuperación nula.

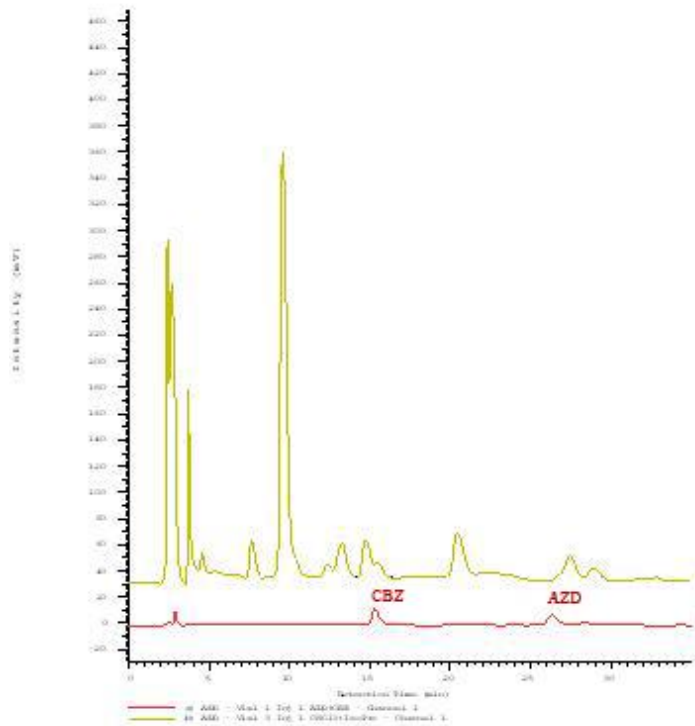
Después de evaluar los posibles factores que llevaron a este mal resultado, se identificó como causa los tubos de polipropileno de 50 mL donde se realizó la extracción, AZD se adsorbe sobre las paredes del tubo (Figura 10). Esto nos llevó a la conclusión que la muestra debe tener el menor contacto posible con material de plástico y que la extracción debe ser efectuada en tubos de vidrio de 50 mL, que puedan ser centrifugados para lograr la separación de fases.

Figura 10: Cromatograma comparado de solución stock almacenada en tubos de polipropileno por 24 horas (arriba) vs. solución stock (abajo).



Cuando las muestras fueron tratadas con el mismo esquema de extracción en tubos de vidrio, tanto las muestras que corresponden al 100% como las muestras extraídas, presentaron un alto número de interferentes en todo el cromatograma, lo que alteró la señal del estándar interno y de los analitos (Figura 11).

Figura 11: Cromatograma comparado de solución stock (abajo) vs. extracción matriz blanco (arriba)

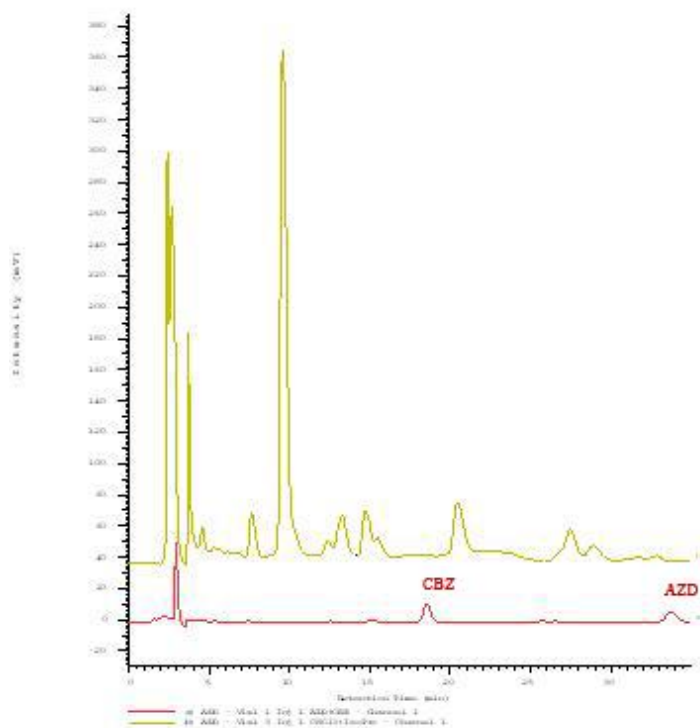


Es entonces cuando se decidió identificar y, de ser posible, eliminar el o los elemento(s) que produjeron la contaminación de las muestras. Se presumió que la contaminación puede provenir de: jeringas, puntas de micropipetas, Swinnex®; filtros IPS, solventes (DCM, MeOH) y/o sellos de goma de las tapas de tubos de ensayo.



Finalmente se determinó que las jeringas, puntas de micropipetas, Swinnex<sup>®</sup>; filtros 1PS y solventes no ceden interferentes en cantidad suficiente para alterar significativamente el cromatograma. Sin embargo los sellos de goma sí ceden contaminantes al ser agitados con DCM, cloroformo o hexano (Figura 12).

Figura 12: Cromatograma comparado de sellos de goma en contacto con DCM por 12 horas (arriba) vs. solución stock (abajo)



Es por este motivo que la agitación no pudo realizarse en forma mecánica, ya que era necesario tapan el tubo y poner en contacto el sello de goma con el solvente de extracción. Así se llegó a la conclusión que la agitación se debía realizar con el mismo equipo utilizado para la homogenización de la muestra: Ultraturrax<sup>®</sup> a 24000 rpm por un minuto.

### Variación de solventes de extracción y homogenización.

Utilizando el equipo Ultraturrax® para realizar la agitación durante la extracción, se evaluó DCM: IPOH (95:5) versus cloroformo: IPOH (95:5) como solventes de extracción y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> versus H<sub>2</sub>O bidestilada, como solvente de homogenización (Figuras 13, 14, 15 y 16).

Cuando se compararon las extracciones con cloroformo versus extracciones con DCM, todas las extracciones refirieron un porcentaje de recuperación de 96,0±0.9% para los analitos. Sin embargo, las extracciones con DCM presentaron menor cantidad de interferentes comparada con cloroformo.

Figura 13: Cromatograma comparado de extracción con cloroformo vs. DCM utilizando como solvente de homogenización NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Solución stock (abajo), DCM (centro) y Cloroformo (arriba)

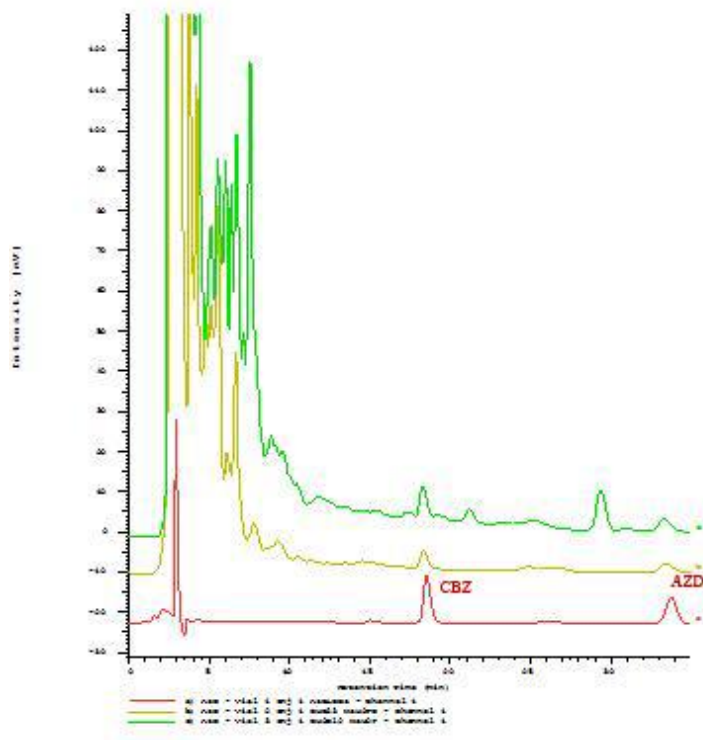
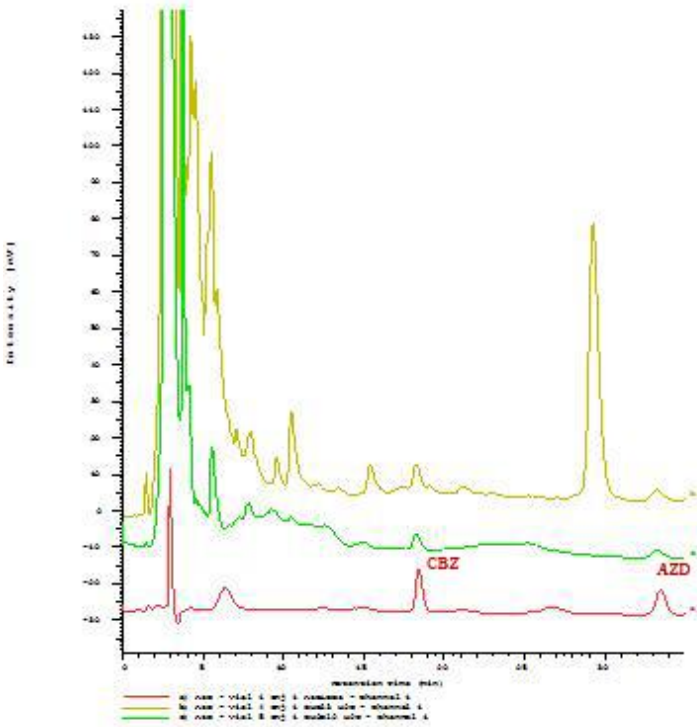


Figura 14: Cromatograma comparado de extracción con cloroformo vs. DCM utilizando como solvente de homogenización H<sub>2</sub>O. Solución stock (abajo), DCM (centro) y Cloroformo (arriba)



Cuando se compararon las extracciones realizadas con la solución saturada de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  versus las extracciones realizadas con  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada, la solución saturada de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  no ofreció ventajas comparativas en cuanto a la eficiencia de la extracción.

Figura 15: Cromatograma comparado de extracción con DCM utilizando como solvente de homogenización  $\text{H}_2\text{O}$  (arriba) vs.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (abajo)

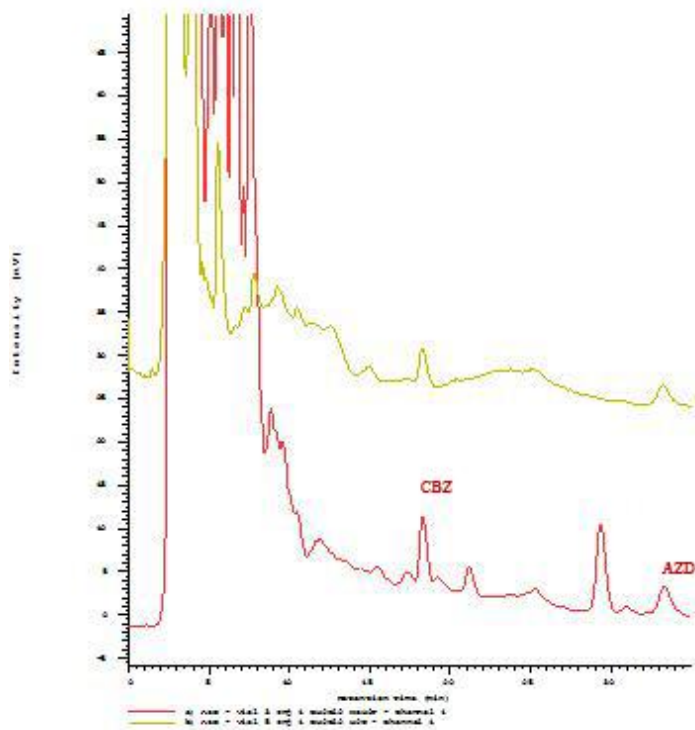
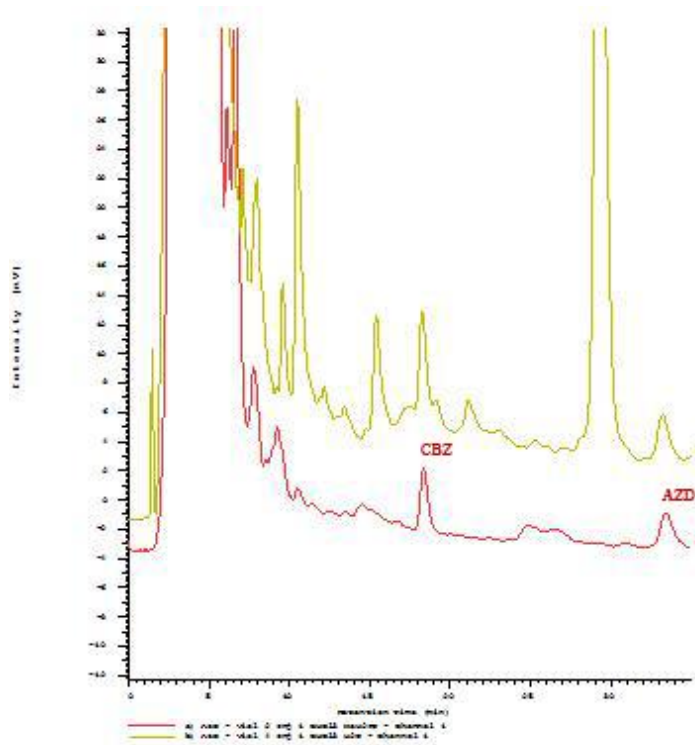


Figura 16: Cromatograma comparado de extracción con cloroformo utilizando como solvente de homogenización H<sub>2</sub>O (arriba) vs. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (abajo)



Finalmente se evaluaron tres extracciones con 16 mL de DCM versus cuatro extracciones con 10 mL de DCM, siendo esta última la más eficiente (Tabla 3).

Tabla 3: Comparación de los porcentajes de extracción de 16 mL × 3 extracciones vs. 10 mL × 4 extracciones.

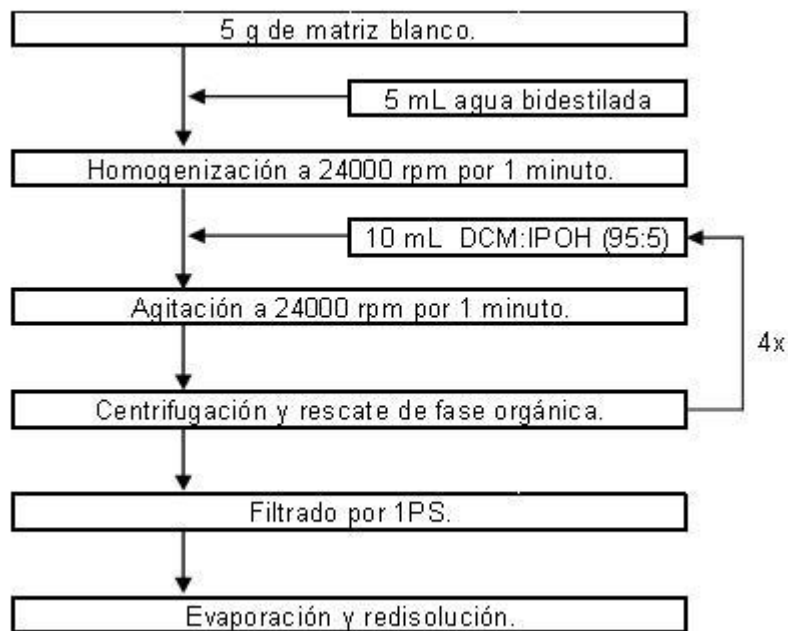
Extracciones	% de Extracción	d.e.
16 mL × 3	96,0%	± 0,9%
10 mL × 4	99,0%	± 0,6%

Como ventaja adicional, el realizar la homogenización y agitación con el mismo equipo permitió disminuir el volumen de agua adicionado a la muestra, siendo suficiente 5 mL de H<sub>2</sub>O bidestilada.

### Esquema final de extracción desde la matriz biológica.

A la luz de la información adquirida fue necesario modificar el esquema de extracción para AZD desde músculo de vacuno. El nuevo esquema de extracción fue (Figura 17):

Figura 17: Esquema de extracción de AZD desde músculo de vacuno.



Las muestras blanco fueron tratadas utilizando el esquema antes presentado. Las muestras al 100% fueron extraídas y antes de su evaporación se adicionó 50  $\mu$ L de solución stock. Las muestras extraídas fueron adicionadas con 50  $\mu$ L de solución stock antes de la homogenización.

Las muestras así preparadas fueron utilizadas para construir una curva de calibración y evaluar selectividad, recuperación, precisión, exactitud y la relación concentración respuesta de esta metodología.

**Selectividad, recuperación, precisión, exactitud y linealidad de la relación concentración respuesta de la metodología.**

Para asegurar la selectividad de la metodología, basándose en los criterios de la FDA para validación de metodologías bioanalíticas, es necesario evaluar si los compuestos propios de la matriz interfieren con el(los) analito(s) y/o con el estándar interno. Este ensayo se recomienda hacerlo a lo menos con seis matrices diferentes.

Al realizar estos ensayos se preparó una batería de soluciones a seis concentraciones de AZD A, con la correspondiente concentración de AZD B, y la misma concentración de CBZ (Tabla 4).

Tabla 4 : Concentración de CBZ, AZD A y AZD B en las soluciones madre.

Denominación	CONC. 1	CONC. 2	CONC. 3	CONC. 4	CONC. 5	CONC. 6
[ ] CBZ (ug/mL)	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
[ ] AZD A (ug/mL)	57,2	114,3	228,7	457,3	857,5	1715,1
[ ] AZD B (ug/mL)	12,3	24,5	49,0	98,0	183,8	367,5

Al evaluar seis matrices distintas, se compró posta rosada de vacuno en seis lugares diferentes. Se encontró que la matriz posee los siguientes picos en los tiempos de retención de los analitos y estándar interno (Tabla 5).

Tabla 5: Áreas de los picos endógenos de la matriz que podrían interferir con la metodología, muestra zero y extracción a la menor concentración.

	BLANCO		Zero		CONC. 1	
	RT (min)	Area (UA)	RT (min)	Area (UA)	RT (min)	Area (UA)
CBZ	20,67	53410	20,11	283451	19,98	219810
	20,60	28623	20,07	251269	19,93	255193
	20,57	14741	20,04	278765	19,89	285288
	20,49	7862			19,87	281902
	20,44	10522			19,83	267102
	20,43	77557				
AZD A	38,19	301860			37,88	243483
	38,08	56823			37,75	248028
	38,08	11305			37,63	278115
	37,97	127836			37,45	322757
	37,99	71071			37,31	306041
	37,91	5523				
AZD B	40,99	8613			40,40	37106
	40,63	15609			40,21	40286
	40,47	13020			40,09	58616
	40,25	6172			39,96	49179
	40,15	5883			39,76	52221

Los datos en gris corresponden a los datos de la matriz con que se realizó el resto de los ensayos.

Si bien existen picos de interferencia que podrían alterar los resultados, no existe interferencia sobre AZD B, la interferencia sobre AZD A no es significativa y la interferencias sobre CBZ fue restada para el análisis de los datos pues CBZ posee la misma concentración en todas las muestras y se tiene el valor del peak de CBZ solo.

Los resultados para el cálculo de la recuperación son (Tabla 6):

Tabla 6: Cálculo del porcentaje de recuperación.

	CONC. 1			CONC 3			CONC 6		
	100%	Extracción	% Recup.	100%	Extracción	% Recup.	100%	Extracción	% Recup.
CBZ (UA)	342106,00	261859,00	77%	312483,33	315042,50	101%	375750,00	397168,00	106%
AZD A (UA)	252562,33	279684,80	111%	1120238,67	1254684,00	112%	9584700,33	10159819,00	106%
AZD B (UA)	22137,33	47481,60	214%	329017,00	373396,00	113%	3010995,00	3169158,50	105%



Al evaluar la relación concentración respuesta se encontraron los siguientes resultados (Tabla 7):

Tabla 7: Áreas curva de calibración y puntos control.

		Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6
CBZ	CC (UA)	217798	246065	183855	216341	233133	266181
	Control (UA)	192639	214533	252300	252461	161146	306589
	Control (UA)	190321	203368	222468	268371	213990	269007
	Promedio	200252,67	221322,00	219541,00	245724,33	202756,33	280592,33
	Des. Est.	15238,84	22143,31	34316,25	26661,16	37285,10	22558,07
	C.V.	7,61%	10,01%	15,63%	10,85%	18,39%	8,04%
AZD A	CC (UA)	188297	461329	720489	1721911	3443271	6454697
	Control (UA)	169913	397144	1008313	2051454	2110826	7575484
	Control (UA)	154375	430353	901880	2159630	2723337	6908272
	Promedio	170861,67	429608,67	876894,00	1977665,00	2759144,67	6979484,33
	Des. Est.	16980,89	32098,97	145529,68	227998,01	666943,82	563776,79
	C.V.	9,94%	7,47%	16,60%	11,53%	24,17%	8,08%
AZD B	CC (UA)	18979	104952	199175	573835	1157254	2105980
	Control (UA)	12863	89760	329305	681037	698896	2461488
	Control (UA)	12662	107445	243318	720045	898134	2247768
	Promedio	14834,67	100719,00	257266,00	658305,67	918094,67	2271745,33
	Des. Est.	3590,50	9572,28	66176,77	75709,16	229830,01	178962,76
	C.V.	24,20%	9,50%	25,72%	11,50%	25,03%	7,88%

Además se decidió evaluar la estabilidad de las muestras en el AutoSampler. Para ello se realizó una extracción de la solución más concentrada, se redisolvió en un volumen mayor y se inyectó un volumen menor, los resultados fueron los siguientes (Tabla 8).

Tabla 8: Áreas extracción concentración 6 diluida.

	Conc. 6 Diluida	
	RT (min)	Area (UA)
CBZ 1	20,21	149449
CBZ 2	19,59	173754
Promedio	19,90	161601,50
Des. Est.	0,44	17186,23
C.V.	2,20%	10,63%

AZD A 1	38,75	4754046
AZD A 2	36,12	5277449
Promedio	37,44	5015747,50
Des. Est.	1,86	370101,81
C.V.	4,97%	7,38%

AZD B 1	41,27	1476316
AZD B 2	38,55	1593962
Promedio	39,91	1535139,00
Des. Est.	1,92	83188,28
C.V.	4,82%	5,42%

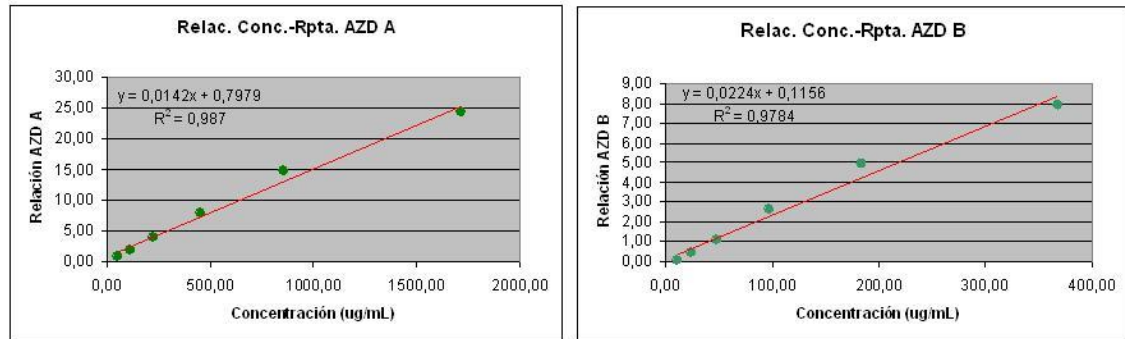
Como se puede apreciar, por el largo tiempo que demora una corrida cromatográfica, las muestras tienden a concentrarse. Además para evitar problemas de manejo de las muestras, sobre todo al momento de rescatar la fase orgánica, se decidió trabajar en función de la relación de áreas (Tabla 9).

Tabla 9 : Relación de áreas curva calibración y puntos control.

		Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6
AZD A	CC	0,86	1,87	3,92	7,96	14,77	24,25
	Control	0,88	1,85	4,00	8,13	13,10	24,71
	Control	0,81	2,12	4,05	8,05	12,73	25,68
	Promedio	0,85	1,95	3,99	8,04	13,53	24,88
	Des. Est.	0,04	0,15	0,07	0,08	1,09	0,73
	C.V.	4,33%	7,53%	1,70%	1,04%	8,04%	2,94%
AZD B	CC	0,09	0,43	1,08	2,65	4,96	7,91
	Control	0,07	0,42	1,31	2,70	4,34	8,03
	Control	0,07	0,53	1,09	2,68	4,20	8,36
	Promedio	0,07	0,46	1,16	2,68	4,50	8,10
	Des. Est.	0,01	0,06	0,13	0,02	0,41	0,23
	C.V.	16,10%	13,38%	10,79%	0,86%	9,08%	2,84%

Luego la curva de calibración fue (Figura 18):

Figura 18: Curva de calibración para AZD A y B.



Para evaluar la precisión y exactitud de la metodología se realizó el análisis de los duplicados de cada punto y la concentración teórica que posee cada muestra al interpolar los datos en la ecuación de la recta que describe la relación concentración-respuesta del equipo (Tabla 10).

Tabla 10: Evaluación de resultados, puntos control.

Azadiractina A						Azadiractina B					
Concentración Real (ug/mL)	Relación de Área	Concentración Calculada (ug/mL)	Promedio (ug/mL)	D.S.	C.V.	Concentración Real (ug/mL)	Relación de Área	Concentración Calculada (ug/mL)	Promedio (ug/mL)	D.S.	C.V.
57,2	0,88	5,9	3,4	3,5	102,99%	12,3	0,07	-2,2	-2,2	0,0	-0,35%
57,2	0,81	0,9				12,3	0,07	0,07			
114,3	1,85	74,2	83,5	13,2	15,8%	24,5	0,42	13,5	16,0	3,5	21,73%
114,3	2,12	92,8				24,5	0,53	18,4			
228,7	4,00	225,3	227,3	2,9	1,3%	49,0	1,31	53,1	48,4	6,7	13,80%
228,7	4,05	229,3				49,0	1,09	43,7			
457,3	8,13	516,1	513,3	3,9	0,8%	98,0	2,70	115,3	114,9	0,5	0,40%
457,3	8,05	510,5				98,0	2,68	114,6			
857,5	13,10	866,3	853,2	18,5	2,2%	183,8	4,34	188,5	185,3	4,4	2,38%
857,5	12,73	840,0				183,8	4,20	182,2			
1715,1	24,71	1683,9	1718,1	48,4	2,8%	367,5	8,03	353,3	360,6	10,3	2,86%
1715,1	25,68	1752,3				367,5	8,36	367,9			

Luego se procedió a la evaluación del error de interpolación en la curva de calibración (Tabla 11).

Tabla 11: Evaluación del error en la interpolación de datos en la curva de calibración.

AZD A						
Real (ug/mL)	57,2	114,3	228,7	457,3	857,5	1715,1
Teórico (ug/mL)	5,9	74,2	225,3	504,3	866,3	1683,9
	0,9	92,8	229,3	510,5	840,0	1752,3
Error	-89,64%	-35,13%	-1,50%	10,27%	1,02%	-1,82%
	-98,37%	-18,81%	0,27%	11,62%	-2,04%	2,17%
AZD B						
Real (ug/mL)	12,3	24,5	183,8	98,0	183,8	367,5
Teórico (ug/mL)	-2,2	13,5	53,1	115,3	188,5	353,3
	-2,2	18,4	43,7	114,6	182,2	367,9
Error	-117,79%	-44,83%	-71,10%	17,62%	2,56%	-3,88%
	-117,88%	-24,80%	-76,24%	16,95%	-0,84%	0,10%

Finalmente los cromatogramas para carne blanco, carne zero, extracción de concentración 57  $\mu\text{g/mL}$ , extracción de concentración 228  $\mu\text{g/mL}$  y extracción 1715  $\mu\text{g/mL}$  serian (Figuras 19, 20, 21, 22 y 23):

Figura 19: Cromatograma carne blanco.

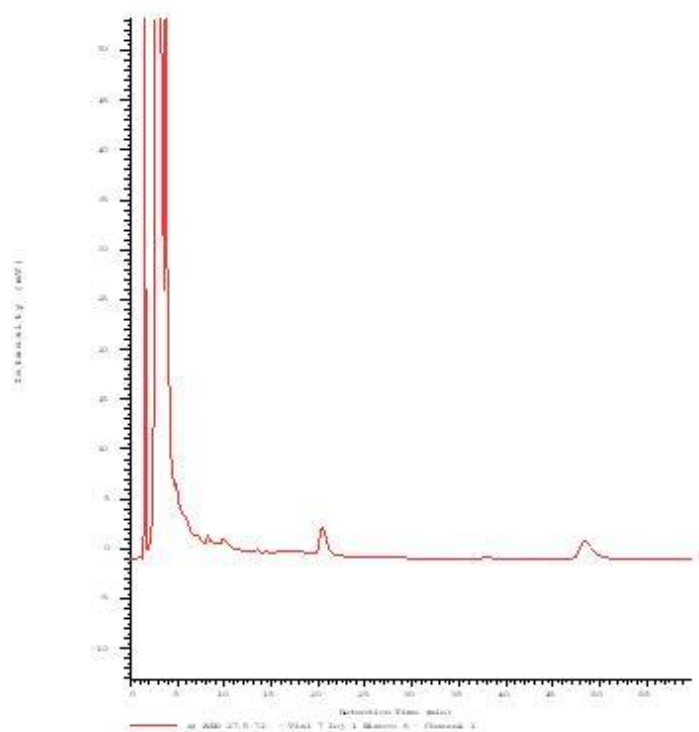


Figura 20: Cromatograma carne cero.

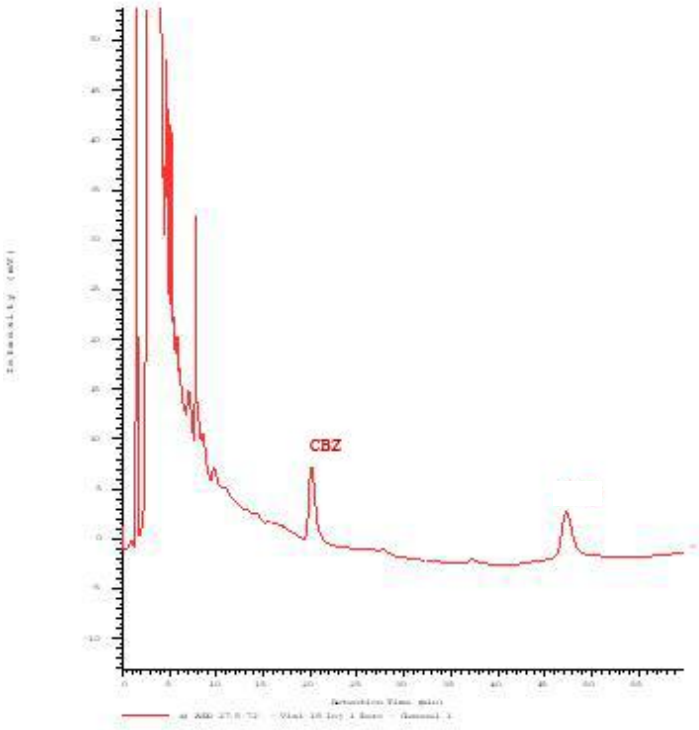


Figura 21: Cromatograma extracción CONC. 1

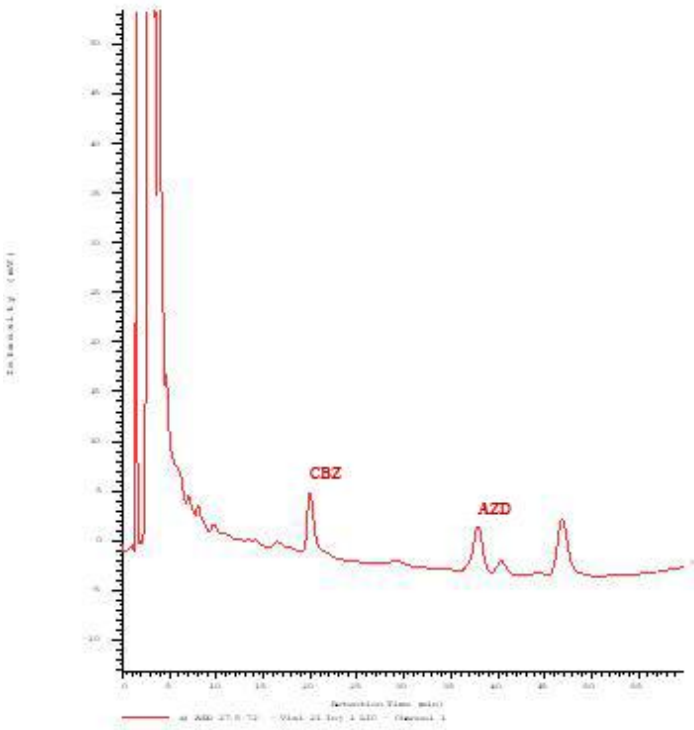


Figura 22: Cromatograma extracción CONC. 3.

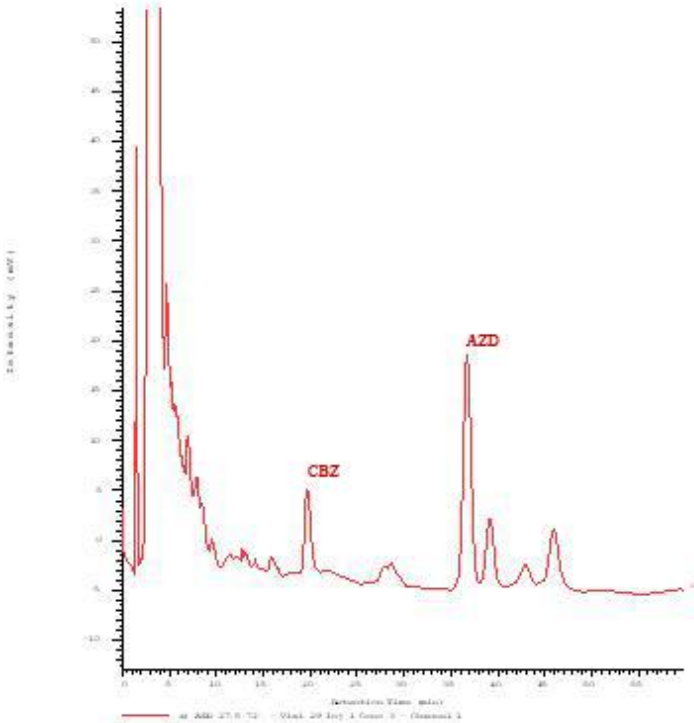
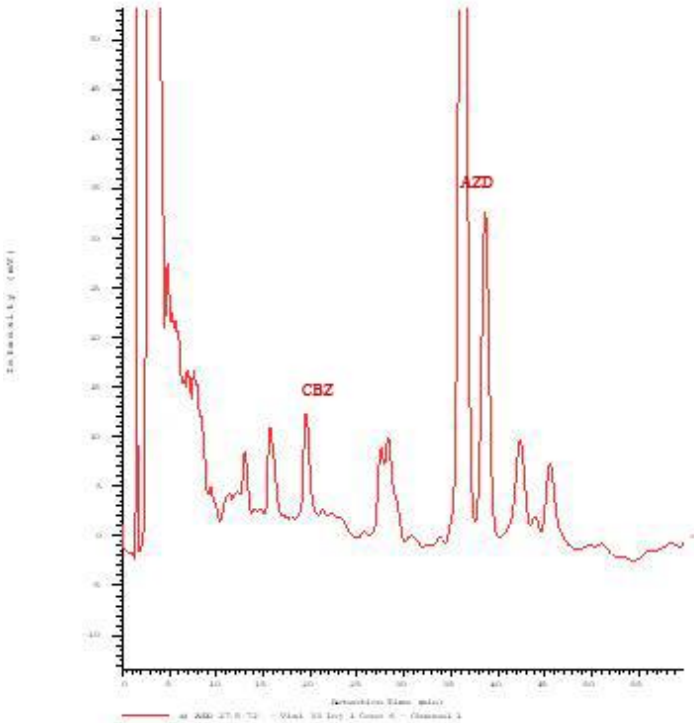




Figura 23: Cromatograma extracción CONC. 6.



## Conclusiones.

### **Metodología analítica.**

Durante este estudio se desarrolló una técnica analítica que permite identificar y cuantificar azadiractina en músculo de vacuno de manera precisa y exacta.

Se determinó que existen tres puntos que son críticos para esta metodología: la polaridad de la fase móvil, la temperatura de trabajo y la longitud de onda de detección, siendo este último punto el menos relevante de los tres.

La polaridad de la fase móvil es muy importante en esta metodología, pues el analito es muy sensible a los cambios de polaridad de ésta. Una pequeña variación en la proporción de acetonitrilo en la fase móvil genera grandes cambios en los tiempos de retención de los analitos (AZD A y B).

Trabajar a una temperatura de 45° C es fundamental para esta técnica, pues es a esta temperatura que se logra una separación satisfactoria de los picos de AZD A y B. No obstante, se debe tener presente que al aumentar la cantidad de AZD inyectada al HPLC, aumentan las áreas y las bases de ambos picos por lo que, se disminuye la separación de éstos.

La longitud de onda también es importante pues al aumentarla, disminuyen las áreas de los picos de los analitos.

También se estableció que el pH de la fase móvil y la fuerza iónica de ésta no son parámetros determinantes para la técnica analítica. Si bien esto era lo esperable, por las propiedades fisicoquímicas de los analitos, se debía asegurar que fuera así.

Este conocimiento permite realizar modificaciones al pH y fuerza iónica de la fase móvil para eliminar picos de interferencia del cromatograma, sin alterar la señal de los analitos.

### **Metodología de extracción.**

En este estudio se desarrolló una técnica de extracción que permite recuperar el  $100,5 \pm 0.1\%$  de azadiractina desde músculo de vacuno.

Cuando se realizaron las pruebas de extracción sobre la solución stock, se tenía por finalidad caracterizar el comportamiento de los analitos frente a diferentes pH y establecer si los cartuchos OASIS<sup>®</sup> HLB<sup>®</sup> prestaban alguna utilidad para purificar la muestra.

Se estableció que variar el pH de la solución acuosa no presentaba ventajas comparativas durante el proceso de extracción. Si bien esto era lo esperado, por la característica ácido – base neutra del analito, debía ser confirmado para una eventual aplicación práctica tendiente a eliminar interferentes.

La purificación en fase sólida es viable para las extracciones desde una solución stock pero no para extracciones desde la matriz biológica, pues obstruye los cartuchos impidiendo la elusión de las muestras.

Al realizar los ensayos con la matriz biológica, se encontraron algunos puntos interesantes:

- La muestra no debe ser trabajada en tubos de polipropileno pues el analito se adsorbe sobre este material.
- Las jeringas, Swinnex<sup>®</sup> y puntas de micropipetas no adsorben el analito.
- Al trabajar la muestra en tubos de vidrio se debe agitar la muestra con Ultraturax<sup>®</sup> para realizar la extracción y así evitar poner en contacto el solvente de extracción con los sellos de las tapas rosca de los tubos, pues contaminan la muestra.
- Las puntas de las micropipetas, jeringas, Swinnex<sup>®</sup>, filtros 1PS y solventes de extracción, homogenización y disolución, no ceden interferentes.

- Al trabajar con DCM se obtienen cromatogramas con menos interferencias que al trabajar con cloroformo.
- Utilizar una solución saturada de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> no presenta ventajas comparativas a trabajar con agua bidestilada como solvente de homogenización.

Al ensayar una curva de calibración se encontró:

- Las muestras blanco no presentan picos de gran interferencia en la zona del estándar interno.
- Algunas muestras de carne blanco, provenientes de diferentes supermercados y carnicerías, presentan picos de interferencia importante en la zona de AZD A. Esto podría indicar que el ganado está siendo suplementado con AZD.
- Ninguna muestra blanco exhibe picos en la zona de AZD B.
- Se logra trabajar con precisión y exactitud a concentraciones superiores a 228 µg/mL de AZD A y 98 µg/mL de AZD B. A esas mismas concentraciones se obtiene un bajo error de interpolación de resultados. Es por ello que este punto se establece como límite inferior de cuantificación.
- Al evaluar la eficiencia del proceso de extracción, los valores de porcentaje de extracción en la concentración más baja (57,2 µg/mL de AZD A y 12,3 µg/mL de AZD B), son superiores al 100%. Estos resultados se explican por estar trabajando a una concentración situada bajo el límite de cuantificación. Como a esta concentración se puede determinar la presencia de AZD A y B en la muestra, se establece como el límite de detección.
- Las muestras a inyectar, por encontrarse disueltas en MeOH: H<sub>2</sub>O (90:10), tienden a concentrarse. Es por esto y por los errores de manipulación al rescatar la fase orgánica, que se debe trabajar en función de la relación de áreas.

$$RA = \frac{\text{Área analito}}{\text{Área estándar interno}}$$

- La respuesta del equipo a las concentraciones ensayadas es lineal tanto para AZD A como para AZD B.

Es importante señalar que aún no está clara la dosis de extracto de *Azadirachta indica* que se administrará al ganado bovino, la cantidad de AZD que se encontrará en el tejido muscular de los vacunos, ni el límite máximo de residuos que se fijará para este quimioterápico.

La técnica de extracción y analítica desarrollada en el transcurso de esta memoria es una metodología validable y fue desarrollada pensando en un posible cambio de equipo de detección.

Una vez que se establezca la dosis de extracto a ser administrada, se podrá evaluar la viabilidad de la técnica aquí expuesta, para realizar la cuantificación de AZD A y B en músculo de vacuno, para realizar los ajustes necesarios y someterla a la validación definitiva.

## Bibliografía.

CAMBRIDGESOFT Corporation. The Merck Index CD. 13<sup>th</sup> ed. Whitehouse station. New Jersey. USA. 2002.

FARRIES, John. A study on the effect of neem oil extract to control external cattle parasite. Agriculture and natural resources series. VSO working papers in development. 1996.

FORTUNE BIO-TECH LIMITED<sup>®</sup> (India) Documento técnico emitido de polvo de semillas de Lilia india. 2005

GAABOUB, Ibrahim and HAYES, Dora K. Effect of larval treatment with azadirachtin, a molting inhibitory component of the neem tree, on reproductive capacity of the face fly, *Musca autumnalis* De Geer (Diptera: Muscidae). Environmental Entomology 13(6): 1639-1643. 1984.

GOVINDACHARI, T.R. Five decades in the study of natural products. Proc. Indian Acad. Sci. 114 (3): 175–195. 2002.

MILLER, J. Allen and CHAMBERLAIN, William F. azadirachtin as a larvicide against the horn fly, stable fly, and horse fly (Diptera: Muscidae). J. Economic Entomology 82 (5): 1375-1378. 1989.

RUIZ, A., et al. ALGIN<sup>®</sup> un bioinsecticida de origen vegetal, biodegradable, compatible con el medio ambiente y los enemigos naturales de las plagas. Agricultura ecológica y desarrollo rural, II congreso de la sociedad española de agricultura ecológica. 211-224. 1996.