

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***DETERMINACIÓN DE COLECALCIFEROL (VITAMINA D₃) EN
PREMEZCLAS NUTRICIONALES DE USO VETERINARIO***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Química por:**

CAMILA IGNACIA GALIANO LAZO

Director de Tesis: Dr. Pablo Richter Duck

Codirectores de Tesis: Dr. Inmaculada Cerrato Ruiz

Lic. Víctor Puentes Araya

Dr. Alejandro Cañas Müller

Santiago-CHILE

Mayo 2024

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por la candidata:

CAMILA IGNACIA GALIANO LAZO

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química.

Director de Tesis:

Dr. Pablo Richter Duck

Co-director de Tesis:

Dra. Inmaculada Cerrato Ruiz

Lic. Víctor Puentes Araya

Dr. Alejandro Cañas Müller

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Tatiana Garrido

Dra. Mónica Antilén

Dra. Claudia Mardones

Para mi abuelo Hermógenes, quien desde siempre me incentivó a tratar de comprender el mundo de la mano del estudio. Espero que desde donde sea que estés, te haga sentir orgulloso.

“Lo que conocemos es una gota, lo que ignoramos es un océano”- Isaac Newton.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera partir agradeciendo al profesor Pablo Richter por brindarme su apoyo, permitirme trabajar en su laboratorio aun siendo una completa desconocida y por considerarme para el desarrollo de este estudio.

A la profesora Inmaculada Cerrato, a quien tuve la fortuna de conocer, por creer en mí, por la confianza depositada sin conocerme, por los consejos, la buena disposición a ayudarme cuando tuve problemas, las enseñanzas y todo el apoyo brindado durante todo este tiempo.

A mis co-directores Víctor y Alejandro, por entregarme todo el conocimiento y guía para poder llevar a cabo satisfactoriamente esta investigación.

A todas las chicas de ambos laboratorios, tanto de Veterquímica (Karen, Fran, Sabina, Cony y Karina) como de Química Ambiental (Vale, Naty y Ale), quienes más de alguna vez me ayudaron cuando tenía dudas y me aconsejaron cuando lo necesité.

A Daniel y a Betsabet, por estar dispuestos a dedicar parte de su tiempo para escuchar mis ensayos y brindarme sus consejos respecto a cómo podría mejorarlos. También a Felipe Miranda, quien se tomó el tiempo de traspasarme sus conocimientos sobre la técnica de extracción para que yo pudiera realizar mi trabajo. A la profesora Inés, que fue la que me introdujo en el laboratorio de Química Ambiental, y me aconsejó desde su experiencia cuál era el mejor camino a seguir para poder realizar lo que me gusta.

A mi comisión evaluadora, las profesoras Tatiana Garrido, Claudia Mardones y Mónica Antilén, por sus consejos y recomendaciones para mejorar la investigación.

A la empresa Veterquímica, por el financiamiento y el apoyo económico para llevar a cabo el desarrollo de esta tesis y abrir sus puertas para permitirme usar toda su infraestructura. A todo el personal que trabajaba en ella, quienes siempre fueron muy amables. Un especial agradecimiento a Don Samuel, por la confianza y los consejos brindados, una gran persona.

A mis padres Danilo y Gloria, quienes siempre se esforzaron para que yo pudiera estudiar, pese a todas las adversidades que tuvieron que superar, inculcándome desde muy pequeña el amor por los libros y la importancia de estudiar. A mi Tutocatuto que siempre esperó verme terminar mis estudios superiores, y sé lo orgulloso que está de mí.

A mi hermano Matías, que siempre ha confiado y creído en mí. A mi tata Luis, mi abuela Carmen y, desde donde quiera que esté, a mi abuelo Hermógenes, que a su manera han estado presente dándome ánimo para lograr mis metas. También a todos los amigos que han estado presente a lo largo de los años para brindar palabras de aliento y consejos cuando fue necesario, en especial a mi Julián, que siempre, siempre, siempre, me demuestra su admiración, cariño y apoyo.

A mis tres amores chiquitos, mis sobrinos Vicente, Trinidad y Alba, que, sin saberlo ni pensarlo, han sido una de las mayores motivaciones para seguir con mis estudios, siendo una parte fundamental de lo que me empuja a terminar este trabajo.

A mis tres grandes amores y los motores de mi vida. Mis dos bebés pequeñitos: Mercury y Callio, que día a día me vuelven loca, me hacen reír y enojar, me dan fuerzas y me motivan a luchar contra todo pronóstico para poder darles todo lo que merecen. Y a Mirko, mi esposo, compañero y amigo, por apoyarme y creer más en mí que yo misma, por alentarme a seguir cada vez que quise bajar los brazos, por entenderme y ayudarme cada vez que lo necesité, por convencerme de que sí me la puedo, y que la valentía le gana al miedo, por jugar a ganador conmigo y estar dispuesto a aprender química, escuchando constantemente mis ensayos y, por último, por permitirme transitar juntos este camino de triunfos y no tantas derrotas. Espero algún día poder retribuir todo el apoyo que me das, con moras.

Finalmente, quisiera agradecer a cualquier persona que he olvidado mencionar y que ha sido parte importante en mi vida, y que crea que merece estar presente acá.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Antecedentes generales	1
1.1.1	Colecalciferol (Vitamina D3).....	3
1.2.	Antecedentes específicos	5
1.2.1	Dispersión de matriz en fase sólida (MSPD)	8
1.2.2	Fases sorbentes naturales: corcho.....	10
1.2.3	Matriz en estudio: Premezcla nutricional	13
1.2.4	Muestreo	14
1.2.5	Verdor de la metodología: AGREEprep	14
2.	HIPÓTESIS	17
3.	OBJETIVOS	18
3.1.	Objetivo general	18
3.2.	Objetivos específicos	18
4.	MATERIALES Y METODOLOGÍA	19
4.1.	Materiales	19
4.2.	Reactivos	19
4.3.	Equipos de laboratorio	20
4.4.	Metodología	20
4.4.1	Muestras.....	20
4.4.2	Preparación de la fase sorbente natural.....	21
4.4.3	Preparación de estándar y optimización cromatográfica	23
4.4.4	Preparación de muestra	23
4.4.5	Validación del método analítico	26
4.4.5.1	Linealidad: Curva de estándares.....	26
4.4.5.2	Linealidad: Curva en matriz	27
4.4.5.3	Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)	27
4.4.5.4	Precisión	28
4.4.5.5	Exactitud	28
4.4.6	Evaluación del verdor de la metodología	28

4.4.7	Metodología alternativa	29
4.4.8	Validación metodología alternativa	30
4.4.8.1	Linealidad: Curva de estándares.....	31
4.4.8.2	Precisión	31
4.4.8.3	Exactitud	31
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
5.1.	Implementar y optimizar la separación por HPLC del analito en matriz.	32
5.2.	Optimizar los factores que afectan la extracción, empleando la técnica de extracción de dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), estudiando el efecto del tamaño de partícula de la fase sorbente (corcho) y la composición del eluyente para la extracción de colecalciferol desde premezclas nutricionales.....	37
5.2.1	Etapas de limpieza.....	37
5.2.2	Extracción del analito	41
5.2.3	Elución del analito.....	43
5.3.	Validar la metodología según los criterios de la VICH.	47
5.3.1	Linealidad: Curva de estándares.....	47
5.3.2	Linealidad: Curva en matriz	48
5.3.3	Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)	51
5.3.4	Precisión	52
5.3.5	Exactitud	55
5.4.	Realizar estudios de dispersión de distintas premezclas nutricionales de Veterquímica S.A. 57	
5.5.	Evaluar la factibilidad de aplicar la metodología en otras matrices como alimentos completos de uso animal, con intervalos concentración menor de vitamina D3 a niveles de $\mu\text{g}/\text{kg}$. 59	
5.6.	Evaluación del veredor de la metodología.	59
5.7.	Metodología alternativa para matrices sencillas.....	66
5.8.	Validación de la metodología alternativa.....	68
5.8.1	Linealidad: Curva de estándares.....	68
5.8.2	Precisión	69
5.8.3	Exactitud	72
6.	CONCLUSIONES	75
7.	BIBLIOGRAFÍA	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura química del ergocalciferol (Vitamina <i>D2</i>) y del colecalciferol (Vitamina <i>D3</i>).	2
Figura 2 Resumen esquemático de la síntesis de colecalciferol (<i>VD3</i>) a partir de su provitamina (7-DHC). (Adaptado de Cholecalciferol: Properties and Determination por A.K. Hewavitharana, F.P. Gomes (2016)).	3
Figura 3 Estructuras químicas de los principales metabolitos de la vitamina <i>D3</i>	4
Figura 4 Resumen esquemático de los 12 principios postulados por la química verde con el fin de evitar la contaminación ambiental y proteger la salud de las personas.	7
Figura 5 Resumen esquemático de las etapas principales para llevar a cabo la extracción MSPD, que se basa en mezclar la muestra con una fase sorbente en un mortero, para luego eluir el analito con un disolvente adecuado	9
Figura 6 Árbol de Alcornoque (<i>Quercus Surber L.</i>) al cual se le está removiendo la corteza exterior, corcho.	11
Figura 7 Micrografía SEM de células de corcho, donde se puede observar las celdas que lo componen [38].	11
Figura 8 Estructuras químicas de las macromoléculas suberina (a) y lignina (b), correspondientes a los principales componentes del corcho.	12
Figura 9 Premezcla nutricional de perro adulto, todas las muestras son proporcionadas por la empresa Veterquímica.	13
Figura 10 Resultado obtenido para la evaluación en un protocolo de análisis en línea basado en MEPS después de aplicar ponderaciones determinadas según un escenario específico [42].	16
Figura 11 Muestras otorgadas por Veterquímica en las que se quiere determinar el contenido de colecalciferol, a) corresponde a la materia prima, b) corresponde a un núcleo, c) corresponde a la premezcla nutricional y d) corresponde al alimento completo.	21
Figura 12 Resumen esquemático del procedimiento inicial seguido para la preparación de la fase sorbente. Como se puede ver en la figura, se obtienen 4 fracciones de diferentes tamaños de partícula de corcho	22
Figura 13 Equipos utilizados para realizar el segundo proceso de molienda y tamizado de la fracción que contenía la mayor cantidad de corcho. Para moler el corcho se utilizó un molino manual como se muestra en la imagen de la izquierda. El tamizado se realizó con una tamizadora eléctrica como se observa en la imagen del centro.	22
Figura 14 Resumen de los pasos llevados a cabo para el procedimiento de limpieza de la matriz.	24
Figura 15 Resumen esquemático del procedimiento de extracción de colecalciferol desde la premezcla nutricional utilizando corcho como fase sorbente. El corcho es mezclado con la premezcla nutricional en un mortero hasta homogeneizar, luego se somete a eluciones secuenciales dentro de una jeringa montada en sistema colector SPE.	25
Figura 16 Esquema del procedimiento de reconstitución e identificación del analito.	26

Figura 17 Procedimiento realizado para la extracción de colecalciferol desde matrices sencillas. Se llevó a cabo una técnica de extracción asistida por ultrasonido utilizando una mezcla de EtOH-i-PrOH para la extracción de la vitamina desde muestras de materia prima.....	30
Figura 18 Cromatogramas obtenidos para la separación de colecalciferol en muestras de estándar y en una premezcla nutricional utilizando las composiciones de fase móvil señaladas para las pruebas 3 y 8. A) corresponde al cromatograma de un estándar de colecalciferol utilizando la composición de fase móvil de la prueba 8, B) corresponde al cromatograma de un estándar de colecalciferol y ergocalciferol obtenido al utilizar una composición de fase móvil de la prueba 3, C) corresponde al cromatograma obtenido para una premezcla nutricional al utilizar la composición de fase móvil de la prueba 8.	35
Figura 19 Cromatograma obtenido para una premezcla nutricional al utilizar la composición de fase móvil de la prueba 8.	36
Figura 20 Se observa la estructura de una jeringa típica, se muestra la estructura luego de cambiar la aguja por un filtro PVDF, y el colapso del filtro producto de los componentes de la premezcla que impiden la correcta elución hacia el sistema colector.	38
Figura 21 Lavados evaluados con el fin de eliminar parte de los componentes interferentes solubles presentes en la premezcla nutricional.	39
Figura 22 Resultados obtenidos del estudio de la distribución de los tamaños de las fracciones tamizadas de corcho. La mayor cantidad de corcho se centra en los tamaños >30 mesh >60 mesh.	42
Figura 23 Componentes para realizar la extracción del analito, se utilizó 100 mg de corcho delgado, 50 mg de Na_2SO_4 y la muestra previamente liofilizada.	43
Figura 24 A) Composición inicial de la jeringa, que consistía en el cilindro de la jeringa provisto de un filtro PVDF de 0,22 μ m. B) Elementos adicionados a la composición inicial, en el caso del filtro de 0,22 μ m, se reemplazó por un filtro de 0,45 μ m, se adicionó a la composición inicial una capa de lana de vidrio y 100 mg de corcho grueso. C) Composición final de la jeringa luego de los cambios realizados en esta etapa.	44
Figura 25 Cromatogramas obtenidos al realizar la elución con diferentes disolventes. A) Resultado para la elución con isopropanol. B) Resultado para la elución con etanol. C) Resultado para la elución con metanol. D) Resultado para la elución con acetona.	45
Figura 26 Cromatogramas obtenidos al realizar la elución con las mezclas de los disolventes. A) Resultado para la elución con una mezcla de EtOH-acetona. B) Resultado para la elución con una mezcla de EtOH-MeOH a 35°C C) Resultado para la elución con una mezcla de EtOH-ACN. D) Resultado para la elución con una mezcla de MeOH-ACN. E) Resultado para la elución con una mezcla de EtOH-MeOH a una temperatura de 45°C	46
Figura 27 Gráfico que muestra el área obtenida en función de la concentración de los estándares de colecalciferol, para evaluar la linealidad de éste en el rango que va desde los 15,8 UI/mL hasta los 94,6 UI/mL.	47
Figura 28 Gráfico que muestra el área obtenida en función de la concentración de distintos blancos de matriz fortificados con una alícuota de estándar de colecalciferol, para evaluar la linealidad en curva en matriz a distintas concentraciones en un rango que va desde los 15,8 UI/mL hasta los 126.1 UI/mL.	48

Figura 29 Gráfico de dispersión de las variables normalizadas para la curva en matriz (A), junto con sus respectivas métricas de evaluación (B).	49
Figura 30 Gráfico de dispersión de las variables normalizadas para la curva estándar (A), junto con sus respectivas métricas de evaluación (B).	50
Figura 31 Resultado obtenido para la evaluación del verdor de la metodología desarrollada en el presente estudio.	62
Figura 32 Procedimiento que describieron Bilodeau y colaboradores para determinar colecalciferol en muestras de pescado. (Adapatado de Determination of vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in foodstuffs by HPLC UV-DAD and LC-MS/MS (2011) [49])......	63
Figura 33 Resultado obtenido para la evaluación del verdor de la metodología que se ha descrito comúnmente en la bibliografía.	65
Figura 34 Cromatograma obtenido para una muestra de materia prima analizada con el procedimiento seleccionado para esta matriz.	68
Figura 35 Gráfico que muestra el área obtenida en función de la concentración de los estándares de colecalciferol, para evaluar la linealidad de éste en el rango que va desde los 71,2 UI/mL hasta los 356,0 UI/mL.	69
Figura 36 Cromatogramas obtenidos para una muestra blanco del núcleo (figura a la izquierda) y para un blanco con adición del estándar (figura de la derecha).....	71
Figura 37 Cromatogramas obtenidos para una muestra de núcleo (figura superior) y para un fortificado (figura inferior).	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I Propiedades fisicoquímicas del colecalciferol.	4
Tabla II Criterios de evaluación que considera la herramienta AGREEprep para evaluar el veredor de las metodologías.	16
Tabla III Composición de las diferentes fases móviles probadas para llevar a cabo la separación del analito.	33
Tabla IV Condiciones cromatográficas seleccionadas para llevar a cabo la separación del analito.	36
Tabla V Parámetros obtenidos de la regresión lineal de la curva en matriz.	52
Tabla VI Resultados obtenidos para la repetibilidad al determinar la concentración experimental de la muestra utilizando la curva estándar.	52
Tabla VII Resultados obtenidos para la repetibilidad al determinar la concentración experimental de la muestra utilizando la curva en matriz.	53
Tabla VIII Resultados obtenidos para el estudio de la precisión intermedia al determinar la concentración experimental de la muestra a partir de la curva en matriz.	54
Tabla IX Resultados obtenidos para la evaluación de la exactitud expresada en un % de recuperación.	55
Tabla X Parámetros descritos por la guía VICH para la validación de metodologías analíticas. ...	56
Tabla XI Resultados obtenidos para la evaluación de la homogeneidad de un lote correspondiente a una premezcla nutricional de perro cachorro (L:119668).	57
Tabla XII Resultados obtenidos para la evaluación de la homogeneidad de un lote correspondiente a un núcleo nutricional (L:111451).	57
Tabla XIII Resultados obtenidos para la evaluación de la homogeneidad de un lote de una premezcla nutricional correspondiente a un perro cachorro.	58
Tabla XIV Materiales, reactivos y disolventes necesarios para la preparación de una muestra de premezcla nutricional de perro cachorro	60
Tabla XV Ranking general de los solventes propuesto por Vatanpour y colaboradores en el año 2022.	64
Tabla XVI Resultados obtenidos de los procedimientos evaluados para extraer colecalciferol en muestras sencillas.	67
Tabla XVII Resultados obtenidos para el parámetro de precisión en términos de repetibilidad, al determinar la concentración experimental de muestras de núcleo nutricional.	70
Tabla XVIII Resultados obtenidos para la precisión en términos de repetibilidad, al determinar la concentración experimental de muestras de núcleo nutricional fortificado.	70
Tabla XIX Resultados obtenidos para la evaluación de la exactitud a tres niveles diferentes expresada en un % de recuperación para muestras de núcleo nutricional.	73
Tabla XX Resultados obtenidos para la evaluación de la exactitud a tres niveles diferentes expresada en un % de recuperación para las muestras de fortificados de núcleo nutricional.	73

GLOSARIO

<i>VD₃</i>	Colecalciferol (Vitamina <i>D₃</i>)
<i>VD₂</i>	Ergocalciferol (Vitamina <i>D₂</i>)
7-DHC	7-Deshidrocolesterol
MSPD	Dispersión de matriz en fase sólida
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
GC	Cromatografía de gases
MeOH	Metanol
ACN	Acetonitrilo
i-PrOH	Isopropanol
EtOH	Etanol
THF	Tetrahidrofurano
SPE	Extracción en fase sólida
rpm	Revoluciones por minuto
CV%	Coficiente de variación porcentual
GAC	Green Analytical chemistry (Química Analítica Verde)
GSP	Green Sample Preparation (Preparación de Muestras Verde)
LD	Límite de detección
LC	Límite de cuantificación
VICH	International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products. (Cooperación Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de Medicamentos Veterinarios)
UV-DAD	Detector ultravioleta con arreglo de diodos

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes generales

A lo largo de la historia de la humanidad se han reportado casos en donde el déficit de nutrientes ha provocado graves problemas en la salud de las personas. En particular, se tiene el caso de la epidemia del escorbuto, enfermedad causada por el déficit de ácido ascórbico (vitamina C), que tuvo lugar entre los siglos XV a XVIII principalmente en los navegantes de la época; en donde los largos viajes y la dieta carente de ácido ascórbico que debían llevar los marinos, propiciaban que a los pocos meses de iniciados los viajes, padecieran de disnea, hipotermia, epistaxis y hemorragias internas, para finalmente alcanzar la muerte [1]. Por otro lado, durante la época de los griegos, Hipócrates recetaba el consumo de hígado de bacalao (rico en vitamina A y D) para el tratamiento de la ceguera nocturna, problema que padecían los hombres pescadores de aquellos años. Inicialmente se creía que la ceguera era ocasionada por la sobreexposición a la luz solar, más tarde, se descubrió que la causal de este padecimiento era la mala nutrición [2]. Lo anterior, entrega una idea de la importancia que tiene una buena nutrición, junto con la ingesta adecuada de ciertos nutrientes, fundamentales para el correcto funcionamiento del cuerpo, donde se encuentran las vitaminas.

Las vitaminas son un grupo vasto y complejo de compuestos orgánicos, típicamente accesibles a través de la ingesta de alimentos ya que la mayoría de estas no son producidas por el cuerpo humano, pero son esenciales para la buena salud de los organismos vivos [3]. Existen 13 vitaminas esenciales que se pueden clasificar según su solubilidad en hidrosolubles o liposolubles. Dentro de las vitaminas hidrosolubles se encuentra el ácido ascórbico (vitamina C) y el complejo vitamínico B (tiamina (vitamina B_1), riboflavina (vitamina B_2), niacina (vitamina B_3), ácido pantoténico (vitamina B_5), piridoxina (vitamina B_6), biotina (vitamina B_7), ácido fólico (vitamina B_9) y cianocobalamina (vitamina B_{12})), estas vitaminas son utilizadas inmediatamente por el sistema y son eliminadas por el riñón a través de la orina. Las vitaminas liposolubles son retinol (vitamina A), calciferol (vitamina D), tocoferol (vitamina E) y filoquinona (vitamina K), estas son almacenadas por el tejido graso. Cada una de estas vitaminas, cumplen múltiples funciones como cofactores enzimáticos en una gran cantidad de procesos bioquímicos del organismo [4]. Tanto el exceso como el déficit del contenido de estas vitaminas en el cuerpo, está asociado con diversos

problemas de salud, ya que comprometen el sistema inmunológico, dificultan el crecimiento y el normal desarrollo, causando morbilidad y mortalidad en el ser humano [5].

Durante las últimas décadas, el estado nutricional de la vitamina D ha cobrado gran importancia debido a que su deficiencia es altamente prevalente a nivel mundial y, además, por sus conocidos efectos en el metabolismo óseo, participación en la diferenciación y proliferación celular, función muscular, equilibrio, entre otros [6]. La vitamina D, es una molécula lipofílica compleja que pertenece a una familia de pseudoesteroides con actividad biológica similar, que presenta hasta veinticinco formas diferentes. El ergocalciferol (vitamina D_2) y el colecalciferol (vitamina D_3) son las formas principales y más importantes de vitamina D, ambas actúan como prohormonas, con estructuras químicas muy similares que solo difieren en la cadena lateral; siendo el colecalciferol, la forma más común de vitamina D en el cuerpo humano [7].

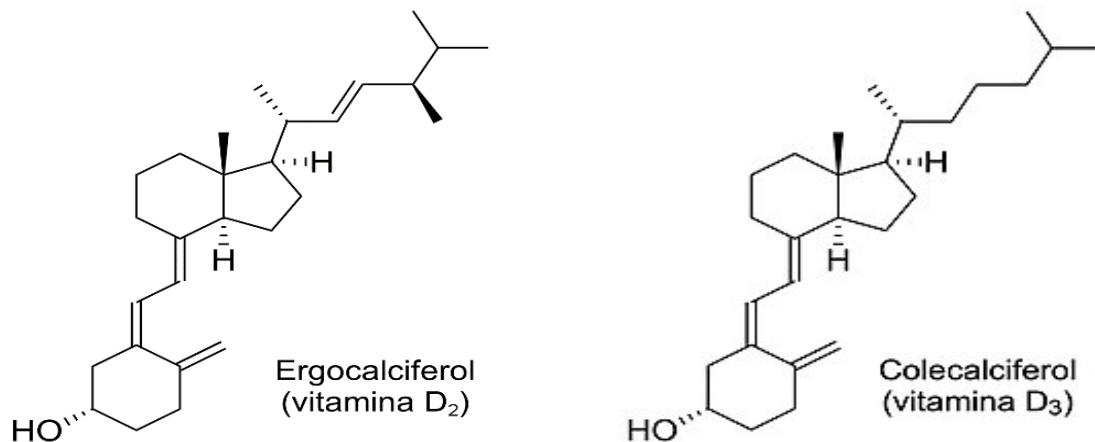


Figura 1 Estructura química del ergocalciferol (Vitamina D_2) y del colecalciferol (Vitamina D_3).

El ergocalciferol o vitamina D_2 (VD_2) denominado químicamente como (9,10-seco(5Z,7E)-5,7,10(19),22-ergostatetraeno-3 β -ol), es una forma vegetal de vitamina D, que se obtiene por la radiación ultravioleta del ergosterol, un esteroide que se encuentra en las plantas y principalmente en hongos. Debido a esto, el cuerpo humano puede obtener vitamina D en forma de VD_2 , mediante la ingesta dietética de plantas y hongos ricos en esta vitamina. Es física, química y nutricionalmente similar al colecalciferol [8], forma de vitamina D en la que se centrará este texto. En la figura 1, se muestran las estructuras químicas de las moléculas de ergocalciferol y colecalciferol, donde se puede observar la similitud entre ambas vitaminas, las que difieren en

virtud de la presencia de un doble enlace en el carbono 22, y un grupo metilo en el carbono 24 de la cadena lateral de la VD_2 .

1.1.1 Colecalciferol (Vitamina D_3)

El colecalciferol o vitamina D_3 (VD_3) denominado químicamente como (9,10-seco(5Z,7E)-5,7,10(19)-colestatrieno-3 β -ol), es conocido comúnmente como una vitamina liposoluble, fundamental para el metabolismo del calcio y fósforo, el correcto crecimiento y el normal desarrollo. El raquitismo es el principal trastorno causado por el déficit de esta vitamina, actualmente también relacionada con muchas otras patologías, tales como la hipertensión, diabetes mellitus, cáncer y otras enfermedades autoinmunes y cardiovasculares [9].

El colecalciferol, es sintetizado principalmente de manera endógena, a partir de la exposición a la luz solar, la que actúa sobre el 7-deshidrocolesterol (provitamina D_3) presente en la piel, iniciando una serie de transformaciones que darán como resultado la formación de vitamina D_3 , como se muestra en la figura 2. A nivel estructural, la irradiación sobre la provitamina D_3 provoca la apertura del anillo B de este esteroide precursor en el enlace 9-10 carbono-carbono, dando paso a la posterior formación de la prohormona seco-esteroide, colecalciferol, la que debido a esta apertura de anillo posee una excepcional actividad antirraquítica [10].

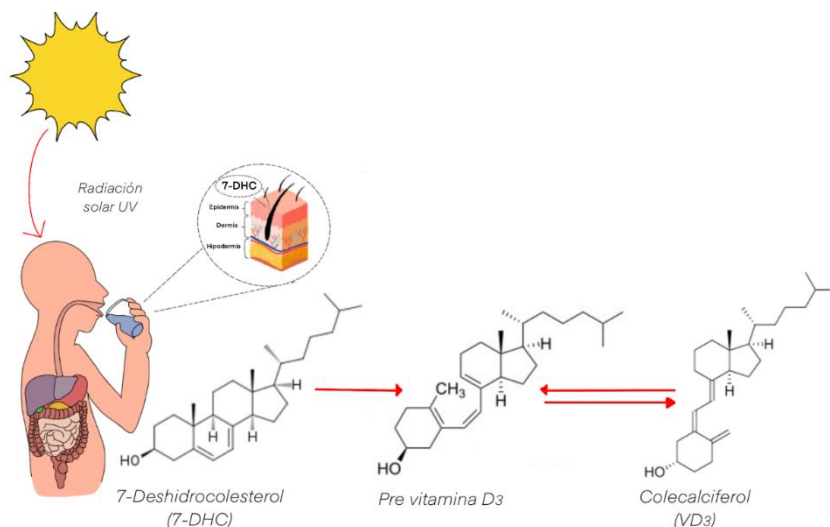


Figura 2 Resumen esquemático de la síntesis de colecalciferol (VD_3) a partir de su provitamina (7-DHC). (Adaptado de *Cholecalciferol: Properties and Determination* por A.K. Hewavitharana, F.P. Gomes (2016)).

El colecalciferol como tal no es biológicamente activo, y se ha demostrado que los importantes efectos biológicos que posee esta vitamina son logrados como consecuencia del metabolismo de la misma, en el hígado y posteriormente en el riñón, dando lugar a la transformación en su forma activa, que actuará en distintos órganos objetivos. Los dos metabolitos principales de esta vitamina son el calcidiol (25-hidroxy vitamina D_3) y el calcitriol (1,25-dihidroxy vitamina D_3) [11]; donde este último metabolito, es la forma biológicamente activa de la vitamina D_3 y el responsable de apoyar la mineralización, afectar el sistema inmunológico y ejercer importantes efectos en la diferenciación y proliferación celular [12]. En la figura 3, se muestran los principales metabolitos de la vitamina D_3 .

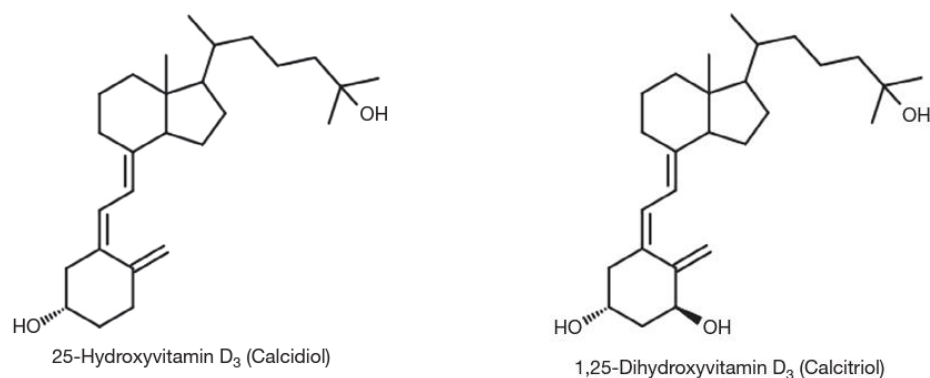


Figura 3 Estructuras químicas de los principales metabolitos de la vitamina D_3 .

La VD_3 es una vitamina insoluble en agua, que debido a su alta lipofilidad, se solubiliza fácilmente en una amplia variedad de disolventes orgánicos, incluidos los alcoholes y los hidrocarburos clorados y no clorados; presenta la apariencia de un polvo cristalino blanco o amarillento, y es fácilmente degradada al exponerse a la luz, al oxígeno o a condiciones ácidas [13]. En la tabla I, se resumen las principales características fisicoquímicas del colecalciferol.

Tabla I Propiedades fisicoquímicas del colecalciferol.

Propiedad	Colecalciferol
Fórmula molecular	$C_{27}H_{44}O$
Peso molecular (<i>g/mol</i>)	384,62
pKa	14,74
Log P	9,085
λ_{max} (nm)	264,5

Así como el déficit causa ciertas enfermedades, también el exceso del consumo de esta vitamina, tienen consecuencias toxicológicas en el organismo, ya que puede provocar complicaciones como la hipercalcemia y calcificaciones metastásicas en las partes blandas [14]. Debido a esto, es sumamente importante un control sobre los niveles del contenido de vitamina D en el cuerpo.

Hasta el momento, se ha hablado de los importantes efectos que tiene el déficit o el exceso del contenido de esta vitamina en el cuerpo humano. En lo que respecta a los animales, la vitamina D, también juega un rol crucial, debido a que los trastornos producto del déficit o el exceso de esta, provocan el mismo impacto, independiente de la especie [15]. Es debido a lo anterior, que tanto en animales de producción, como lo son bovinos, ovinos, aves y cerdos, así como también en animales domésticos como perros y gatos, se utiliza la vitamina como suplemento nutricional junto con otras vitaminas y sales minerales, en premezclas o aditivos que se incorporan en la alimentación del animal [16].

1.2. Antecedentes específicos

La Química Analítica, es una rama importante dentro de la Química, debido a que es la ciencia encargada del estudio de la separación, identificación y determinación de los componentes de una muestra, permitiendo así, un análisis tanto cuantitativo como cualitativo de la misma. El conjunto de procedimientos que se realizan en un análisis químico, desde el muestreo hasta la obtención e interpretación de los resultados, con la finalidad de determinar la composición química de una muestra, comprenden lo que se denomina proceso de medición analítico. Todos los métodos analíticos, están basados en la observación de ciertas propiedades que presentan los elementos o los grupos químicos con los que se pueda deducir el comportamiento que va a presentar la muestra a estudiar [17].

El conocer las propiedades fisicoquímicas de un determinado compuesto, resulta sumamente importante a la hora de elegir un método para realizar el análisis químico de una muestra que contenga nuestro analito de interés. La calidad de los resultados obtenidos va a depender directamente del método escogido para llevar a cabo el análisis, así como también de la preparación de la muestra, proceso que se lleva a cabo previo al análisis del compuesto. Este proceso de preparación de la muestra va a depender del tipo de muestra que se desea analizar, y puede incluir una serie de operaciones de distinta complejidad, cuyo objetivo es disminuir el efecto matriz en la determinación, eliminando la mayor cantidad de interferentes, y así prepararlo de

mejor manera para el instrumento que lo va a medir, proceso que además de la eliminación de interferencias, involucra un aumento en la concentración del analito de interés en una muestra dada. La preparación de muestra es un proceso muy importante dentro de un análisis químico, y el que por lo general conlleva más tiempo, ya que esta etapa comprende todos aquellos procesos que se realizan desde que llega una muestra determinada al laboratorio, hasta justo antes de la etapa de medición (determinación e identificación) del analito. Por lo que una mala preparación, va a conducir indiscutiblemente a errores que no podrán ser subsanados en etapas posteriores e influirá en los resultados obtenidos. La calidad de los resultados obtenidos, se evalúan con una serie de parámetros analíticos (cifras de mérito) que dan cuenta de la validez de estos [18].

Según la literatura, los métodos más utilizados para analizar y aislar vitaminas liposolubles, como el colecalfiferol, consiste en un método de saponificación, seguido de una técnica de extracción con largos tiempos de procesamiento. La mayoría de los extractos para analizar vitaminas liposolubles, se preparan utilizando disolventes orgánicos tóxicos, siendo los más utilizados el éter de petróleo, el éter dietílico y el hexano [19]. Adicionalmente, se ha reportado que el método más común para la determinación y cuantificación del contenido de VD_3 , consiste en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), debido a las ventajas que presenta esta técnica con respecto a otras técnicas usadas para determinar esta vitamina, ya que se adapta de muy buena manera a las necesidades que requiere el análisis de este tipo de sustancias, considerando que es posible realizar el análisis a temperatura ambiente y sin la derivatización del analito de interés [20, 21, 22]. En estudios publicados, se ha probado la determinación de colecalfiferol utilizando cromatografía de gases (GC), pero el procedimiento de preparación de muestra para esta determinación, implica una mayor cantidad de etapas previas al análisis, lo que vuelve el procedimiento más largo y laborioso, generando una mayor cantidad de contaminantes, ya que la determinación por GC implica la derivatización de la vitamina para volatizarla y volverla termoestable, lo que hace esta determinación menos verde en comparación con la determinación mediante HPLC, que sería la técnica más adecuada para este analito [23]. De igual manera, los principales problemas que se han señalado para la determinación del colecalfiferol en matrices complejas como lo son las premezclas nutricionales, matriz en la que se encuentra nuestro analito de interés en este caso particular de estudio, es la existencia de múltiples sustancias que pueden interferir con la correcta determinación de la vitamina, además, se ha informado que su naturaleza lipofílica, da lugar a diversos problemas analíticos en la identificación y cuantificación de ésta [24].

En consecuencia, la principal desventaja de las técnicas actuales comúnmente reportadas para el análisis de las vitaminas, es que requieren el uso de disolventes orgánicos tóxicos y largos tiempos de procesamiento para llevar a cabo la determinación, lo que debido al creciente interés de las últimas décadas por la contaminación ambiental, se traduce en un grave problema en el mundo científico, produciendo la necesidad de desarrollar metodologías más rápidas y ecoeficientes para llevar a cabo el estudio de la muestra, incorporando así, procedimientos analíticos más amigables con el medio ambiente y la salud de los seres vivos, siguiendo los principios otorgados por la química verde [25].

La química verde, surgió en la década de los 90, como resultado de la preocupación por la protección ambiental, y como una manera de combatir la creciente contaminación que estaba siendo provocada por la industria química. Durante esta década, se postularon 12 principios que buscan proteger tanto al medio ambiente como la salud de las personas, reduciendo la contaminación por el uso de sustancias peligrosas, la generación de desechos y previniendo así la contaminación [26], los 12 principios se pueden observar en la figura 4.

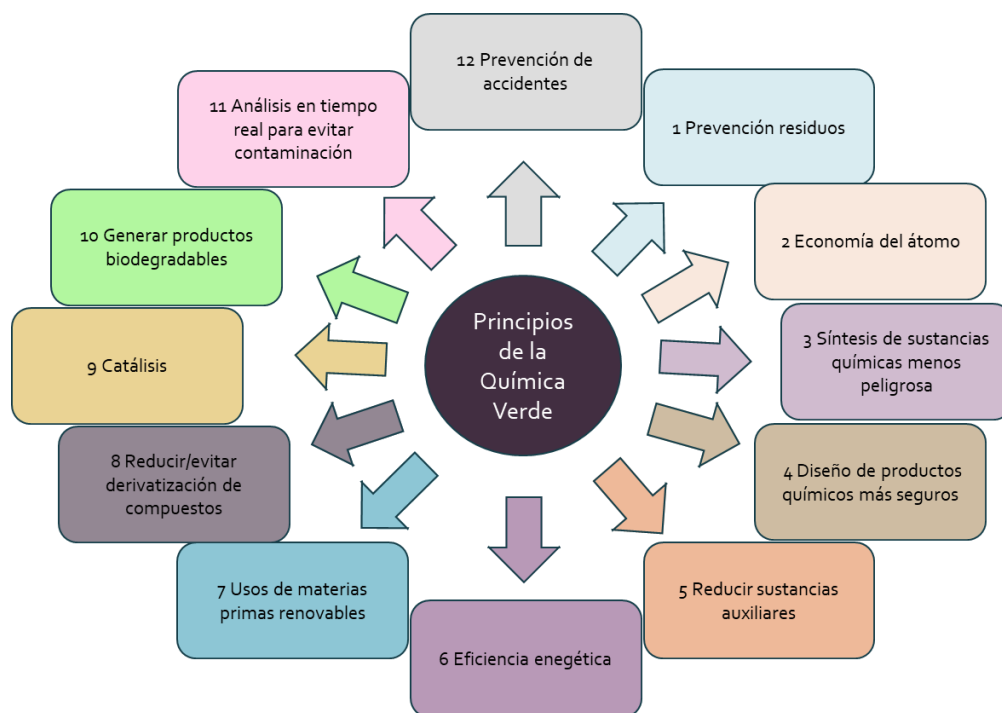


Figura 4 Resumen esquemático de los 12 principios postulados por la química verde con el fin de evitar la contaminación ambiental y proteger la salud de las personas.

Junto con el concepto de química verde, comenzó el desarrollo de técnicas de extracción miniaturizadas, que cumplieran con los principios que la misma proponía. Dentro de estas técnicas se encuentra la técnica de extracción por dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), que es una interesante metodología que puede ser aplicada a una gran variedad de matrices, además cumple con las características de rapidez, eficiencia y bajo impacto ambiental [27].

1.2.1 Dispersión de matriz en fase sólida (MSPD)

El análisis de muestras complejas implica generalmente el uso de técnicas de extracción que sean capaces de conseguir una preparación eficaz de la misma, tales como la extracción líquido-líquido, extracción Soxhlet, el reflujo y la maceración. Estas técnicas también llamadas técnicas convencionales, han sido utilizadas ampliamente a lo largo de los años. Sin embargo, estas presentan una serie de desventajas como el tiempo que se necesita para llevar a cabo el método, la gran cantidad de disolvente que requieren y, a menudo, presentan una reproducibilidad insatisfactoria. Es por esto, que durante el último tiempo la tendencia ha sido el desarrollo de nuevos sistemas de extracción miniaturizados, que cumplan con los principios de la química verde y utilicen pequeña cantidad de disolventes que sean menos tóxicos, durante la etapa de preparación de muestras; motivando así, la aparición de diversas técnicas de microextracción, entre las que se encuentra la dispersión de matriz en fase sólida [28].

La dispersión de matriz en fase sólida es un método de extracción que fue introducido en el año 1989 por Baker et al. Desde su introducción, ha sido utilizada para aislar una amplia gama de compuestos orgánicos como contaminantes o constituyentes naturales, a partir de una amplia variedad de matrices complejas como muestras ambientales, muestras de plantas y de animales [29].

La MSPD, es un método de preparación de muestras que puede ser aplicado directamente en muestras semisólidas, sólidas y viscosas. Una de las principales ventajas que presenta respecto a técnicas convencionales, es que requiere una pequeña cantidad de muestra y de disolvente para llevar a cabo el procedimiento de extracción en algunos simples pasos; motivo por el cual ha despertado el interés de quienes investigan, ya que contribuye a la simplificación del proceso de preparación de muestras, a través de una técnica sencilla, genérica, rápida, rentable, ecológica, adaptable a diversas aplicaciones [30], y en alianza con varios principios de la química verde.

El procedimiento para llevar a cabo la extracción por MSPD, se puede describir en términos generales en los siguientes pasos. En un mortero se realiza la mezcla directa de una fase sorbente adecuada, con la muestra donde esté contenido el analito a extraer. Luego, el material mezclado se transfiere y se empaqueta en una columna, donde se utiliza una secuencia de disolventes apropiados para limpiar la columna o aislar directamente los compuestos de elección, esto se realiza con la ayuda de un sistema de vacío [31]. En la figura 5, se muestra de manera esquemática los pasos para llevar a cabo la extracción según esta metodología.

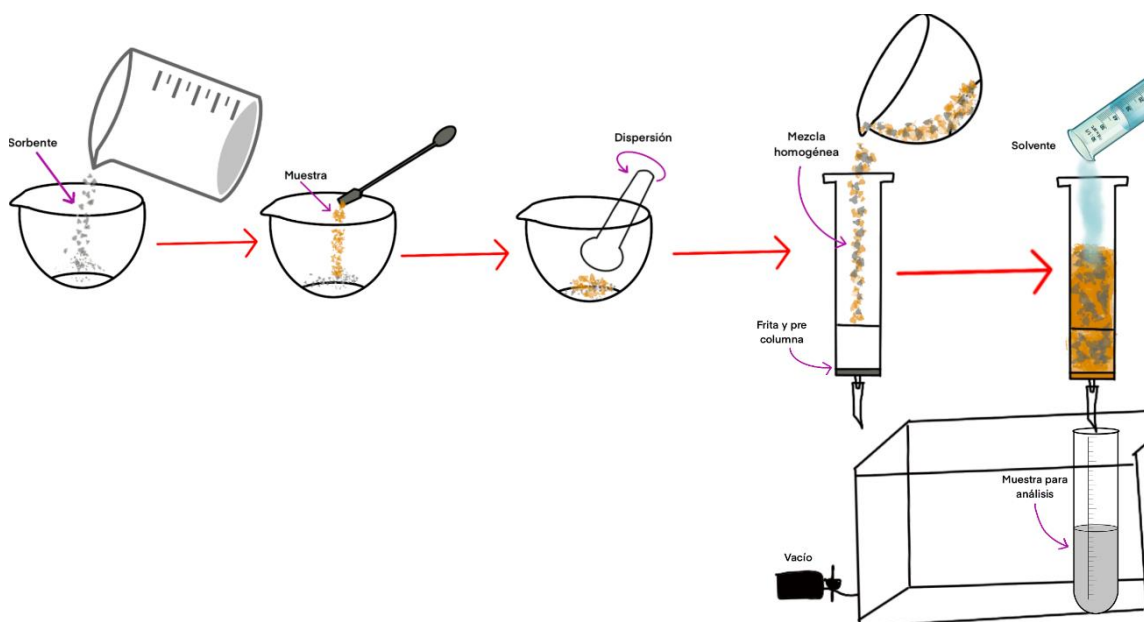


Figura 5 Resumen esquemático de las etapas principales para llevar a cabo la extracción MSPD, que se basa en mezclar la muestra con una fase sorbente en un mortero, para luego eluir el analito con un disolvente adecuado

Otra gran ventaja que presenta la extracción MSPD, es la gran variedad de fases sorbentes entre las que se puede elegir, ya que se trata de una técnica sumamente adaptable a las necesidades del analito que se quiera estudiar. Durante los últimos 20 años, la creciente demanda de introducir métodos analíticos fiables, eficientes y de alto rendimiento, ha provocado un aumento exponencial del uso de materiales de extracción sintéticos en el sector industrial, cuyos materiales son fundamentales para poder aislar y cuantificar analitos tanto orgánicos como inorgánicos de diferentes matrices complejas [32]. Sin embargo, muchas de las fases sintéticas utilizadas no son capaces de extraer una amplia gama de analitos de una manera eficiente de ciertas matrices, lo que ha causado graves problemas en la obtención de resultados confiables en el estudio de muestras complejas. Por lo que, en los últimos años, se ha empezado a fomentar el uso de fases naturales

en reemplazo de las fases tradicionales y sintéticas, siguiendo así, los principios propuestos por la química verde, y que, a su vez, han presentado mejoras sustanciales con respecto a las fases tradicionales [33, 34].

1.2.2 Fases sorbentes naturales: corcho

Una fase natural que ha tomado el liderazgo entre las fases sorbentes naturales escogidas para llevar a cabo la extracción de analitos, es el corcho, esto debido a sus características fisicoquímicas que le permiten extraer de manera adecuada una amplia variedad de compuestos de diversas matrices.

El corcho es una materia prima natural obtenida a partir de la corteza del alcornoque (*Quercus surber L.*), dentro de sus principales características se puede mencionar que es hidrofóbico, impermeable, aislante térmico y es uno de los materiales más sostenibles debido a que posee una huella de carbono negativa, ya que presenta bajas emisiones y una gran capacidad para capturar CO_2 , ayudando a la preservación forestal, la conservación de la biodiversidad y a la prevención de incendios forestales [35]. Los robles de corcho son una especie característica endémica de los bosques de Europa, principalmente de los bosques de Portugal y España, que pueden vivir durante siglos (200-250 años) sobreviviendo a condiciones adversas tales como corte, pastoreo, sequía, fuego, entre otras. Logran alcanzar una altura promedio de 15-20 m y se caracterizan por poseer una corteza exterior gruesa aislante de hasta 20 cm de espesor y que va a conformar lo que se conoce comúnmente como corcho, esta corteza de corcho le da su relevancia económica y ambiental, ya que es un material sumamente extraño y valioso para la industria, que puede ser removido del tronco del árbol sin poner en peligro al árbol en sí, convirtiéndolo en un árbol único en todo el mundo. Dicha corteza es removida en periodos de 9-14 años dependiendo de la región en la que se encuentre el bosque, y el árbol va generando nuevas capas de corteza de corcho de manera anual [36].



Figura 6 *Árbol de Alcornoque (Quercus Surber L.) al cual se le está removiendo la corteza exterior, corcho.*

Esta corteza exterior está compuesta por un 45% de suberina, un 33% de polifenoles como lignina y taninos, un 12% de celulosa, un 5% de ceras y un 5% de otros compuestos como agua y sales minerales [37]. Su estructura molecular tiene forma de celdas huecas que se asemejan a la forma de panal de abeja cuando se mira de manera radial, y con forma de pared de ladrillos al mirarla en dirección transversal, lo que le permite al corcho tener cavidades internas que almacenan aire [38], la estructura molecular del corcho vista a través de micrografía SEM, se muestra en la figura 7.

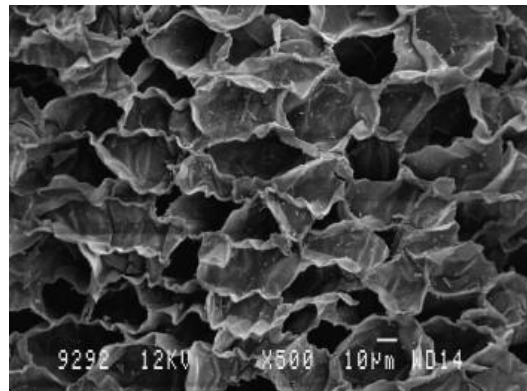


Figura 7 *Micrografía SEM de células de corcho, donde se puede observar las celdas que lo componen [38].*

Debido a que el corcho está compuesto mayoritariamente de suberina y lignina, serán estos compuestos los principales responsables de las características e interacciones de este material. La suberina es un poliéster conformado principalmente por ácidos grasos de cadena larga, que otorgan el carácter alifático que presenta esta molécula, siendo la suberina quien dota al material de elasticidad, impermeabilidad y aislación térmica, y es además responsable de la hidrofobicidad que caracteriza al corcho. Por otro lado, la lignina, es un polímero compuesto principalmente por alcoholes aromáticos, que permiten la interacción del corcho con compuestos ligeramente polares, y que, junto con la celulosa, forman microfibrillas rígidas que permiten que el corcho muestre

resistencia al estiramiento. Siendo ambas macromoléculas las responsables de que el corcho pueda interactuar con una amplia variedad de analitos a través de interacciones intermoleculares [39].

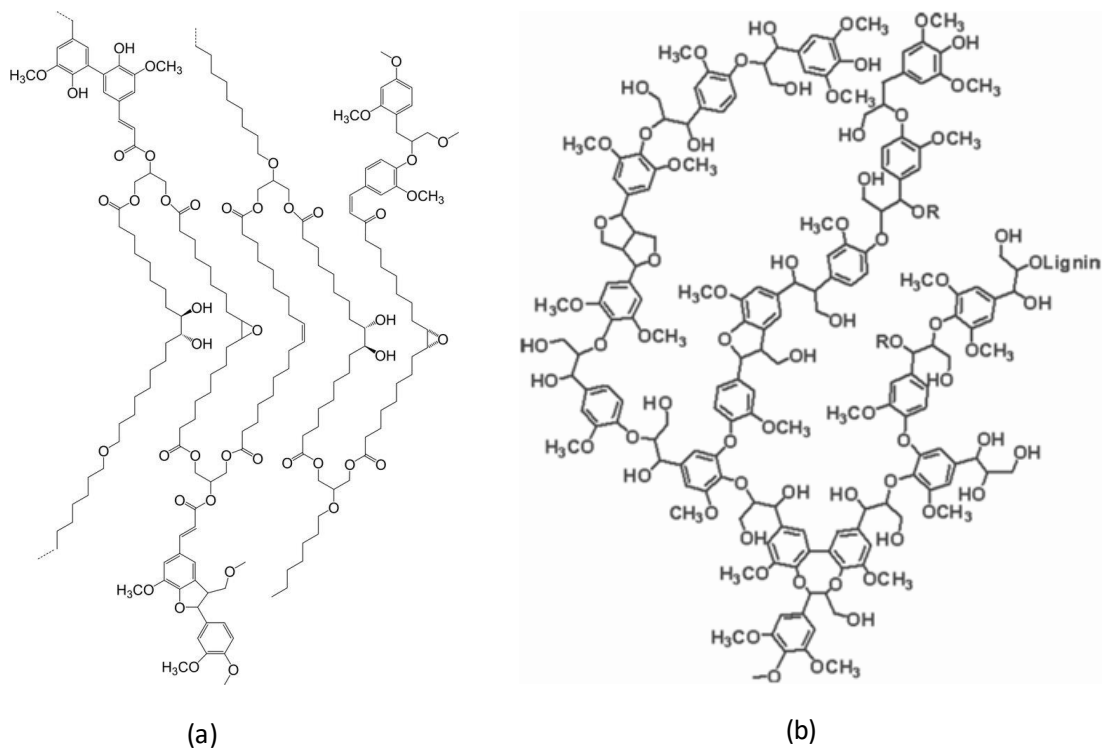


Figura 8 Estructuras químicas de las macromoléculas suberina (a) y lignina (b), correspondientes a los principales componentes del corcho.

Debido a esta capacidad del corcho de interactuar con diferentes analitos, resulta un material sumamente interesante para ser utilizado como fase sorbente natural. En la literatura se ha reportado el uso de corcho como fase sorbente natural, para extraer compuestos medianamente apolares. Cerrato et al. en el año 2022, informaron el uso de corcho como fase sorbente en muestreadores pasivos para el muestreo y la preconcentración de triclosán en muestras de agua, obteniendo valores de triclosán consistentes al utilizar corcho en muestreadores pasivos, en comparación a cuando se utilizaron otras técnicas de extracción como RDSE [37].

Hasta el momento, no se ha reportado el uso de corcho como fase sorbente en la técnica MSPD para la extracción de compuestos altamente apolares como lo es el colecalciferol, de matrices tan complejas como lo son las premezclas nutricionales de uso veterinario.

1.2.3 Matriz en estudio: Premezcla nutricional

Las premezclas nutricionales de uso veterinario corresponden a mezclas de diferentes ingredientes como aditivos, vitaminas y sales minerales de alto valor nutricional, que son empleadas en la fabricación de productos terminados, como los piensos, y que cumplen la función de actuar como un soporte asegurando la correcta distribución de los micronutrientes requeridos por el animal, en el alimento completo.

Las premezclas estudiadas, fueron proporcionadas por Veterquímica S.A., empresa dedicada a la investigación, formulación y fabricación de productos veterinarios destinados al cuidado de las necesidades farmacológicas y nutricionales de distintos animales.

Debido a que las premezclas corresponden a mezclas compuestas por distintos ingredientes, se trata de una matriz altamente compleja, cuyo principal desafío para la determinación del contenido de colecalciferol presente en esta matriz, viene dado por la alta cantidad de interferentes y las bajas concentraciones en las que el analito se encuentra presente (50 UI/g, equivalente a 1,25 µg/g). En la figura 9, se muestra una premezcla nutricional de perro, donde se puede observar a simple vista una composición no homogénea de la misma.

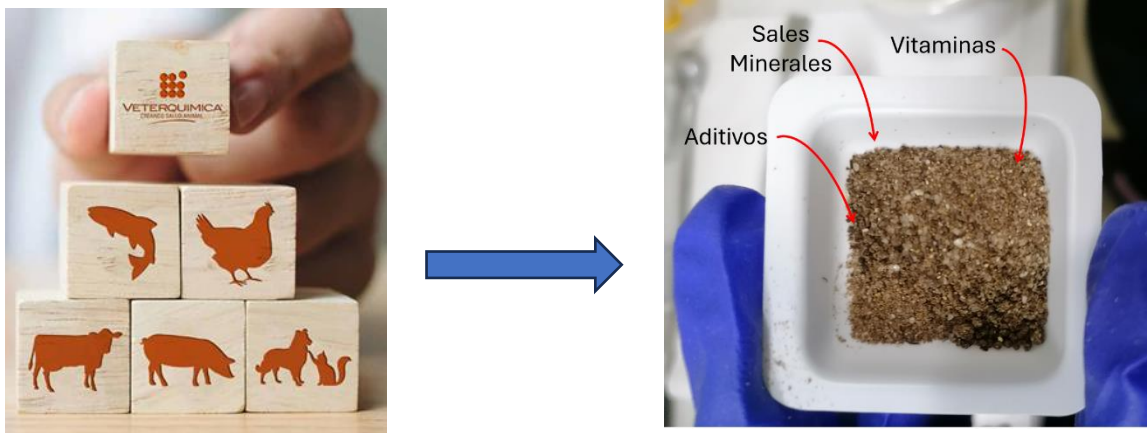


Figura 9 Premezcla nutricional de perro adulto, todas las muestras son proporcionadas por la empresa Veterquímica.

1.2.4 Muestreo

Dentro de la empresa se cuenta con un protocolo establecido para llevar a cabo el procedimiento de muestreo de productos terminados, el cual está regido por la Norma Chilena NCh 44 [40]. Esta norma está enfocada a actuar como una herramienta orientadora sobre los parámetros de representatividad, que van a permitir obtener resultados confiables en procedimientos aplicados a productos farmacéuticos. Los procedimientos de muestreos regidos por la norma 44, deben contar con un plan de muestreo y un método de extracción, que permita que los procedimientos de toma de muestra entreguen resultados confiables en los respectivos análisis. Bajo esta norma, la selección de muestra se realiza de manera aleatoria, y la extracción debe realizarse de manera sistemática, para asegurar resultados representativos del universo muestral. El procedimiento de muestreo debe cumplir con una serie de requisitos, donde se consideran factores como la cantidad de muestra tomada, la contramuestra que debe ser almacenada, el plazo dentro del cual se puede aceptar o rechazar un lote muestreado, el cual va a estar determinado por el Ministerio de Salud.

La cantidad de muestra usada en los análisis viene dada por el tamaño del lote fabricado, que también determinará cuántas muestras se van a tomar del mismo, considerando los criterios de representatividad y homogeneidad. La muestra obtenida es dividida en dos porciones con el fin de obtener una contramuestra, en caso de necesitar realizar análisis posteriores. Tanto la muestra como la contramuestra deben ser almacenados en envases estériles, limpios y secos, con sus respectivos datos de trazabilidad, y protegiéndolas de acuerdo con las condiciones de almacenamiento dadas para cada producto terminado.

1.2.5 Verdor de la metodología: AGREEprep

Es importante considerar, que la metodología desarrollada en este trabajo se presenta como una opción más verde en reemplazo de las técnicas informadas para la determinación de colecalciferol en matrices complejas. Un aspecto relevante al hablar de técnicas más verdes viene dado por el impacto ambiental que éstas provocan. El impacto ambiental, a su vez viene dado principalmente por el uso de disolventes, químicos y energía en la etapa de preparación de muestras. Recientemente Wojciech Wojnowski et al., propusieron una herramienta métrica centrada en la preparación de muestra, denominada AGREEprep, que evalúa el impacto ambiental que presenta la preparación de muestra de una metodología desarrollada [41]. Lo anterior, permite evaluar cuán ecológica es una metodología, en comparación a otras metodologías aplicadas a la determinación

de un mismo analito en matrices similares, mediante una puntuación según los pasos involucrados en cada una de ellas, indicando cuál presenta el menor impacto ambiental.

Para la familiarización con la herramienta mencionada, se hará una breve descripción de cómo son asignados los puntajes por este software. En primer lugar, se debe señalar que el enfoque de los 12 principios de la Química Analítica Verde (GAC), excluye la etapa de preparación de muestra debido a que esta etapa es la que provoca el mayor impacto ambiental, no obstante, recientemente se ha definido y formulado el concepto de Preparación de Muestras Verdes (GSP), que mediante 10 principios busca otorgar directrices claras para mejorar la ecología de los métodos de preparación de muestras [42]. En el software AGREeprep se evalúan de manera individualizada estos 10 criterios de la GSP, para los que esta herramienta va a asignar valores que van de 0 a 1, cuyos extremos corresponden al peor y al máximo rendimiento respectivamente, cada criterio tendrá entonces un valor numérico asociado que dependerá del peso que le asigne el usuario a cada criterio evaluado, los que se ponderarán para obtener una puntuación final que también oscilará en valores entre 0 y 1, y que entregará la información sobre el desempeño de la metodología en términos del verdor, mientras más cercano a 1 sea el valor logrado, más verde será la metodología descrita. El puntaje final obtenido es entregado por la herramienta en un gráfico circular con forma similar a la de un reloj, en donde en el centro se mostrará el puntaje final obtenido con un color asociado a dicho puntaje, con colores que van en una escala de colores desde el rojo al verde según el verdor de la metodología, donde un color rojo indicará una metodología menos verde respecto a los criterios de la GSP, y un color verde corresponderá a una metodología más amigable con el medioambiente según estos principios. En el borde de este gráfico, se mostrará un segmento con un ancho que va a representar el peso que le dio el analista a ese criterio, y un color asociado a cada uno de los criterios evaluados, de modo que sea lo más intuitivo posible y los resultados sean fácilmente interpretables por el usuario [43]. En la figura 10, se ejemplifica cómo es mostrado el puntaje asignado por la herramienta para una metodología específica informada por Francisco Pena-Pereira y colaboradores, en la cual se puede observar que los criterios 4, 5, 7 y 8, son los mejores criterios ensayados para dicha metodología, mientras que el resto de los criterios, son menos verdes, en particular el criterio 10 que se muestra de un color rojo, indica el peor rendimiento en términos de verdor según la escala de color mostrada; además, los criterios 1, 6, 7 y 9, corresponden a los criterios con menor peso en términos de relevancia, asignado por los

autores. Los criterios que se evalúan con esta herramienta corresponden a los que se detallan en la tabla II.

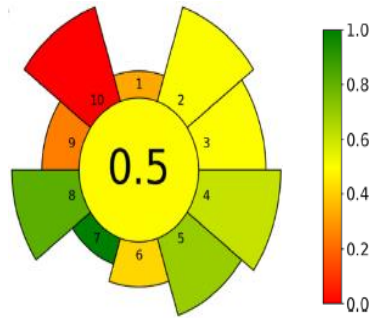


Figura 10 Resultado obtenido para la evaluación en un protocolo de análisis en línea basado en MEPS después de aplicar ponderaciones determinadas según un escenario específico [42].

Tabla II Criterios de evaluación que considera la herramienta AGREEprep para evaluar el verdor de las metodologías.

Criterio	Qué es lo que evalúa
1	Favorecer la preparación de muestra in situ
2	Uso de disolventes y reactivos más seguros
3	Materiales sostenibles, reutilizables y renovables
4	Minimizar el desperdicio
5	Minimizar cantidades de muestras, productos químicos y materiales
6	Maximizar el rendimiento de la muestra
7	Integrar pasos y promover la automatización
8	Minimizar el consumo de energía
9	Elegir configuración posterior de preparación de muestra lo más ecológica posible para el análisis
10	Garantizar procedimientos seguros para el operador

2. HIPÓTESIS

Debido a las características fisicoquímicas de la vitamina D_3 , será posible desarrollar una metodología analítica, para la extracción de colecalciferol de forma eficiente desde premezclas de uso veterinario, mediante una extracción de dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), utilizando fases sorbentes naturales, como el corcho, para luego realizar la cuantificación con HPLC-DAD.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Desarrollar e implementar un método analítico más verde para la determinación de la concentración de colecalciferol en premezclas nutricionales de uso veterinario. Para lograr esto, se utilizará como metodología de extracción, la dispersión de matriz en fase sólida, evaluando una fase sorbente natural (corcho), para posteriormente desarrollar la determinación del analito mediante HPLC-DAD.

3.2. Objetivos específicos

1. Implementar y optimizar la separación por HPLC del analito en matriz.
2. Optimizar los factores que afectan la extracción, empleando la técnica de extracción de dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), estudiando el efecto del tamaño de partícula de la fase sorbente (corcho) y la composición del eluyente para la extracción de colecalciferol desde premezclas nutricionales.
3. Validar la metodología desarrollada según los criterios de la VICH.
4. Realizar estudios de dispersión de distintas premezclas nutricionales de Veterquímica S.A.
5. Evaluar la factibilidad de aplicar la metodología en otras matrices como alimentos completos de uso animal, con intervalos de concentración menor de vitamina D_3 (a niveles de $\mu\text{g}/\text{kg}$).

4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1. Materiales

- Columna analítica Ultisil XB – C18 5 μm 250x4, 6 mm, Welch o equivalente.
- Filtros de jeringa de PVDF de 0,22 y 0,45 μm .
- Botellas de vidrio de 1 L.
- Tubos cónicos de polipropileno de 15 y 50 mL.
- Matraces aforados de vidrio de 10 mL color ámbar, clase A.
- Espátulas y cucharitas de diferentes tamaños y capacidades.
- Pipeta automática de 1-10 mL.
- Probetas de vidrio de 100 mL y 1 L.
- Vasos precipitados de vidrio de 50 y 100 mL.
- Viales ámbar de 2,0 mL con septa ranurada.
- Jeringas desechables de 3 y 5 mL.
- Pipetas Pasteur desechables.
- Láminas de corcho, Corchos Chile.
- Fibra de lana de vidrio.

4.2. Reactivos

- Acetonitrilo, grado HPLC.
- Etanol anhidro 99,5 %.
- Isopropanol, grado HPLC.
- Metanol, grado HPLC.
- Acetona, grado HPLC.
- Agua clase 1.
- Sulfato de sodio anhidro (99%), Merck.
- Nitrógeno extrapuro.
- Estándar Colecalciferol.
- Estándar Ergocalciferol.

4.3. Equipos de laboratorio

- Balanza analítica de precisión de 0,1 mg.
- Baño de ultrasonido.
- Baño termorregulado.
- Agitador de tubos Multi Reax.
- Manifold para SPE.
- Centrífuga.
- Liofilizador L101.
- Procesadora de café.
- Equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia con detector ultravioleta o de Arreglo de Diodos.

4.4. Metodología

4.4.1 Muestras

La empresa Veterquímica S.A. proporcionó todas las muestras que serán estudiadas, tanto de materia prima, núcleos y premezclas nutricionales de uso veterinario. En la figura 11, se pueden observar los diferentes tipos de muestras en estudio, donde a) corresponde a la materia prima (colecalfiferol), la cual presenta una concentración de 500.000 UI/g (12.500 µg/g), b) muestra un núcleo que corresponde a un concentrado vitamínico, en el que el colecalfiferol presenta una concentración de 5.000 UI/g (125 µg/g), en c) se muestra una premezcla nutricional de perro adulto, que corresponde a una mezcla del concentrado vitamínico (núcleo), junto a harinilla y sales minerales, en la cual el colecalfiferol presenta una concentración de 50 UI/g (1,25 µg/g), finalmente en d) se muestra el producto final o alimento completo, que corresponde al alimento que se le entrega al animal según sus necesidades nutricionales, en este tipo de muestra, el

colecalfiferol presenta una concentración mucho menos concentrada que en la premezcla nutricional, alcanzando un valor de 0,050 UI/g (0,00125 $\mu\text{g/g}$).



Figura 11 Muestras otorgadas por Veterquímica en las que se quiere determinar el contenido de colecalciferol, a) corresponde a la materia prima, b) corresponde a un núcleo, c) corresponde a la premezcla nutricional y d) corresponde al alimento completo.

4.4.2 Preparación de la fase sorbente natural

La fase sorbente escogida para este estudio fue corcho laminar. La preparación de la fase sorbente consistió en trozar la lámina de corcho dejándola de un tamaño adecuado para agregarla en un vaso de precipitado de 1 L, donde se sometió a una limpieza por ultrasonido para eliminar cualquier impureza que pudiera tener adherida en él. Un primer y segundo lavado se realizó con agua destilada durante 20 minutos, luego un tercer y cuarto lavado se realizó con una mezcla reciclada de 75% MeOH - 25% ACN durante 10 minutos cada una, transcurrido los lavados, el corcho se dejó secar al aire libre envuelto en papel aluminio con el fin de evitar una posible contaminación. Una vez seco, se molió y se tamizó, obteniendo 4 fracciones de diferentes tamaños de partícula de corcho (<150 mesh, >150 mesh, >100 mesh y >60 mesh, donde mesh corresponde a la cantidad de perforaciones que existen en una determinada área de malla). En la figura 12, se muestra esquemáticamente el procedimiento antes descrito.

Como se puede observar en la figura, la cantidad de corcho obtenido para los tamaños más pequeños es considerablemente más baja que la cantidad contenida en la botella de vidrio, donde con una examinación visual rápida, es posible notar que es donde se encuentra la mayor porción del corcho. Debido a esto, se decidió realizar un segundo proceso de molienda a la porción que contenía la mayor parte del corcho, y un nuevo proceso de tamizado con el objetivo de estudiar la distribución que siguen los tamaños de partícula del corcho, para así poder seleccionar la mejor

fracción, basándose en la cantidad obtenida, con la que se va a realizar el procedimiento de extracción.

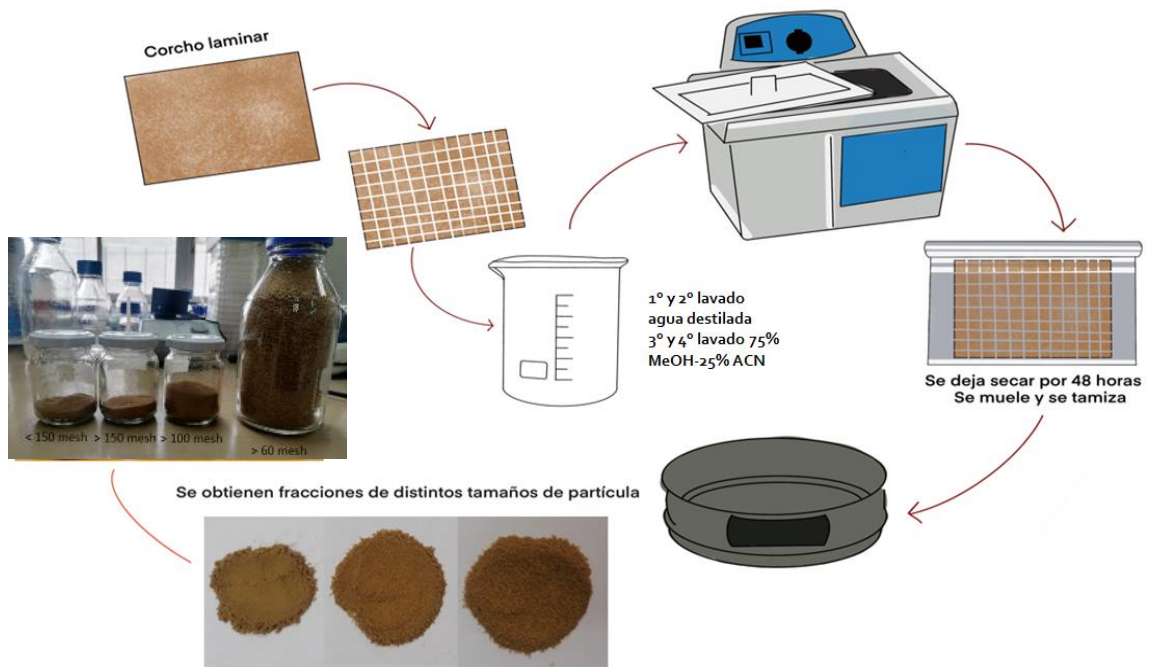


Figura 12 Resumen esquemático del procedimiento inicial seguido para la preparación de la fase sorbente. Como se puede ver en la figura, se obtienen 4 fracciones de diferentes tamaños de partícula de corcho

En la figura 13, se muestra el equipo con el que se realizó el segundo proceso de molienda, el tamizado para obtener las distintas fracciones de tamaños de partícula de corcho, y finalmente el pesaje de la cantidad obtenida. Cabe señalar, que la cantidad inicial de corcho que se sometió a este segundo proceso de molienda fue de 110,12 g.



Figura 13 Equipos utilizados para realizar el segundo proceso de molienda y tamizado de la fracción que contenía la mayor cantidad de corcho. Para moler el corcho se utilizó un molino manual como se muestra en la imagen de la izquierda. El tamizado se realizó con una tamizadora eléctrica como se observa en la imagen del centro.

4.4.3 Preparación de estándar y optimización cromatográfica

1. Se preparó una solución stock a partir de 19,7 mg de un estándar concentrado de colecalciferol el que fue disuelto en etanol y aforado en el mismo disolvente, presentando una concentración de 78.800 UI/mL (equivalente a 1.970 mg/L).
2. A partir de la solución stock, se preparó una solución intermedia por dilución de 0,1 mL de la solución stock en 10 mL de etanol, presentando una concentración de 788 UI/mL (equivalente a 19,7 mg/L).
3. Con la solución intermedia se preparó una curva estándar evaluando 5 concentraciones diferentes, en un rango que abarcó desde los 15,8 UI/mL hasta 94,6 UI/mL.
4. A partir de la curva estándar, se realizó el estudio del método cromatográfico para la determinación y cuantificación del colecalciferol mediante HPLC-DAD. Para ello, se inyectaron 5 μ L de cada punto de la curva estándar, y se analizaron diferentes condiciones cromatográficas, evaluando la eficiencia de la columnas, la composición de la fase móvil, la temperatura a la que se llevaba a cabo la separación y el tipo de elución más adecuada para este analito.

4.4.4 Preparación de muestra

a) Limpieza de la matriz

Previo a la extracción del analito desde la premezcla nutricional, fue necesario llevar a cabo un paso de limpieza de la matriz para poder eliminar parte de los interferentes polares que pudieran estar contenidos en la misma. Para esto, se agregó 1 g de muestra en un tubo cónico de polipropileno de 50 mL y se añadió 10 mL de agua destilada, el tubo fue agitado durante 5 minutos en Multi Reax a 2200 rpm, luego, se sometió a dos ciclos de centrifugado de 5 minutos cada uno a 5000 rpm y a 4°C, finalmente se desechó el sobrenadante y la parte de la muestra decantada se liofilizó. La figura 14 muestra el resumen de los pasos seguidos para llevar a cabo el procedimiento de limpieza.

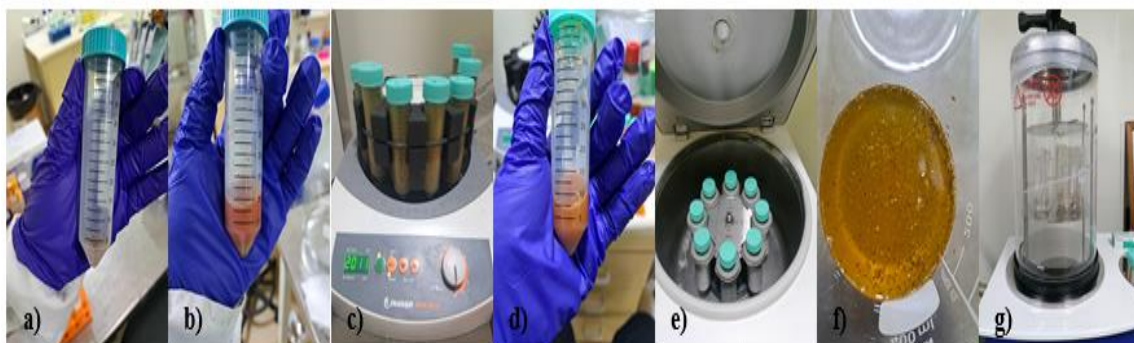


Figura 14 Resumen de los pasos llevados a cabo para el procedimiento de limpieza de la matriz.

b) Extracción y elución del analito

Para el procedimiento de extracción del analito, se utilizó la técnica MSPD usando corcho como fase sorbente natural. Para llevar a cabo la técnica, en un mortero de porcelana se añadieron 100 mg de corcho fino (tamaño de partícula > 60 mesh), 50 mg de sulfato de sodio anhidro y el gramo de muestra previamente liofilizada correspondiente a una muestra de premezcla nutricional de perro, estos fueron dispersados con el pistilo del mortero durante 30 segundos aproximadamente hasta formar una mezcla visualmente homogénea. La mezcla MSPD fue transferida cuidadosamente a un cilindro de jeringa de 5 mL, la que fue montada en un sistema colector SPE, en donde se llevó a cabo el proceso de elución con una mezcla 1:1 de MeOH-EtOH, el proceso de elución consistió en dos eluciones secuenciales con 4 mL de la mezcla cada una y fue realizada de manera que la elución se produjera gota a gota, los extractos fueron recolectados en la parte inferior del colector en tubos de vidrio. El procedimiento se muestra a continuación en la figura 15.

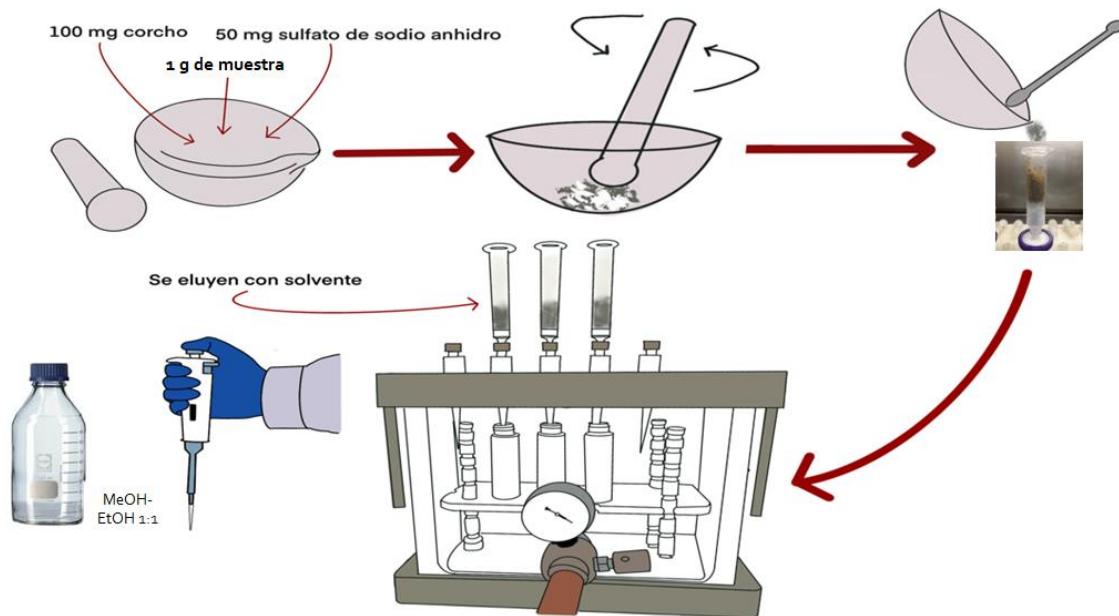


Figura 15 Resumen esquemático del procedimiento de extracción de colecalciferol desde la premezcla nutricional utilizando corcho como fase sorbente. El corcho es mezclado con la premezcla nutricional en un mortero hasta homogeneizar, luego se somete a eluciones secuenciales dentro de una jeringa montada en sistema colector SPE.

c) Reconstitución e identificación del analito

Los extractos colectados se llevaron a sequedad bajo una corriente de N_2 en un baño termostático a 40°C , posteriormente fueron reconstituidos en 1 mL de EtOH, se agitó durante 5 minutos en Multi Reax a 2200 rpm, y luego se sonicó durante 1 minuto para solubilizar todo el producto adherido en las paredes del tubo de vidrio. Finalmente, el eluato reconstituido fue filtrado a vial e inyectado en un sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia con un detector de arreglo de diodos, junto con la correspondiente curva estándar con el fin de identificar el analito. El procedimiento esquemático para esta etapa se muestra en la figura 16.

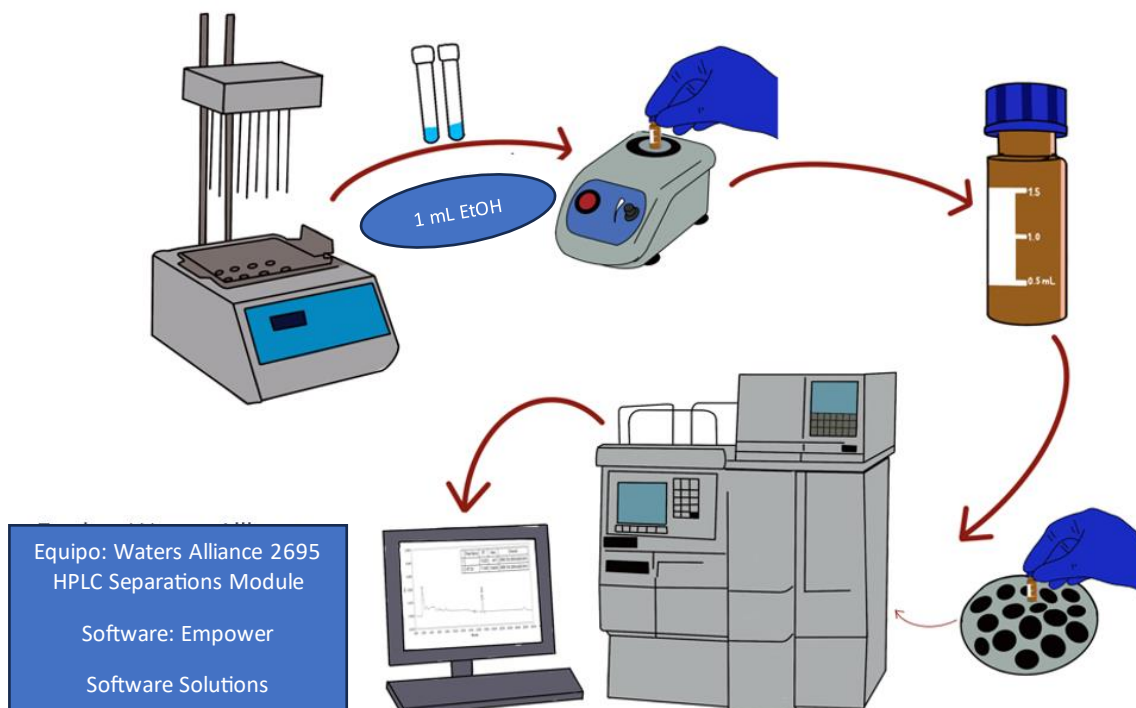


Figura 16 Esquema del procedimiento de reconstitución e identificación del analito.

4.4.5 Validación del método analítico

La validación de la metodología desarrollada se realizó siguiendo los criterios otorgados por la guía VICH [44,45], para la cual se evaluaron los parámetros de linealidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), precisión y exactitud. La determinación de estos parámetros se realizó utilizando muestras correspondientes a una premezcla nutricional de perro cachorro.

4.4.5.1 Linealidad: Curva de estándares

La guía VICH determina que es posible evaluar la linealidad mediante una curva de calibración estándar, para observar la relación lineal que existe en el rango de concentraciones estudiados, evaluados a partir de la regresión lineal del gráfico generado a partir de la respuesta de las diferentes concentraciones (5 como mínimo).

La linealidad del colecalciferol se evaluó con una curva de calibrado de estándares, para la que se fue añadiendo una alícuota de la solución intermedia y aforando en etanol para alcanzar la concentración esperada, evaluando la linealidad en el rango que abarcó desde los 15,8 UI/mL hasta

los 94,6 UI/mL. Con los datos obtenidos se realizó una regresión lineal para obtener la ecuación de la recta que se ajustó a los puntos experimentales, determinando así los valores de pendiente (m), intercepto (n) y coeficiente de determinación (R^2) asociados a esta curva, que nos podrá informar el grado de variabilidad que tiene la variable concentración respecto al área obtenida para el rango de concentración estudiada.

4.4.5.2 Linealidad: Curva en matriz

Se evaluó la linealidad en una curva en matriz, para la cual se fortificó un blanco de la matriz con alícuotas de la solución intermedia, para alcanzar las concentraciones que abarcaron el rango desde los 15,8 UI/mL hasta las 126,1 UI/mL. Con los datos obtenidos se realizó una regresión lineal para obtener la ecuación de la recta que se ajuste a los puntos experimentales, determinando así los valores de pendiente (m), intercepto (n) y coeficiente de determinación (R^2) asociados a esta curva, que nos podrá informar el grado de variabilidad que tiene la variable concentración respecto al área obtenida para el rango de concentración estudiada.

4.4.5.3 Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)

Según la VICH, el LD corresponde a la cantidad más pequeña de analito que se puede medir a partir de la cual se puede deducir la presencia del analito en la muestra con un cierto grado de certeza aceptable. Mientras que definen el LC, como la cantidad de analito más pequeña que puede ser medida, por encima del cual se puede realizar la determinación de concentración de un analito con un cierto grado especificado de exactitud y precisión.

Para determinar estos límites, a partir de una curva en matriz se obtuvo los parámetros asociados a su regresión lineal, tales como pendiente (m), intercepto (n) y su coeficiente de determinación (R^2). Se obtuvo, además, las incertezas asociadas a la pendiente (σ_m) y al intercepto (σ_n), lo que nos permitió calcular los límites de detección y cuantificación como se muestran en las ecuaciones 1 y 2.

$$LD = \frac{3,3 * \sigma_n}{m} \quad (1)$$

$$LC = \frac{10 * \sigma_n}{m} \quad (2)$$

4.4.5.4 Precisión

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad y de precisión intermedia. Para el caso de la repetibilidad, se determinaron las concentraciones de colecalciferol en 6 muestras al 100% de su concentración, y se determinó el parámetro CV% que nos entregará el grado de dispersión entre la serie de muestras estudiadas. Para la precisión intermedia, se determinaron las concentraciones de colecalciferol en 8 muestras réplicas, variando el analista, el día de ensayo y los instrumentos utilizados, y determinando el CV% para obtener el grado de dispersión entre las muestras. Para ambos casos, el criterio de aceptación según la VICH es $CV\% \leq 10\%$, se trate de repetibilidad o de precisión intermedia.

4.4.5.5 Exactitud

La exactitud se evaluó en términos de un porcentaje de recuperación, para esto, se determinó la concentración de colecalciferol contenido en 8 réplicas de una muestra de premezcla nutricional de perro cachorro y se calculó la recuperación de esta, frente al valor teórico de colecalciferol informado en las mismas. El criterio de aceptación según la VICH para analitos en el rango de concentración estudiado, es el rango que abarca de -20% a +10% de recuperación.

4.4.6 Evaluación del veredor de la metodología

Se evaluó el veredor de la metodología desarrollada utilizando la herramienta AGREEprep. Se realizó un análisis de los pasos involucrados en la metodología, considerando los materiales, reactivos y disolventes utilizados, con el fin de poder introducir la información necesaria de manera que el software asignara el puntaje correspondiente a cada criterio evaluado, y posteriormente, pudiera entregar la puntuación final para la metodología presentada. Se evaluó también el veredor de una metodología descrita en la literatura para la determinación de colecalciferol en matrices correspondientes a alimentos, para poder realizar una comparación de los puntajes obtenidos para cada metodología, y poder concluir respecto al veredor de la metodología descrita en este estudio, respecto a las utilizadas rutinariamente con el mismo propósito.

4.4.7 Metodología alternativa

La metodología que se describe en este estudio fue desarrollada para premezclas nutricionales de perro cachorro y de perro adulto, matrices altamente complejas por la cantidad de componentes que presentan. Adicionalmente, se desarrolló una metodología alternativa para el caso de matrices sencillas como los núcleos nutricionales y la materia prima, donde el colecalciferol se encuentra presente en concentraciones altas (500.000 UI/g y 5.000 UI/g para la materia prima y el núcleo respectivamente). Para la extracción del analito desde estas matrices, se utilizó una técnica de extracción asistida por ultrasonido, utilizando sólo disolventes considerados inocuos como agua, etanol e isopropanol.

a) Extracción del analito

La extracción se llevó a cabo tomando muestras de 0,1 g y 0,5 g para la materia prima y el núcleo nutricional respectivamente, las muestras fueron situadas dentro de tubos cónicos de polipropileno de 15 mL previamente rotulados. A cada tubo se le añadió 1 mL de agua destilada, y se agitó durante 5 minutos en Multi Reax a 2000 rpm, luego, las muestras fueron sonicadas durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo, se añadió 7 mL de una mezcla 1:1 de etanol-isopropanol, repitiendo el proceso de agitación y sonicación durante el mismo tiempo y condiciones ya mencionadas. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a 5000 rpm a 4°C, y el sobrenadante fue cuidadosamente traspasado a un matraz ámbar de 10 mL, donde se aforó con el mismo disolvente de extracción. El procedimiento descrito para matrices sencillas se muestra esquematizado en la figura 17, el que es explicado a partir de una muestra de materia prima. Para el caso de núcleos nutricionales, bastaría con tomar una porción mayor de muestra (0,5 g) y seguir el procedimiento antes descrito.

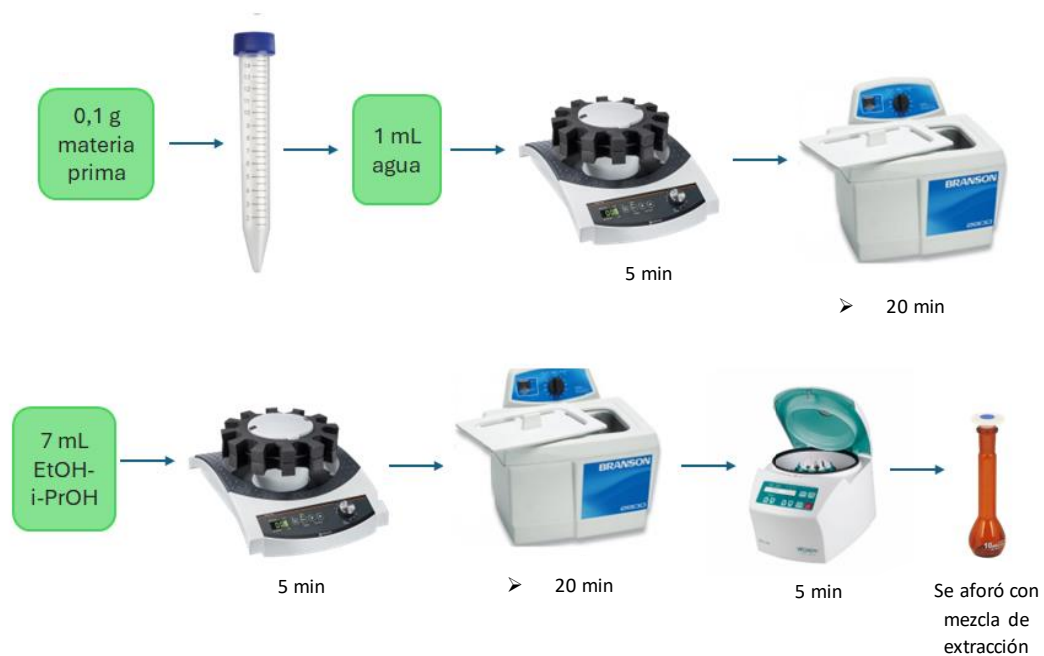


Figura 17 Procedimiento realizado para la extracción de colecalciferol desde matrices sencillas. Se llevó a cabo una técnica de extracción asistida por ultrasonido utilizando una mezcla de EtOH-i-PrOH para la extracción de la vitamina desde muestras de materia prima.

b) Dilución e identificación del analito

Se preparó una dilución de la disolución obtenida de la extracción de colecalciferol contenido en la materia prima, tomando una alícuota de 500 μL y aforando nuevamente en 10 mL en un matraz de aforo color ámbar con la mezcla EtOH-i-PrOH, alcanzando una concentración de 250 UI/mL. En el caso del núcleo nutricional, no fue necesario realizar una dilución, ya que la concentración en el matraz ya correspondía a 250 UI/mL. Finalmente, se filtraron a vial, 2 mL de cada una de las soluciones con ayuda de una jeringa de 3 mL y filtros PVDF de 0,22 μm y fueron analizadas en sistema HPLC con las condiciones optimizadas.

4.4.8 Validación metodología alternativa

La validación de la metodología desarrollada para matrices sencillas se realizó siguiendo los criterios otorgados por la guía VICH, para la cual se evaluó la linealidad, precisión (como repetibilidad) y exactitud. La determinación de estos parámetros se realizó utilizando 8 muestras réplicas correspondientes a un núcleo nutricional y 8 muestras réplicas de un fortificado del núcleo.

4.4.8.1 Linealidad: Curva de estándares

La linealidad del colecalciferol se evaluó mediante una curva de calibrado de estándares, para la que se fue añadiendo una alícuota de la solución intermedia y aforando en etanol para alcanzar la concentración esperada, evaluando la linealidad en el rango que abarcó desde los 71,2 UI/mL hasta los 356,0 UI/mL. Con los datos obtenidos se realizó una regresión lineal para obtener la ecuación de la recta que se ajustó a los puntos experimentales, determinando así los valores de pendiente (m), intercepto (n) y coeficiente de determinación (R^2) asociada a esta curva, que nos podrá informar el grado de variabilidad que tiene la variable concentración respecto al área obtenida para el rango de concentración estudiada.

4.4.8.2 Precisión

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad, para la cual se determinaron las concentraciones de colecalciferol en 8 muestras al 100% de su concentración, y se determinó el parámetro CV% que nos entregó el grado de dispersión entre la serie de muestras estudiadas. Cabe recordar que, el criterio de aceptación según la VICH para la repetibilidad es $CV\% \leq 10\%$.

4.4.8.3 Exactitud

La exactitud se evaluó a tres niveles de concentración en masa, y se evaluó en términos de un porcentaje de recuperación. Para esto, se determinó la concentración de colecalciferol contenido en 8 réplicas tanto de una muestra de núcleo nutricional, como de 8 réplicas de una muestra de fortificados del núcleo. y se calculó la recuperación de estos, frente al valor teórico de colecalciferol informado en las mismas. Recordar que el criterio de aceptación según la VICH para analitos en el rango de concentración estudiado, es el rango que abarca de -20% a +10% de recuperación.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se describen los resultados obtenidos para este estudio, los que son presentados de tal manera que se pueda evidenciar el logro de los objetivos específicos planteados inicialmente.

5.1. Implementar y optimizar la separación por HPLC del analito en matriz.

Como ya se ha mencionado con anterioridad, el análisis se llevó a cabo en un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia con detector UV-DAD, el cual se ajustó para cuantificar al colecalciferol a 265 nm ya que es la longitud de onda de máxima absorción que se ha reportado en la literatura para este compuesto [46]. Debido a que la VD_3 corresponde a un compuesto altamente apolar, la separación se llevó a cabo utilizando una columna de C18, específicamente la Ultisil XB-C18, de 5 μm de tamaño de poro, de 250 mm de largo y de 4,6 mm de diámetro, de la marca Welch, con la cual no se tuvo mayor inconveniente.

Respecto a la identificación y cuantificación en sí, los primeros análisis de la vitamina se llevaron a cabo probando un método de elución en gradiente, que se había probado y optimizado con antelación en la empresa para compuestos vitamínicos inyectables de un producto diferente. Sin embargo, para lo que son las premezclas nutricionales, un producto muy distinto a los que se habían analizado previamente, al utilizar este tipo de elución no se generaban buenos resultados cromatográficos para la cuantificación de vitaminas desde las premezclas nutricionales. Debido a esto, se optó por probar la elución de tipo isocrática evaluando la composición de la fase móvil, con el fin de obtener una composición de fase móvil que permitiera llevar a cabo la correcta separación del analito en cuestión y a su vez, observar de mejor manera el orden de elución de los componentes de las premezclas nutricionales. Se probaron diferentes composiciones de fase móvil en eluciones isocráticas, para analizar primero un estándar de colecalciferol y luego se aplicó a premezclas nutricionales.

En la tabla III, se resumen las composiciones evaluadas para encontrar la fase móvil óptima para el analito de interés.

Tabla III Composición de las diferentes fases móviles probadas para llevar a cabo la separación del analito.

Prueba	Composición fase móvil
1	90% MeOH – 10% H_2O
2	55% MeOH – 40% ACN – 5% H_2O
3	55% MeOH- 38% ACN- 5% H_2O - 2% THF
4	80% MeOH- 15% ACN- 5% i-PrOH
5	80% ACN- 15% MeOH- 5% i-PrOH
6	85% MeOH- 10% ACN- 5% i-PrOH
7	75% MeOH- 15% ACN- 10% i-PrOH
8	70% MeOH- 15% ACN- 15% i-PrOH

En la figura a continuación, se muestran 3 cromatogramas obtenidos al analizar muestras de colecalciferol a partir de las fases móviles correspondientes a las pruebas 3 y 8 señaladas en la tabla III. En particular, en la figura 18 A), se observa el cromatograma obtenido al utilizar la composición de fase móvil de la prueba 8 en un estándar de colecalciferol. Por otro lado, en la figura 18 B), se muestra el cromatograma obtenido al utilizar una fase móvil compuesta por lo indicado en la prueba 3, en estándares de colecalciferol y ergocalciferol, cromatograma obtenido en estudios iniciales donde se estaba evaluando el uso de ergocalciferol como estándar interno, lo que fue descartado posteriormente debido a que se informó por parte de la empresa que las premezclas nutricionales contenían VD_2 , no obstante, con los resultados obtenidos de este estudio, se obtuvo la resolución de la separación cromatográfica de VD_3 respecto de la VD_2 , permitiendo verificar la selectividad del método, parámetro útil para la validación de la metodología, que nos indica la capacidad de un método para distinguir entre dos sustancias estrechamente relacionadas que estén presentes en una muestra. En particular, se obtuvo que el método presentado es selectivo, ya que puede resolver correctamente la separación de ambas formas de vitamina D presente en la muestra estudiada, tanto para una altura completa de pico, como para la mitad de la altura de pico (HH) como se presenta en la tabla informativa de la figura 18 B), obteniendo en ambos casos un valor para la resolución $R_s > 1,5$, que es el valor que se ha descrito en la literatura correspondiente a una separación cromatográfica completa [47]. Finalmente, en la figura 18 C), se muestra el cromatograma obtenido al analizar el colecalciferol contenido en una premezcla nutricional de perro cachorro, usando la composición de fase móvil correspondiente a la prueba 8.

Como se logra visualizar en la figura 18, en los cromatogramas A) y C), correspondientes a la separación realizada con una fase móvil compuesta por 70% de metanol, 15% de acetonitrilo y 15% de isopropanol (prueba 8), el tiempo de retención del colecalciferol es menor, rondando los 8 minutos en ambos casos, independiente si se trata de un estándar o de una muestra de premezcla nutricional, en comparación a cuando se usa la fase móvil compuesta por 55% de metanol, 38% de acetonitrilo, 2% tetrahidrofurano y 5% de agua (prueba 3), donde el tiempo de retención está por sobre los 22 minutos, lo que se traduce en corridas cromatográficas mucho más largas, y por lo tanto, con un mayor gasto energético y de disolventes orgánicos lo que va en contra de lo propuesto en los 12 principios de la química verde.

Como se busca lograr la separación cromatográfica usando una metodología lo más verde posible, se decide utilizar la fase móvil correspondiente a la prueba 8, que permite la separación del analito en un tiempo aproximadamente 3 veces menor en contraste a otras fases móviles probadas, lo que permite realizar el análisis de las muestras en corridas cromatográficas más cortas, de alrededor de 12 minutos, siendo un tiempo bastante prudente considerando que se trata de muestras altamente complejas, con una gran cantidad de componentes de distinta naturaleza, y que, además utiliza una fase móvil que presenta una composición mayor de disolventes considerados menos tóxicos/dañinos o más recomendados para el medio ambiente [48].

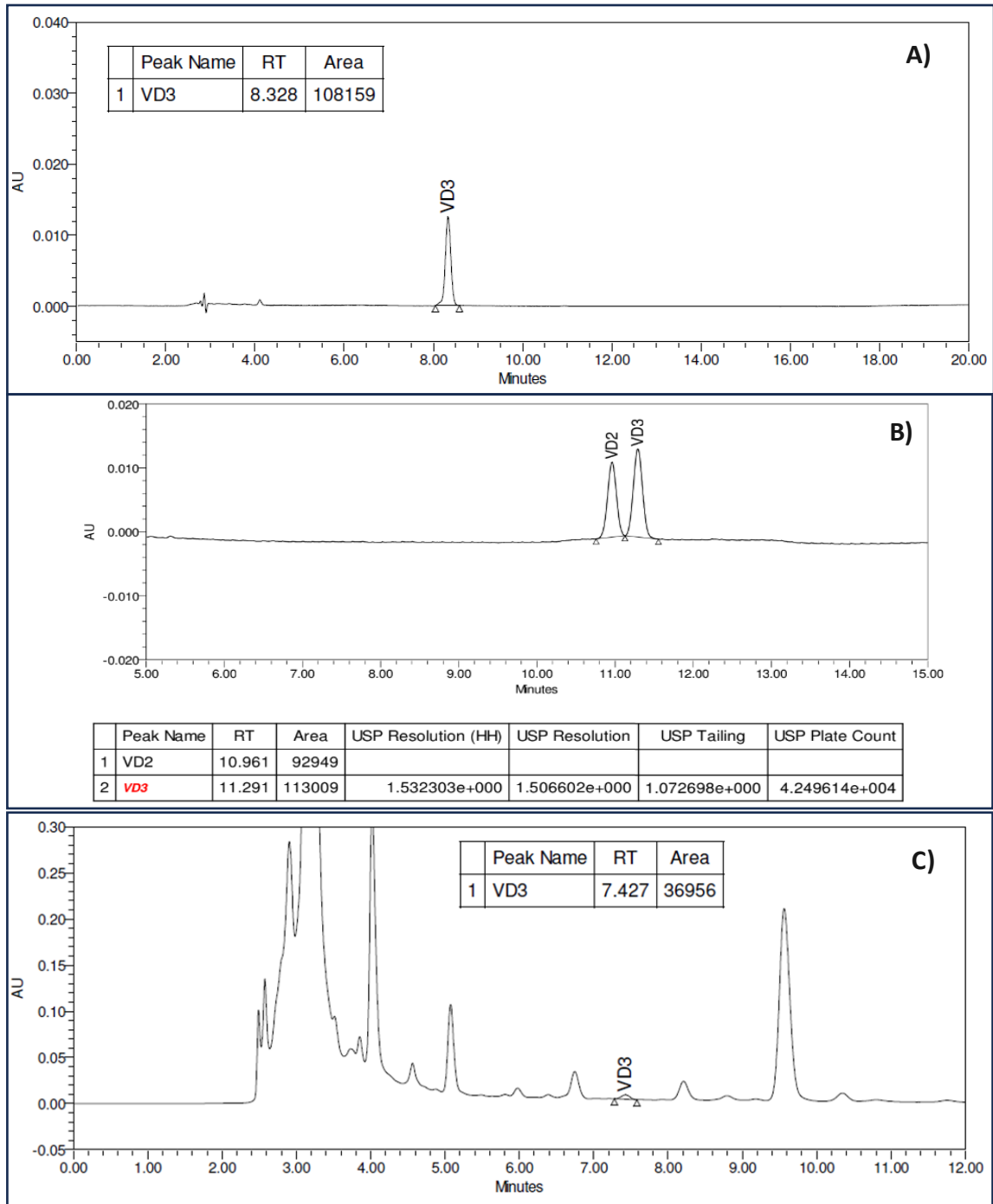


Figura 18 Cromatogramas obtenidos para la separación de colecalciferol en muestras de estándar y en una premezcla nutricional utilizando las composiciones de fase móvil señaladas para las pruebas 3 y 8. **A)** corresponde al cromatograma de un estándar de colecalciferol utilizando la composición de fase móvil de la prueba 8, **B)** corresponde al cromatograma de un estándar de colecalciferol y ergocalciferol obtenido al utilizar una composición de fase móvil de la prueba 3, **C)** corresponde al cromatograma obtenido para una premezcla nutricional al utilizar la composición de fase móvil de la prueba 8.

En la figura 19, se muestra una ampliación del cromatograma de la figura 18 C), donde se puede observar de mejor manera el pico cromatográfico obtenido para la vitamina en la premezcla nutricional, el que presenta un tiempo de retención aproximado de 7,4 minutos.

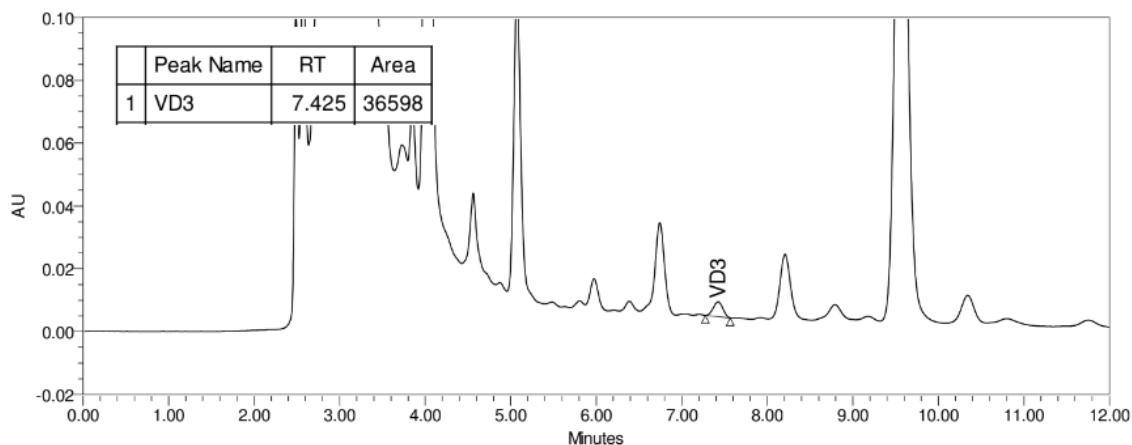


Figura 19 Cromatograma obtenido para una premezcla nutricional al utilizar la composición de fase móvil de la prueba 8.

Finalmente, se probó la separación a dos temperaturas diferentes, 35°C y 45°C, obteniendo una mejor definición del pico cromatográfico a mayor temperatura, fijando las condiciones que se muestran en la tabla IV.

Tabla IV Condiciones cromatográficas seleccionadas para llevar a cabo la separación del analito.

Parámetro	Valor
Longitud de onda (nm)	265
Tipo de elución	Isocrática
Fase móvil	MeOH 70%, ACN 15%, i-PrOH 15%
Flujo (mL/min)	1,0
Columna	Ultisil XB-C18 5 µm, 250x4,6 mm, Welch
Volumen de inyección (µL)	5
Tiempo de retención promedio (min)	7,33
Tiempo total de corrida (min)	12
Temperatura del horno (°C)	45
Detector	UV-DAD

5.2. Optimizar los factores que afectan la extracción, empleando la técnica de extracción de dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), estudiando el efecto del tamaño de partícula de la fase sorbente (corcho) y la composición del eluyente para la extracción de colecalciferol desde premezclas nutricionales.

Para el estudio de los factores que afectan la extracción del analito en la matriz, se evaluaron y optimizaron 3 factores principalmente, que consistieron en una etapa previa de limpieza, la extracción del analito y la elución del analito. A continuación, se detallan cada uno de estos.

5.2.1 Etapa de limpieza

En la etapa inicial del estudio de las premezclas nutricionales para la determinación de colecalciferol, se presentaron dos problemas que impedían el correcto análisis del analito: el taponamiento de los filtros PVDF y el posterior taponamiento de la columna cromatográfica, estos problemas y la solución a los mismos se detallan a continuación.

Como se describió en la metodología, luego de la extracción del analito desde la premezcla nutricional usando corcho como fase sorbente, la mezcla MSPD formada se cargaba en cilindros de jeringas. A estas jeringas previo a la carga de la mezcla en ellas, se les retiró el émbolo junto con la aguja y su capuchón, para enroscar en el pivote de la jeringa, un filtro PVDF de 0,22 μm , una vez listas las jeringas con las muestras dentro de ellas, se efectuó lo que correspondía a la elución con el fin de provocar el paso de la vitamina adsorbida en el corcho, hacia el eluato. No obstante, la composición que presentaban las premezclas nutricionales, dada por la presencia de diferentes sustancias con variados tamaños de partícula, dio paso al primer problema para llevar a cabo el análisis. Este problema consistió en el colapso del filtro debido a que el disolvente de elución lograba transportar consigo componentes que presentaban un tamaño mayor a 0,22 μm , es decir, no lograban pasar a través del filtro, quedando posados en la parte superior del mismo, obstruyéndolo a tal punto que no dejaban que el disolvente de elución pasara a través de él. En la figura 20, se muestra la estructura de una jeringa típica para un mejor entendimiento de lo antes descrito, se muestra también la jeringa provista del filtro PVDF de 0,22 μm , la que fue montada en un sistema colector SPE donde se llevaba a cabo la elución y finalmente se muestra el filtro totalmente obstruido por la presencia de distintos componentes de la premezcla nutricional.



Figura 20 Se observa la estructura de una jeringa típica, se muestra la estructura luego de cambiar la aguja por un filtro PVDF, y el colapso del filtro producto de los componentes de la premezcla que impiden la correcta elución hacia el sistema colector.

El segundo problema que se presentó fue el taponamiento de la columna cromatográfica debido a los componentes de menor tamaño de la premezcla nutricional, que lograban llegar a la etapa de análisis, lo que provocaba que no se pudiera llevar a cabo la separación cromatográfica de las distintas muestras. Debido a esto, se decidió evaluar una etapa de limpieza con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de interferentes contenidos en la matriz, que pudieran estar entorpeciendo el análisis de las muestras.

Se realizaron lavados en distintas etapas del proceso de preparación de muestra, para evaluar cuál de ellos era la mejor opción para la matriz en estudio. En una primera instancia, se probó lavar las muestras previamente a ser extraídas, auxiliándose de un embudo Büchner sujeto a un matraz Kitasato, que a su vez se conectaba a una bomba de vacío para optimizar el tiempo de lavado, la muestra se cargaba en el embudo Büchner y se iba pasando agua destilada sobre ella, que posibilitaba el filtrar las sustancias solubles, permitiendo que el sobrante de muestra no soluble quedará intacto en la superficie del embudo (figura 21A). Un segundo lavado se realizó a la muestra luego de llevarse a cabo la extracción por MSPD, la mezcla se cargó en jeringas y se les agregó agua destilada antes de llevar a cabo la elución del analito (figura 21B). Un tercer proceso de limpieza fue evaluado, y consistió en un lavado luego de la extracción MSPD de las mezclas cargadas en jeringas, pero esta vez haciendo pasar agua sobre jeringas de mayor tamaño conectadas a las jeringas que contenían la muestra a analizar (figura 21C).

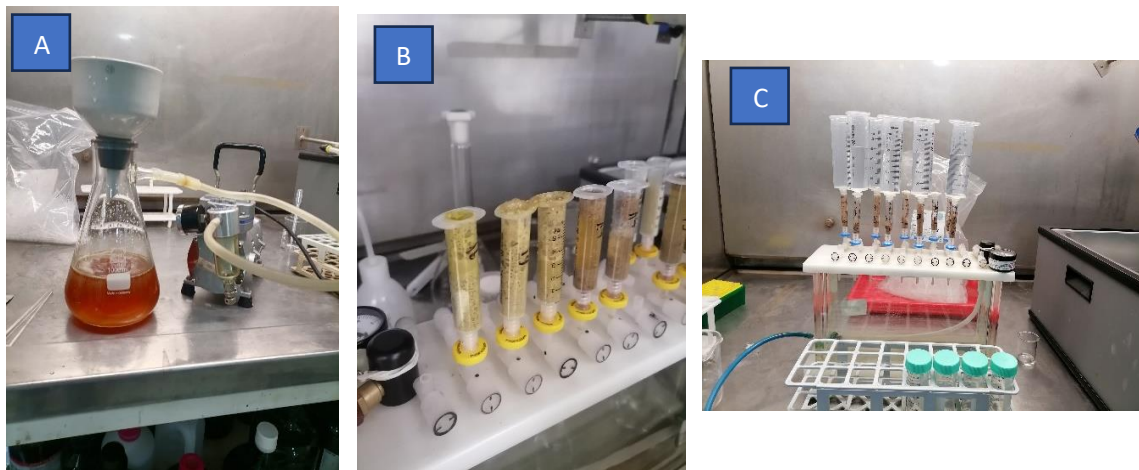


Figura 21 Lavados evaluados con el fin de eliminar parte de los componentes interferentes solubles presentes en la premezcla nutricional.

Sin embargo, cada uno de los lavados mostrados en la figura 21 fue descartado debido a los problemas asociados a ellos. En el caso del lavado mostrado en la figura 21A, si bien, se lograba llevar a cabo la eliminación de interferentes solubles, no se tenía un control sobre los volúmenes de agua que se requerían para la eliminación de estos, junto con el hecho de que, para sacarle provecho en términos de gasto energético, se debía lavar una gran porción de muestra, lo que eventualmente complicaba la determinación de la cantidad de muestra lavada que debía ser pesada, para llevar a cabo el análisis, ya que con la eliminación de sustancias solubles, se pierde una parte considerable de la masa inicial de la muestra en la cual es conocido el contenido de vitamina presente en ella, más desconocido en la parte que queda sin la presencia de sales minerales. Por el contrario, en caso de querer lavar la cantidad justa para analizar cada muestra de 1 g por si sola, se requerían de largos tiempos de lavado, y grandes volúmenes de agua, lo que no resultaba eficiente a largo plazo.

Para el lavado mostrado en la figura 21B, como se puede apreciar en la imagen, el contenido de la jeringa se desbordaba de la misma al adicionar el agua, esto debido a que la premezcla nutricional presenta entre sus componentes bicarbonato de sodio, que, al adicionar el agua, reacciona efervescentemente causando el rebalse del contenido de la jeringa, lo que provoca la pérdida de parte de la muestra, siendo esta la principal razón por la que se descartó este lavado. El lavado de la figura 21C surge a raíz del lavado anterior, siendo una variación del mismo, que se realizó con la finalidad de observar si se lograba desarrollar correctamente el lavado de la muestra, al ir adicionando el agua de manera controlada desde una jeringa de mayor tamaño, la cual fue montada

sobre la jeringa contenedora de la mezcla MSPD, evitando de esta manera la efervescencia. A pesar de esto, el lavado no resultó óptimo para las muestras, ya que el paso del agua se realizaba de manera muy lenta, aun cuando se ayudaba con la bomba de vacío al sistema, además, después de un punto el agua dejaba de pasar a través de la jeringa inferior, y se mantenía contenida en ella incapacitando el curso del lavado como tal.

En lugar de los lavados ya mencionados, se optó por un lavado previo a la extracción de la muestra, que resultó en un lavado mucho más sencillo para el operador, ya que no se requiere la constante participación del analista para llevarlo a cabo, siendo un lavado fácil y rápido, que consistió, como se describió en la metodología, en pesar 1 g de la premezcla a analizar situándola en un tubo cónico de 50 mL, agregando sobre ella 10 mL de agua destilada y agitando durante 5 minutos, para luego centrifugarla en dos ciclos de 5 minutos cada uno, desechando el sobrenadante para liofilizar la parte de la muestra decantada y poder obtenerla completamente seca. Los pasos de la etapa de limpieza se mostraron con anterioridad en la figura 14, donde también se indicaron las condiciones de los instrumentos utilizados. Este lavado se seleccionó para el tipo de muestra en estudio, debido a que es un lavado sencillo, que permite tener un mayor control sobre la cantidad de muestra lavada, y, por lo tanto, proporciona una idea sobre el contenido teórico de colecalciferol que debe haber en ella, además, utiliza pequeños volúmenes de agua para realizar el lavado, y el tiempo requerido para la limpieza, es sumamente corto. Si bien se podría considerar como desventaja el tiempo que se dedica al secado de las muestras mediante la liofilización, esta técnica nos permite secar de manera simultánea un gran número de muestras que pueden ser almacenadas hasta su análisis sin problema, sin poner en peligro a la vitamina ya que no se somete a altas temperaturas como sería el caso si se secara dentro de un horno, en el que probablemente se degradaría el colecalciferol presente en las muestras, por lo que la liofilización resulta ser una manera eficiente de eliminar el agua contenida en esta matriz, evitando la degradación del colecalciferol en el proceso. En nuestro caso en particular, se lograron liofilizar hasta 36 muestras de manera paralela. El lavado presentó como ventaja junto con las ya nombradas, la reducción de la cantidad de sustancias interferentes, pues eliminó parte de los minerales y otras especies solubles que afectaban inicialmente la elución y determinación de la vitamina, evitando el taponamiento de la columna cromatográfica.

Cabe señalar, que el procedimiento descrito para la limpieza de las muestras se probó para muestras de 1 y 2 g; para estas últimas, el volumen de agua añadido fue de 20 mL con el fin de

mantener la proporción masa-agua (1:10) con la que ya se habían obtenido buenos resultados. En ambos casos, se obtuvieron resultados similares en relación a la pérdida porcentual de masa respecto a la masa pesada inicialmente, que osciló entre los valores 30-50%, lo que podría ser un indicativo de la homogeneidad que presentan los lotes de muestra para esta matriz, siendo también un indicador de la calidad del muestreo realizado, pues el perder una masa semejante independiente de la cantidad de muestra tomada, sugiere que se pierde una porción constante de sustancias solubles. Esto se puede relacionar con que las muestras están compuestas por una cantidad definida de los diferentes componentes en la matriz respecto del total, que, si el lote de la matriz es homogéneo, no se deberían tener diferencias significativas en la pérdida de masa al lavar la muestra, independiente de la cantidad de muestra tomada. Un estudio detallado permitiría concluir de mejor manera respecto a estos resultados, para el cual se debería considerar la evaluación del alcance de los mismos en muestras de mayor tamaño.

5.2.2 Extracción del analito

Para la extracción del analito se utilizó la técnica de extracción MSPD, que consiste en agregar una fase sorbente, que, como se detalló en la introducción correspondió a corcho molido, junto con la muestra, en este caso, una premezcla nutricional, ambos en un mortero donde se llevó a cabo la dispersión.

La elección del corcho que se utilizó para el procedimiento de extracción, se basó en el estudio de la distribución de los tamaños de partícula de corcho obtenidos a partir del segundo proceso de molienda y tamizado al que fue sometido. En la figura 22, se muestran los resultados adquiridos a partir de este estudio, en donde se obtuvo que la mayor cantidad de corcho se centra en los tamaños correspondientes a >30 mesh (38,90 g) y >60 mesh (33,87 g), siendo estas dos fracciones las que se utilizarán a lo largo del estudio. Empleando la fracción de menor tamaño (>60 mesh) como fase sorbente natural, ya que, al tener un tamaño de partícula más pequeño, tiene una mayor área de superficie para interactuar con la vitamina generando una mejor retención de la misma en el corcho. Además, se debe señalar, que de ahora en adelante se mencionará como "corcho grueso" al corcho de tamaño >30 mesh y como "corcho fino o delgado" al corcho de tamaño >60 mesh.

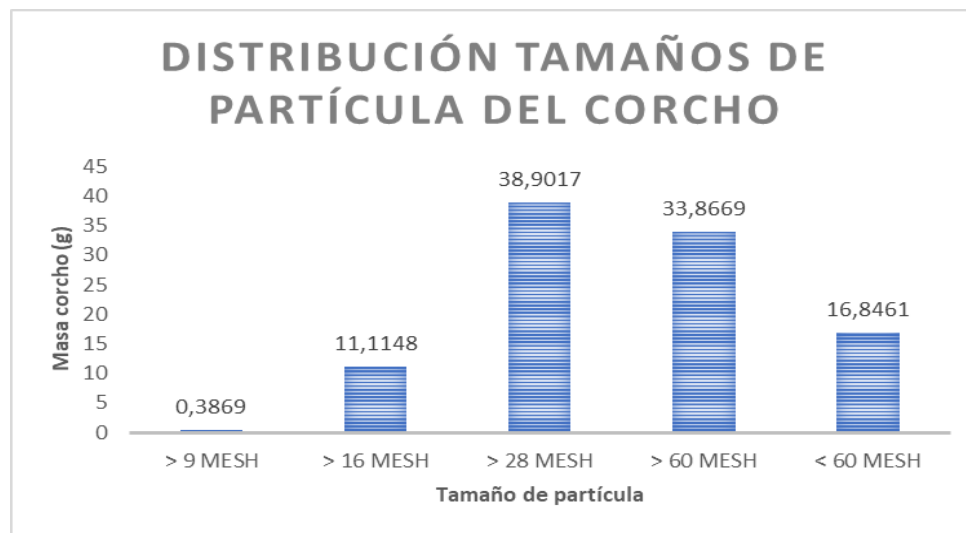


Figura 22 Resultados obtenidos del estudio de la distribución de los tamaños de las fracciones tamizadas de corcho. La mayor cantidad de corcho se centra en los tamaños >30 mesh >60 mesh.

Las cantidades de corcho a utilizar fueron seleccionadas siguiendo un método que se había optimizado previamente en el laboratorio de Química Ambiental de la universidad, en el cual se llevó a cabo la purificación de un compuesto mediante la técnica MSPD, usando una fase comercial como fase sorbente, correspondiente a 100 mg de C18, adicionalmente se agregaba 100 mg de florisil y 50 mg de Na_2SO_4 para llevar a cabo la dispersión junto con la muestra en el mortero [49]. Debido a que en el estudio descrito en este trabajo se busca utilizar fases naturales como fase sorbente, el C18 se reemplazó con 100 mg de corcho delgado, y se mantuvo en el procedimiento la adición de 50 mg de Na_2SO_4 , ya que las muestras trabajadas tendían a absorber rápidamente humedad. En el caso del florisil, inicialmente se añadía una capa de florisil a los cilindros de jeringa, para luego montar sobre esta capa, la mezcla MSPD; sin embargo, considerando que la función que cumple el florisil es el de retener compuestos polares y, que la finalidad de desarrollar esta metodología es alinearse lo más posible con los principios de la química verde, disminuyendo el uso de sustancias auxiliares, se dejó de agregar ya que las muestras eran previamente lavadas con agua para eliminar las sustancias interferentes polares que pudieran estar contenidas en la matriz, y no se obtuvo variación en los resultados al eliminar el uso de este compuesto.

Por lo tanto, la extracción se llevó a cabo utilizando 100 mg de corcho delgado, 50 mg de Na_2SO_4 y la muestra, que luego de su liofilización presentaba un peso de alrededor del 30-50% de su peso inicial como fue comentado con antelación, estos fueron añadidos en un mortero de porcelana donde se llevó a cabo la dispersión por alrededor de 30 segundos hasta formar la mezcla homogénea. Los componentes para llevar a cabo la extracción se pueden observar en la figura 23.

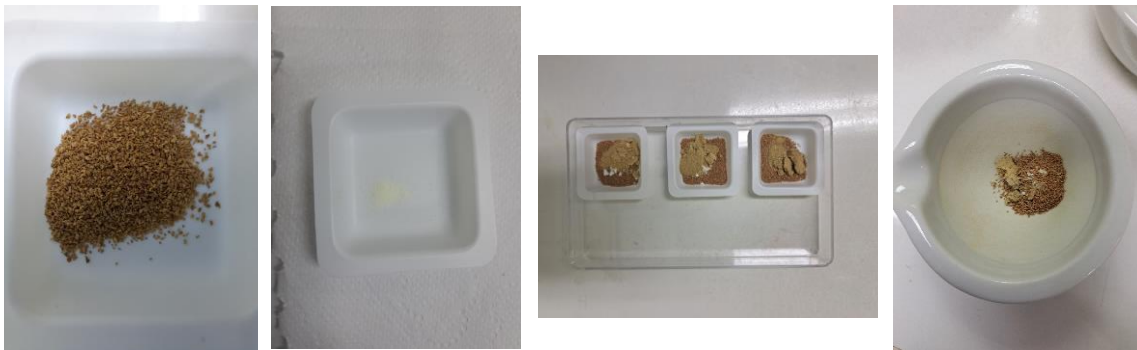


Figura 23 Componentes para realizar la extracción del analito, se utilizó 100 mg de corcho delgado, 50 mg de Na_2SO_4 y la muestra previamente liofilizada.

5.23 Elución del analito

Como última etapa de la optimización de factores que afectaran la extracción del analito, se procedió a optimizar la composición de la jeringa y los disolventes de elución. Como se comentó, una de las razones de la etapa de limpieza de la muestra, fue el hecho que los filtros PVDF conectados a la jeringa, se colapsaban por la dispersión de tamaños de los componentes de la muestra; no obstante, pese al lavado, los filtros seguían tapándose debido al paso de sustancias presentes en las premezclas nutricionales. Debido a lo anterior, se realizó una optimización de la composición de la jeringa. Como el filtro de menor tamaño de poro presentaba problemas para la elución, lo primero que se hizo fue cambiarlo por un filtro PVDF de $0,45\ \mu m$, aun así, los filtros se seguían tapando, impidiendo el paso del disolvente a través de él. Esto generó que se tuviera que tomar una segunda medida con el fin de evitar el colapso, evaluando la opción de adicionar una capa antes de cargar la mezcla MSPD dentro de la jeringa, que cumpliera la labor de retener dentro de la misma, las partículas de mayor tamaño impidiendo así el taponamiento del filtro, para esto se probó agregando una capa de algodón y una capa de lana de vidrio. En el caso de la capa de algodón, se presentó una elución mucho más lenta en comparación a la elución utilizando lana de vidrio, además, la capa de algodón eventualmente absorbía suficiente disolvente formando una especie de tapón dentro de la jeringa que impedía el paso del disolvente, por lo que se decidió

utilizar una capa de lana de vidrio para ayudar en la retención de partículas de mayor tamaño en la etapa de la elución. La lana de vidrio resultó ser una opción que no presentó problemas para el paso del disolvente a través de ella, transcurriendo de forma bastante rápida, e impidiendo el paso de gran parte de los componentes que pudieran taponar el filtro; pese a esto, a medida que transcurría el tiempo de elución, eventualmente el filtro se volvía a taponar. Provocando que como tercera medida se agregarán 100 mg de corcho grueso, el que fue incorporado junto con la mezcla MSPD dentro de la jeringa, y que favoreció el transporte del disolvente, ayudando a que la elución se desarrollara con normalidad. Finalmente, al servirse de las tres medidas antes mencionadas, se logró llevar a cabo la elución de manera rápida y eficaz. En la figura 24 se muestran los cambios antes descritos variando la composición de la jeringa para llevar a cabo la elución del analito.

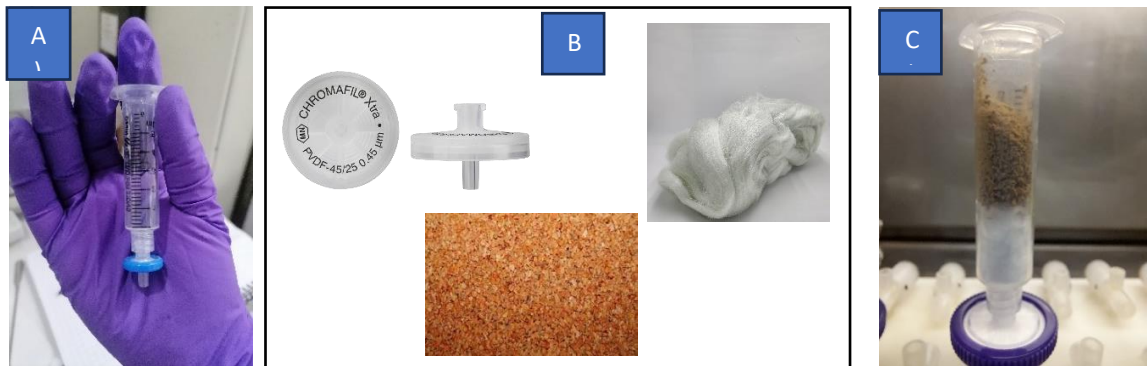


Figura 24 A) Composición inicial de la jeringa, que consistía en el cilindro de la jeringa provisto de un filtro PVDF de 0,22 μm . B) Elementos adicionados a la composición inicial, en el caso del filtro de 0,22 μm , se reemplazó por un filtro de 0,45 μm , se adicionó a la composición inicial una capa de lana de vidrio y 100 mg de corcho grueso. C) Composición final de la jeringa luego de los cambios realizados en esta etapa.

La formación de la especie de tapón al utilizar algodón como filtro, se puede explicar debido a que el algodón está formado en su mayoría por celulosa, que debido a la presencia del grupo hidroxilo en su estructura, va a poder interactuar fuertemente con los disolventes polares como lo son los alcoholes utilizados para la elución del analito, lo que no sucede al utilizar lana de vidrio que es mucho más inerte que el algodón, por lo que no interacciona a tal punto con los componentes contenidos en la jeringa, permitiendo una rápida elución.

Para la optimización del disolvente de elución se probaron diferentes disolventes y mezclas de estos, con el objetivo de determinar cuál de ellos generaba los mejores resultados en términos de eficiencia y rapidez en el proceso de elución, así como también de evaluar los resultados cromatográficos obtenidos. Para esto, se armaron jeringas con los componentes descritos anteriormente y se cargó en ellas la mezcla MSPD, se probó como disolvente de elución isopropanol, etanol, metanol, y acetona, también se probó eluir con mezclas de estos disolventes, probando las mezclas de etanol-acetona, etanol-metanol, metanol-acetonitrilo y metanol-acetona, todas en una proporción 1:1 de cada disolvente. En la figura 25, se muestran los resultados obtenidos al realizar la elución de la muestra con disolventes puros.

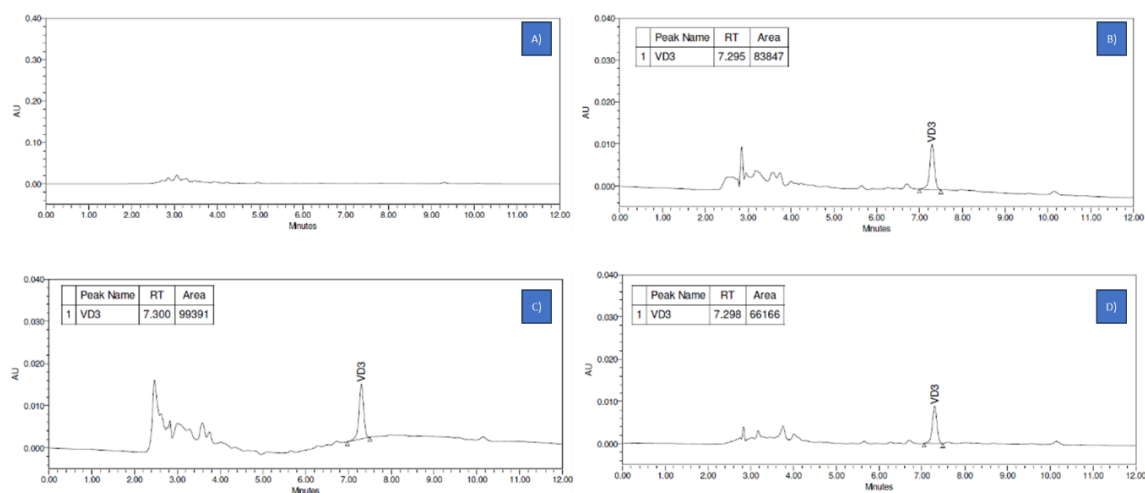


Figura 25 Cromatogramas obtenidos al realizar la elución con diferentes disolventes. A) Resultado para la elución con isopropanol. B) Resultado para la elución con etanol. C) Resultado para la elución con metanol. D) Resultado para la elución con acetona.

Como se puede ver en la figura 25A), al realizar la elución con isopropanol no se obtenía señal cromatográfica para esta matriz, por lo que no es adecuado como disolvente de elución. Para los otros tres disolventes probados, se generó señal cromatográfica, en el caso del etanol (figura 25B)), el problema se presentó al momento de realizar la elución en sí, proceso que empezó a tardar mucho más en comparación con otros disolventes, debido a que el contenido de la jeringa se compactaba dentro de ella generando un proceso de elución más lento. Como se observa en la figura 25C), al utilizar metanol como disolvente de elución, se generaba un cromatograma con una mala línea base, además de que presentaba el mismo problema que al eluir con etanol, compactándose el contenido dentro de la jeringa lo que se traducía en eluciones mucho más lentas. El último disolvente puro probado fue la acetona, que fue la que presentó los mejores resultados en comparación a los otros disolventes puros, la cromatografía resultante fue bastante buena, con

una buena separación de los otros componentes de la matriz y la elución se llevó a cabo de manera rápida; sin embargo, para evitar problemas de arrastre de otros componentes indeseables debido a la polaridad de la acetona, se probó la elución con las mezclas de disolventes ya mencionados. En la figura a continuación, se muestran los resultados obtenidos.

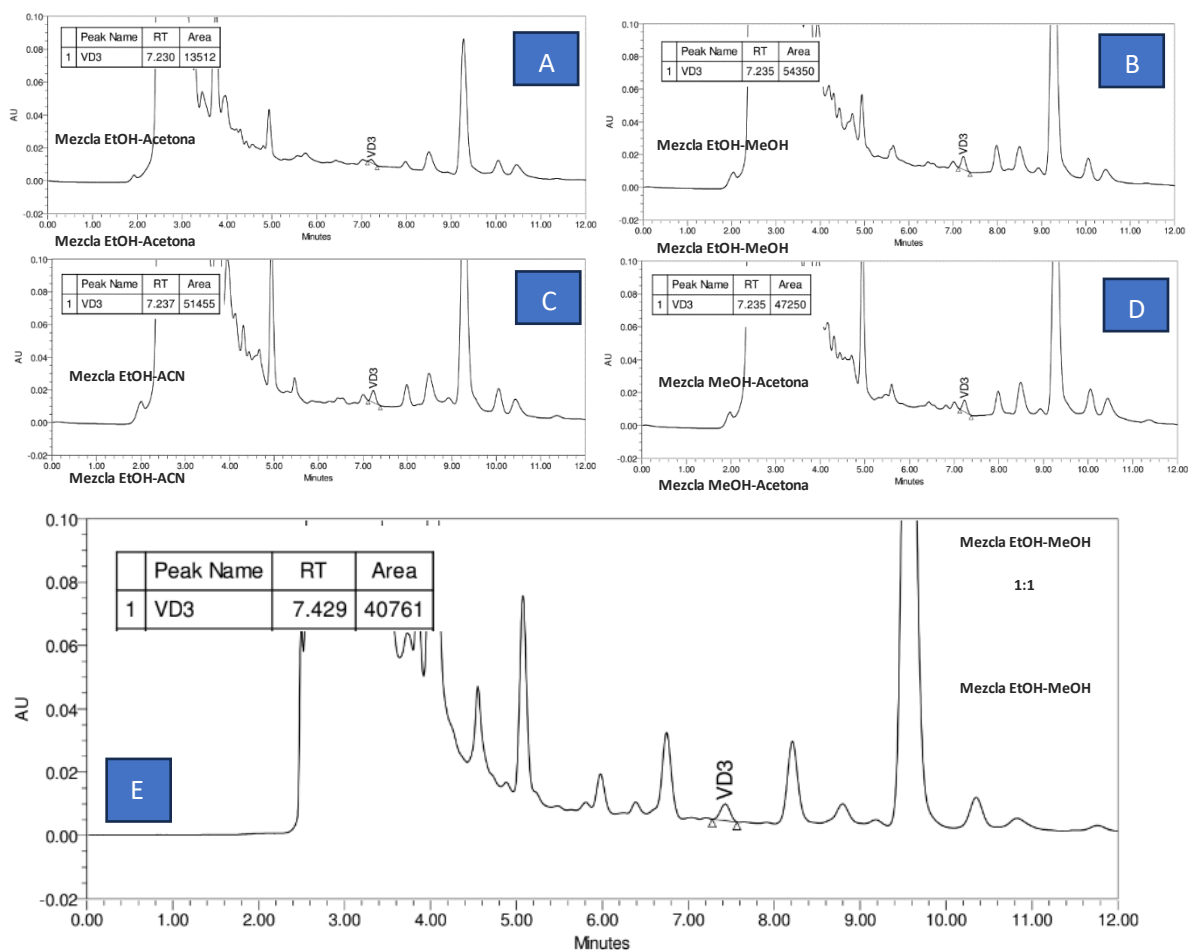


Figura 26 Cromatogramas obtenidos al realizar la elución con las mezclas de los disolventes. A) Resultado para la elución con una mezcla de EtOH-acetona. B) Resultado para la elución con una mezcla de EtOH-MeOH a 35°C C) Resultado para la elución con una mezcla de EtOH-ACN. D) Resultado para la elución con una mezcla de MeOH-ACN. E) Resultado para la elución con una mezcla de EtOH-MeOH a una temperatura de 45°C

En el caso de las mezclas de disolventes, con todos se obtuvo una cromatografía similar en términos de línea base y área del pico, exceptuando el caso de la elución con etanol-acetona (figura 26A) que presentó una menor área respecto a las otras mezclas. Sin embargo, se escogió la mezcla de metanol-etanol como mezcla de elución (figura 26E), debido a que fue la mezcla que presentó la mejor separación del pico cromatográfico del analito de interés, pues con las otras mezclas, en

la cromatografía se puede observar el solapamiento de dos señales lo que impediría la correcta cuantificación. Con el fin de asegurar la completa desorción del analito retenido en el corcho, se utilizó un volumen de 8 mL de esta mezcla, en dos eluciones secuenciales de 4 mL cada una.

5.3. Validar la metodología según los criterios de la VICH.

Como se mencionó anteriormente, la validación de la metodología se realizó según los criterios de la VICH, evaluando los parámetros linealidad, límites de detección (LD) y de cuantificación (LC), precisión y exactitud, para una muestra correspondiente a una premezcla nutricional de perro cachorro, la cual presenta una concentración de colecalciferol informada de 43 UI/g.

5.3.1 Linealidad: Curva de estándares

La linealidad del colecalciferol se evaluó mediante una curva de calibrado de estándares, evaluando el rango que abarcó desde los 15,8 UI/mL hasta los 94,6 UI/mL. Obteniendo lo que se muestra en la figura 27, en donde se puede observar que el colecalciferol presentó un comportamiento lineal para el rango en estudio, con un buen coeficiente de determinación ($R^2 = 0,9998$).

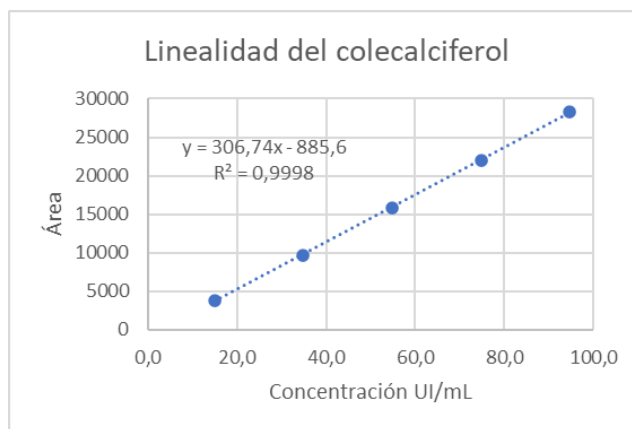


Figura 27 Gráfico que muestra el área obtenida en función de la concentración de los estándares de colecalciferol, para evaluar la linealidad de éste en el rango que va desde los 15,8 UI/mL hasta los 94,6 UI/mL.

La linealidad se evaluó en diferentes rangos de concentraciones según las muestras a estudiar, exhibiendo un comportamiento lineal en todos los rangos estudiados, con un buen coeficiente de determinación.

5.3.2 Linealidad: Curva en matriz

Como las premezclas nutricionales de perro corresponden a una matriz altamente compleja en donde existe presencia de distintos componentes, se evaluó la linealidad en una curva en matriz, para poder evaluar la concentración del analito considerando el aporte producido por la matriz. Esta curva en matriz se preparó a partir de un blanco de la matriz el cual fue fortificado a distintas concentraciones de estudio, abarcado el rango desde los 15,8 UI/mL hasta las 126,1 UI/mL. A continuación, se muestra lo obtenido para la curva en matriz.

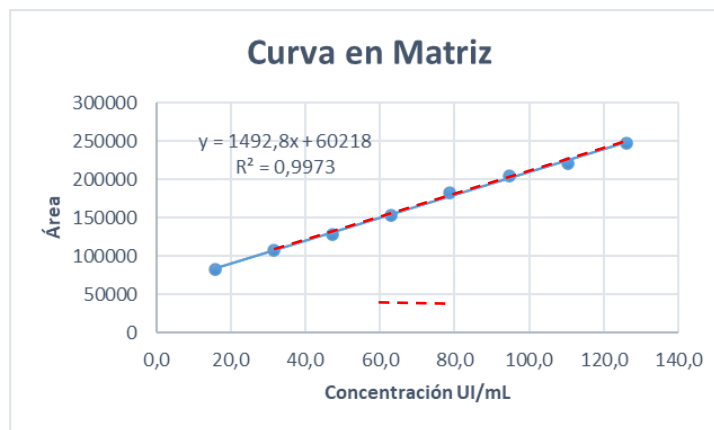


Figura 28 Gráfico que muestra el área obtenida en función de la concentración de distintos blancos de matriz fortificados con una alícuota de estándar de colecalciferol, para evaluar la linealidad en curva en matriz a distintas concentraciones en un rango que va desde los 15,8 UI/mL hasta los 126.1 UI/mL.

Como se puede ver en la figura 28, en la curva en matriz también existe un comportamiento lineal en el rango estudiado, con un buen coeficiente de determinación $R^2 = 0,9973$.

Se realizó un análisis estadístico a los datos de la curva estándar y la curva en matriz, para evaluar la significancia de los parámetros asociados al modelo de regresión lineal. En las figuras 27 y 28, se observa que el orden de magnitud entre las variables de concentración y área, son diferentes, donde la variable área tiene por lo menos dos órdenes de magnitud más que la variable concentración. Debido a lo anterior, se normalizarán estos valores, para poder realizar los análisis de significancia de cada uno de los coeficientes obtenidos de la regresión lineal para cada curva.

Para realizar este análisis estadístico, se utilizaron modelos de regresión lineal con sus respectivas métricas de evaluación, esto se llevó a cabo utilizando los paquetes statsmodels.api y sklearn del lenguaje de programación Python, en su versión 3.11. Lo primero que se realizó, fue la normalización de las variables usando el segundo paquete antes mencionado, utilizando la función

MinMaxScaler(), que genera una distribución de las variables en el intervalo [0,1], luego se realizó una regresión lineal utilizando la función OLS() entre las variables de concentración y área normalizadas.

En la figura 29A, se puede observar la curva en matriz normalizada, obtenida a partir del procedimiento descrito en el párrafo anterior. Donde se observa el ajuste del modelo lineal a los datos obtenidos, que luego de la normalización siguen la misma tendencia. En la figura 29B, se muestran los resultados estadísticos para el modelo de regresión lineal ajustado entre las variables área y concentración normalizadas, donde el parámetro constante, el intercepto, presenta una significancia (p-value) mayor a 0,05, lo que nos indica que no se puede rechazar la hipótesis nula, demostrando estadísticamente, que el intercepto no es significativo para el ajuste lineal de la curva.

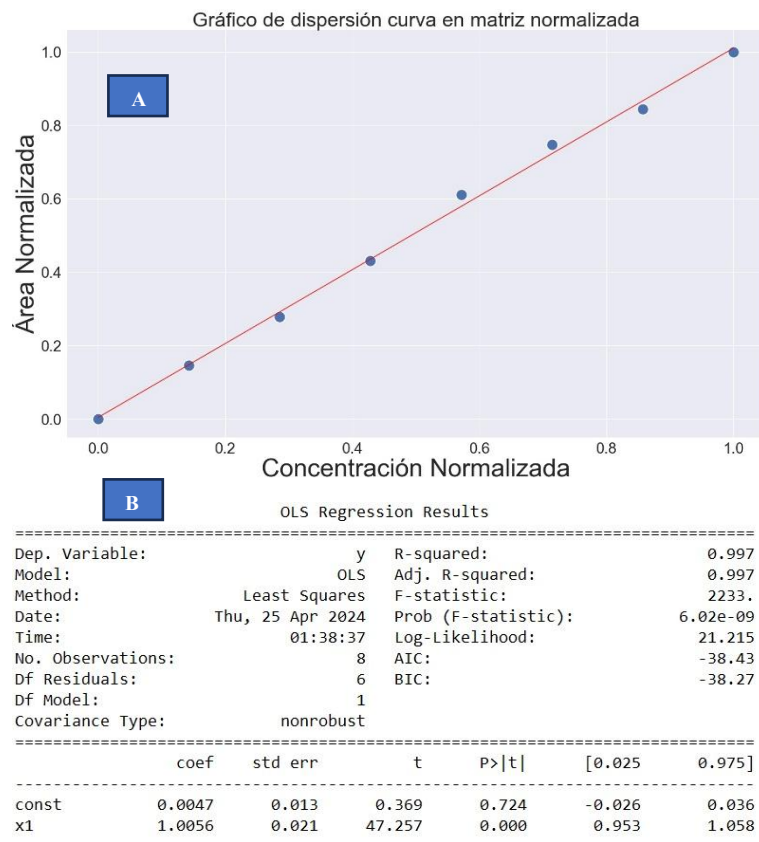


Figura 29 Gráfico de dispersión de las variables normalizadas para la curva en matriz (A), junto con sus respectivas métricas de evaluación (B).

Para la curva estándar, también se realizó el procedimiento descrito anteriormente, obteniendo lo que se muestra en la figura 30. En la figura 30A, se puede observar el ajuste del modelo lineal a los datos obtenidos de la curva de calibración. En la figura 30B, se observan los resultados estadísticos para el modelo de regresión lineal entre las variables área y concentración normalizadas, donde se observa que el parámetro constante, el intercepto, presenta una significancia (p-value) mayor a 0,05, lo que nos indica que no se puede rechazar la hipótesis nula, por lo que estadísticamente, el intercepto no es significativo para el ajuste lineal de la curva.

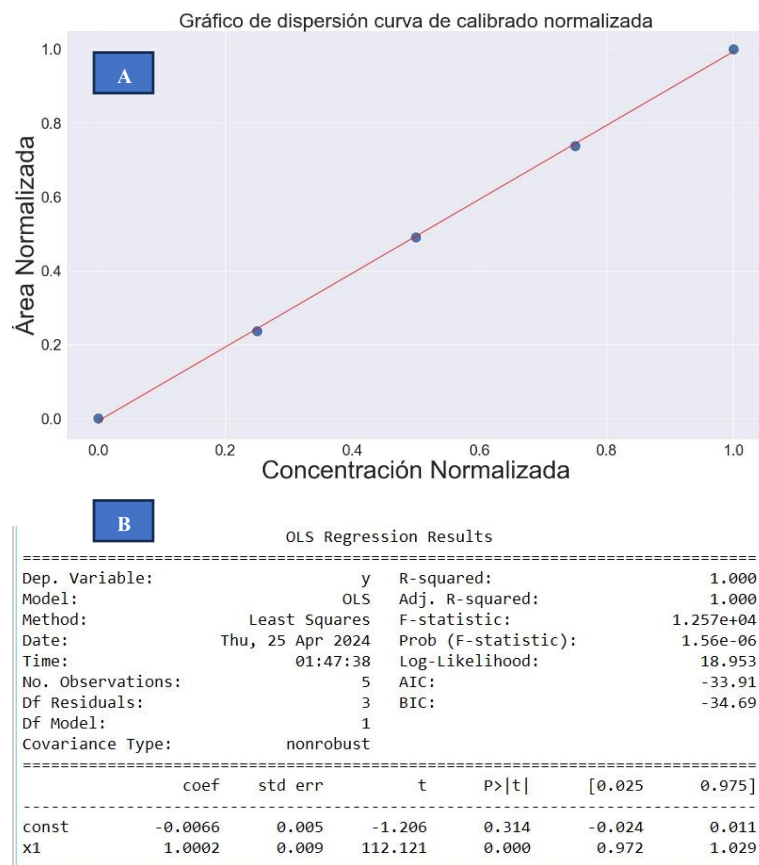


Figura 30 Gráfico de dispersión de las variables normalizadas para la curva estándar (A), junto con sus respectivas métricas de evaluación (B).

Debido a que en ambas curvas el intercepto no es una variable significativa para el ajuste lineal, se puede prescindir de ella en el modelo de regresión lineal aplicado a las curvas correspondientes, puesto que los datos se ajustarían de la misma manera a la recta generada por el producto entre la pendiente y los valores de concentración normalizada. Considerando lo anterior, se podría generar un gráfico de las variables área y concentración con distinta escala, y de esta manera, se

observarían curvas similares a las mostradas en las figuras 29A y 30A, esto no se realiza debido a que las unidades de los gráficos carecerían de sentido, y por lo tanto su interpretación, sería más complicada respecto al análisis estadístico realizado con las variables normalizadas.

Considerando los resultados ilustrados en la figura 29B, fijándose particularmente en el valor para el intercepto, se puede notar que este es cercano a 0, por lo tanto, si se quisiera volver a las magnitudes originales de la figura 28, al hacer la transformación inversa de la normalización, se obtendría un valor para el intercepto de 51.175, que está en el mismo orden del intercepto mostrado en dicha figura. Lo anterior se puede explicar debido a que, el valor del área entregada por el equipo es muy grande en comparación a las unidades de la concentración con las que se trabajó, en conclusión, el valor numérico aparentemente grande obtenido para el intercepto en esta curva, no es representativo y no se debe considerar para los análisis químicos, pues es un valor matemático sin significancia estadística. Este mismo análisis, se puede realizar para los datos mostrados en la figura 30B.

5.3.3 Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)

Se obtuvieron los límites de detección y de cuantificación a partir de los parámetros asociados a la regresión lineal de la curva en matriz. En la tabla V, se muestran distintos parámetros relevantes de la regresión lineal obtenidos para la curva en matriz mostrada en la figura 28. Para determinar los límites, se utilizó en particular la incerteza asociada al intercepto junto con la pendiente de la curva como se mostró en las ecuaciones 1 y 2, donde LD se calculó como 3,3 veces el error del intercepto sobre la pendiente, y LC se calculó como 10 veces el error del intercepto sobre la pendiente de la curva.

Obteniendo como resultado un LD = 5,6 UI/mL y un LC = 16,8 UI/mL, que equivalen a valores de 2,8 UI/g y 8,4 UI/g respectivamente, que debido a la concentración informada para la premezcla de perro cachorro, nos permitiría cuantificar el colecalciferol contenido en las muestras estudiadas con un buen nivel de confianza.

Tabla V Parámetros obtenidos de la regresión lineal de la curva en matriz.

Parámetro	Valor obtenido
Pendiente (m)	1492,8
Intercepto (n)	60218
σ_m	31,6
σ_n	2514,2
R^2	0,997
Suma residuos cuadrados	0,937

5.3.4 Precisión

Para la precisión como repetibilidad, se determinó un coeficiente de variación porcentual (CV%) a partir de las concentraciones de colecalciferol obtenido en las distintas muestras analizadas. Para comprobar con cuál curva se obtenían mejores resultados, se analizó el CV% tanto para las muestras cuantificadas con la curva estándar, así como también para las muestras cuantificadas con la curva en matriz. En la tabla VI se muestran los resultados obtenidos para las muestras analizadas con la curva estándar, mientras que en la tabla VII, se muestran los resultados obtenidos para las muestras analizadas con la curva en matriz. Cabe señalar que en ambas tablas se muestra la concentración en UI/mL, ya que en estas unidades se obtiene la concentración desde las curvas preparadas, pero como se trata de una muestra sólida, también se agregó una columna en donde se informa la equivalencia de la concentración en UI/g para mejorar la comprensión de lo que aquí se describe.

Tabla VI Resultados obtenidos para la repetibilidad al determinar la concentración experimental de la muestra utilizando la curva estándar.

Muestra	Concentración UI/mL	Concentración UI/g	Promedio concentración UI/mL	Desviación estándar	CV%
1	123,4	61	120,3	16,6	13,8
2	138,2	69			
3	100,1	50			
4	123,5	61			
5	136,0	68			
6	100,5	50			

Tabla VII Resultados obtenidos para la repetibilidad al determinar la concentración experimental de la muestra utilizando la curva en matriz.

Muestra	Concentración UI/mL	Concentración UI/g	Promedio concentración UI/mL	Desviación estándar	CV%
1	65,1	32	64,5	3,4	5,3
2	68,1	34			
3	60,3	30			
4	65,1	32			
5	67,7	34			
6	60,4	30			

Como se puede ver en la tabla VI, al cuantificar el colecalciferol contenido en las muestras utilizando la curva estándar, se obtienen concentraciones mayores a la concentración informada para la premezcla nutricional, presentando una desviación estándar alta para los resultados mostrados y, por lo tanto, obteniendo un coeficiente de variación también alto (13,8%). En el caso de los resultados obtenidos al cuantificar las muestras con la curva en matriz, se obtienen concentraciones mucho más bajas, que corresponden a la mitad de las informadas con la curva estándar, las concentraciones obtenidas con curva en matriz presentan mayor concordancia con la concentración de colecalciferol informada por la empresa para estas muestras. Se obtiene además una desviación estándar baja entre los resultados, obteniendo, por tanto, un coeficiente de variación más bajo que al usar la curva estándar (5,3%).

Resulta importante mencionar que el criterio de aceptación de la VICH para la precisión como repetibilidad, es de $CV\% \leq 10\%$, por lo que los resultados obtenidos al utilizar la curva en matriz como curva para cuantificar el analito, permite obtener resultados de acuerdo con lo descrito en la VICH. Las grandes diferencias obtenidas al cuantificar con una curva u otra, se deben a que con la curva en matriz, se considera el impacto de la matriz en la cuantificación, considerando el aporte dado por las interferencias que están presentes en la matriz, que puedan estar aumentando o disminuyendo la señal, lo que permite corregir los resultados, generando que se obtengan resultados más cercanos al valor real.

Es importante señalar, que estas muestras son preparadas en la misma empresa, controlando y llevando un registro de la adición de colecalciferol que es agregado en ellas, por lo que es lógico obtener valores más bajos de concentración de colecalciferol que el valor informado, no así

obtener valores más altos. Los bajos valores obtenidos al utilizar la curva en matriz, puede deberse a la degradación de la vitamina por un mal almacenamiento, a pérdidas en el manejo de las muestras, o simplemente a errores asociados a la metodología en sí, por lo que los resultados obtenidos con curva en matriz no implican necesariamente que sea un mal resultado. En el caso de los resultados obtenidos con curva estándar, la explicación más probable para obtener valores de colecalciferol más alto a los valores informados, es que posiblemente se está considerando algún compuesto inherente de la matriz, que aporta área en nuestro analito a la hora de realizar la cuantificación.

Para la precisión como precisión intermedia, se determinó nuevamente el CV% a partir de los resultados obtenidos para distintas muestras de la premezcla nutricional estudiada. El procedimiento en su totalidad fue realizado por un analista diferente, cambiando también el día en el que se realizaron las muestras y variando los instrumentos utilizados. Los resultados de este estudio son mostrados en la tabla VIII, donde al igual que en las tablas anteriores, se muestra la concentración del analito en UI/mL, obtenida a partir de la cuantificación con la curva en matriz, y su respectiva conversión a concentración en UI/g ya que se trata de una matriz sólida.

Tabla VIII Resultados obtenidos para el estudio de la precisión intermedia al determinar la concentración experimental de la muestra a partir de la curva en matriz

Muestra	Concentración UI/mL	Concentración UI/g	Promedio concentración UI/mL	Desviación estándar	CV%
1	65,8	33	69,9	6,9	9,9
2	79,5	40			
3	71,9	36			
4	64,3	32			
5	64,0	32			
6	67,8	34			
7	64,9	32			
8	81,0	41			

En el caso de la precisión intermedia al cuantificar con la curva en matriz, nuevamente se obtienen concentraciones menores a las informadas por la empresa, éstas presentan una desviación estándar mayor que para el caso de repetibilidad, lo que se puede deber a que hay dos valores que se escapan un poco de la tendencia de los demás valores, alcanzando los 40 UI/g, no obstante a lo anterior, se obtiene un coeficiente de variación de 9,9%, estando dentro del criterio de aceptación planteado por la VICH.

5.3.5 Exactitud

La exactitud se evaluó en términos de un porcentaje de recuperación, determinando el contenido de colecalciferol en 8 réplicas de una muestra de premezcla nutricional, calculando la recuperación de esta frente al valor teórico de colecalciferol informado en las mismas por la empresa. En la tabla IX, se resumen los resultados del estudio de la exactitud, al igual que en los casos anteriores se muestra la concentración tanto en UI/mL, debido a que en estas unidades se evalúa desde la curva en matriz, como también se muestra en UI/g, unidades en las que se informa el valor teórico de colecalciferol en esta matriz.

Como se puede notar, la concentración de colecalciferol contenido en las premezclas nutricionales es más baja que la informada por la empresa, y varían entre el 70-90% del valor real, obteniendo un valor promedio de recuperación del 80% (% Re prom), lo que está dentro del criterio de aceptación otorgado por la VICH según la concentración de este tipo de muestras.

Tabla IX Resultados obtenidos para la evaluación de la exactitud expresada en un % de recuperación.

Muestra	Concentración UI/mL	Concentración UI/g	Concentración informada UI/mL	% Recuperación	% Re prom
1	64	32	86	70	80
2	68	34		80	
3	81	41		90	
4	65	32		80	
5	64	32		80	
6	66	33		80	
7	80	40		90	
8	72	36		80	

En la tabla X, se muestran los parámetros propuestos por la guía VICH para validar metodologías analíticas, en la cual se resume la manera de evaluar dichos parámetros, junto con el criterio de aceptación que define la guía para aceptar metodologías aplicadas a productos farmacológicos/nutricionales de uso veterinario. Como se puede observar en la tabla, y como también se ha mencionado a lo largo de este estudio, la guía propone rangos donde se deben encontrar los valores de los parámetros para aceptar la metodología desarrollada, debido a esto, no es correcto determinar un grado de cumplimiento. Sin embargo, para la metodología desarrollada en este estudio, se evaluaron los parámetros mostrados en la tabla, y los resultados

Tabla X Parámetros descritos por la guía VICH para la validación de metodologías analíticas.

Parámetro	Evaluación	Grado de cumplimiento
Linealidad	Se evalúa en una curva de calibrado mediante métodos estadísticos apropiados, como una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados determinando el cuadrado del coeficiente de correlación de Pearson, el cual debe presentar un valor cercano a 1 para ser aceptado. La linealidad debe ser evaluada en un rango de por lo menos 5 concentraciones conocidas diferentes.	Se logra totalmente el cumplimiento de cada uno de los parámetros evaluados para la validación de la metodología desarrollada según los criterios otorgados por la guía VICH
Exactitud	Se evalúa mediante la recuperación del analito, medida como un porcentaje de recuperación. La exactitud recomendada para un método depende de la concentración del analito, para el analito dado (43 UI/g ó 1,075 µg/g), el criterio de aceptación de exactitud es obtener recuperaciones dentro del rango entre -20% a +10%.	
Precisión	Como repetibilidad, puede ser evaluada usando un mínimo de 6 determinaciones al 100% de la concentración. Como precisión intermedia, se puede estudiar como el efecto de eventos aleatorios en la precisión del procedimiento analítico, donde las típicas variaciones corresponden a días, analista, equipamiento, etc., no es necesario estudiar el efecto de estos de manera individualizada. Se informa mediante el coeficiente de variación (CV%), y el rango de aceptación estará determinado por la concentración del analito, para el analito dado, el criterio de aceptación es CV% ≤10%	
Límite de detección (LD)	Se puede determinar basándose en la desviación estándar de la respuesta (σ) y la pendiente (m) como $LD = \frac{3,3 \sigma}{m}$	
Límite de cuantificación (LC)	Se puede determinar basándose en la desviación estándar de la respuesta (σ) y la pendiente (m) como $LC = \frac{10 \sigma}{m}$	
Selectividad/Especificidad	Puede ser demostrada con la resolución de los dos componentes que eluyen cercanos uno del otro.	

obtenidos del estudio, permiten concluir que la metodología analítica, es adecuada para ser utilizada en premezclas nutricionales.

5.4. Realizar estudios de dispersión de distintas premezclas nutricionales de Veterquímica S.A.

Para el cumplimiento de este objetivo, se realizaron estudios de dispersión en distintas premezclas nutricionales entregadas por la empresa. El estudio se realizó en términos de la homogeneidad que presentaban los diferentes lotes de muestras entre sí; para esto, se tomó de manera aleatoria una cantidad de muestra de un mismo lote para llevar a cabo el análisis del contenido de colecalciferol presente en ella. El grado de dispersión entre los resultados se estudió mediante el coeficiente de variación, del mismo modo que se realizó para los parámetros de validación. En la tabla XI, se muestran los resultados del estudio de homogeneidad para una premezcla nutricional de perro cachorro, en donde se obtuvo una concentración promedio de 32,4 UI/g, una desviación estándar de 2,0 UI/g y un CV% de 6,2%, por lo que no habría una diferencia significativa al tomar de manera azarosa la muestra desde un mismo lote para este lote en particular.

Tabla XI Resultados obtenidos para la evaluación de la homogeneidad de un lote correspondiente a una premezcla nutricional de perro cachorro (L:119668).

Muestra	Concentración obtenida (UI/g)	Promedio concentración (UI/g)	Desviación estándar	CV%
1	32,6	32,4	2,0	6,2
2	34,3			
3	30,3			

Tabla XII Resultados obtenidos para la evaluación de la homogeneidad de un lote correspondiente a un núcleo nutricional (L:111451).

Muestra	Concentración obtenida (UI/g)	Promedio concentración (UI/g)	Desviación estándar	CV%
1	2685	3066	316	10
2	3034			
3	3364			
4	3126			
5	3504			
6	3310			
7	2832			
8	2676			

En la tabla XII, se muestran los resultados obtenidos para el estudio de la homogeneidad de un lote correspondiente a un núcleo nutricional de perro adulto, para el cual se obtuvo una concentración promedio de 3066 UI/g, una desviación estándar de 316 UI/g y un CV% de 10%. Cabe recordar que los núcleos nutricionales son muestras donde el contenido de colecalciferol está mucho más concentrado que en las premezclas nutricionales, sin embargo, los bajos contenidos de colecalciferol encontrados en estas muestras pueden deberse a que estos fueron estudiados bastante tiempo después de la preparación de los mismos, sin tomar resguardos para su almacenamiento, por lo que probablemente la vitamina se degradó en el transcurso del tiempo. No obstante, el CV% obtenido se encuentra en el límite superior (10%), que generalmente es aceptado para la dispersión de las muestras estudiadas en este rango de concentración según la guía VICH.

En la tabla XIII, se muestra el resultado obtenido para el estudio de homogeneidad de un lote de una premezcla nutricional de perro cachorro, al igual que en los casos antes presentados, para esta matriz también se obtuvo un coeficiente de variación aceptable, teniendo un valor de 9,4%.

Los valores obtenidos para el coeficiente de variación de las distintas muestras, indican que aparentemente existe homogeneidad en el contenido de colecalciferol que éstas presentan, y que no depende de la porción de la muestra que se tome, aun cuando se trata de una matriz sólida y con bajo contenido de colecalciferol como lo son las premezclas nutricionales.

Tabla XIII Resultados obtenidos para la evaluación de la homogeneidad de un lote de una premezcla nutricional correspondiente a un perro cachorro.

Muestra	Concentración obtenida (UI/g)	Promedio concentración (UI/g)	Desviación estándar	CV%
1	32	35	3,3	9,4
2	34			
3	41			
4	32			
5	32			
6	33			
7	40			
8	36			

5.5. Evaluar la factibilidad de aplicar la metodología en otras matrices como alimentos completos de uso animal, con intervalos concentración menor de vitamina D_3 a niveles de $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Como último objetivo planteado en un comienzo, se propuso evaluar la factibilidad de aplicar la metodología en otras matrices como los alimentos completos. Como se mostró en la figura 11, los alimentos completos son matrices de producto terminado, donde la vitamina está presente en una concentración menor, que la que presentan en las premezclas nutricionales, siendo estas de 0,050 UI/g y 50 UI/g para el alimento completo y la premezcla nutricional respectivamente. Debido a esto, y considerando los límites que se obtuvieron al trabajar con la premezcla nutricional, $LD = 2,8 \text{ UI/g}$ y $LC = 8,4 \text{ UI/g}$, es que se determinó que no es posible aplicar la metodología en matrices como los alimentos completos, pues la sensibilidad de la metodología no me permitiría detectar el analito de interés por la baja concentración que éste tiene en esta matriz, considerando que su concentración es de dos órdenes de magnitud menor que lo que mi metodología puede detectar, es decir, tendría que concentrar cien veces la muestra para alcanzar el límite en el que se pueda detectar, lo que no resulta ser una opción viable.

Para poder detectar el analito en concentraciones tan bajas de vitamina, se podrían estudiar otras opciones como lo sería el análisis y detección por cromatografía líquida acoplada a un detector de masas, con lo cual se lograría un límite de detección menor y se podría trabajar en matrices más diluidas como el producto terminado o alimento completo, pero con la metodología aquí presentada y, con el equipo utilizado, no es factible la determinación de colecalciferol en dichas matrices.

5.6. Evaluación del verdor de la metodología.

Como último paso para terminar el estudio, se evaluó el verdor de la metodología presentada utilizando la herramienta AGREEprep, a continuación, se detalla el análisis y los resultados para el estudio del verdor.

En este caso en particular, la preparación de muestra para la matriz de estudio consiste en tres etapas, la primera etapa corresponde a una limpieza para eliminar interferentes, la segunda etapa corresponde a la extracción del analito con la técnica MSPD, y finalmente la última etapa corresponde al secado y preconcentración del analito. Para el análisis de los materiales y reactivos utilizados, se tomó como guía las cantidades necesarias para la preparación de una muestra de la

premezcla nutricional de perro cachorro en cada una de estas etapas. En la tabla XIV, se mencionan los diferentes materiales, reactivos y disolventes utilizados para la preparación de la muestra.

Tabla XIV Materiales, reactivos y disolventes necesarios para la preparación de una muestra de premezcla nutricional de perro cachorro

Materiales/Reactivos/Disolventes	Cantidad
Muestra (premezcla nutricional)	2 g
Tubo de polipropileno	1 unidad (13,6 g)
Agua	20 mL
Corcho fino	0,1 g
Sulfato de sodio anhidro	0,05 g
Corcho grueso	0,1 g
Jeringa de 5 mL	1 unidad (6,8 g)
Filtro PVDF 0,45 μ m	1 unidad (2,5 g)
Fibra de lana de vidrio	1 g
Mezcla de elución (MeOH-EtOH 1:1)	8 mL (4 mL de cada disolvente)
Disolvente de reconstitución (EtOH)	1 mL
Pipetas pasteur desechable	1 unidad (1,5 g)
Jeringa de 3 mL	1 unidad (4,4 g)
Filtro PVDF 0,22 μ m	1 unidad (0,8 g)
Vial de 2,0 mL	1 unidad (2,9 g)

Teniendo en consideración los materiales y sustancias auxiliares utilizadas, se puede realizar el análisis con la herramienta AGREEp^{rep}. Como las muestras son preparadas y analizadas en el mismo laboratorio, corresponderá a una preparación de muestra on site, que no va a requerir del transporte de materiales o instrumentos para realizar el muestreo en un sitio diferente a donde es realizado el análisis, si no que, el análisis se lleva a cabo directamente donde la muestra es preparada.

El segundo criterio evalúa la seguridad de los reactivos y materiales utilizados. AGREEp^{rep} considera que una cantidad sobre 10 mL de todo químico que sea tóxico por cualquiera de las vías de exposición no es aceptable y le asigna un puntaje de 0. Según un estudio realizado en el año 2019 por Marek Tobiszewski [50], el etanol y el metanol son considerados biosolventes y no suponen un gran peligro medioambiental como sí es el caso del acetonitrilo que se utiliza como fase móvil para el análisis de la muestra. En otro estudio realizado por Vahid Vatanpour et al., en el año 2022, sitúan al metanol en los disolventes ligeramente problemáticos, pero aun recomendados [51]. En el caso de estudio particular, se utilizan 1,8 mL de ACN para analizar una muestra, sin embargo, para evaluar el verdor de la metodología se consideran únicamente los

disolventes utilizados en la etapa de preparación de muestra como tal, por lo que la cantidad de volumen introducida para este criterio es de 0 mL.

El tercer criterio considera los materiales sostenibles, renovables y reutilizables, en particular, en este estudio se reutilizaron los tubos cónicos en los que se lavaba la muestra, y también se utilizó corcho para realizar la extracción, un material renovable y sostenible, pero que representan una pequeña porción frente al resto de materiales usados, lo que equivale a un valor menor al 25% de los reactivos y materiales utilizados.

Para el cuarto criterio, se debe considerar el desecho generado durante el procedimiento de preparación de muestra. Para esto, se siguió el diagrama propuesto por Pena-Pereira et al. [42], donde se consideró la cantidad de materiales utilizados una única vez, la cantidad de materiales reutilizables, la cantidad de químicos añadidos y el tipo de muestra, obteniendo para este criterio un valor de 49,26 g de desecho generado.

El quinto criterio se relaciona con la miniaturización y considera el tamaño de la muestra, que, en el caso de este estudio, corresponde a 2 g. Cabe señalar que para AGREEprep, muestras superiores a 100 mL o g, no son aceptables.

El sexto criterio evaluado se relaciona con el rendimiento de la muestra, y lo definen como el número de muestras que puede ser preparado en una hora. En este caso, por hora se pueden preparar 1,5 muestras considerando toda la etapa de preparación de muestra (limpieza, extracción, secado y preconcentración).

El séptimo criterio, evalúa la automatización del procedimiento con el fin de minimizar la intervención humana, y con ello, los errores, a la vez de reducir los riesgos de exposición para los operadores. En primer lugar, para puntuar este criterio, se deben considerar los pasos implicados en la etapa de preparación de muestra. Como se mencionó anteriormente, para la metodología desarrollada, se consideraron 3 pasos: limpieza, la extracción MSPD y finalmente el secado y reconstitución del producto. Es importante señalar que se consideraron estos pasos debido a que los autores definen un paso como una operación o conjunto de operaciones conducentes a un cambio de la matriz de la muestra, un cambio en el volumen, propiedades o composición de la muestra, la separación de fases o un cambio en el propio analito, recalcan también que las operaciones menores no deben ser tratadas como un paso separado. En segundo lugar, se evalúa la automatización del procedimiento, para la metodología desarrollada, es necesaria la

participación parcial del operador para poder llevar a cabo las tareas como colocar las muestras dentro del liofilizador, sin embargo, no se requiere la participación directa para el desarrollo del procedimiento.

Para el octavo criterio, evalúa el consumo de energía a lo largo del procedimiento, para esto, se estima el requerimiento energético necesario para completar el procedimiento de preparación de muestra, dividida por el número de muestras extraídas, de esta manera, se considera el consumo energético en watt/hora (Wh) por muestra, al realizar el cálculo con los diferentes instrumentos utilizados, se obtiene un valor de 442,51 Wh por muestra.

El noveno criterio no requiere cálculos, simplemente se seleccionó la opción de cromatografía líquida como método de análisis.

Finalmente, para el último criterio donde se evalúa la exposición del operador, no se considera la peligrosidad de los químicos utilizados, debido a que se toman resguardos como el uso de guantes y delantal, reduciendo así el posible riesgo relacionado con el derrame de los diferentes químicos.

Considerando todos los criterios antes mencionados, la herramienta puntúa la metodología con un valor de 0,4 como se puede ver en la figura 31. Lo que aparentemente indicaría que la metodología no es muy verde desde los criterios evaluados por AGREEprep, sin embargo, lo que se propone en este estudio es una metodología más verde que las utilizadas comúnmente para determinar colecalciferol en matrices complejas, debido a esto, se determina el puntaje para una metodología que ha sido descritas en la literatura, y se compara con el puntaje obtenido para este estudio (0,4) con el fin de poder concluir respecto al verdor que presenta la metodología aquí presentada cumple con ser más verde.

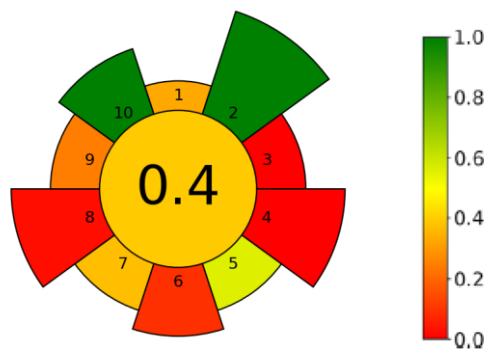


Figura 31 Resultado obtenido para la evaluación del verdor de la metodología desarrollada en el presente estudio.

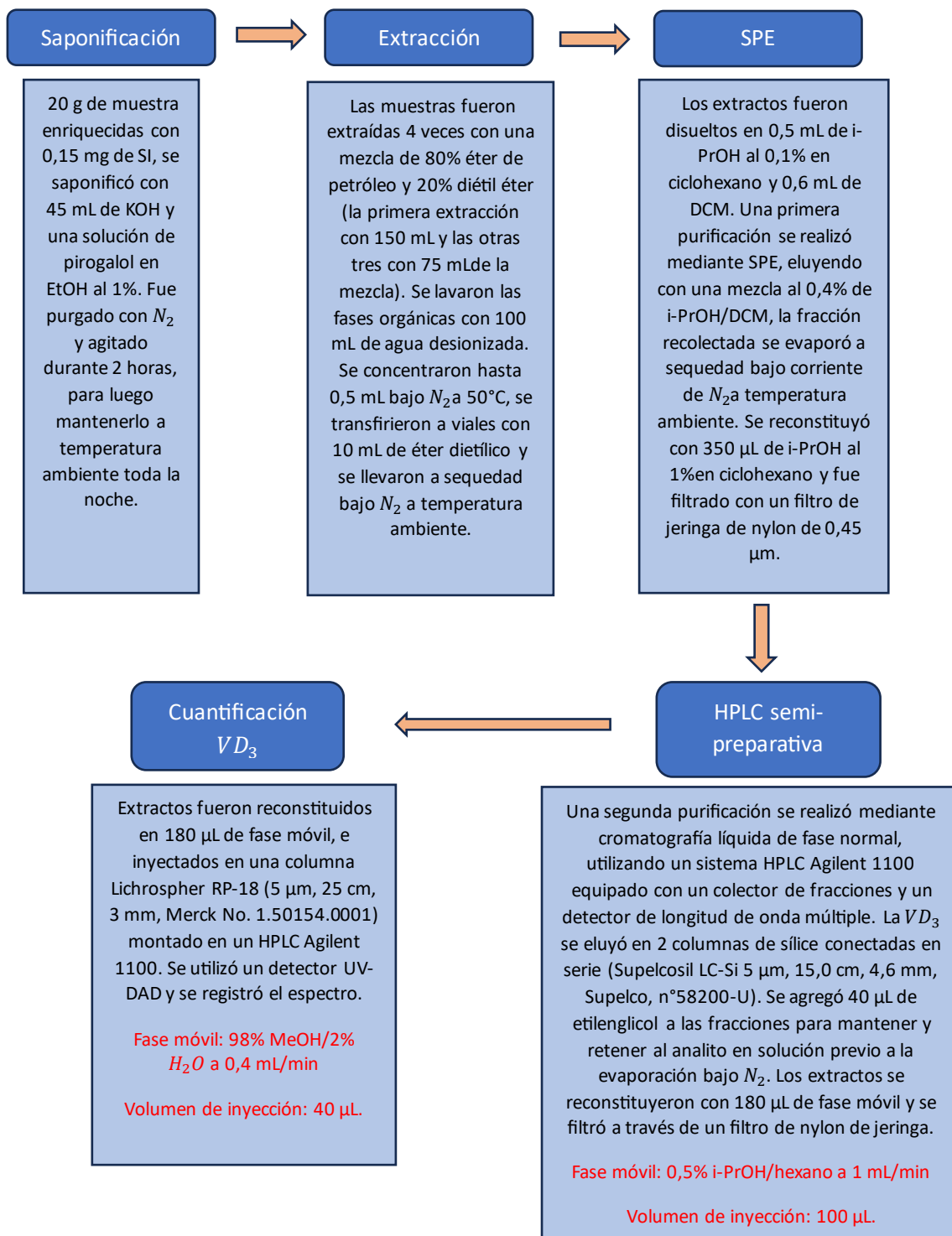


Figura 32 Procedimiento que describieron Bilodeau y colaboradores para determinar colecalciferol en muestras de pescado. (Adaptado de Determination of vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in foodstuffs by HPLC UV-DAD and LC-MS/MS (2011) [49]).

Como estudio comparativo se eligió el desarrollado por Bilodeau et al. [52], quienes describen detalladamente el procedimiento a seguir para determinar el contenido de colecalciferol en productos alimenticios, lo que facilita el análisis realizado en AGREEprep. El procedimiento seguido por los autores se muestra en la figura 32.

Debido a que en este procedimiento las muestras son recolectadas y luego transportadas al laboratorio, se escoge la opción ex situ para el primer criterio.

Para el segundo criterio se consideró la peligrosidad de las sustancias utilizadas, basándose en la tabla propuesta por Vatanpour [51], la cual fue adaptada y se muestra a continuación.

Tabla XV Ranking general de los solventes propuesto por Vatanpour y colaboradores en el año 2022.

Altamente peligroso	Peligroso	Problemático/ Peligroso	Problemático	Recomendado/ Problemático	Recomendado
Dietil éter	Hexano	Ciclohexano	Heptano	Acetona	i-PrOH
Benceno	Diisopropil éter	THF	Clorobenceno	MeOH	Agua
CCl_4	Metoxy-etanol	Ácido fórmico	Acetonitrilo	Etilenglicol	EtOH
Nitrometano	1,4-Dioxano	DCM	Tolueno	Ciclohexanona	Isopropil acetato
Cloroformo	Pentano	Piridina	Me-THF	Metil acetato	Anisol

Para este criterio, se consideraron las cantidades de disolventes clasificados desde altamente peligrosos a problemáticos, obteniendo un volumen utilizado de 70,15 mL. Para el tercer criterio, se seleccionó la opción: valor menor al 25% de los reactivos y materiales utilizados.

Para el cuarto criterio, no se tiene la información suficiente respecto a los materiales como para poder estimar un valor numérico del total de desecho generado, por lo que, para este caso, se repetirá el valor obtenido para la metodología desarrollada por nosotros para la premezcla nutricional, que equivale a un total de 49,26 g. Para el quinto criterio se considera una muestra de 20 g que es con la que trabajan los autores.

Para el sexto y octavo criterio, al igual que para el cuarto, no se cuenta con la información suficiente como para obtener un valor exacto, por lo que se utilizarán los valores obtenidos en nuestra metodología, equivalente a 1,5 muestras/hora y 442,51 Wh/muestra respectivamente. Para el séptimo criterio se consideran los 4 pasos previos al análisis que describen los autores, y se selecciona un grado de automatización del sistema de semiautomático.

Para el noveno criterio se seleccionó cromatografía líquida, y para el décimo criterio al igual que en nuestro caso, se seleccionó que no había peligro de exposición para el operador asociado, ya que se supone que se tomaron los resguardos correspondientes para utilizar los disolventes y otros reactivos.

Considerando todos los criterios antes mencionados, la herramienta puntúa la metodología descrita en la bibliografía con un valor de 0,17 como se puede ver en la figura 33. Lo que indicaría que la metodología es mucho menos verde desde los criterios evaluados por AGREeprep, que la metodología que se ha propuesto a lo largo de este estudio para poder determinar el contenido de colecalciferol en matrices complejas nutricionales.

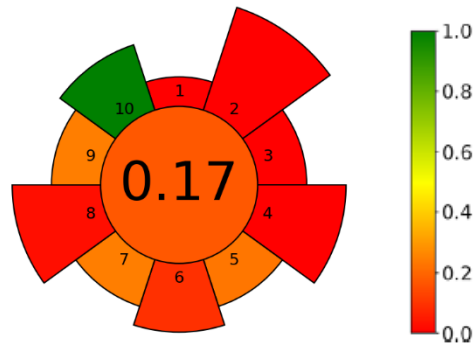


Figura 33 Resultado obtenido para la evaluación del verdor de la metodología que se ha descrito comúnmente en la bibliografía.

Cabe señalar, que este resultado no refleja con exactitud el verdor de la metodología descrita en la bibliografía, ya que no se tiene la información apropiada para poder puntuar de manera correcta los criterios 4, 6 y 8, los que probablemente tendrían un peor puntaje asociado debido a los tiempos de procesamiento. Aun así, el resultado acá informado es una aproximación de la puntuación de verdor de las metodologías comúnmente desarrolladas para la determinación de colecalciferol en matrices nutricionales, lo que nos ayuda a tener una idea del grado de ecologización de estas.

Otro aspecto a considerar, es que no se comparó una metodología aplicada en la misma matriz, debido a que no se encontró literatura que indicara procedimientos relacionados a premezclas nutricionales de uso veterinario, por lo que se optó por utilizar una metodología aplicada a matrices nutricionales de uso humano, lo cual puede ser motivo de sesgo en los resultados obtenidos.

Obviando los aspectos antes mencionados, se puede concluir que la metodología presentada en este estudio es más verde que las utilizadas rutinariamente, ya que no necesita el uso de disolventes orgánicos considerados tóxicos para llevarla a cabo, además, los volúmenes de disolventes utilizados son menores debido a que la muestra requerida para llevar a cabo el estudio es mucho menor, siendo 10 veces más pequeña que la utilizada en el estudio comparativo.

Se podría mejorar el puntaje obtenido para el verdor, si se reciclaran todos los materiales posibles, como podría ser el caso de las jeringas donde se realizó la elución, que mediante un lavado apropiado podrían ser recuperadas para reutilizarse en análisis posteriores, de esta manera se reduciría la cantidad de desecho generado, y por lo tanto se obtendría un puntaje más alto otorgado por la herramienta.

5.7. Metodología alternativa para matrices sencillas.

Para llevar a cabo el desarrollo de una metodología que permitiera cuantificar el contenido de colecalciferol presente en distintas muestras de materia prima (concentración informada por el fabricante de 500.000 UI/g), y en muestras de núcleos nutricionales (concentración informada de 5.000 UI/g), se probaron diferentes procedimientos, todos consistentes en una extracción con disolventes asistida por ultrasonido utilizando equipos de baños ultrasónicos, variando el disolvente y los tiempos de extracción para obtener las mejores recuperaciones.

De este estudio, se obtuvieron mejores recuperaciones y una menor variabilidad en los resultados, al utilizar el procedimiento seleccionado para matrices sencillas, que, como se mencionó en la metodología, consistió en tomar una muestra de 0,1 g de materia prima, o 0,5 g de núcleo nutricional, llevando a cabo una extracción de 20 minutos, primero utilizando agua como disolvente, y luego utilizando una mezcla 1:1 de EtOH-i-PrOH por otros 20 minutos, para poder extraer el contenido de vitamina presente en esta muestra. En la tabla XVI, se presentan los diferentes procedimientos probados, siendo el último el método escogido para la extracción de colecalciferol desde estas matrices, ya que como se puede observar en la tabla, presenta un coeficiente de variabilidad de 1,2%, obteniendo una concentración experimental de 515.063 UI/g para la matriz en estudio, que presenta un error del 3% respecto a la concentración informada por el fabricante.

Tabla XVI Resultados obtenidos de los procedimientos evaluados para extraer colecalciferol en muestras sencillas.

Procedimiento	Solvente de extracción	Tiempo de extracción (min)	Concentración experimental (UI/g)	% Rec	CV %
1	Etanol	15	465105	93	5,9
2	Etanol	20	507678	102	1,7
3	Etanol	25	524406	92	2,7
4	Etanol	30	519733	103	1,7
5	Agua + Mezcla EtOH-i-PrOH	15	461987	105	16,2
6	Agua + Mezcla EtOH-i-PrOH	20	515063	104	1,2

Este estudio permitió concluir, que los procedimientos que implicaban la adición de agua previo a la adición de la mezcla utilizada para la extracción de colecalciferol, presentaban mayores recuperaciones de la vitamina, lo que probablemente se deba a que el agua logra romper el coating en el que se encuentra encapsulada la vitamina, y por lo tanto se obtengan mejores recuperaciones al realizar la extracción con la mezcla de disolventes luego de esta ruptura. Lo que tiene sentido, considerando que el coating en el que está encapsulada la vitamina, cumple la función de protegerla de las condiciones ambientales, pero probablemente éste sea de naturaleza hidrofílica, debido a que esto facilitaría la liberación dentro del organismo del animal al entrar en contacto con la saliva, lo que, a su vez, posibilita la obtención y almacenamiento de la vitamina por el tejido graso del cuerpo, al ya quedar disponible para su absorción.

Cabe señalar que en la tabla XVI, se resumen los resultados obtenidos para muestras analizadas de manera triplicada para cada procedimiento, y en base a estos resultados, se seleccionó el sexto procedimiento como metodología para matrices más sencillas.

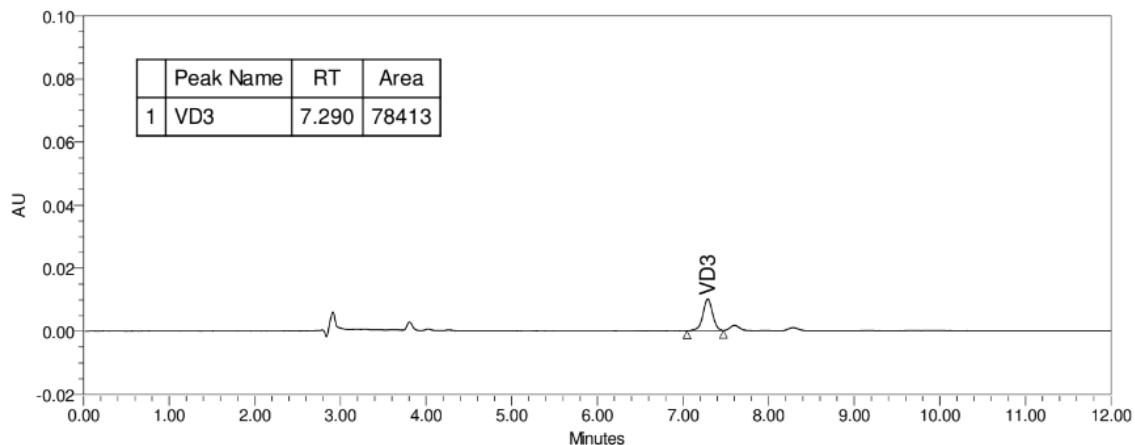


Figura 34 Cromatograma obtenido para una muestra de materia prima analizada con el procedimiento seleccionado para esta matriz.

5.8. Validación de la metodología alternativa

Como se mencionó anteriormente, la validación de la metodología se realizó según los criterios de la VICH, evaluando los parámetros linealidad, precisión y exactitud, para 8 muestras réplicas correspondiente a un núcleo nutricional (concentración teórica informada de 5.000 UI/g) y para 8 muestras réplicas de un fortificado de núcleo nutricional (concentración teórica calculada de 4.922 UI/g).

5.8.1 Linealidad: Curva de estándares

La linealidad del colecalciferol se evaluó mediante una curva de calibrado de estándares, evaluando el rango que abarcó desde los 71,2 UI/mL hasta los 356,0 UI/mL. Obteniendo lo que se muestra en la figura a continuación, donde se puede observar que el colecalciferol presentó un comportamiento lineal para el rango en estudio, con un buen coeficiente de correlación cuadrático ($R^2 = 0.9949$).

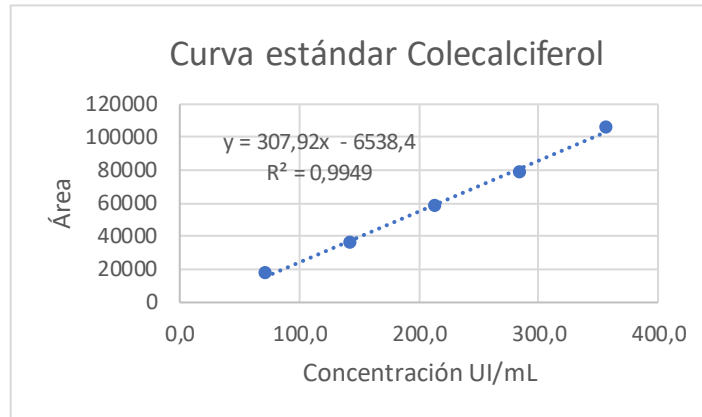


Figura 35 Gráfico que muestra el área obtenida en función de la concentración de los estándares de colecalciferol, para evaluar la linealidad de éste en el rango que va desde los 71,2 UI/mL hasta los 356,0 UI/mL.

El comportamiento lineal mostrado en el gráfico de la figura 35, concuerda con lo descrito anteriormente en esta investigación, ya que el colecalciferol exhibió un comportamiento lineal en distintos rangos de concentración estudiados, que, para el caso de los núcleos nutricionales, no fue la excepción.

5.8.2 Precisión

Se utilizaron 8 muestras réplicas de núcleos nutricionales, las que fueron analizadas paralelamente para evaluar la precisión de la metodología en términos de repetibilidad. Adicionalmente, se prepararon fortificados del núcleo, a partir de un núcleo sin contenido de vitamina D_3 , al que se le añadió una cantidad conocida de materia prima, correspondiente a 80,4 mg, obteniendo así una concentración teórica de los fortificados de 4.922 UI/g (concentración experimental: 5.070 UI/g, calculada a partir de la concentración obtenida para la vitamina descrita en la tabla XVI), las que también fueron evaluadas en octuplicados estudiando la precisión. Se evaluó también una muestra blanco del núcleo nutricional para poder comparar el cromatograma cuando no hay presencia de vitamina y poder hacer el contraste cuando sí está presente en la matriz, y finalmente, se analizó una muestra del blanco del núcleo, con la adición previa de una alícuota de estándar de la vitamina, con el fin de poder identificar el tiempo de retención de esta. De cada una de estas matrices se tomaron porciones de 0,5 g, éstas fueron colocadas en sus respectivos tubos de polipropileno previamente rotulados y se repitió el procedimiento para matrices sencillas que se describió en párrafos anteriores. Las tablas XVII y XVIII, muestran los resultados para el estudio de

repetibilidad en núcleos y en fortificados, analizadas con la curva estándar que se muestra en la figura 34.

Tabla XVII Resultados obtenidos para el parámetro de precisión en términos de repetibilidad, al determinar la concentración experimental de muestras de núcleo nutricional.

Muestra	Concentración (UI/mL)	Concentración (UI/g)	Concentración promedio (UI/g)	Desviación estándar	CV%
1	146,2	2821	3213	324	10
2	162,5	3182			
3	192,0	3517			
4	169,4	3275			
5	192,9	3663			
6	177,3	3465			
7	157,9	2971			
8	147,2	2812			

Tabla XVIII Resultados obtenidos para la precisión en términos de repetibilidad, al determinar la concentración experimental de muestras de núcleo nutricional fortificado.

Muestra	Concentración (UI/mL)	Concentración (UI/g)	Concentración promedio (UI/g)	Desviación estándar	CV%
1	246,0	4748	5362	537	10
2	319,3	5627			
3	352,1	5919			
4	322,0	5886			
5	261,6	5185			
6	317,3	5770			
7	271,8	5282			
8	247,6	4478			

Al igual que en el caso de las premezclas nutricionales, en las tablas XVI y XVII se muestra la concentración de colecalciferol en UI/mL, ya que en estas unidades se obtiene la concentración desde la curva estándar, pero como se trata de una muestra sólida, también se agregó una columna en donde se informa la concentración en UI/g para mejorar la comprensión de lo que se describe.

Como se puede observar en la tabla XVI, las concentraciones obtenidas para el colecalciferol contenido en el núcleo nutricional, es menor a la concentración que ha sido informada (5.000

UI/g), presentando un error respecto a la concentración teórica de -36%, en este caso, es importante señalar, que esta matriz se analizó después de meses desde su fabricación, por lo que es probable que la vitamina contenida en la misma, se pudiera haber degradado por la exposición a altas temperaturas o a las condiciones ambientales dentro del laboratorio, pues no se almacenó resguardando la integridad de la misma, lo que podría explicar las bajas concentraciones obtenidas. Aun así, se obtuvo un coeficiente de variación del 10% para esta matriz, quedando dentro del criterio de aceptación otorgado por la VICH para la precisión. En el caso de los fortificados, la concentración obtenida de manera experimental presentó concordancia respecto a la concentración de colecalciferol añadida a la matriz, presentando un error de solo el 6% respecto a dicho valor, con un coeficiente de variación del 10%, por lo que se encuentra dentro del criterio de aceptación otorgado por la VICH.

Los resultados obtenidos para la matriz de núcleos nutricionales se podrían mejorar, obteniendo resultados menores para el coeficiente de variación al utilizar una curva en matriz, de tal manera que se considere el efecto que aporte la matriz en estas muestras, efecto que se ha demostrado que existe y que afecta los resultados, sin embargo, para estas muestras no se realizó curva en matriz.

En la figura 36, se muestran los cromatogramas obtenidos para el blanco del núcleo, así como también el cromatograma obtenido al añadir una alícuota de estándar de VD_3 para poder identificar el tiempo de retención de la vitamina en esta matriz.

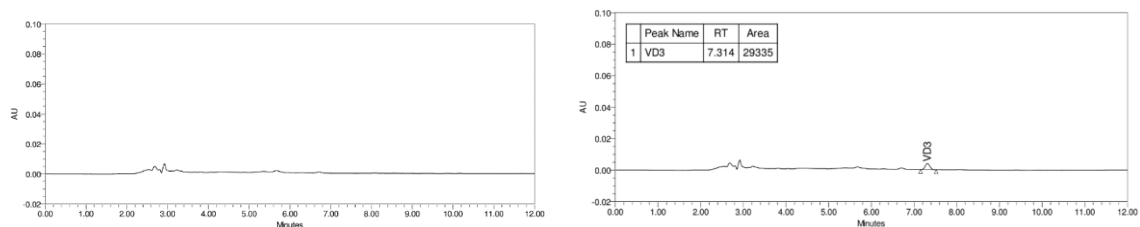


Figura 36 Cromatogramas obtenidos para una muestra blanco del núcleo (figura a la izquierda) y para un blanco con adición del estándar (figura de la derecha).

En la figura 37, se muestra uno de los cromatogramas obtenidos tanto para el núcleo como para el fortificado. En ella es posible apreciar el área aumentada que presenta el fortificado en relación al sin fortificar, lo que concuerda con la mayor concentración de colecalciferol que está presente en esta matriz.

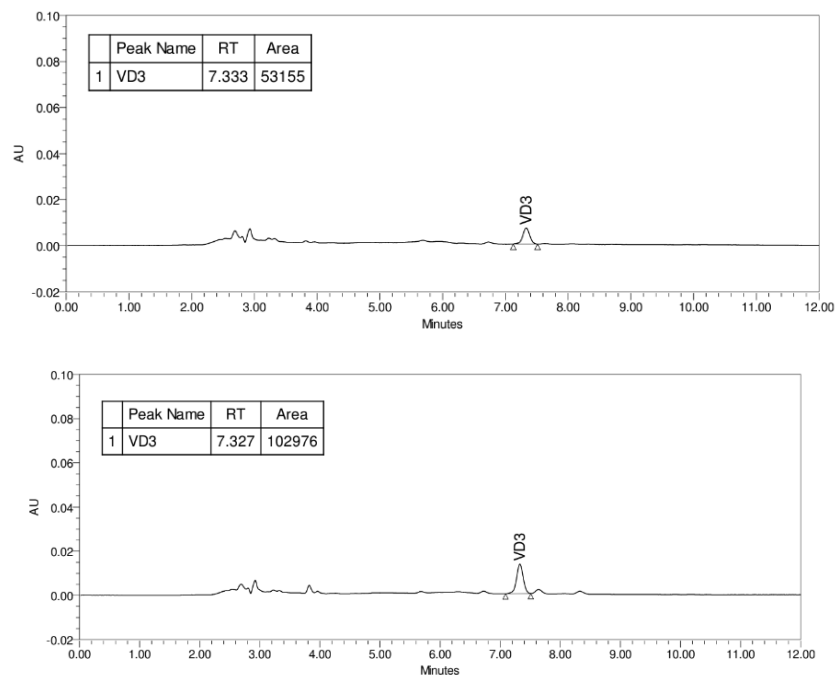


Figura 37 Cromatogramas obtenidos para una muestra de núcleo (figura superior) y para un fortificado (figura inferior).

5.8.3 Exactitud

Para evaluar la exactitud de la metodología, se analizó la recuperación a 3 niveles de concentración diferentes (80, 100 y 120 % de la concentración de vitamina en las muestras). Para lo cual, de manera triplicada se tomaron muestras de 0,4 g, 0,5 g y 0,6 g, tanto del núcleo como del fortificado preparado, y se repitió el procedimiento para analizar estas muestras.

La tabla XIX, muestra los resultados obtenidos para el estudio de exactitud a tres niveles diferentes para muestras de un núcleo nutricional, como era de esperar, se obtuvieron bajas recuperaciones debido a que las concentraciones obtenidas de manera experimental son mucho más bajas que las informadas de manera teórica, lo que como se discutió antes, puede deberse a la degradación de la vitamina en estas matrices debido al tiempo de almacenamiento sin resguardo previo al análisis.

Tabla XIX Resultados obtenidos para la evaluación de la exactitud a tres niveles diferentes expresada en un % de recuperación para muestras de núcleo nutricional.

Nivel	Concentración (UI/mL)	Concentración (UI/g)	Concentración informada (UI/g)	% Recuperación	%Re promedio
80%	144,5	3553	4000	89	79
	118,0	2727		68	
	127,4	3148		79	
100%	192,0	3517	5000	70	71
	192,9	3663		73	
	177,3	3465		69	
120%	187,0	2830	6000	47	49
	174,1	2548		42	
	228,7	3399		57	

En la tabla XX, se muestran los resultados obtenidos para el estudio de exactitud a tres niveles distintos para los fortificados de núcleos. Para los niveles estudiados se obtienen recuperaciones en un rango que varía entre los 84 a 117%, promediando una recuperación del 103% para el primer nivel (correspondiente a concentraciones al 80% de colecalciferol), 100% para el segundo nivel (al 100% de la concentración del colecalciferol) y 88% para el tercer nivel (correspondiente a una concentración al 120% de la concentración de colecalciferol). Presentando un error mayor en el nivel más alto, por lo que se debe tener mayor cuidado al aplicar esta metodología en matrices sencillas con concentraciones más altas, ya que estas introducen recuperaciones más bajas y, por lo tanto, errores más altos en los resultados.

Tabla XX Resultados obtenidos para la evaluación de la exactitud a tres niveles diferentes expresada en un % de recuperación para las muestras de fortificados de núcleo nutricional.

Nivel	Concentración (UI/mL)	Concentración (UI/g)	Concentración informada (UI/g)	% Recuperación	%Re promedio
80%	243,1	4651	4000	114	103
	211,3	4090		100	
	207,8	3861		95	
100%	352,1	5185	5000	102	100
	322,0	5282		104	
	317,3	4748		94	
120%	256,2	5071	6000	84	88
	286,0	5431		89	
	288,1	5527		91	

Al llevar a cabo la validación del núcleo, se obtienen como resultado bajas concentraciones de colecalciferol en esta matriz, y, por lo tanto, bajas recuperaciones. Esto puede deberse a un incorrecto almacenamiento, que como se ha mencionado anteriormente, podría haber provocado la degradación de la vitamina contenida en esta matriz, además, se debe mencionar que no se tiene un registro claro de la fecha de preparación de esta y, por lo tanto, no se sabe el tiempo de exposición a condiciones ambientales. Otro factor importante de esta matriz, es que fue preparada con una materia prima diferente a la evaluada en este estudio, debido a que inicialmente se trabajaba con una materia prima de diferente fabricación, pero estudios posteriores realizados por la empresa, demostraron que la calidad de estas era menor a la que fue añadida tardíamente, ocasionando una fácil degradación de la misma al no controlar las condiciones de almacenamiento, debido a esto, es que resulta razonable pensar que la vitamina se degradó previo al análisis y de ahí los bajos resultados obtenidos, y no precisamente a un error de la metodología.

En el caso de los fortificados, estos fueron preparados con la materia prima que se encontró que era de mejor calidad, además se supone que no hubo degradación de la vitamina pues se trabajó con esta matriz en el corto plazo desde que fue preparada, lo que se ve reflejado en los resultados obtenidos pues se obtienen buenas recuperaciones y concentraciones concordantes a la informada con el método utilizado.

Por lo anterior, el método desarrollado para determinar el contenido de colecalciferol en matrices sencillas como son los núcleos nutricionales es una alternativa ecológica, rápida y sencilla, que ofrece resultados con precisión y exactitud aceptable según los criterios otorgados por la VICH, que puede ser aplicado en este tipo de matrices, evitando así el uso de grandes cantidades de solventes tóxicos y de materiales que puedan ser dañinos para el analista, siendo una alternativa muy eficiente en términos del tiempo que requiere para el análisis, y que además presenta la ventaja de requerir únicamente instrumentos accesibles que están presentes en todos los laboratorios químicos.

6. CONCLUSIONES

Se logró realizar la extracción de colecalciferol contenido en premezclas nutricionales mediante la técnica MSPD utilizando corcho molido como fase sorbente natural, evitando así el uso de fases sorbentes comerciales y apegándose un poco más a los principios propuestos por la Química Verde en comparación con las técnicas informadas para la extracción de este compuesto.

Se optimizó el método cromatográfico que permitió determinar y cuantificar de mejor manera la vitamina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia utilizando un detector de arreglo de diodos.

Se optimizó también la extracción del analito utilizando la técnica MSPD utilizando corcho molido fino como fase sorbente, y optimizando los componentes que afectaban la elución del analito a la hora de realizar la desorción de éste desde el corcho tales como la composición de la jeringa en donde se realizó la elución, así como también de los disolventes escogidos para llevar a cabo la elución del analito.

Se validó la metodología según los criterios otorgados por la VICH, con lo que se demostró que se trata de una metodología precisa y exacta para la determinación de vitamina en estas matrices complejas. Se comprobó, además, que, para matrices altamente complejas con una amplia variedad de componentes en ellas, es necesario realizar la cuantificación con curva en matriz, considerando los efectos que pueda tener esta sobre los resultados del analito obtenido, generando resultados más exactos cuando se considera el efecto de la matriz en la muestra.

Se concluye que el método desarrollado permite la determinación de colecalciferol desde matrices complejas como lo son las premezclas nutricionales, mediante una técnica fácil, rápida y eficiente, que no requiere de grandes cantidades de solventes, ni largos tiempos de procesamiento como sucede con las técnicas convencionales, obteniendo recuperaciones del 80% respecto al valor informado para estas muestras. Cabe destacar que no se puede asegurar con total certeza que el contenido de vitamina en la premezclas no sea menor al que informan, pues la vitamina es altamente degradable al exponerse a condiciones ambientales no controladas, como lo son las altas temperaturas, la luz proveniente del sol, humedad, entre otras, por lo que no hay una manera de asegurar que el contenido de colecalciferol en las premezclas no se degradó antes del análisis, lo que aumentaría la recuperación obtenida, pues la concentración si es que la vitamina se degrada, sería menor.

Se propone que se podría aumentar la aplicación de la metodología a diferentes muestras de estudio, utilizando un equipo acoplado a un detector de masas, el cual ofrece una sensibilidad mayor para poder estudiar aquellas muestras en que se encuentra la vitamina en menor concentración como lo son los alimentos completos de uso veterinario.

Se realizó un estudio comparativo del veredor de la metodología desarrollada y de una metodología informada en la literatura, para determinar colecalciferol en matrices complejas nutricionales, obteniendo que la metodología desarrollada en el presente estudio es más verde según la herramienta AGREEprep, y por lo tanto, más amigable con el medioambiente y con el operador, proporcionando mayor seguridad al llevar a cabo el procedimiento, obteniéndose un puntaje de 0,4 puntos (en una escala de 0,0-1,0) para la metodología propuesta, es decir, un valor en el medio inferior según los criterios evaluados, mientras que para la metodología de la literatura se obtuvo un puntaje de 0,17 puntos, encontrándose en el límite inferior de la escala de esta herramienta métrica.

Adicionalmente, se propone una metodología alternativa para matrices más sencillas que las premezclas nutricionales, como lo son los núcleos nutricionales, donde no se requiere más que la utilización de disolventes apropiados para la extracción de colecalciferol desde estas matrices, facilitando lo que es el análisis de vitamina, y, otorgando resultados precisos y exactos según los criterios de la VICH, lo cual aporta atractivo a la metodología desde un punto de vista ecológico, al adecuar el procedimiento según la complejidad de la matriz en estudio con resultados que respaldan la aplicación de una u otra metodología.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Dr. Milton Rizzi (2010). Historia del escorbuto Especial referencia a las epidemias acaecidas en los sitios de Montevideo. Revista FASO año 17, N° 2.
- [2] Bolet Astoviza, Miriam. (2004). Aspectos de la historia del descubrimiento de algunas vitaminas. Revista Cubana de Medicina General Integral, volumen 20(4).
- [3] A.J.M. Santos, S. Khemiri, S. Simões, C. Prista, I. Sousa, A. Raymundo (2013). The importance, prevalence and determination of vitamins B6 and B12 in food matrices: A review. Food Chemistry, Volume 426.
- [4] Carrera Castro, Carmen (2013). En la naturaleza está la respuesta "micronutrientes: las vitaminas, agentes terapéuticos en las heridas". Enfermería Global, Volumen 12(31), 273-289.
- [5] Gretchen A Stevens, Ty Beal, Mduduzi N N Mbuya, Hanqi Luo, Lynnette M Neufeld, O Yaw Addo, Seth Adu-Afarwuah, Silvia Alayón, Zulfiqar Bhutta, Kenneth H Brown, Maria Elena Jefferds, Reina Engle-Stone, Wafaie Fawzi, Sonja Y Hess, Robert Johnston, Joanne Katz, Julia Krasevec, Christine M McDonald, Zuguo Mei, Saskia Osendarp, Christopher J Paciorek, Nicolai Petry, Christine M Pfeiffer, Maria J Ramirez-Luzuriaga, Lisa M Rogers, Fabian Rohner, Vani Sethi, Parminder S Suchdev, Masresha Tessema, Salvador Villapando, Frank T Wieringa, Anne M Williams, Meseret Woldeyehannes, Melissa F Young (2022). Micronutrient deficiencies among preschool-aged children and women of reproductive age worldwide: a pooled analysis of individual-level data from population-representative surveys. The Lancet Global Health, Volume 10, Issue 11, e1590-e1599.
- [6] Miranda C, Daisy, Leiva B, Laura, León S, José Pablo, & de la Maza C, Ma Pía. (2009). Diagnóstico y tratamiento de la deficiencia de vitamina D. Revista chilena de nutrición, volumen 36(3), 269-277.
- [7] C. Román-Hidalgo, M. Villar-Navarro, G.E. Falcón-García, M.P. Carbonero-Aguilar, J.D. Bautista-Palomas, M.A. Bello-López, M.J. Martín-Valero, R. Fernández-Torres (2021). Selective, rapid and simultaneous determination of ergosterol and ergocalciferol in mushrooms by UPLC-Q-TOF-MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 194.
- [8] Tanawat Amphansap, Atiporn Therdyothin, Nitirat Stitkitti, Lertkong Nitiwarangkul, Vajarin Phiphobmongkol (2022). Efficacy of plain cholecalciferol versus ergocalciferol in raising serum vitamin D level in Thai female healthcare workers. Osteoporosis and Sarcopenia, Volume 8, Issue 4, Pages 145-151.
- [9] A.K. Hewavitharana, F.P. Gomes (2016). Cholecalciferol: Properties and Determination. Encyclopedia of Food and Health, Academic Press, Pages 42-46.
- [10] D.C. Woollard, H.E. Indyk (2003). CHOLECALCIFEROL | Properties and Determination. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition), Academic Press, Pages 1205-1213.
- [11] A.W. Norman (2003). CHOLECALCIFEROL | Physiology. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition), Academic Press, Pages 1213-1220.

- [12] Pawel Grzywacz, Lori A. Plum, Wanda Sicinska, Rafal R. Sicinski, Jean M. Prah, Hector F. DeLuca. (2004). 2-Methylene analogs of 1α -hydroxy-19-norvitamin D₃: synthesis, biological activities and docking to the ligand binding domain of the rat vitamin D receptor. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Volumes 89–90, Pages 13-17.
- [13] EUROPEAN PHARMACOPOEIA, vol 8.0, pages 1870-1871.
- [14] Elsevier Connect (2019). *Metabolismo-funciones-toxicidad y estados deficitarios de la vitamina D*.
- [15] Adams R (2001). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. John Wiley & Sons 8ª Edición.
- [16] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) (2012). Scientific Opinion on the safety and efficacy of vitamin D₃ (cholecalciferol), as a feed additive for chickens for fattening, turkeys, other poultry, pigs, piglets (suckling), calves for rearing, calves for fattening, bovines, ovines, equines, fish and other animal species or categories, based on a dossier submitted by DSM, *EFSA Journal* 10, 2968.
- [17] Arribas Jimeno, S., Hernández Méndez, J. E. S. Ú. S., & Lucena Conde, F. (2002). *Química analítica cualitativa*. Ediciones Paraninfo, SA.
- [18] Skoog, D. A., & West, D. M. (2022). *Introducción a la química analítica*. Reverté.
- [19] GODOY, C. L. A. (2006). *Ejercicio Profesional Supervisado, Tesis Doctoral dissertation, Universidad de San Carlos de Guatemala*.
- [20] Arbatskii, A.P., Afon'shin, G.N. & Vostokov, V.M (2004). Determination of Vitamins in Feed and Foodstuffs by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry* 59, 1186–1189.
- [21] EURL (2012). *Evaluation Report on the Analytical Methods submitted in connection with the application for the Authorisation of a Feed Additive according to Regulation (EC) No 1831/2003*. JRC.D.5/CvH/PRO/ARES109438.
- [22] Bognár, A (1992). Bestimmung von Vitamin D in Lebensmitteln mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). *Z Lebensm Unters Forch* 194, 469–475.
- [23] Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación, Dirección de alimentación y nutrición (1997). *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición*. Santiago de Chile, Inta.
- [24] Temova Z., Roškar R (2016). Stability-Indicating HPLC–UV Method for Vitamin D₃ Determination in Solutions, Nutritional Supplements and Pharmaceuticals. *Journal of Chromatographic Science*, 54, No. 7, 1180–1186.
- [25] R. Mestres (2013). *Química Sostenible: Naturaleza, fines y ámbito*. Educación Química, Volumen 24, Suplemento 1, Páginas 103-112.
- [26] M. Escalante (2021). *Diseño Químico de Materiales Poliméricos para la Sostenibilidad*. Tesis de grado, Universidad de Sevilla.
- [27] Valenzuela-Quintanar, A. I., Armenta-Corral, R., Moreno-Villa, E., Gutiérrez-Coronado, L., & Grajeda-Cota, P. (2006). Optimización y validación de un método de dispersión de matriz en

fase sólida para la extracción de plaguicidas organofosforados en hortalizas. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 23(4), 471-482.

[28] Dorota Wianowska, Marta Gil, and Malgorzata Olszowy (2020). Miniaturized methods of sample preparation. *Handbook on Miniaturization in Analytical Chemistry*.

[29] Rosa Ana Pérez, Beatriz Albero, José L. Tadeo (2020). Matrix solid phase dispersion. Departamento de Medio Ambiente y Agronomía, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, Spain.

[30] YingyingWen (2020). Recent advances in solid-phase extraction techniques with nanomaterials. *Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry*.

[31] Steven A. Barker (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, Volume 70, Issue 2, Pages 151-162.

[32] Nipunika H. Godage, Emanuela Gionfriddo (2020). Use of natural sorbents as alternative and green extractive materials: A critical review, *Analytica Chimica Acta*, Volume 1125, Pages 187-200.

[33] Ma. del Carmen Doria Serrano (2009). Química verde: un nuevo enfoque para el cuidado del medio ambiente, *Educación Química*, Volume 20, Issue 4, Pages 412-420.

[34] Rodrigo F. da Silva, Candice N. Carneiro, Cheila B. do C. de Sousa, Federico J. V. Gomez, Magdalena Espino, Joana Boiteux, María de los Á. Fernández, Maria F. Silva, Fabio de S. Días (2022). Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal plants based on the principles of green analytical chemistry: A review, *Microchemical Journal*, Volume 175, 107184.

[35] Mafalda Valente, Sara Magalhães Silva, Maria Helena Braga (2023). Cork: Enabler of sustainable and efficient coaxial structural batteries. *Heliyon*, Volume 9, Issue 4.

[36] Jesús Rives, Ivan Fernandez-Rodriguez, Joan Rieradevall, Xavier Gabarrell (2012). Environmental analysis of raw cork extraction in cork oak forests in southern Europe (Catalonia-Spain). *Journal of Environmental Management*, Volume 110, Pages 236-245.

[37] Inmaculada Cerrato, Alejandra Molina-Balmaceda, Daniel Arismendi, Inés Ahumada, Pablo Richter (2022). Cork-based passive samplers for monitoring triclosan in water samples. *Green Analytical Chemistry*.

[38] Ariana M.A. Pintor, Catarina I.A. Ferreira, Joana C. Pereira, Patrícia Correia, Susana P. Silva, Vítor J.P. Vilar, Cidália M.S. Botelho, Rui A.R. Boaventura (2012). Use of cork powder and granules for the adsorption of pollutants: A review. *Water Research*, Volume 46, Issue 10, Pages 3152-3166.

[39] Silva, S., Sabino, M., Fernandes, E., Correló, V., Boesel, L., Reis, R. (2005). Cork: properties, capabilities and applications. *International Materials Reviews*, 50, 345–365.

[40] Norma Chilena Oficial. NCh 44. Of2007. Procedimientos de muestreo indexados por nivel de calidad aceptable (AQL) para la inspección lote a lote. Instituto Nacional de Normalización.

- [41] Wojciech Wojnowski, Marek Tobiszewski, Francisco Pena-Pereira, Eleftheria Psillakis (2022). AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 149.
- [42] Ángela I. López-Lorente, Francisco Pena-Pereira, Stig Pedersen-Bjerggaard, Vânia G. Zuin, Sibel A. Ozkan, Eleftheria Psillakis (2022). The ten principles of green sample preparation, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 148.
- [43] Francisco Pena-Pereira, Marek Tobiszewski, Wojciech Wojnowski, Eleftheria Psillakis (2022). A Tutorial on AGREEprep an Analytical Greenness Metric for Sample Preparation. *Advances in Sample Preparation*, Volume 3.
- [44] GUIDELINE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: METHODOLOGY, VICH GL2 (1998).
- [45] STUDIES TO EVALUATE THE METABOLISM AND RESIDUE KINETICS OF VETERINARY DRUGS IN FOOD PRODUCING ANIMALS: VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS USED IN RESIDUE DEPLETION STUDIES, VICH GL49 (2011).
- [46] Piramon Pokkanta, Phumon Sookwong, Manatchanok Tanang, Saranya Setchaiyan, Pittayaporn Boontakham, Sugunya Mahatheeranont (2019). Simultaneous determination of tocopherols, γ -oryzanol, phytosterols, squalene, cholecalciferol and phyloquinone in rice bran and vegetable oil samples. *Food Chemistry*, Volume 271, Pages 630-638.
- [47] María Guillermina Volonté (2013). Cromatografía de alta resolución (HPLC). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP), 78-120.
- [48] Seyed Ali Naziri Mehrabani, Vahid Vatanpour, Ismail Koyuncu (2022). Green solvents in polymeric membrane fabrication: A review. *Separation and Purification Technology*, Volume 298.
- [49] Felipe Miranda Tafuku (2020). Evaluación de la toxicidad de tres disruptores endocrinos a través de bioensayos con *Lactuca sativa* y *Eisenia fetida* en suelos tratados con biosólidos. Tesis presentada para optar al grado de Magíster.
- [50] Tobiszewski, M. (2019). Analytical chemistry with biosolvents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(19), 4359–4364.
- [51] Seyed Ali Naziri Mehrabani, Vahid Vatanpour, Ismail Koyuncu. (2022). Green solvents in polymeric membrane fabrication: A review. *Separation and Purification Technology*, Volume 298.
- [52] Bilodeau, L., Dufresne, G., Deeks, J., Clément, G., Bertrand, J., Turcotte, S., Robichaud, A., Beraldin, F., Fouquet, A. (2011). Determination of vitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃ in foodstuffs by HPLC UV-DAD and LC–MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(3), 441–448.