



UNIVERSIDAD DE CHILE



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADO A DETECCIÓN
POR ARREGLO DE DIODOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
RESIDUOS DE NICARBAZINA.**

DANIELA PAZ RUBIO MÉNDEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESORA GUÍA: PILAR OVIEDO HANNIG

**SANTIAGO, CHILE
2009**



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADO A DETECCIÓN POR ARREGLO DE DIODOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE NICARBAZINA.

DANIELA PAZ RUBIO MÉNDEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA : PILAR OVIEDO
PROFESORA CONSEJERA: BETTY SAN MARTIN
PROFESORA CONSEJERA: ANITA SOTO

SANTIAGO, CHILE
2009

Agradecimientos

A Luis Roa (jefe del Laboratorio de Residuos de Medicamentos Veterinarios del ISP), por que sin él nada de este proyecto habría sido posible, por su confianza, apoyo, cariño y enseñanzas continuas. Y en general a todos los del ISP que me acogieron, en especial a la Doris. A la Dra Pilar Oviedo por su compromiso y ayuda en todo momento.

A mi familia por darme fuerza y apoyo incondicional.

A mis amigas que me hicieron la vida universitaria más amena.

Y a Leo, por su amor, apoyo y entrega, has sido el pilar fundamental en mi vida. Te amo.

Índice de Contenidos

Agradecimientos.....	i
Índice de Contenidos	ii
Índice de Figuras	iv
Índice de Tablas.....	v
Resumen	vii
Abstract.....	viii
1 Introducción.....	1
2 Revisión Bibliográfica.....	3
2.1 Generalidades	3
2.2 Características del fármaco.....	3
2.3 Toxicidad.....	5
2.4 Metodologías	6
2.5 Situación en Chile.....	7
3 Objetivos.....	8
4 Materiales y Métodos	9
4.1 Muestras	9
4.2 Materiales, insumos y equipos	10
4.2.1 Equipos	10
4.2.2 Estándares	11
4.2.3 Materiales	12
4.2.4 Reactivos	12
4.3 Estudio del comportamiento cromatográfico de Nicarbazina	13
4.4 Desarrollo y optimización del método analítico.....	14
4.4.1 Método de Purificación	14
4.4.1.1 Estudio con columna de Silica:	14
4.4.1.2 Estudio con columna SCX.....	17
4.4.2 Método de Extracción.....	19
4.5 Validación de Métodos Cromatográficos	22
4.6 Estudio de vigilancia	27
5 Resultados y Discusión.....	28

5.1	Estudio del comportamiento cromatográfico de Nicarbazina	28
5.1.1	Comportamiento espectral	28
5.1.2	Comportamiento cromatográfico	28
5.2	Desarrollo y Optimización.....	31
5.2.1	Método de purificación.....	31
5.2.1.1	Columna de Silica:	32
	Método de Superficie de respuesta.....	34
5.2.1.2	Columnas SCX:	35
5.2.2	Método de Extracción.....	38
5.3	Plan de Validación.....	44
5.3.1	Determinación rango lineal	44
5.3.2	Determinación de especificidad.....	49
5.3.3	Tiempo de retención	49
5.3.4	Recuperación	50
5.3.5	Precisión	51
5.3.6	Veracidad.....	52
5.3.7	Límite de decisión ($CC\alpha$), Capacidad de detección ($CC\beta$) e Incertidumbre.....	52
5.3.8	Estudio entre dos operadores	52
5.3.9	Estudio de Estabilidad	53
5.4	Estudio de otras Matrices	54
5.5	Estudio de Vigilancia	55
6	Conclusiones.....	56
7	Bibliografía.....	57

Índice de Figuras

Figura 1: Estructura química de la nicarbazina	4
Figura 2: Espectro de absorción de la nicarbazina	28
Figura 3: Cromatograma de estandar de nicarbazina con fase móvil 60/40.....	30
Figura 4: Cromatograma de estandar de nicarbazina con fase móvil 50/50.....	30
Figura 5 Cromatograma de estandar de nicarbazina con fase móvil 40/60.....	30
Figura 6: Cromatograma del estándar de nicarbazina en gradiente.....	31
Figura 7: Efectos significativos para el diseño de Screening factor SPE Silica.....	34
Figura 8: Superficie de respuesta.....	35
Figura 9: Efectos significativos para el diseño de Screening factor SPE SCX	36
Figura 10: Dilución de acetonitrilo v/s recuperación.	37
Figura 11: Efectos significativos para el diseño de Screening factor SPE.....	39
Figura 12: Cromatograma de estándar puro de nicarbazina	41
Figura 13: Cromatograma utilizando como limpieza SPE SCX.	41
Figura 14: Cromatograma utilizando como limpieza SPE Columna C18.....	42
Figura 15: Cromatograma utilizando como limpieza SPE Silica	42
Figura 16 : Cromatograma utilizando como limpieza filtro	43
Figura 17: Correlación gráfica estándar de nicarbazina	44
Figura 18: Curva Externa	45
Figura 19: Cromatograma de estándares superpuestos.....	45
Figura 20: Curva matriz.....	46
Figura 21: Cromatograma 10ng/g.....	47
Figura 22: Cromatogramas de muestras fortificadas superpuestas	47
Figura 23: Espectro de absorción superpuesto de un estándar y una muestra enriquecida	48
Figura 24: Cromatograma superpuesto de un estándar y una muestra fortificada	48
Figura 25: Cromatograma de músculo de pollo sin fortificar	49
Figura 26: Tiempo de retención del total de muestras con sus límites de aceptabilidad.....	49
Figura 27: Linealidad del total de las muestras	51

Índice de Tablas

Tabla 1: Propiedades de la nicarbazina	4
Tabla 2: Límite máximo residual	5
Tabla 3: Elusión en gradiente	13
Tabla 4: Factores y niveles de Screenig factor SPE Silica	15
Tabla 5 : Matriz de diseño SPE Silica	16
Tabla 6: Factores y niveles de la metodología de superficie de respuesta SPE Silica	17
Tabla 7: Matriz de diseño de Superficie de Respuesta de columna de silica	17
Tabla 8: Factores y niveles screenig factor SPE SCX.....	18
Tabla 9: Matriz de diseño experimental del screening factor SPE SCX	18
Tabla 10: Factores y niveles Screenig factor extracción	20
Tabla 11: Matriz de diseño experimental de extracción, utilizando columna SCX	20
Tabla 12: Esquema del plan de validación.	23
Tabla 13: Muestras de estudio de vigilancia	27
Tabla 14: Influencia de la composición y flujo de la fase móvil en HPLC.....	29
Tabla 15: Resultado ensayo SPE columna de silica	32
Tabla 16: Significancia estadística SPE silica.....	33
Tabla 17: Matriz de respuesta de estudio de superficie de respuesta	34
Tabla 18: Matriz de respuesta estudio SPE SCX	35
Tabla 19: Significancia estadística SPE SCX.....	36
Tabla 20: Mezclas hidro-orgánicas de cargado columna SCX.....	37
Tabla 21: Solventes de extracción y su recuperación.....	38
Tabla 22: Matriz de respuesta de método de extracción	39
Tabla 23: Significancia estadística	40
Tabla 24: Esquema de curva externa.....	44
Tabla 25: Parámetros de curva externa.....	45
Tabla 26 : Estándares agregado con	46
Tabla 27: Resultados plan validación.....	50
Tabla 28: Resumen de resultados del plan de validación.	52
Tabla 29: Resultados estudio con otro operador	53
Tabla 30: Comparación	53

Tabla 31: Estudio de estabilidad.....	54
Tabla 32: Recuperación en otras matrices	54
Tabla 33: Respuestas de estudio de vigilancia	55

Resumen

La Nicarbazina es un coccidiostato sintético utilizado en medicina veterinaria para el control protozoario (*Eimeria sp*) en pollos. Si no se respetan las dosis de aplicación y periodos de resguardo de estos fármacos, pueden quedar en forma de residuos en los tejidos destinados al consumo humano, los que pueden ocasionar efectos nocivos en la salud. Con el propósito de entregar productos sanos, se han establecido Límites Máximos Residuales (LMR), por lo que es importante contar con metodologías de análisis validadas para determinar dichos límites. Con este objetivo, en esta memoria se desarrolló un método simple y confiable para la detección de residuos de nicarbazina a través de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a detector de arreglo de diodos, que cumpla con los criterios de validación establecidos en la Comunidad Europea (2002/657/CE). Durante el desarrollo del método, el tipo y volumen de extractante, la forma de limpieza de la muestra y la composición de la fase móvil fue modificada hasta optimizarla. Finalmente el método validado consistió en 2 g de músculo de pollo que fueron fortificados y extraído el analito con 12 ml de acetonitrilo asistido con energía de ultrasonido, limpiada a través del uso de filtro y evaporado a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Los extractos fueron reconstituidos en 500 µl de acetonitrilo/agua 1/1, para luego realizar el análisis instrumental en HPLC-DAD a 350 nm. El método fue validado según las directrices de la comunidad europea y el tejido de músculo de pollo fue fortificado a niveles de 100, 200 y 300 µg/Kg con el estándar de nicarbazina. El límite de decisión ($CC\alpha$) fue de 205 µg/kg y la capacidad detección ($CC\beta$) fue de 211 µg/kg. La recuperación fue mayor al 80% y el límite de detección fue de 10 µg/kg (basado en la curva matriz). Finalmente el método validado fue aplicado a un programa piloto de detección de residuos de medicamentos de uso veterinario en alimentos de origen animal, tal piloto fue desarrollado en conjunto entre el Instituto de Salud Pública (ISP) y el Ministerio de Salud (MINSAL).

Abstract

The Nicarbazin is a synthetic coccidiostats used in veterinary medicine for the control of protozoa (*Eimeria sp*) in chickens. If the doses of application and periods of defense are not respected of the drugs may be in the form of residues in tissues destined for human consumption, which can cause harmful effects on health. For the purpose of deliver products healthy have been established Maximum Residual Limits (LMR), so it is important to have validated analytical methodologies to determinate those limits. With this objective in this report developed a simple and reliable method for detecting residues of nicarbazin through high performance liquid chromatography coupled to diode array detector that meets the validation criteria established in the European Community (2002/657/CE). During the development of the method, type and volume of extracting, cleaning the sample, the composition of the mobile phase was varied to optimize. Finally the validated method consisted in 2 g of chicken muscle that was fortified and extracted the analyte with 12 ml of acetonitrilo assisted with ultrasound energy, cleaned using a filter and evaporated to dryness under nitrogen flow. The extracts were reconstituted in 500 μ l of acetonitrile/water 1/1, for then realize instrumental analysis in HPLC-DAD whit detection at 350 nm. The method was validated according to UE guidelines, the chicken muscle was fortified at level of 100, 200 and 300 μ g/Kg with nicarbazin standart. The decision limit ($CC\alpha$) was 205 μ g/kg and the detection capability ($CC\beta$) was 211 μ g/kg. The recovery was > 80% and the limit of detection was 10 μ g/kg (based on the matrix curve). Finally, the validated method was applied to a pilot program for detecting residues of veterinary drugs in foods of animal origin, this pilot was developed jointly between the Institute of Public Health (ISP) and the Ministry of Health (MINSAL)

1 Introducción

Hace unos 30 años, el consumo de carne en Chile apenas alcanzaba los 28,5 kg/hab/año, siendo mayoritariamente de especie bovina. Esta situación ha cambiado radicalmente, ya que para el año 2006 el consumo de carne aumentó hasta aproximadamente 80 kg/hab/año, donde el 43% corresponde a carne de aves (ODEPA, 2007). Del total de carne de ave, un 94,2% corresponde a pollo, siendo hoy en día la principal carne consumida en nuestro país (APA, 2008).

El aumento del consumo de carne de aves propone un desafío a los productores para aumentar su producción. Este aumento en la producción de aves es multifactorial, siendo atribuible, por ejemplo, al desarrollo de nuevos medicamentos y tratamientos eficaces contra los diferentes patógenos que afectan la producción de aves.

Por “medicamento veterinario” se entiende cualquier sustancia aplicada o administrada a cualquier animal destinado a la producción de alimentos, como los que producen carne o leche, las aves de corral, peces o abejas, tanto con fines terapéuticos como profilácticos o de diagnóstico, o para modificar las funciones fisiológicas o el comportamiento (*Codex Alimentarius*, 2003). Según el *Codex Alimentarius*, los residuos de medicamentos veterinarios, incluyen los compuestos de origen y/o sus metabolitos presentes en cualquier porción comestible de un producto animal, así como los residuos de impurezas relacionados con el medicamento veterinario correspondiente.

La inocuidad alimentaria cobra importancia progresiva, pues es tanto un problema de salud pública como también de índole económico. Se atribuyen a la presencia de residuos de medicamentos veterinarios y/o sus metabolitos efectos nocivos, tales como: genotóxicos, mutagénicos, cancerígenos, etc. La apertura de mercados exigentes como el europeo, obliga a terceros países que desean exportar instaurar un programa de vigilancia de estas sustancias que satisfagan los requisitos que establece la legislación comunitaria. Dicha legislación establece Límites Máximos de Residuos para sustancias de uso permitido (LMRs). Luego es importante contar con metodologías de análisis validadas, apropiadas para estudiar los residuos de medicamentos veterinarios en los límites exigidos por las distintas legislaciones y/o normas.

En esta memoria de título se propone, en una primera etapa, desarrollar y optimizar un método de extracción, purificación y cuantificación del residuo marcador de Nicarbazina que corresponde a 4-4´dinitrocarbanida (DNC) en tejido de pollo, luego validar la metodología según criterios analíticos propuestos por la Comunidad Europea, en la Decisión de la Comisión nº 2002/657/CE, y por último aplicar la metodología validada a muestras de un programa piloto de residuos de medicamentos veterinarios desarrollado por el Instituto de Salud Pública en conjunto con el Ministerio de Salud de Chile.

2 Revisión Bibliográfica

2.1 Generalidades

La coccidiosis es una importante enfermedad de las aves causada por un parásito protozoario del género *Eimeria* (Chapman, 2001). Afecta principalmente el intestino de las aves, produciendo un bajo desarrollo, baja en la producción, pérdida de peso y una mortalidad variable que puede ir desde un 5% hasta la totalidad de las aves de un plantel, convirtiéndola actualmente a nivel mundial en un problema económico altamente significativo. Tan sólo en Estados Unidos se estima que los costos de la medicación exceden los 90 millones de dólares y más de 300 millones de dólares en todo el mundo (González, 2000).

Las formas de control de la coccidiosis en aves se basan esencialmente en el uso de drogas (coccidicidas, coccidiostatos) o a través de la vacunación. (González, 2000). De acuerdo a su acción las drogas anticoccidiales se dividen entre:

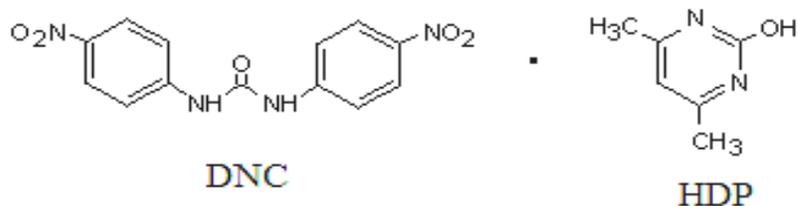
Coccidicidas: Son drogas que inhiben o evitan el desarrollo a nivel intestinal de las coccidias.

Coccidiostato: Estas drogas permiten un desarrollo controlado de las coccidias.

2.2 Características del fármaco

La Nicarbazina es un coccidiostato sintético usada rutinariamente en la industria avícola desde los años 50 para el control protozoario (Yoder, 2006). Corresponde a una mezcla equimolar, conformada por 4-4´dinitrocarbanida (DNC) y 2-hidroxi-4-6 dimetilpirimida (HDP). La función del HDP es aumentar la absorción intestinal y la DCN es el compuesto activo (Yoder, 2006). Estudios de metabolismo muestran que el HDP es eliminado dentro de las 24 horas por la orina, en cambio DNC permanece en la sangre por aproximadamente 4 días antes de ser removido por las heces (Yoder, 2005). Parte del fármaco se excreta en las heces sin absorción (OMS, 2000).

Figura 1: Estructura química de la nicarbazina



En la tabla 1, se muestran algunas características físico-químico de la nicarbazina (Merck, 1968; EPA, 2005).

Tabla 1: Propiedades de la nicarbazina

Color	Amarillo Pálido
Peso Molecular	426.38
Formula	C ₁₉ H ₉ N ₆ O ₆
Punto de Fusión	265.275°C
Absorción UV	300-360 nm
pH	5-7
Densidad	0,5 gr/ml
Solubilidad en agua	baja

El Servicio Agrícola Ganadero (SAG), registra sólo 3 fármacos de Nicarbazina, los cuales son autorizados para su comercialización y uso en el país, Nicarbazina 25% de Veterquímica, Maxiban de Eli Lilly Company y Nicarbazina 25% de Centrovét (SAG, 2008). Cualquiera de éstos posee un período de resguardo de 4 días (Botana, 2002).

El Ministerio de Salud, (Minsal, 1999) usando como referencia las normas del *Codex Alimentarius*, fijó como Límites Máximos de Residuos (LMR) de nicarbazina en pollo, lo que se señala a continuación:

Tabla 2: Límite máximo residual

Producto	LMR
Músculo	200µg/kg
Hígado	200µg/kg
Riñón	200µg/kg
Grasa	200µg/kg

Por "límite máximo para residuos de medicamentos veterinarios" (LMRMV) se entiende la concentración máxima de residuos resultante del uso de un medicamento veterinario (expresada en mg/kg o µg/kg del peso del producto fresco) que la Comisión del Codex Alimentarius recomienda como legalmente permisible o reconoce como aceptable dentro de un alimento o en la superficie del mismo. (*Codex Alimentarius*, 2003)

En un estudio en el Reino Unido de 306 muestras de hígado de pollos broiler analizadas, se encontró residuos de Nicarbazina más allá del LMRMV en 27 muestras (8.8%) del total. Las concentraciones bordearon entre 210 y 3.030 µg/kg (VMD, 2005)

2.3 Toxicidad

Pocos estudios se han realizado sobre la toxicidad de la nicarbazina, entre los resultados destacan lesiones renales en forma de depósito de cristales en los túbulos colectores en ratas, proliferación de conductos biliares y aumento de los niveles séricos de alanina-aminotransferasa en perros (OMS, 2000).

La evaluación de la capacidad genotóxica se realizó sólo con bacterias, en donde se observó un ligero aumento de mutación en la bacteria *Salmonella typhimurium* tipo TA1538 y TA98 (OMS, 2000).

Con el fin de determinar la toxicidad en el desarrollo se estudiaron ratas preñadas, a las cuales se les administró Nicarbazina a distintas dosis durante su gestación, con dosis de 600 mg/Kg peso vivo al día, disminuyeron su ingesta de alimentos, su peso corporal y se presentó una mortalidad del 28% de las madres, con esta dosis, se produjo una disminución del peso fetal y de la osificación, lo que sugeriría un retraso del desarrollo fetal, además se observaron diversas

anomalías fetales, en particular hidronefrosis e hiperplasia y curvatura de las costillas, con estos datos se estableció un nivel no observable del efecto (NOEL) de toxicidad materna y fetal de 200 mg/Kg de peso corporal al día (OMS, 2000).

La Nicarbazina posee una dosis letal (DL) de $DL_{50} >25000$ mg/Kg PV en ratones y en rata es >10000 mg/Kg PV. Se estableció una ingesta diaria admisible de 0-400 μ g/kg de peso corporal, basándose en el NOEL de 200 mg/Kg de peso corporal al día determinado en el estudio de toxicidad en el desarrollo con un factor de seguridad de 500 (OMS, 2000).

2.4 Metodologías

Los laboratorios que deseen determinar residuos de fármacos, deben aplicar metodologías analíticas que garanticen la detección de los LMR, para ello se puede seleccionar métodos realizados en estudios colaborativos realizados por diversos laboratorios de prestigio, recogerlos en revistas analíticas o se pueden desarrollar por el propio laboratorio. Independiente de cual metodología analítica se seleccione, esta debe ser debidamente validada por el laboratorio (San Martín, Cañón. 2000). Los laboratorios privados no tienen obligación de publicar sus métodos para terceros, pero si se deben conocer las referencias bibliográficas que sustenten el método usado¹.

Para el caso de Nicarbazina existe un método recomendado (no obligatorio) por el *Codex Alimentarius*, pero sólo para la matriz de hígado (*Codex Alimentarius*, 2006) y no existe una recomendada para músculo de pollo.

La técnica de análisis para determinar la presencia de residuos de fármacos en alimentos se basa en la extracción con solventes orgánicos, purificación (Souza, et al, 2001) y posteriormente su cuantificación por cromatografía ya sea líquida con detección de arreglo de diodo, fluorescencia, espectrometría de masas o cromatografía de gases (Pérez, 2004).

En el caso de la Nicarbazina, se han empleado diversos solventes de extracción como son el acetonitrilo (Capurro, et al, 2005; MacNeil, 2003; Souza, el al, 2001), metanol (Cannavan, et al, 1999) y acetato de etilo (*Codex Alimentarius*, 2006; Lewis, el al, 1989), así como diferentes medios de purificación, entre los cuáles destaca el uso de columnas de extracción de fase sólida

(Capurro, et al, 2005; Souza, et al, 200), extracción líquido-líquido (*Codex Alimentarius*, 2006), uso de filtros (Sthal y Johnston, 2002) o ninguna (Cannavan, et al, 1999).

En cuanto a la cromatografía, el arreglo de diodo, es altamente usado para determinar la nicarbazina (Capurro, et al, 2005; *Codex Alimentarius*, 2006; MacNeil, 2003; Souza, et al, 2001), es un detector específico y sensible, que genera un espectro de absorción propio de cada analito y su uso es más económico que otros equipos como es la espectrometría de masas¹. Cabe señalar que la nicarbazina no fluoresce por sí sola, por lo que si se quiere utilizar la fluorescencia como detector, ésta habría que derivatizarla, lo que resultaría demoroso y tedioso.

2.5 Situación en Chile

Actualmente en Chile, el Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile es el único laboratorio acreditado para la determinación de Nicarbazina (INN, 2008), además esta reconocido por el SAG para este tipo de análisis, todo ello en el ámbito del programa nacional de residuos de medicamentos veterinarios en productos de exportación¹.

El Instituto de Salud Pública de Chile, por ley, es el laboratorio Nacional de referencia en diferentes ámbitos de la salud pública, por tanto la investigación, desarrollo e implementación de nuevas técnicas analíticas es fundamental para el cumplimiento de su labor de referencia, en alimentos destinado al consumo interno¹.

¹ Roa, L. 2008 [comunicación personal] Jefe del Laboratorio Residuos de Medicamentos Veterinarios, Instituto de Salud Pública, Chile.

3 Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar un método de extracción, purificación y cuantificación del residuo marcador de Nicarbazina, 4-4´dinitrocarbanida (DNC) en matriz de músculo de pollo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar un método por cromatografía líquida de alta resolución acoplado a detección con arreglo de diodos (HPLC-DAD), para la detección y cuantificación del estándar de Nicarbazina.
2. Optimizar condiciones de purificación mediante extracción en fase sólida (SPE).
3. Optimizar condiciones de extracción desde la matriz músculo de pollo.
4. Validar el método seleccionado siguiendo los criterios de la Comunidad Europea a través de la Decisión de la Comisión 2002/657/CE.
5. Cuantificar la presencia de Nicarbazina en diferentes muestras de pollo, pertenecientes a un programa piloto, Estudios de Residuos de Medicamentos Veterinarios, desarrollado por el Ministerio de Salud.

4 Materiales y Métodos

Todos los ensayos realizados para cumplir con los objetivos de esta memoria, se realizaron en dependencias del Instituto de Salud Pública de Chile, en el Departamento de Salud Ambiental, Sección Química y Alimentos, en el Laboratorio de Residuos de Medicamentos Veterinarios.

La cuantificación de la Nicarbazina se realizó por HPLC-DAD, por lo tanto en una primera etapa se desarrolló y optimizó un método cromatográfico para la cuantificación de Nicarbazina.

Luego se desarrolló y optimizó el método de limpieza de la muestra, mediante extracción en fase sólida (SPE); previamente se estudió el comportamiento de diferentes columnas (SCX, Silica, etc.), en presencia del estándar de nicarbazina, se ensayaron diferentes factores, tales como: volúmenes de carga, solventes de cargado, lavado y elusión, luego se realizó el análisis instrumental y cálculo de la recuperación del analito.

Posteriormente, se desarrolló y optimizó la extracción de nicarbazina desde el músculo, mediante la adición de una cantidad conocida del analito sobre una muestra blanco (para garantizar que esta sea blanco, se probó el método de extracción en muestras del mismo músculo sin adición de nicarbazina con el fin de identificar si el músculo contiene el fármaco o interferentes). Se ensayaron diferentes factores, tales como: solventes y tiempo de extracción (por el uso de vortex, orbital y ultrasonido). A continuación se realizó la limpieza de las muestras y el análisis instrumental.

Finalmente se procedió a validar el mejor método desarrollado y se aplicó a muestras de músculo de pechugas de pollos.

4.1 Muestras

19 Muestras fueron utilizadas, las cuales corresponden a músculo de pechuga de pollo, proveniente de vitrinas de diferentes supermercados elegidos aleatoriamente. Cerca de la

totalidad del muestreo se realizó entre los meses de Abril-Mayo del año 2008 y fue realizado por inspectores oficiales dependientes de la autoridad sanitaria de la Región Metropolitana, pertenecientes al MINSAL, quienes las ingresan al ISP, en cajas isotérmicas, para mantener la cadena de frío. Estas muestras una vez que ingresan al laboratorio se saca de su envase original, se limpian retirándoles la grasa y la piel, luego son cortadas en trozos y homogenizadas en homogenizador tipo Blender, para finalmente guardarlas con su identificación en bolsas con sellado hermético a -20°C . De estas muestras, una es elegida aleatoriamente y pasa a formar parte de un programa preliminar del ISP, cuyo objetivo es poner a punto las metodologías analíticas a ensayar, es decir, en ellas se harán las pruebas de ensayo, optimización y validación del método, y el resto de las muestras (18) pertenecen a un segundo programa, que es un programa piloto de Estudio de Residuos de Medicamentos Veterinarios, dependiente del MINSAL, sobre las cuales se aplicará la metodología analítica puesta a punto en el primer muestreo.

Además se contará con muestras de hígado obtenidas de la vitrina de un supermercado de Santiago y con muestras de riñones, otorgadas por el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Chile.

4.2 Materiales, insumos y equipos

4.2.1 Equipos

La detección y cuantificación de la Nicarbazina se realizó usando un equipo cromatográfico, consistente en un Cromatografo líquido Agilent. Equipado con bomba cuaternaria 1200 series, Desgasificador por vacío 1200, muestreador automático con control de temperatura Agilent 1200, termostatizador de columna y Detector DAD.

Se emplearon otros equipos tales como:

Baño de ultrasonido, Elma.

Rotavapor con baño termorregulado $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Evaporador con corriente de nitrógeno de 18 posiciones, Barnstea.

Manifold de extracción de 20 posiciones, Waters.

Bomba de vacío.
Vortex, VWR Scientific.
Licuadora Blender.
Orbital, Seriker.
Balanza analítica de exactitud de 0,0001g.Sartorius.
Centrifuga de 6000 rpm refrigerada, IEC.
Desionizador de agua, Simplicity
Refrigerador.
Congelador.

4.2.2 Estándares

El estándar utilizado para este trabajo fue Nicarbazina (Sigma[®]) con 98,7% de pureza.

Solución Stock: se peso 36,3 mg de Nicarbazina en una balanza de exactitud de 0,0001 g, el analito fue disuelto en 25 ml de DMSO, resultando una concentración final de 1016 µg/mL. Esta solución se debe conservar a una temperatura inferior a 0°C.

Solución intermedia: Se tomó una alícuota de 984 ul de la solución stock y se aforó en un matraz de 10 ml con acetonitrilo, dando una concentración de 100 µg/mL. Esta solución se debe conservar a una temperatura inferior a 0°C.

Solución de trabajo (10 µg/mL): Se tomó una alícuota de 1000 ul de la solución intermedia y se aforó hasta 10 ml con acetonitrilo, dando una concentración de 10 µg/mL. Esta solución se debe conservar a una temperatura inferior a 0°C.

Solución trabajo (1 µg/mL, 2 µg/mL y 3 µg/mL): Se tomó una alícuota de 1000 µL, 2000 µL y 3000 µL del estándar de 10 µg/mL y se agregó cada alícuota sobre un matraz de aforo de 10 mL, enrasar hasta completar el volumen con CH₃CN. Esta solución se debe conservar a una temperatura entre 2-8°C.

Solución de trabajo (0,2 µg/mL): Se tomó una alícuota de 1000 µl de la solución de trabajo de 2 µg/mL y se aforo hasta 10 ml con acetonitrilo, dando una concentración de 0,2 µg/mL. Esta solución se debe conservar a una temperatura entre 2-8°C.

4.2.3 Materiales

Se trabajó con diferentes materiales, entre los que se pueden destacar:

Columna cromatográfica Eclipse XDB- C₁₈ de 2.1 mm x 150 mm (5 µm).

Precolumna Phenomenes C₁₈, 4x3mm (5 µm).

Micropipeta eppendorf intervalo de 10-100 y 100-1000 µL.

Filtros Millipore de 0.45 y 0.22 µm de tamaño de poro.

Columna de extracción en fase sólida silica ,500 mg adsorbente y de 6 cc.

Columna de extracción en fase sólida SCX, 500mg de adsorbente y 3 cc.

Matraz de aforo de 10 mL +/- 0.04 mL (20°C), clase A.

Matraz de aforo de 25 mL +/- 0.04mL (20°C), clase A.

Frascos Shock de 200, 500 y 1000 mL.

Vasos precipitados de 50 y 100 mL.

Tubos de centrifuga Falcón con tapa de 15 y 50 mL.

Tubos de vidrio con tapa de 15 mL.

Viales de 2 mL para autosampler.

Jeringas desechables de 1 y 5 mL.

4.2.4 Reactivos

Se ocuparon diferentes reactivos, tales como:

Acetonitrilo HPLC, 100 % pureza, J. T. Baker.

Acetona, 99,8% pureza, Merck.

Metanol HPLC, 99.8 % pureza, J. T. Baker.

n-Hexano HPLC, 99 % pureza., J. T. Baker.

Sulfato de sodio anhidro p.a., Merck.

Eter dietilico grado HPLC, 99.8 % pureza, Merck.

Dimetilsulfoxido (DMSO), 99,7% pureza, Merck.

Acido fórmico p.a. , Merck.

Acido ortofosforico 88 - 93% pureza, BDH.

Agua.

4.3 Estudio del comportamiento cromatográfico de Nicarbazina

Se estudió el comportamiento cromatográfico en modo isocrático, utilizando diferentes condiciones de flujo y composición de la fase móvil. Se empleó una columna Eclipse XDB- C₁₈ y se utilizó un estándar de 100 ppb de nicarbazina. La fase móvil utilizada consistió en agua y como modificador orgánico acetonitrilo, la composición varió de 30, 40, 50, 60% de modificador orgánico, el flujo varió entre 0,5; 0,8; 1,0 ml/minuto para cada composición. Además se estudió el comportamiento cromatográfico de la Nicarbazina en gradiente, en este tipo de elución la composición de la fase móvil varia a través del tiempo del análisis, se inicio el gradiente con un 30 % de modificador orgánico hasta el primer minuto, para luego incrementar linealmente a un 60% hasta los 6 minutos y mantener esta condición hasta los 7.5 minutos, volviendo a la condición inicial a los 11 minutos y manteniéndose esta condición hasta los 15 minutos, con el objetivo de equilibrar el sistema para la próxima inyección. La velocidad de flujo elegida fue de 0.8 ml/min. En la tabla 3 se detalla el gradiente utilizado, en ambos modos de elución se trabajó a una longitud de onda de 350 nm, una temperatura de la columna de 40 °C y 25 µL como volumen de inyección

Tabla 3: Elución en gradiente

Tiempo	CH ₃ CN	H ₂ O
0	30	70
1	30	70
6	60	40
7,5	60	40
11	30	70
15	30	70

4.4 Desarrollo y optimización del método analítico

La optimización de los parámetros, tanto en la limpieza de la muestra denominada “clean up”, como en la extracción, pretende en un primer paso conocer aquellos factores que son significativos en la recuperación. Con fines metodológicos se estudió el método de purificación y extracción, en forma separada, pero con un esquema similar. En primer lugar se sometieron a un diseño experimental de barrido al cual se le denomina “Screening factor”, una vez identificados los factores significativos, se realizó un segundo paso que consiste en la optimización de dichos factores a través de un diseño experimental del tipo “superficie de respuesta” para obtener el máximo en la respuesta para los factores significativos, la variable de respuesta será expresada como recuperación.

4.4.1 Método de Purificación

En este punto se desarrollaron distintos ensayos para lograr un sistema óptimo de limpieza de la muestra, debido a que la matriz de músculo es compleja por la cantidad de interferentes presentes, principalmente proteínas y grasas.

Para ello se empleó columnas de extracción en fase sólida (SPE), en un principio éstas se estudiaron en ausencia de matriz, con el fin de determinar si las columnas son capaces de retener el analito hasta el momento de su elusión. Se estudiaron dos columnas de características distintas, ellas son Silica y SCX.

4.4.1.1 Estudio con columna de Silica:

Este estudio se desarrolló a través de un diseño screening factor, se utilizó una columna de silica, de 500 mg y 6 cc, que es hidrofóbica y con afinidad por compuestos polares. El diseño consta de cinco factores experimentales (experimental factorial 2^5), que permitirá conocer cuales son los factores que contribuyen de manera significativa en la recuperación. En la tabla 4 se muestran los factores y niveles utilizados.

Tabla 4: Factores y niveles de Screenig factor SPE Silica

Factor		Nivel	
		- 1	+ 1
Volumen de elución	A	3 ml	6 ml
Temperatura de evaporación	B	30 °C	60 °C
Volumen de lavado	C	12 ml	24 ml
Volumen de carga	D	2 ml	4 ml
Tiempo de secado al vacío	E	5 minutos	10 minutos

El estudio consistió en 36 experimentos (ver tabla 5), 32 del ensayo y 4 duplicados, por razones de tipo práctico la realización de este diseño se realizó en 2 bloques, uno de 17 muestras para evaporación a 60 °C y otro con 19 muestras para evaporación a 30 °C.

Este estudio de SPE en ausencia de matriz, se realizó tomando una alícuota de 200 µl de la solución de trabajo de 1µg/ml y se depositó en un tubo falcon de 15 ml, inmediatamente fue agregado hexano/dietileter (90/10) con un volumen de carga de acuerdo al diseño, se agitó un minuto en el vortex y se desarrollaron experimentos según éste. Las muestras fueron cargadas previo acondicionamiento de la columna con 6 ml de hexano/dietileter (90/10), los lavados de la columna fue realizada con la mezcla de hexano/dietileter (90/10) y hexano, a continuación las muestras fueron secadas al vacío y eluidas con metanol. Los extractos fueron evaporados a sequedad bajo corriente de nitrógeno. El extracto seco fue resuspendido con 1 ml de acetonitrilo/agua (50/50), agitado un minuto en vortex, y llevado a ultrasonido por un minuto, finalmente las muestras fueron depositadas en viales para su análisis instrumental.

Se uso el programa Statgraphics 5.0 para el análisis de datos y el método estadístico de análisis fue ANOVA con un nivel de significancia del 95%.

Tabla 5 : Matriz de diseño SPE Silica

N°	A	B	C	D	E
1	6	60	12	4	5
2	3	30	12	4	10
3	6	60	24	4	10
4	3	60	12	2	5
5	3	60	24	4	5
6	3	60	12	2	10
7	6	30	12	2	5
8	6	30	24	2	5
9	3	30	12	4	5
10	3	30	24	4	10
11	6	30	24	2	10
12	3	60	24	4	10
13	3	30	24	2	5
14	3	60	12	4	5
14´	3	60	12	4	5
15	3	30	24	4	5
16	3	60	24	2	5
17	6	30	24	4	5
17´	6	30	24	4	5
18	6	30	12	4	10
18´	6	30	12	4	10
19	6	60	12	4	10
20	6	30	12	4	5
21	6	60	12	2	5
22	6	60	24	2	5
23	3	60	12	4	10
24	3	30	12	2	5
25	3	30	24	2	10
25´	3	30	24	2	10
26	6	60	12	2	10
27	3	30	12	2	10
28	6	30	24	4	10
29	3	60	24	2	10
30	6	60	24	2	10
31	6	60	24	4	5
32	6	30	12	2	10

En este estudio de screening factor, se entregaron los factores significativos que influyen en la recuperación, luego estos debieron ser optimizados por un diseño de superficie de respuesta, en donde se fijan los factores no significativos y se varían solo los significativos, con el fin de optimizarlos. Para este estudio de “superficie de respuesta”, se varió el volumen de carga y volumen de lavado, tal como se muestra en la tabla 6, se utilizó el mismo programa Statgraphic 5.0 y la matriz de diseño a trabajar se muestra en la tabla 7.

Tabla 6: Factores y niveles de la metodología de superficie de respuesta SPE Silica

Factor		Nivel		
		-1	0	+1
Vol. de Carga	A	4	6	8
Vol. de Lavado	B	6	12	18

Tabla 7: Matriz de diseño de Superficie de Respuesta de columna de silica

N°	Volumen de carga	Volumen de lavado	N°	Volumen de carga	Volumen de lavado
1	8	18	8	6	12
2	4	6	9	8	12
3	6	12	10	6	12
4	6	18	11	4	12
5	8	6	12	6	12
6	6	12	13	6	6
7	6	12	14	4	18

4.4.1.2 Estudio con columna SCX

En este estudio de screening factor, se utilizó una columna de intercambio catiónico fuerte o SCX, que tiene la particularidad de unirse fuertemente con compuestos de carga positiva, el DNC de la Nicarbazina contiene un grupo funcional que en presencia de agua podría ionizarse, en forma positiva y retenerse en la columna.

Para el estudio screening factor, se ensayaron cuatro factores experimentales, mediante un diseño experimental factorial 2^4 , para conocer que factores contribuyen de manera significativa en la recuperación. En la tabla 8 se muestran los factores y niveles utilizados y en la tabla 9 se encuentra la matriz de diseño.

Tabla 8: Factores y niveles screenig factor SPE SCX

Factor		Nivel	
		- 1	+ 1
Volumen de lavado	A	6 ml	12 ml
Composición del lavado	B	acido fórmico 2% (1)	Hexano (2)
Volumen de elusión	C	3 ml	6 ml
Volumen de carga	D	5 ml	10 ml

Tabla 9: Matriz de diseño experimental del screening factor SPE SCX

N°	A	B	C	D
1	6	1	6	10
2	6	2	6	10
3	6	1	12	10
3'	6	1	12	10
4	3	1	6	10
5	6	2	12	10
6	6	2	12	5
7	6	2	6	5
8	3	1	12	5
N°	A	B	C	D
9	3	1	12	10
10	3	2	12	10
11	3	2	12	5
12	3	2	6	10
13	6	1	12	5
14	3	2	6	5
14'	3	2	6	5
15	3	1	6	5
16	6	1	6	5

En este estudio de SPE se tomó una alícuota de 200 μ L de la solución de trabajo de 1 μ g/ml y se agregó a un tubo falcon de 15 ml, luego se adicionó agua desionizada con un volumen de acuerdo al diseño, se agitó un minuto en el vortex y se siguió según el diseño experimental. Las muestras fueron cargadas previo acondicionamiento con 6 ml de metanol y 6 ml de agua desionizada, los lavados consistieron en ácido fórmico 2 % (en agua) o hexano y posteriormente un lavado con metanol 5% (en agua), las muestras fueron secadas al vacío y fueron eluidas con metanol. El extracto se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 60 °C. Una vez que los extractos estuvieron secos fueron resuspendidos con 1 ml de acetonitrilo/agua (50/50), agitados en vortex por un minuto y en el ultrasonido por 1 minuto, las muestras fueron depositadas en viales y llevadas para su análisis instrumental. Se utilizó el

programa Statgraphics 5.0 para el análisis de datos y el método estadístico de análisis fue ANOVA con un nivel de significancia del 95%.

En forma paralela fuera del diseño, se estudió el comportamiento de la columna frente a otros solventes y mezclas de solventes en agua, con el objetivo de obtener información prospectiva sobre la potencialidad de utilizar otros vehículos de cargados diferentes a agua o mezclas hidro-orgánicas.

4.4.2 Método de Extracción

En esta etapa, se realizaron una serie de experimentos con el objetivo de desarrollar un sistema de extracción del analito desde la matriz, utilizando solventes orgánicos, asistidos con energía de ultrasonido.

En el estudio de extracción, se ensayaron dos métodos diferentes, teniendo en cuenta ciertas restricciones en el uso de las columnas de SPE. La columna de sílica es hidrofóbica, luego el cargado de cualquier extracto en ella requiere la ausencia total de agua y como el músculo contiene agua en su forma estructural, habría que retirarla antes de empezar a realizar la SPE, de otra forma, para la columna SCX, el cargado debe realizarse en un medio acuoso. En base a estas consideraciones se diseñaron en un comienzo dos tipos de extracción, una dirigida para usar la columna de Sílica y otra para la columna SCX.

Para el primer estudio de extracción acoplado a clean up con columna SCX, se desarrolló un screening factor, a través de un diseño factorial 2^4 para el que se ensayaron cuatro factores experimentales, (cantidad de extractante, tiempo en orbital, tiempo en ultrasonido y cantidad de reconstitución), este diseño permitió conocer que factores contribuyen de manera significativa en la recuperación. En la tabla 10 se muestran los factores y niveles utilizados y en la tabla 11 la matriz de diseño.

Tabla 10: Factores y niveles Screenig factor extracción

Factor		Nivel	
		- 1	+ 1
Cantidad de extractante	A	8 ml	16 ml
Tiempo en orbital	B	5 minutos	10 minutos
Tiempo en ultrasonido	C	5 minutos	15 minutos
Reconstitución	D	8 ml	16 ml

Tabla 11: Matriz de diseño experimental de extracción, utilizando columna SCX

N°	A	B	C	D
1	16	10	5	8
2	8	5	15	8
2'	8	5	15	8
3	16	10	15	8
4	16	5	15	8
5	16	5	15	4
6	8	10	5	8
7	16	5	5	8
8	8	10	15	8

N°	A	B	C	D
9	16	10	15	4
10	16	5	5	4
11	16	5	5	4
12	8	10	5	4
12'	8	10	5	4
13	8	5	15	4
14	8	10	15	4
15	8	5	5	8
16	8	10	5	4

Preliminarmente se evaluaron diferentes extractantes para ser usado posteriormente en la columna SCX, con el objetivo de conocer cuales de ellos entrega una mayor recuperación, los solventes utilizados corresponden a agua, acetonitrilo, tampón pH 3 (KH_2PO_4 0,05M), metanol, acetato de amonio y mezclas de ellos. Los ensayos se realizaron en 2 g de músculo de pollo, los cuales fueron fortificados a nivel de 200 ng/g esperando 15 minutos previo a la extracción, a continuación se adicionó 10 ml de la solución extractante. Las muestras fueron agitadas secuencialmente 1 y 10 minutos en el vortex y agitador orbital respectivamente, a continuación se llevo a baño de ultrasonido por 15 minutos, posteriormente la muestra se centrifugó a 5500 rpm por 10 minutos, finalmente se recolectaron 5 ml del sobrenadante, y se realizó la limpieza por la columna SCX, optimizada en el paso anterior, la columna se acondicionó primero con 6 ml de

metanol y posteriormente con 6 ml de agua desionizada, luego las muestras fueron cargadas y a continuación fueron lavadas con 3 ml de ácido Fórmico 2 % (en agua desionizada) y con 6 ml de metanol 5% (en agua desionizada), las muestras fueron secadas al vacío durante 10 minutos, para finalmente eluirlas con 3 ml de metanol. El extracto se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 60 ° C. Una vez que los extractos estuvieron secos fueron resuspendidos con 0,5 ml de acetonitrilo/agua (50/50), agitados en vortex por un minuto y en el ultrasonido por 1 minuto, las muestras fueron depositadas en viales y llevadas para su análisis instrumental.

Una vez conocido el extractante a utilizar se desarrollaron los experimentos según el diseño experimental screening factor detallado en la tabla 11. Se utilizaron 2 g de músculo de pollo los cuales fueron fortificados con 400 µL del estándar de nicarbazina de 1 µg/ml, (200 ng/g) luego se esperó 15 minutos y se adicionó la solución extractante consistente en acetonitrilo. Una vez obtenido el extracto, se recolectó y se evaporó a sequedad a 60 °C bajo corriente de nitrógeno. El extracto seco fue resuspendido en agua desionizada y cargado a la columna SCX con sus factores experimentales optimizados. Se usó el programa Statgraphics 5.0 para el análisis de datos y el método estadístico de análisis fue ANOVA con un nivel de significancia del 95%.

Como modo de comparación, se utilizó una columna de extracción en fase sólida C₁₈, que es utilizada por Capurro et al (Capurro, et al. 2005), se trabajó con 5 muestras con las condiciones de la columna SCX optimizadas.

Para el estudio de extracción acoplado a la columna de silica, se ensayaron dos factores para conocer su influencia en la recuperación. Puesto que se empleará en una parte el mismo solvente de extracción y la misma matriz que en el estudio anterior de screening factor de extracción acoplado a la columna de SCX, no fue necesario evaluar los mismo factores que en éste, por lo que se decidió sólo variar la cantidad de extractante, disminuyéndola en comparación al estudio anterior (6 o 10 ml) y además se probó otra composición de extractante que fue acetonitrilo/acetona (50/50), versus 100% de acetonitrilo. Debido que en este estudio sólo se querían conocer dos factores, no fue posible utilizar el programa Statgraphics 5.0, ya que no se cumplen con los grados de libertad necesarios. Para esto 2 g de músculo de pollo en un tubo plástico de 50 ml, al instante se fortificó con 400 µl del estándar de nicarbazina de 1 µg/ml se esperó 15 minutos y se adicionó la solución extractante, se agitó durante un minuto en vortex y

se mantuvo 15 minutos en el baño de ultrasonido, posteriormente la muestra fue centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos, a continuación se agregó a la muestra 1 g de sulfato de sodio anhidro, se esperó un minuto para traspasar el sobrenadante a un tubo de ensayo, a continuación se enjuagó la muestra con 2 ml de la solución extractante y finalmente las muestras fueron evaporadas bajo corriente de nitrógeno a 60 °C. Una vez que la muestra estuvo totalmente seca, se resuspendió en hexano/dietileter (90/10), luego se procedió a limpiar la muestra vía columna de sílica con sus factores optimizados.

Para finalizar los estudios de purificación se desarrolló un método que excluía la extracción en fase sólida, el clean up sólo dependía del filtrado del sobrenadante en un filtro de 0,45 µm. El método consistió en pesar 2 g de músculo de pollo (6 muestras) los cuales fueron fortificados con 400 µL del estándar de nicarbazina de 1 µg/ml, luego se esperó 15 minutos y se adicionó como solución extractante 12 ml de acetonitrilo, inmediatamente se agitó 1 minuto en vortex, para luego colocarlo en el agitador orbital por 10 minutos y en el baño de ultrasonido por 15 minutos, posteriormente se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante fue recolectado y filtrado en un filtro de 0,45 µm, finalmente 6 ml fueron recogidos en tubos de vidrio de 10 ml y evaporado a sequedad a 60 °C bajo corriente de nitrógeno. El extracto seco fue resuspendido con 500 µl de acetonitrilo/agua (50/50), agitado un minuto en vortex, y llevado a ultrasonido por un minuto, para luego filtrarlo en filtro de 0,22 µm, finalmente las muestras fueron depositadas en viales para su análisis instrumental.

4.5 Validación de Métodos Cromatográficos

La validación de un método analítico, cobra importancia debido a la garantía que ésta otorga para asegurar la calidad de resultados analíticos, ya que los hace reproducibles y comparables. Estos métodos se pueden validar según diferentes directrices, una de ellas es a través del criterio de la Comunidad Europea, en la Decisión de la Comisión nº 2002/657/CE, la que consta de una serie de parámetros entre los que podemos mencionar: linealidad (curva de calibración), precisión (repetibilidad y reproducibilidad), especificidad, recuperación, estabilidad, límite de decisión y capacidad de detección. Del mismo modo se calcularon dos parámetros que aunque no estén presentes en los criterios de la Directiva 2002/657/CE, es importante conocer, estos corresponden a límite de detección e incertidumbre.

Para cumplir con dichos parámetros, se diseñó un plan de validación, considerando un LMR de 200 µg/Kg, se realizaron 18 muestras fortificadas a nivel de 100 ng/g (½ LMR), 20 muestras fortificadas a nivel de 200 ng/g (LMR) y 18 muestras fortificadas a nivel de 300 ng/g (1 ½ LMR), los ensayos se realizaron durante 5 días. En cada día de validación, además de los fortificados y de la curva de calibración, se realizaron en paralelo cuatro blancos de matriz músculo de pollo, completando un total de 20 al final de la actividad. En la tabla 12 se detalla el plan de validación.

Tabla 12: Esquema del plan de validación.

Día Validación	Nivel		
	Replicados	Replicados	Replicados
	100 µg/kg	200 µg/kg	300 µg/kg
1	3	4	3
2	3	4	3
3	4	4	4
4	4	4	4
5	4	4	4
Total	18	20	18

El método que se validó comprende el método cromatográfico, extracción y limpieza optimizado en experimentos previos.

La metodología usada consistió en pesar 2 g de músculo de pollo los cuales fueron fortificados con 200 µl del estándar de nicarbazina de 1, 2 o 3 µg/ml, según corresponda, luego se esperó 15 minutos y se adicionó una solución extractante consistente en 12 ml de acetonitrilo, agitándolo 1 minuto en vortex, para luego colocarlo en el agitador horizontal orbital a 350 rpm por 10 minutos y en el baño de ultrasonido por 15 minutos más, posteriormente se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos, inmediatamente el sobrenadante fue recolectado y filtrado en un filtro de 0,45 µm, finalmente 6 ml fueron recogidos en tubos de vidrios de 10 ml y evaporado a sequedad a 60 °C bajo corriente de nitrógeno. El extracto seco fue resuspendido con 500 µl de acetonitrilo/agua (50/50), agitado un minuto en vortex, y llevado a ultrasonido por un minuto,

luego fueron filtrado en un filtro de 0,22 μm , finalmente las muestras fueron depositadas en viales para su análisis instrumental.

Una vez finalizado los ensayos se calcularon los siguientes parámetros:

- Tiempo de retención: Corresponde al tiempo que demora el analito en eluir de la columna analítica y ser detectada por el equipo.
- Curva de calibración: Es la curva de concentración, versus área cromatográfica, tanto para estándares (curva externa) como para las muestras enriquecidas (curva matriz).
- Límite de detección (C_m) corresponde a la mínima concentración o la mínima masa del analito que se puede detectar para un nivel de confianza dado. Este límite depende de la relación entre la magnitud de la señal analítica y el valor de las fluctuaciones del blanco. Se puede determinar a través de la siguiente fórmula (Skoog, et al, 2001):

$$C_m = (S_{bl} + K s_{bl}) - S_{bl} / m$$

En donde S_{bl} corresponde a la media de la señal instrumental del blanco, s_{bl} a su desviación estándar, m a la pendiente y K es una constante cuyo valor más aceptado es 3, con un nivel de confianza del 95% (Skoog, et al, 2001).

- Incertidumbre: es la estimación que caracteriza el intervalo de valores en el que se sitúa generalmente con una alta probabilidad dada, el valor verdadero de la magnitud medida. La incertidumbre expandida al nivel de interés, se calcula a partir de CV de la media a dicho nivel de interés o a todos los niveles, multiplicando dicho valor por 2 (95% de nivel de confianza, $K=2$), propuesto por el comité Nórdico NMKL 1997 (*Codex Alimentarius*, 2009): la formula es la siguiente:

$$U = 2 * CV$$

- Precisión: Grado de concordancia entre resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones estipuladas. La precisión suele expresarse como imprecisión y calcularse

como desviación estándar (DE) de los resultados de los ensayos. Se medirá a través de estudios de repetibilidad y reproducibilidad.

- Veracidad: Se calcula al relacionar la cantidad agregada y encontrada del analito. Se expresa como sesgo. Este parámetro en conjunto con la precisión componen la exactitud.

$$\text{Sesgo} = ((\text{cantidad encontrada} - \text{cantidad agregada}) / \text{cantidad agregada}) * 100$$

- Selectividad/Especificidad: Capacidad de un método de distinguir entre el analito y otra sustancia. Se analizaron 20 muestras blancos para ver si existe interferencia en el tiempo de retención.
- Repetibilidad: Grado de concordancia entre los resultados de sucesivas mediciones, efectuadas bajo las mismas condiciones de medición, realizadas por el mismo operador, idénticas muestras, en el mismo laboratorio y con el mismo equipo en un corto periodo de tiempo. Se calculó a partir de los resultados obtenidos en las muestras fortificadas a nivel de 0,5, 1 y 1,5 veces el LMR (mínimo 18). Se deberá determinar la media (\bar{X}) y la desviación estándar (DE). La repetibilidad, se expresa como coeficiente de variación (CV).

$$CV\% = \left(\frac{DE}{\bar{X}} \right) \cdot 100$$

- Reproducibilidad: Grado de concordancia entre los resultados de sucesivas mediciones, efectuadas bajo distintas condiciones de medición. Se calculó a partir de los resultados obtenidos en las muestras fortificadas en diferentes días y a diferentes niveles, 0,5, 1 y 1.5 veces LMR (mínimo 18). La reproducibilidad se expresa como coeficiente de variación.
- Recuperación (exactitud): Porcentaje de la concentración real del analito que puede ser obtenida después del procedimiento analítico. Se calculó a partir de los resultados obtenidos en las muestras fortificadas a diferentes niveles, 0,5, 1 y 1.5 veces LMR (mínimo 18). Se expresa como porcentaje.

$$\% R = (\text{Nivel Medido} / \text{Nivel Fortificado}) * 100$$

- Estabilidad: Se midió a través de diferentes almacenamientos del estándar del fármaco en diferentes solventes (acetonitrilo, metanol, acetona, agua, entre otras) a diferentes tiempos (a 1 hora, 1 día, 1 semana) y se determinó la concentración del analito luego del almacenamiento. También se midió el estándar recién preparado. Se calculó en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Resto del analito (\%)} = \text{Concentración al momento } i * 100 / \text{Concentración de la solución recién preparada}$$

- Límite de decisión (CC α): Límite por encima o igual del cual puede incluirse con una probabilidad de error α que una muestra no cumple. (falso +). Se calculó analizando al menos en tres días diferentes con un mínimo de 20 muestras blancas enriquecidas a nivel del LMR. Se determinó con la siguiente fórmula:

$$CC \alpha (5\%) = \bar{X} \text{ LMR} + 1,64 * DE (\text{LMR})$$

- Capacidad de detección (CC β): contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error β . En el caso de sustancias para las que se ha establecido un límite permitido, la capacidad de detección es la concentración en la que un método puede detectar límites de concentración permitidos con una certeza estadística de $1 - \beta$. Se calculó en base a la siguiente fórmula:

$$CC \beta (5\%) = CC \alpha + 1,64 * DE (\text{LMR})$$

Una vez validada la metodología para la matriz músculo de pollo, y como un modo de ampliar el uso de este método se probó el método con otras matrices de pollo que corresponden a riñón e hígado. Para ello se realizaron 4 muestras blancas y 4 muestras fortificadas a nivel de 200 ng/g para cada matriz.

4.6 Estudio de vigilancia

Una vez validada la metodología propuesta, se procedió a realizar un estudio de vigilancia de muestras que corresponde a un programa piloto de estudios de Residuos de medicamentos Veterinarios, desarrollado por el Minsal. Para ello se contó con 19 muestras, que se detallan en la tabla 13, sobre las cuales se aplicó la metodología validada.

Tabla 13: Muestras de estudio de vigilancia

Muestra	Marca	Procedencia	Fecha Recepción
1880/2007- 2- 4 a	Agrosuper	-	16-05-2007
3569/2007 R 57 a ²	Vitrina	Supermercado Lider Las Condes	28-09-2007
4868/2007 RM-118 t	Vitrina	Supermercado Colina	30-11-2007
75/2008 RM 7 t	Vitrina	Supermercado Tottus	18-01-2008
3978/2008- RM 15- t	Aristia	Supermercado Lider Cerrillos	16-04-2008
3978/2008- RM 16- t	Aristia	Supermercado Lider Cerrillos	16-04-2008
3978/2008- RM 17- t	SuperPollo	Supermercado Lider Cerrillos	16-04-2008
3978/2008- RM 18- t	SuperPollo	Supermercado Lider Cerrillos	16-04-2008
3978/2008- RM 19- t	King	Supermercado Tottus Cerrillos	16-04-2008
3978/2008- RM 20- t	King	Supermercado Tottus Cerrillos	06-05-2008
3978/2008- RM 21- t	Sta Rosa	Supermercado Unimarc La Florida	07-05-2008
3978/2008- RM 22- t	Sta. Rosa	Supermercado Unimarc La Florida	07-05-2008
3978/2008- RM 23- t	Don Pollo	Supermercado Ribeiro La Florida	07-05-2008
3978/2008- RM 24- t	Don Pollo	Supermercado Ribeiro La Florida	07-05-2008
5670-2008- 2470	-	Distribuidora Estación Central	20-05-2008
5670-2008- 2471	-	Distribuidora Estación Central	20-05-2008
5670-2008- 2472	-	Distribuidora Estación Central	20-05-2008
5670-2008- 2473	-	Distribuidora Estación Central	20-05-2008
5670-2008- 2474	-	Distribuidora Estación Central	20-05-2008

Para considerar una muestra con nicarbazina, el pico cromatográfico de ésta deberá tener el mismo tiempo de retención (\pm 2,5%) y el mismo espectro de absorción que el estándar de nicarbazina. La cuantificación de las muestras se realizó a través de la interpolación en una curva en matriz. Los resultados se expresarán de la siguiente forma:

No Detectado (ND): Cuando la concentración obtenida sea inferior al límite de detección.

Detectado: Cuando la concentración obtenida este por sobre el límite de detección, pero debajo del límite de cuantificación. Si esta por sobre el límite de cuantificación, se indicará la concentración.

² Muestra utilizada para la validación

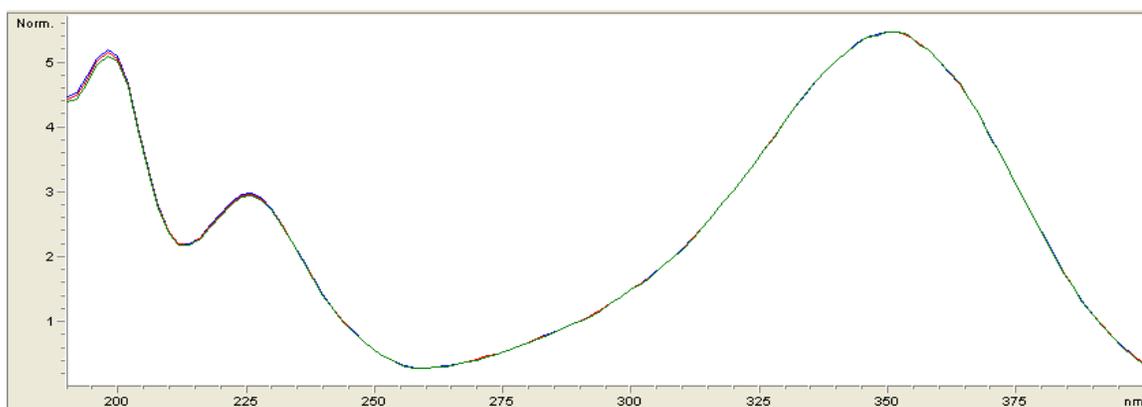
5 Resultados y Discusión

5.1 Estudio del comportamiento cromatográfico de Nicarbazina

5.1.1 Comportamiento espectral

En la figura 2, se observa el espectro de absorción de nicarbazina, que va desde 180-400 nm, tomado en el máximo del peak cromatográfico, claramente se pueden diferenciar tres máximos de absorción, los cuales corresponden a 200, 225 y 350 nm, se seleccionó ésta última, debido a que presenta la mayor absorción y además por que la mayoría de los compuestos orgánicos presentan una fuerte absorción a longitudes de onda menores a 280 nm.

Figura 2: Espectro de absorción de la nicarbazina



5.1.2 Comportamiento cromatográfico

En la tabla 14 se muestran los resultados de los ensayos realizados con el estándar de Nicarbazina, a una concentración fija de 100 ppb, con un modelo isocrático variando el flujo y la composición de la fase móvil. En ésta misma tabla se entregan los siguientes parámetros cromatográficos: tiempos de retención, ancho del pico y el área bajo la curva. Se puede observar que una disminución en el flujo de la fase móvil provoca un aumento en el tiempo de retención, como también un aumento del área bajo la curva y una disminución de la presión. Este resultado puede explicarse porque un menor flujo permite una mayor interacción entre el analito y la fase estacionaria y una menor resistencia de la columna frente al paso de la fase móvil. Al aumentar la

concentración del modificador orgánico (CH₃CN) en la fase móvil, disminuye el tiempo de retención, disminuye la presión y aumenta el área, esto debido a la mayor afinidad que tiene el analito frente a este solvente y por la baja viscosidad que tiene éste comparado con el agua (H₂O). Los resultados se observan claramente en los cromatogramas de las figuras 3, 4 y 5.

Tabla 14: Influencia de la composición y flujo de la fase móvil en HPLC

Fase móvil CH ₃ CN/H ₂ O	Flujo (ml/min)	Presión (bar)	TR (min)	Área	Ancho de peak (seg)
60/40	0.5	112	2.776	32.68	22
	0.8	162	0.999	20.74	22
	1	204	0.800	16.69	21
50/50	0.5	100	1.617	33.21	40
	0.8	179	1.686	20.42	30
	1	224	1.327	16.39	30
40/60	0.5	128	7.763	30.57	75
	0.8	209	4.935	19.59	46
	1	264	4.035	15.86	45
30/70	0.5	141	> 15	-	-
	0.8	229	> 15	-	-
	1	284	> 15	-	-

Un flujo de 0.8 ml/minutos, genera presiones de trabajo intermedias en la columna y ancho de peak angosto, idéntico a 1ml/min pero menores que usando un flujo de 0,5 ml/min, con lo que se logra disminuir la posibilidad de coelusión con interferentes.

Figura 3: Cromatograma de estandar de nicarbazina con fase móvil 60/40 y flujo 0,5 ml/min (rojo), 0,8 ml/min (azul) y 1ml/min (verde)

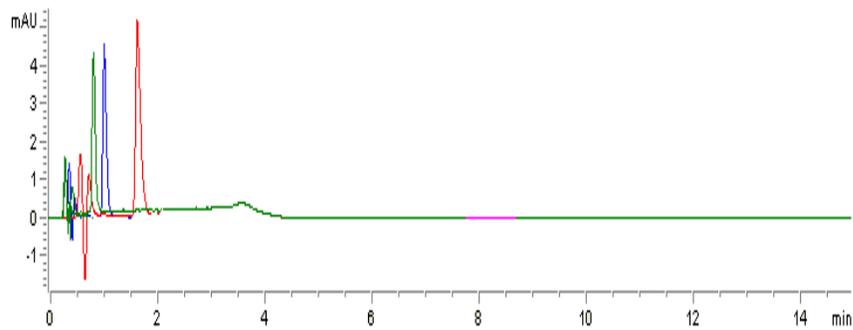


Figura 4: Cromatograma de estandar de nicarbazina con fase móvil 50/50 y flujo 0,5 ml/min (rojo), 0,8 ml/min (azul) y 1ml/min (verde)

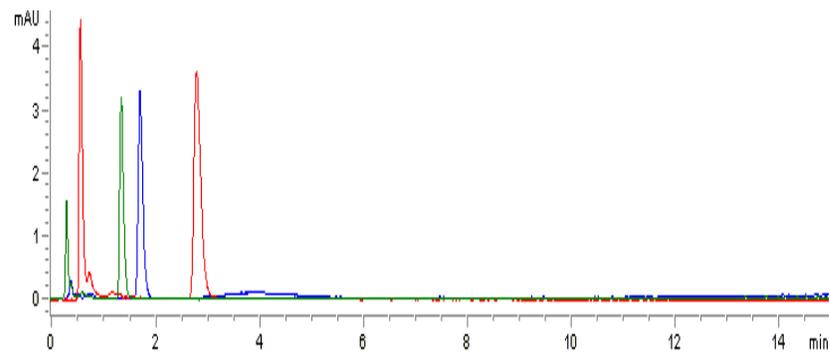
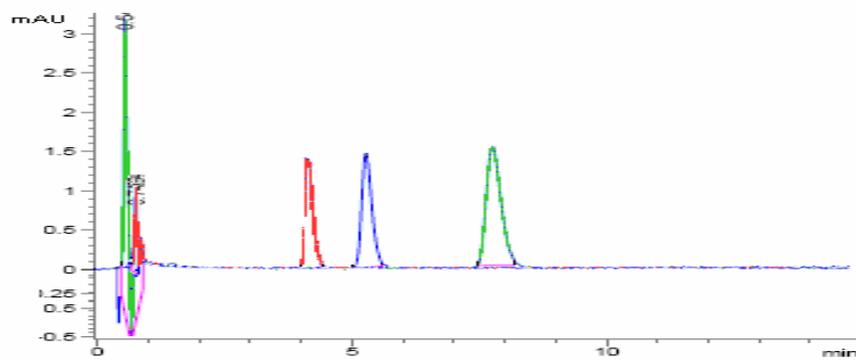
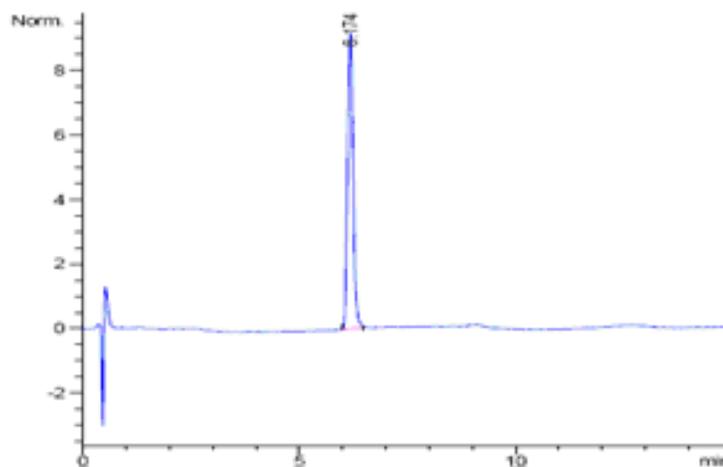


Figura 5 Cromatograma de estandar de nicarbazina con fase móvil 40/60 y flujo 0,5 ml/min (verde), 0,8 ml/min (azul) y 1ml/min (rojo)



Posteriormente se realizó un modelo de elución en gradiente, cuyo cromatograma se muestra en la figura 6. Como se puede apreciar, el analito posee un tiempo de retención de 6,17 minutos, un área de 21,02 y el peak es simétrico y con un ancho de 22 seg, el ancho de peak es similar al obtenido en la condición isocrática 60/40, pero con un tiempo de elución mayor, esto permite asegurar una buena separación del analito de los interferentes tanto de solventes y matriz que aparecen antes del primer minuto del cromatograma.

Figura 6: Cromatograma del estándar de nicarbazina en gradiente.



5.2 Desarrollo y Optimización

5.2.1 Método de purificación

En esta parte se mostrarán y evaluarán los ensayos propuestos en la metodología, en una primera etapa se darán a conocer las respuestas del diseño screening factor creado para determinar que factores son significativos en la recuperación utilizando las columnas de Silica y SCX, al existir factores significativos, estos se optimizaron a través de la metodología “superficie de respuesta”

5.2.1.1 Columna de Silica:

La matriz de respuesta obtenida del screening factor de purificación, usando la columna de silica se muestra en la tabla 15. Los porcentajes de recuperación de estos ensayos fluctuaron entre 38,9 y 96,4%.

Tabla 15: Resultado ensayo SPE columna de silica

Ensayo	Recuperación %	Ensayo	Recuperación %
1	38,9	17'	86,8
2	87,5	18	92,1
3	94,2	18'	91,1
4	93,7	19	91,6
5	95,9	20	92,1
6	93,5	21	90,6
7	86,8	22	73,3
8	78,7	23	86,2
9	91,6	24	90,5
10	95,4	25	63,7
11	84,4	25'	73,5
12	89,2	26	84,7
13	84,4	27	96,4
14	87,1	28	89,3
14'	95,2	29	76,6
15	92,3	30	75,4
16	83,1	31	91,8
17	90,2	32	92,1

A partir del análisis estadístico del programa, se obtiene los efectos de cada factor y de sus interacciones. Los factores significativos fueron tres: volumen de carga (D), volumen de lavado (C) y la interacción entre ambos, a un nivel de significancia del 95%. La significancia estadística de cada efecto se obtiene comparando los cuadrados medios contra un estimado del error experimental obteniendo los valores correspondientes de “p-value”. Cuando éstos son menores a un 0,05 el efecto será significativo a un nivel de confianza de un 95%. En este caso la hipótesis

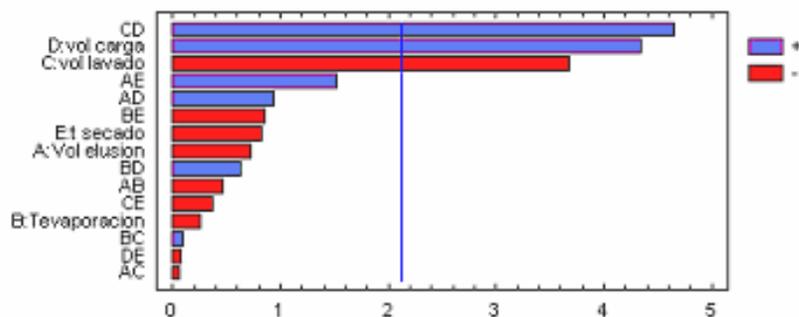
nula es que el efecto no es significativo y un menor valor de p-value es mejor evidencia en contra de dicha hipótesis. En la tabla 16 se observan los factores y las interacciones significativas obtenidas en el análisis ANOVA y en la figura 7 se grafica, mostrándose en azul los factores positivos que inducen a una mayor recuperación y en rojo los negativos que inducen a una menor recuperación.

Como se puede apreciar el volumen de cargado influye en un modo positivo, es decir que al cargar 4 ml se recupera más que al cargar sólo 2 ml, tal comportamiento, puede explicarse porque la columna de silica es altamente polar y para provocar la retención del analito en la columna, éste debe disolverse en un solvente apolar, en este caso se usó una mezcla de hexano-dietileter, donde el analito posee una baja solubilidad, por este motivo una mayor cantidad de solvente provoca una mayor solubilización. Al contrario el volumen de lavado influye de un modo negativo, mientras más veces la columna es lavada, menor es la recuperación, posiblemente porque en los lavados parte del analito eluía con éste.

Tabla 16: Significancia estadística SPE silica

Factor	p-value ($\alpha=0,05$)	Significancia
A: Vol. elusión	0,4763	No significativo
B: T° evaporación	0,8008	No significativo
C: Vol. Lavado	0,0020	Significativo
D: Vol. cargado	0,0005	Significativo
E: T° Secado	0,4212	No significativo
AB	0,6427	No significativo
AC	0,9497	No significativo
AD	0,3623	No significativo
AE	0,1473	No significativo
BC	0,9308	No significativo
BD	0,5407	No significativo
BE	0,4038	No significativo
CD	0,0003	Significativo
CE	0,7172	No significativo
DE	0,9434	No significativo

Figura 7: Efectos significativos para el diseño de Screening factor SPE Silica



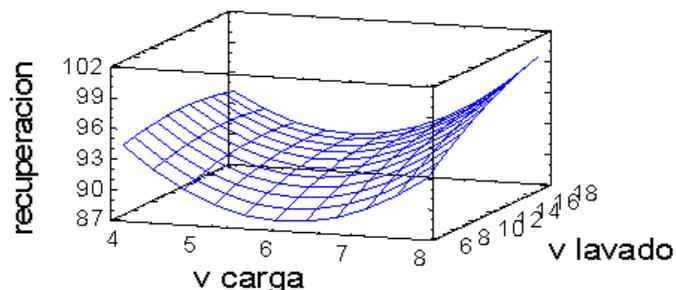
Método de Superficie de respuesta

Los factores significativos derivados del estudio de screening factor usando la columna de Silica, que corresponden a volumen de carga y volumen de lavado, fueron variados, con el fin de optimizarlos a través del estudio de superficie de respuesta. En la tabla 17, se detalla la matriz de respuesta, los porcentajes de recuperación de estos ensayos fluctuaron entre 82,1 y 98,8 %, no evidenciándose ninguna diferencia estadística entre un volumen de carga de 4, 6 y 8 ml, como tampoco hubo diferencias estadísticas entre lavar con 6, 12 o 18 ml. En la figura 8 se observa la superficie de respuesta obtenidas para la recuperación en función de volumen de carga-volumen de lavado. Al observar el gráfico se puede advertir que no se aprecian máximos bien definidos, luego se logró el máximo operacional de los factores estudiados en el diseño de screening factor.

Tabla 17: Matriz de respuesta de estudio de superficie de respuesta

Ensayo	Recuperación %	Ensayo	Recuperación %
1	98	8	91,8
2	97,2	9	96,1
3	98,8	10	88,7
4	94,5	11	93,7
5	95,7	12	87,5
6	84,4	13	82,1
7	93,3	14	92,9

Figura 8: Superficie de respuesta



5.2.1.2 Columnas SCX:

Utilizando el mismo programa que para la columna de Silica, se realizó el estudio para evaluar los factores significativos que influyen en la recuperación usando la columna SCX, la matriz de respuesta se puede ver en la tabla 18. Los porcentajes de las recuperaciones fluctuaron entre 69,1 y 78,9.

Tabla 18: Matriz de respuesta estudio SPE SCX

Ensayo	Recuperación %	Ensayo	Recuperación %
1	72,6	9	71,1
2	69,1	10	65,5
3	71,4	11	70,8
3'	71,4	12	64,1
4	71,4	13	78,9
5	72,6	14	72,6
6	70,6	14'	74,4
7	76,2	15	75,4
8	72,6	16	72,6

Los resultados de este estudio, evidenciaron sólo un factor significativo, que fue el volumen de carga en un modo negativo, es decir que mientras menos era el volumen de carga se obtiene mayor recuperación del analito, tal comportamiento puede explicarse debido a que a menores volúmenes de carga existe una mayor interacción entre la Nicarbazina y los grupos

funcionales SO_3^- de la columna. En la tabla 19 se observan los factores y las interacciones significativas obtenidas en el análisis ANOVA y en la figura 9 se grafica.

Figura 9: Efectos significativos para el diseño de Screening factor SPE SCX

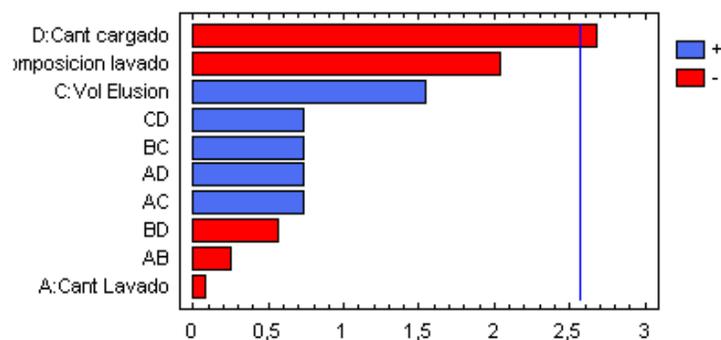


Tabla 19: Significancia estadística SPE SCX

Factor	p-value ($\alpha=0,05$)	Significancia
A: Cant. de lavado	0,9384	No significativo
B: Composición	0,0979	No significativo
C: Vol. Elusión	0,1832	No Significativo
D: Vol. cargado	0,0437	Significativo
AB	0,8171	No significativo
AC	0,4973	No significativo
AD	0,4973	No significativo
BC	0,4973	No significativo
BD	0,5940	No significativo
CD	0,4973	No significativo

Como se mencionó anteriormente, en forma paralela, fuera del diseño, se estudió el comportamiento de la columna frente a mezclas de solventes tales como acetonitrilo, metanol y acetona en agua, con el objetivo de obtener información prospectiva sobre la potencialidad de utilizar otros vehículos de carga diferentes a 100% agua. En la tabla 20 se muestran los resultados obtenidos.

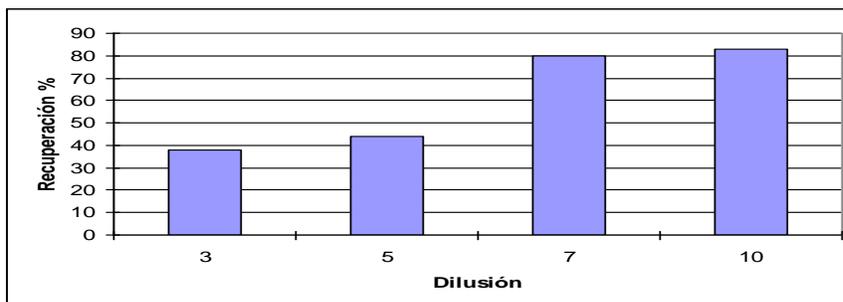
Tabla 20: Mezclas hidro-orgánicas de cargado columna SCX.

Componentes	R %
Acetonitrilo/agua (10/90)	83
Acetona/acetonitrilo/agua (5/5/90)	46
Metanol/agua (10/90)	84

Tanto la mezcla de acetonitrilo-agua y metanol-agua, interfieren mínimamente con el mecanismo de obtención de carga positiva en la molécula de nicarbazina y posterior unión de la molécula ionizada con el grupo SO_3^- del relleno de la columna. Tanto el metanol como el acetonitrilo poseen un grupo hidroxilo y ciano electronegativo muy similar al del agua. En cambio la molécula de acetona no lo posee e interfiere en el mecanismo de ionización e interacción entre nicarbazina y el relleno de la columna.

Al comprobar que el acetonitrilo al 10% no interfería en la unión de la nicarbazina con el relleno catiónico de la columna, se realizó otro ensayo con el fin de determinar el límite de concentración de acetonitrilo que se podía utilizar sin que este eluyera el analito en el momento del cargado. Se tomaron 200 ppb del estándar de nicarbazina y se agregó en un tubo falcon que contenía 2 ml de acetonitrilo, para posteriormente hacer la dilución con agua, a nivel de 3, 5, 7 y 10 veces, las recuperaciones fueron de 38, 44, 80 y 83% respectivamente, tal como se puede apreciar en la figura 10, observándose que un aumento de la concentración de agua produce mayores recuperaciones, pues el mecanismo de ionización y unión es mínimamente interferido. La necesidad de dilución, implica un gran volumen de cargado, haciendo lento y poco práctico el procedimiento.

Figura 10: Dilución de acetonitrilo v/s recuperación.



5.2.2 Método de Extracción

Columnas SCX:

Como se mencionó en la metodología lo primero que se realizó fue utilizar diferentes solventes de extracción, para evaluar su posible utilización tanto como extractante y como medio de carga para la columna SCX, en la tabla 21 se muestra los solventes utilizados conjuntamente con la recuperación obtenida.

Tabla 21: Solventes de extracción y su recuperación

Solventes	R%
Agua	0
Acetonitrilo	0
Tampón pH 3	1
Metanol	0
Acetato de amonio	0
Acetato de Amonio/Acetonitrilo (50/50)*	12
Acetonitrilo/Agua (50/50)*	11
Metanol/Agua (50/50)*	0
Acetonitrilo/tampón pH 3 (50/50)*	12
Acetonitrilo**	38
Acetonitrilo/tampón pH 3 (50/50)**	33

* diluido 2 veces para cargarlo en la columna

** diluido 10 veces para cargarlo en la columna

Luego de obtenidos los resultados, se puede deducir que el uso de solventes hídricos como el agua, tampón y acetato de amonio no son capaces de extraer el analito desde la matriz, en tanto el acetonitrilo, no es capaz de permitir la unión de la nicarbazina en la columna. El uso de mezclas hidro-orgánicas con acetonitrilo/agua incrementa la recuperación, no ocurre lo mismo con la mezcla metanol/agua que al parecer no logra extraer la nicarbazina desde el músculo. Por último la mayor recuperación se logra utilizando como solvente de extracción acetonitrilo 100%, pero éste debe ser diluido antes del cargado, al existir éste inconveniente, se optó luego de la

extracción con acetonitrilo, evaporarlo a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 60 °C, y reconstituirlo en agua para después cargarlo por la columna SCX.

En la tabla 22, se puede ver el estudio completo del screening factor diseñado en la metodología, los cuales muestran un promedio de recuperación cercano al 40%, cuyos valores fluctuaron entre el 28 y 59%, lejos del 80% necesario para la validación. En la tabla 23 se observan los factores y las interacciones significativas obtenidas en el análisis ANOVA y en la figura 11 se grafica.

Tabla 22: Matriz de respuesta de método de extracción

Ensayo	Recuperación %	Ensayo	Recuperación %
1	42	9	44
2	33	10	59
2'	35	11	31
3	47	12	46
4	45	12'	45
5	31	13	28
6	28	14	49
7	40	15	48
8	29	16	34

Figura 11: Efectos significativos para el diseño de Screening factor SPE

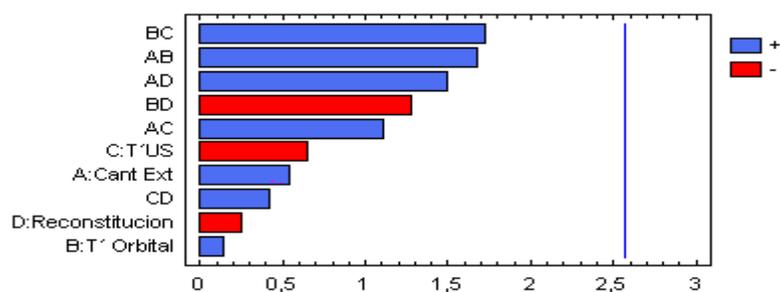


Tabla 23: Significancia estadística

Factor	p-value ($\alpha=0,05$)	Significancia
A: Cant. de Extract.	0,6139	No significativo
B: T´Orbital	0,8930	No significativo
C: T´US	0,5439	No Significativo
D: Reconstitución	0,8091	No Significativo
AB	0,1559	No significativo
AC	0,3201	No significativo
AD	0,1940	No significativo
BC	0,1449	No significativo
BD	0,2589	No significativo
CD	0,6889	No significativo

Como se puede apreciar, no hubo diferencias significativas en los parámetros estudiados.

Columna Silica:

Se ensayaron dos factores para conocer su influencia en la recuperación, cantidad de extractante (6 o 10 ml) y composición del extractante (50% de acetonitrilo/acetona, versus 100 de acetonitrilo), el resultado obtenido muestra recuperaciones menores que las de la extracción anterior, bordeando el 20%, resultando ser un método poco apto y engorroso.

Como se señaló anteriormente en la metodología, se quiso comparar el uso de la columna C₁₈ utilizando el mismo método que para la columna SCX, las recuperaciones obtenidas fueron en promedio 38%, muy similar a las obtenidas con la columna SCX.

El uso de SPE, tiene grandes y variadas ventajas como son concentrar y limpiar la muestra, sin embargo para los estudios propuestos en esta memoria, luego de la extracción, en todos los casos fue necesario evaporar la muestra, lo que lo hace demoroso, y las recuperaciones bajan por el hecho de resuspender las muestras 2 veces. La exclusión de SPE, al limpiar la muestra utilizando sólo un filtro de 0,45µm, entrega recuperaciones que bordean el 80%.

En las figuras 12, 13, 14, 15 y 16 se comparan diferentes cromatogramas, correspondientes a un estándar de nicarbazina de 400 ppb, al uso de columna SCX, C18, Silica y solo filtro. Pudiendo apreciar en éstos que las mayores recuperaciones se obtuvieron utilizando el método sin SPE (figura 16), la cual entrega un pico cromatográfico simétrico y sin interferentes. El uso de las columnas, producían una interferencia cerca del pico cromatográfico, por lo cual se decidió validar la metodología sin extracción en fase sólida.

Figura 12: Cromatograma de estándar puro de nicarbazina

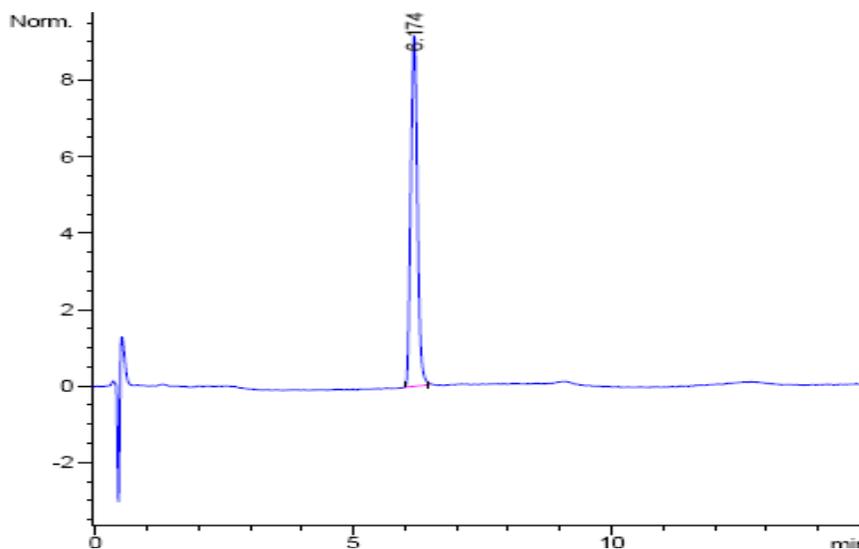


Figura 13: Cromatograma utilizando como limpieza SPE SCX.

En muestras fortificadas a nivel de 200 ng/g

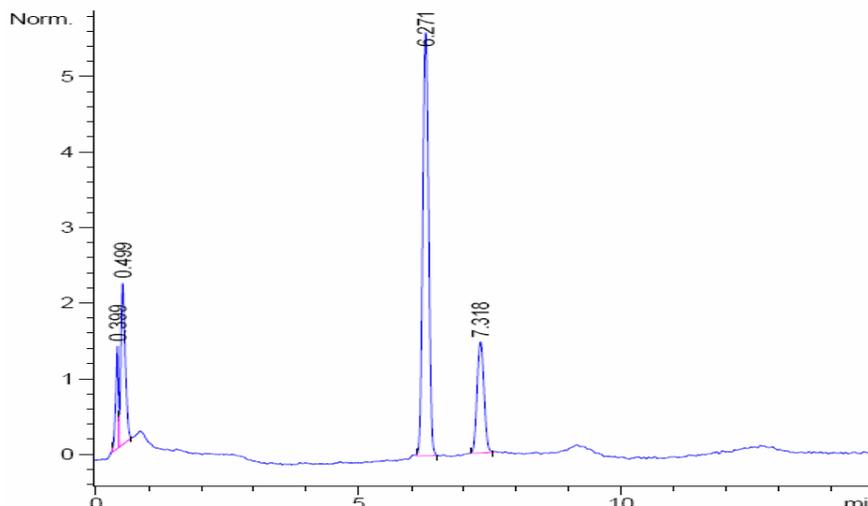


Figura 14: Cromatograma utilizando como limpieza SPE Columna C18 en muestras fortificadas a nivel de 200 ng/g

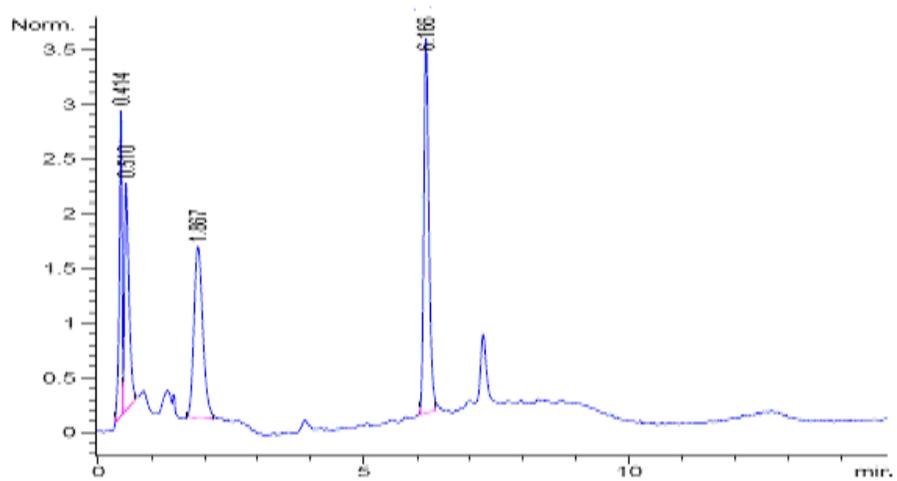


Figura 15: Cromatograma utilizando como limpieza SPE Silica en muestras fortificadas a nivel de 200 ng/g

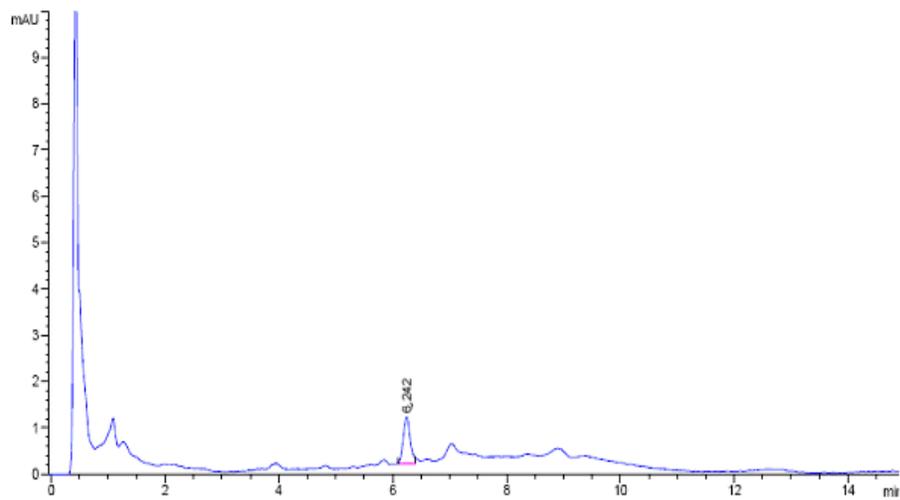
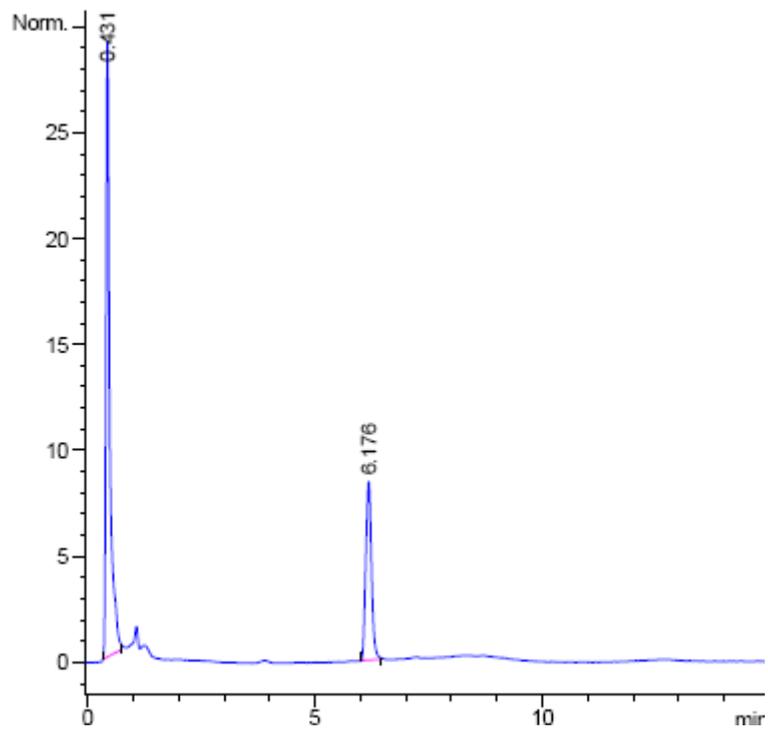


Figura 16 : Cromatograma utilizando como limpieza filtro
en muestra fortificada a nivel de 200 ng/g,



5.3 Plan de Validación

5.3.1 Determinación rango lineal

Lo primero que se realizó, fue la elaboración de una curva de calibración de estándares de nicarbazina, a niveles de 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 200 y 300 ng/ml (ppb) con el propósito de evaluar el comportamiento lineal de ésta, con el mismo ensayo se podrá conocer el límite de detección instrumental, es decir la mínima concentración de nicarbazina que el equipo es capaz de detectar. Como se puede apreciar en la figura 17, la nicarbazina presenta una alta correlación ($r^2 = 0,999$). En la tabla 24 se puede ver el área resultante de cada estándar estudiado, donde a nivel de 1 ppb no fue posible detectarlo cromatográficamente (n/d), por lo que el límite instrumental empírico es de 2,5 ppb.

Figura 17: Correlación gráfica estándar de Nicarbazina

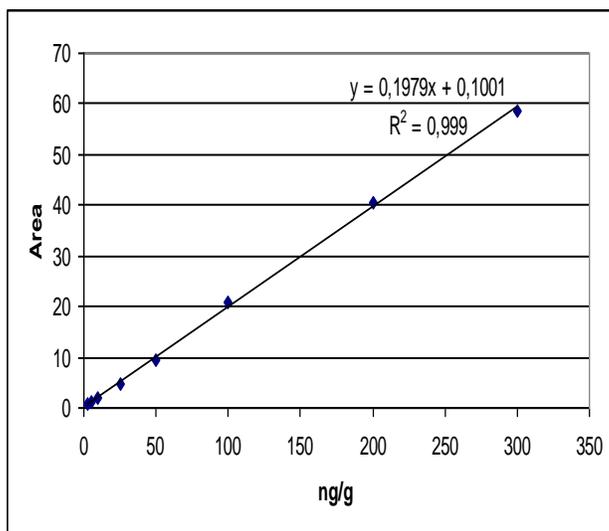


Tabla 24: Esquema de curva externa

ng/ml	Área
1	n/d
2,5	0,59
5	1,07
10	1,85
25	4,56
50	9,56
100	21,02
200	40,57
300	58,61

El límite instrumental teórico es:

$$C_m = (0,42 + 3 \cdot 0,0073) - 0,42 / 0,198 = 0,11$$

Como se puede apreciar el límite teórico está muy por debajo del límite empírico, que corresponde a la señal más pequeña que se puede visualizar en los cromatogramas.

Por cada día de validación se realizó una curva externa de estándares, cuyos niveles fueron, 10, 20, 40, 100, 200, 400, 600 y 800 ng/ml (ppb). En la figura 18 se grafica la curva de concentración, versus área cromatográfica, de todos los días y en la tabla 25 se entregan los parámetros correspondientes a cada uno de ellos. Como se puede apreciar para cada día el ajuste lineal (r^2) entrega valores mayores a 0,998, esto indica que existe una buena linealidad de los estándares de nicarbazina. En la figura 19 se muestra la superposición de tres cromatogramas de estándares a niveles de 200, 400 y 600 ppb, en ésta se puede ver que un aumento de la concentración otorga una mayor área cromatográfica en el mismo tiempo de retención.

Figura 18: Curva Externa

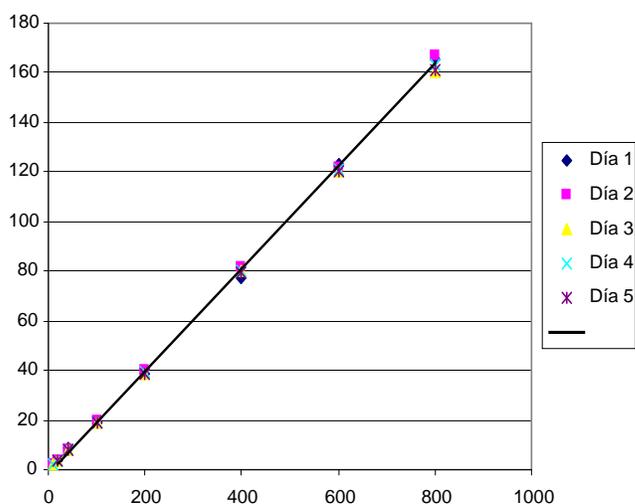
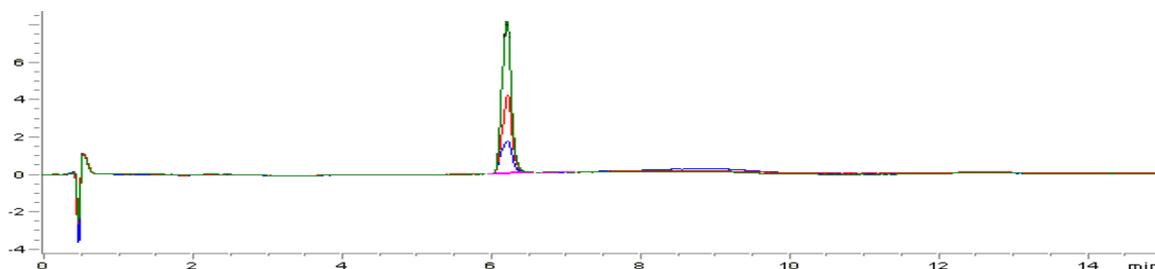


Tabla 25: Parámetros de curva externa

Día	pendiente (m)	intercepto	r^2
1	0,207	1,641	0,998
2	0,207	0,745	0,999
3	0,201	0,501	0,999
4	0,204	0,619	0,999
5	0,202	0,842	0,999
X	0,204		0,999
DE	0,003		
CV	1,474		

Figura 19: Cromatograma de estándares superpuestos



Curva Matriz:

La curva de calibración de matriz se realizó enriqueciendo en tres días diferentes, 7 muestras, que corresponden a una muestra blanco, y a muestras enriquecidas a nivel de 5, 10, 20, 100, 200 y 300 ng/g, en la figura 20 se grafica el promedio de estos días. El ajuste lineal (r^2) entrega valores de 0,999, esto indica que existe una buena linealidad. A nivel de 5 ng/g la Nicarbazina no fue detectada por el equipo, ya que se confundía con la señal ruido producida, por lo cual el límite mínimo de detección empírica fue de 10 ng/g, 20 veces menos que el LMR.

Figura 20: Curva matriz

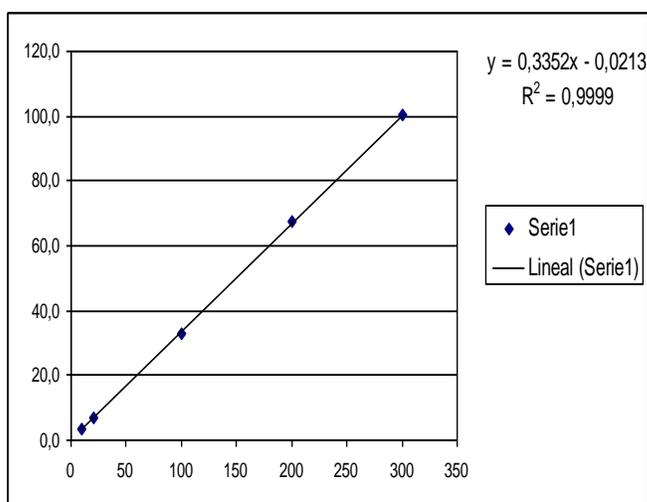


Tabla 26 : Estándares agregado con sus áreas entregadas

Estándar agregado	Área promedio	DE
5 ng/g	n/d	-
10 ng/g	3,6	0,25
20 ng/g	6,7	0,42
100 ng/g	33	0,88
200 ng/g	67,5	2,37
300 ng/g	100,4	4,01

El límite teórico es:

$$C_m = (0,48 + 3 \cdot 0,053) - 0,48 / 0,176 = 0,9$$

Al igual que el límite mínimo instrumental, éste límite teórico está muy por debajo del límite empírico, esto se puede deber a que en matrices complejas existe una señal ruido que impide visualizar con certeza los picos cromatográficos más pequeños. En la figura 21 se puede ver un cromatograma de una muestra de 2 g, fortificada a nivel de 10 ng/g, valor bajo el cual no es posible detectarlo por HPLC-DAD, además el método tiene un límite de cuantificación empírica de 20 ng/g (correspondiente a 2 veces el límite de detección).

Figura 21: Cromatograma 10 ng/g

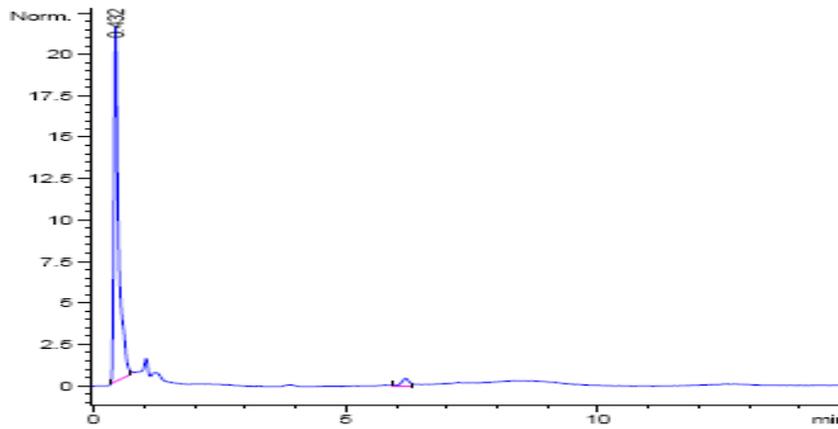
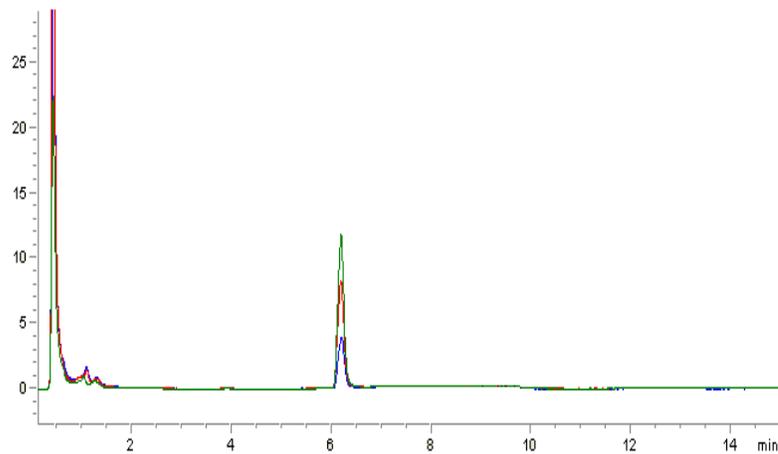


Figura 22: Cromatogramas de muestras fortificadas superpuestas



En la figura 22 se muestran tres cromatogramas superpuestos de muestras fortificadas a niveles de 100 ng/g, 200 ng/g y 300 ng/g. En la figura 23, se sobreponen dos espectros de absorción, en azul se aprecia el espectro de absorción de un estándar (600 ppb) y en rojo, el de una muestra fortificada al mismo nivel (300 ng/g (utilizando 2 g)), como se ve, ambos espectros poseen la misma forma y a nivel de 350 nm son prácticamente idénticas, las pequeñas diferencias se deben a mínimas sumas de interferentes que pudiese tener la muestra fortificada en el tiempo de retención obtenido. En la figura 24 se pueden ver dos cromatogramas superpuestos de una muestra fortificada (en rojo) y un estándar (en azul) al mismo nivel de concentración.

Figura 23: Espectro de absorción superpuesto de un estándar y una muestra enriquecida al mismo nivel

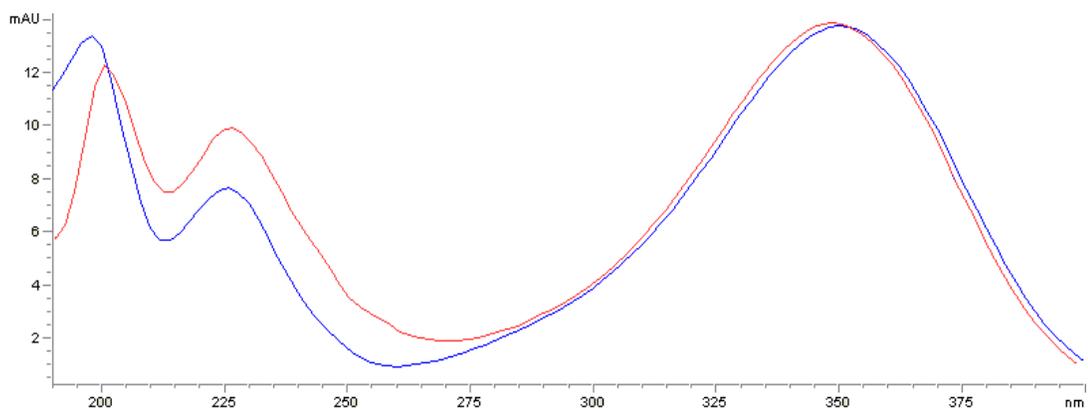
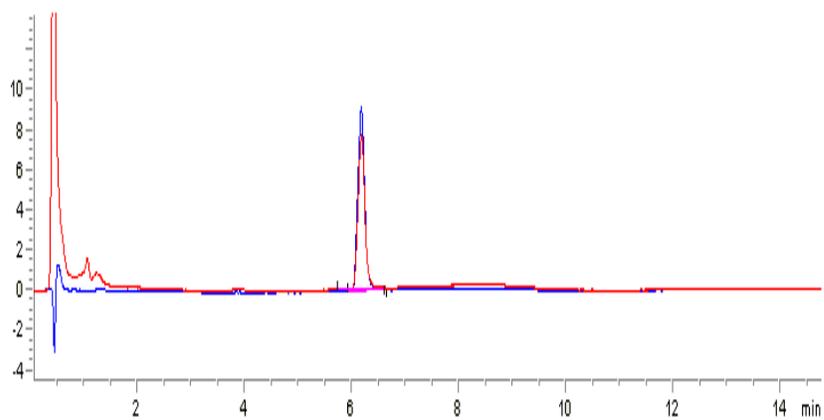


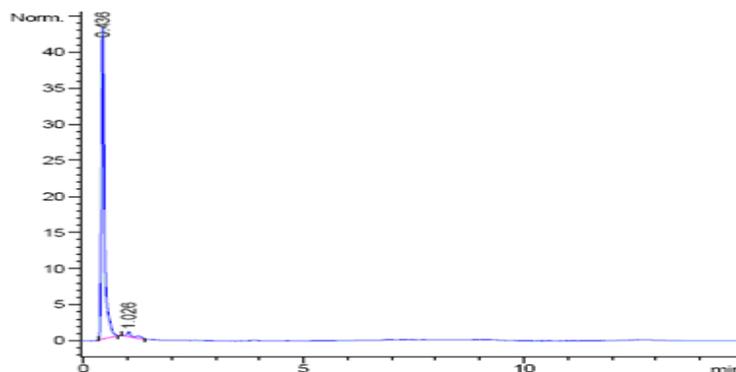
Figura 24: Cromatograma superpuesto de un estándar y una muestra fortificada



5.3.2 Determinación de especificidad

De la inspección visual de los 20 cromatogramas correspondiente a los blancos de matriz no se observó la presencia de señales que interfieran con el pico de Nicarbazina, siendo el método a validar selectivo y específico.

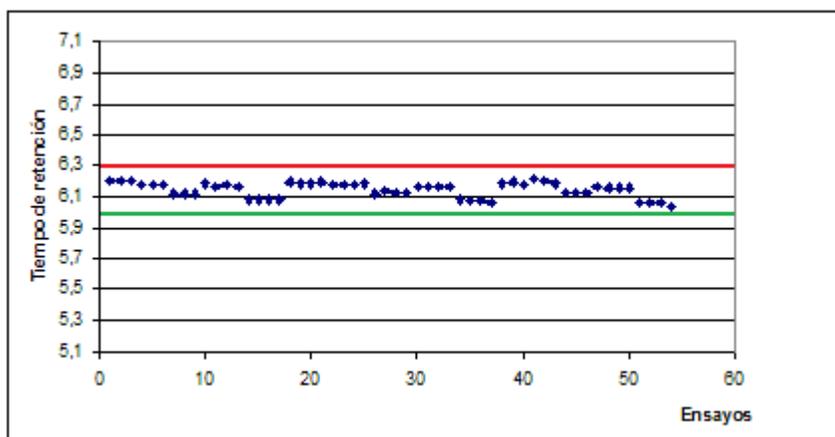
Figura 25: Cromatograma de músculo de pollo sin fortificar



5.3.3 Tiempo de retención

El análisis cromatográfico del total de muestras dio un tiempo de retención promedio de 6,15 minutos, el cual podrá variar en un 2,5%, es decir se aceptará una elución entre los 6,00 y 6,30 minutos. Como se puede apreciar en la figura 26, el total de las muestras se encuentra dentro del rango de aceptación,

Figura 26: Tiempo de retención del total de muestras con sus limites de aceptabilidad



5.3.4 Recuperación

Los valores máximos de aceptabilidad para la recuperación media, para una fracción de masa mayor o igual a 10 µg/Kg fluctúa entre 80% y 110%, por lo cual las recuperaciones obtenidas en esta validación para cada nivel estudiado deberá estar entre dicho rango.

Para determinar la recuperación de Nicarbazina, se interpoló la respuesta instrumental (área) obtenida para los fortificados en la curva de calibración correspondiente al día de la validación. Las recuperaciones fueron de 83%, 83,7% y 82,8% para los fortificados de 100, 200 y 300 ng/g respectivamente, por lo cual se cumple con las exigencias de aceptabilidad.

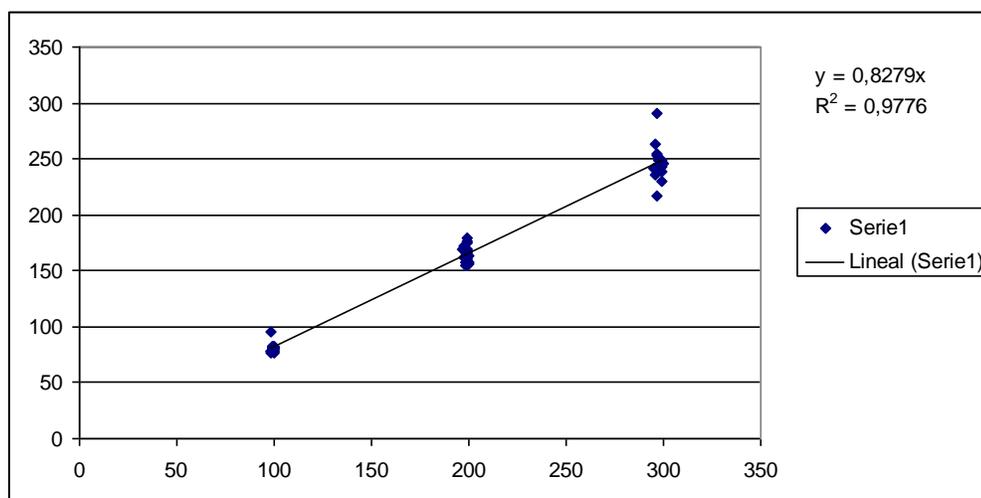
En la tabla 27, se representan los porcentajes de ug/kg encontrado, desviación estándar (DE) y coeficientes de variación (CV) para los niveles validados.

Tabla 27: Resultados plan validación

Dia	100 ng/g			200 ng/g			300 ng/g		
	µg/kg enc	DE	CV %	µg/kg enc	DE	CV %	µg/kg enc	DE	CV%
1	84,094	1,37415	1,624	170,886	1,350	1,567	247,490	2,573	3,095
2	79,186	1,949	2,444	169,573	5,427	6,368	244,362	5,990	7,542
3	86,355	9,203	10,558	164,444	2,786	3,366	243,539	0,048	0,059
4	81,805	1,828	2,213	166,399	3,878	4,630	261,235	7,569	8,610
5	81,154	1,584	1,943	161,333	3,220	3,972	241,021	2,854	3,539
	82,396	4,324	5,210	166,527	4,398	3,686	246,362	6,337	5,249

En la figura 27, se puede apreciar el total de muestras estudiadas en la validación, el ajuste lineal (R^2) entrega valores mayores a 0,977, esto indica que existe una buena correlación entre la cantidad agregada y encontrada del analito.

Figura 27: Linealidad del total de las muestras



5.3.5 Precisión

- Repetibilidad

El Valor máximo permitido para el coeficiente de variación, será definido según la ecuación de Horwitz: $CV = 2^{(1-0,5 \log C)}$, donde C, es la fracción de masa expresada como potencia de 10.

El CV para los estudios de repetibilidad no podrá ser mayor a 11,31; 10,19 y 9,59 para 100, 200 y 300 ng/g respectivamente. Del análisis de la tabla anterior se observa que para la matriz músculo de pollo el coeficiente de variación (CV) para repetibilidad es menor a 6,4 % al nivel del LMR, menor a 10,6 para ½ LMR y menor a 8,7 para 1 ½ LMR, por lo que para cada nivel se cumplen los límites de aceptabilidad para dicho parámetro.

- Reproducibilidad

El CV en el caso de la reproducibilidad intralaboratorio, no podrá ser mayor a 15,08, 13,59 y 12,79 para 100, 200 y 300 ng/g respectivamente. En la tabla 27, que dichos límites son cumplidos, ya que los valores determinados son 5,2; 3,6 y 5,2 para ½ LMR, LMR y 1 ½ LMR, respectivamente lo que comprueba que el método es reproducible.

5.3.6 Veracidad

La veracidad para fracción de masa $\geq 10 \mu\text{g/Kg}$ es entre -20% a + 10 %, por lo que el valor obtenido en ésta validación para el LMR se encuentra dentro del rango deseado, lo que demuestra que el método es exacto.

$$\begin{aligned}\text{Sesgo} &= ((166,53 - 198,74) / 198,74) * 100 \\ &= -16,71\%\end{aligned}$$

5.3.7 Límite de decisión ($CC\alpha$), Capacidad de detección ($CC\beta$) e Incertidumbre.

Se estimó el límite de decisión ($CC\alpha$), capacidad de detección ($CC\beta$) e incertidumbre. Estos parámetros fueron estimados al nivel del LMR y se pueden ver en la tabla 28.

Tabla 28: Resumen de resultados del plan de validación.

	Conc.media corregida LMR ($\mu\text{g/kg}$)	DE (ng/g)	CV %	$CC\alpha$ (ng/g)	$CC\beta$ (ng/g)	I (%)
LMR(n=20)	198,7	3,7	4,4	205	211	9

5.3.8 Estudio entre dos operadores

Para este punto, se utilizó la ayuda de personal del laboratorio del ISP de Chile, el cual realizó los ensayos que consistieron en 16 muestras, 4 de ellas fueron blancos, 4 muestras fortificadas a nivel de 100 ng/g , 4 con 200 ng/g y 4 con 300 ng/g . En la tabla 29 se resume lo realizado y en la tabla 30 se puede comparar los promedios de recuperación obtenidos del plan de validación y de este estudio, en donde se puede determinar un coeficiente de variación menor al 10%, lo cual demuestra que el método funciona independiente del operador.

Para aceptar dicho parámetro, se utilizó los valores del CV para los estudios de reproducibilidad interlaboratorio, el cual no podrá ser mayor a 22,63; 20,39 y 19,18 para 100, 200 y 300 ng/g respectivamente. Del análisis de la tabla anterior que para la matriz músculo de pollo

el coeficiente de variación (CV) para el nivel del LMR es 9,13, 6,89 para ½ LMR y 9,35 para 1 ½ LMR, por lo que para cada nivel se cumplen los límites de aceptabilidad para la reproducibilidad interlaboratorio.

Tabla 29: Resultados estudio con otro operador

Nivel	µg/kg encontrado	Recuperación %	DE	CV
100ng/g	74,85	75,28	0,872	1,158
200 ng/g	145,48	73,54	1,351	1,837
300 ng/g	216,01	72,53	2,270	3,129

Tabla 30: Comparación

% R	%R validación	DE	X	CV
75,28	83	5,459	79,140	6,898
73,54	83,7	7,184	78,620	9,138
72,53	82,8	7,262	77,665	9,350

5.3.9 Estudio de Estabilidad

Se colocó en un tubo de ensayo 1ppm del estándar de Nicarbazina, el cual fue evaporado hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno a 60 °C, una vez secos, los extractos fueron reconstituidos con 500 µL de los solventes indicados en la tabla 31 y almacenados a 6 °C en un refrigerador. Pasado el tiempo establecido se fueron retirando para evaporarlo bajo corriente de nitrógeno a 60 °C y luego reconstituirlo en 1 ml de Acetonitrilo/agua (1/1), para su posterior análisis instrumental. En la tabla 31, se detalla las recuperaciones obtenidas para cada solvente estudiado. Se puede establecer que el estándar de nicarbazina es estable en numerosos solventes, entre los que destacan, el acetonitrilo, metanol y acetonitrilo/agua 1/1.

También se fortificaron tres muestra de músculo de pollo a 200 ng/g, las cuales se congelaron a -20°C por 21 días, luego se realizó la metodología validada, dando una recuperación promedio de 78%, lo que demuestra su estabilidad en el tejido animal en condiciones de congelamiento.

Tabla 31: Estudio de estabilidad

Soluciones / Tiempo(min)	100	500	1000	1500	4300	10000
Agua	97	94	96	100	92	99
Acetonitrilo	98	98	100	101	100	100
Metanol	100	100	100	102	103	102
Acetonitrilo/agua (50/50)	99	101	100	100	100	102
Acetona	96	89	82	100	99	99
Buffer ph 3	99	101	94	95	96	98

5.4 Estudio de otras Matrices

Posteriormente de los estudios de validación con muestra de músculo de pollo, se procedió a estudiar las matrices complementarias que fueron hígado y riñón de pollo. Las recuperaciones obtenidas, fueron 55% para ambas matrices, siendo menores que con la matriz de músculo, la repetibilidad para estas matrices complementarias fueron de 7,5 y 2,6 % para hígado y riñón de pollo respectivamente.

Tabla 32: Recuperación en otras matrices

Hígado	200 ug/kg		
Dia	ug/kg enc	DS	CV %
1	110	4,1	7,5

Riñón	200 ug/kg		
Dia	ug/kg enc	DS	CV %
1	109	1,4	2,6

5.5 Estudio de Vigilancia

Luego de validada la metodología. Ésta se aplicó a las 18 muestras del programa piloto de estudios de residuos de medicamentos veterinarios, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 33:

Tabla 33: Respuestas de estudio de vigilancia

Muestra	
1880/2007- 2- 4 a	n/d
3569/2007 R 57 a	n/d
4868/2007 RM-118 t	n/d
75/2008 RM 7 t	n/d
3978/2008- RM 15- t	n/d
3978/2008- RM 16- t	n/d
3978/2008- RM 17- t	n/d
3978/2008- RM 18- t	n/d
3978/2008- RM 19- t	n/d
3978/2008- RM 20- t	n/d
3978/2008- RM 21- t	n/d
3978/2008- RM 22- t	n/d
3978/2008- RM 23- t	n/d
3978/2008- RM 24- t	n/d
5670-2008- 2470	n/d
5670-2008- 2471	n/d
5670-2008- 2472	n/d
5670-2008- 2473	n/d
5670-2008- 2474	n/d

Como se puede evidenciar, en ninguna de las muestras estudiadas se pudo detectar la presencia de nicarbazina, ya sea porque esta fuese negativa o por tener concentraciones menores a 10 ng/g correspondiente al límite de detección.

6 Conclusiones

1.- Se desarrolló un método cromatográfico fácil, reproducible y sensible para la determinación de nicarbazina a través de cromatografía líquida de alta resolución acoplado a detección con arreglo de diodo, utilizando una elución en gradiente y una fase móvil consistente en acetonitrilo/agua, a una longitud de onda de 350 nm.

2.- Se ensayaron diferentes metodologías para la purificación de muestras, las cuales en un comienzo se centraron en la utilización de extracción en fase sólida, trabajándose con columnas de Silica y SCX. Las recuperaciones fueron satisfactorias cuando no se trabajó con matriz, pero disminuyeron drásticamente cuando se trabajó con muestras.

3.- Los mejores resultados en la extracción se obtuvieron con acetonitrilo acoplado a filtración y evaporación a 60 °C con porcentajes de recuperación al nivel del LMR, que fluctuaron entre 78,3% y 90,3%, con una DE de 4,3 y un CV de 3,6%.

4.- La metodología validada es selectiva y específica para determinar nicarbazina en tejido de músculo de pollo por cromatografía líquida. El valor del LMR corregido es 198,7, el de CC α y CC β de 205 y 211 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente, con una incertidumbre de un 9 %. Además la metodología entrega recuperaciones de un 83% a nivel del LMR.

5.- La validación de éste método permite establecer que cumple con todos los criterios de aceptación establecidos por la Comunidad Europea

6.- El método validado también es posible aplicarlo a otras matrices tales como hígado y riñón de pollo, pero la recuperación es de 55% para ambas matrices.

7.- No se detectó la presencia de nicarbazina en ninguna de las muestras analizadas del programa piloto de estudios de residuos de medicamentos veterinarios.

7 Bibliografía

APA, Asociación de productores avícolas de Chile, 2008. Informe de ODEPA sobre mercado avícola [en línea] <www.apa.cl/index/tendencias_det.asp?id_tendencia=85> [consulta 20-01-09]

Botana, 2002. Farmacología y Terapéutica Veterinaria, primera edición, ed. Mc Graw hill, Madrid, España. pp: 532-534

Cannavan A, Ball G y Kennedy D. 1999. Determination of nicarbazin in feeds using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Analyst* 124 pp: 1431-1434.

Capurro E, Danaher M, Anastasio A, Cortesi M y O' Keeffe M. 2005. Efficient HPLC method for the determination of nicarbazin, as dinitrocarbanilide in broiler liver. *Journal of Chromatography* 822 pp: 154-159.

Chapman, H.D, 2001. Use of anticoccidial drugs in broiler chickens in the USA: Analysis for the years 1995 to 1999. *Poultry Science* 80: pp572-580

Codex Alimentarius, 2003. Glosario de Términos y Definiciones (Residuos de Medicamentos Veterinarios) [en línea] <http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=348> [consulta 20-04-08]

Codex Alimentarius, 2006. Compendio de métodos de análisis identificados como idóneos para respaldar los LMR del codex. [En línea] < http://www.codexalimentarius.net/mrls/vetdrugs/vetd_ref/MAS-RVDF_2006_s.pdf > [consulta 18-01-09]

Codex Alimentarius, 2009. Anteproyecto de directrices revisadas sobre la incertidumbre en la medición [en línea] <ftp://ftp.fao.org/codex/ccmas30/ma30_09s.pdf> [consulta 25-04-09]

Comunidad Europea, 2002. Decisión 2002/657/CE. Decisión de la comisión de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. 35 p.

EPA, Environmental Protection Agency. 2005, Nicarbazin [En línea] <<http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/nicarbazin.pdf>> [consulta 30-05-08]

Gonzalez, J. 2000. Coccidias aviares de gallineros industriales de Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. pp 2-32.

INN, Instituto Nacional de Normalización. 2008, Certificado de acreditación de Laboratorio de Farmacología Veterinaria, Universidad de Chile [en línea] <<http://www3.inn.cl/pdfs/acreditados/LE184.pdf>> [consulta 10-03-09]

Lewis J., Macy J. y Garteiz D. 1989. Determination of nicarbazin in chicken tissues by liquid chromatography and confirmation of identity by thermospray liquid chromatography mass spectrometry. J. Assoc off Anal. Chem. 72 (4) pp: 571-581.

MacNeil, J, 2003. Drugs Residues in Animal Tissues. Journal off AOAC International 86 (1): pp: 116-127.

Merck, 1968. The Merck index an encyclopedia of chemicals and drugs, 8° edition. USA, p 727.

MINSAL, Ministerio de Salud. Resolución Exenta N° 1462 de 1999 [en línea] <www.minsal.cl/juridico/RESOLUCION_1462_99.doc> [consulta 24-04-08]

ODEPA, Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, 2007. Carnes de ave y porcina lideraron el consumo de este rubro en los chilenos en 2006 [en línea] <<http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servlet/contenidos.ServletDetallesScr?jsessionid=DEF35B5D62FC5F0715EEDB50505C0D63?idcla=2&idcat=8&idn=1918>> [consulta: 23-07-08]

OMS, Organización Mundial de la Salud. 2000 Evaluación de residuos de ciertos fármacos de uso veterinario en los alimentos 50° informe del comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios. Ginebra. pp 73-80

Pérez, B. 2004. La detección de residuos farmacológicos en alimentos [en línea] <<http://www.adiveter.com/ftp/articles/articulo1254.pdf>> [consulta: 20-01-09]

SAG, Servicio Agrícola Ganadero, 2008. Medicamentos Veterinarios [en línea] <http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/medicamentos_veterinarios/excel/productos.xls> [consulta 12-06-08]

San Martín, B.; Cañon H. 2000. Métodos de análisis para el control de residuos químicos en productos de origen animal. [En línea] <www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D11534%2526ISID%253D463,00.html> [consulta 5-02-09]

Skoog, Holler y Nieman. 2001. Principios de Análisis instrumental. 5° Edición. Ed. Mc. Graw Hill, España. pp 12-14.

Souza S, Silva G, Diniz M, Santos E, Lima J. y Teodoro J. 2001. Determinacao de residuos de nitrofurazona, furazollidona e nicarbazina em tecidos de origen animal. Cienc. Technol. Aliment 21 (1): pp 34-38.

Stahl, R. y Johnston, J. 2002. High-performance liquid chromatography-based determination of nicarbazin excretion in waterfowl. Journal of chromatography B, 775. pp 103-108.

VMD, Veterinary Medicines Dictorate. Annual Report on Surveillance for Veterinary Residues in Food in the UK 2005. [en línea] < <http://www.vmd.gov.uk/>> [consulta 15-05-08]

Yoder C.A, Miller L.A y Bynum K.S. 2005. Comparision of nicarbazin absorption in chickens, mallards, and Canada geese. Poultry Science 85: pp 1285-129.

Yoder C.A, Graham J.K y Miller L.A. 2006. Molecular effects of nicarbazin on Avian reproduction. Poultry Science 85: pp 1285-1293.