



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Inorgánica y Analítica
Laboratorio de Química Ambiental.

TESIS DE DOCTORADO

Determinación de fármacos de uso veterinario en matrices de origen animal, utilizando como estrategia analítica la extracción por sorción con disco rotatorio y técnicas cromatográficas para su aplicación en estudios de farmacocinética y de depleción de residuos.

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Pablo Richter

CO-DIRECTOR

Samuel Valdebenito

AUTOR

Alejandro Cañas Müller

Santiago – Chile

2016

LUGAR DE DESARROLLO DE LA TESIS

- (1) Laboratorio de HPLC, Investigación y Desarrollo, Veterquímica S.A.
- (2) Laboratorio de Química Ambiental, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

FINANCIAMIENTO

- (1) Proyecto FONDECYT 1140716 y 1100085
- (2) Desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de residuos farmacéuticos en alimentos, Veterquímica S.A.
- (3) Beca de Tesis de Doctorado en la industria 7813110007
- (4) Beca CONICYT 21120020
- (5) Proyecto FONDEQUIP EQM130116

Resumen

La productividad de la industria pecuaria depende en gran medida del uso de fármacos de uso veterinario, utilizados en el control de enfermedades en animales de producción. En este contexto, la presente investigación demuestra que la extracción por sorción con disco rotatorio (RDSE) es una técnica válida para la etapa de preparación de las muestras de origen animal, como plasma, leche o tejidos, para su utilización en estudios de farmacocinética y estudios de depleción de residuos.

Se desarrolló y validó (Según la normativa descrita por la VICH), un total de ocho metodologías analíticas que utilizan RDSE, cinco de ellas con cuantificación mediante HPLC acoplado a un detector espectrofotométrico, una mediante HPLC acoplado a un detector de fluorescencia y dos mediante UHPLC acoplado a espectrometría de masas con un analizador por tiempo de vuelo (TOF).

Para el antibiótico florfenicol se desarrolló un método en la matriz plasma de bovino, utilizada para realizar la farmacocinética del producto Duflosan® 30%. Para la determinación de florfenicol residual en tejidos de bovinos, la estrategia involucró la hidrólisis ácida a la forma florfenicol-amina y se aplicó a músculo, hígado y riñón de bovinos y se aplicó en el estudio de depleción de residuos para Duflosan® 30%.

Para el antiparasitario triclabendazol, se desarrolló un método para cuantificar los metabolitos triclabendazol-sulfóxido y triclabendazol-sulfona presentes en plasma bovino, mediante el método se realizó un estudio de bio-equivalencia para los productos Trisuvet® 10% y Soforen® 10%. Para la determinación de triclabendazol residual en tejidos bovinos, la estrategia involucró la hidrólisis alcalina y oxidación a la forma keto-triclabendazol de los metabolitos de triclabendazol presentes en las matrices a músculo, hígado, riñón y grasa de bovinos, y se aplicó en un estudio de depleción de residuos para el producto inyectable Trisuvet® 10%.

En la matriz leche se desarrolló un método para la determinación simultánea de cuatro antibióticos (oxitetraciclina, sulfadoxina, trimetoprima y enrofloxacino), incluyendo los metabolitos activos 4epi-oxitetraciclina y ciprofloxacino, con HPLC-DAD para la cuantificación y paralelamente se desarrolló un método para la determinación del antiparasitario closantel en leche mediante HPLC con detector de fluorescencia.

Para la determinación de lincomicina y espectinomina, se desarrolló un método para su cuantificación en la matriz plasma de cerdo. Para residuos de lincomicina y espectinomina en tejidos de cerdo se desarrolló una estrategia utilizando la extracción con solvente acelerada (ASE) previa a la etapa de extracción con RDSE, la metodología fue validada en las matrices músculo, hígado, riñón y piel + grasa. Tanto en plasma como tejidos se cuantificó por espectrometría de masas mediante un equipo UHPLC-ESI-TOF.

Tabla de contenidos

I.	Introducción.	1
1.1	Preparación de la muestra en la Química Analítica.	1
1.2	Fármacos de uso veterinario.	8
II.	Hipótesis.	17
III.	Objetivos.	18
3.1	Objetivos Generales.	18
3.2	Objetivos Específicos.	18
IV.	Materiales y Métodos.	20
4.1	Reactivos.	20
4.2	Equipos.	21
4.3	Materiales.	22
4.4	Muestras.	24
4.4.1	Músculo, hígado, riñón, grasa, leche y plasma. (Blancos de matriz)	24
4.4.2	Muestras reales (Ensayos de farmacocinética y de depleción)	24
4.5	Metodología analítica.	25
4.5.1	Florfenicol.	26
4.5.1.1	Determinación de florfenicol en plasma.	26
4.5.1.2	Determinación de residuos de florfenicol en tejidos bovinos, expresado como florfenicol-amina.	26
4.5.2	Triclabendazol.	28
4.5.2.1	Determinación de los metabolitos triclabendazol-sulfona y triclabendazol-sulfóxido en plasma de bovino.	28
4.5.2.1	Determinación de residuos de triclabendazol en tejidos bovinos, expresado como keto-triclabendazol.	28
4.5.3	Determinación de fármacos residuales en leche.	29
4.5.3.1	Enrofloxacino, oxitetraciclina, sulfadoxina y trimetoprima.	29
4.5.3.2	Closantel.	30
4.5.4	Lincomicina y espectinomicina.	31
4.5.4.1	Determinación de lincomicina y espectinomicina en plasma.	31
4.5.4.2	Determinación de lincomicina y espectinomicina residuales en tejidos de cerdo.	31
4.6	Método de validación.	33
4.6.1	Linealidad del sistema: Curva de estándares.	33
4.6.2	Linealidad del método: Curva con matrices fortificadas.	33
4.6.3	Límite de cuantificación y detección (LC y LD).	34
4.6.4	Selectividad.	35

4.6.5	Exactitud.....	35
4.6.6	Precisión.....	36
4.6.7	Estabilidad de las muestras almacenadas.....	36
4.7	Método de análisis de muestras reales.....	37
4.7.1	Estudios de farmacocinética.....	37
4.7.2	Estudios de depleción de residuos.....	39
V.	Resultados y discusión.....	42
5.1	Florfenicol.....	43
5.1.1	Determinación florfenicol en plasma.....	43
5.1.2	Determinación de florfenicol residual en tejidos de bovinos.....	47
5.1.3	Comparación de eco-eficiencia del método RDSE y el método oficial de la USDA para residuos de florfenicol en tejidos.....	53
5.1.4	Estudio de depleción de residuos para florfenicol en bovinos.....	54
5.2	Triclabendazol.....	56
5.2.1	Determinación de metabolitos de triclabendazol en plasma.....	56
5.2.2	Evaluación de bioequivalencia mediante comparación de farmacocinéticas de triclabendazol en plasma bovino.....	61
5.2.3	Determinación triclabendazol residual en tejidos de bovino.....	64
5.2.4	Comparación de eco-eficiencia del método RDSE y el método oficial de la FAO para residuos de triclabendazol en tejidos.....	71
5.2.5	Estudio de depleción de residuos para triclabendazol en bovinos.....	72
5.3	Determinación de fármacos residuales en leche.....	73
5.3.1	Enrofloxacin, oxitetraciclina, sulfadoxina y trimetoprima.....	73
5.3.2	Closantel.....	84
5.4	Lincomicina y espectinomicina.....	88
5.4.1	Determinación de lincomicina y espectinomicina en plasma.....	88
5.4.2	Determinación de concentraciones residuales de lincomicina y espectinomicina en tejidos de cerdo.....	93
VI.	Conclusiones.....	99
VII.	Anexos.....	101
7.1	Medición directa en un sistema RDSE-nylon.....	101
VIII.	Referencias.....	104
IX.	Publicaciones.....	108

Tabla de abreviaturas

- ❖ **4E-OTC:** 4Epi-oxitetraciclina
- ❖ **ASE:** *Accelerated solvent extraction*
- ❖ **C18:** Octadecil
- ❖ **C8:** Octacil
- ❖ **CFX:** Ciprofloxacino
- ❖ **CIM:** Concentración inhibitoria mínima
- ❖ **CN-P:** Cianopropil
- ❖ **CTL:** Closantel
- ❖ **CV:** Coeficiente de variación
- ❖ **DAD:** Detector Arreglo de Diodos
- ❖ **EDTA:** Etilendiaminotetraacetato
- ❖ **eDVB:** Estireno divinilbenceno
- ❖ **EFX:** Enrofloxacino
- ❖ **EMA:** *European Medicines Agency*
- ❖ **EMC:** Espectinomomicina
- ❖ **ESI (+):** *Electrospray Ionization (positive mode)*
- ❖ **FAO:** *Food and Agriculture Organization*
- ❖ **FF:** Florfenicol
- ❖ **FFA:** Florfenicol-amina
- ❖ **GC:** *Gaseous chromatography*
- ❖ **HFBA:** *Heptafluorobutyric acid*
- ❖ **HF-SLPME:** *Hollow fiber solid-liquid phase microextraction*
- ❖ **HLB®:** *Hidrofílic lipofílico balanceado*
- ❖ **HPLC:** *High performance liquid chromatography*
- ❖ **KT-TCB:** Keto-triclabendazol
- ❖ **LC:** Límite de cuantificación
- ❖ **LCM:** Lincomicina
- ❖ **LD:** Límite de detección
- ❖ **LMR:** Límite máximo residual
- ❖ **MS:** Mass Spectrometry
- ❖ **OTC:** Oxitetraciclina
- ❖ **PDMS:** Polidimetilsiloxano
- ❖ **QQQ:** *Triple Quadrupole*
- ❖ **RDSE:** *Rotating disk sorptive extraction*
- ❖ **SBSE:** *Stir bar sorptive extraction*
- ❖ **SDX:** Sulfadoxina
- ❖ **SME:** *Stir membrane extraction*
- ❖ **SM-LLME:** *Stir membrane liquid-liquid microextraction*
- ❖ **SPE:** *Solid phase extraction*
- ❖ **SPME:** *Solid phase microextraction*
- ❖ **TCA:** *Trichloroacetic acid*
- ❖ **TCB:** Triclabendazol
- ❖ **TCB-SO:** Triclabendazol sulfóxido
- ❖ **TCB-SO₂:** Triclabendazol sulfona
- ❖ **TIC:** *Total Ion Current*
- ❖ **TFA:** *Trifluoroacetic acid*
- ❖ **TMP:** Trimetoprima
- ❖ **TOF:** *Time of flight*
- ❖ **UHPLC:** *Ultra high performance liquid chromatography*
- ❖ **UV-VIS:** Detector espectroscopia Ultravioleta-visible
- ❖ **VICH:** *Veterinary International Cooperation on Harmonisation*

I. Introducción.

1.1 Preparación de la muestra en la Química Analítica.

En la actualidad, la química analítica juega un rol clave en diversas áreas de desarrollo e interés humano (materiales, alimentos, fármacos, medioambiente, etc), con el objetivo de obtener información química de un determinado sistema, ya sea para asegurar la calidad, evaluar la peligrosidad, evaluar posibles fuentes de contaminación o simplemente estudiar la composición de una muestra, en este plano, es necesario un proceso analítico que sea capaz de entregar resultados que cumplan con una serie de parámetros analíticos de calidad (selectividad, exactitud, precisión, robustez, etc) para que dichos resultados sean considerados válidos.

El proceso analítico, mediante el que podemos determinar y/o cuantificar la presencia de un analito contenido en la muestra, requiere de una serie de etapas que dependen de la naturaleza química y nivel de concentración del analito, además de la naturaleza fisicoquímica y complejidad de la matriz en la que se encuentra.

En la determinación de analitos orgánicos presentes en matrices ambientales, alimentos o muestras biológicas, la técnica analítica más utilizada cuando el objetivo es cuantificar con exactitud y precisión es la cromatografía (GC, HPLC o UHPLC), siendo una técnica de separación sumamente depurada, tanto en la ingeniería de los equipos como en la tecnología de la fase estacionaria utilizada. Además estos equipos se encuentran acoplados a detectores altamente sensibles, como el caso de los detectores espectroscópicos, como el espectrofotómetro UV-VIS, con mayor selectividad con una configuración de arreglo de diodos (DAD) y el detector de fluorescencia, o incluso mediante espectrometría de masas con analizadores como el triple cuádruplo (QQQ) o el tiempo e vuelo (TOF), que permiten una identificación con mayor certidumbre del analito y otras especies, incluso en concentraciones traza.

A pesar del desarrollo tecnológico, tanto en cromatografía como en la detección, en la mayoría de los casos no es posible realizar una medición directa de la muestra, de modo que se requiere de una etapa de preparación que permita aislar y concentrar al analito objetivo, mediante la simplificación de la matriz, la pre-concentración y/o la derivatización de los analitos contenidos en la muestra. La etapa de preparación de la muestra es la menos robusta del proceso, debido a la variabilidad, complejidad y manipulación, por lo tanto esta etapa resulta ser crítica en el proceso analítico, donde los errores que se comenten inciden directamente en la calidad de los resultados.

En este sentido, el desarrollo de nuevas estrategias para la preparación de muestras, busca mejorar una serie de valores en el proceso: reducir el número de pasos del procedimiento (simplificación), acotar la cantidad de muestra y volumen del proceso (miniaturización), disminuir la intervención humana (automatización), reducir o eliminar la utilización de disolventes orgánicos (eco-eficiencia) (1).

Existen tres dispositivos comerciales ampliamente utilizados en la actualidad en los laboratorios de análisis; la microextracción en fase sólida con fibra (SPME), la extracción por sorción con barra de agitación (SBSE) y la extracción en fase sólida mediante cartuchos (SPE). La SPME consiste en un filamento de sílice fundida recubierta con una fibra de fase sorbente (generalmente PDMS), donde la fibra debe contactarse con la muestra acuosa o en fase gaseosa. Por su parte, SBSE consiste en una barra magnética dentro de una cápsula de vidrio recubierta con una fase sorbente (generalmente PDMS), en este caso, mediante la rotación del dispositivo se produce una agitación durante el proceso de extracción, disminuyendo el grosor de la capa estática de agua, lo que agiliza el transporte de masa, reduciendo los tiempos de extracción. En cambio SPE consiste en un cartucho donde la fase sorbente se encuentra entre dos fritas de polietileno, la muestra líquida ingresa al cartucho por el reservorio y pasa a través del sorbente por acción de una cámara de vacío, controlando el flujo con una válvula manual (2).

Durante los últimos años, se han desarrollado numerosas técnicas de extracción y microextracción alternativas a las disponibles comercialmente, basadas tanto en los principios de la extracción fase sólida, como incluso la tradicional extracción en fase líquida, con dispositivos que integran agitación de la muestra (Figura 1).

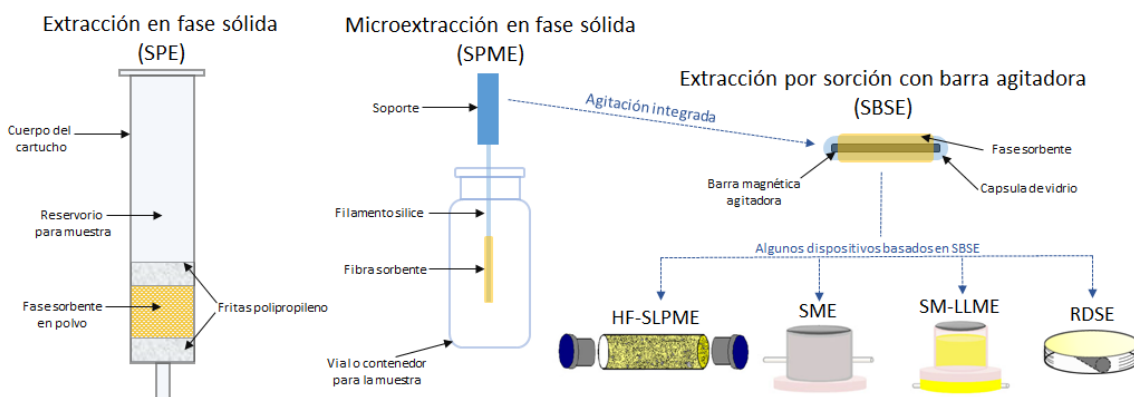


Fig 1. Esquema de técnicas comerciales para preparación de muestras: Extracción en fase sólida (SPE), Microextracción en fase sólida (SPME) y Extracción por sorción con barra agitadora (SBSE), y algunos ejemplos para algunos desarrollos no comerciales basados en los principios de SBSE.

En el presente estudio, se propone utilizar una plataforma analítica desarrollada por nuestro grupo de investigación, llamada extracción por sorción en disco rotatorio o RDSE, como alternativa a las técnicas comerciales (Figura 2). Este sistema permite extraer los analitos reteniéndolos en una fase sólida polimérica adecuada (afinidad química), por contacto con la muestra líquida ⁽³⁻⁵⁾.

Al igual que en SBSE, la rotación del dispositivo agiliza el proceso de extracción, con la ventaja de que la fase sorbente no se encuentra directamente en contacto con el recipiente de extracción, de modo que pueden alcanzarse mayores velocidades de agitación sin una pérdida o deterioro de la fase sorbente. Además el diseño de RDSE permite mantener expuesta una mayor razón área/volumen y una mayor capacidad de carga de fase sorbente que la soportada en SBSE.

De la misma forma, RDSE posee ventajas significativas sobre SPE, destacando la recirculación de la muestra que permite una continua renovación de la interfase durante el proceso de extracción, de modo que no requiere etapas exhaustivas de limpieza (*clean up*) en muestras complejas, como si lo requiere SPE, debido a que la extracción se realiza mediante un régimen de paso unidireccional, lo que provoca la obstrucción del filtro superior del cartucho, siendo esta la mayor dificultad para la utilización de SPE en muestras líquidas o extractos que provienen de matrices complejas como tejidos, plantas, frutas o suelos. Otra ventaja de RDSE sobre SPE es que requiere una menor supervisión durante el proceso de extracción. En el caso de RDSE, el proceso ocurre a una velocidad de rotación constante, que no requiere intervención humana, en cambio SPE requiere de un operador que regule el flujo óptimo mediante válvulas en la cámara Manifold, debido a que pequeñas diferencias en la composición la muestra, incide en la velocidad de paso por el cartucho.



Fig 2. Fotos a escala de técnicas de extracción en fase sólida, (A) SBSE, (B) SPE, (C) RDSE.

Las ventajas señaladas para el sistema RDSE lo convierten en una técnica adecuada para su utilización en muestras complejas, como lo son las matrices de origen animal, permitiendo reducir los tiempos de análisis (para un set de muestras), disminuir las etapas preparativas, reducir el volumen de disolventes orgánicos asociados al pretratamiento, disminuir la intervención humana y simplificar el procesamiento de las muestras. Además, es factible su automatización, siendo una alternativa innovadora, de fácil fabricación y adaptación, es económica y ambientalmente sustentable para su implementación en los laboratorios de rutina de Chile y el mundo.

Actualmente RDSE tiene dos configuraciones (Figura 3): la versión plana en que la fase sorbente es un *film* de polímero adherido a una de las caras del disco de teflón, mediante esta configuración se ha utilizado polidimetilxiloxano (PDMS), filtros de octadecil (C₁₈) y filtros de nylon para la extracción de analitos de baja polaridad (LogP entre 3 a 7), no obstante para analitos de mayor polaridad (LogP menor a 3), con este conjunto de fases, no se obtienen recuperaciones cuantitativas en tiempos cortos de extracción, de manera que se exploró cambiar la configuración del disco para utilizar un mayor espectro de fases sorbentes.

La segunda configuración de RDSE fue desarrollada durante el año 2012, consiste en un disco con cavidad, en la cual se dispone una cantidad de fase sorbente en polvo, luego se agrega un filtro de fibra de vidrio y se sella con un anillo de teflón, esta configuración fue exitosamente implementada para la extracción de florfenicol en plasma porcino ⁽⁶⁾, utilizando como sorbente OASIS-HLB®, que corresponde al copolímero divinilbenceno-N-vinilpirrolidona, este material sorbente permite extraer analitos polares en un rango de pH operacional de 0-14 ⁽⁷⁾. Además esta configuración de disco con cavidad permite la utilización de distintas fases sorbentes provenientes de la cromatografía como del desarrollo de fases sorbentes para SPE.

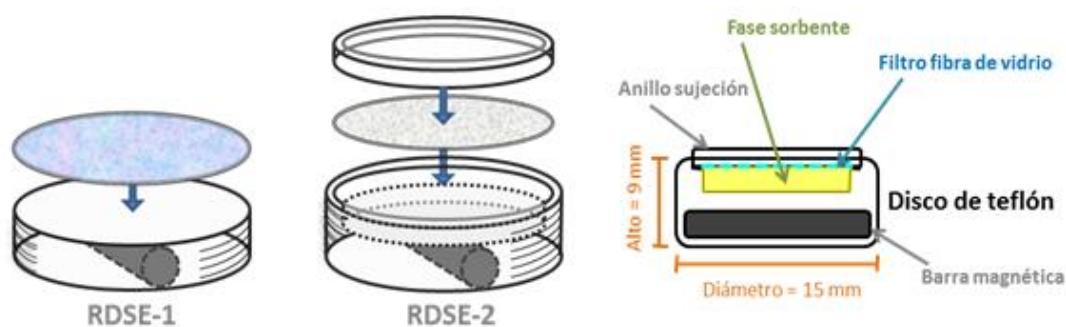


Fig 3. A la izquierda configuración del disco plano, al centro la configuración con depósito y la derecha esquema de los componentes del disco con cavidad y sus dimensiones.

El proceso más clásico de extracción de un analito desde una matriz acuosa es la extracción líquido-líquido, la cual se basa en contactar dos disolventes (fases) inmiscibles, donde por efecto de la polaridad de la segunda fase, se rompen las fuerzas de atracción que existen entre el analito y las moléculas de la primera fase. Al tratarse de un proceso de reparto entre las fases, la solubilidad relativa del analito es la que gobierna el proceso de reparto. Análogo a este proceso es el que ocurre en la extracción utilizando PDMS, que al tratarse de un elastómero que se comporta como un fluido apolar, donde la constante de reparto entre PDMS y la fase acuosa puede aproximarse a la Constante de Reparto octanol-agua ⁽⁸⁻⁹⁾ (Ecuación 1).

$$(ec. 1) K_{O/W}(=) K_{PDMS/W} = \frac{C_{PDMS}}{C_W} = \frac{m_{PDMS}}{V_{PDMS}} \chi \frac{V_W}{m_W}$$

Donde C_{PDMS} y C_W es la concentración del analito, m_{PDMS} y m_W la masa del analito y V_{PDMS} y V_W los volúmenes de las fases en PDMS y agua respectivamente. Agrupando la razón de fase (V_W/V_{PDMS}) y definiéndola como β , se obtiene (Ecuación 2):

$$(ec. 2) \frac{K_{PDMS/W}}{\beta} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} = \frac{m_{PDMS}}{m_0 - m_{PDMS}}$$

Donde m_0 representa la cantidad inicial de analito en la muestra, reemplazando se obtiene una expresión que da cuenta de la recuperación (Ecuación 3).

$$(ec. 3) \text{recuperación} = \frac{m_{PDMS}}{m_0} = \frac{\frac{K_{O/W}}{\beta}}{1 + \frac{K_{O/W}}{\beta}}$$

Entonces la recuperación teórica depende solamente de la $K_{O/W}$ (LogP) y los volúmenes relativos de agua y PDMS.

En el caso de la fase sorbente C_{18} , ocurre un proceso de adsorción mediante fuerzas de Van der Waals donde el analito interacciona con las cadenas alifáticas, mientras que la fase divinilbenceno-N-vinilpirrolidona (HLB®) el analito interacciona mediante puentes de hidrógeno con el grupo pirrolidona e interacciones del tipo π - π o *pi staking* ⁽¹⁰⁾ con el anillo bencénico del copolimero (Figura 4).

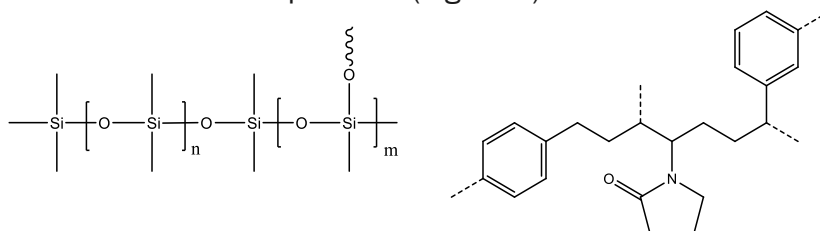


Fig 4. A la izquierda PDMS y a la derecha divinilbenceno-N-vinilpirrolidona (HLB®).

La principal limitante en el proceso de extracción por sorción, durante la agitación, es que sobre la cara de la fase sorbente (en la interfase) se produce una capa estática de espesor definido, llamada capa estática de agua, la cual debe ser atravesada por el analito solo por difusión, siendo esta etapa la determinante para la velocidad de extracción y para alcanzar el tiempo de equilibrio. La rotación del disco produce la agitación de la muestra, produciendo la convección forzada que reduce el grosor de la capa estática o límite entre el fluido y el sólido. Así el transporte de masa se ve agilizado, disminuyendo los tiempos para alcanzar extracciones cuantitativas.

El grosor de la capa estática (δ) esta descrito según la siguiente expresión empírica:

$$(ec. 4) \quad \delta = 2,64 \frac{b}{Pr^{0,43} \sqrt{R_d}}$$

La transferencia de masa también se describe por una relación empírica:

$$(ec. 5) \quad \frac{dn}{dt} = \left(\frac{D_s A}{\delta} \right) C_s$$

Donde el Número de Prandlt (Pr) es un número adimensional utilizado en la mecánica de fluidos que resulta del cociente entre la viscosidad cinemática y el coeficiente de difusión ($Pr = \nu/D$), el Número de Reynolds (R_d) también es un número adimensional que relaciona la velocidad del fluido con la viscosidad cinemática ($R_d = 2ub/\nu$), donde u es la velocidad lineal del fluido y b es el radio del dispositivo. Desde la ecuación 5, se desprende que la tasa de extracción es proporcional al área superficial de la fase (A) e inversamente proporcional al espesor de la capa estática (δ).

Si bien reducir la capa estática mediante la agitación es importante para lograr extracciones cuantitativas, existen otros parámetros físico-químicos que intervienen en la eficiencia del proceso. Uno de los parámetros más relevantes al extraer analitos que poseen propiedades ácido-base (uno o varios pK_a), es el pH. Dado que los fármacos son estructuras que normalmente poseen varios grupos funcionales con características ácido/base, suelen formar distintas especies estables al cambiar el pH de su entorno. Entonces si solo consideramos la Constante de Reparto ($\log P$) que describe la hidrofobicidad respecto a la especie no-ionizada (Ecuación 6), estaríamos despreciando el efecto del pH. De hecho, la capacidad de los fármacos de cambiar de ionizarse a distintos pH (cambiando su polaridad aparente), es la principal responsable de que estos puedan traspasar membranas celulares ⁽¹¹⁾.

El Coeficiente de Distribución ($\log D$) es el cociente de reparto de la suma de las concentraciones de todas las formas del compuesto (ionizadas y no-ionizadas) en

cada una de las dos fases (Ver ecuación 7). Para efecto de la extracción en fase sólida, conocer la LogD, permite predecir el rango de pH que favorecerá la interacción con nuestra fase sorbente.

$$(ec. 6) \text{Log}P_{\left(\frac{\text{octanol}}{\text{agua}}\right)} = \log \frac{[\text{soluto}]_{(\text{octanol})}}{[\text{soluto}]_{(\text{agua})}^{\text{no ionizado}}}$$

$$(ec. 7) \text{Log}D_{\left(\frac{\text{octanol}}{\text{agua}}\right)} = \log \frac{[\text{soluto}]_{(\text{octanol})}}{[\text{soluto}]_{(\text{agua})}^{\text{no ionizado}} + [\text{soluto}]_{(\text{agua})}^{\text{ionizado}}}$$

Otra variable que puede afectar el proceso de extracción es el incremento de la fuerza iónica de la solución, que consiste en utilizar una pequeña cantidad de una sal inerte para producir el fenómeno de *salting-out*, lo que se traduce en una disminución de la solubilidad del analito volviéndolo disponible para ser retenido por un sorbente de menor polaridad. Sin embargo, la presencia de sal aumenta también la viscosidad absoluta de la solución, reduciendo por ende la velocidad de la extracción, pero a su vez es posible reducir la viscosidad de la solución diluyendo la muestra. La eficiencia de extracción también se ve afectada por la utilización de compuestos que enmascaren el efecto de un interferente, por ejemplo, en el caso de la oxitetraciclina en leche, es conveniente utilizar EDTA para complejar el calcio, debido a que compleja al analito y evita la quelación del analito con con el calcio libre ⁽¹²⁾.

En experiencias previas con RDSE se ha demostrado que la velocidad de agitación incide de manera positiva en la eficiencia de la extracción. Sin embargo, esto no se cumple para la etapa de elución, debido a que se utiliza un pequeño volumen de disolvente y que normalmente presenta una baja viscosidad, no es conveniente utilizar altas velocidades de agitación, por la formación de un vortex que impide el contacto entre la fase sorbente y el disolvente. Los disolventes que normalmente se utilizan en la elución, por polaridad y volatilidad, son metanol, acetona, acetonitrilo, acetato de etilo, diclorometano y cloroformo entre otros.

Vale considerar que en esta investigación se pondrá a prueba la capacidad del RDSE en un sistema [analito-matriz-sorbente], donde la particularidad y complejidad de cada matriz de origen animal se aborda mediante la experiencia reportada en la literatura y observaciones empíricas que se realicen durante la investigación.

1.2 Fármacos de uso veterinario.

La productividad de industria pecuaria depende en gran medida de la utilización de fármacos de uso veterinario, esenciales en el control de enfermedades en animales productores de carne y leche destinados al consumo humano. Aquí surge la necesidad de contar con métodos analíticos permitan determinar dichos fármacos en matrices de origen animal, incentivando la aplicación de nuevas estrategias analíticas con mayor eco-eficiencia, para su aplicación en tres campos de suma importancia:

El primero es la determinación de la farmacocinética, el segundo es la depleción de residuos para los fármacos administrados y el tercero es contar con métodos para el control de calidad de alimentos dirigidos al consumo humano (Figura 5).



Fig 5. Esquema del contexto en que se desarrolla la investigación.

El perfil farmacocinético de un fármaco administrado permite medir su absorción, distribución y eliminación, además permite conocer datos relevantes como la concentración máxima (C_{max}), concentración mínima (C_{min}), tiempo en que permanece sobre la concentración inhibitoria mínima (CIM) y el área bajo la curva de acción (esta última está relacionada con la potencia). La farmacocinética se obtiene al medir concentraciones plasmáticas del fármaco o metabolito activo, en una secuencia de tiempos posteriores a su administración a grupo representativo del animal de destino. Los estudios de depleción de residuos en cambio, tienen importancia por razones de inocuidad alimentaria, y consiste en la determinación de residuos en los animales tratados, específicamente en las matrices destinadas al consumo humano (carne, hígado, riñón, grasa, leche, etc.). Esto permite establecer los tiempos de resguardo (carencia) según el Límite Máximo Residual (LMR) establecido por la normativa vigente para el fármaco o metabolito marcador en dicha matriz. Los métodos que permitan resolver estudios de depleción también son útiles para realizar el control de calidad de los alimentos destinado al consumo humano, resguardando así la seguridad alimentaria y las buenas prácticas productivas ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

En la presente investigación se han seleccionado fármacos de uso veterinario de distinta naturaleza y ampliamente utilizados en Chile y el mundo.

El primero de ellos es el antibacteriano florfenicol (FF; 2,2-dicloro-N-[(1R, 2S)-3-fluoro-1-hidroxi-1-(4 metanosulfonilfenil) propan-2-il]acetamida), que es utilizado en el tratamiento de enfermedades respiratorias y digestivas en animales de producción (bovinos, porcinos y aves). Su mecanismo de acción consiste en que este se une de manera reversible a una unidad del ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis proteica, lo que se traduce en la inhibición de la multiplicación bacteriana, por lo que se lo clasifica como bacteriostático. El florfenicol pertenece a la familia del cloranfenicol y es administrado a los bovinos mediante inyectables por vía intramuscular o subcutánea. Para medir su actividad debe medir la cantidad libre en plasma, sin embargo florfenicol se metaboliza lentamente a la forma florfenicol amina (FFA; (1R, 2S)-2-amino-3-fluoro-1-(4-metilsulfonilfenil) propan-1-ol), especie que mantiene actividad quimioterapéutica ⁽¹⁵⁻¹⁶⁾. En el estudio de residuos es necesario cuantificar ambas especies ⁽¹⁷⁾, siendo una alternativa analítica la hidrólisis ácida para llevar al FF remanente a FFA (Figura 6) ⁽¹⁸⁾. Para la mayoría de los fármacos, los metabolitos de eliminación son más hidrosolubles que su precursor, FF no es la excepción y su metabolito FFA presenta una mayor polaridad (Figura 7) ⁽¹⁹⁾.

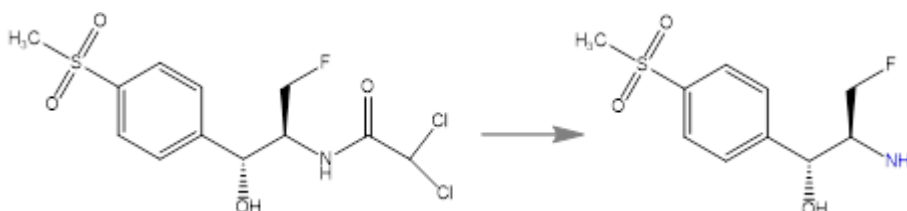


Fig 6. A la izquierda florfenicol (FF) y a la derecha el metabolito florfenicol amina (FFA), proceso que ocurre mediante un proceso metabólico o bien por una hidrólisis ácida en el laboratorio.

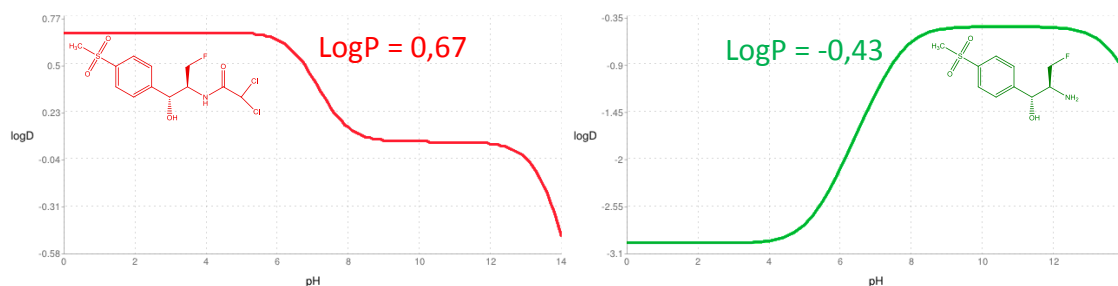


Fig 7. Constante de Distribución (LogD) en función del pH y Constante de Reparto (LogP), a la izquierda florfenicol (FF) y a la derecha su metabolito florfenicol amina (FFA).

El segundo fármaco es el triclabendazol (TCB; 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-metilbenzimidazole) es un antiparasitario antihelmíntico de la familia de los benzimidazoles, los cuales son altamente efectivos para el tratamiento de las formas maduras e inmaduras de *Fasciola hepática* y *Fasciola gigantica* en todas las especies rumiantes. Este fármaco es ampliamente utilizado en el tratamiento de bovinos productores de carne. Tras su administración por vía oral el TCB es oxidado por enzimas hepáticas a triclabendazol sulfóxido (TCB-SO; 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-2-(metilsulfinil)-1H-benzimidazol) y luego a triclabendazol sulfona (TCB-SO₂; 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-2-(metilsulfonil)-1H-benzimidazol), por lo que no es posible detectar TCBZ en sangre. Sin embargo, su metabolito TCB-SO es activo, siendo este el responsable de la actividad fasciolicida del fármaco (Figura 8) ⁽²⁰⁾.

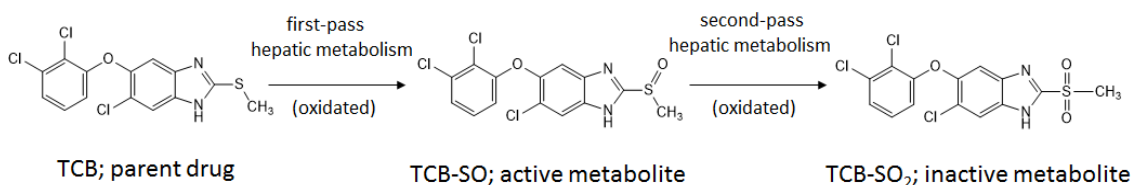


Fig 8. A la izquierda triclabendazol (TCB), a la derecha el metabolito activo triclabendazol sulfóxido (TCB-SO) y abajo el metabolito inactivo triclabendazol sulfona (TCB-SO₂).

La efectividad antiparasitaria del TCB es dependiente del tiempo, por lo que el éxito terapéutico radica en que el producto administrado mantenga concentraciones efectivas de TCB-SO en el sitio de localización de la *Fasciola hepática*. En este sentido, la farmacocinética de los metabolitos en plasma es un indicador directo de la eficiencia del producto administrado.

Para realizar un estudio de depleción del fármaco en tejidos se debe determinar las concentraciones residuales de TCB, TCB-SO y TCB-SO₂, sumado a la presencia de un tercer metabolito, keto-triclabendazol (KT-TCB; 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1,3-dihidro-benzimidazol-2-ona). Sin embargo la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) establecen como residuo marcador para el LRM de TCB la suma de todos los residuos extraíbles que pueden ser oxidados a la forma KT-TCB ⁽¹⁷⁾, válido para las matrices: músculo, grasa, hígado y riñón de bovino.

Los tejidos con residuos de triclabendazol y sus metabolitos deben someterse a una hidrólisis alcalina, luego se debe concentrar el residuo marcador y mediante una oxidación sobre el extracto limpio se obtiene KT-TCB (Figura 9) ⁽²¹⁾.

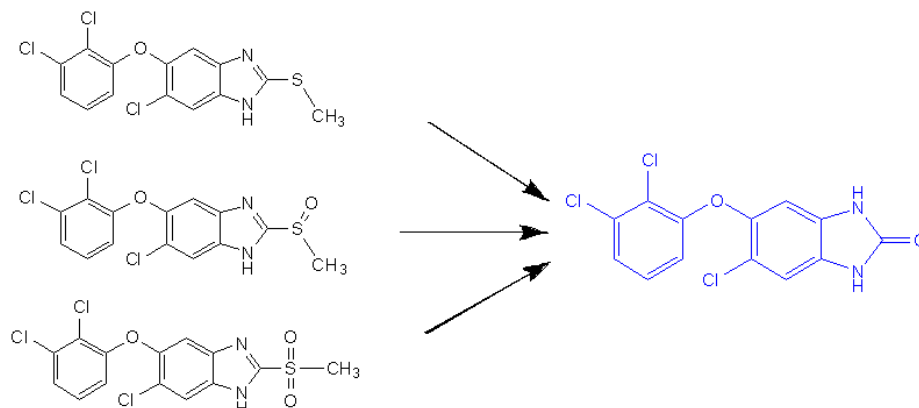


Fig 9. Hidrólisis alcalina y oxidación de los residuos de triclabendazol (TCB).

Los antiparasitarios se caracterizan por su de baja polaridad, TCB se metaboliza rápidamente a especies de menor lipofilia, TCB-SO y TCB-SO₂, al igual que el metabolito KT-TCB que se forma menor tasa que sus predecesores, sin embargo son especies de baja polaridad, acumulables en tejido adiposo (Figuras 10 y 11) (22).

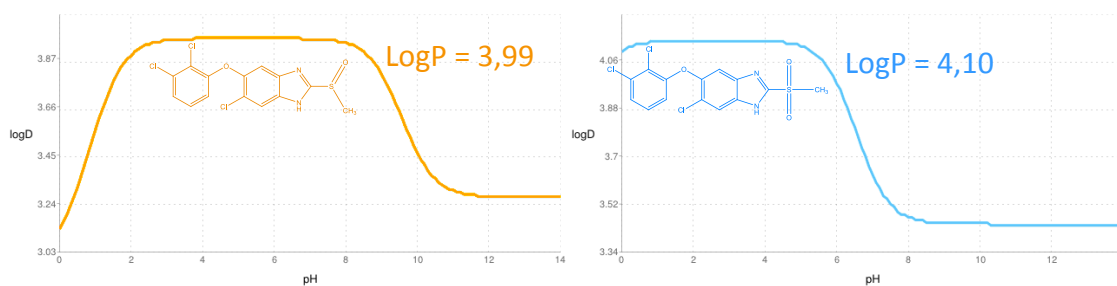


Fig 10. Constante de Distribución (LogD) en función del pH y Constante de Reparto (LogP), a la izquierda triclabendazol sulfóxido (TCB-SO) y a la derecha triclabendazol sulfona (TCB-SO₂).

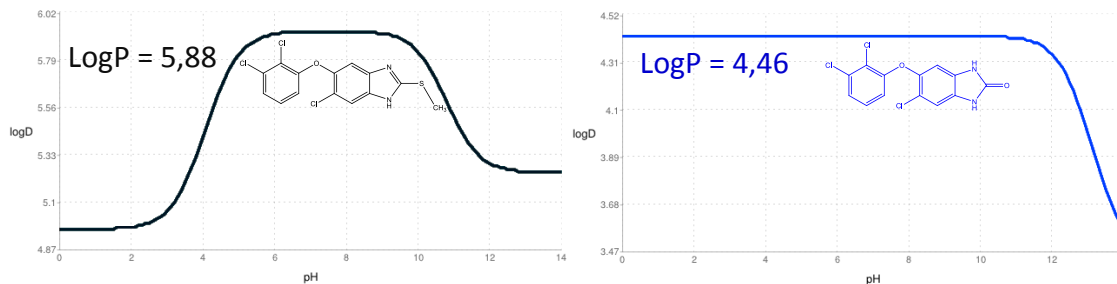


Fig 11. Constante de Distribución (LogD) en función del pH y Constante de Reparto (LogP), a la izquierda triclabendazol (TCB) y a la derecha el metabolito marcador Keto-triclofenol (KT-TCB).

En el caso particular de la matriz leche, la persistencia de antibióticos ha suscitado un tema de gran preocupación en términos de la salud pública, en gran medida porque el consumo de productos lácteos en los países desarrollados ha ido en constante aumento y que aún no se ha estimado con objetividad el peligro que estos residuos provocan a largo plazo, dando lugar probables resistencias bacterianas o induciendo hipersensibilidad a un antibiótico ^(11 y 23). Además, el calentamiento o pasteurización de la leche no afecta el contenido de un antibiótico; en algunos casos, sólo se modifica la actividad microbiana. En este sentido, los LMR establecidos por el *Codex alimentarius* y la EMA son más estrictos en el caso de este alimento que en el resto de las matrices de consumo humano, de manera que es necesario contar con métodos analíticos que permitan pre-concentrar la muestra y alcanzar límites de cuantificación que cumplan con la normativa.

Para esta investigación se han seleccionado cuatro antibióticos utilizados en vacas productoras de leche: oxitetraciclina, enrofloxacino, sulfadoxina y trimetoprima, que corresponden a bacteriostáticos y bactericidas de amplio espectro.

La oxitetraciclina (OTC; 4-(dimetilamino)-3,5,6,10,12,12a-hexahidroxi-6-metil-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidrotetraceno-2-carboxamida) es una tetraciclina que está indicada para el tratamiento de leptospirosis, listeriosis, infecciones del sistema respiratorio, neumonía, infecciones del tracto urinario y digestivo (enteritis bacteriana) y endometritis bacteriana. Se ha propuesto que su mecanismo de acción se debe a su capacidad de quelación de cationes, la inhibición de sistemas enzimáticos o la supresión de la síntesis proteínica por una unión específica a ribosomas bacterianos ⁽¹⁶⁾.

Para los residuos en leche se considera la concentración de OTC y su epímero activo, la 4-epi-oxitetraciclina (4E-OTC; 4-(dimetilamino)-1,5,6,10,11,12a-hexahidroxi-6-metil-3,12-dioxo-3,4,4a,5,5a,6,12,12a-octahidrotetraceno-2-carboxamida), de forma que debe considerarse la polaridad de ambas especies (Figura 12) ⁽²⁴⁾.

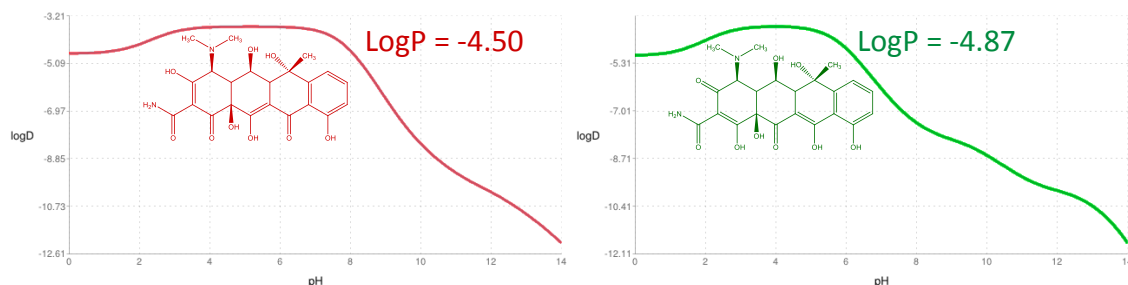


Fig 12. Constante de Distribución (LogD) en función del pH y Constante de Reparto (LogP), a la izquierda oxitetraciclina (OTC) y a la derecha el metabolito activo 4-Epi-Oxitetraciclina (4E-OTC).

Es importante considerar que el uso de antibióticos en vacas productoras de leche es necesario para controlar de manera eficaz y selectiva la presencia de bacterias que provocan enfermedades, que se pueden traducir en una contaminación e inutilización de la leche para su comercialización. Sin embargo, los bajos LMR establecidos para esta matriz implican que algunos productos alcancen largos periodos de resguardo, lo que también significa cuantiosas pérdidas en la producción. Este es el principal incentivo para el desarrollo de nuevas formulaciones para reduzcan el tiempo de resguardo.

El enrofloxacin (EFX; ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-(4-etilpiperazin-1-il)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico) es una quinolona que está indicado para enfermedades respiratorias, digestivas, reproductivas, articulares y erisipelosis bacteriana. Este antibiótico forma un metabolito activo llamado ciprofloxacino (CFX; ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-il)-quinolin-3-carboxílico), presente en leche debido a la metabolización del EFX (25).

El sitio de acción de las quinolonas es la DNA girasa o topoisomerasa II, una enzima esencial para la replicación bacteriana. A pesar de que CPX posee una actividad antimicrobiana más potente, la administración de EFX logra el doble de las concentraciones plasmáticas que la administración directa de CPX, el grupo etil en la posición 4 del piperazin reduce significativamente su polaridad (Figura 13) (24), de modo que para el uso veterinario se administra EFX que hepáticamente pasa a la forma CFX, manteniendo su actividad antimicrobiana por un tiempo más prolongado. Las quinolonas son muy poco tóxicas para los animales en las dosis en que se utilizan, sin embargo se han relacionado algunos efectos colaterales con las quinolonas en seres humanos, incluyendo desorientación, alteraciones motoras y convulsiones, sobre todo por la presencia de CPX en residuos.

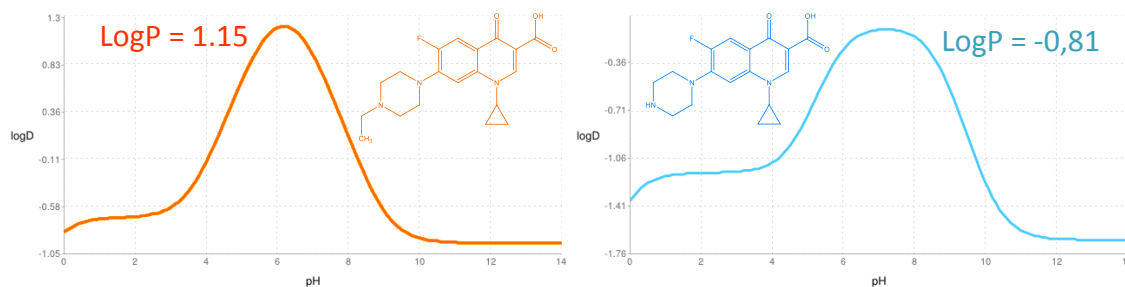


Fig 13. Constante de Distribución (LogD) en función del pH y Constante de Reparto (LogP), a la izquierda enrofloxacin (EFX) y a la derecha el metabolito activo Ciprofloxacino (CFX).

Sulfadoxina (SDX; 4-amino-N,-(5,6-dimetoxi-4-pirimidinil)benzenosulfonamida) es una sulfonamida que normalmente se usa en combinación con trimetoprima (TMP; 5-(3,4,5-trimetoxibenzil)pirimidin-2,4-diamina) que es una diaminopirimidina, estos antibióticos se administran conjuntamente para conseguir un efecto sinérgico, ya que producen un efecto secuencial al actuar en dos etapas sucesivas del metabolismo bacteriano. SDX tiene un efecto bacteriostático de larga acción, pues por semejanza estructural su grupo para-aminobenzol, compite con el ácido para-aminobenzoico (PABA), inhibiendo la síntesis del ácido dihidrofólico, necesario para la replicación bacteriana. Por su parte, TMP inhibe la reductasa del ácido dihidrofólico, impidiendo la síntesis del ácido tetrahidrofólico, otro precursor necesario en la replicación bacteriana. De esta manera ambos antibióticos juntos se potencian provocando un efecto bactericida. De hecho, la concentración mínima de inhibitoria de estos fármacos es considerablemente más baja que ambos de manera individual, esto se ha comprobado para las infecciones por estreptococos, meningococos, E. coli y proteus.

En base a su amplio espectro de acción esta combinación de antibióticos está indicada para infecciones del aparato respiratorio, como laringitis, infecciones inespecíficas, bronconeumonías y neumonías. Para infecciones del sistema urogenital, pielitis, cistitis y mastitis puerperal. El tratamiento sistémico de infecciones generales o locales, como septicemias, mastitis, infecciones de heridas e infecciones articulares (26). Para residuos en leche debe determinarse ambas especies inalteradas (Figura 14) (24).

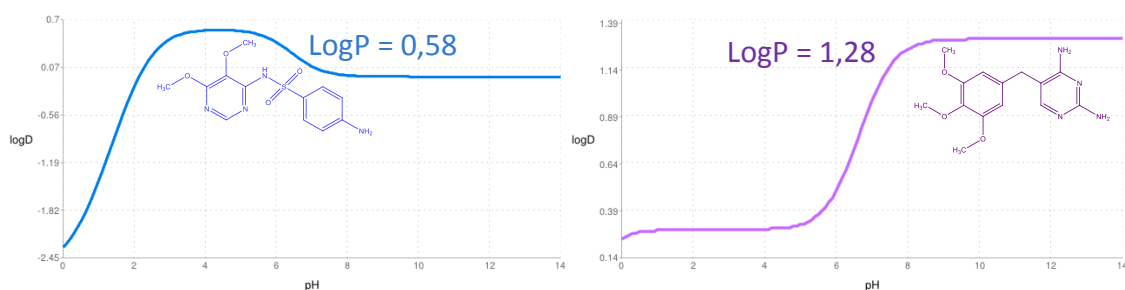


Fig 14. Constante de Distribución (LogD) en función del pH y Constante de Reparto (LogP), a la izquierda sulfadoxina (SDX) y a la derecha trimetoprima (TMP).

Continuando en el la matriz leche, existe otro grupo de fármacos cuyo estudio es importante dada su persistencia en la grasa por su característica apolar, un ejemplo de antiparasitario utilizado en vacas productoras de leche es el closantel (CLT, N-(5-cloro-4-[(4-clorofenil)ciano-metil]-2-metilfenil)-2-hidroxi-3,5-diiodo-benzamida), es un fasciolicida eficaz, siendo una buena alternativa cuando los bovinos presentan resistencia de Fasciola hepatica al triclabendazol y otro benzimidazoles.

Closantel se adhiere fuertemente a las proteínas plasmáticas, por lo tanto su periodo de acción es prolongado (hasta 28 días de persistencia), debido a que se han establecido un LMR en leche de solo 45 ppb, los detectores de UV y DAD no son una buena alternativa para alcanzar LC útiles para su cuantificación en leche, no obstante esta descrito que closantel tiene un buen rendimiento cuántico para ser medido mediante HPLC-Fluorescencia ⁽²⁷⁻²⁸⁾.

Closantel se mide en leche sin modificar su estructura original, la que se caracteriza por ser apolar a pH fisiológico (Figura 15) ⁽²⁹⁾, donde su lipofilia es una característica determinante para la estrategia utilizada en la extracción desde la matriz leche.

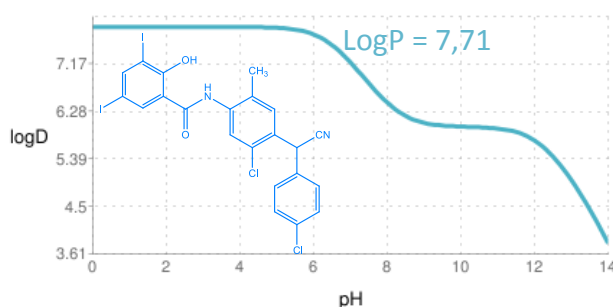


Fig 15. Constante de Distribución (LogD) en función del pH y Constante de Reparto (LogP) del antiparasitario closantel.

Otras familias importantes de antibióticos de uso veterinario son los macrólidos, lincosamidas y aminoglúcidos, en esta investigación se estudiará la determinación simultánea de la lincomicina (LMC; (4R)-N-[(1R,2R)-2-hidroxi-1-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(metilsulfanil)oxan-2-il]propil]-1-metil-4-propilpirrolidina-2-carboxamida) y la espectinomocina (EMC; (1R,3S,5R,8R,10R,11S,12S,13R,14S)-8,12,14-trihidroxi-5-metil-11,13-bis(metilamino)-2,4,9-trioxatriciclo [8.4.0.03,8]tetradecan-7-ona), corresponden a una lincosamida y un aminoglucido respectivamente. Sus mecanismos de acción consisten en la inhibición de la síntesis proteica de las bacterias, por unión a ribosomas específicos durante la replicación (Figura 16) ⁽²⁹⁾. Tanto lincomicina como espectinomocina no presentan estructuras resonantes, obteniendo muy baja sensibilidad al utilizar detectores espectroscópicos como UV, DAD y fluorescencia. Para su cuantificación en los niveles de concentración encontrados en plasma y en residuos tisulares debe realizarse mediante espectrometría de masas ⁽³⁰⁻³³⁾, donde el analizador más utilizado es QQQ, sin embargo se adaptaran las condiciones de ionización ESI (+) para su medición mediante TOF, utilizando UHPLC en la etapa cromatográfica.

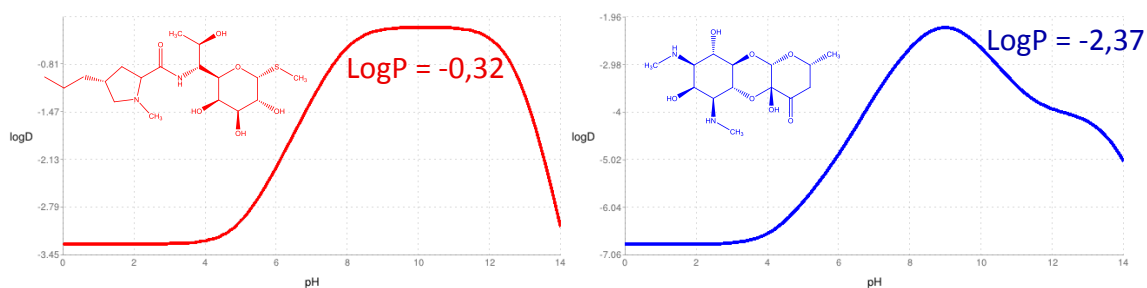


Fig 16. Constante de Distribución (LogD) en función del pH y Constante de Reparto (LogP), a la izquierda lincomicina y a la derecha espectinomicina

Tanto la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), esta última mediante el Codex Alimentarius establecen los niveles tolerables para residuos destinados al consumo humano, a continuación se resumen los LMR para los analitos y matrices en que se estudiarán en la presente investigación (Tabla 1).

Tabla 1. Analitos y LMR según cada matriz estudiada en la investigación.

Fármaco	Residuo marcador	Especie	Tejido objetivo	LMR (μgKg^{-1})		
Florfenicol	Suma de florfenicol y metabolitos expresados como florfenicol-amina	Bovino	Músculo	200		
			Hígado	3000		
			Riñón	300		
Triclabendazol	Suma de los residuos extraíbles y oxidables a keto-triclabendazol		Músculo	225		
			Hígado	250		
			Riñón	150		
Oxitetraciclina	Suma de oxitetraciclina y 4epi-oxitetraciclina		Leche	Grasa	100	
				Enrofloxacin	Suma de enrofloxacin y ciprofloxacino	100
				Sulfadoxina	Sulfadoxina	50
Trimetoprima	Trimetoprima			45		
Closantel	Closantel					
Lincomicina	Lincomicina	Porcino	Músculo	100		
			Hígado	500		
			Riñón	1500		
			Grasa	50		
Espectinomicina	Espectinomicina		Músculo	300		
			Hígado	1000		
			Riñón	5000		
			Grasa	500		

II. Hipótesis.

La técnica de extracción por sorción con disco rotario (RDSE), tradicionalmente empleada en muestras de agua, es aplicable en la extracción de fármacos residuales en muestras complejas líquidas de origen animal como plasma y leche. Además es posible su aplicación en matrices no líquidas de origen animal como músculo, hígado, riñón y grasa de distintas especies, mediante un pre-tratamiento adecuado.

Mediante metodologías optimizadas, utilizando RDSE en la preparación de la muestra y cromatografía para la cuantificación, se pueden garantizar resultados analíticamente válidos según la normativa competente, permitiendo su aplicación en muestras reales para estudios de farmacocinética y de depleción de residuos.

Por otro lado, RDSE es una alternativa competitiva frente al “estado del arte” en la etapa de preparación de la muestra para matrices de origen animal, con posibles ventajas relacionadas con la dinámica del proceso de extracción con disco rotatorio, que pueden traducirse en:

- Disminución en el costo del proceso de preparación de la muestra (economía).
- Reducción del uso de disolventes orgánicos (eco-eficiencia).
- Menor supervisión e intervención humana del proceso (automatización)
- Versatilidad al uso de distintas fases sorbentes.
- Mayor simpleza en el proceso de *clean-up*.
- Disminución del tiempo de procesamiento.

III. Objetivos.

3.1 Objetivos Generales

Desarrollar metodologías para la cuantificación de fármacos de uso veterinario, presentes en distintas matrices de los animales de destino, utilizando como plataforma analítica la extracción por sorción con disco rotatorio (RDSE) y su posterior aplicación en estudios de farmacocinética y residuales en muestras reales.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Optimizar un método de extracción utilizando la plataforma RDSE en la determinación de florfenicol en plasma de bovinos para su posterior cuantificación por HPLC-DAD.
- ✓ Implementar una estrategia de determinación de florfenicol residual total en tejidos de bovino, utilizando RDSE en una etapa posterior a una digestión ácida de la muestras para llevar a cabo la cuantificación de florfenicol-amina como residuo marcador por HPLC-DAD.
- ✓ Optimizar un método de extracción por RDSE en la determinación de los metabolitos, triclabendazol-sulfóxido y triclabendazol-sulfona, de manera simultánea en plasma de bovino y cuantificación por HPLC-DAD.
- ✓ Implementar una estrategia de determinación de residuos de triclabendazol en tejidos de bovino, utilizando RDSE en una etapa posterior a una digestión alcalina de la muestras para llevar a cabo la cuantificación de keto-triclabendazol como residuo marcador por HPLC-DAD.
- ✓ Desarrollar un método de extracción por RDSE en la determinación simultánea de los antibióticos residuales, utilizando como analitos modelo, los fármacos y metabolitos: oxitetraciclina, 4epi-oxitetraciclina, enrofloxacino, ciprofloxacino, sulfadoxina y trimetoprima presentes en leche bovina para su posterior cuantificación por HPLC-DAD.
- ✓ Desarrollar un método de extracción por RDSE en la determinación de residuos simultánea de los antibióticos y metabolitos oxitetraciclina, 4epi-oxitetraciclina, enrofloxacino, ciprofloxacino, sulfadoxina y trimetoprima presentes en leche bovina para su posterior cuantificación por HPLC-DAD.

- ✓ Optimizar un método de extracción utilizando la plataforma RDSE en la determinación de los antibióticos lincomicina y espectinomicina en plasma de porcinos para su posterior cuantificación por UHPLC-TOF.
- ✓ Implementar una estrategia de determinación de residuos lincomicina y espectinomicina en tejidos de porcino, utilizando RDSE en una etapa posterior a extracción acuosa mediante Extracción por solvente acelerada (ASE) para llevar a cabo la cuantificación mediante UHPLC-TOF.

IV. Materiales y Métodos

4.1 Reactivos.

- Acetona grado HPLC, Merck.
- Acetonitrilo grado HPLC, Merck.
- Acetonitrilo grado LC-MS, Merck.
- Ácido cítrico monohidratado, grado analítico, Merck.
- Ácido clorhídrico fumante 37%, grado analítico, Merck.
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), para análisis, Merck.
- Ácido heptano-1-sulfónico ($\text{Na}^+\text{C}_7\text{H}_{15}\text{SO}_3^-$), cromatografía pares iónicos, Merck.
- Ácido heptanofluorobutírico 0,5 M, cromatografía pares iónicos, LC-MS, Sigma Aldrich.
- Ácido heptanofluorobutírico, para síntesis, Merck.
- Ácido orto-fosfórico (H_3PO_4) 85%, Merck.
- Ácido oxálico dihidratado ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), grado analítico, Merck.
- Ácido tricloroacético (CCl_3COOH), para síntesis, Merck.
- Ácido trifluoroacético (CF_3COOH), grado HPLC, Merck
- Agua grado 1, Milli Q.
- Agua grado LC-MS, Merck.
- Amoniacó 25%, para análisis, Merck.
- Cloroformo (CHCl_3), grado analítico, Merck.
- Diclorometano (CH_2Cl_2), grado analítico, Merck.
- Estándar 4-Epi-oxitetraciclina 97%, ACROS ORGANICS.
- Estándar Ciprofloxacino 95%, Sigma-Aldrich.
- Estándar Closantel 99,7 %, Sigma-Aldrich.
- Estándar Keto-triclabendazol 99%, WITEGA.
- Estándar Enrofloxacino 98,5%, Sigma-Aldrich.
- Estándar Espectinomicina diclorhidrato pentahidratado 97,6%, Dr. Ehrenstorfer GmdH.
- Estándar Florfenicol 100%, Sigma-Aldrich.

- Estándar Florfenicol amina 99,92%, GALCHIMIA.
- Estándar Oxitetraciclina clorhidrato 96,5%, Sigma-Aldrich.
- Estándar Lincomicina clorhidrato monohidratado 98,0%, Dr. Ehrenstorfer GmdH.
- Estándar Suldadoxina 99,8%, VETRANAL.
- Estándar Triclabendazol-sulfona 99,1%, Sigma-Aldrich.
- Estándar Triclabendazol-sulfóxido 99,6%, Sigma-Aldrich.
- Estándar Trimetroprim 99,7%, VETRANAL.
- Etanol absoluto, grado analítico, Merck.
- Fosfato di-acido de potasio (KH_2PO_4), grado analítico, Merck.
- Hidróxido de sodio en lentejas, grado analítico, Merck.
- Metanol, grado HPLC, Merck.
- Metanol, grado LC-MS, Merck.
- Peróxido de hidrogeno 30%, grado analítico, Merck.
- Trietilamina ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}$), para síntesis, Merck.
- Tri-sodio fosfato dodeca-hidratado ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), grado analítico, Merck.

4.2 Equipos.

- Agitador magnético múltiple (10 posiciones, 2000 rpm), Lab Companion.
- Agitador magnético múltiple con calefacción (10 posiciones, 1000 rpm), IKA.
- Balanza analítica, precisión 0,1 mg.
- Balanza microanalítica, precisión 0,001 mg.
- Balanza semi analítica, precisión 0,1 g.
- Baño de Termorregulado.
- Baño Ultrasonido.
- Dispensadores de solventes de regulados, 2,5-25,0 mL, VITLAB.
- Equipo de extracción pro solvente acelerada, ASE-100, DIONEX.
- Equipo de Cromatografía Líquida con detector DAD-Fluorescencia, Lachrom Elite.
- Equipo de Cromatografía Líquida con detector UV, Hitachi Lachrom.

- Equipo de Cromatografía Líquida (UHPLC), Flexar, acoplado a espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo (TOF), fuente de ionización ESI, Axion II, Perkin Elmer.
- Equipo para Filtración de Fase Móvil.
- Equipo para concentrar bajo corriente de nitrógeno.
- Espectrómetro de masas (TOF), con fuente ESI, Axion II, Perkin Elmer.
- Liofilizador L101
- Medidor de pH.
- Micropipetas de 20-200 y 100-1000 μL
- Procesador de alimentos, Mini pimer. Black and Decker.

4.3 Materiales

- Barras agitadoras magnéticas de teflón de 1 cm.
- Cámara de vermiculita para aislación a altas temperaturas, fabricación propia.
- Columna
- Columna HPLC, RP-C₁₈ 150 mm x 4,6 cm x 5 μm . X-terra.
- Columna HPLC, RP-C₁₈ 250 mm x 4,6 cm x 5 μm , Symmetry.
- Columna UHPLC, RP-C₁₈ HRes 50 mm x 2,7 cm x 1.9 μm , Browlee.
- Discos rotatorios de teflón con depósito, fabricación propia.
- Discos rotatorios de teflón planos, fabricación propia.
- Espátula metálica.
- Filtros de fibra de vidrio.
- Filtros de membrana para fase móvil 47 mm diámetro, 0.45 μm .
- Filtros de nylon 13 mm diámetro, 0.22 μm .
- Jeringas Desechables de 5 mL.
- Matraces aforados de vidrio de 2, 5, 10, 100, 500 y 1000 mL.
- Pipetas graduadas de vidrio de 10 mL.
- Pipetas pasteur de vidrio.
- Probetas de vidrio 100, 500 y 1000 mL.
- Sorbente Divinilbenceno-N-vinilpirrolidona, OASIS-HLB.

- Sorbente Octil (C₈), Selectrasorb™, UCT.
- Sorbente Octadecil (C₁₈), Selectrasorb™, UCT.
- Sorbente Cianopropil (CNP), Selectrasorb™, UCT.
- Sorbente Pharma-Sil Silica, Selectrasorb™, UCT.
- Sorbente Florisil, Selectrasorb™, UCT.
- Sorbente Estireno divinilbenceno (eDVB), Selectrasorb™, UCT.
- Sorbente Estireno Octadecil, Selectrasorb™, UCT.
- Sorbente Estireno Sulfónico, Selectrasorb™, UCT.
- Tubos de polipropileno de 15 y 50 mL.
- Tubos de vidrio graduados transparentes y ámbar de 10 mL (concentradores).
- Tubos Eppendorf 3mL.
- Tubos Vacutainer.
- Vasos precipitados de 100, 250 y 1000 mL.
- Viales cromatográficos claros y ámbar de 1,8 mL, septas ranuradas.
- Viales EPA claros y ámbar de 25 y 40 mL.

4.4 Muestras.

La empresa Veterquímica S.A. provee todas las muestras de plasma, músculo, hígado, riñón, grasa suprarrenal y leche de bovinos para aplicar las metodologías analíticas desarrolladas en el marco del proyecto "New developments in rotating-disk sorptive extraction: An efficient and green alternative for the sample preparation of simple and complex matrix" FONDECYT 1140716 regular 2014.

La empresa Veterquímica S.A. certifica que en cada entidad donde se realizará esta parte de la investigación, se emplean para todas las especies involucradas protocolos de bienestar animal de acuerdo a los principios de las Rs (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) y de los cuatro principios básicos del protocolo Welfare Quality® (buena alimentación, comportamiento apropiado, buen alojamiento y buena salud de las especies involucradas).

Las muestras de tejido (músculo, hígado, riñón y grasa) fueron molidas mediante una procesadora de alimento, porcionadas en viales EPA y fortificadas según los niveles indicados en la validación para su almacenamiento a -20 °C.

Las muestras de sangre recolectadas en tubos vacutainer fueron centrifugadas a 3000 G, por 10 minutos, a 4 °C, luego el plasma fue porcionado en tubos Eppendorf y fortificado según los niveles indicados en la validación para su almacenamiento a -20 °C.

4.4.1 Músculo, hígado, riñón, grasa, leche y plasma. (Blancos de matriz)

- ✓ Club de Rodeo, Camino el Toro, Kilómetro 7, Curacavi.
- ✓ Plantel Agro UC, Av. Alcalde Hernán Prieto 3285, Pirque.
- ✓ Frigorífico PROCAREN (Productos Caren), Camino Lo Sierra 04300, San Bernardo, Santiago.

4.4.2 Muestras reales (Ensayos de farmacocinética y de depleción)

- ✓ Agrícola Fundo Bellavista, Camino Llanquihue-Loncotoro km 15, Llanquihue, Región de los Lagos, Chile
- ✓ Parcela Santa Filomena, Camino Santa Filomena, Parcela 1, Calera de Tango, Región Metropolitana, Chile
- ✓ Plantel Agro UC, Av. Alcalde Hernán Prieto 3285, Pirque.
- ✓ Frigorífico PROCAREN (Productos Caren), Camino Lo Sierra 04300, San Bernardo, Santiago.

4.5 Metodología analítica.

Se aborda cada sistema (analito-matriz-sorbente) de manera independiente, agrupando analitos o matrices según el objetivo específico de cada desarrollo.

En la matriz plasma la estrategia inicial es diluir la muestra de plasma en una solución acuosa, evaluando el pH que favorezca la retención del analito en la fase sorbente utilizada. En el caso de la matriz leche se evalúa la estrategia de separación de proteínas y grasa más adecuada para cada grupo de analitos y la posterior aplicación en disco rotatorio sobre el suero resultante ajustando al pH que favorezca su retención en la fase sorbente. En el caso de tejidos, se realiza la optimización del pre-tratamiento (Hidrólisis ácida, básica o extracción por solvente acelerada) en la matriz músculo de la especie correspondiente (bovino o porcino), adecuando el extracto obtenido (pH y dilución) al proceso de extracción con disco rotatorio. Una vez validada la metodología, se realiza una adaptación de la metodología a los demás tejidos objetivos del estudio.

Independiente de la complejidad de la matriz, existen tres etapas transversales a los desarrollos metodológicos con RDSE en matrices de origen animal:

- ✓ Determinación de las condiciones cromatográficas y la configuración apropiada de los detectores espectrofotométricos con arreglo de diodos (DAD), fluorescencia (FXD) y espectrometría de masas con tiempo de vuelo (TOF), respectivamente. Traduciéndose en una adecuada identificación de los fármacos o metabolitos marcadores, con resolución y sensibilidad suficientes para cuantificar con exactitud y precisión en los rangos que satisfagan la aplicación del método a muestras reales (estudio de farmacocinética o depleción de residuos).
- ✓ Diseño y optimización del tratamiento de las muestras, depurando las etapas de pre-tratamiento, extracción, limpieza y elución, los que pueden ser iterativos o mediante diseño experimental, utilizando el sistema RDSE como estrategia analítica para el tratamiento de las muestras, privilegiando reducir el número de etapas y la utilización de disolventes orgánicos.
- ✓ Validación de la metodología propuesta, determinando rango lineal, selectividad, límites de cuantificación y detección, exactitud y precisión de la metodología desarrollada según las guías VICH GL 2 y VICH GL 49.

4.5.1 Florfenicol.

4.5.1.1 Determinación de florfenicol en plasma.

En el tratamiento de las muestras se utilizaron discos rotatorios con 50 mg de OASIS-HLB®, para alícuotas de plasma bovino de 400 μL (Figura 17). En el método cromatográfico se utilizó una columna RP-C₁₈ de 250 mm x 4,6 cm x 5 μm (Symmetry), detector UV (228 nm). La fase móvil fue una mezcla de agua/acetonitrilo (3:2), con un flujo de 1,0 mLmin⁻¹, volumen de inyección de 100 μL y un tiempo de análisis de 10 minutos. El método considera un factor de dilución de cinco veces (FD=5), utilizándose un rango de 0,05 - 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para la curva de estándares de FF y de 0,25 - 2,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para muestras de plasma blanco de bovino fortificado.

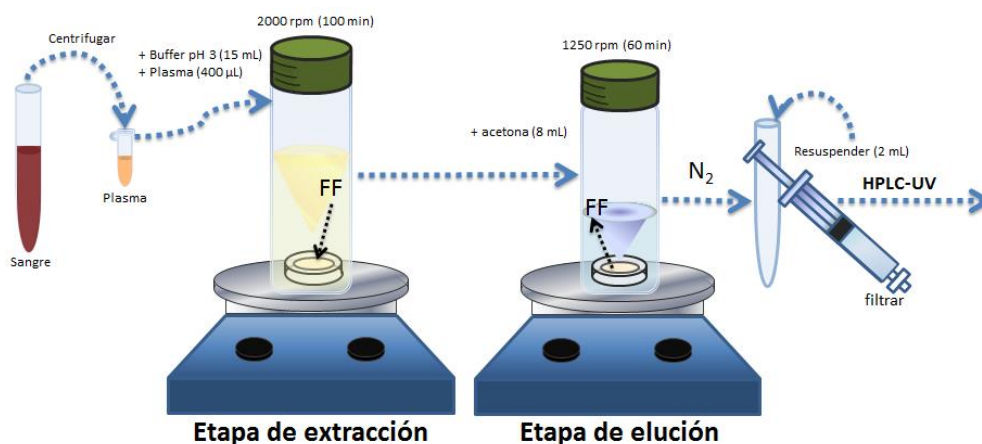


Fig 17. Esquema del método RDSE propuesto para la determinación de FF en plasma bovino.

4.5.1.2 Determinación de residuos de florfenicol en tejidos bovinos, expresado como florfenicol-amina.

En la etapa RDSE se utilizaron discos con 50 mg de OASIS-HLB® para muestras provenientes de la digestión ácida (Necesaria para la hidrólisis del FF a FFA) en porciones de tejido de 5 g para las matrices músculo, hígado y riñón de bovino (Matrices requeridas por la EMA y CODEX Alimentarius). El esquema RDSE se observa en la figura 18. Como método cromatográfico se utilizó una columna RP-C₁₈ de 250 mm x 4,6 cm x 5 μm (Symmetry), detector espectrofotométrico con DAD, la cuantificación se realizó a la longitud de onda 225 nm, la fase móvil utilizada fue un buffer fosfato 20 mM y ácido heptano-1-sulfónico 5 mM pH 3,85/ metanol 0,1% trietilamina (73:27), flujo de 1,0 mLmin⁻¹, volumen de inyección de 50 μL , temperatura del horno de 30 °C y tiempo de análisis de 20 minutos.

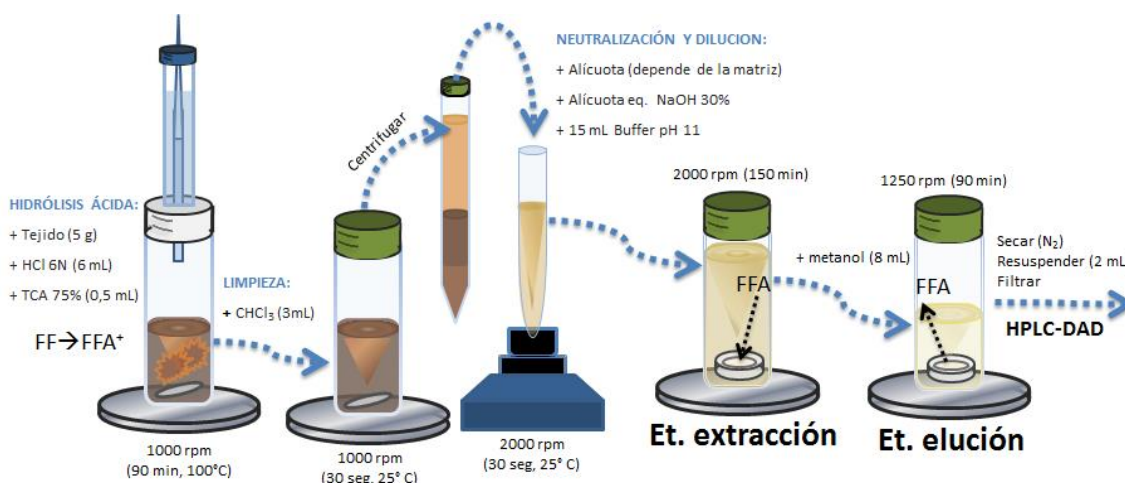


Fig 18. Esquema del método RDSE propuesto para la cuantificación FF total como FFA proveniente de la hidrólisis ácida de muestras de tejido bovino fortificado con FF.

El método considera un factor de dilución diferente en cada matriz, utilizándose como curva de calibración única para las tres matrices un rango de 50 - 1000 ngmL⁻¹ para los estándares de FFA y rangos que incluyan el LMR para las matrices fortificadas de músculo, hígado y riñón de bovino respectivamente (Figura 19).

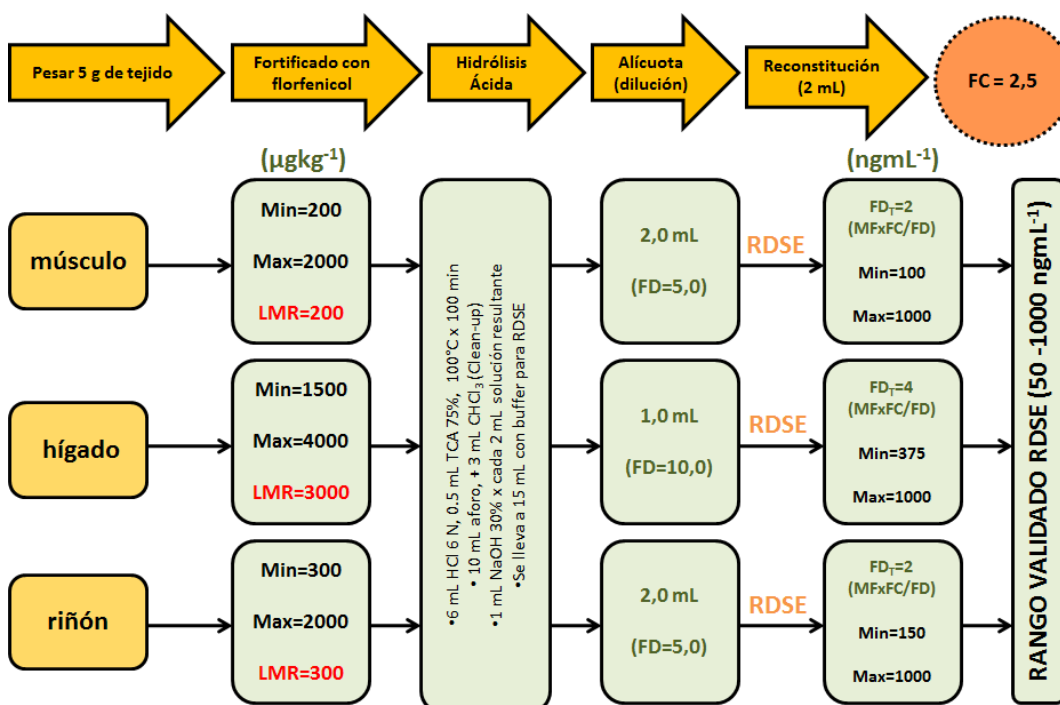


Fig 19. Sistema alícuotas y diluciones del método RDSE propuesto para FF en tejidos; (LMR) = Límite máximo residual la matriz, (MF) = Muestra Fortificada, (FC) = Factor de Concentración y (FD_T) = Factor de dilución total aplicado a la muestra.

4.5.2 Triclabendazol.

4.5.2.1 Determinación de los metabolitos triclabendazol-sulfona y triclabendazol-sulfóxido en plasma de bovino.

Para la metodología RDSE se utilizaron discos con 50 mg de HLB® y alícuotas plasma de bovino de 400 µL. Para el método cromatográfico se utilizó una columna RP-C₁₈ de 250 mm x 4,6 cm x 5 µm (Symmetry), detector UV a la longitud de 294 nm, la fase móvil utilizada fue una mezcla de acetato de amonio 25 mM pH 6,6/acetonitrilo (1:1), flujo 1,0 mLmin⁻¹, volumen de inyección de 50 µL y tiempo de análisis de 13 minutos. El método considera un factor de dilución de cinco (FD=5), utilizándose como curva de calibración un rango de 0,10 - 1,00 µg mL⁻¹ para los estándares de TCBZ-SO y TCBZ-SO₂ para un rango de 0,25 - 2,50 µg mL⁻¹ en muestras de plasma bovino.

4.5.2.1 Determinación de residuos de triclabendazol en tejidos bovinos, expresado como keto-triclabendazol.

En la etapa de extracción se usaron discos con 80 mg de C₁₈ para extractos provenientes de la digestión alcalina de porciones de tejido de 5 g de las matrices músculo, hígado, riñón y grasa de bovino (Necesaria para la hidrólisis de los residuos de TCB a KT-TCB), se observa la secuencia RDSE en la figura 20. En el método cromatográfico se utilizó una columna RP-C₁₈ 150 mm x 4,6 cm x 5 µm (X-terra), detector espectrofotométrico con DAD, longitud de cuantificación de 298 nm, la fase móvil utilizada fue agua/metanol (1:3), flujo de 1,2 mLmin⁻¹, volumen de inyección de 50 µL, temperatura del horno de 28 °C y tiempo de análisis de 18 minutos.

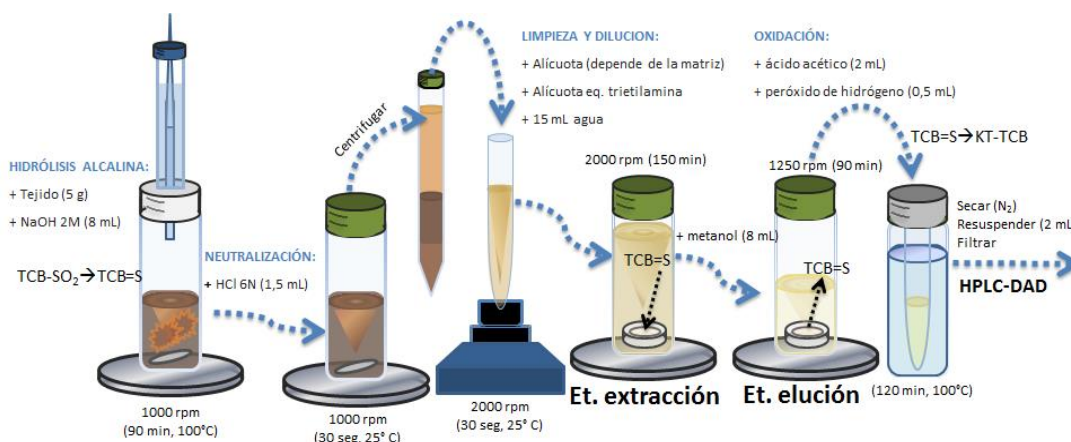


Fig 20. Esquema del método RDSE propuesto para la cuantificación TCB total como KT-TCB proveniente de la hidrólisis alcalina y oxidación de muestras de tejido bovino fortificado con TCB-SO₂.

El método considera un factor de dilución diferente en cada matriz, utilizándose como curva de calibración única para las cuatro matrices un rango de 100 – 1000 ngmL⁻¹ para los estándares de KT-TCB y rangos que incluyan el LMR particular para las matrices fortificadas de músculo, hígado, riñón y grasa de bovino respectivamente con TCB-SO₂. (Figura 21)

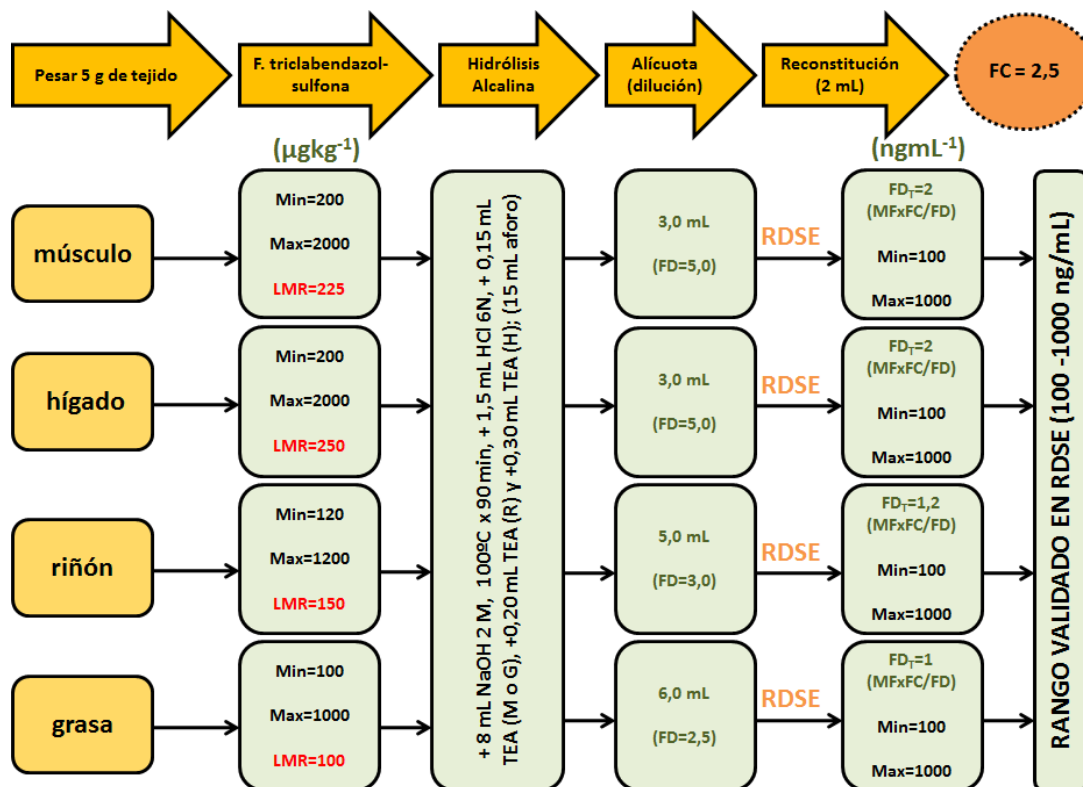


Fig 21. Sistema alícuotas y diluciones del método RDSE propuesto para TCB en tejidos; (LMR) = Límite máximo residual la matriz, (MF) = Muestra Fortificada, (FC) = Factor de Concentración y (FD_T) = Factor de dilución total aplicado a la muestra.

4.5.3 Determinación de fármacos residuales en leche.

4.5.3.1 Enrofloxacin, oxitetraciclina, sulfadoxina y trimetoprima.

En la etapa de extracción con disco rotatorio se utilizaron discos con 50 mg de estireno-divinilbenceno para muestras provenientes de leche entera, previamente tratada mediante un buffer compuesto por ácido cítrico, EDTA y tricloroacético, la solución resultante se acidifica con 3 gotas de ácido clorhídrico 6N, se centrifuga a 4400 rpm por 5 minutos a 4 °C y el sobrenadante es diluido con 5 mL de agua para ser tratado mediante RDSE (Figura 22). Para el método cromatográfico se utilizó una

columna RP-C₁₈ de 250 mm x 4,6 cm x 5 µm (Symmetry), detector espectrofotométrico con DAD (260 - 380 nm en la identificación) y 280 nm para la cuantificación simultánea de OTC, 4E-OTC, EFX, CFX, SDX y TMP en el rango 50-300 µgKg⁻¹ que contiene los LMR de cada especie analizada respectivamente. La fase móvil utilizada fue ácido trifluoroacético 0,2%/metanol/acetonitrilo (20:3:2), flujo de 1,0 mLmin⁻¹, volumen de inyección de 100 µL, temperatura del horno de 35 °C y tiempo de análisis de 30 minutos.

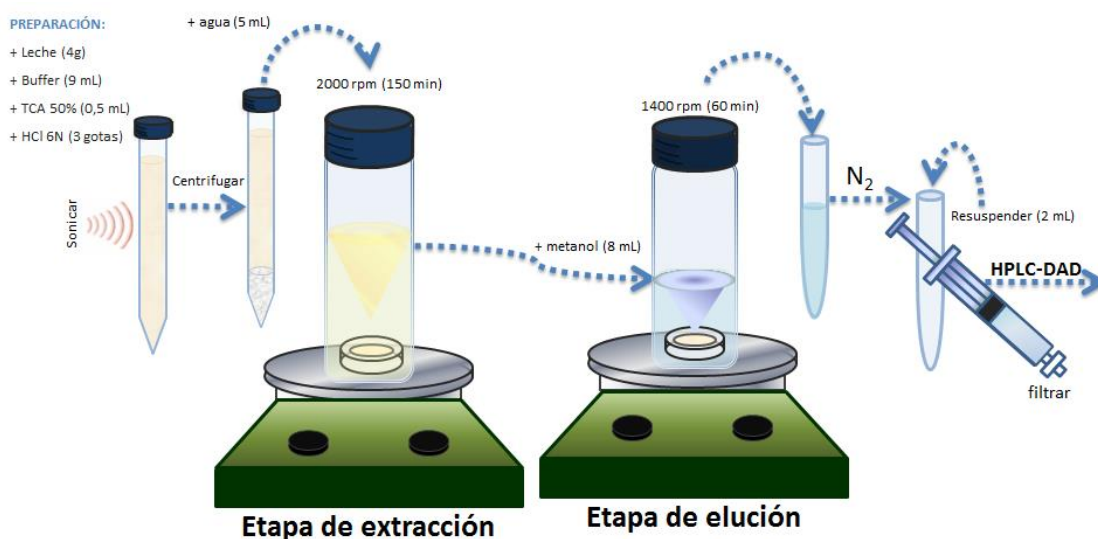


Fig 22. Esquema del método RDSE para la cuantificación simultánea de los antibióticos OTC, 4E-OTC, EFX, CFX, SDX y TMP en leche bovina.

4.5.3.2 Closantel.

Al igual que en el caso de los antibióticos en leche, en el caso del antiparasitario Closantel para la etapa de extracción se utilizaron discos con 50 mg de estireno-divinilbenceno y muestras compuestas por leche entera, a la que se le agrega 4 mL de una mezcla metanol/acetona (1:3) para extraer el analito (liposoluble) y luego es centrifugada a 4400 rpm por 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante orgánico se le agregan 15 mL de agua, disminuyendo su solubilidad respecto a la porción orgánica de la primera etapa, para luego realizar la extracción y clean-up con RDSE. Para el método cromatográfico se utilizó una columna RP-C₁₈ 150 mm x 4,6 cm x 5 µm (X-terra), un detector de fluorescencia (335 nm de excitación y 510 nm de emisión). La fase móvil utilizada fue ácido trifluoroacético 0,2%/acetonitrilo (3:7), flujo de 1,2 mLmin⁻¹, volumen de inyección de 50 µL, temperatura del horno de 25 °C y tiempo de análisis de 7 minutos.

4.5.4 Lincomicina y espectinomicina.

4.5.4.1 Determinación de lincomicina y espectinomicina en plasma.

Para metodología RDSE se utilizaron discos con 50 mg de e-DVB y alícuotas plasma de porcino de 500 μL . Para el método cromatográfico se utilizó una columna RP-C₁₈ HRes 50 mm x 2,7 cm x 1,9 μm (Browlee), la fase móvil fue ácido heptanofluorobutírico 10 mM /acetonitrilo (73:27), flujo de 0,22 mLmin⁻¹, volumen de inyección de 20 μL y tiempo de análisis de 2,5 minutos. Se utilizó una fuente de ionización ESI (+) con 3,5 kV aplicado en el cilindro, 2,5 kV aplicados en el “endplate” y 4 kV en la entrada del capilar. El espectrómetro consiste en un analizador por tiempo de vuelo (TOF) a 3,6 kV aplicado en el detector, para realizar la cuantificación se monitorearon los iones $m/z = 407,2210$ y $356,1752$ (Figura 23).

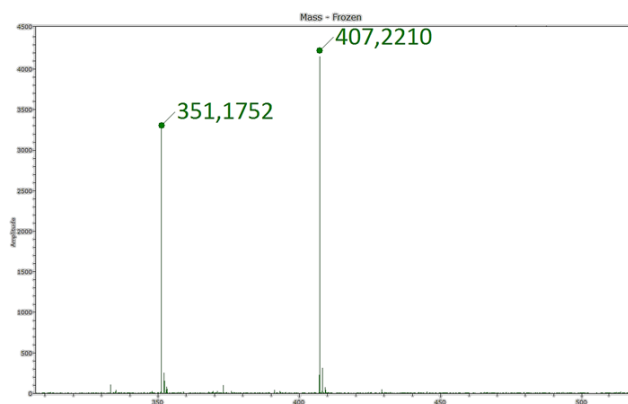


Fig 23. Iones m/z [espectinomicina- H_3O^+] y [lincomicina- H^+] por ESI (+) con detector TOF.

4.5.4.2 Determinación de lincomicina y espectinomicina residuales en tejidos de cerdo.

Para metodología RDSE se utilizaron discos con 50 mg de e-DVB para extractos provenientes de la extracción por solvente acelerada (ASE) utilizando agua a 100 °C y en una celda de 10 mL, para una cantidad de tejido liofilizado (Músculo, Hígado, riñón o grasa de cerdo) equivalente a 2 gramos de tejido original. Desde abajo hacia arriba, en la celda se dispuso un filtro de fibra de vidrio de 14 mm, 6 g de diatomea, la muestra y finalmente 2 g de tierra diatomea. Al extracto se le agrega HFBA 0,5 M (5 mL) para llevar a cabo la extracción con RDSE (Figura 24). Se utilizaron las condiciones cromatograficas (UHPLC), de ionización (ESI) y del analizador (TOF), descritas en la metodología de lincomicina y espectinomicina en plasma de cerdo.

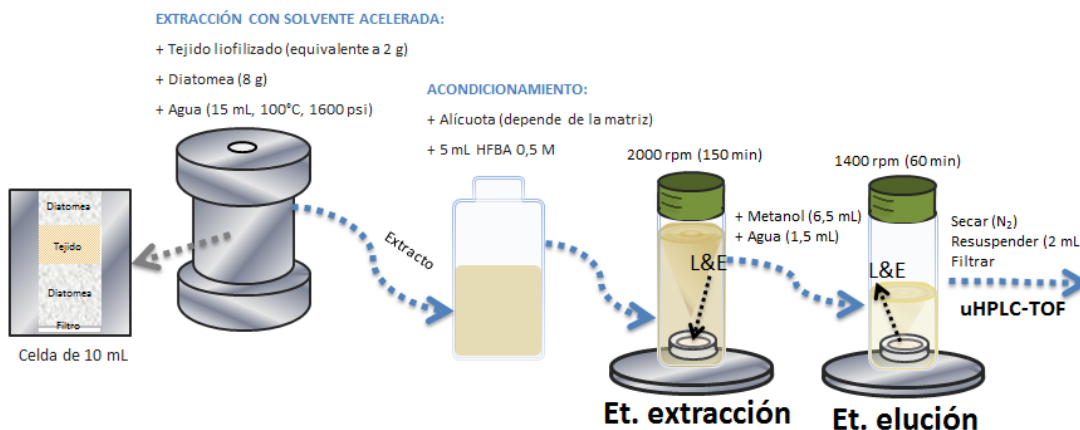


Fig 24. Esquema del método RDSE para la cuantificación simultanea de lincomicina y espectinomicina en tejidos de cerdo.

El método considera un factor de dilución diferente en cada matriz, utilizándose como curva de calibración única para las cuatro matrices un rango de 25 – 1000 ngmL⁻¹ para lincomicina y 150 – 3000 ngmL⁻¹ para espectinomicina ngmL⁻¹, los rangos que contienen LMR particular para cada matriz. (Figura 25)

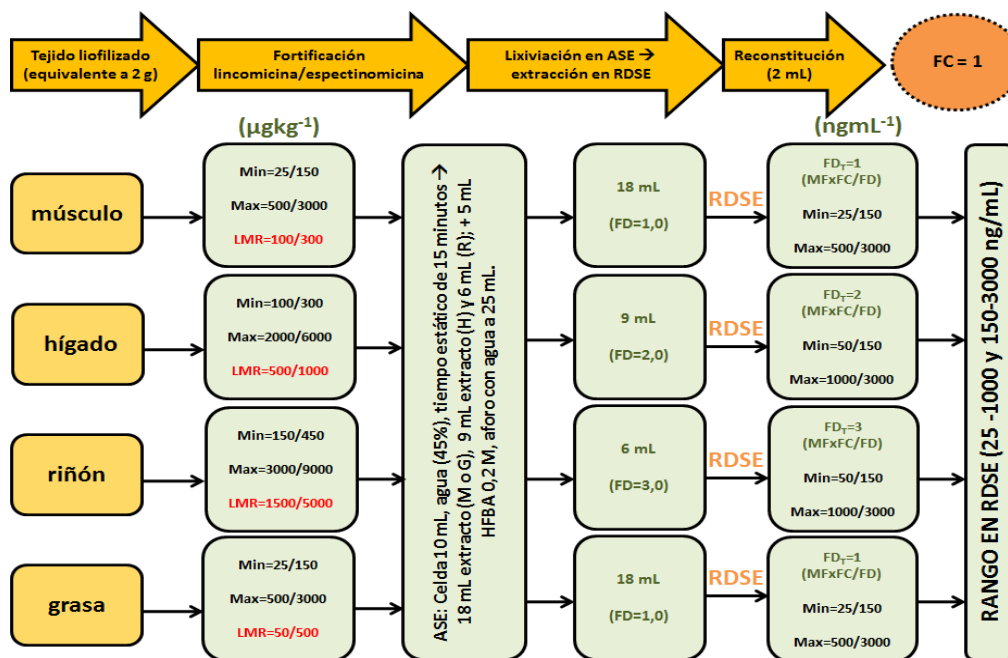


Fig 25. Sistema alícuotas y diluciones para lincomicina y espectinomicina en tejidos; (LMR) = Límite máximo residual la matriz, (MF) = Muestra Fortificada, (FC) = Factor de Concentración y (FD_T) = Factor de dilución total aplicado a la muestra.

4.6 Método de validación.

Los parámetros analíticos evaluados se definen según la terminología definida en la guía VICH GL1 ⁽³⁴⁾. Cada metodología desarrollada está validada según los criterios y recomendaciones de la guía VICH GL2 ⁽³⁵⁾ y VICH GL49 ⁽³⁶⁾, que son las guías competentes y oficiales para verificar parámetros de calidad analítica de un método desarrollado para la cuantificación de residuos en matrices de origen animal.

A continuación se definen y contextualizan los parámetros más significativos, abordando la expresión de resultados, donde los cálculos se realizan mediante la aplicación ORIGIN PRO 8 (OriginLab®, Northampton, Massachusetts, USA)

4.6.1 Linealidad del sistema: Curva de estándares.

Este parámetro expresa la capacidad del sistema de entregar una señal que sea directamente proporcional a la concentración del analito dentro de un rango determinado. Se incluye el equipo cromatográfico (inyector, bombas detector, etc), pero además como RDSE es un método de extracción basado en el equilibrio entre la muestra en solución y la fase sorbente, se incluye la etapa de extracción de los estándares (en ausencia de la matriz) como parte del sistema de calibrado.

- Diseñar una curva de calibración de estándares, añadiendo la alícuota equivalente a la concentración esperada en el vial de inyección.
- Utilizar al menos cinco niveles de concentración uniformemente distanciados para construir la curva con tres inyecciones por cada nivel de concentración.
- Realizar la regresión lineal y determinar la ecuación de la recta, determinando pendiente (m), intercepto (n) y el coeficiente de correlación (R^2).

4.6.2 Linealidad del método: Curva con matrices fortificadas.

Este parámetro expresa la linealidad entre la respuesta de la concentración del analito en presencia de la matriz, es decir la recuperación y linealidad del método en presencia de la matriz, considerando las diluciones y/o concentraciones en cada una de las etapas de procesamiento. El rango debe cubrir la concentración esperada en las muestras y debe ser capaz de medir con exactitud y precisión hasta la concentración del límite máxima residual (LMR) establecida en cada matriz en el caso de los métodos desarrollados para residuos y debe ser capaz medir con exactitud y precisión hasta la concentración inhibitoria mínima (CIM) respectiva en el caso de las muestras de plasma cuyo objetivo son el estudio de la una farmacocinética.

- Preparar una curva de calibración de la matriz fortificada en al menos cinco niveles, considerando el factor de concentración (FC) y/o factor de dilución (FD) para que estas se encuentren dentro en el rango lineal de calibración.
- Realizar la regresión lineal y determinar la ecuación de la recta, determinando pendiente (m), intercepto (n) y el coeficiente de correlación (R^2).
- Para determinar la linealidad utilizando la suma de los cuadrados de los residuos conviene realizar el test F (La prueba estadística que se utiliza para determinar si los datos se ajustan a la ley) ⁽³⁷⁾, que relaciona la suma de los cuadrados medios (SCM) del modelo y los residuos, donde para un nivel de confianza del 95%, se debe cumplir que $SCM_{\text{modelo}} > SCM_{\text{residuos}}$ para asegurar que los datos se comportan linealmente. Adicionalmente se puede expresar la probabilidad “pF” conocida como p_{value} que está asociada al valor de F y se considera que la prueba de linealidad es aceptada si $p_{\text{value}} < 0,05$.
- Adicionalmente un gráfico de los residuos del modelo entrega información visual de la pérdida de linealidad, residuos con una distribución al azar y homocedástica en la varianza (normalidad de la varianza entre réplicas y a distintos niveles) son los esperados en un rango lineal, mientras que la pérdida de linealidad entrega un gráfico de residuos con tendencia y diferencia significativa entre la varianza entre niveles y las réplicas.

4.6.3 Límite de cuantificación y detección (LC y LD).

El Límite de Cuantificación (LC) expresa la menor concentración del analito presente en la matriz que puede ser cuantificada con exactitud y precisión. Por su parte el Límite de Detección (LD) expresa la menor concentración del analito presente en la matriz, que puede ser detectada pero no cuantificada con exactitud y precisión.

- Realizar una curva de fortificados en un rango cercano al límite de detección observable (mínima concentración que presenta señal distinguible) y determinar la ecuación de la recta, determinando pendiente (m), intercepto (n) y el coeficiente de correlación (R^2).
- Calcular los LC y LD como se muestra en las ecuaciones 8 y 9:

$$\text{(ec. 8) } LC = 10 \times SD_{\text{curva}} / \text{pendiente de la curva}$$

$$\text{(ec. 9) } LD = 3,3 \times SD_{\text{curva}} / \text{pendiente de la curva}$$

4.6.4 Selectividad

Este parámetro expresa la capacidad del método para medir y diferenciar el analito de interés en presencia de componentes endógenos que podrían afectar la medición de las muestras.

- Usar al menos 6 fuentes individuales de matriz blanco.
- Se considera “ausencia de interferentes” si la señal interferente es menor al 20% del área promedio del límite inferior de cuantificación (LIC), es decir el primer nivel de la curva de fortificados.
- Para expresar la selectividad como un valor porcentual (%) que dé cuenta del grado de selectividad, en el presente trabajo se propone la expresión como un índice de selectividad (ecuación 10). Es decir, para blancos de matriz con un 0% de área relativa respecto al LIC, la selectividad será un 100%, mientras que para blancos que presenten un 20% de área de “interferentes” en el blanco de matriz, la selectividad será de un 80%. El método se considerara selectivo con un índice e selectividad $\geq 80\%$.

$$(ec. 10) \text{ Índice de selectividad (\%)} = 100 - (\text{Área blanco matriz} / \text{Área LIC}) \times 100$$

4.6.5 Exactitud.

Este parámetro expresa el grado de concordancia entre el valor aceptado como verdadero (concentración teórica) y el valor medido experimentalmente (concentración experimental). La exactitud se relaciona con el error sistemático del procedimiento experimental y la recuperación frente a la respuesta de una curva de calibrado del analito de interés.

- Cuantificar en un mismo día un mínimo de tres muestras fortificadas a un nivel bajo (B), tres muestras a un nivel medio (M) y tres a un nivel alto (A).
- Calcular la recuperación y expresar la magnitud de la exactitud en exceso (+%) o defecto (-%). Rangos de aceptación en la tabla 2:

Tabla 2. Rangos de aceptación para la exactitud según VICH GL49

Concentración del analito	Rango de exactitud aceptable
$\geq 10 \mu\text{gkg}^{-1} < 100 \mu\text{gkg}^{-1}$	-30 % a +10 %
$\geq 100 \mu\text{gkg}^{-1}$	-20 % a +10 %

4.6.6 Precisión.

Este parámetro expresa el grado de dispersión de una serie de medidas realizadas en un mismo día de análisis (Repetibilidad), una ampliación que resulta más interesante para evaluar a la vez la robustez del proceso es la precisión intermedia (Repetitividad) en que se debe evaluar la dispersión de una serie de medidas realizadas en días de análisis distintos.

- Para un mínimo de tres muestras fortificadas a un nivel bajo (B), tres muestras a un nivel medio (M) y tres a un nivel alto (A), procesadas e inyectadas en tres días distintos.
- Calcular el coeficiente de variación (CV) para cada nivel de concentración (CV_B , CV_M y CV_A), el criterio de aceptación para la precisión en un mismo día de análisis es un $CV \leq 10\%$ y entre días es un $CV \leq 16\%$.

4.6.7 Estabilidad de las muestras almacenadas.

Se mide la estabilidad del principio activo en tejidos biológicos en función de las condiciones de manejo y almacenamiento de las muestras para la aplicación de método desarrollado en la aplicación en muestras reales. Para esto, se debe validar la exactitud y precisión del ensayo sobre muestras en que deben simularse los tiempos y número etapas de congelación y descongelación en las condiciones en que se realizará el muestreo y procesamiento de las muestras en el ensayo con animales. Entonces el protocolo debe considerar el periodo de muestreo, tiempo de sacrificio, faenamiento, tiempo y temperatura de traslado de las muestras, temperatura de almacenamiento, descongelación, molienda de los tejidos, congelación, liofilización y almacenamiento para su posterior análisis.

- Fortificar por triplicado muestras a un nivel bajo (B_{3S}) y alto (A_{3S}) de la curva, realizar los ciclos de congelación y descongelación considerados en el protocolo que se aplicara en el ensayo con animales, almacenar las muestras durante 4 semanas (4S) a -20°C , descongelarlas para su procesamiento y análisis con el método desarrollado.
- Las muestras deben cumplir con los parámetros de exactitud y precisión.

4.7 Método de análisis de muestras reales.

La planificación, realización y análisis de los estudios de farmacocinética y depleción de residuos se realizaron de acuerdo a las recomendaciones del Servicio Agrícola Ganadero (SAG), quienes aprueban utilizar las recomendaciones de las guías oficiales de la VICH (Cooperación internacional para la armonización de los requisitos técnicos para el registro de medicamentos veterinarios) y la EMA (Agencia europea de medicamentos) para así certificar la validez de los resultados para los estudios realizados en Chile.

4.7.1 Estudios de farmacocinética

Para un diseño adecuado del estudio debe determinarse adecuadamente la Concentración Mínima Inhibitoria 90 (CIM₉₀) para cada patógeno, entendiéndose como tal a “la menor concentración de antimicrobiano necesaria para impedir o inhibir el crecimiento bacteriano (in vitro) del 90% de las cepas estudiadas, en un ensayo de laboratorio utilizando la técnica de dilución”. Entonces, el estudio farmacocinético debe modelar la concentración plasmática del fármaco (μgml^{-1}), obtenida al administrar el medicamento en una dosis, pauta horaria y vía de administración propuesta. Se pueden evaluar parámetros de interés como el tiempo que permanece el fármaco sobre la CIM₉₀ ($T > \text{CIM}_{90}$), concentración máxima (C_{max}), tiempo en alcanzar dicha concentración (T_{max}), separación entre la C_{max} y la CIM₉₀ ($C_{\text{max}}/\text{CIM}_{90}$) y área bajo la curva (AUC). ⁽³⁸⁻³⁹⁾

A través de los parámetros farmacocinéticos y relaciones entre ellos, puede evaluarse el impacto que tiene modificaciones en la formulación sobre la eficacia del fármaco.

Para el caso de los antimicrobianos, estos pueden clasificarse en dos grupos:

- **Concentración dependiente:** El efecto terapéutico se incrementa a medida que aumenta la concentración del antimicrobiano por sobre el CIM.
Ej: Aminoglucósidos, fluoroquinolonas, penicilinas.
- **Tiempo dependiente:** El efecto terapéutico se ejerce cuando existen concentraciones ligeramente sobre la CIM, que puede o no persistir en el tiempo.
Ej: Menos persistentes: Betalactámicos (Amoxicilina), eritromicina, florfenicol.
Efecto prolongado: Tetraciclinas.

A través de la farmacocinética evaluarse los índices de eficacia (Figura 26):

- Coeficiente de inhibición: Relación entre la concentración plasmática máxima (C_{max}) y la CIM₉₀. Se sugiere como valor aceptable ≥ 10 .
- AUC/MIC: Relación entre el área bajo la curva y la concentración mínima inhibitoria (CIM₉₀). Se sugiere como valor aceptable ≥ 125 .
- T>MIC: Intervalo posológico durante el cual los niveles plasmáticos del antimicrobiano están sobre la CIM₉₀. Se sugiere como valor aceptable $\geq 50\%$

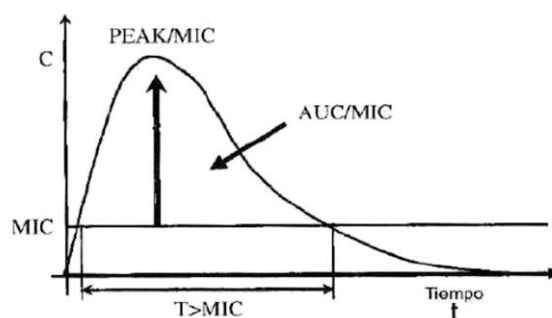


Fig 26. Perfil farmacocinético típico para un modelo no compartimental en que se grafican los principales índices de eficacia. ⁽⁴⁰⁾

Para protocolizar el manejo, alojamiento, método de dosificación y selección de los animales para el estudio, se utilizaron las siguientes guías oficiales:

- VICH-GL9. “Good Clinical Practice”. 2000.
- EMEA/CVMP/133/99. 2000. “Guidelines for de conduct of pharmacokinetic studies in target animal species”.
- EMEA/CVMP/016/00. 2011. “Guidelines for de conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal products”.

Para el análisis de los resultados, se obtuvieron las concentraciones plasmáticas para seis animales ($n=6$) por cada estudio. Los datos fueron promediados, y expresados junto a su desviación estándar. Se utiliza un método no compartimental en el programa computacional PK solutions 2.0. Se calcula la C_{max} y T_{max} directamente, la AUC se calcula desde el tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo (0-t), utilizando el método de los trapezoides.

En el caso de la bioequivalencias se establecen considerando los parámetros farmacocinéticos de C_{max} y AUC_{0-t} , realizando una prueba de t-Student con una confianza del 95% y una significancia de 0,05.

4.7.2 Estudios de depleción de residuos.

El objetivo de un estudio de depleción de residuos es determinar el “período de resguardo” para un producto farmacéutico de uso veterinario de formulación y dosificación establecida. El período de resguardo se define como el tiempo que debe transcurrir entre la última administración del producto farmacéutico de uso exclusivamente veterinario, en las condiciones recomendadas en su rotulado, y la obtención de productos alimenticios de dicho animal (carne, leche, huevos, etc.), con el fin de proteger la salud pública y de garantizar que dichos productos alimenticios no contengan residuos (principios activos o sus metabolitos) en cantidades que superen los LMR.

Dependiendo de la especie animal, se recomienda de 4 a 10 animales por punto de muestreo, la FDA sugiere proporcionar datos de al menos 20 animales, es decir por ejemplo con 4 animales que son sacrificados en cada uno de los 5 puntos de tiempo distribuidos uniformemente.

Los animales del estudio deben estar sanos y ser representativos de las razas comerciales y de la población animal de destino que será tratada con el producto.

La estimación del periodo de resguardo se realiza por regresión lineal utilizando los resultados del estudio de residuos. Se debe determinar el límite de tolerancia superior, estimado con una confianza determinada, por debajo del LMR. Si este punto de tiempo no corresponde a un día completo, el tiempo de espera debe ser aproximado al día siguiente. Los cálculos pueden ser realizados con un 95% del límite de tolerancia superior (Figura 27).

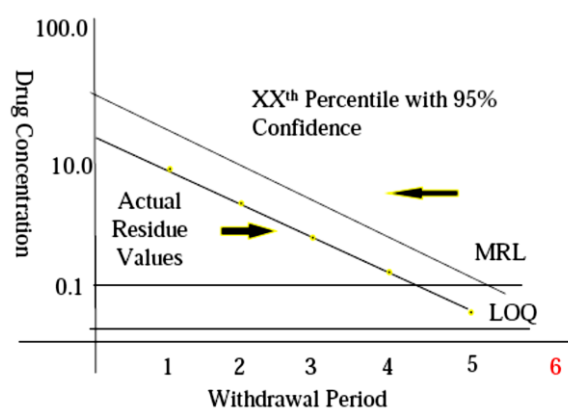


Fig 27. Curva de residuos, se indica LMR, LC del método y 95% de confianza para los datos. ⁽⁴⁰⁾

Para protocolizar el manejo, alojamiento, método de dosificación, selección y sacrificio de los animales para el estudio, se utilizaron las siguientes guías oficiales:

- AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. American Veterinary Medical Association.
- EMEA/CVMP/036/95 – Note for Guidance: Approach towards Harmonisation of Withdrawal Periods for Meat.
- EMEA/CVMP/563/02 – Updated Application Software relating to Note for Guidance on Approach towards Harmonisation of Withdrawal Periods for Meat.
- Guía de aplicación de la regulación (EEC) N° 2377/90, Volumen 8: Notice to applicants and Guideline – Veterinary Medicinal Products – Establishment of Maximum Residue Limits (MRLs) for residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, part III-B
- VICH GL9. Good Clinical Practices. 2000.
- VICH GL48. Metabolism and Residue Kinetics: Studies to evaluate the Metabolism and Residue Kinetics of Veterinary Drugs in Food-producing Animals: Marker Residue Depletion Studies to establish Product Withdrawal Periods.

Para los estudios en bovinos se establecieron cinco puntos de muestreo, posteriores al tratamiento, en cada uno se sacrificaron cuatro animales, para un total de 20 animales por estudio. El sacrificio se realizó insensibilizando mediante un disparo al encéfalo (Figura 28). Posterior a la verificación de la correcta insensibilización, por ausencia de reflejo palpebral, midriasis simétrica arreactiva y ausencia de dolor profundo, se procede a la exanguinación por incisión del paquete vascular cervical, con un tiempo mínimo de sangrado de cuatro minutos.

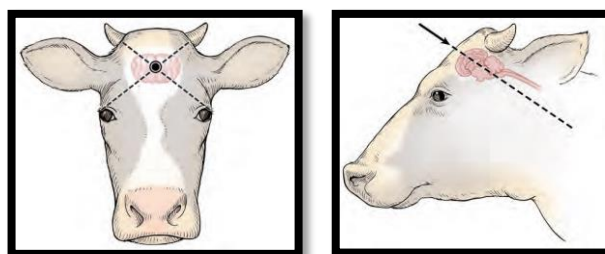


Fig 28. Ubicación anatómica del cerebro para insensibilización mecánica.

Para el estudio florfenicol inyectable se extrajo el punto de inyección (PI_{core}), utilizando una guía de cartón de 15 cm de diámetro, posteriormente se retiró un círculo concéntrico al anterior (PI_{peri}) de aproximadamente 3 cm de ancho, luego se obtuvieron aproximadamente 500 g de lomo, se extrajeron los riñones completos, cortes longitudinales de cada lóbulo hepático. En el caso del estudio de triclabendazol oral se obtuvieron 500 g de lomo, los riñones completos, cortes longitudinales de cada lóbulo hepático y grasa perirenal completa.

Las muestras fueron depositadas en bolsas con cierre hermético, y almacenadas en una caja de poliestireno expandido, en las que fueron enviadas vía Chilexpress al laboratorio de análisis cromatográfico de Veterquímica en Cerrillos, Santiago, lugar donde se procesaron con un homogeneizador “Silent crusher M” (Heidolph®), y se separaron en 5 bolsas debidamente rotuladas, para ser congeladas a -80 °C.

Para los estudios de depleción de florfenicol y triclabendazol en bovinos, los resultados fueron analizados por regresión, utilizando el programa computacional Withdrawal Time Calculation (WT 1.4) de libre acceso mediante el sitio web de la EMA, método armonizado en la Unión Europea para el cálculo del período de resguardo en tejidos de consumo humano, considerando un límite de confianza de 95% y los LMRs establecidos por la EMA (Tabla 3).

Tabla 3. LMR de la EMA para florfenicol y triclabendazol en bovinos

Fármaco	Residuo marcador	Matriz	LMR (μgKg^{-1})
Florfenicol	Suma de florfenicol y metabolitos expresados como florfenicol-amina	Músculo	200
		Hígado	3000
		Riñón	300
Triclabendazol	Suma de residuos extraíbles y oxidables a la forma keto-triclabendazol	Músculo	225
		Hígado	250
		Riñón	150
		Grasa	100

V. Resultados y discusión.

A continuación se describen los resultados obtenidos para las etapas de desarrollo, optimización, validación y aplicación de las metodologías propuestas para los distintos sistemas (analito-matriz). Los resultados son presentados de manera cronológica, para evidenciar la utilización de las observaciones y conclusiones obtenidas durante el proceso de desarrollo de cada aplicación de la técnica RDSE.

Se inició con florfenicol en plasma, seguido por su determinación como florfenicolamina en residuos. Los metabolitos de triclabendazol en plasma, sucedida por su determinación en residuos expresados como keto-triclabendazol. En la matriz leche, la determinación simultánea de oxitetraciclina, enrofloxacino, sulfadoxina y trimetoprima, seguida de closantel. Finalmente, lincomicina y espectinomicina en plasma, finalizando con su determinación en residuos.

El orden de los resultados, junto a las características técnicas más relevantes de cada metodología se describe mediante el siguiente diagrama de resultados (Figura 29):

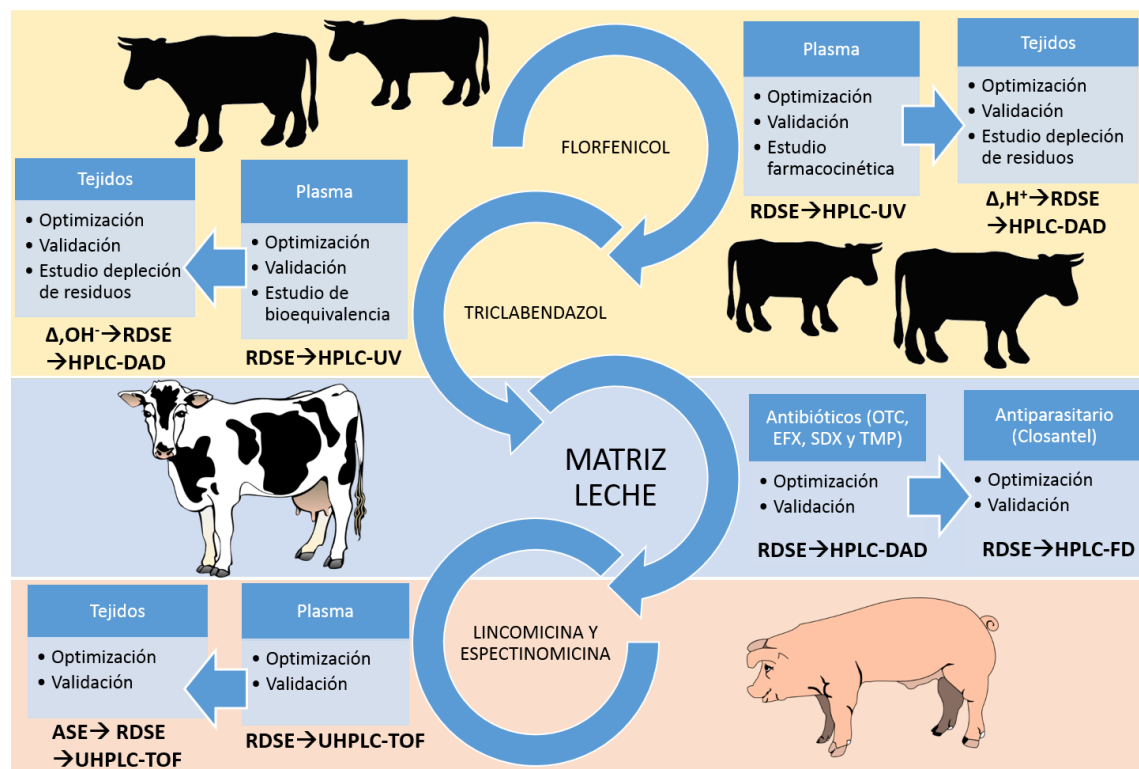


Fig 29. Diagrama de resultados (En el orden en que se desarrolló la tesis).

5.1 Florfenicol.

5.1.1 Determinación florfenicol en plasma.

Para implementar la metodología RDSE en plasma de bovinos, se utilizó como base las condiciones obtenidas en la optimización de la metodología RDSE desarrollada para FF en plasma de porcinos en la Unidad de Investigación, anterior a la presente investigación. Para el caso antes mencionado, el estudio de pH mostró una menor variabilidad y en el rango con mayor recuperación para 45 minutos de extracción para un pH de 3,2 (Figura 30).

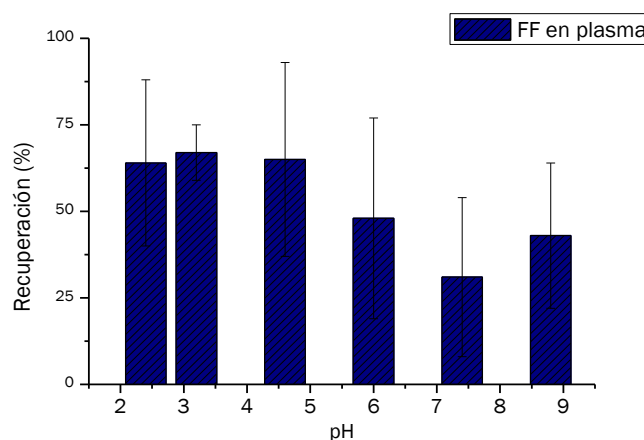


Fig 30. Efecto del pH para 45 min de extracción de FF en plasma porcino (n=3).

Otra modificación a la metodología desarrollada para plasma porcino fue la de la alícuota de plasma. En caso de los bovinos la CIM₉₀ para FF es 0,5 µg mL⁻¹ mientras que en porcinos es 1000 ng mL⁻¹, de modo que un método en plasma de bovinos debe considerar una mayor sensibilidad para cuantificar con exactitud hasta el 50% de CIM₉₀ y así describir adecuadamente la farmacocinética. Se modificó entonces la alícuota utilizada en porcinos (250 µL de plasma) por 400 µL plasma en bovinos, reduciendo el factor de dilución del método desde FD=8 a FD=5.

La segunda modificación para la aplicación del método en plasma bovino, fue que se observó una mayor capacidad tamponante del plasma bovino (pH 7,5), que el producido por el plasma porcino en los estudios preliminares, de modo que para mantener el pH en un rango óptimo para la extracción de FF con HLB® fue necesario incrementar la concentración del buffer fosfato desde 5 a 20 mM.

Se determinaron los perfiles de extracción para soluciones de 15 mL de buffer a pH=3 (20 mM), se comparó la extracción de plasma de bovino fortificado al nivel medio de la curva ($1250 \mu\text{g mL}^{-1}$) y soluciones fortificadas únicamente con el estándar, utilizando una velocidad de agitación de 2000 rpm, con una elución mediante 8 mL de acetona durante 60 minutos a 1000 rpm. Mediante estas condiciones se llega al equilibrio aproximadamente a los 90 minutos de extracción (Figura 31), se observan los cromatogramas representativos en la Figura 32.

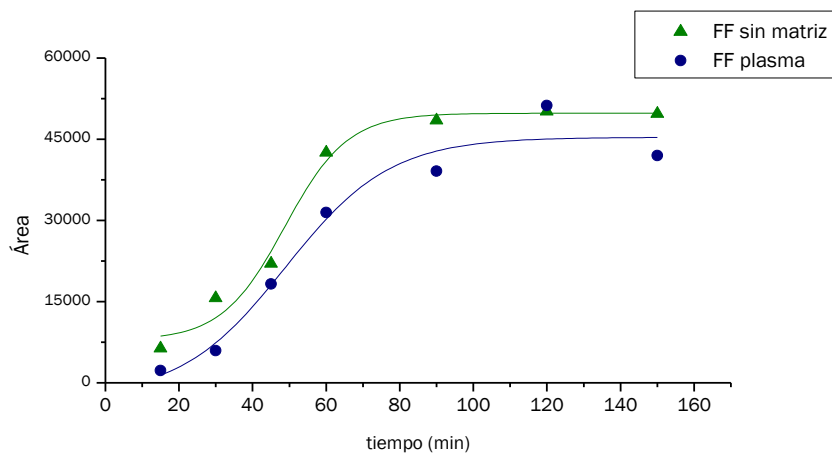


Fig 31. Comparación perfil de RDSE para FF sin matriz y en plasma ($1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$).

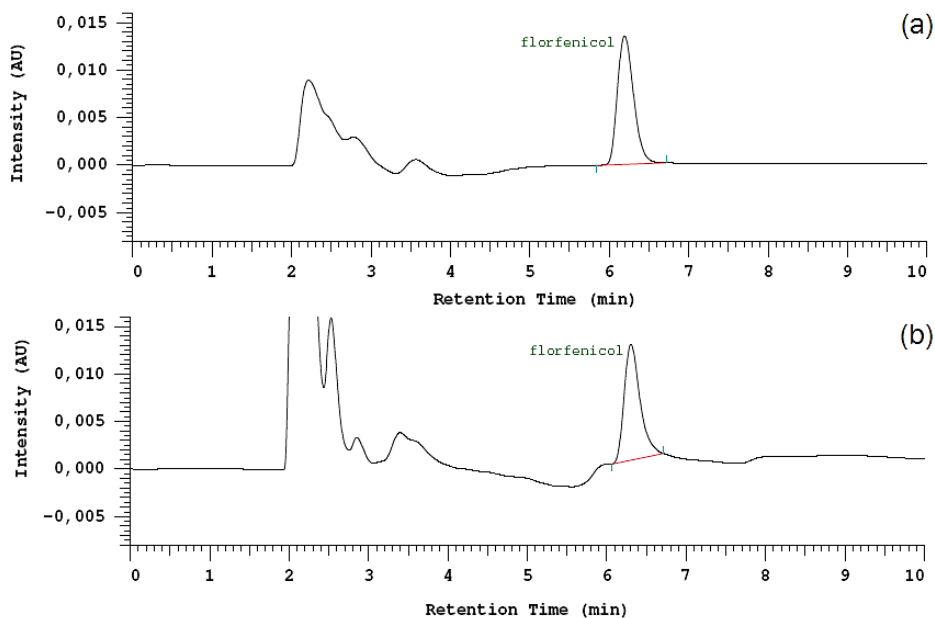


Fig 32. Cromatogramas de florfenicol en plasma bovino; (a) RDSE para estándar FF ($0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$); (b) equivalente RDSE con plasma fortificado a $2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FF (FD=5); ambos para 90 minutos de extracción (2000 rpm) y 60 minutos de elución (1000 rpm).

Se realizó la validación de la metodología propuesta utilizando 100 minutos para el tiempo de extracción y 60 minutos para el tiempo de elución, la metodología propuesta alcanzó una buena correlación para las muestras de plasma fortificadas en el rango 0,25 a 2,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FF en plasma bovino con una distribución homocedástica para los residuos (Ver figuras 33 y 34) de lo que se desprende adecuada linealidad en el rango estudiando, además se cumplen los parámetros analíticos de la validación (Tabla 4).

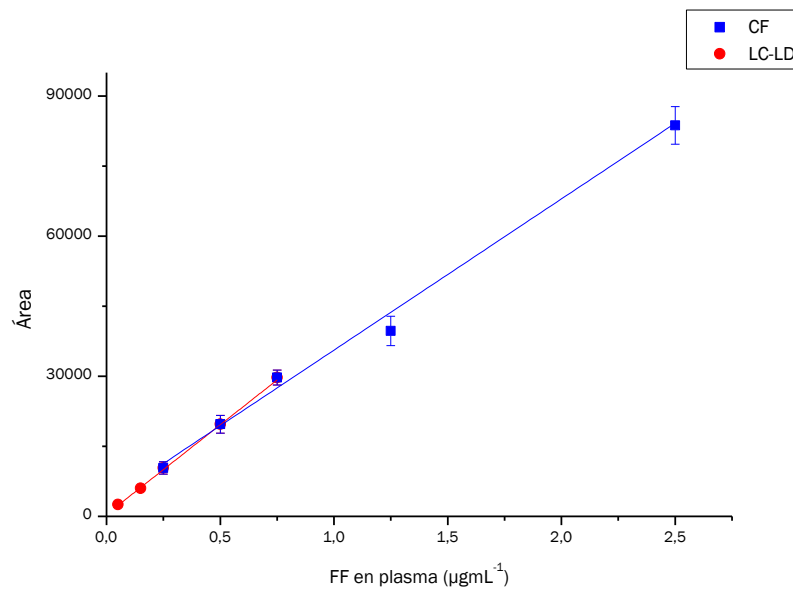


Fig 33. Curva de fortificados (CF) para FF en plasma de bovinos (0,25-2,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y curva para la determinación del LC-LD (0,05-0,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

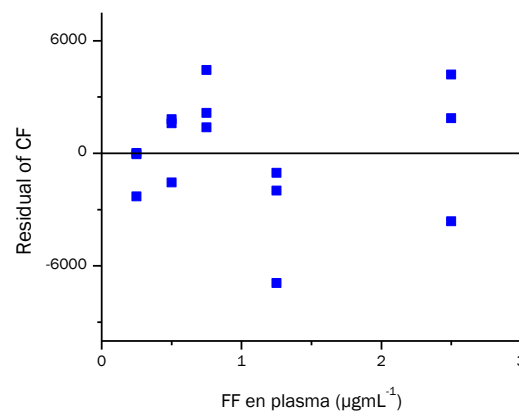


Fig 34. Distribución de los residuos para la CF de FF en plasma de bovinos

Tabla 4. Resultados de la validación de la metodología RDSE para FF en plasma de bovinos.

	Niveles	Replicas	Resultados
Linealidad estándares	5	3	$y = 190029,3x + 1010,7$ $R^2 = 0,999$ $p_{value} = 6,24 \times 10^{-8}$
Linealidad fortificados	5	3	$y = 32373,5x + 3216,3$ $R^2 = 0,989$ $p_{value} = 5,07 \times 10^{-4}$
Índice de selectividad	1	6	80,4 %
Límite de cuantificación	5	3	$0,09 \mu\text{g mL}^{-1}$
Límite de detección	5	3	$0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$
Exactitud	3	3	(B) +0,6 %
			(M) +1,3 %
			(A) -11,7 %
Precisión intermedia	3	3	(CV _B) 15,8 %
			(CV _M) 12,9 %
			(CV _A) 1,4 %

La metodología propuesta fue utilizada para analizar muestras de plasma provenientes de un estudio de farmacocinética del producto comercial Duflosan (inyectable florfenicol al 30%) en seis bovinos (n=6) y 12 tiempos de muestreo. Las concentraciones sobre el rango de la curva se reprocesaron con un FD=10 (Alícuota de plasma 200 μL), los resultados encontrados entre el valor de LC y LD se reemplazaron por LC/2, los valores inferiores al LD se reemplazaron por el valor de LD (Figura 35).

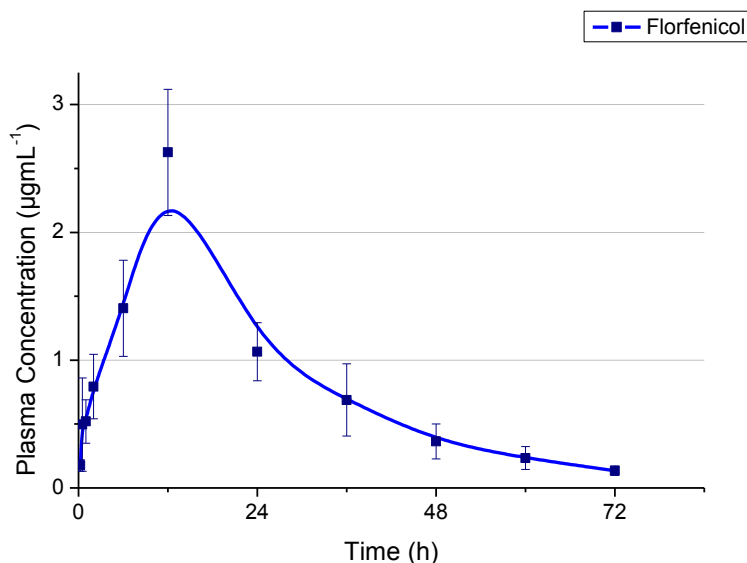


Fig 35. Ensayo farmacocinética florfenicol (Duflosan 30% Veterquímica S.A.) en bovinos (n=6).

5.1.2 Determinación de florfenicol residual en tejidos de bovinos.

Para implementar la metodología RDSE en tejidos de bovinos, se utilizaron algunas de las condiciones experimentales encontradas para la metodología desarrollada previamente en la Unidad de Investigación para FF en hígado de porcinos. Para la extracción del metabolito marcador FFA utilizando HLB® como fase sorbente se encontró un pH óptimo para la extracción alrededor de 12 (Figura 36), que coincide con la zona en que el FFA se encuentra neutro y por lo tanto con su menor polaridad.

Sin embargo, en el caso de la metodología desarrollada para hígado de porcinos, se usa RDSE para una alícuota de 4 mL del extracto, proveniente de 8 mL de la solución resultante de la hidrólisis de 2 g de tejido, que es diluido a 15 mL para la extracción con el disco. Estas condiciones no fueron aplicables a músculo de bovino, debido a que esta matriz presenta interferentes para la medición por HPLC-UV (Figura 37).

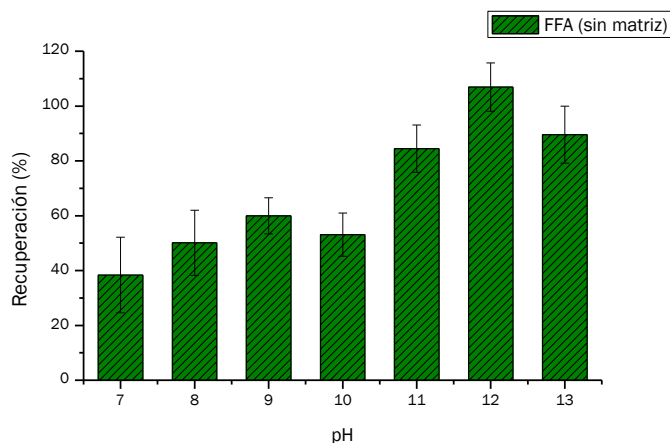


Fig 36. Influencia del pH en la Extracción con RDSE (120 minutos) de FFA en solución acuosa.

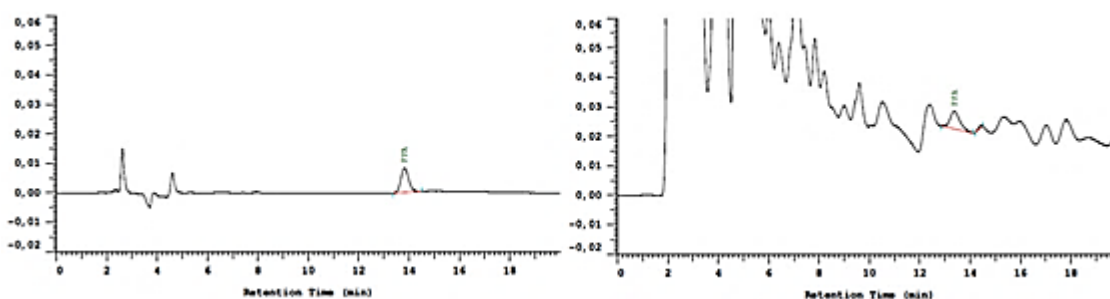


Fig 37. A la izquierda cromatograma estándar FFA extraído mediante RDSE; a la derecha método preliminar (hígado de porcinos) aplicado a una muestra de músculo de bovino fortificada con FF, hidrolizada y extraída por RDSE.

Como estrategia de limpieza (*Clean-up*) se utilizaron disolventes orgánicos de baja polaridad posterior a la etapa de hidrólisis ácida, antes y después de neutralizar. De los disolventes propuestos en la literatura (acetato de etilo, diclorometano y cloroformo), el mejor resultado se obtuvo al utilizar cloroformo antes de neutralizar la muestra, lo que permitió eliminar interferentes de la matriz sin disminuir la recuperación de FFA que en la solución a pH ácido (aprox. 2), ya que se encuentra en su forma protonada. Además se utilizó ácido tricloroacético (TCA) para precipitar proteínas remanentes, aprovechando su solubilidad en disolventes orgánicos este ácido se descarta junto a las proteínas, material carbonizado y cloroformo al centrifugar. Aun cuando no se pudo eliminar la utilización de disolventes orgánicos clorados mediante el RDSE, la cantidad de cloroformo (3 mL) por muestra es significativamente inferior a lo reportado en la literatura (15 mL) ¹⁸.

El sobrenadante se separó por centrifugación y aforó a 10 mL. La solución no se traspasó directamente a la etapa RDSE. A pesar de que el extracto no presenta material en suspensión, los ensayos preliminares mostraron un efecto desfavorable de la matriz en las etapas de extracción/elución, de modo que por ensayos secuenciales se determinó que el efecto de la matriz se ve significativamente anulado al utilizar una alícuota de 2 mL (FD=5, ver figura 38), también se determinó iterativamente que para cada 2 mL de la solución proveniente de la hidrólisis se requiere 1 mL de NaOH 30%, para fines prácticos se añaden 11 mL con buffer fosfato 0,2 M (pH 11), luego la alícuota de muestra hidrolizada y finalmente la alícuota de hidróxido, lo que permite obtener una solución con pH 11-13, en condición favorable para la extracción mediante RDSE-HLB).

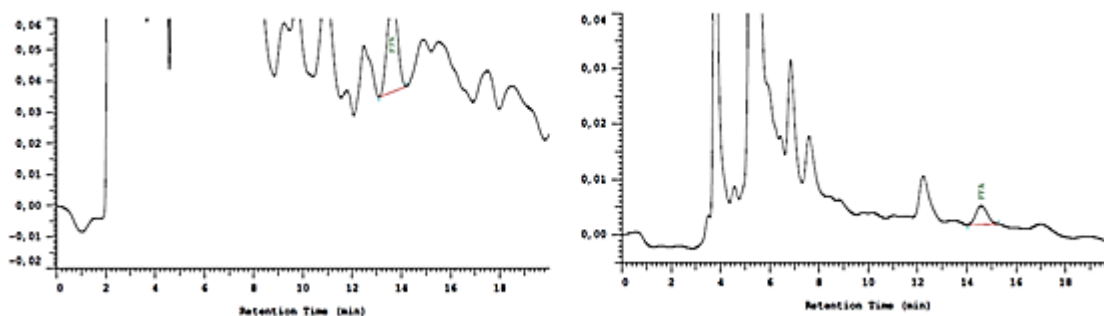


Fig 38. A la izquierda cromatograma de FFA extraído mediante RDSE proveniente directamente de la solución de 10 mL, neutralizada y diluida a 15 mL con buffer pH 11; a la derecha FFA extraído mediante RDSE para una alícuota de 2 mL, neutralizada y diluida a 15 mL con buffer pH 11.

Se realizó el perfil de extracción para comparar la cinética de extracción de FFA en la solución pH 11 y muestras provenientes de la hidrólisis ácida de FF en músculo (Figura 39). Cada muestra de músculo fue de 5 g, de modo que considerando el factor de concentración del método (5 g \rightarrow 2 mL finales) y el factor de dilución (alícuota de 2 mL desde la solución resultante de 10 mL), el método para músculo tiene un factor de dilución total de 2 ($FD_T=2$).

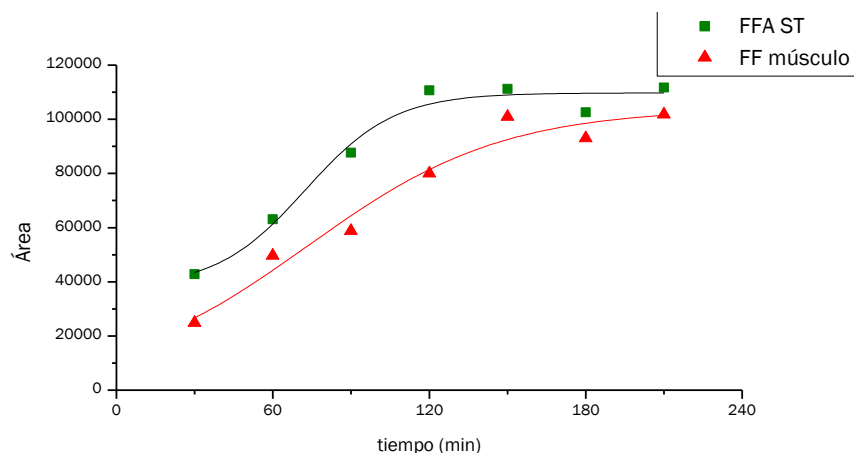


Fig 39. Perfil RDSE FFA estándar (500 ngmL^{-1}) y FF en músculo (1000 µgKg^{-1}) hidrolizado a la forma FFA y tratado mediante RDSE, $FD_T=2$.

Es importante señalar que florfenicol pierde masa molar en la hidrólisis (FF: $358,2 \text{ gmol}^{-1}$; FFA: $238,7 \text{ gmol}^{-1}$), siendo mol equivalente la hidrólisis esto implica que $358,2 \text{ µgKg}^{-1}$ de FF generarán $238,7 \text{ µgKg}^{-1}$ de FFA como respuesta, lo que representa una diferencia en la masa molar del 33,4%. Dado que las concentraciones se determinan en masa del estándar y que la curva de estándares se construye mediante estándares de concentración conocida para FFA, estas deben tener un factor de corrección de 0,66 (aplicado en el estándar intermedio para FFA), de modo que la equivalencia sea directa a la cantidad de FF fortificada en el tejido.

Cabe destacar que en las muestras reales se encontrarán ambas especies (FF y FFA) en distintas proporciones y que se utiliza el FFA proveniente de la hidrólisis como el mesurando de su suma. En el caso de que una muestra contenga un 100% de FF, el método validado dará cuenta de la concentración total de FF en el tejido, mientras que en la situación contraria con un 100% de FFA en la muestra, el método dará cuenta de un 133,4% del FFA del que realmente tiene la muestra, lo que implica que los resultados estarán sobreestimados en un rango desde 0 a +33,4%, es decir con un sesgo por exceso, pero en ningún caso por defecto. Dado que el objetivo es asegurar el que las muestras se encuentran bajo el LMR, sobreestimar estos valores garantiza que todas las muestras reales reportadas como <LMR en realidad lo están.

El método propuesto para músculo de bovinos se adaptó a las matrices hígado y riñón (Figura 40). Esto debido a que no está definida la matriz blanco (matriz que determina el periodo de resguardo). Para la adaptación se utilizaron las alícuotas que permitirán un factor de dilución que llevaran a los LMR de cada matriz al rango de la curva de calibración con estándares de FFA por RDSE. Para cada matriz se construyó una curva de fortificados y realizó el grafico de los residuos (Figuras 41 a la 44) y se validaron los parámetros analíticos descritos en la sección 3.6 (Tabla 5).

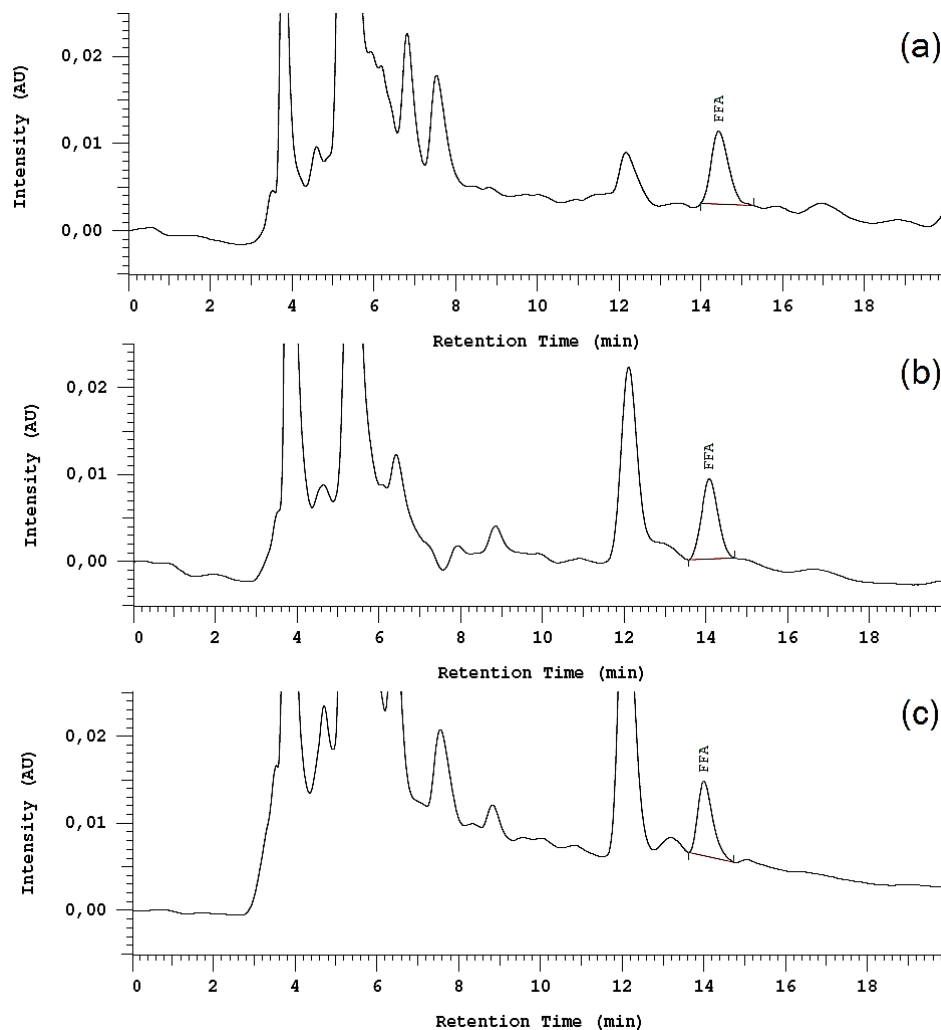


Fig 40. Cromatogramas del método RDSE de florfenicol total en tejidos bovino expresado como FFA; (a) Músculo fortificado en 1000 ngKg^{-1} de FF (FD=2); (b) Hígado fortificado en 2500 ngKg^{-1} de FF (FD=4); Riñón fortificado en 1000 ngKg^{-1} de FF (FD=2).

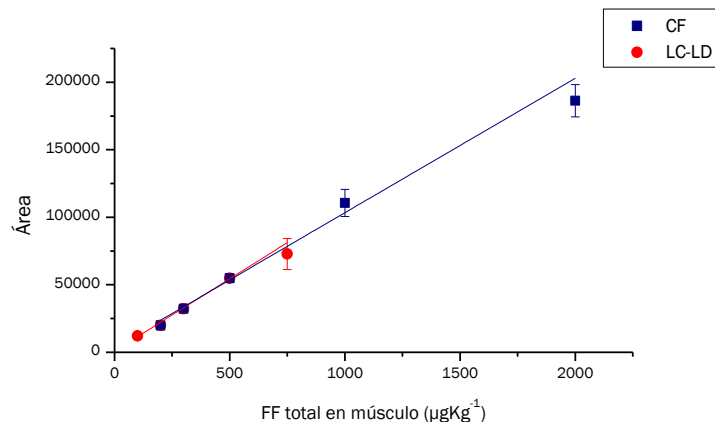


Fig 41. Curva de fortificados en el rango validado para FF en músculo de bovinos (200-2000 μgKg^{-1}) y curva para la determinación del LC-LD (100-700 μgKg^{-1}) expresados como FFA.

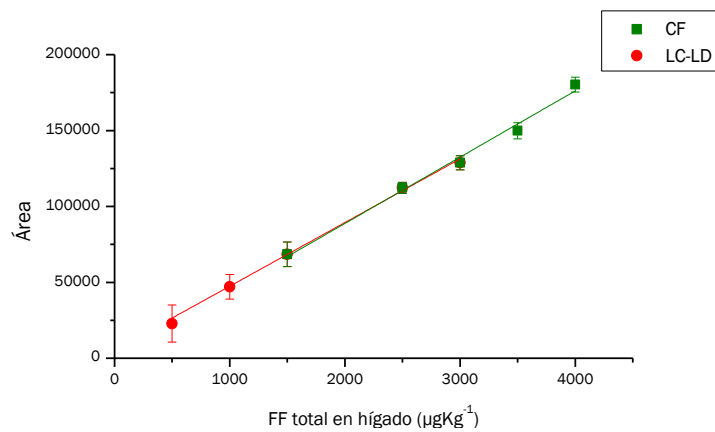


Fig 42. Curva de fortificados en el rango validado para FF en hígado de bovinos (1500-4000 μgKg^{-1}) y curva para la determinación del LC-LD (500-3000 μgKg^{-1}) expresados como FFA.

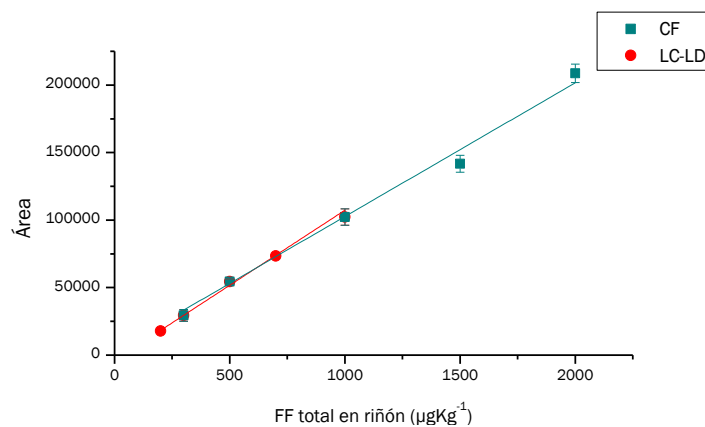


Fig 43. Curvas de fortificados en el rango validado para FF en riñón de bovinos (300-2000 μgKg^{-1}) y curva para la determinación del LC-LD (100-1000 μgKg^{-1}) expresados como FFA.

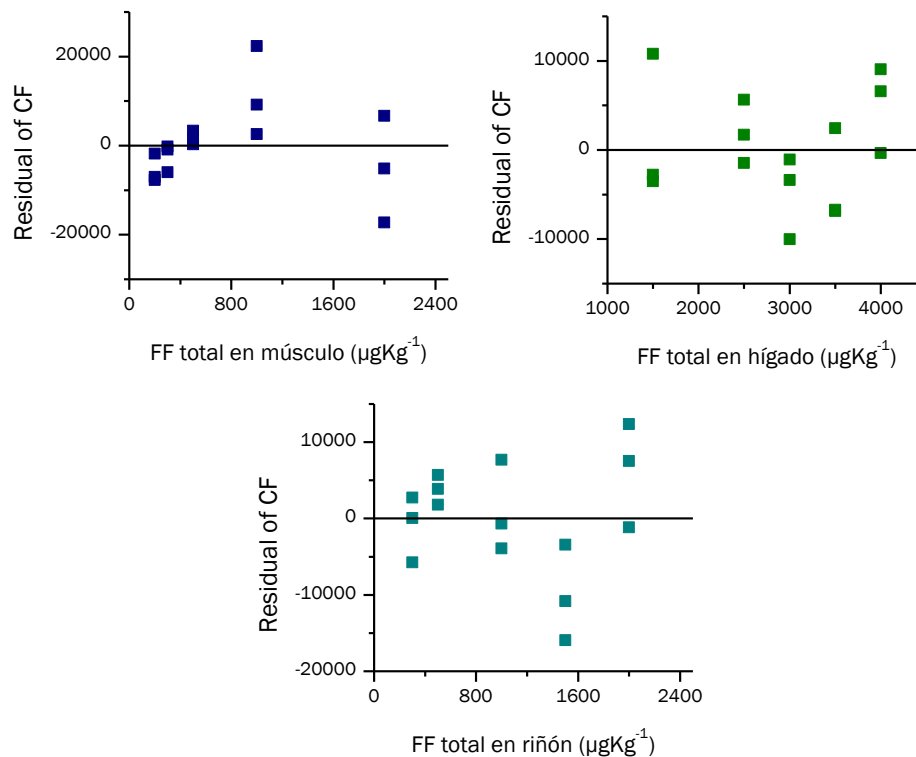


Fig 44. Distribución de los residuos para la curva de fortificados FF en tejidos de bovino.

Tabla 5. Resultados de la validación de la metodología RDSE para FF en tejidos de bovino.

	N	R	Músculo	Hígado	Riñón
Linealidad estándares	5	3		$y = 214,0x - 5141,1$ $R^2 = 0,998$ $p_{\text{value}} = 4,24 \times 10^{-4}$	
Linealidad fortificados	5	3	$y = 99,5x + 3837,0$ $R^2 = 0,984$ $p_{\text{value}} = 8,76 \times 10^{-4}$	$y = 43,7x + 1433,8$ $R^2 = 0,989$ $p_{\text{value}} = 5,16 \times 10^{-4}$	$y = 99,0x + 3627,3$ $R^2 = 0,992$ $p_{\text{value}} = 2,49 \times 10^{-4}$
Índice de selectividad	1	6	80,6 %	93,8 %	87,0 %
Límite de cuantificación	5	3	149,3 μgKg^{-1}	826,5 μgKg^{-1}	158,6 μgKg^{-1}
Límite de detección	5	3	49,3 μgKg^{-1}	272,7 μgKg^{-1}	52,3 μgKg^{-1}
Exactitud	3	3	(B) +9,4 %	(B) -14,5 %	(B) -7,3 %
			(M) +6,9 %	(M) -16,1 %	(M) -4,1 %
			(A) -11,1 %	(A) -15,9 %	(A) -2,7 %
Precisión intermedia	3	3	(CV _B) 13,8 %	(CV _B) 11,7 %	(CV _B) 14,5 %
			(CV _M) 8,8 %	(CV _M) 3,2 %	(CV _M) 5,8 %
			(CV _A) 6,1 %	(CV _A) 2,7 %	(CV _A) 3,3 %
Estabilidad de la muestra	2	3	(B _{4s}) +8,6 %	(B _{4s}) -12,1 %	(B _{4s}) -6,2 %
			(A _{4s}) +6,7 %	(A _{4s}) +3,7 %	(A _{4s}) -7,5 %

5.1.3 Comparación de eco-eficiencia del método RDSE y el método oficial de la USDA para residuos de florfenicol en tejidos.

El método para la determinación y confirmación de florfenicol residual en tejidos, propuesto por la FSIS (Servicio de Inocuidad e Inspección), agencia perteneciente a la USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) fue oficializado el año 2010 y consiste a validación de un método para la determinación de residuos de florfenicol en distintas especies utilizando la hidrólisis ácida en una primera etapa, posterior extracción con acetato de etilo (20 mL), neutralización con NaOH (30%), paso por columnas con tierra de diatomea y extracción con cloroformo (2 porciones de 20 mL), para ser llevado a sequedad mediante rotavapor y resuspensión para análisis como FFA mediante HPLC-UV.

En el contexto de la química verde, se puede ponderar cuán amigable es el método de análisis con el medio ambiente, ponderando su eco-escala (ee) ⁽⁴¹⁾, determinada por la suma de los puntos de penalización (pp), ponderados en cada etapa del proceso, donde el valor de la ee se expresa como se muestra en la ecuación 10:

$$(ec. 10) ee = 100 - pp$$

Un valor de $ee > 75$ se cataloga como un excelente nivel verde, mientras que los métodos con $ee < 50$, presentan de un inadecuado nivel verde. En la tabla 6 se observa la comparación de la ee para el método propuesto respecto al método oficial.

Tabla 6. Resultados del cálculo de la eco-escala para el método RDSE propuesto y método de referencia FSIS para FF en tejidos de bovino.

Método RDSE		Método oficial de la FSIS	
Reactivos			
HCl (6N) : 6 mL	3 pp	HCl (6N) : 10 mL	6 pp
NaOH (30%) : 1 mL	2 pp	NaOH (30%) : 10 mL	4 pp
Cloroformo : 3 mL	4 pp	Acetato de etilo: 20 mL	16 pp
Metanol : 8 mL	8 pp	Cloroformo: 40 mL	8 pp
Instrumental			
Agitador calefaccionado	1 pp	Baño calefactor	2 pp
Agitador	1 pp	Cámara de vacío	3 pp
Centrifuga	1 pp	Rotavapor	2 pp
LC-DAD	1 pp	Riesgo	3 pp
Desechos	3 pp	LC-UV	2 pp
		Desechos	8 pp
Suma puntos penalización	24 pp	Suma puntos penalización	54 pp
Eco-escala	76	Eco-escala	46

5.1.4 Estudio de depleción de residuos para florfenicol en bovinos.

Para realizar el estudio de depleción de residuos, se seleccionaron 22 bovinos (11 hembras y 11 machos bovinos), se les realizó un examen clínico general y se registraron los pesos y se identificaron mediante Dispositivos de Identificación Individual Oficial (DIIO). Los animales fueron alojados en corrales aislados de otros bovinos, con comederos y bebederos independientes. Transcurrido el período de aclimatación les administró el tratamiento (día 0), con una dosis de 40 mgKg⁻¹ PV de florfenicol mediante Duflosan® (30% florfenicol en solución inyectable). Previo a la inyección, se depiló el lugar en forma circular, con el objetivo de marcar el punto exacto de inyección (Pi core). Transcurridos “N” días desde el día 0, se eligieron dos machos y dos hembras al azar para su sacrificio y comenzar el primer muestreo, las muestras se analizaron mediante la metodología propuesta para cada una de las matrices ensayadas en los sucesivos puntos de muestreo (Tabla 6).

Tabla 6. Concentraciones tisulares individuales de FFA en estudio de depleción de residuos.

Tejido	T	Concentración por animal (µgKg ⁻¹)				promedio	σ
Pi core	N	15823	19981	20451	25282	20384	3871
	N+7	3513	5338	4330	3841	4256	796
	N+14	1111	510	900	733	813	254
	N+21	170	168	151	*123	153	22
	N+28	ND	*50	ND	*52	-	-
Músculo	N	733	682	520	547	620	103
	N+7	379	520	372	308	395	89
	N+14	182	111	288	258	210	80
	N+21	*140	*122	*132	*66	115	34
	N+28	ND	ND	*62	*55	-	-
Hígado	N	2956	5679	6658	2211	4376	2130
	N+7	4283	2442	4224	3166	3529	888
	N+14	2025	1327	2737	1868	1989	581
	N+21	*532	1058	1586	829	1001	445
	N+28	ND	ND	ND	ND	-	-
Riñón	N	641	646	1275	1078	910	318
	N+7	545	654	547	429	544	92
	N+14	317	244	405	426	348	84
	N+21	228	*112	*94	*103	134	63
	N+28	*91	ND	*104	*84	-	-

* = < LC, ND= < LD, T= día de muestreo

Los resultados obtenidos fueron analizados por regresión logarítmica, utilizando el programa computacional WT 1.4, considerando los LMR propuestos por la EMA.

De acuerdo al análisis de resultados con una confianza del 95%, se obtuvo un $p_{\text{value}} > 0,05$ para las pruebas F de Fisher y C de Cochran, que aseguran la normal distribución de los datos respecto a sus varianzas y su normalidad.

El período de resguardo obtenido en todas las matrices ensayadas, se encontró en el rango (N+22 a N+23), según lo que indica la normativa de la EMA para tiempos de resguardo con días fraccionados. Estos se deben aproximar al día entero mayor es decir (N+23) días de tiempo de resguardo (Figura 45).

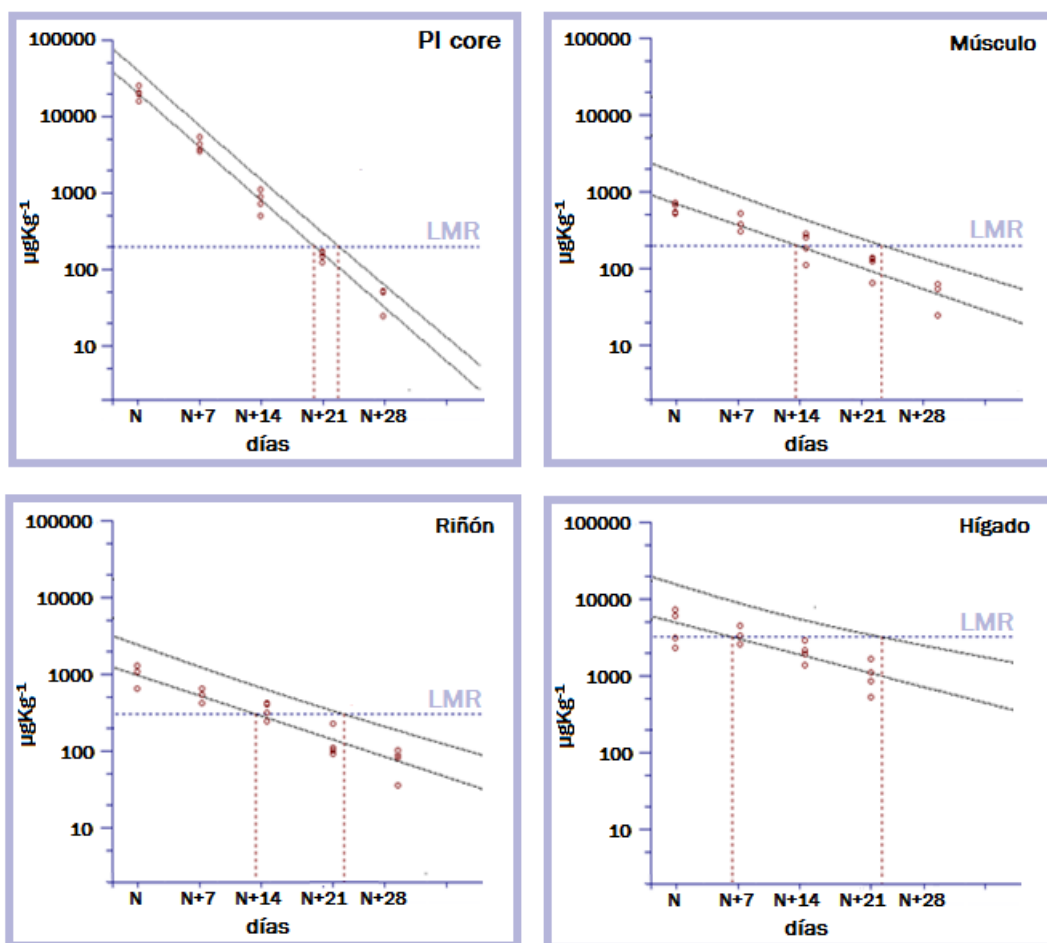


Fig 45. Regresiones logarítmicas utilizando el programa WT 1.4 para los resultados del ensayo de depleción de residuos para Duflosan® 30% florfenicol en bovinos.

5.2 Triclabendazol

5.2.1 Determinación de metabolitos de triclabendazol en plasma.

Para desarrollar la metodología RDSE en plasma de bovinos para la determinación de los metabolitos de TCB presentes en dicha matriz (TCB-SO y TCB-SO₂), se consideró inicialmente un factor de dilución de 5, (400 µL de plasma → 2 mL finales), de modo que la curva de estándares de 0,05 – 1,00 µg mL⁻¹ entregará la respuesta del rango 0,10 – 5,00 µg mL⁻¹ en plasma, que representa un rango útil para validar un método dirigido a la farmacocinética de un TCB administrado en una dosis de 12 mg Kg⁻¹ PV, que es dosis para el producto propuesto para el estudio final.

En la etapa exploratoria se fortificaron soluciones de 15 mL de buffer acetato de amonio 25 mM (pH 6,6) con el equivalente a la concentración media de la curva estándar propuesta (0,50 µg mL⁻¹ en TCBZ-SO y TCB-SO₂ en 2 mL de reconstitución), se utilizó la fase sorbente C₁₈, dada que la baja polaridad de ambas especies (LogP=4) para realizar una cinética preliminar (Ver figura 46).

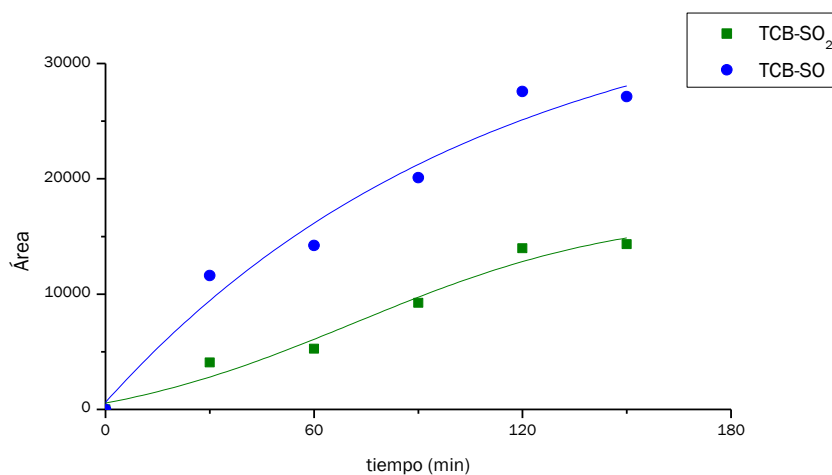


Fig 46. Perfil RDSE TCB-SO y TCB-SO₂ (estándar 0,5 µg mL⁻¹) con C₁₈ como fase sorbente en ausencia de la matriz plasma.

Para muestras de plasma blanco, fortificadas al nivel medio de la curva de calibración (2,5 µg mL⁻¹) se utilizó un diseño de compuesto central (2^K + 2K + 2), centrado en las caras y con dos centros, los factores experimentales utilizados fueron el pH (3 – 4 – 5) y la concentración del buffer (10 – 30 – 50 mM), para tiempos de extracción y elución de 120 y 90 minutos respectivamente. Como respuesta se utilizaron dos variables, la recuperación de TCB-SO y TCB-SO₂, se utilizó acetona en la elución ya

que metanol presentó algunas interferencias en la cromatografía para las pruebas preliminares con plasma blanco de bovino.

Como resultado del diseño se observa una dependencia importante del pH en la etapa de extracción, con una mínima recuperación en pH 4 y una mayor recuperación a pH 3 con el buffer a una concentración alta (Figura 47).

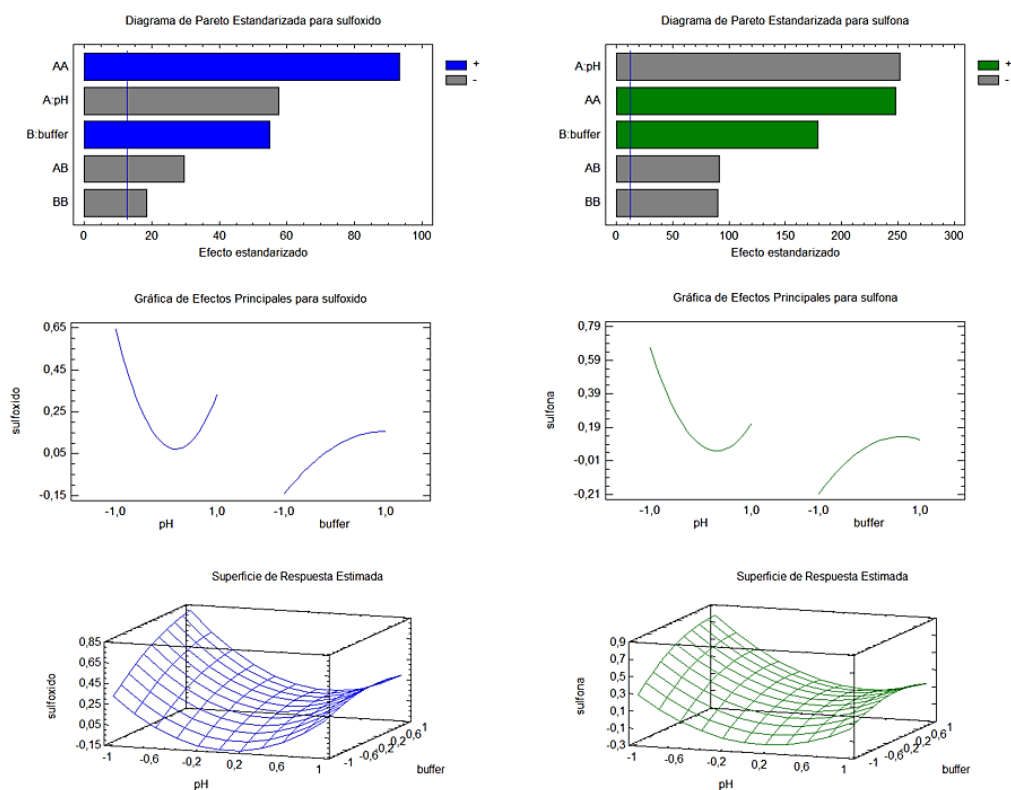


Fig 47. Resultados del diseño para RDSE TCB-SO y TCB-SO₂ en plasma (2,5 µg mL⁻¹) con C₁₈ como fase sorbente, variando pH y concentración del buffer; Arriba diagrama de Pareto de efectos estandarizados, al medio la gráfica de los efectos principales y abajo las superficies de respuesta.

A partir los resultados obtenidos por el diseño, se utilizaron las condiciones óptimas para realizar una curva de fortificados en plasma, sin embargo la correlación fue insuficiente ($R^2 < 0,990$), en el rango ensayado para ninguno de los dos metabolitos.

Para mejorar la linealidad del método se decidió utilizar como fase sorbente alternativa el HLB®, se realizó un nuevo diseño experimental, esta vez utilizando la concentración del buffer fija y variando el pH (3 – 4 – 5) y el factor de dilución (2.5 – 5.0 – 10.0) equivalentes a una alícuota de 200, 400 y 800 µL que se llevan a 2 mL finales respectivamente.

Aunque el pH óptimo utilizando HLB® fue tres (3) al igual que en el caso de C₁₈, no se produjo una inflexión, con un mínimo como en C₁₈, lo que indicaría una mayor robustez frente a cambios de pH en la zona ensayada. Es posible que la falta de linealidad en el caso de C₁₈ se deba a variaciones en la recuepración frente a pequeños cambios de pH. Además se ponderó como la dilución afecta la recuperación a un tiempo de extracción fijo (Figura 48).

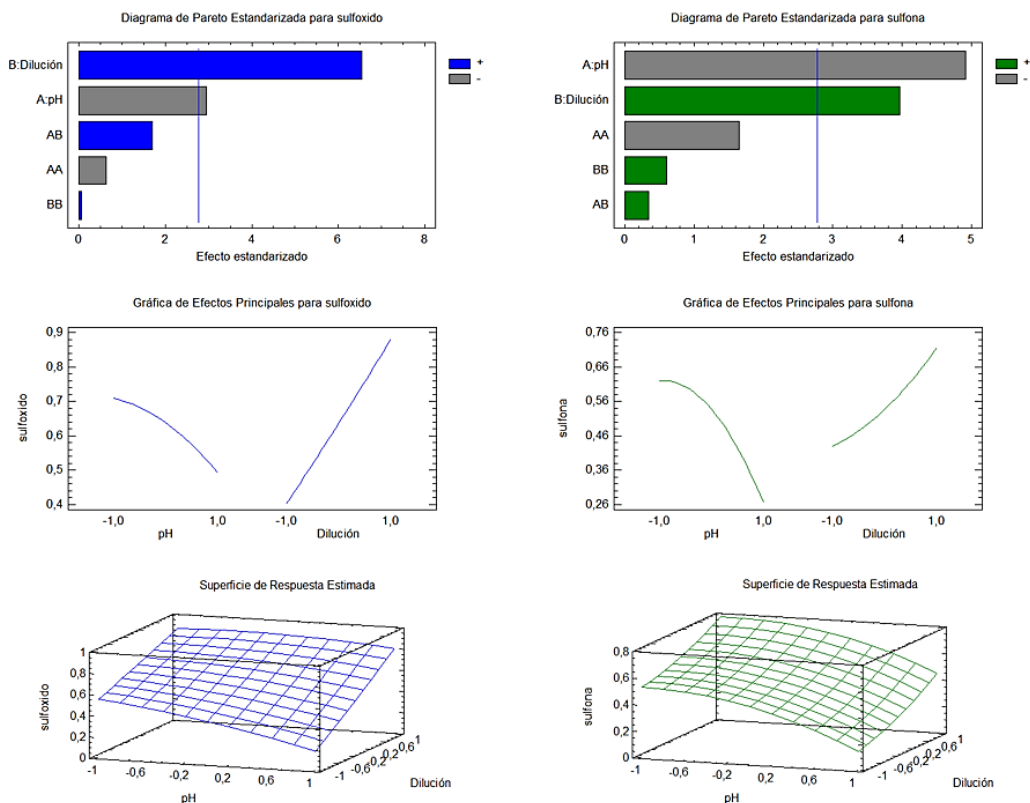


Fig 48. Resultados del diseño para RDSE TCBZ-SO y TCBZ-SO₂ en plasma (2,5 µg mL⁻¹) con HLB como fase sorbente, variando pH y dilución; arriba diagrama de Pareto de efectos estandarizados, al medio la gráfica de los efectos principales y abajo las superficies de respuesta.

Utilizando las condiciones óptimas del diseño experimental, se realizó el perfil de extracción para el método propuesto para plasma utilizando RDSE-HLB (Figura 49). Se observan cromatogramas representativos (Figura 50). Con estas condiciones se realizó la curva de fortificados (Figuras 51 y 52), se obtuvo la gráfica de los residuos (Figura 53) y se validaron los parámetros descritos en la sección 3.6 (Tabla 7).

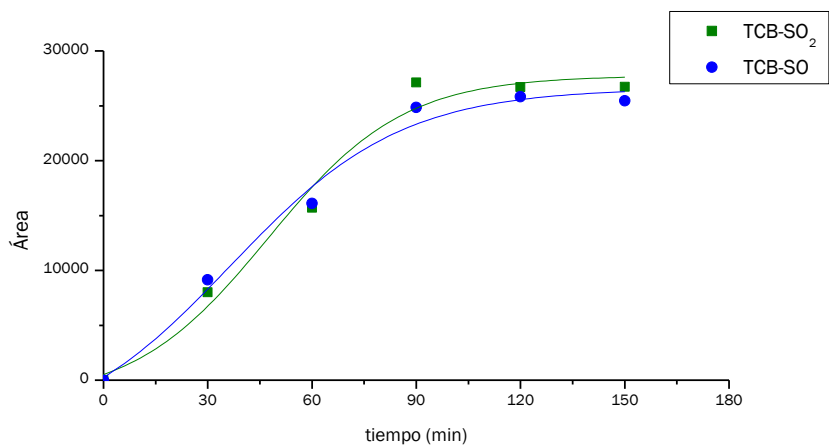


Fig 49. Perfil RDSE TCBZ-SO y TCBZ-SO₂ en plasma (2,5 µg/mL) con HLB como fase sorbente.

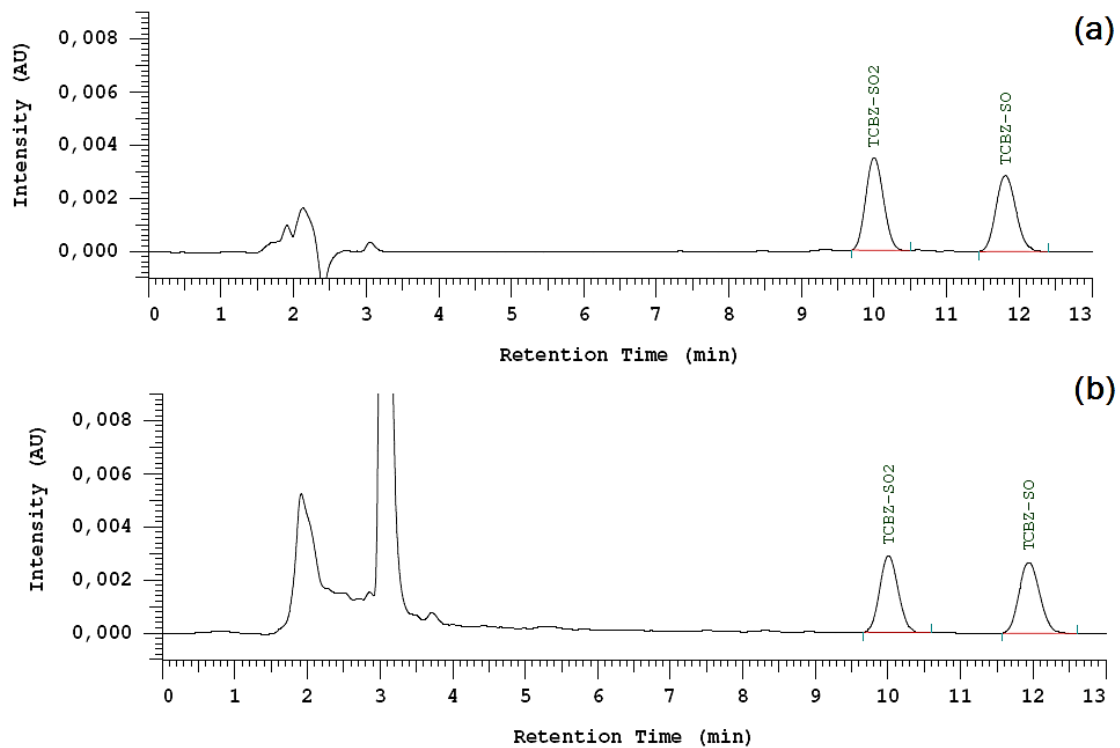


Fig 50. Cromatogramas del método de triclabendazol en plasma bovino; (a) Estándares de TCB-SO y TCB-SO₂ (0,50 µg/mL); (b) RDSE en plasma fortificado a 2,5 µg/mL de TCB-SO y TCB-SO₂ (FD=5).

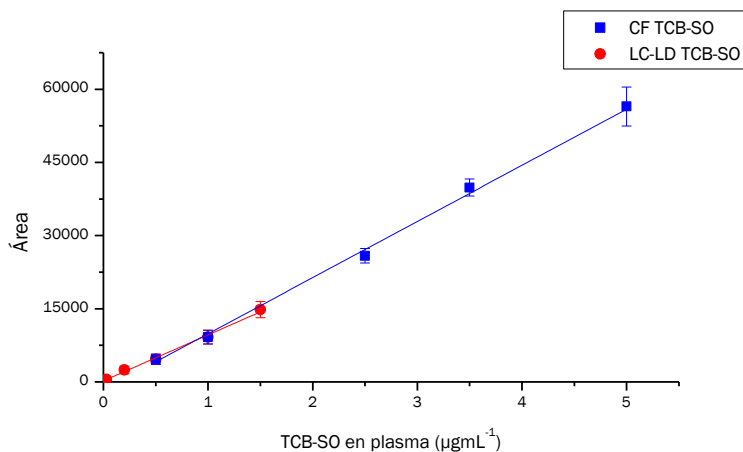


Fig 51. Curva de fortificados (CF) para TCB-SO en plasma de bovinos (0,50-5,00 µg mL⁻¹) y curva para la determinación del LC-LD (0,03-1,50 µg mL⁻¹).

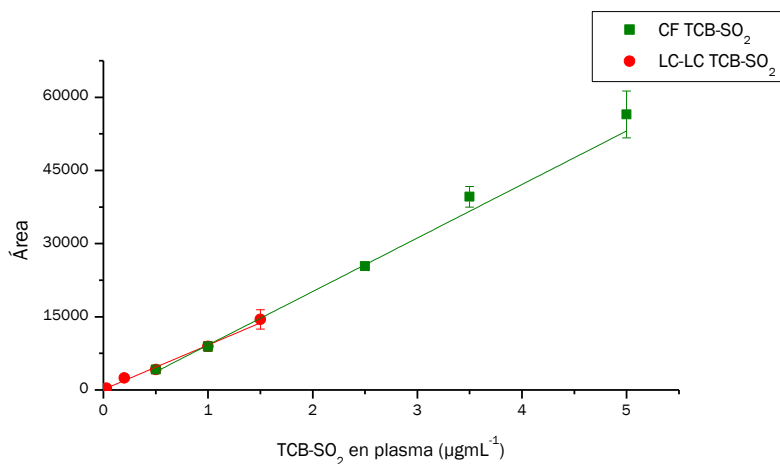


Fig 52. Curva de fortificados (CF) para TCB-SO₂ en plasma de bovinos (0,50-5,00 µg mL⁻¹) y curva para la determinación del LC-LD (0,03-1,50 µg mL⁻¹).

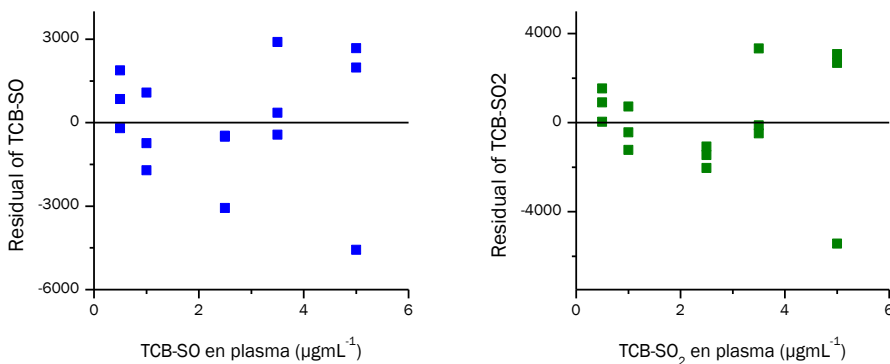


Fig 53. Distribución de los residuos para la curva de fortificados de TCBZ-SO y TCBZ-SO₂.

Tabla 7. Resultados de la validación de la metodología RDSE para TCBZ-SO y TCBZ-SO₂ en plasma de bovinos.

	N	R	TCBZ-SO	TCBZ-SO ₂
Linealidad estándares	5	3	$y = 66176,9x - 3637,8$	$y = 72358,4x - 4850,1$
			$R^2 = 0,999$	$R^2 = 0,997$
			$p_{value} = 1,24 \times 10^{-5}$	$p_{value} = 8,21 \times 10^{-5}$
Linealidad fortificados	5	3	$y = 11512,9x - 1641,3$	$y = 10972,7x - 1763,1$
			$R^2 = 0,996$	$R^2 = 0,996$
			$p_{value} = 9,18 \times 10^{-5}$	$p_{value} = 1,05 \times 10^{-5}$
Índice Selectividad	1	6	88,2 %	96,6 %
Límite de cuantificación	5	3	0,108 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,104 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Límite de detección	5	3	0,036 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,035 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Exactitud	3	3	(B) +10,0 %	(B) -7,7 %
			(M) -8,7 %	(M) -16,7 %
			(A) -8,1 %	(A) -15,0 %
			(CV _B) 8,1 %	(CV _B) 8,0 %
Precisión intermedia	3	3	(CV _M) 5,5 %	(CV _M) 4,1 %
			(CV _A) 6,8 %	(CV _A) 8,0 %

5.2.2 Evaluación de bioequivalencia mediante comparación de farmacocinéticas de triclabendazol en plasma bovino.

La bioequivalencia en medida de las farmacocinéticas es la evaluación comparativa de la equivalencia terapéutica “in vivo” entre dos formulaciones de un medicamento que contiene el mismo principio activo. Mediante la metodología desarrollada se analizaron muestras de plasma provenientes de un estudio comparativo para dos productos de triclabendazol al 10% oral para bovinos (Trisuvet® de Veterquímica y Soforen® de Novartis).

Para realizar el estudio, ambos productos se administraron en dosis única en bolo oral, para 12 mgKg⁻¹ PV de triclabendazol, en bovinos. Para cada producto se seleccionaron 3 machos y 3 hembras, que cumplieren con los criterios de inclusión establecidos para el estudio.

Las muestras de 2 a 10 mL de sangre, se obtuvieron por punción directa de la vena coxígea, utilizando dispositivo multi-muestreo y tubos Vacutainer® (heparina de litio). Estos tubos fueron centrifugados a 3000 G por 10 minutos a 4 °C para la obtención de plasma, el que fue congelado a -20 °C hasta su utilización.

Las muestras fueron analizadas y se determinó la concentración plasmática de los metabolitos TCB-SO (activo) y TCB-SO₂ (inactivo) en cada tiempo de muestreo (Tabla 8) para ambos productos (Figura 54), donde se observó un comportamiento normal según lo descrito para las cinéticas en bovinos. (21 y 41)

Tabla 8. Calendario para la toma de muestras en el estudio de farmacocinética de triclabendazol, comparación de dos productos de triclabendazol oral administrado en 12 mgKg⁻¹ en bovinos (n=6).

Día	1	2	3	4	5	6	7
	0	24	48	72	96	120	144
Horas	2	30	60				
	6	36					
	8	42					
	12						
	18						

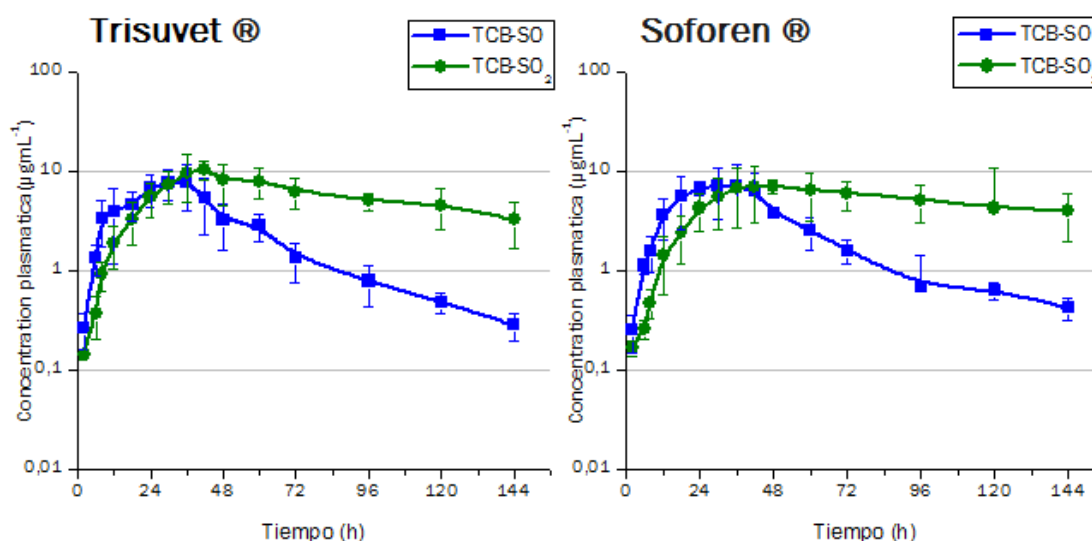


Fig 54. Farmacocinéticas plasmáticas para dos productos orales de triclabendazol al 10% administrados en 12mgKg⁻¹ en bovinos (n=6), a la izquierda Trisuvet® de Veterquímica; a la derecha oral Soforen® de Novartis.

Con los resultados de ambas farmacocinéticas, se realizó un análisis para las concentraciones de TCB-SO con el programa computacional PK Solutions 2.0 y se determinaron los parámetros farmacocinéticos, C_{max}, C_{min}, T_{max}, ABC_{0-t} y ABC_{0-∞} para ambos productos (Tabla 9).

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos, obtenidos de las concentraciones plasmáticas de TCBZ-SO, de bovinos a los que se les administró Trisuvet® 10% (Veterquímica) y el producto original Soforen® (Novartis), ambos en dosis de 12 mgKg⁻¹ PV en bolo oral (n=6 para cada producto).

Pharmacokinetic parameters of TCBZ-SO	Trisuvet®		Soforen®	
	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV
C_{max} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	9,7	15,8	8,8	32,2
C_{min} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,3	45,7	0,4	26,2
T_{max} (h)	36,0	25,8	36,0	21,1
ABC_{0-t} ($\mu\text{g mL}^{-1}\text{h}^{-1}$)	408,8	21,0	410,6	22,3
$ABC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}\text{h}^{-1}$)	420,0	21,6	441,3	23,2

\bar{x} = promedio; CV= coeficiente de variación (%); C_{max} =concentración máxima; C_{min} =concentración mínima; T_{max} =tiempo en alcanzar la concentración máxima; ABC_{0-t} =área bajo la curva del tiempo 0 hasta la última medición; $ABC_{0-\infty}$ =área bajo la curva del tiempo 0 extrapolado al infinito

Se realizó una comparación de medias mediante la prueba de t-Student para evaluar diferencias en los parámetros farmacocinéticos T_{max} y ABC_{0-t} , resultando ambos productos bioequivalentes, con 95% de confianza y $p_{value} > 0,05$ para los parámetros comparados no se observaron diferencias significativas (Figura 55)

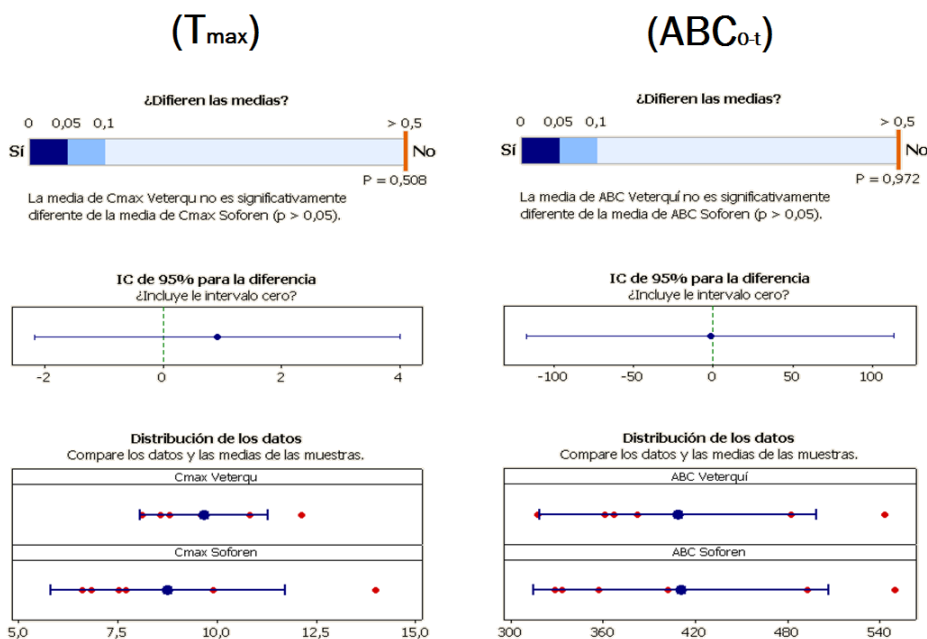


Fig 55. Pruebas de t-Student para las medias de C_{max} y ABC_{0-t} de los productos orales de triclabendazol al 10% administrados en 12mgKg⁻¹ en bovinos (n=6).

5.2.3 Determinación triclabendazol residual en tejidos de bovino.

En el desarrollo de la metodología RDSE para tejidos de bovinos se evaluaron distintas fases sorbentes para una concentración intermedia del metabolito marcador keto-triclabendazol (500 ng mL^{-1} resultantes en 2 mL de reconstitución), para el ensayo se fortificaron soluciones acuosas de 15 mL, utilizando como sorbentes, HLB, C_{18} y PDMS, para distintos tiempos de extracción (Figura 56).

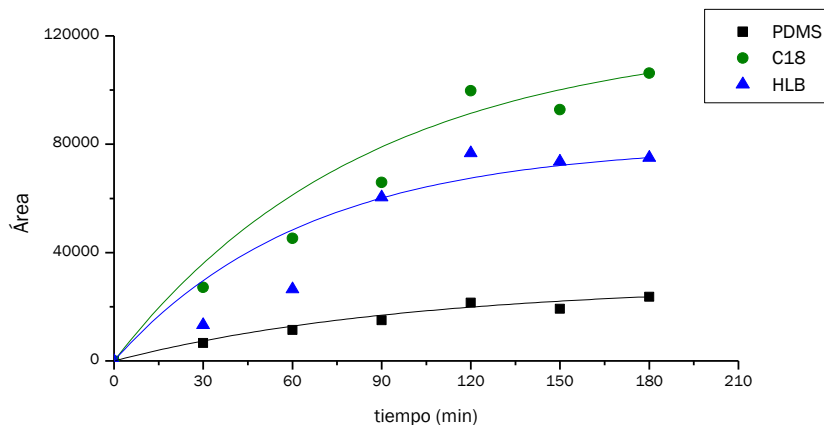


Fig 56. Perfil comparativo para la extracción de keto-triclabendazol desde agua utilizando las fases sorbentes PDMS, C_{18} y HLB.

Por la baja polaridad del KT-TCB ($\text{LogP} = 4,46$) no es posible realizar un *clean up* utilizando disolventes orgánicos posterior a la hidrólisis alcalina, de modo que debe seleccionar la fase sorbente que presente un menor co-extracción de la matriz, principalmente porque la muestra debe llegar limpia a la etapa de oxidación. En las pruebas preliminares se observó que la co-extracción entre las fases se comportó de la siguiente forma, $\text{HLB} \gg C_{18} > \text{PDMS}$, mientras que la afinidad observada en los perfiles con KT-TCB fue, $C_{18} > \text{HLB} \gg \text{PDMS}$, en este sentido privilegiando la sensibilidad y selectividad de la metodología se optó por la fase de C_{18} .

Al igual que en el caso de FFA en tejidos, es importante indicar que en el caso del KT-TCB como mesurando, debe considerarse el cambio en la masa molar en la hidrólisis alcalina y oxidación desde la especie original a la que se cuantifica. En este caso las muestras se fortificaron con el principal metabolito encontrado en tejidos (TCB-SO_2 : $391,6 \text{ g mol}^{-1}$), mientras que el mesurando (KT-TCB: $329,5 \text{ g mol}^{-1}$), considerándose entonces esta diferencia en la masa molar del 9,1% para realizar los cálculos. Dado que las concentraciones se determinan en masa de estándar y que la curva de estándares se construye mediante estándares de concentración conocida para KT-TCB, que deben tener un factor de corrección de 1,09 (aplicado directamente en el

estándar intermedio de KT-TCB), de modo que la equivalencia sea directa a la cantidad de TCB-SO₂ fortificada en los tejidos.

En una etapa exploratoria se evaluó el efecto del pH (3 – 5 – 7) y la concentración del buffer (10 – 30 – 50 mM) para KT-TCBZ, utilizando un diseño factorial a dos niveles y 3 centros (2^k + 3) para tiempos de extracción de 2 horas, de observa un efecto significativo y positivo en la recuperación para parámetros, de manera que se seleccionó el pH 7 y el buffer 50 mM para seguir con la optimización (Figura 57).

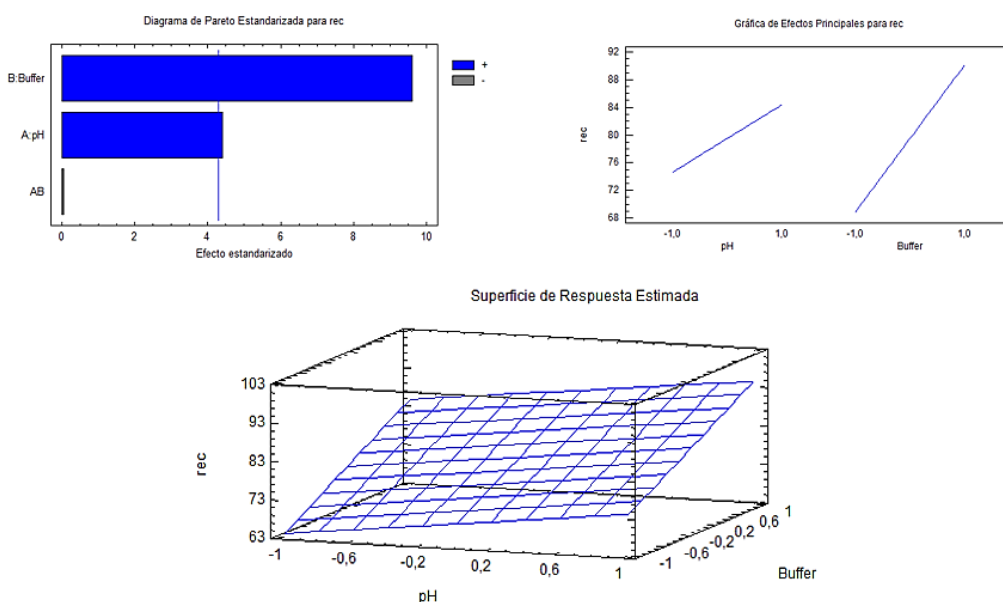


Fig 57. Resultados del diseño experimental para KT-TCBZ en solución acuosa (equivalente 500 ngmL⁻¹ en reconstitución en 2 mL) con C₁₈ como fase sorbente, variando pH y la concentración del buffer; arriba diagrama de Pareto y gráfica de los efectos principales; abajo superficie de respuesta.

Para muestras de 5 g de músculo se fortificó con KT-TCB, la solución resultante de la hidrólisis alcalina (equivalente a 1000 µgKg⁻¹ de TCB-SO₂ en la matriz), se utilizó un diseño de compuesto central (2^k + 2K + 2), centrado en las caras, con dos centros, los factores experimentales utilizados fue un rango más acotado de pH (5 – 6 – 7) y el volumen de la alícuota de la solución resultante durante la hidrólisis alcalina (3 – 5 – 7 mL) que representan la dilución expresada en la tabla 10.

Tabla 10. Alícuotas y diluciones equivalentes para el diseño experimental de TCB en tejidos.

Alícuota de solución resultante hidrólisis (mL)	Factor de dilución en la extracción por RDSE	Factor de dilución total (muestra→HPLC)
3,0	5,00	2,0
4,0	3,75	1,5
5,0	3,00	1,2

Los resultados indican que la extracción es favorecida por una mayor dilución (menor volumen del extracto resultante de la hidrólisis alcalina) y a pH=7 (Figura 56).

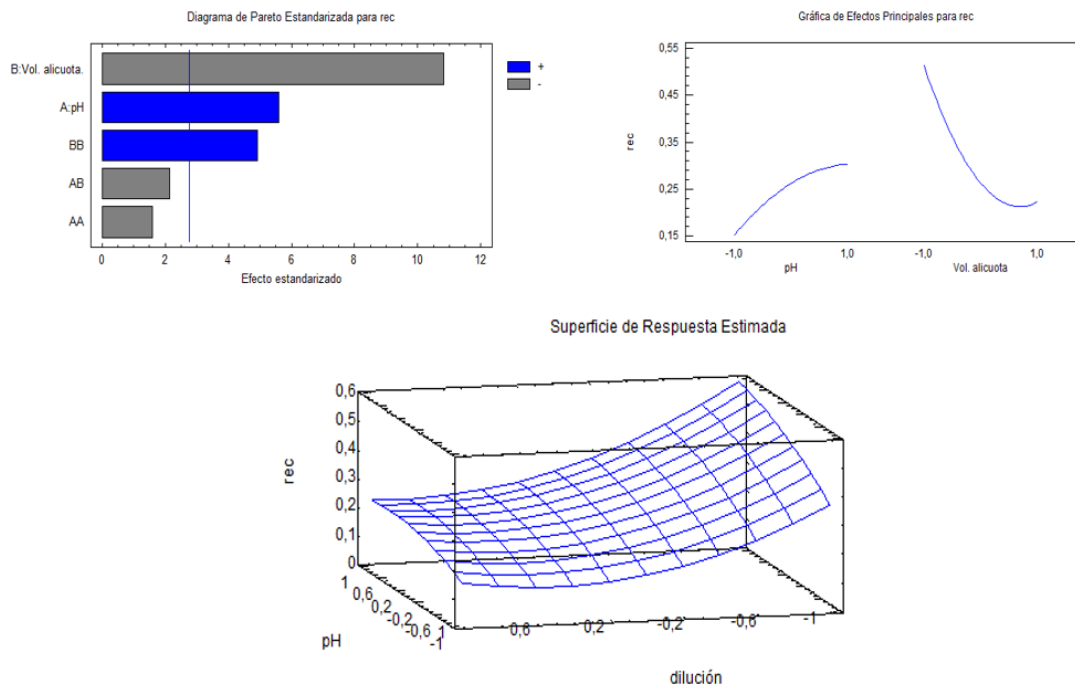


Fig 56. Resultados del diseño experimental para músculo blanco sometido a hidrólisis alcalina, la solución de fortificó con el equivalente a $1000 \mu\text{gKg}^{-1}$ de KT-TCB, se utilizó RDSE con C_{18} como fase sorbente, variando pH y la alícuota de solución proveniente de la hidrólisis; arriba diagrama de Pareto y gráfica de los efectos principales; abajo superficie de respuesta.

Para muestras de 5 g de músculo fortificadas con TCB-SO_2 , se realizó la hidrólisis alcalina, la extracción mediante RDSE- C_{18} en las condiciones optimizadas y la posterior oxidación a KT-TCB. El extracto alcalino se neutralizó con HCl 6N (1,5 mL), al ajustar a pH 7 el extracto, se observa la aparición de abundante material floculante, dada la baja polaridad del KT-TCB no es posible agregar un disolvente orgánico como una alternativa de *clean-up*, de modo que en lugar de precipitar el material suspendido se optó por solubilizarlo utilizando un modificador de fase en el extracto, en este caso fue trietilamina (TEA), se adicionó TEA hasta obtener un extracto transparente (150 μL), lo que además ocurre cuando la solución llega a pH 7 con TEA. El método propuesto para músculo de bovinos se adaptó a las demás matrices de interés, hígado, riñón y grasa (Figura 59), en donde se requirió 300, 200 y 150 μL de TEA respectivamente para llevar la solución a pH 7, para la adaptación se utilizaron las alícuotas que permitirán un factor de dilución que llevaran a los LMR de cada matriz al rango de la curva de calibración con estándares de KT-TCB.

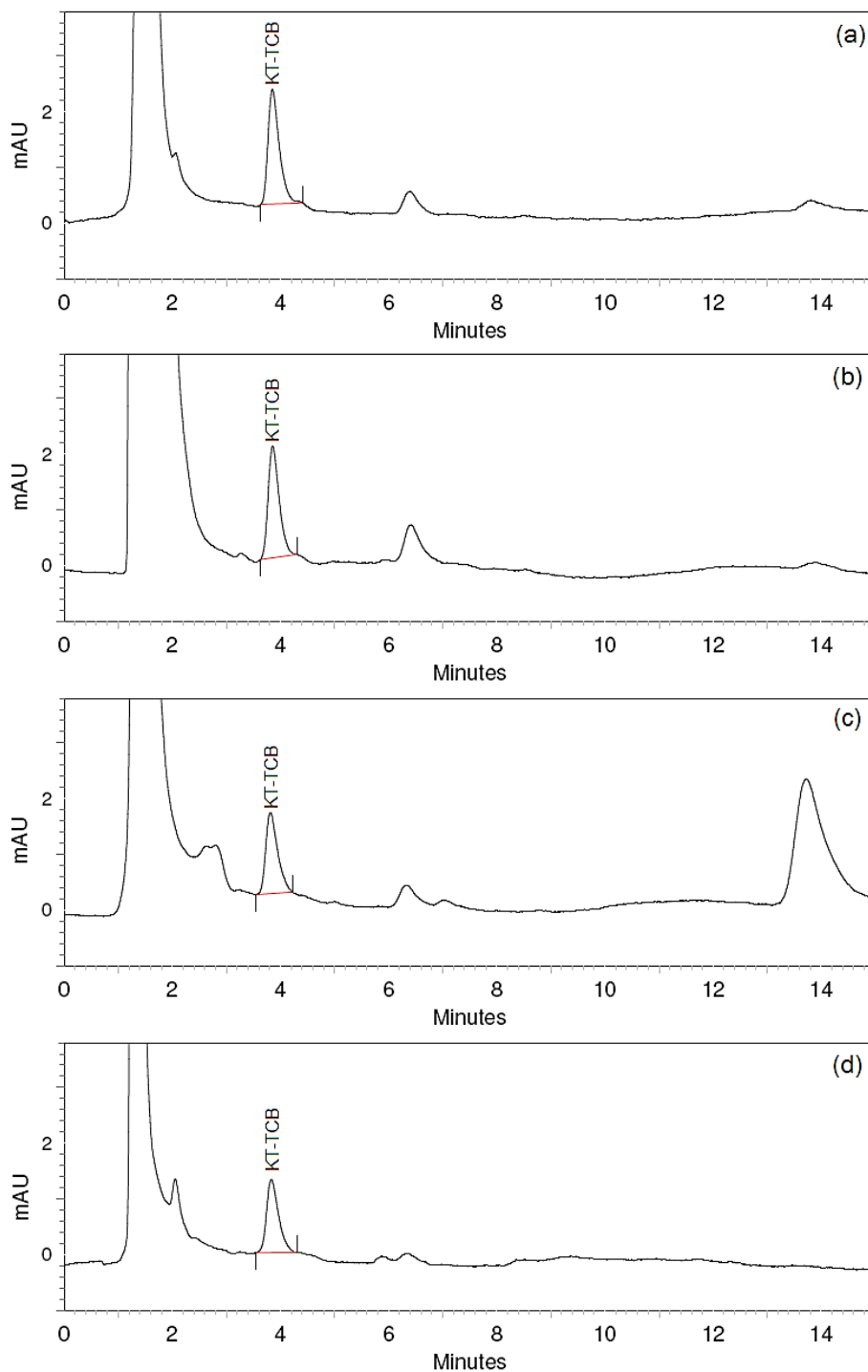


Fig 59. Cromatogramas para TCB total en tejidos bovino expresado como KT-TCB; (a) Músculo a $1000 \mu\text{gKg}^{-1}$ de TCB-SO₂ (FD=2); (b) Hígado a $1000 \mu\text{gKg}^{-1}$ de TCB-SO₂ (FD=2); (c) Riñón a $600 \mu\text{gKg}^{-1}$ de TCB-SO₂ (FD=1,2); (d) Grasa a $500 \mu\text{gKg}^{-1}$ de TCB-SO₂ (FD=1).

En el caso de la matriz grasa, la hidrólisis alcalina produjo una saponificación de la muestra, de modo que se debe procurar acidificar con HCl y luego agregar TEA en caliente sin detener la agitación, para así evitar la solidificación de la muestra antes de llevarla a pH 7. Luego la muestra debe ser traspasada a un tubo de centrifuga (al igual que las otras matrices), sin embargo en el caso de la grasa, luego de enfriarse, la muestra saponificada permanece en la parte superior y solidificada, de modo que para recuperar el extracto acuoso debe perforarse el tubo en la parte inferior (aguja #1) para recoger la muestra la fase acuosa y perforarse lateralmente (aguja #2) para liberar la presión y liberar la fase acuosa (Figura 60).

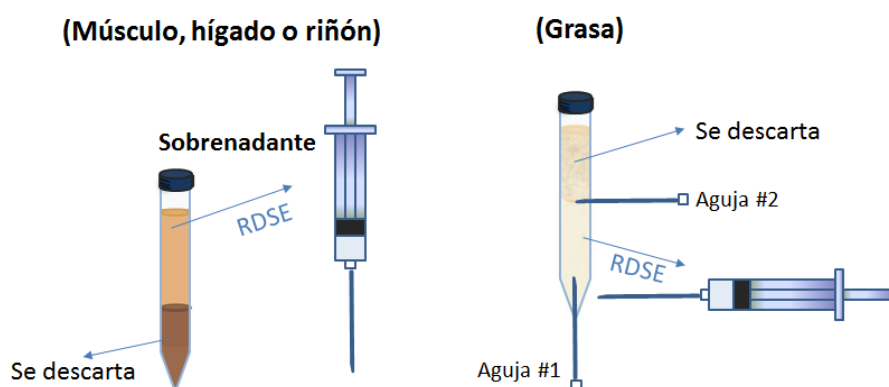


Fig 60. Manejo de la muestra proveniente de hidrólisis alcalina, a la derecha el caso de matrices músculo, hígado y riñón; a la izquierda el caso de la matriz grasa.

Para cada matriz se realizó la curva de fortificados (Figuras 61-65) y respectivo gráfico de residuos (Figura 66), se validaron los parámetros analíticos descritos en la sección 3.6 para cada una de las matrices ensayadas (Tabla 11).

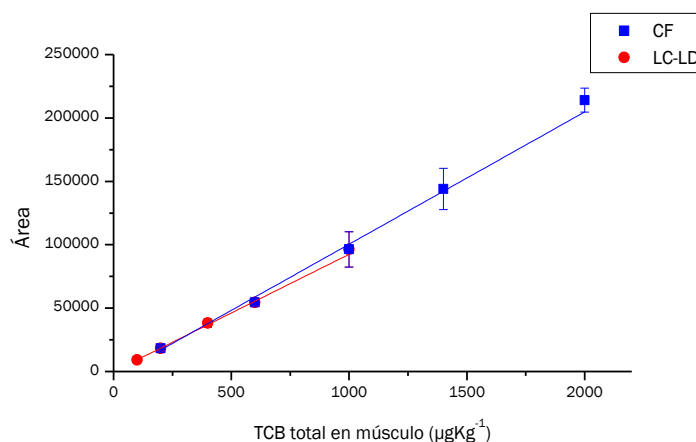


Fig 61. Curvas de fortificados (CF) en rango validado para TCB-SO₂ en músculo (200-2000 μgKg^{-1}) y curva para la determinación del LC-LD (100-1000 ngmL^{-1}), expresados como KT-TCB.

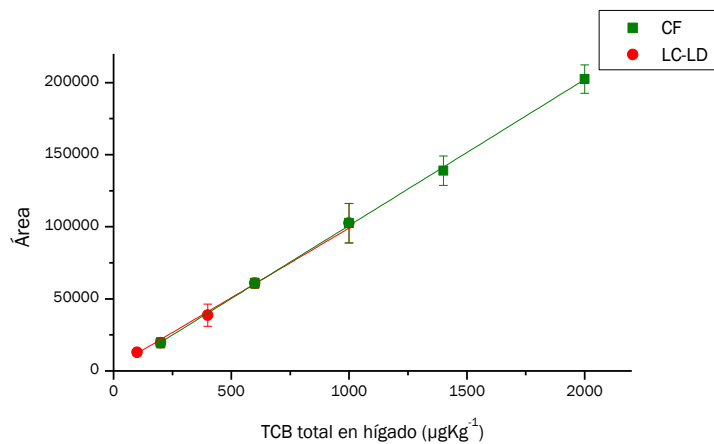


Fig 62. Curvas de fortificados (CF) en rango validado para TCBZ-SO₂ en hígado (200-2000 µgKg⁻¹) y curva para la determinación del LC-LD (100-1000 µgKg⁻¹), expresados como KT-TCB.

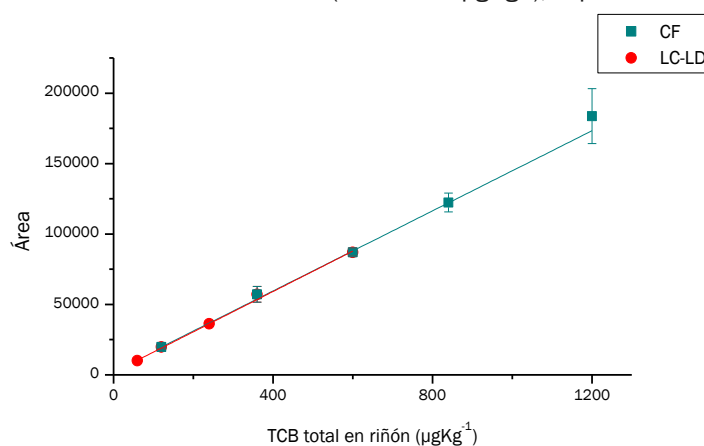


Fig 63. Curvas de fortificados (CF) en rango validado para TCBZ-SO₂ en riñón (120-1200 µgKg⁻¹) y curva para la determinación del LC-LD (60-600 µgKg⁻¹), expresados como KT-TCB.

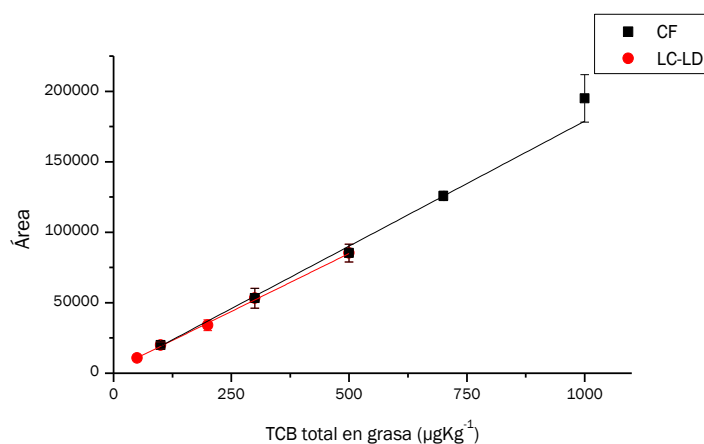


Fig 64. Curvas de fortificados (CF) en rango validado para TCBZ-SO₂ en grasa (100-1000 µgKg⁻¹) y curva para la determinación del LC-LD (50-500 µgKg⁻¹), expresados como KT-TCB.

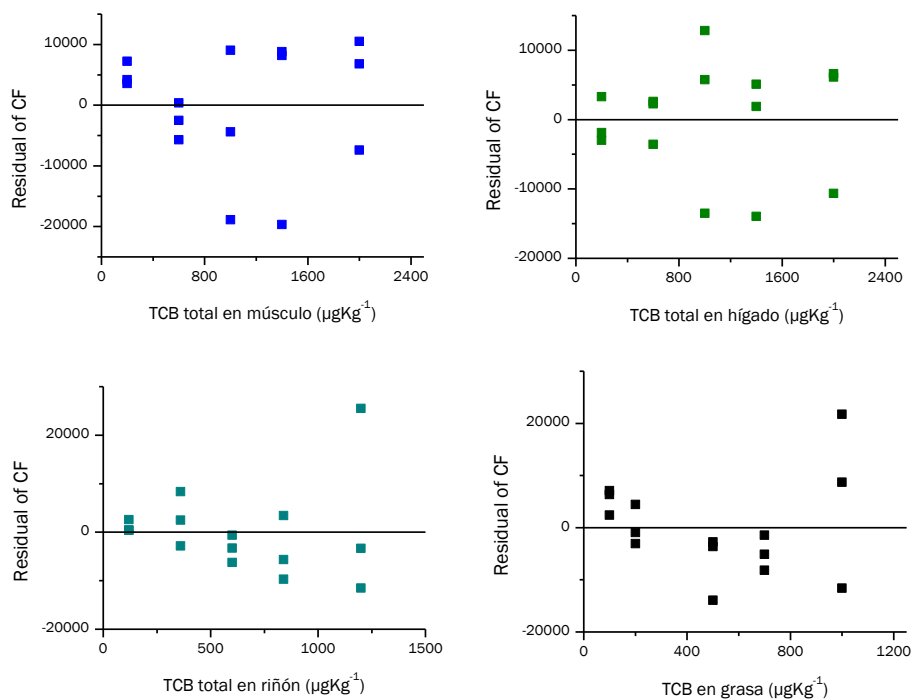


Fig 65. Distribución de los residuos para la curva de fortificados TCBZ-SO₂ en tejidos de bovinos, a la izquierda músculo, al centro hígado y a la derecha riñón.

Tabla 11. Resultados de la validación de la metodología RDSE para TCBZ-SO₂ en tejido de bovinos, resultados expresados como KT-TCBZ.

	N	R	Músculo	Hígado	Riñón	Grasa	
Linealidad estándares	5	3		$y = 220,4x - 3548,6$ $R^2 = 0,999$ $p_{\text{value}} = 8,99 \times 10^{-6}$			
Linealidad fortificados	5	3	$y = 104,4x - 3923,5$ $R^2 = 0,993$ $p_{\text{value}} = 2,13 \times 10^{-4}$	$y = 101,3x + 396,9$ $R^2 = 0,999$ $p_{\text{value}} = 1,704 \times 10^{-6}$	$y = 142,2x + 2681,4$ $R^2 = 0,998$ $p_{\text{value}} = 1,79 \times 10^{-5}$	$y = 177,2x + 1578,0$ $R^2 = 0,997$ $p_{\text{value}} = 1,14 \times 10^{-4}$	
Índice de selectividad	1	6	90,0 %	88,4 %	95,5 %	95,4 %	
Límite de cuantificación	5	3	172,5 µgKg ⁻¹	209,0 µgKg ⁻¹	112,9 µgKg ⁻¹	72,1 µgKg ⁻¹	
Límite de detección	5	3	56,9 µgKg ⁻¹	69,0 µgKg ⁻¹	37,3 µgKg ⁻¹	23,8 µgKg ⁻¹	
Exactitud	3	3	(B) +12,2 %	(B) -8,9 %	(B) -2,6 %	(B) +16,3 %	
			(M) -4,0 %	(M) +4,3 %	(M) -12,2 %	(M) -12,0 %	
			(A) -10,4 %	(A) -3,4 %	(A) -2,0 %	(A) +2,3 %	
Precisión intermedia	3	3	(CV _B) 6,2 %	(CV _B) 10,6 %	(CV _B) 12,6 %	(CV _B) 5,1 %	
			(CV _M) 14,7 %	(CV _M) 4,5 %	(CV _M) 4,7 %	(CV _M) 4,6 %	
			(CV _A) 13,2 %	(CV _A) 4,2 %	(CV _A) 15,0 %	(CV _A) 11,1 %	
Estabilidad de la muestra	2	3	(B _{3s}) +13,2 %	(B _{3s}) -10,1 %	(B _{3s}) -2,2 %	(B _{3s}) +4,3 %	
			(A _{3s}) -12,5 %	(A _{3s}) -9,8 %	(A _{3s}) +6,1 %	(A _{3s}) -6,8 %	

5.2.4 Comparación de eco-eficiencia del método RDSE y el método oficial de la FAO para residuos de triclabendazol en tejidos.

El método para la determinación y confirmación de triclabendazol residual en tejidos, recomendado por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) y la OMS (La Organización Mundial de la Salud) mediante la JECFA (Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios), validado el año 2009, consiste en un método para la determinación de residuos de triclabendazol en distintas especies utilizando la hidrólisis alcalina en una primera etapa, seguida de la acidificación de la solución resultante con HCl 6N y la extracción con diclorometano. Posteriormente el solvente es secado para llevar a cabo un posterior clean-up por reparto entre n-hexano y acetonitrilo. La fase de acetonitrilo es secada y resuspendida en ácido acético/etanol y peróxido de hidrógeno para la oxidación a keto-triclabendazol, luego se lleva a sequedad y se resuspende en diclorometano, para finalmente ser pasada a través de una columna SPE de intercambio aniónico, para posteriormente ser eluido con isopropanol/diclorometano, ser secado y resuspendido con acetonitrilo, para su análisis mediante HPLC-UV. Se comparó mediante la eco-escala (tal como en el caso de residuos de FF), el método oficial y el método desarrollado en el presente trabajo (Tabla 12), donde se aprecia que la ecoeficiencia de la metodología propuesta es considerablemente mejor a la metodología oficial, lo cual junto al excelente nivel de propiedades analíticas alcanzadas (Tabla 11), hacen muy recomendable el uso de RDSE a nivel de laboratorio de rutina.

Tabla 12. Cálculo de eco-escala (RDSE y método de referencia FAO, TCB en tejidos de bovino).

Método RDSE		Método oficial de la FAO	
Reactivos			
HCl (6N) : 1,5 mL	3 pp	HCl (6N) : 2 mL	3 pp
NaOH (30%) : 8 mL	2 pp	NaOH (30%) : 10 mL	4 pp
Cloroformo : 3 mL	4 pp	Diclorometano: 28 mL	8 pp
Trietilamina: 0,2 mL	1 pp	n-Hexano: 8 mL	16 pp
Metanol : 8 mL	8 pp	Acetonitrilo: 12 mL	8 pp
Ác. acético (glacial): 2 mL	2 pp	Ác. acético (glacial): 6 mL	2 pp
H ₂ O ₂ (30%): 0,5 mL	4 pp	Etanol: 12 mL	8 pp
		H ₂ O ₂ (30%): 0,5 mL	4 p
Instrumental			
Agitador calefaccionado	1 pp	Baño calefactor	2 pp
Agitador	1 pp	Cámara de vacío	3 pp
Centrifuga	1 pp	Riesgo	3 pp
LC-DAD	1 pp	LC-UV	2 pp
Desechos	3 pp	Desechos	8 pp
Suma puntos penalización	31 pp	Suma puntos penalización	71 pp
Eco-escala	69	Eco-escala	29

5.2.5 Estudio de depleción de residuos para triclabendazol en bovinos.

Se utilizaron las mismas condiciones y manejo de animales descritas en la depleción de residuos para florfenicol (4.1.4). El día del tratamiento (día 0), se administró con una dosis de 12 mgKg^{-1} PV de triclabendazol oral mediante Trisuvet® (10% triclabendazol en suspensión oral). Transcurridos “N” días desde el día 0, se realizó el primer muestreo y las muestras se analizaron mediante la metodología propuesta en los sucesivos puntos de muestreo (N+7, N+10, N+14 y N+21 días).

La determinación del período de resguardo se realizó analizando los resultados obtenidos mediante regresión logarítmica, utilizando el programa computacional WT 1.4 (95% de confianza, $p_{\text{value}} > 0,05$ para F de Fisher y C de pruebas de Fishser F y C de Cochran), se consideraron los LMR propuestos por la EMA.

Para riñón se obtuvo $298 \pm 136 \text{ } \mu\text{gKg}^{-1}$ el día N y concentraciones $< \text{LC}$ y $< \text{LD}$ los días posteriores, descartándose el análisis de eliminación exponencial para los datos que se encontraron siempre $< \text{LMR}$ ($150 \text{ } \mu\text{gKg}^{-1}$) desde N+7 en adelante). El periodo de resguardo se encuentra determinado por matrices músculo e hígado, en que se calculó un periodo aproximado al entero superior de N+16 días, mientras que para la matriz grasa se obtuvo periodo de N+14 días. (Figura 66)

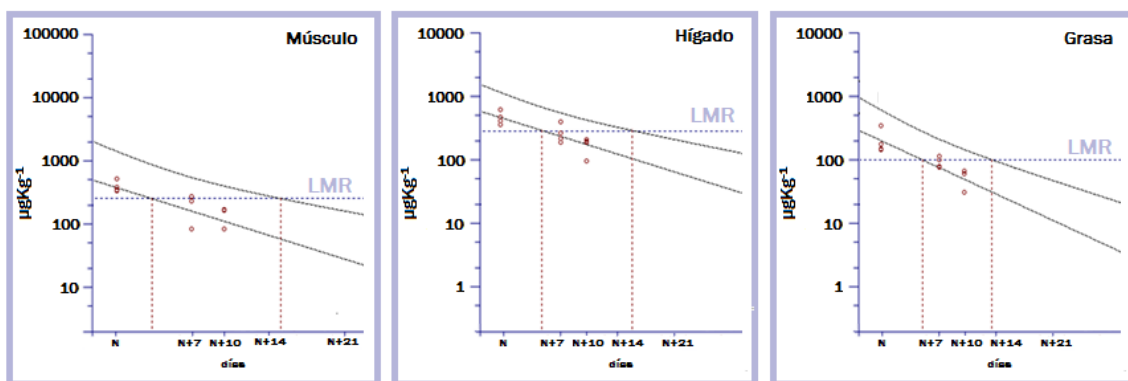


Fig 66. Regresiones logarítmicas utilizando el programa WT 1.4 para los resultados del ensayo de depleción de residuos para Trisuvet 10% triclabendazol oral en bovinos.

5.3 Determinación de fármacos residuales en leche.

5.3.1 Enrofloxacin, oxitetraciclina, sulfadoxina y trimetoprima.

Para el desarrollo de la metodología RDSE aplicada a un sistema compuesto por antibióticos de uso veterinario en leche bovina destinada al consumo humano, se seleccionaron seis analitos: oxitetraciclina (OTC), su epimero 4epi-oxitetraciclina (4E-OTC), enrofloxacin (EFX), su metabolito activo ciprofloxacino (CFX), sulfadoxina (SDX) y trimetoprima (TMP), todos antibióticos permitidos para su uso en vacas productoras de leche, cuyos LMR se encuentran entre los 50-100 μgKg^{-1} .

Como análisis preliminar se seleccionaron siete fases sorbentes para comparar RDSE con 90 minutos de extracción y elución (metanol), para los seis analitos desde una solución compuesta por el buffer de McIlvaine (pH 4) en ausencia de la matriz leche. El buffer está compuesto por ácido cítrico, fosfato y EDTA para la complejación del calcio y así evitar la quelación de las tetraciclinas.

En la figura 67, se observa la comparación de las fases: octacil (C8), octadecil (C18), cianopropil (CN-P), estireno-divinilbenceno (e-DVB), florisil (FLO), divinilbenceno-N-vinilpirrolidona (HLB) y silica (Sil).

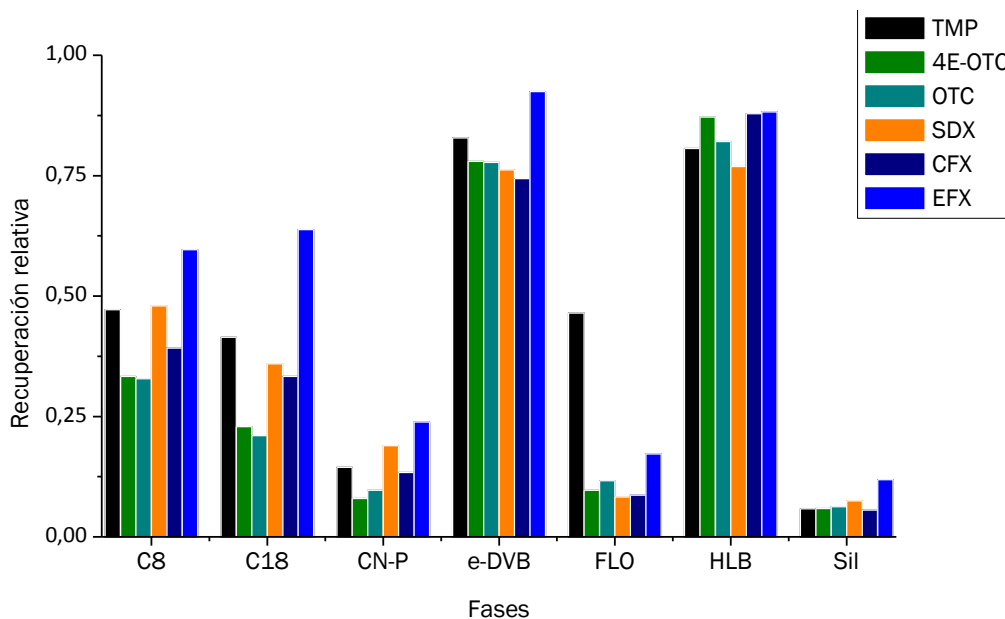


Fig 67. Comparación de fases sorbentes en RDSE para antibióticos en ausencia de la matriz leche para un equivalente de 200 ngmL^{-1} de los estándares en su resuspensión en 2 mL.

A partir de la comparación de fases sorbentes se seleccionaron las que produjeron la mayor recuperación de los seis analitos (HLB y e-DVB), luego se realizó una extracción comparativa en presencia de leche entera (2 g), donde la extracción mediante la fase sorbente HLB mostró un mayor nivel de interferencias espectrales que la fase e-DVB a lo largo del análisis de 40 minutos (Figura 68).

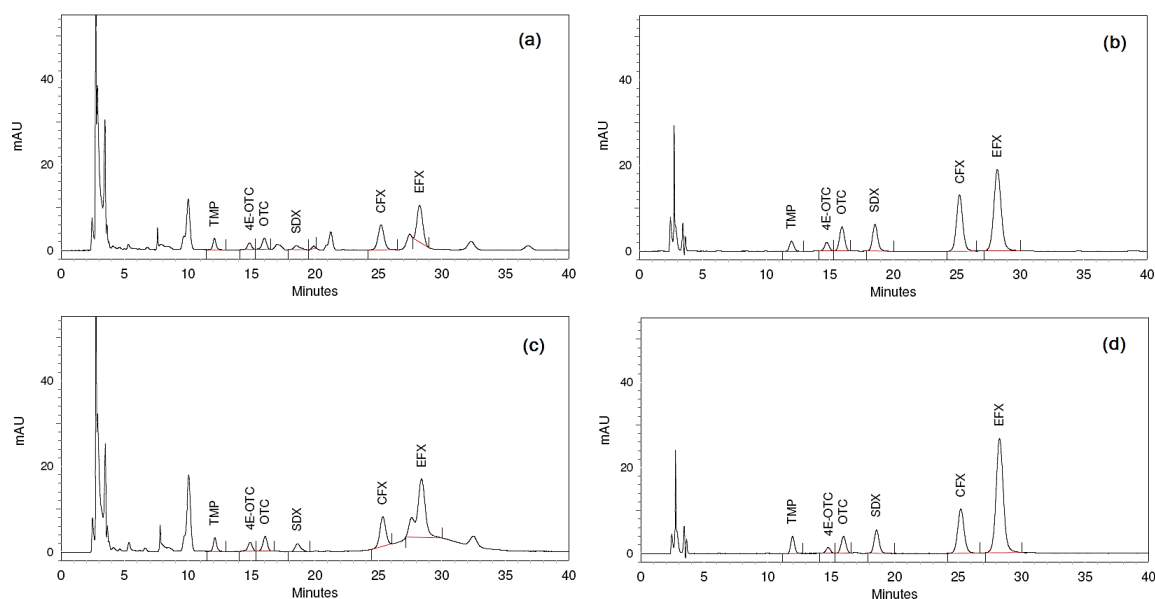


Fig 68. Cromatogramas comparativos de RDSE en el sistema de antibióticos en leche (equivalente a 200 ng mL^{-1}); (a) HLB en presencia de 2 g de leche, (b) HLB en ausencia de la matriz leche, (c) e-DVB en presencia de 2 g de leche, (d) e-DVB en ausencia de la matriz leche,

A partir de los resultados con leche se optó por continuar utilizando la fase sorbente e-DVB y dada la menor cantidad de interferentes durante la cromatografía se cambió la composición de la fase móvil desde $\text{TFA}_{0,2\%}/\text{MeOH}/\text{ACN}$ (21:2:2) a $\text{TFA}_{0,2\%}/\text{MeOH}/\text{ACN}$ (20:3:2), el aumento de la proporción orgánica permitió reducir el tiempo de análisis desde 40 a 30 minutos, aun en presencia de interferentes propios de la matriz leche para el caso de e-DVB.

Con las nuevas condiciones cromatográficas se ensayó la extracción desde leche entera fortificada a $200 \mu\text{g Kg}^{-1}$ y se analizaron los perfiles espectrales de los antibióticos 260-390 nm, donde para el tramo entre 8 a 24 minutos, no se observan interferencias espectrales para su identificación (Figura 69).

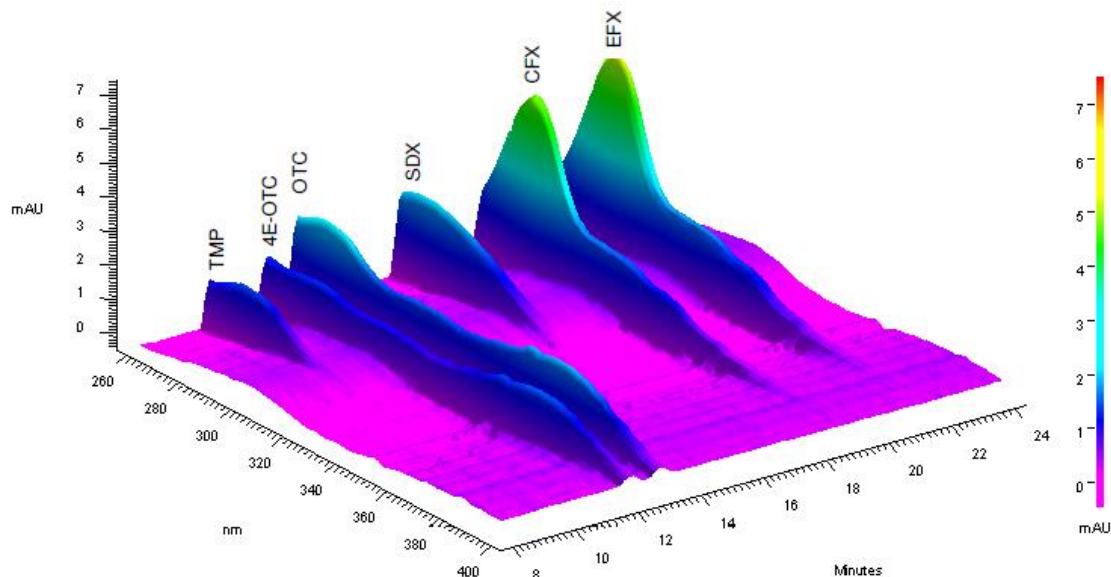


Fig 69. Espectro 3D-DAD (min x nm x mAU) para los antibióticos extraídos con RDSE-eDVB desde leche entera ($200 \mu\text{gKg}^{-1}$), en el rango 260-390 nm y 8-24 min de análisis.

A pesar de la utilización del buffer de McIlvaine (pH 4) para 2 g de leche en la etapa preparativa y la posterior centrifugación de la muestra, el sobrenadante mantiene una gran cantidad de material sólido que no precipita en la etapa de centrifugación previa a RDSE. Este material se impregna en la membrana del disco provocando gran variabilidad entre los ensayos con leche entera, de modo que para optimizar la etapa de clean-up previa a RDSE, se agregó ácido tricloroacético (TCA) como precipitante de proteínas y aprovechando su solubilidad en fases orgánicas se comparó su utilización en ausencia y presencia de distintos disolventes orgánicos de baja polaridad (diclorometano, cloroformo y éter dietílico) para remover material lipídico y proteico de la muestra durante la centrifugación.

Al utilizar TCA 50% (200 a 1000 μL) sobre las muestras de leche diluidas en el buffer, no se observó una eliminación del material floculante, por otro lado se adicionaron cantidades crecientes de los solventes orgánicos hasta obtener un sobrenadante que se mantuviera separado de la porción precipitada, lo que se logró con recién con 1-3 mL de los disolventes para 2 g de leche y 10 mL del buffer. Por otro lado al adicionar 400 μL de TCA 50%, permitió utilizar 500 μL de disolvente para separar completamente el material floculante desde el sobrenadante. En seguida, se estudió el efecto de los solventes sobre la recuperación de los analitos, utilizando 400 μL de TCA 50% y 500 μL diclorometano, cloroformo y éter dietílico respectivamente, sobre

leche entera fortificada a $200 \mu\text{gKg}^{-1}$ de los analitos, obteniéndose la mejor recuperación normalizada con diclorometano (Figura 70).

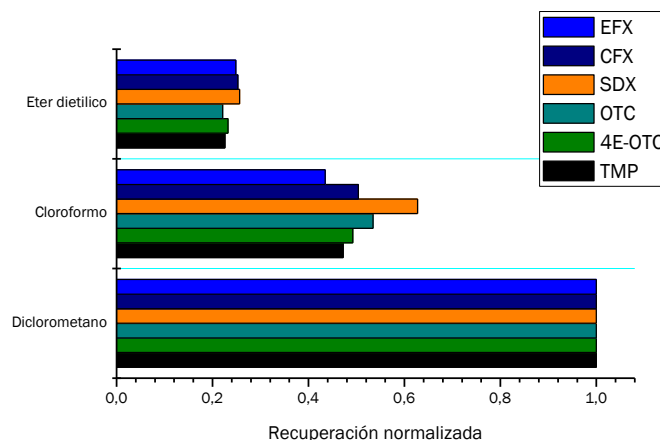


Fig 70. Efecto de los disolventes cloroformo, diclorometano y éter dietilico en el *clean-up* previo a RDSE, y su efecto sobre la recuperación normalizada para los seis analitos en leche.

Para obtener señales cuantificables para todos los analitos estudiados al nivel de $50 \mu\text{gKg}^{-1}$, se elevó la alícuota de leche a 4 g, para de esta manera obtener un factor de concentración total de 2 ($\text{FC}=2$). Considerando la fotosensibilidad y oxidación de las tetraciclinas, no se lleva a sequedad el extracto final, de modo que se evapora hasta 1 mL, con nitrógeno en tubos ámbar cónicos graduados, para luego llevarlos a 2 mL con TFA 0,2% (Componente acuoso de la fase móvil).

Para determinar la cantidad de TCA, diclorometano, buffer y dilución óptimos durante la extracción se utilizó un diseño de compuesto central ($2^k + 2k + 2$), centrado en las caras y con dos centros. Los factores experimentales utilizados fueron la cantidad de buffer (5 - 7 - 9 mL), la cantidad de $\text{TCA}_{50\%}$ en diclorometano (300 - 600 - 900 μL) y para la dilución la cantidad de agua adicionada sobre el sobrenadante resultante de la centrifugación (0 - 5 - 10 mL).

Mediante los resultados de los 16 experimentos se obtuvieron efectos significativos para TMP, 4E-OTC, CFX y EFX con un 95% de confianza. Mediante la superficie de respuesta combinada para los seis analitos, se obtuvieron los valores óptimos para las variables, al maximizar la deseabilidad del diseño (Figura 71); Buffer = 1,0 (9 mL del buffer), Dilución = -0,075 (4,6 mL de agua después de centrifugar) y TCA en diclorometano = -0,133 (460 μL $\text{TCA}_{50\%}$ en CH_2Cl_2).

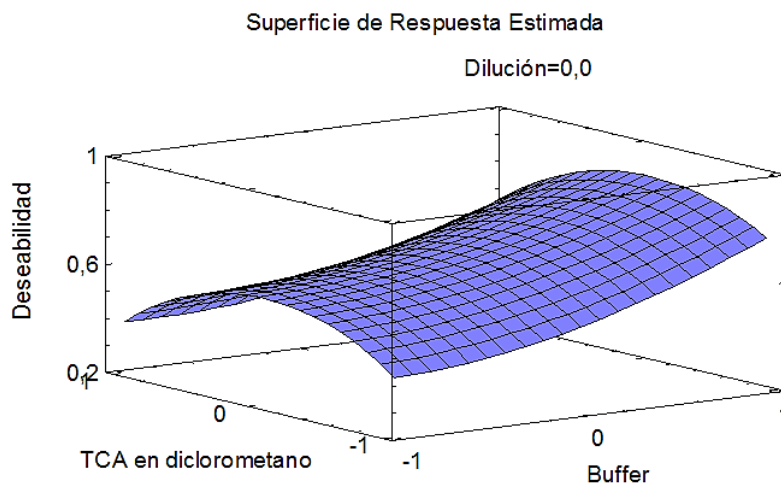


Fig 71. Superficie de respuesta #1, para la optimización del clean-up de las muestras de leche fortificadas con los seis analitos ($200 \mu\text{Kg}^{-1}$).

El método optimizado, aplicado en leche obtuvo recuperaciones $> 80\%$ para TMP, CFX y EFX, y recuperaciones $< 70\%$ para 4E-OTC, OTC y SDX (No cumpliría el criterio de aceptación para su validación). Una explicación es que al pH del buffer utilizado, 4E-OTC, OTC y SDX se encuentran neutros a diferencia de TMP, CFX y EFX, de modo que es posible que al centrifugar se pierda las especies neutras que presenten afinidad con las proteínas y/o la grasa de la leche.

Por otro lado, se observó en muestras de leche que al disminuir el pH se logra el mismo efecto visual que al usar TCA/diclorometano, probablemente porque precipitan proteínas que aún se mantenían en solución al pH del buffer, además la LogD indica que a un $\text{pH} < 3$ los analitos se encuentran ionizados, de modo que esto ayudaría a que se mantuvieran en la fase acuosa.

Para acidificar la solución no se puede disminuir el pH del buffer que contiene el EDTA estable a pH 4, de modo que se adoptó como estrategia para el estudio, aplicar el buffer pH 4 a la leche, acidificar con HCL 6N (gotas), agitar y sónico las muestras y luego centrifugarlas para su extracción por RDSE.

Se estudió la adición de HCL 6N (1 a 3 gotas) en las condiciones de dilución obtenidas en la optimización anterior, reemplazando el TCA_{50%} en diclorometano por TCA_{50%} en agua, utilizando un diseño de compuesto central ($2^k + 2k + 2$), centrado en las caras y con dos centros, para HCL 6N (1 – 2 – 3 gotas), TCA_{50%} en agua (0 – 250 – 500 μL). Mediante los resultados de los 10 experimentos se obtuvieron efectos significativos para los seis analitos con un 95% de confianza. Mediante el diseño se realizó una superficie de respuesta combinada para los seis analitos, donde se obtuvieron los

valores óptimos para las variables al maximizar la deseabilidad del diseño (Figura 72); HCl 6N = 1,0 (3 gotas), TCA 50% = 1,0 (500 μ L TCA_{50%} en agua).

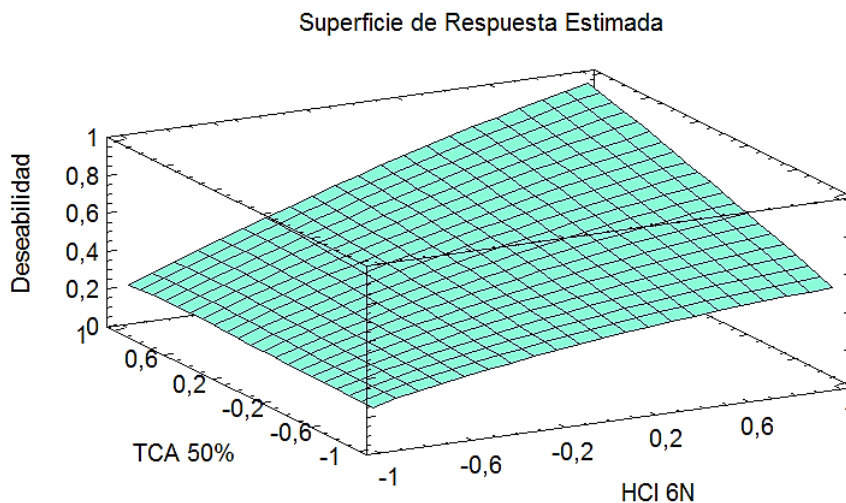


Fig 72. Superficie de respuesta #2, para la optimización del clean-up de las muestras de leche fortificadas con los seis analitos ($200 \mu\text{gKg}^{-1}$).

El método optimizado en este caso permite obtener recuperaciones $> 80\%$ para los seis analitos estudiados, de manera que se realizó el perfil de recuperación para distintos tiempos de extracción del método (Figura 73).

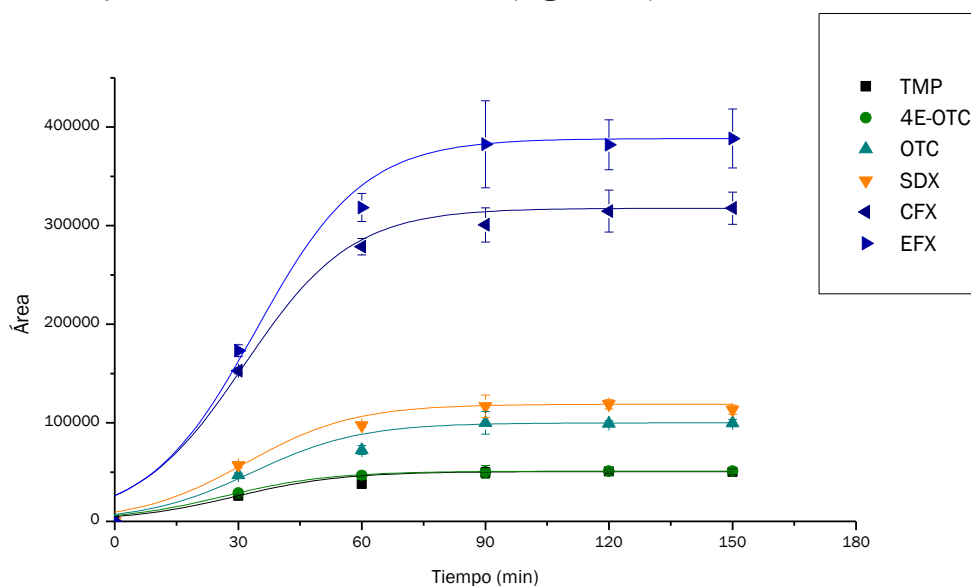


Fig 73. Perfil RDSE-eDVB para los seis antibióticos ($100 \mu\text{gKg}^{-1}$) en de 4 g leche ($\text{FC}=2$), utilizando las condiciones optimizadas.

Para el método propuesto, utilizando 4 g de leche entera, 9 mL de buffer, 500 μL de $\text{TCA}_{50\%}$, 3 gotas de HCL 6N y agregando 5 mL de agua al sobrenadante posterior a la centrifugación, se utilizó el RDSE-eDVB por 100 minutos como tiempo de extracción y de 60 minutos elución, se observan cromatogramas representativos para la extracción de 100 y 200 μgKg^{-1} de los antibióticos respectivamente (Figura 74).

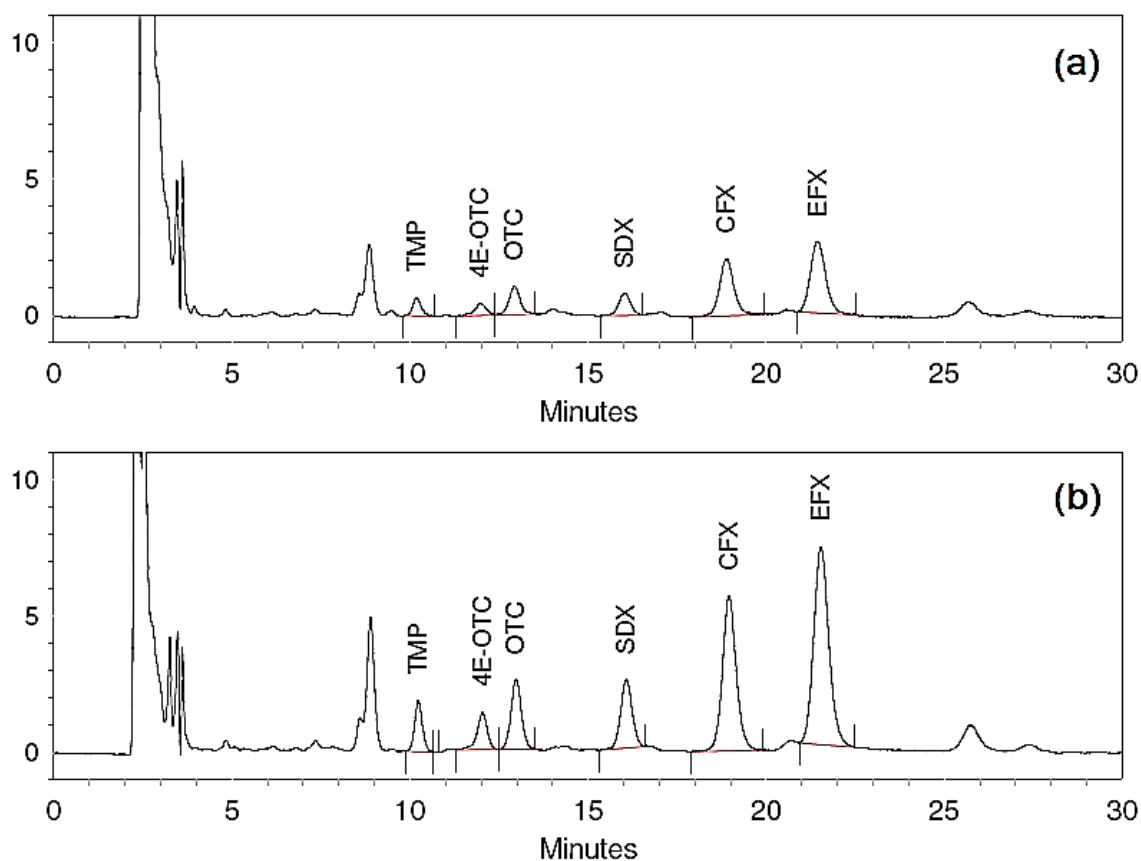


Fig 74. Cromatogramas (280 nm) método RDSE-eDVB aplicado en muestras de leche fortificadas; (a) 100 μgKg^{-1} , (b) 200 μgKg^{-1} para los seis analitos en leche (FC=2).

Se realizó la validación del método propuesto, obteniendo las curvas de fortificado y gráficos de los residuos para los seis analitos estudiados (Figuras 75 a la 80). Además se validaron todos los parámetros analíticos descritos en la sección 3.6 (Tabla 13), donde se demuestra que el rango utilizado para los seis analitos permiten obtener recuperaciones cuantitativas en todo el rango validado en el que se incluyen los LMR de todas las especies estudiadas.

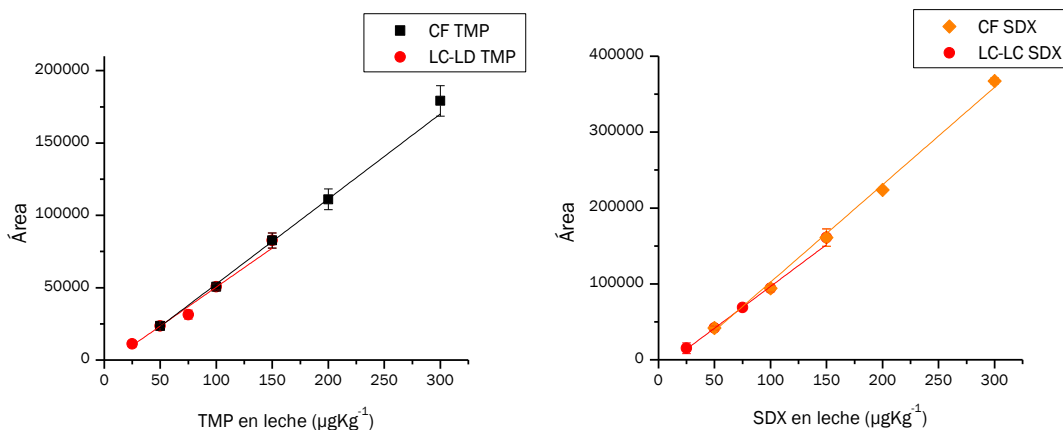


Fig 75. Curvas de fortificados (CF) en rango validado para TMP y SDX en leche (50-300 μgKg^{-1}) y curvas para la determinación de los LC-LD (25-150 μgKg^{-1}).

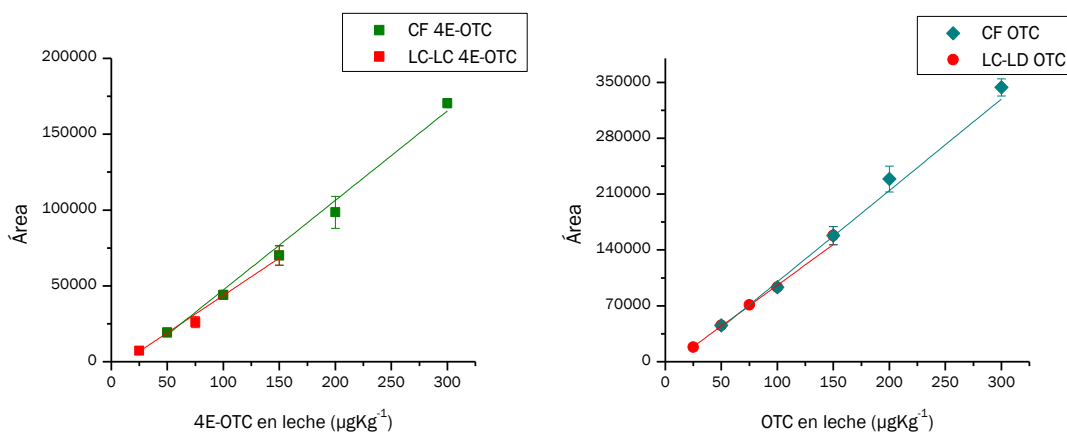


Fig 76. Curvas de fortificados (CF) en rango validado para 4E-OTC y OTC en leche (50-300 μgKg^{-1}) y curvas para la determinación de los LC-LD (25-150 μgKg^{-1}).

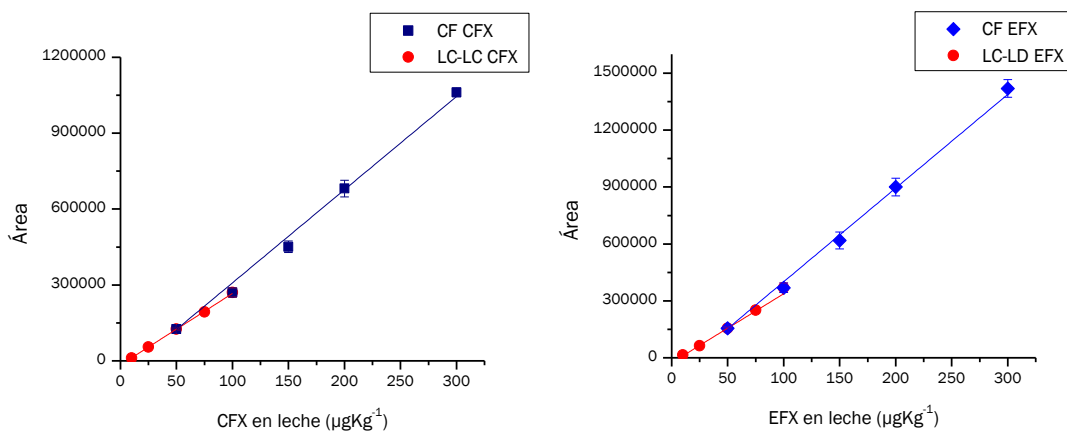


Fig 77. Curvas de fortificados (CF) en rango validado para CFX y EFX en leche (50-300 μgKg^{-1}) y curvas para la determinación de los LC-LD (10-100 μgKg^{-1}).

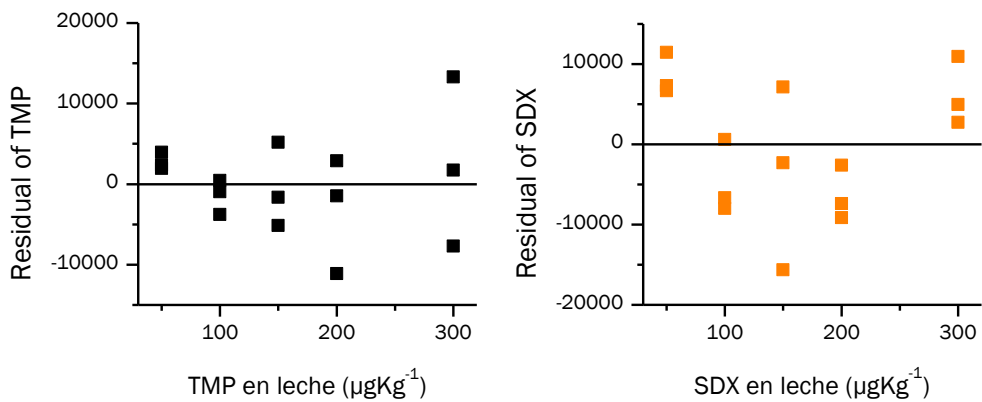


Fig 78. Distribución de los residuos para TMP y SDX en leche.

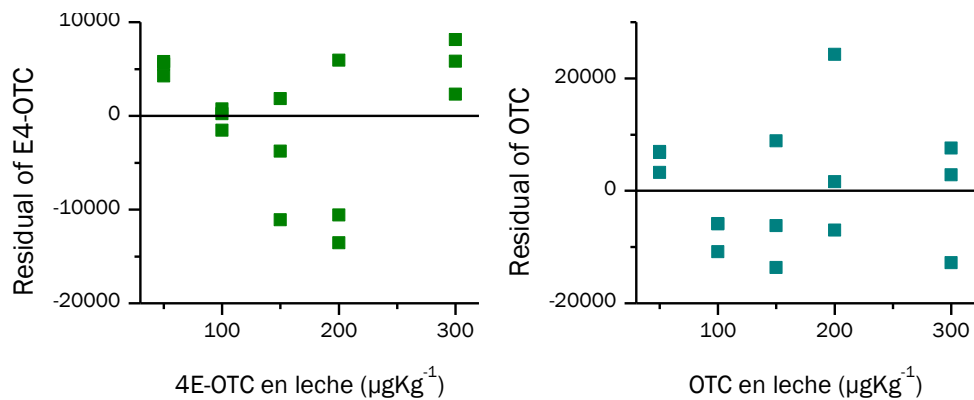


Fig 79. Distribución de los residuos para 4E-OTC y OTC en leche.

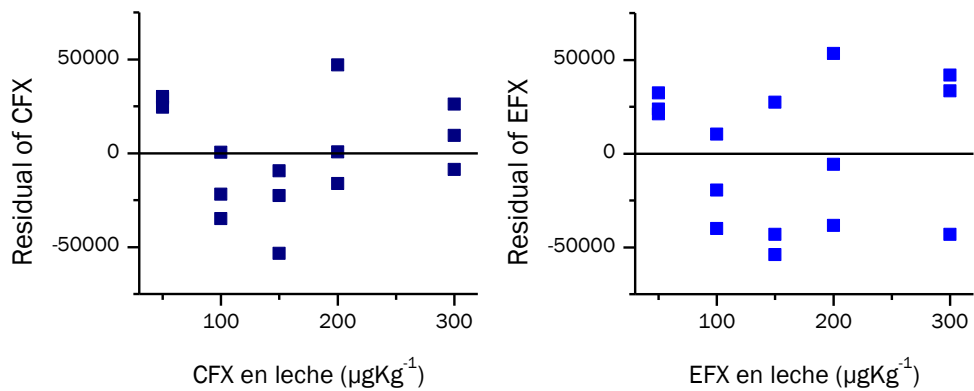


Fig 80. Distribución de los residuos para CFX y EFX en leche.

Tabla 13. Resultados de la validación de la metodología RDSE para antibióticos en leche.

	N	R	TMP	4E-OTC	OTC
Linealidad estándares	5	3	$y = 297,8x - 8059,2$ $R^2 = 0,997$ $p_{\text{value}} = 6,79 \times 10^{-5}$	$y = 324,8x - 12917,6$ $R^2 = 0,998$ $p_{\text{value}} = 1,79 \times 10^{-5}$	$y = 966,2x - 25430,1$ $R^2 = 0,996$ $p_{\text{value}} = 8,91 \times 10^{-5}$
Linealidad fortificados	5	3	$y = 587,6x - 6280,7$ $R^2 = 0,996$ $p_{\text{value}} = 7,71 \times 10^{-5}$	$y = 590,3x - 11678,6$ $R^2 = 0,994$ $p_{\text{value}} = 1,85 \times 10^{-4}$	$y = 1145,3x - 14562,1$ $R^2 = 0,990$ $p_{\text{value}} = 4,15 \times 10^{-4}$
Índice de selectividad	1	6	88,4 %	93,3 %	99,7 %
Límite de cuantificación	5	3	33,4 μgKg^{-1}	33,3 μgKg^{-1}	27,5 μgKg^{-1}
Límite de detección	5	3	11,0 μgKg^{-1}	10,9 μgKg^{-1}	9,1 μgKg^{-1}
Exactitud	3	3	(B) +2,8 %	(B) -14,5 %	(B) +4,9 %
			(M) +0,5 %	(M) -17,2 %	(M) -5,2 %
			(A) +3,6 %	(A) +0,6 %	(A) -1,8 %
Precisión intermedia	3	3	(CV _B) 9,9 %	(CV _B) 9,8 %	(CV _B) 3,9 %
			(CV _M) 7,2 %	(CV _M) 9,2 %	(CV _M) 4,2 %
			(CV _A) 5,3 %	(CV _A) 7,1 %	(CV _A) 3,9 %
Estabilidad de la muestra	2	3	(B _{4S}) +7,4 %	(B _{4S}) -11,0 %	(B _{4S}) +6,9 %
			(A _{4S}) +5,8 %	(A _{4S}) -4,7 %	(A _{4S}) -4,5 %
			SDX	CFX	EFX
Linealidad estándares	5	3	$y = 686,1x + 16867,8$ $R^2 = 0,996$ $p_{\text{value}} = 1,28 \times 10^{-4}$	$y = 1916,0x - 57235,2$ $R^2 = 0,997$ $p_{\text{value}} = 7,96 \times 10^{-5}$	$y = 2263,9x - 59153,0$ $R^2 = 0,997$ $p_{\text{value}} = 1,21 \times 10^{-4}$
Linealidad fortificados	5	3	$y = 1284,0x - 26105,5$ $R^2 = 0,997$ $p_{\text{value}} = 6,03 \times 10^{-5}$	$y = 3682,6x - 59754,4$ $R^2 = 0,997$ $p_{\text{value}} = 6,24 \times 10^{-4}$	$y = 4937,3x - 92918,6$ $R^2 = 0,997$ $p_{\text{value}} = 4,73 \times 10^{-5}$
Índice de selectividad	1	6	96,8 %	99,2 %	94,6 %
Límite de cuantificación	5	3	46,6 μgKg^{-1}	9,2 μgKg^{-1}	10,7 μgKg^{-1}
Límite de detección	5	3	15,4 μgKg^{-1}	3,0 μgKg^{-1}	3,5 μgKg^{-1}
Exactitud	3	3	(B) -12,8 %	(B) +0,5 %	(B) +6,4 %
			(M) -12,6 %	(M) -12,6 %	(M) -3,8 %
			(A) -5,5 %	(A) -2,2 %	(A) +1,4 %
Precisión intermedia	3	3	(CV _B) 7,9 %	(CV _B) 7,9 %	(CV _B) 3,7 %
			(CV _M) 6,1 %	(CV _M) 3,3 %	(CV _M) 4,2 %
			(CV _A) 3,1 %	(CV _A) 4,1 %	(CV _A) 4,8 %
Estabilidad de la muestra	2	3	(B _{4S}) -7,1 %	(B _{4S}) +4,6 %	(B _{4S}) +9,5 %
			(A _{4S}) -10,6 %	(A _{4S}) -4,2 %	(A _{4S}) +1,0 %

El método propuesto cumple con los parámetros analíticos para ser utilizado en estudios de depleción de residuos, en los seis analitos estudiados se alcanzan LC inferiores a los LMR. No obstante, la preocupación por el creciente consumo de productos lácteos en países desarrollados, hace pensar en la posibilidad de que en el mediano plazo, nuevos estudios respecto a la tolerancia a los residuos en leche impliquen la disminución de los LMR o incluso nuevas prohibiciones, que den lugar a la necesidad de cuantificar concentraciones inferiores a las actuales.

Teniendo lo anterior en consideración, se evaluaron los LC y LD del método propuesto analizando los extractos mediante la detección por espectrometría de masas en un equipo uHPLC-TOF, donde se utilizó una fuente de ionización ESI (+). La fase móvil fue ácido fórmico 0,1 M/acetonitrilo (4:1), una columna RP-C₁₈ HRes 50 mm x 2,7 cm x 1.9 μm (Browlee). Se optimizaron los parámetros de ionización y de la trampa iónica para la lectura de los iones: $m/z = 291,15$ [TMP-H⁺], $m/z = 461,16$ [OTC-H⁺] y [4EOTC-H⁺], $m/z = 311,08$ [SDX-H⁺], $m/z = 332,14$ [CFX-H⁺] y $m/z = 360,17$ [EFX-H⁺], cromatogramas representativos en la figura 81.

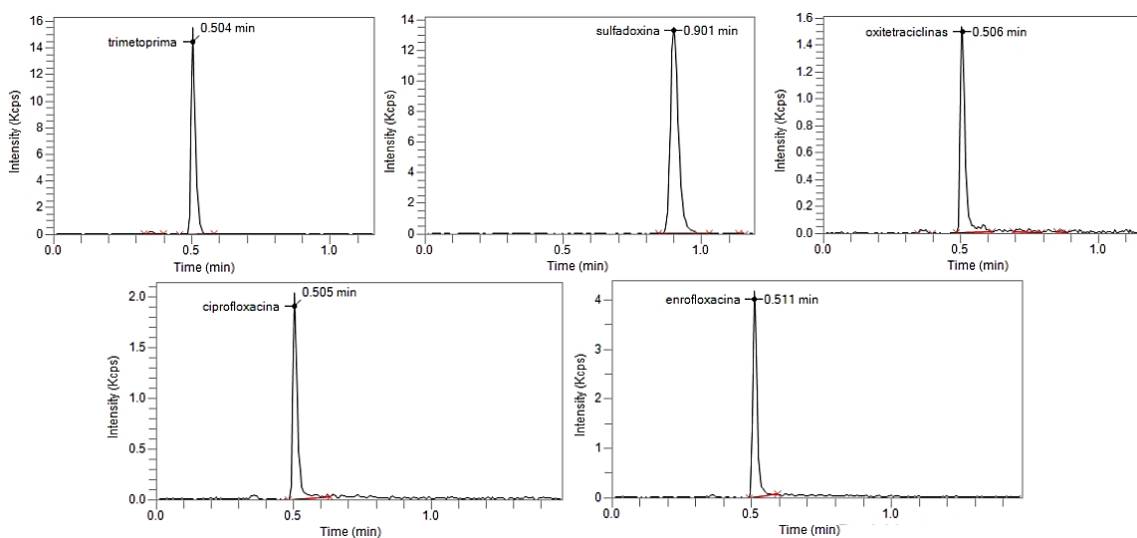


Fig 81. Cromatogramas por uHPLC-TOF método RDSE-eDVB aplicado en muestras de leche fortificada con $25 \mu\text{gKg}^{-1}$ para los analitos TMP, SDX, CFX y EFX; para OTC y 4E-OTC se mide la suma de ambas con $50 \mu\text{gKg}^{-1}$, (FC=2).

Para calcular los LC y LD se realizaron curvas de fortificados en leche, 2 a $25 \mu\text{gKg}^{-1}$ para TMP y SDX, 5 a $50 \mu\text{gKg}^{-1}$ para CFX y EFX; 10 a $100 \mu\text{gKg}^{-1}$ para la suma de 4EOTC y OTC. Los LC y LD calculados y comparados con HPLC-DAD en la tabla 14, muestra que en algunos analitos se obtienen LC y LD significativamente más bajos al utilizar UHPLC-TOF para la cuantificación, sin realizar ningún cambio en la RDSE.

Tabla 14. LC y LD (μgKg^{-1}), RDSE para antibióticos en leche, analizadas por HPLC-DAD y UHPLC-TOF

Analitos		TMP	SDX	CFX	EFX	4E-OTC	OTC
HPLC-DAD	LC	33,4	46,6	9,2	10,7	33,3	27,5
	LD	11,0	15,4	3,0	3,5	10,9	9,1
UHPLC-TOF	LC	4,4	2,4	7,3	4,2	14,6	
	LD	1,4	0,8	2,4	1,4	4,8	

5.3.2 Closantel.

Para el desarrollo de la metodología RDSE aplicada a un sistema compuesto por antiparasitarios de uso veterinario en leche bovina destinada al consumo humano, se seleccionó el antiparasitario closantel, de naturaleza apolar ($\text{Log } P=7,71$). Como estrategia de *clean-up* no es posible realizar directamente la extracción en fase acuosa desde la matriz leche. En este sentido se estudió la utilización de solventes orgánicos en la extracción inicial, seguida de la dilución y *clean-up* mediante RDSE, para su posterior análisis por HPLC con detector de fluorescencia, utilizando una longitud de 335 nm de excitación y 510 nm de emisión.

Los ensayos preliminares a distintos pH, indicaron una baja recuperación (<5%) en la parte acuosa, además de mucha variabilidad en las mismas condiciones ($\text{CV}>50\%$).

En base a las estrategias existentes en la literatura, en que se utilizan mezclas de solventes sobre la leche y una posterior dilución para SPE como *clean-up*, se utilizó 4 mL de solvente orgánico (acetonitrilo, metanol y acetona) para 4 g de leche fortificada con $100 \mu\text{gKg}^{-1}$ de closantel, se sónico, agitó y centrifugó, el sobrenadante obtenido se diluyó con 10 mL de agua y se compararon 4 fases sorbentes (C_8 , C_{18} , eDVB y HLB), con 90 minutos de extracción y elución por RDSE (Figura 82).

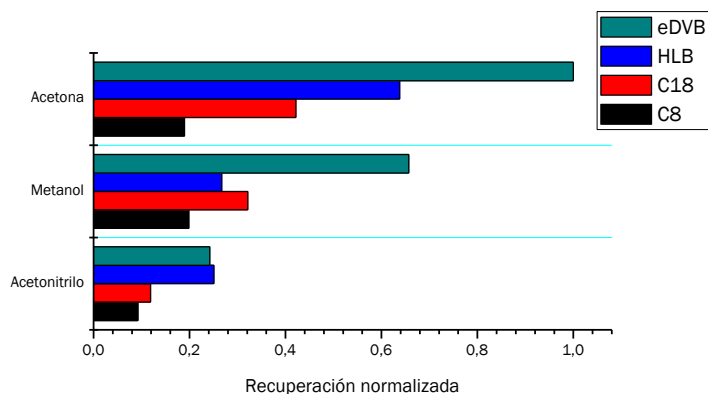


Fig 82. Efecto de los disolventes acetonitrilo, metanol y acetona en el *clean-up* previo a RDSE, y su efecto sobre la recuperación normalizada para 4 fases sorbentes para closantel en leche.

A partir de los resultados preliminares se eligió la fase sorbente e-DVB. En seguida se realizó un diseño factorial a cinco niveles para optimizar la naturaleza y proporción del solvente (entre metanol y acetona) y la cantidad de agua adicionada a la muestra. Se consideró un volumen de 4 mL de solvente, variando la proporción entre acetona/metanol (100% - 75% - 50% - 25% - 0%) y de 3 niveles para la cantidad de agua adicionada a la muestra (5 - 10 - 15 mL), con un total de 15 experimentos.

En la figura 83 se observa un máximo en la dilución y un efecto significativo de la proporción acetona/metanol. Los valores óptimos fueron: Dilución=0,2 (11 mL) y para acetona/metanol=0,57 (2,9 mL de acetona y 1,1 mL de metanol).

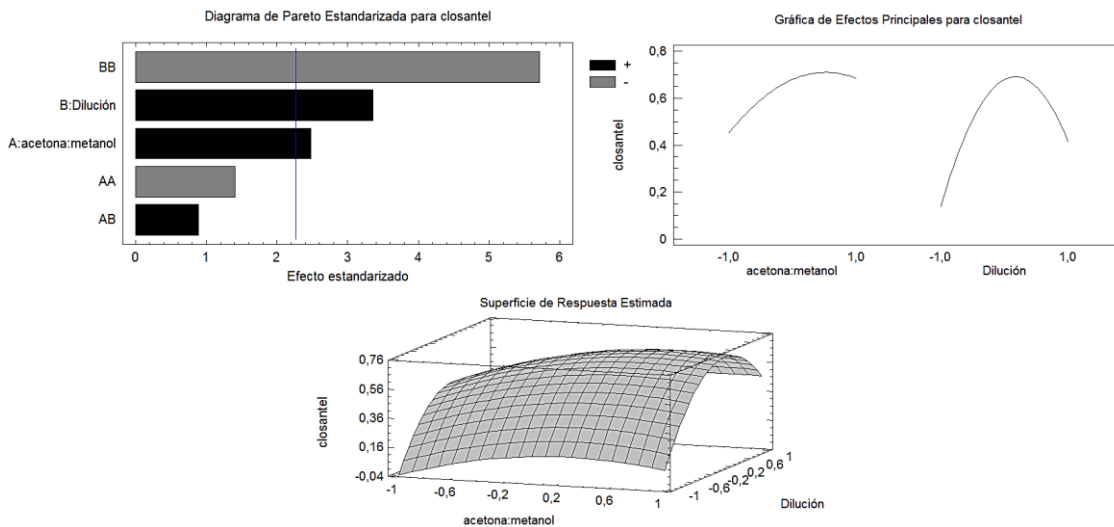


Fig 83. Resultados del diseño experimental para RDSE Closantel en leche ($100 \mu\text{gKg}^{-1}$) con eDVB como fase sorbente, variando la dilución y proporción acetona/metanol; A la izquierda diagrama de Pareto de efectos estandarizados, a la derecha la efectos principales y abajo superficie de respuesta.

Se observa el perfil de extracción para el método en leche (Figura 84), cromatogramas representativos del método (Figura 85). Se realizó la curva de fortificados (Figura 86), gráfica de los residuos (Figura 87) en que se observa una distribución homocedastica, muestran los parámetros analíticos descritos en la sección 3.6 (Tabla 15), donde el LC fue inferior al LMR en leche ($45 \mu\text{gKg}^{-1}$).

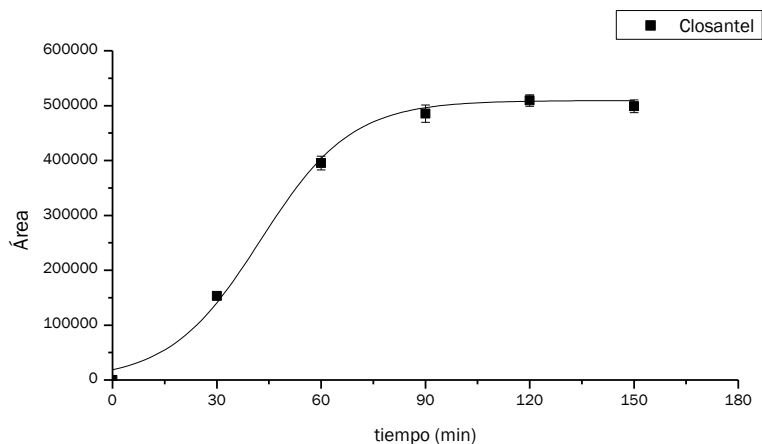


Fig 84. Perfil RDSE-eDVB para closantel ($120 \mu\text{gKg}^{-1}$) en de 2 g leche, utilizando las condiciones optimizadas.

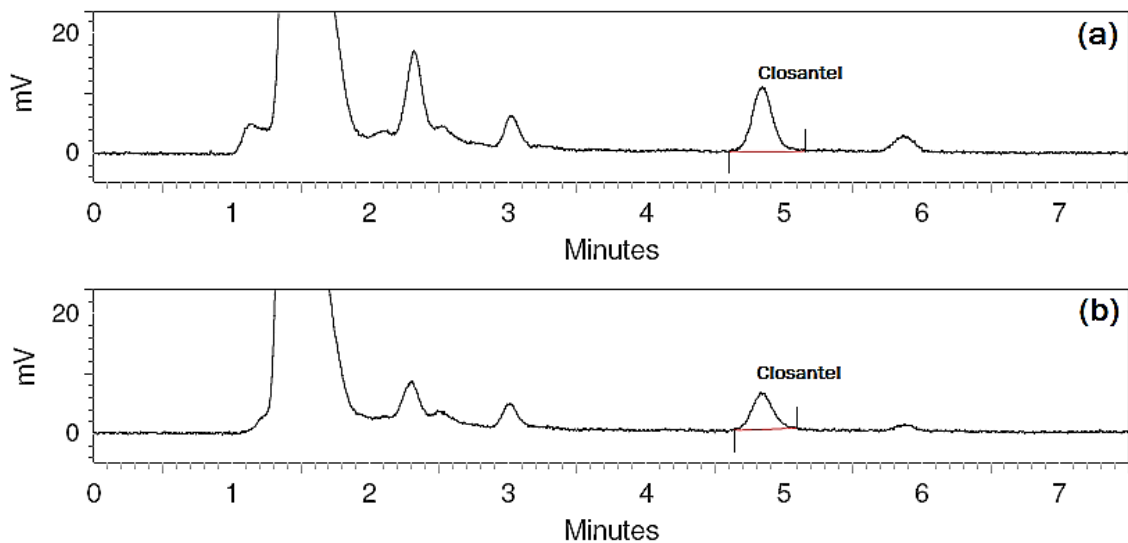


Fig 85. Cromatogramas del método RDSE para closantel en leche por HPLC con detector de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}}=335\text{nm}$ $\lambda_{\text{em}}=510\text{ nm}$); (a) closantel a $120\ \mu\text{gKg}^{-1}$ y (b) closantel a $60\ \mu\text{gKg}^{-1}$.

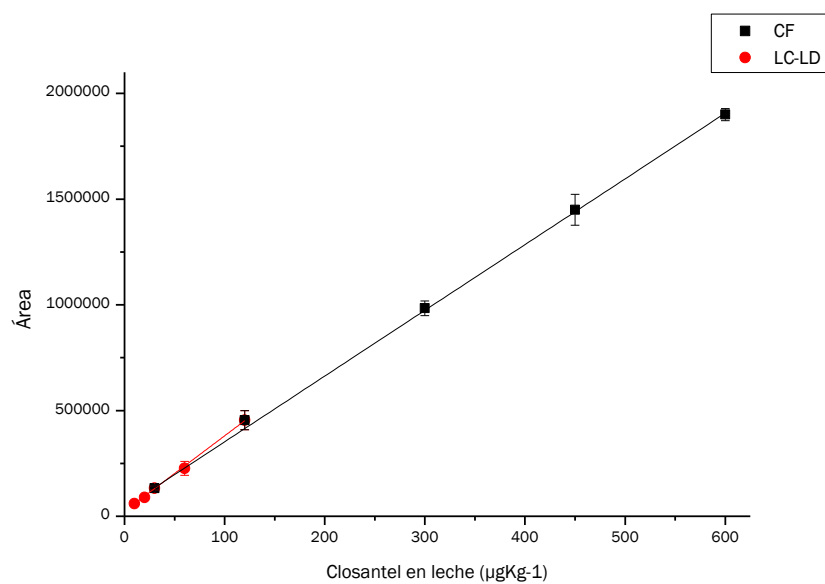


Fig 86. Curva de fortificados (CF) para closantel en leche ($30\text{-}600\ \mu\text{gKg}^{-1}$) y curva para la determinación del LC-LD ($10\text{-}120\ \mu\text{gKg}^{-1}$).

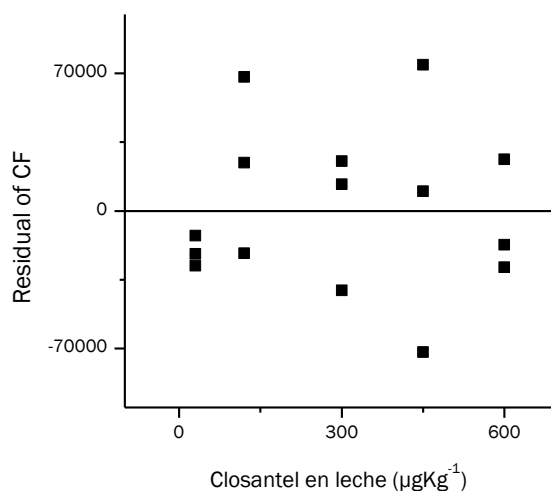


Fig 87. Distribución de los residuos para la curva de fortificados CF de closantel en leche.

Tabla 15. Resultados de la validación de la metodología RDSE para closantel en leche.

	Niveles	Replicas	Resultados
Linealidad estándares	5	3	$y = 3561,7x + 39022,8$
			$R^2 = 0,993$
			$p_{\text{value}} = 2,42 \times 10^{-4}$
Linealidad fortificados	5	3	$y = 3108,7x + 41384,9$
			$R^2 = 0,999$
			$p_{\text{value}} = 8,02 \times 10^{-6}$
Índice de selectividad	1	6	84,9 %
Límite de cuantificación	5	3	17,6 μgKg^{-1}
Límite de detección	5	3	5,8 μgKg^{-1}
Exactitud	3	3	(B) -11,7 %
			(M) -11,6 %
			(A) -12,9 %
Precisión intermedia	3	3	(CV _B) 4,6 %
			(CV _M) 4,9 %
			(CV _A) 4,7 %
Estabilidad de la muestra	2	3	(B4S) -0,4 %
			(A4S) +4,8 %

El método desarrollado cumple con todos los parámetros analíticos para ser utilizado en estudios en estudios de depleción de closantel en leche, los LC y LD obtenidos son muy inferiores al LMR (45 μgKg^{-1}), a pesar de no haber utilizado la máxima sensibilidad (energía) con el detector de fluorescencia, de manera que los LC y LD incluso podrían reducirse de ser necesario en estudios futuros.

5.4 Lincomicina y espectinomicina

5.4.1 Determinación de lincomicina y espectinomicina en plasma.

Para desarrollar una metodología que permita extraer lincomicina y espectinomicina mediante RDSE, desde plasma porcino, se utilizó carbonato de sodio 0,1 M (pH=9), condición en que la lincomicina y la espectinomicina se encuentran neutras en solución los estudios preliminares de extracción a distintos pH con buffer fosfato no permiten recuperar espectinomicina desde la solución. Como alternativa se utilizó un modificador de la solución el ácido heptanofluorobutírico (HFBA), utilizado como agente de pares iónicos en la cromatografía y en la fase móvil para la determinación de aminoglúcidos por LC-MS. En la figura 87, se observa la comparación de las fases: octacil (C8), octadecil (C18), cianopropil (CN-P), estireno-divinilbenceno (e-DVB), florisil (FLO), divinilbenceno-N-vinilpirrolidona (HLB) y silica (Sil) para dos condiciones (pH9 y HFBA 10mM), utilizando 90 minutos para la extracción y la elución (Figura 88).

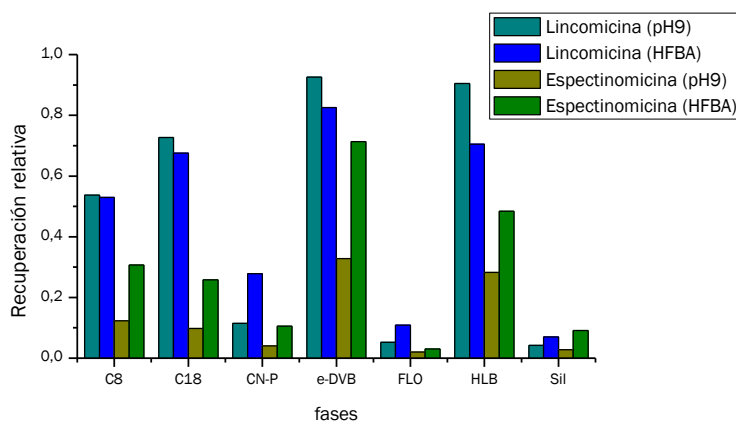


Fig 88. Comparación de fases sorbentes en RDSE para lincomicina y espectinomicina en ausencia de la matriz plasma para un equivalente de $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de los estándares en su resuspensión a 2 mL.

A partir de la comparación de fases sorbentes y condiciones para la extracción se seleccionó e-DVB y HFBA 10 mM (pH=2) para la extracción simultánea de lincomicina y espectinomicina. Para optimizar la metodología en plasma, se fortificaron muestras al nivel medio de la curva de calibración ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para lincomicina y $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para espectinomicina), se utilizó un diseño de compuesto central ($2^k + 2k + 2$), centrado en las caras y con dos centros, los factores experimentales utilizados fueron la concentración de la solución de HFBA (5 – 10 – 15 mM), dilución (10 – 15 – 20 mL) y la composición en la elución metanol/acetona (100% - 50% - 0%), se observan los efectos para lincomicina y espectinomicina en la figura 89.

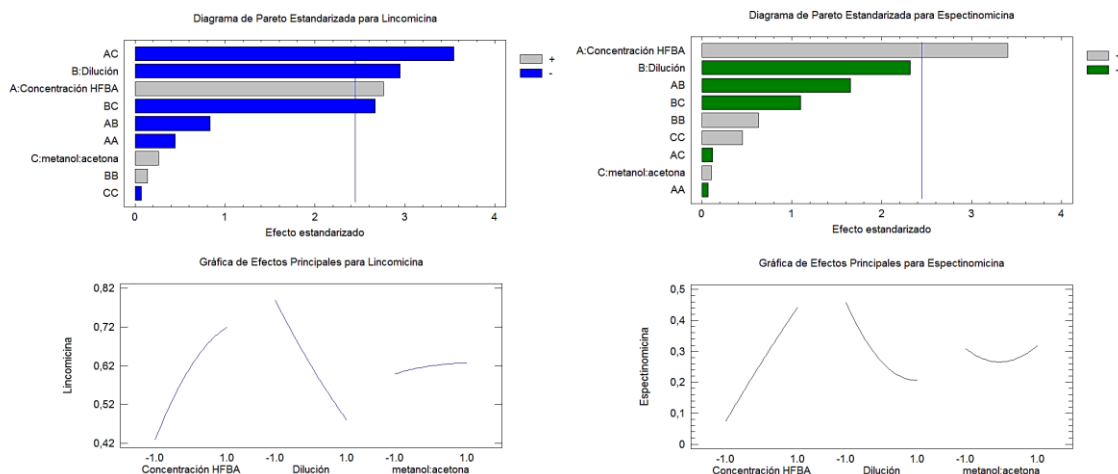


Fig 89. Diseño experimental de RDSE-eDVB para lincomicina y espectinomicina en plasma de cerdo ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), variando la concentración del modificador HFBA, dilución y la proporción acetona/metanol en la elución; Arriba diagramas de Pareto y abajo efectos principales.

Desde el diseño se desprende un efecto positivo con la concentración de la solución de HFBA, tanto para lincomicina como para espectinomicina. La dilución provocó un efecto significativamente negativo en la lincomicina y la proporción metanol/acetona no produjo diferencias significativas, de modo que se determinó la superficie de respuesta combinada para un 100% de metanol en la elución, a pesar de que la acetona es más eco-eficiente produce un eluido opalescente, lo que se manifiesta en una mayor dificultad al filtrar la muestra resuspendida, privilegiando la vida útil de la columna UHPLC se decidió utilizar metanol en la elución (Figura 90).

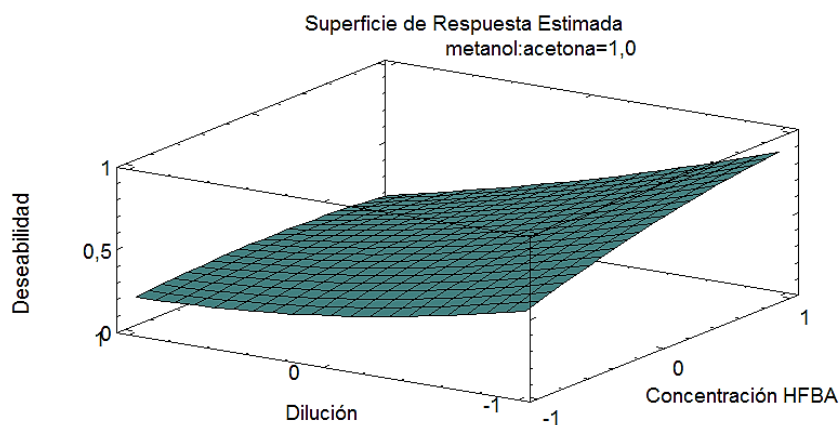


Fig 90. Superficie de respuesta combinada para la optimización de RDSE para lincomicina y espectinomicina en plasma de cerdo.

A partir del diseño experimental se determinó que las condiciones óptimas son: concentración de HFBA = 1,0 (15 mM), dilución = -1,0 (10 mL de HFBA), luego se determinaron los perfiles de extracción para muestras de 500 μL de plasma de cerdo fortificado con 0,5 y 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de lincomicina y espectinomicina respectivamente (Figura 91), se observan los cromatogramas representativos del método optimizado con 20 ppm en m/z de error en la figura 91, se utilizaron estas condiciones para determinar las curvas de fortificado y gráficas de los residuos (Figuras 93 a la 95), finalmente se validaron los parámetros descritos en la sección 3.6 (Tabla 16).

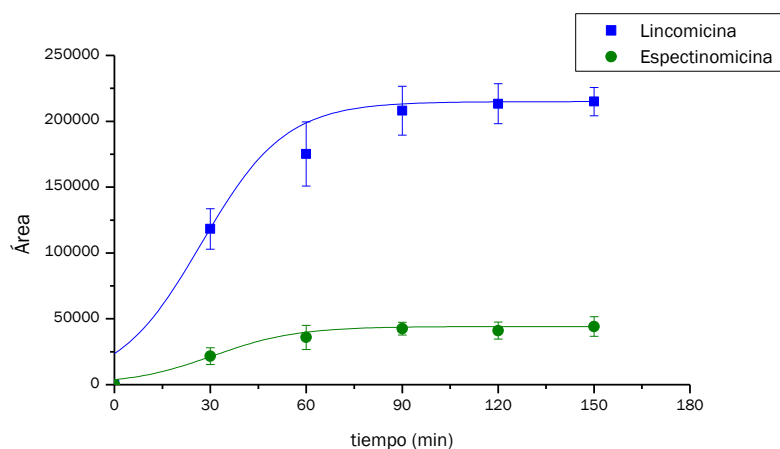


Fig 91. Perfil RDSE para lincomicina y espectinomicina en plasma (0,5 y 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente), con e-DVB como fase sorbente.

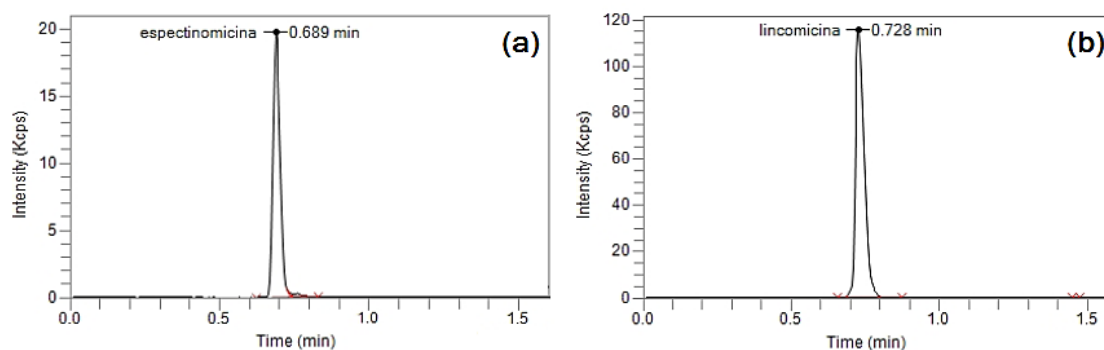


Fig 92. Cromatogramas del método RDSE-eDVB para lincomicina y espectinomicina; (a) espectinomicina a 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (m/z = 356,1752, 20 ppm m/z de error), (b) lincomicina a 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (m/z = 407.2210, 20 ppm m/z de error) en plasma (FD=2).

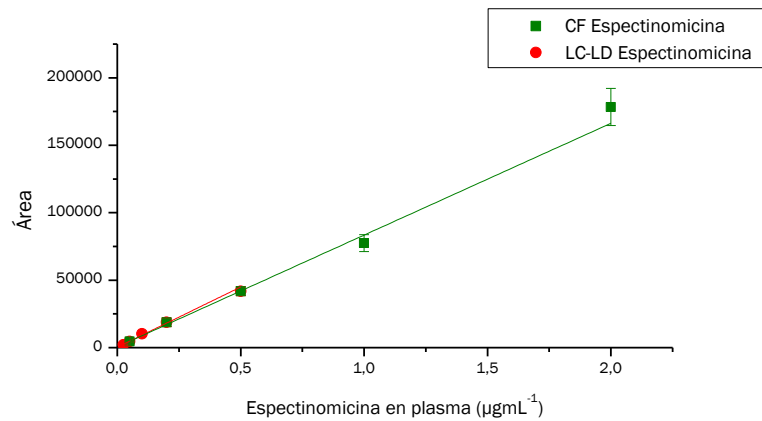


Fig 93. Curva de fortificados (CF) para espectinomicina em plasma de porco (0,05-2,00 µg mL⁻¹) e curva para a determinação do LC-LD (0,025-0,500 µg mL⁻¹).

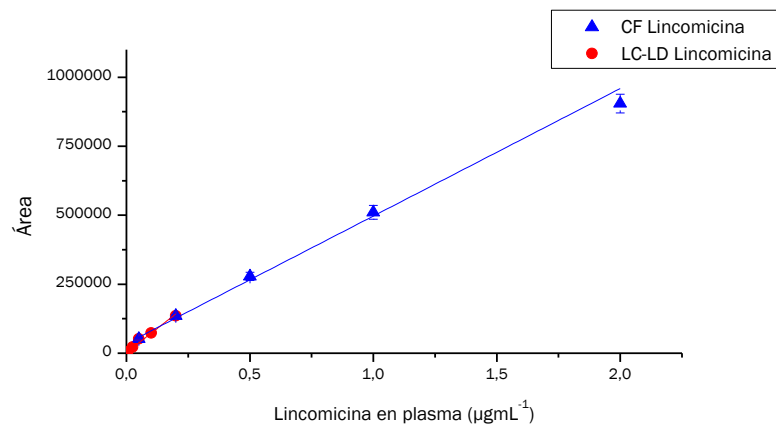


Fig 94. Curva de fortificados (CF) para lincomicina em plasma de porco (0,05-2,00 µg mL⁻¹) e curva para a determinação do LC-LD (0,005-0,200 µg mL⁻¹).

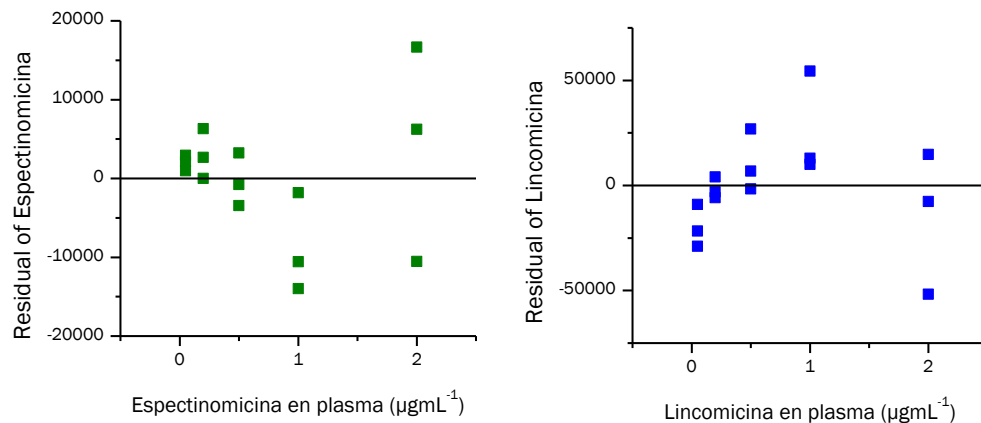


Fig 95. Distribuição dos resíduos para a curva de fortificados (CF) de lincomicina e espectinomicina em plasma.

Tabla 16. Resultados de la validación de la metodología RDSE para lincomicina y espectinomocina en plasma.

	N	R	Espectinomocina	Lincomicina
Linealidad estándares	5	3	$y = 185675,8x + 993,7$	$y = 1150540,0x + 36877,8$
			$R^2 = 0,998$	$R^2 = 0,999$
			$p_{value} = 3,37 \times 10^{-5}$	$p_{value} = 2,22 \times 10^{-6}$
Linealidad fortificados	5	3	$y = 87895,2x + 518,1$	$y = 462101,8x + 34987,7$
			$R^2 = 0,995$	$R^2 = 0,993$
			$p_{value} = 1,36 \times 10^{-4}$	$p_{value} = 2,51 \times 10^{-4}$
Índice Selectividad	1	6	98,7 %	99,4 %
Límite de cuantificación	5	3	0,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Límite de detección	5	3	0,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$
			(B) -6,2 %	(B) -26,3 %
			(M) -12,4 %	(M) +2,4 %
Exactitud	3	3	(A) +1,2 %	(A) -3,9 %
			(CV _B) 12,9 %	(CV _B) 8,1 %
			(CV _M) 8,1 %	(CV _M) 4,9 %
Precisión	3	3	(CV _A) 7,6 %	(CV _A) 3,7 %

El método desarrollado cumple con todos los parámetros analíticos para ser utilizado en estudios de farmacocinética, incluso la exactitud para lincomicina a $0,050 \mu\text{g mL}^{-1}$, ya que para concentraciones $< 0,100 \mu\text{g mL}^{-1}$ se admite según la VICH GL49, que la exactitud se encuentre entre -30% a +10%, sin embargo, se observa una tendencia en el gráfico de residuos (Figura 95) que estaría explicada por un fenómeno de apalancamiento en las concentraciones altas de lincomicina y espectinomocina, de modo que es recomendable trabajar en un rango más acotado para obtener resultados confiables en futuros estudios con muestras reales.

La utilización de HFBA como fase móvil permitió retrasar cromatográficamente la espectinomocina, si bien mediante el analizador con TOF, no es necesario separar especies que se miden en canales m/z distintos, si fue necesario separar la espectinomocina del frente de especies ionizables pertenecientes a la matriz, lo que es posible analizar gracias al *Total Ion Current* (TIC). Cuando la espectinomocina no es separada de este frente de especies ionizables reduce significativamente su sensibilidad y disminuye su reproducibilidad entre inyección ($CV > 30\%$).

La mayor dificultad encontrada en la determinación simultánea de lincomicina y espectinomocina fue la baja sensibilidad del aminoglúcido, lo que se pudo resolver utilizando el fragmento m/z de mayor abundancia [espectinomocina- H_3O^+], además la trampa iónica del analizador permitió sensibilizar la medida en el rango m/z en que se cuantifica la especie casi siete (7) veces respecto a la utilización del modo pulso.

5.4.2 Determinación de concentraciones residuales de lincomicina y espectinomicina en tejidos de cerdo.

Para desarrollar una estrategia de determinación de lincomicina y espectinomicina en tejidos no es posible realizar una digestión de la matriz como en el caso de los analitos florfenicol o triclabendazol. Por otro lado, la polaridad de espectinomicina ($\text{LogP}=-2,37$) y de lincomicina ($\text{LogP}=-0,32$) indican que la extracción debe realizarse en fase hidrofílica. Para realizar estudios cuantitativos de residuos en tejidos en la literatura propone la utilización de la extracción con solvente acelerada (ASE) seguida de una etapa de clean-up y pre-concentración mediante SPE.

La extracción por lixiviación exhaustiva que se produce mediante el ASE permite obtener un extracto acuoso (al extraer con agua), que contiene a los analitos y los componentes de la matriz que no hayan sido retenidos mediante de tierra diatomea.

Para acoplar la lixiviación desde la matriz utilizando ASE a la consecutiva extracción y clean-up mediante RDSE, es necesario optimizar las condiciones de la extracción acelerada para que el extracto contenga una máxima cantidad de los analitos, minimizando los posibles los interferentes, luego optimizarse los parámetros de que inciden en RDSE para adaptarlos a las características del extracto mediante el ASE.

En una etapa preliminar se comparó utilizar una celda de extracción de 33 mL contra una de 10 mL. La cantidad de extracto obtenida con la primera, excedía los 40 mL, lo que dificulta la utilización de RDSE para la extracción en tiempos cortos. Para obtener señales cuantificables para lincomicina y espectinomicina, se decidió utilizar 2,00 g de músculo de cerdo, el cual liofilizado tiene una masa $0,54 \pm 0,04$ g, se calcula el factor de corrección exacto para cada set de muestras liofilizadas, mediante la pérdida de masa por sublimación del agua durante el proceso, por 48 horas a -50°C . En los ensayos preliminares se fortificó a $200 \mu\text{gKg}^{-1}$ para lincomicina y $600 \mu\text{gKg}^{-1}$ para espectinomicina, cuyo LMR respectivos en músculo son 100 y $300 \mu\text{gKg}^{-1}$.

Para determinar las condiciones óptimas en la etapa de extracción con ASE, se mantuvieron fijas la cantidad de tejido (liofilizado equivalente a 2 g), tierra de diatomea (8 g), extracción con agua a 100°C y 1 ciclo estático, se utilizó un diseño factorial a cinco niveles para el volumen utilizado en el ciclo estático del ASE a 5 niveles (50% - 45% - 40% - 35% - 30%) y de 3 niveles para el tiempo en el ciclo estático del ASE a 3 niveles (5 - 10 - 15 min). Los extractos obtenidos se llevaron a 25 mL con agua y se dejaron en una concentración de HFBA de 20 mM mediante la adición de 2,5 mL de una solución HFBA 0,2 M.

Para el diseño (Figura 96), se observa un máximo significativo para el tiempo estático, mientras que se observa un máximo para el volumen estático en el caso de la espectinomicina, ya que probablemente coextraen desde la matriz sustancias que interfieren en su posterior extracción mediante el disco rotatorio.

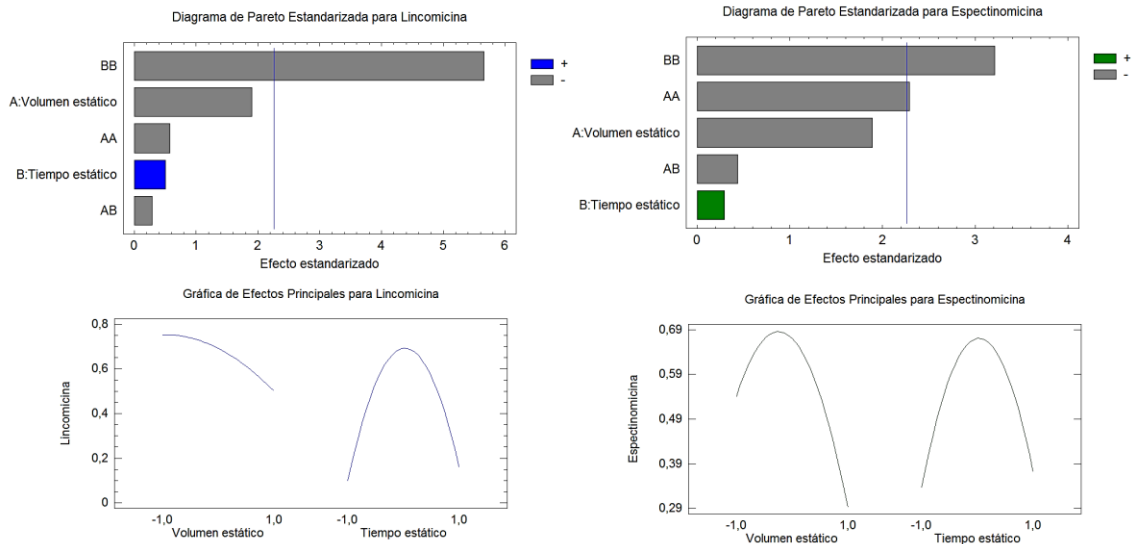


Fig 96. Resultados del diseño experimental, lincomicina y espectinomicina en músculo de cerdo (200 y 600 μgKg^{-1} respectivamente), para RDSE-eDVB, variando el tiempo y volumen estático durante la etapa ASE; Arriba diagramas de Pareto de efectos estandarizados y abajo efectos principales.

Combinando las respuestas (Figura 97), se obtiene: un tiempo estático de 0,04 (10 min) y un volumen estático de -0,39 (36%), como las condición óptima en el ASE.

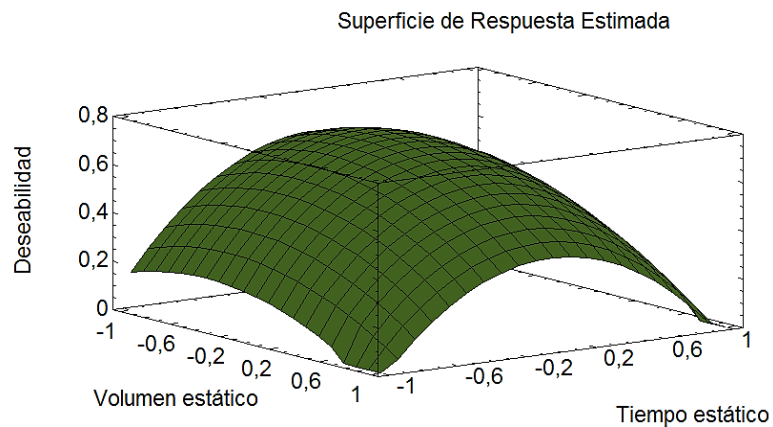


Fig 97. Superficie de respuesta combinada, para la optimización las variables de tiempo y volumen estático durante la etapa ASE.

Se realizó el perfil de extracción para músculo porcino fortificado a $50 \mu\text{gKg}^{-1}$ de lincomicina y $300 \mu\text{gKg}^{-1}$ de espectinomicina, utilizando las condiciones optimas en el ASE, se observa el perfil (Figura 98) y cromatogramas representativos (Figura 99).

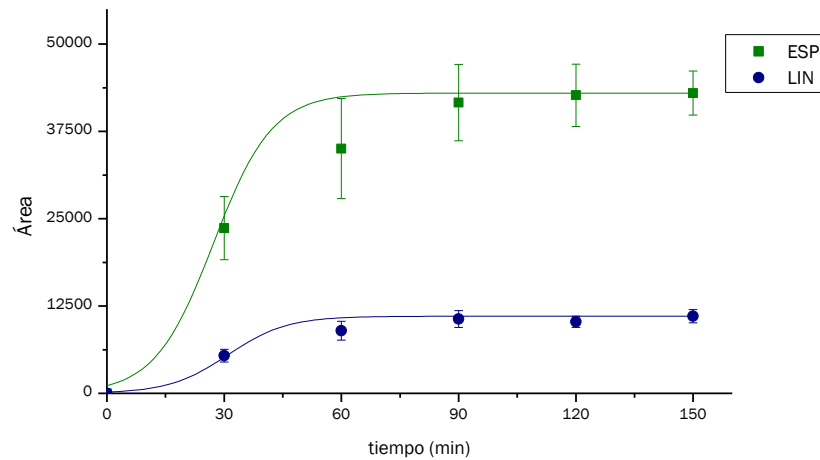


Fig 98. Perfil RDSE-eDVB para músculo ($50 \mu\text{gKg}^{-1}$ de lincomicina y $300 \mu\text{gKg}^{-1}$ de espectinomicina).

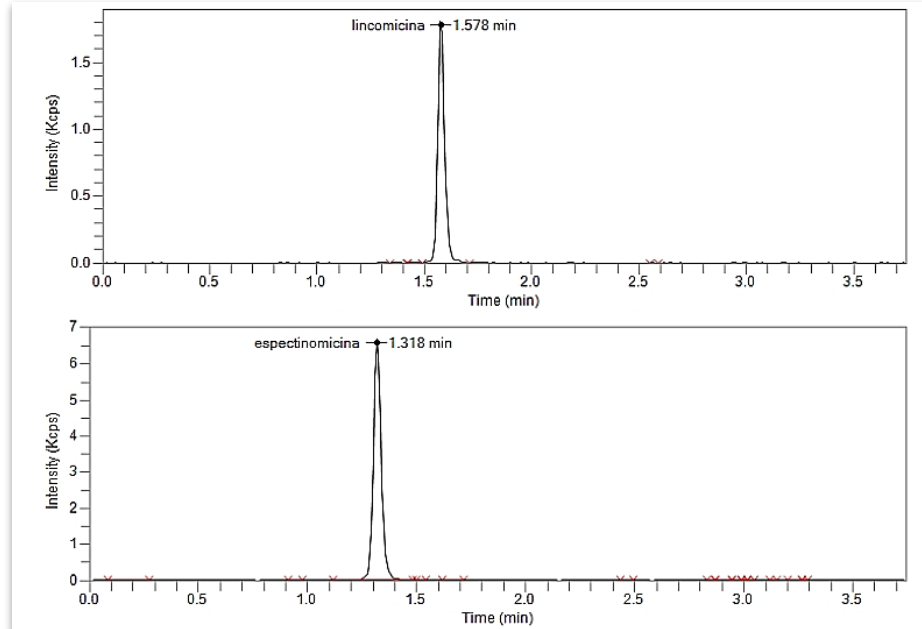


Fig 99. Músculo a $50 \mu\text{gKg}^{-1}$ de lincomicina y $300 \mu\text{gKg}^{-1}$ de espectinomicina ($m/z= 407.2210$ y 356.1752 , $20 \text{ ppm } m/z$ de error)

Para cada matriz se realizó la curva de fortificados (Figuras 100-103) y respectivo gráfico de residuos (Figuras 104 y 105), se validaron los parámetros analíticos descritos en la sección 3.6 para cada una de las matrices ensayadas (Tabla 17).

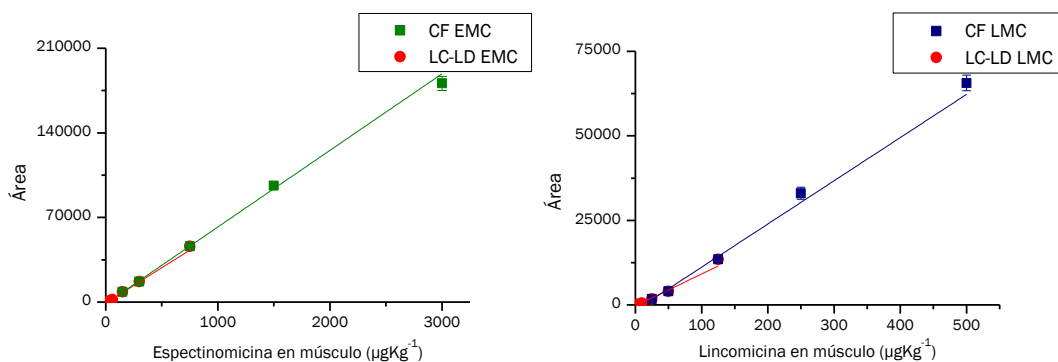


Fig 100. Curvas de fortificados (CF) en músculo, EMC: 150-3000 μgKg^{-1} y LMC: 25-500 μgKg^{-1} ; curvas determinación de los LC-LD, ECM: 30-750 μgKg^{-1} y LMC: 5-125 μgKg^{-1} .

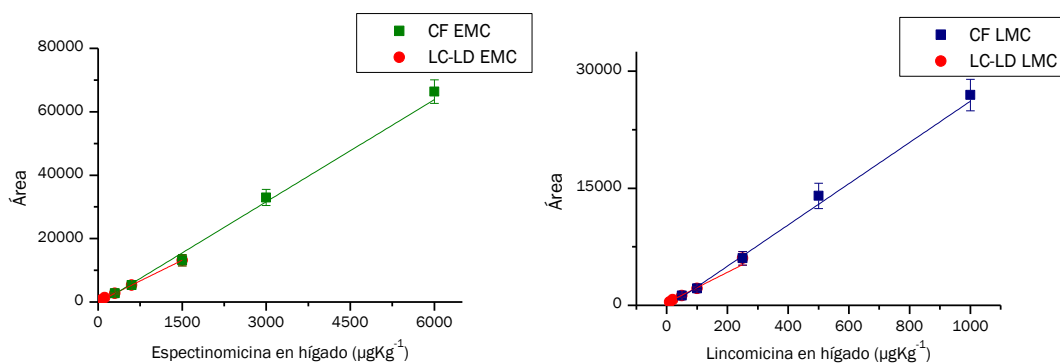


Fig 101. Curvas de fortificados (CF) en hígado, EMC: 300-6000 μgKg^{-1} y LMC: 50-1000 μgKg^{-1} ; curvas determinación de los LC-LD, ECM: 60-1500 μgKg^{-1} y LMC: 10-250 μgKg^{-1} .

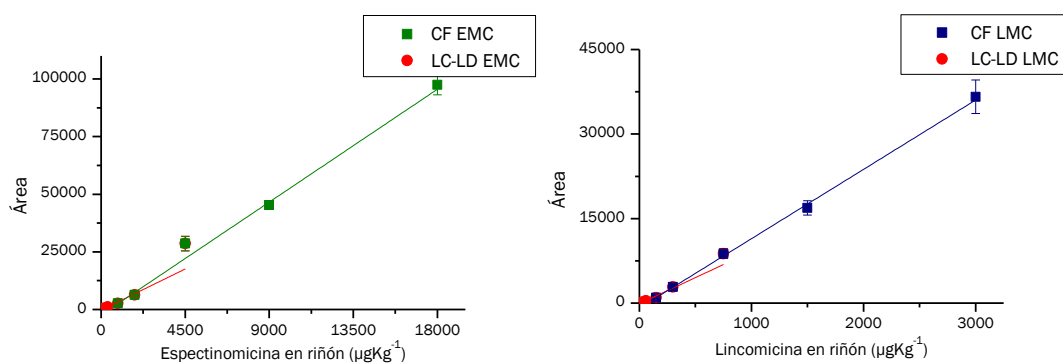


Fig 102. Curvas de fortificados (CF) en riñón, EMC: 900-18000 μgKg^{-1} y LMC: 150-3000 μgKg^{-1} ; curvas determinación de los LC-LD, ECM: 180-4500 μgKg^{-1} y LMC: 30-750 μgKg^{-1} .

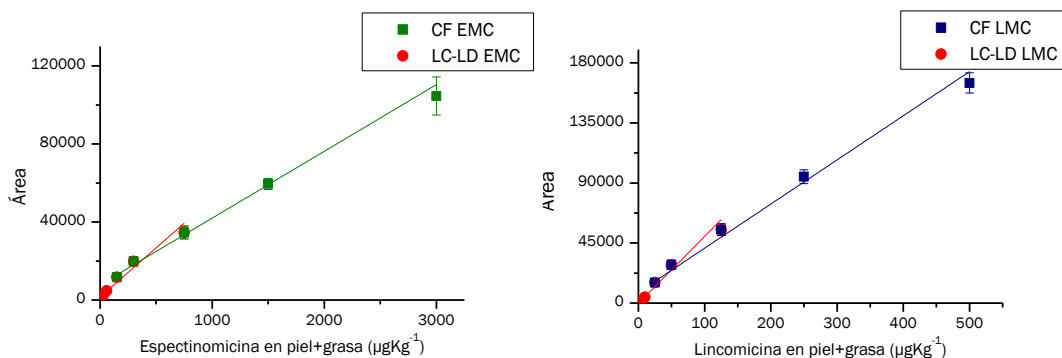


Fig 103. Curvas de fortificados (CF) en piel+grasa, LMC: 150-3000 µgKg⁻¹ y EMC: 25-500 µgKg⁻¹; curvas determinación de los LC-LD, LCM: 30-750 µgKg⁻¹ y EMC: 25-500 µgKg⁻¹.

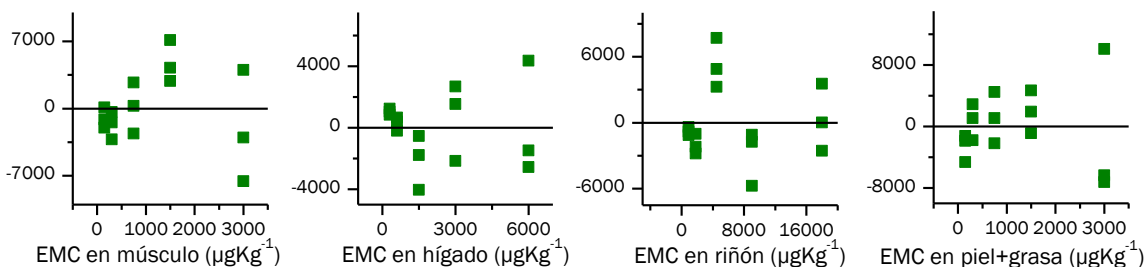


Fig 104. Distribución de los residuos para espectinomicina en músculo, hígado, riñón y piel+grasa.

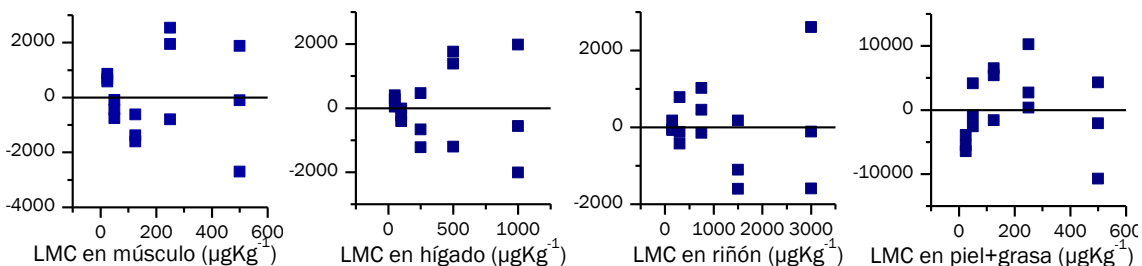


Fig 105. Distribución de los residuos para lincomicina en músculo, hígado, riñón y piel+grasa.

Tabla 17. Resultados de la validación de la metodología RDSE para lincomicina y espectinomicina en tejidos de cerdo.

Lincomicina		N	R	Músculo	Hígado	Riñón	Piel + grasa
Linealidad estándares	5	3		$y = 149,4x - 1971,9$ $R^2 = 0,994$ $p_{\text{value}} = 2,30 \times 10^{-4}$			
Linealidad fortificados	5	3	$y = 127,8x - 1623,4$ $R^2 = 0,991$ $p_{\text{value}} = 3,61 \times 10^{-4}$	$y = 26,4x - 266,3$ $R^2 = 0,988$ $p_{\text{value}} = 5,67 \times 10^{-5}$	$y = 12,3x - 874,4$ $R^2 = 0,997$ $p_{\text{value}} = 2,78 \times 10^{-5}$	$y = 330,7x + 8081,7$ $R^2 = 0,991$ $p_{\text{value}} = 3,44 \times 10^{-4}$	
Índice de selectividad	1	6	99,0 %	98,7 %	99,2 %	99,6 %	
Límite de cuantificación	5	3	7,6 μgKg^{-1}	24,8 μgKg^{-1}	67,2 μgKg^{-1}	17,1 μgKg^{-1}	
Límite de detección	5	3	2,5 μgKg^{-1}	8,2 μgKg^{-1}	22,2 μgKg^{-1}	5,6 μgKg^{-1}	
Exactitud	3	3	(B) -21,1 %	(B) -17,7 %	(B) -2,7 %	(B) -8,6 %	
			(M) +18,8 %	(M) -17,4 %	(M) -14,0 %	(M) -2,6 %	
			(A) +7,4 %	(A) -18,9 %	(A) -12,7 %	(A) -4,1 %	
Precisión intermedia	3	3	(CV _B) 7,9 %	(CV _B) 14,5 %	(CV _B) 14,5 %	(CV _B) 8,3 %	
			(CV _M) 8,8 %	(CV _M) 14,2 %	(CV _M) 9,4 %	(CV _M) 8,0 %	
			(CV _A) 7,5 %	(CV _A) 7,5 %	(CV _A) 8,2 %	(CV _A) 6,5 %	
Estabilidad de la muestra	2	3	(B _{4S}) -17,5 %	(B _{4S}) -14,2 %	(B _{4S}) -5,9 %	(B _{4S}) -7,9 %	
			(A _{4S}) +2,9 %	(A _{4S}) -11,3 %	(A _{4S}) -13,1 %	(A _{4S}) -7,1 %	
Espectinomicina				Músculo	Hígado	Riñón	Piel + grasa
Linealidad estándares	5	3		$y = 58,7x - 585,7$ $R^2 = 0,999$ $p_{\text{value}} = 1,04 \times 10^{-5}$			
Linealidad fortificados	5	3	$y = 63,4x - 1253,5$ $R^2 = 0,998$ $p_{\text{value}} = 3,09 \times 10^{-5}$	$y = 10,7x - 633,7$ $R^2 = 0,991$ $p_{\text{value}} = 3,13 \times 10^{-4}$	$y = 5,4x - 2365,2$ $R^2 = 0,992$ $p_{\text{value}} = 2,12 \times 10^{-4}$	$y = 34,2x + 7842,4$ $R^2 = 0,993$ $p_{\text{value}} = 1,67 \times 10^{-4}$	
Índice de selectividad	1	6	99,5 %	99,1 %	98,9 %	99,5 %	
Límite de cuantificación	5	3	34,9 μgKg^{-1}	48,8 μgKg^{-1}	197,4 μgKg^{-1}	83,2 μgKg^{-1}	
Límite de detección	5	3	11,5 μgKg^{-1}	16,1 μgKg^{-1}	65,2 μgKg^{-1}	27,4 μgKg^{-1}	
Exactitud	3	3	(B) -0,6 %	(B) -12,7 %	(B) -16,4 %	(B) -9,1 %	
			(M) +5,2 %	(M) -8,2 %	(M) -18,0 %	(M) -19,8 %	
			(A) +2,6 %	(A) -6,6 %	(A) -7,7 %	(A) -10,7 %	
Precisión intermedia	3	3	(CV _B) 12,6 %	(CV _B) 7,6 %	(CV _B) 13,4 %	(CV _B) 15,6 %	
			(CV _M) 9,8 %	(CV _M) 13,5 %	(CV _M) 10,0 %	(CV _M) 9,6 %	
			(CV _A) 5,2 %	(CV _A) 5,6 %	(CV _A) 4,4 %	(CV _A) 9,3 %	
Estabilidad de la muestra	2	3	(B _{4S}) -3,7 %	(B _{4S}) -14,2 %	(B _{4S}) -15,5 %	(B _{4S}) -12,1 %	
			(A _{4S}) -5,4 %	(A _{4S}) -9,7 %	(A _{4S}) -8,6 %	(A _{4S}) -9,9 %	

El método desarrollado combinando ASE y RDSE cumple con todos los parámetros analíticos en las matrices de cerdo estudiadas. De esta manera es válida su aplicación en estudios de depleción de residuos para fármacos que contengan lincomicina y/o espectinomicina en su formulación, para la determinación del periodo de resguardo. Los LC obtenidos son muy inferiores a los LMR en cada matriz, la sensibilidad y selectividad lograda mediante la espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo y su compatibilidad con la utilización de ASE y RDSE en la etapa preparativa, hacen de esta estrategia analítica una alternativa ideal para la determinación de macrólidos y aminoglúcidos residuales en matrices animales.

VI. Conclusiones

Se demostró que la técnica RDSE, tradicionalmente utilizada en muestras de agua, es aplicable en la determinación de fármacos y metabolitos residuales en distintas matrices de origen animal, realizando la extracción desde una solución acuosa resultante de la dilución, digestión o lixiviación de los analitos desde cada una de las matrices estudiadas, las metodologías cumplen con los parámetros analíticos establecidos en la normativa internacional (VICH) para su aplicación en estudios de farmacocientica y de depleción de residuos respectivamente.

Considerando que la complejidad de cada matriz y naturaleza de los analitos fue determinante para el desarrollo metodológico utilizando RDSE, es conveniente realizar un análisis separado para cada matriz (Tabla 18).

- ✓ **Plasma:** Es la matriz de menor complejidad estudiada. Debido a que las concentraciones plasmáticas esperadas para su aplicación en estudio de farmacocinética son más elevadas que las de un estudio de depleción de residuos es posible diluir la muestra en el proceso preparativo. En consecuencia para la aplicación de RDSE se debe estudiar la fase sorbente más adecuada para la extracción de los analitos en solución y su comparación de la respuesta en presencia de la matriz plasma, mediante la determinación de los perfiles de recuperación, para así establecer el tiempo de equilibrio del proceso.
- ✓ **Leche:** Es la matriz de mediana complejidad. A pesar del contenido de proteínas y grasa, al ser una matriz líquida facilitó la aplicación de RDSE. Se desarrollaron estrategias que requieren una etapa preparativa simple, en que se separará mediante centrifugación el suero de la leche, tanto para antibióticos (analitos polares) y antiparasitarios (analitos apolares) presentes en dicha matriz. RDSE permite la pre-concentración y clean-up para la cuantificación simultánea de los antibióticos residuales estudiados (oxitetraciclina, 4-epi-oxitetraciclina, sulfadoxina, trimetoprima, enrofloxacino y ciprofloxacino) por HPLC-DAD, cumpliendo con todos los parámetros analíticos exigidos en la VICH GL49, obteniendo LC inferiores a los LMR. La adaptación a un antiparasitario (closantel) se logró adicionando una pequeña porción de solvente orgánico y diluyendo el sobrenadante con agua, la utilización del HPLC con detector de fluorescencia permitió alcanzar LC significativamente más bajas que el LMR.

- ✓ **Tejidos:** Son las matrices de mayor complejidad estudiadas. En esta categoría se encuentra el músculo, hígado, riñón y grasa, de bovinos y porcinos.

En este caso al no ser matrices líquidas fue necesario realizar un pre-tratamiento exhaustivo que hiciera aplicable RDSE en una posterior de extracción. Fue posible utilizar la digestión de las muestras para los residuos de florfenicol y triclabendazol, siendo una etapa clave para la lograr la lixiviación completa de los fármacos residuales y metabolitos de interés. Mediante estrategias de clean-up y diluciones fue posible llevar el extracto resultante a la condición ideal, realizar su validación que en todas las matrices permitió obtener LC inferiores a los LMR. A pesar del elevado número de etapas necesarias para realizar la implementación de RDSE en extractos de estas matrices mediante hidrolisis ácida o alcalina de los analitos, se puede destacar la ventaja comparativa en términos de eco-eficiencia en relación a métodos oficiales de la USDA y la FAO. Las metodologías desarrolladas para florfenicol y triclabendazol residuales en tejidos se aplicaron estudios de depleción de residuos realizados en la empresa Veterquímica S.A.

En el caso de sistema compuesto de macrólidos y aminoglúcidos como el estudiando para lincomicina y espectinomicina, gracias la mayor polaridad de los analitos es posible realizar una extracción con solvente acelerada (ASE) utilizando únicamente agua y consecutivamente la aplicación de RDSE para la pre-concentración y clean-up de los extractos, siendo una estrategia aplicable a la cuantificación mediante un sistema UHPLC-ESI-TOF.

Tabla 18. Comparación metodologías RDSE desarrolladas según complejidad de la matriz, respecto a la bibliografía citada en la tesis.

	Complejidad baja (Plasma)	Complejidad media (Leche)	Complejidad alta (Tejidos)	
Pre-tratamiento	Dilución	Centrifugación	Digestión	ASE
Economía	✓	✓	≈	✓
Eco-eficiencia	≈	≈	✓	≈
Tiempo del proceso	✗	≈	≈	≈
Simpleza del Clean-up	≈	✓	✗	≈

Mejor (✓), equivalente (≈), peor (✗).

VII. Anexos

7.1 Medición directa en un sistema RDSE-nylon.

Con el objetivo de implementar una técnica de medición utilizando como plataforma analítica la RDSE, se implementó la extracción de HAPs (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos) utilizando una membrana de nylon como fase extracción y como medio de identificación y cuantificación el uso de la espectrometría fluorescente, a través de los espectros de excitación y emisión fluorescentes medidos directamente sobre la fase de nylon utilizando un soporte diseñado para su medición directa en el fluorímetro ⁽⁴³⁾.

La presencia de PAHs en el medio ambiente, es un tema de preocupación para la humanidad, debido a que algunos presentan un alto potencial cancerígeno. La química analítica tiene el deber de desarrollar nuevas estrategias que permitan su determinación en niveles traza y ultratrazo de manera rápida y simple.

Con Benzo[a]Pireno (BaP) como analito modelo, se realizó el perfil de extracción, llegando al equilibrio a los 20 minutos de agitación para soluciones acuosas de 25 mL, utilizando una membrana de nylon de 10 mm de diámetro (Figura 107).

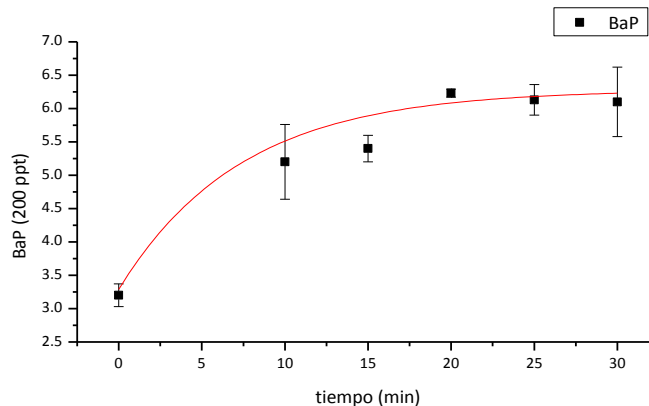


Fig 107. Perfil extracción BaP 200 ngmL⁻¹, medición a 404 nm del espectro emisión fluorescente (n=3).

Para incorporar la determinación simultánea de PAHs en niveles traza se utilizó el algoritmo PARAFAC (Parallel Factor Analysis) como método de descomposición de las superficies de fluorescencia obtenidas ⁽⁴⁴⁾.

Se propuso un sistema modelo de 4 PAHs, Benzo[a]Pireno (BaP), Benzo[a]Antraceno (BaA), Criseno (Cri) y Dibenzoantraceno (DBA), los dos primeros arrojaron un rango lineal ($R > 0,9995$) entre 50 y 300 ngL⁻¹ y los últimos dos entre 100 y 600 ngL⁻¹.

Mediante un diseño semifactorial de experimentos se realizó el set de calibración, combinando las concentraciones mínimas y máximas para cada PAHs, añadiendo un centro y un cero al sistema. Los barridos se realizaron entre 370 y 480 nm como ventana de emisión para 40 longitudes de excitación entre 250 y 367 nm, generándose las superficies fluorescentes, luego procesadas mediante MATLAB con la interfase MVC2 y la descomposición en los espectros puros y calibrado por PARAFAC. Con la finalidad de probar el método en un sistema complejo, se incorporó un set de interferentes, Indenopireno (IP), Pireno (Pir), Benzo[ghi]Perileno (BghiP) y Benzo[b]Pireno (BbP), todos presentaron interferencias espectrales con el set de calibrado (Figura 107) ⁽⁴⁵⁾.

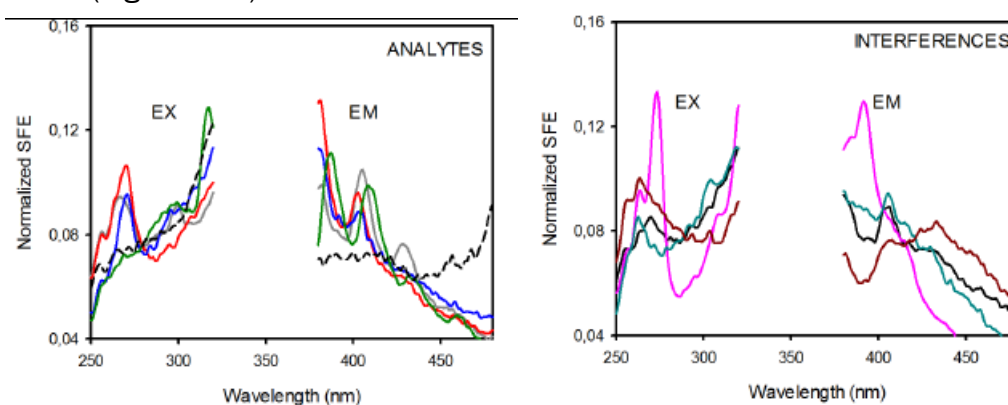


Fig 107. A la izquierda los espectros puros de los analitos obtenidos desde el set de calibrado y descomposición por PARAFAC; Cri (rojo); BaP (gris); DBA (azul); BaA (verde); *background* (negro); a la derecha espectros puros de los interferentes obtenidos desde el set de calibrado y descomposición por PARAFAC; IP (negro); Pir (rosado); BghiP (celeste); BbP (marrón)..

Se realizó un set de validación con 10 muestras que contenían una combinación de concentraciones aleatorias (entre 0 y 500 ngL⁻¹) de BaP, BaA, Cri y DBA, mediante PARAFAC se realizó la predicción con el set de calibrado obteniéndose con buena regresión entre los predicho por PARAFAC y las muestras preparadas (Figura 108) ⁽⁴⁵⁾.

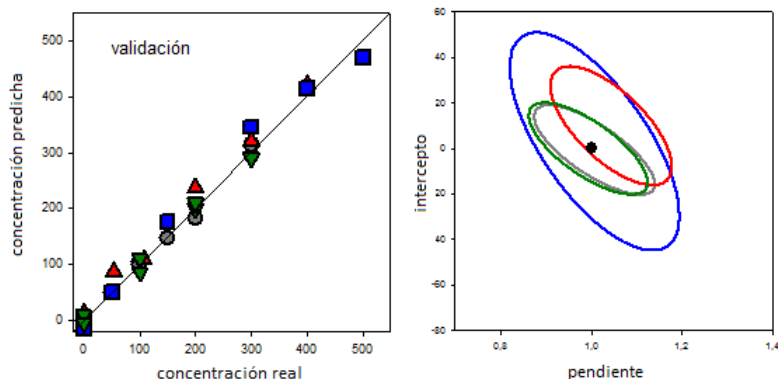


Fig 108. Set de validación, calibración Cri (rojo); BaP (gris); DBA (azul); BaA (verde). A la derecha las regiones elípticas de confianza conjunta (95% de confianza).

Se realizó un set de 10 muestras problemas con concentraciones aleatorias (entre 0 y 350 ngL⁻¹) de BaP, BaA, Cri y DBA, incorporando concentraciones aleatorias de los 4 PAHs interferentes (600 a 1000 ngL⁻¹) y se predijo con exactitud la concentración de los 4 PAHs analitos a pesar de la interferencia espectral (Figura 109) ⁽⁴⁵⁾.

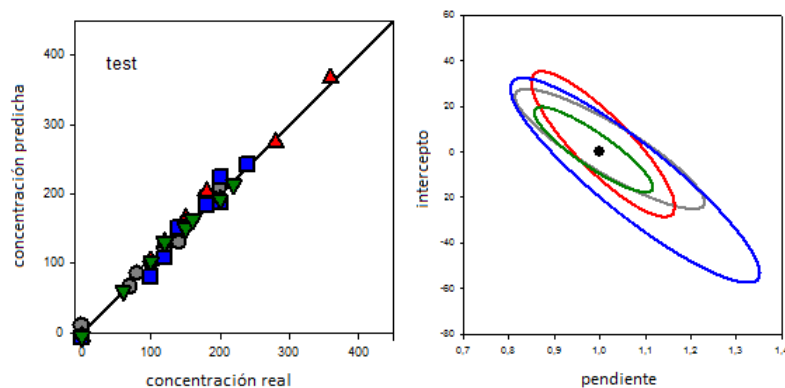


Fig 109. Set de prueba (en presencia de interferentes); calibración Cri (rojo); BaP (gris); DBA (azul); BaA (verde). A la derecha las regiones elípticas de confianza conjunta (95% de confianza).

Se propuso utilizar la modalidad de medición directa como un método *screening* en la determinación de antibióticos en leche, sin embargo mediante la fase de nylon, para un sistema de compuesto por los analitos OTC, EFX, CFX, SDX y TMP. Solo EFX y CFX fueron retenidos en la fase (Verificado por HPLC), sin embargo no fue posible calibrar por medición directa en la fase, aun así es posible evaluar en el futuro la utilización de este propuesta con membranas alternativas a la de nylon.

VIII. Referencias

1. Lucena R. 2012. Extraction and stirring integrated techniques: examples and recent advances. *Anal Bioanal Chem*, 403, Pag 2213-2223.
2. Simpson N. 2000. Solid-phase extraction. Principles, Techniques, and Applications. Taylor & Francis Group LLC. Pag 18-37.
3. Richter, P., Leiva C., Choque A., Giordano B., Sepúlveda J. 2009. Rotating-disk sorptive extraction from water samples, *Chromatogr. A*. 1216, Pag 8598-8602.
4. Richter P., Cañas A., Muñoz C., Leiva C., Ahumada, I. 2011. Rotating disk sorbent extraction for pre-concentration of chromogenic organic compounds and direct determination by solid phase spectrophotometry, *Anal Chimica Acta*. 695. Pag 73-76.
5. Cañas A., Richter P. 2012. Solid-phase microextraction using octadecyl-bonded silica immobilized on the surface of a rotating disk: Determination of hexachlorobenzene in water, *Anal Chimica Acta*. 743. Pag 75-79.
6. Cañas A., Richter P. 2014. A new rotating-disk sorptive extraction mode, with a copolymer of divinylbenzene and N-vinylpyrrolidone trapped in the cavity of the disk, used for determination of florfenicol residues in porcine plasma, *Anal Bioanal. Chem*. 406. Pag 2205-2210.
7. Waters.com
<http://www.waters.com/waters/es_ES/Oasis-Sample-Extraction-Products/nav.htm?locale=es_ES&cid=513209>
[Consulta: 5 mayo 2014]
8. Qin Z., Bragg L., Ouyang G., Pawliszyn J. 2008. Comparison of thin-film microextraction and stir bar sorptive extraction for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples with controlled agitation conditions. *J Chromatogr. A*. 1196-1197. Pag 89-95.
9. Baltussen E., Sandra P., David F., Cramers C. J. 1999. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *Microcol. Pag* 737-747.
10. Hunter C., Sanders J. 1990. The nature of pi-pi interactions, *J Am Chem Soc*. 112. Pag 5525-5534
11. Sumano H., Ocampo L. 1997. *Farmacología Veterinaria*. Segunda Edición. McGraw-Hill Interamericana. Capítulos 4-7. Pag 34-87.
12. Cinquina, A., Longo, F. 2003. Validation of a high performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J. Chromatogr. A*. 987. Pag 227-233.
13. Riviere J.E., Papich M.G. 2009. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Ninth Edition. Wiley-Blackwell. Section 9. Pag 945-9825.
14. Riviere J.E., Papich M.G. 2009. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Ninth Edition. Wiley-Blackwell. Section 1. Pag 3-75.
15. Sumano H., Ocampo L. 1997. *Farmacología Veterinaria*. Segunda Edición. McGraw-Hill Interamericana. Capítulo 4. Pag 23-33.

16. Sumano H., Ocampo L. 1997. Farmacología Veterinaria. Segunda Edición. McGram-Hill Interamericana. Capítulo 13. Pag 148-160.
17. COMMISSION REGULATION N°37. 2010. On pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Official Journal of the European Union. Pag 1-72.
18. USDA (United States Department of Agriculture), FSIS (Food Safety and Inspection Service). 2010, Determination and Confirmation of Florfenicol, CLG-FLOR1.04, 1-27.
19. Chemicalize.org
<<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=73231-34-2&source=calculate>>
<<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=108656-33-3&source=calculate>>
[Consulta: 12 mayo 2014]
20. Sumano H., Ocampo L. 1997. Farmacología Veterinaria. Segunda Edición. McGram-Hill Interamericana. Capítulo 20. Pag 251-341.
21. Addendum to the monographs prepared by the 40th, 66th and 75th meetings of the Committee and published in FAO Food & Nutrition Paper 41/5 and FAO JECFA Monographs 2 and 6, respectively. 41-5-triclabendazole, 2-2006-triclabendazole, 6-2009-triclabendazole, 12-2012-triclabendazole
22. Chemicalize.org
<<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=68786-66-3&source=calculate>>
<<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=5-Chloro-6-%282%2C3-dichlorophenoxy%29-2-%28methylsulfinyl%29-1H-benzimidazole&source=calculate>>
<<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=5-Chloro-6-%282%2C3-dichlorophenoxy%29-2-%28methylsulfonyl%29-1H-benzimidazole&source=calculate>>
<<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=5-chloro-6-%282%2C3-dichlorophenoxy%29-1%2C3-dihydro-benzimidazol-2-one&source=calculate>>
[Consulta: 12 mayo 2014]
23. Sumano H., Ocampo L. 1997. Farmacología Veterinaria. Segunda Edición. McGram-Hill Interamericana. Capítulo 41. Pag 519-531.
24. Chemicalize.org
<<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=4-%28dimethylamino%29-3%2C5%2C6%2C10%2C12%2C12a-hexahydroxy-6-methyl-1%2C11-dioxo-1%2C4%2C4a%2C5%2C5a%2C6%2C11%2C12a-octahydrotetracene-2-carboxamide&source=calculate>>
<<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=4-%28dimethylamino%29-1%2C5%2C6%2C10%2C11%2C12a-hexahydroxy-6-methyl-3%2C12-dioxo-3%2C4%2C4a%2C5%2C5a%2C6%2C12%2C12a-octahydrotetracene-2-carboxamide&source=calculate>>
<<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=93106-60-6&source=calculate>>
<<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=CIPROFLOXACIN&source=calculate>>
<<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=2447-57-6&source=calculate>>
<<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=738-70-5&source=calculate>>
[Consulta: 12 mayo 2014]

25. Sumano H., Ocampo L. 1997. *Farmacología Veterinaria*. Segunda Edición. McGram-Hill Interamericana. Capítulo 16. Pag 180-189.
26. Sumano H., Ocampo L. 1997. *Farmacología Veterinaria*. Segunda Edición. McGram-Hill Interamericana. Capítulo 10. Pag 107-113.
27. Stoev G., Dakova T., Michailova Al. 1999. Quantitative determination of Closantel residues in milk by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J of Chromatogr A*, 846. Pag 383-386
28. Sun H., Wang F., Ai L. 2008. Determination of Closantel Residues in Milk and Animal Tissues by HPLC with Fluorescence Detection and SPE with Oasis MAX Cartridges. *J Chromatogr Sci.*, 46. Pag 351-355.
29. Chemicalize.org
<<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=closantel&source=calculate>>
<<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=lincomycin&source=calculate>>
<<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=spectinomycin&source=calculate>>
[Consulta: 12 junio 2015]
30. Peru K., Kuchta S., Headley J., Cessna A. 2006 Development of a hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry assay for spectinomycin and lincomycin in liquid hog manure supernatant and run-off from cropland. *J. Chromatogr A*, 1107. Pag 152-158
31. Zhua W., Yanga J., Liua Y., Zhangb S. 2008. Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps. *J Chromatogr A*, 1207 Pag 29-37
32. Rezende C., Souza L., Almeida M., Dias P., Diniz M., Garcia J. 2012 Optimisation and validation of a quantitative and confirmatory method for residues of macrolide antibiotics and lincomycin in kidney by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 29, Pag 587-595
33. Lehotaya S., Mastovskaa K., Lightfielda A., Nuñez A., Dutkob T., Bluhmc L. 2013. Rapid analysis of aminoglycoside antibiotics in bovine tissues using disposable pipette extraction and ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1313, Pag 103- 112
34. VICH GL 1. Validation of Analytical Procedures: Definition and Terminology. 1998. Pag 1-5.
35. VICH GL 2. Validation of Analytical Procedures: Methodology. 1998. Pag 1-10.
36. VICH GL 49. Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food producing animals: Validation of analytical methods used in residue depletion studies. 2010. Pag 1-21.
37. Goicoechea H., Olivieri A. 2010. *La Calibración en Química Analítica*. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. Capítulo 2. Pag 8-26.
38. McKellar Q., Sanchez Bruni S., Jones D. 2004. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 27, Pag 503-514
39. Andes D., Craig W. 2002. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. *J Antimicrob Agents.* 19, Pag 261-268

40. Scaglione F. 2002. Can PK/PD be used in everyday clinical practice. *J Antimicrob Agents*. 19 Pag 349–353
41. Gałuszka, A., Konieczka, P., Migaszewski, Z.M, Namies´nik J. 2012. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures *Trends Anal Chem*. 37, Pag 61-72.
42. Mestorino N., Formentini E, Lucas M., Fernandez C. Modamio P., Hernández E., Errecalde J. 2008. Pharmacokinetic disposition of triclabendazole in cattle and sheep; discrimination of the order and the rate of the absorption process of its active metabolite triclabendazole sulfoxide. *Vet Res Commun*. 32, Pag 21–33
43. Escandar G., Arancibia J., Bortolato S. 2008. Chemometrics-assisted excitation-emission fluorescence spectroscopy on nylon membranes. Simultaneous determination of benzo[a]pyrene and dibenz[a,h]anthracene at part-per-trillion levels in the presence of the remaining EPA PAH priority pollutants as interferences. *Anal. Chem*, 80. Pag 8276-8286.
44. Bro R. 1997. PARAFAC: tutorial and applications. *Chemom. Intell. Lab. Syst*. 38, Pag 149–171.
45. Cañas A., Richter P., Escandar G. 2014. Chemometrics-assisted excitation–emission fluorescence spectroscopy on nylon-attached rotating disks. Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of interferences. *Anal Chim Acta*. 852. Pag 105-111

IX. Publicaciones

En las siguientes páginas se adjuntan los artículos publicados durante el desarrollo de la tesis doctoral.

A new rotating-disk sorptive extraction mode, with a copolymer of divinylbenzene and *N*-vinylpyrrolidone trapped in the cavity of the disk, used for determination of florfenicol residues in porcine plasma

Alejandro Cañas · Samuel Valdebenito · Pablo Richter

Received: 5 July 2013 / Revised: 23 December 2013 / Accepted: 15 January 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract A novel extraction approach was developed based on rotating-disk sorptive extraction (RDSE). In this approach the rotating-disk extraction device consists of a Teflon disk, with a cavity that is loaded with a commercial sorbent phase selected according to the polarity of the analyte. To avoid leakage of the sorbent, the cavity is covered with a fiberglass filter and sealed with a Teflon ring. The proposed novel analytical RDSE technique was used in this study to determine florfenicol levels in plasma as a model analyte, or sample system, to describe the pharmacokinetics of a veterinary formulation. The sorbent used for this application was the copolymer of divinylbenzene and *N*-vinylpyrrolidone (Oasis HLB), which was selected because the florfenicol molecule contains both hydrophilic and lipophilic moieties. After the extraction, final determination of the analyte was performed by HPLC–DAD. Calibration plots and other analytical features were obtained after 90 min of extraction. The calibration plot was linear over the interval 0.4–16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($n=6$), with $R^2=0.9999$. Recovery and repeatability were determined using a blank plasma sample spiked with 4.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ florfenicol. A recovery of 91.5 %, with a relative standard deviation (RSD) of 8.8 %, was obtained when the extraction was evaluated using six different rotating-disk devices. Precision was also assessed, using the same disk (containing the same sorbent phase) for eight aliquots of the same sample. The RSD under

these conditions was 10.2 %, clearly indicating that the sorptive phase could possibly be re-used. Accordingly, RDSE is a suitable sample preparation alternative to liquid–liquid extraction (LLE), solid-phase extraction (SPE), and stir-bar sorptive extraction (SBSE).

Keywords Rotating-disk sorptive extraction · Florfenicol · Oasis HLB · Plasma · Sample preparation

Introduction

One of the most important steps in sample preparation for determination of trace amounts of organic compounds is the extraction and/or separation of the analyte from the matrix. This increases the sensitivity of the chemical measurement, and minimizes the interference associated with the matrix. In this context, extraction techniques have been the focus of intensive research over the last 15 years, with the objective of achieving advances in automation, miniaturization, and simplification [1, 2].

Currently, the most-used replacement for the traditional liquid–liquid extraction (LLE) method for separating organic pollutants from liquid samples is solid-phase extraction (SPE) [3]. An important aspect of SPE performance is control of the flow rate during sample loading, because in this technique the flow of the sample is almost exclusively unidirectional. Flow that is too fast can result in low recovery, caused by breakthrough during the analyte retention step or inadequate elution during the elution step [3].

In addition, several “solvent-free” sample-preparation strategies for liquid samples have been developed, starting from solid-phase microextraction (SPME) [4], which are based on the use of appropriate polymeric sorbents for extraction and concentration of the target compounds. One of the

Published in the topical collection *Microextraction Techniques* with guest editors Miguel Valcárcel Cases, Soledad Cárdenas Aranzana and Rafael Lucena Rodríguez.

A. Cañas · P. Richter (✉)
Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Pharmaceutical Sciences, University of Chile, PO Box 653, Santiago, Chile
e-mail: prichter@ciq.uchile.cl

A. Cañas · S. Valdebenito
Veterquímica S.A., Camino a Lonquén 10.387, Santiago, Chile

most representative extraction techniques belonging to this group is stir-bar sorptive extraction (SBSE), which was introduced in 1999 [5] with the purpose of increasing sensitivity compared with SPME. The extraction device in SBSE contains a volume of extracting phase much higher than that used in SPME.

As an alternative to SBSE, rotating-disk sorptive extraction (RDSE) was introduced in 2009 [6]. The typical dispositive used in this technique is a Teflon disk containing an extraction phase with a high surface-area-to-volume ratio. The extraction device can be stirred at much higher velocity, without damaging the phase, than can be achieved with the stir bar used in SBSE, because the extraction phase is only in contact with the liquid sample. The higher rotation velocity of the extraction device reduces the boundary layer of water at the interface, speeding up the analyte mass transport.

In the standard version of RDSE, the sorbent phase is a polymer film adhered to one side of the Teflon disk. In this configuration, polydimethylsiloxane (PDMS) and octadecyl (C18) was used as the solid phase for extraction of low-polarity analytes ($\log P$ between 3 and 7) [6–11]. However, for more-polar analytes ($\log P < 3$), quantitative recoveries are not achievable with short extraction times [8]. We propose a second configuration for RDSE, consisting of a disk with a cavity (Fig. 1) that can be loaded with a commercial sorbent phase typically used in SPE and selected depending on analyte polarity. To avoid leakage of the sorbent from the cavity, the cavity is covered with a fiberglass filter and sealed with a Teflon ring.

There is great interest in the veterinary drug industry in the development of effective analytical methods for measuring veterinary residues in plasma to describe the pharmacokinetics of the administered drug product. Such methods would facilitate more efficient selection of administration routes and dosage levels to achieve adequate chemotherapeutic concentrations and distribution of the product. Determination of drug

concentrations in plasma is also an important indicator for formulation bioequivalence studies [12].

The development of new, greener analytical strategies for sample preparation is an opportunity to incorporate innovations into the current analytical chemistry of the veterinary drug industry. In this context, the proposed novel analytical technique for RDSE was used to determine florfenicol levels in plasma, as a model analyte or sample system (Fig. 2). Florfenicol is a broad-spectrum antibiotic, used in treatment of cattle, pigs, poultry, and fish because it is rapidly metabolized to florfenicol amine and has a relatively short withdrawal time [13]. Considering the amphiphilic structure of florfenicol, Oasis HLB was selected as the sorptive phase for this RDSE application. To describe the pharmacokinetics of absorption and elimination, it is necessary to determine the concentration of the drug in plasma. After the RDSE procedure, quantification can be performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with a UV detector, using a reversed phase [14].

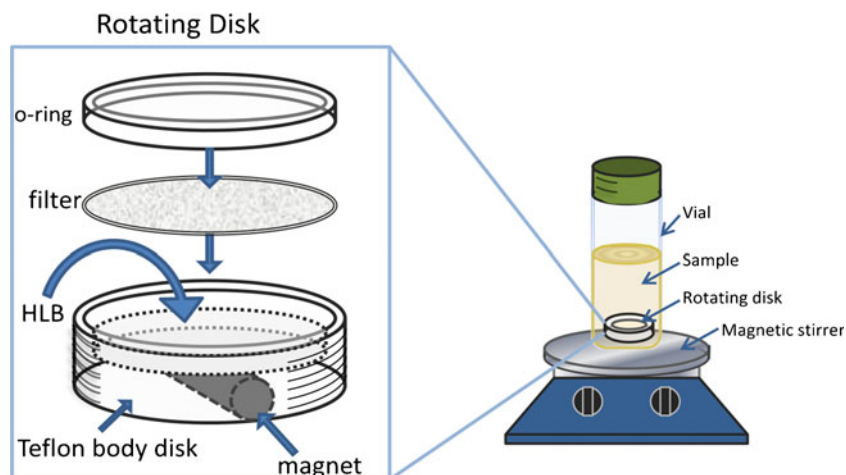
Sample preparation techniques including liquid–liquid extraction (LLE) with ethyl acetate [15] and SPE with C18 phase [14] have previously been used for florfenicol extraction from plasma samples. SBSE has also been used for plasma samples, but for other analytes than florfenicol [16].

Experimental

Reagents

Nanopure water from a Barnstead water system (Dubuque, IA, USA) was used for all experiments. Florfenicol (100 % purity) was provided by Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). A stock standard solution of the analyte, of $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, was prepared in acetonitrile and was stable for at least two months at $-18 \text{ }^\circ\text{C}$. Intermediate standard

Fig. 1 Schematic diagram of the rotating disk used in this study



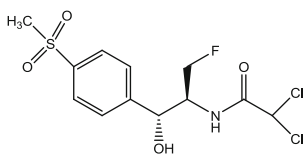


Fig. 2 Structure of florfenicol

solutions of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ were prepared by dilution with acetonitrile and were stable for at least one week at 4°C . The powdered extraction sorbent Oasis HLB ($30 \mu\text{m}$ particle size) was obtained from cartridges provided by Waters (Milford, MA, USA). Octadecyl (C18, $30 \mu\text{m}$ particle size) cartridges obtained from Waters were used for comparison. All solvents were HPLC grade and were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Animals and experimental design

Five healthy 11-week-old hybrid pigs (land race \times large white, Duroc) were used in this study. All five pigs were male and weighed 32 ± 2 kg. Before use, they were housed in a collective pigpen for seven days. The animals were fed pelleted feed (florfenicol-free) and provided with drinking water. Animal experiments were performed in an approved ethical manner following the Guidelines of Good Clinical Practice [17].

The pigs were weighed before administration of the drug, and the dose was adjusted accordingly. One single dose of 20 mg kg^{-1} bodyweight of florfenicol formulation (2 % oral Duflosan Veterquímica, Santiago, Chile) was administered orally. Blood samples were taken from each pig while it was immobilized in a restraining device, and were collected in Vacutainer tubes (Lithium Heparin) at 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 8, 12, 16, and 32 h after drug administration. Blank samples were taken from each pig just before drug administration. The samples were centrifuged for 10 min (1.5 G), and the plasma samples were stored frozen (-20°C) until analysis. All samples were analyzed within two weeks after the experiments were performed.

Preparation of the rotating disks

The extraction device used in this study (Fig. 1) was a Teflon disk (1.5 cm diameter) containing an imbedded miniature magnetic stirring bar (Teflon-coated Micro Stir bar from VWR International). The disk has a cavity (0.44 cm^3) on one of its surfaces, into which 80 mg Oasis HLB sorbent was loaded. The cavity was covered with a fiberglass filter (1.4 cm diameter, mean pore size $3 \mu\text{m}$) and sealed with a Teflon ring.

Instruments and apparatus

The rotating disk was driven using an MR 300 (Heidolph Instruments GmbH, Germany), a common laboratory

magnetic stirrer. Quantification of florfenicol was performed using a LaChrom Elite HPLC System with an L-7400 UV detector (Hitachi, Tokyo, Japan) and a C8 HPLC column ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$, Waters). A LaChrom Elite HPLC System with an L-2450 diode-array detector (DAD) (Hitachi) was used for confirmation of florfenicol in samples.

Analytical procedure

Before use, the Oasis HLB sorbent packed in the rotating disk was conditioned by rotation for 10 min in a vial containing 10 mL methanol.

10 mL phosphate buffer (5 mmol L^{-1} , pH 3.2) was poured into a 25 mL EPA vial, and a $250 \mu\text{L}$ aliquot of porcine plasma sample was added. The previously conditioned disk was submerged in the sample and rotated at 1250 rpm for 90 min. After the extraction, the disk was cleaned with water for 30 s, dried using a lint-free tissue, and placed into a 15 mL vial that contained 8 mL acetone as the desorption solvent. The disk was stirred at 1250 rpm for a desorption time of 60 min. The solvent was then evaporated to dryness under an N_2 stream, and the final extract was re-dissolved in 2 mL mobile phase. This volume was filtered using a syringe containing a PVDF membrane ($0.45 \mu\text{m}$), and poured into a vial for injection into the HPLC instrument.

The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile and water at a ratio of 35:65 (v/v). The injection volume was $50 \mu\text{L}$, the monitoring wavelength was 228 nm, the oven temperature was 25°C , and the flow was 0.8 mL min^{-1} . The calibration curve was prepared using blank plasma at a range of concentrations from 0.4 – $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($n=6$).

Spectrum match was used for confirmation of florfenicol in samples (HPLC–DAD).

Results and discussion

RDSE methods have previously been revealed to be applicable to water samples [6–11]. Furthermore, according to previous studies on SBSE and SPE [16, 18], the proposed RDSE technology could be extended to more complex liquid matrices, including plasma. RDSE does not require substantial control of the sample's passage through the extraction phase, as is mandatory in an SPE cartridge, because recirculation of the sample into the device maximizes its sorptive capacity, and the interface is continuously renewed during the extraction process. Furthermore, in RDSE, the extraction phase is only in contact with the liquid sample during the extraction process, whereas in SBSE, the extraction phase is in direct contact with the bottom of the sample vial, where the stir bar rotates, making the phase less durable.

The reversed-phase sorbent Oasis HLB is a macroporous copolymer made from a balanced ratio of divinylbenzene and

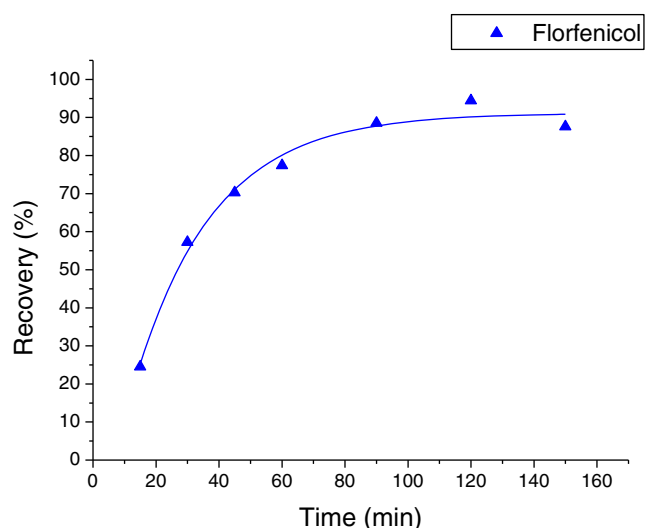


Fig. 3 Extraction time profile for florfenicol using RDSE

N-vinylpyrrolidone. This solid phase is currently one of the most commonly used sorbents for SPE extraction of drugs with different polarities [19–21], but has not been used for extraction of florfenicol. Oasis HLB is a copolymer with a high degree of crosslinking, a high porosity, and an open structure, enabling hydrophobic interactions (through π - π interactions between benzene rings and the less polar part of the analytes) and hydrophilic retention (via the formation of hydrogen bonds between the pyrrolidone moiety and the polar groups of the analyte). This adsorbent has been widely used in SPE systems, but use of this sorbent has not been reported in stir-bar sorptive extraction (SBSE) or in rotating-disk sorptive extraction (RDSE). RDSE with divinylbenzene-*N*-vinylpyrrolidone should be suitable for the extraction of a semipolar drug, for example florfenicol (log *K*_{ow} 0.67), from porcine plasma, simplifying sample preparation and reducing the volume of solvent required.

An attempt to immobilize the solid-phase powder in the original rotating-disk configuration (without cavity), using a variety of adherents (double-sided tape, silicone, etc.), resulted

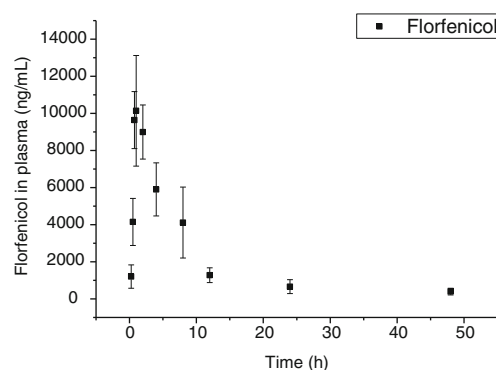


Fig. 5 Pharmacokinetics of florfenicol in pigs, obtained by RDSE for 2 % Duflosan (Veterquímica)

in detachment of part of the phase during rotation of the disk. Thus the rotating device was designed, as shown in Fig. 1.

Florfenicol is a weak acid (pK_a 9.02), so higher recovery for extraction into Oasis HLB sorbent was obtained when the molecule was preferably neutral, at $pH < 9$. However: between pH 4.5 and pH 9.0, different interfering signals appeared in the chromatograms, hindering proper identification and integration of the analyte's signal. Below pH 4.5, the analyte's signal in the chromatogram was not subject to interference. Therefore, a pH of 3.2 was selected for use in the RDSE experiments.

Use of matrix modifiers in microextraction techniques can enhance the efficiency of extraction of some analytes, depending on their polarity [10]. NaCl is a modifier that is often used because of the salting-out effect, which changes the ionic strength of the sample. For semipolar and polar analytes, the addition of salt usually increases the extraction efficiency by making the analytes insoluble in water and increasing their affinity for the apolar phase [9, 10]. The effect of adding 0–4 % NaCl was studied, and the addition of salt had a negative effect on the sensitivity of the signal. The interactions of the analyte with the divinylbenzene-*N*-vinylpyrrolidone polymer are probably not favored in a saline medium, for example PDMS. Consequently, no salt was added to the subsequent optimization experiments.

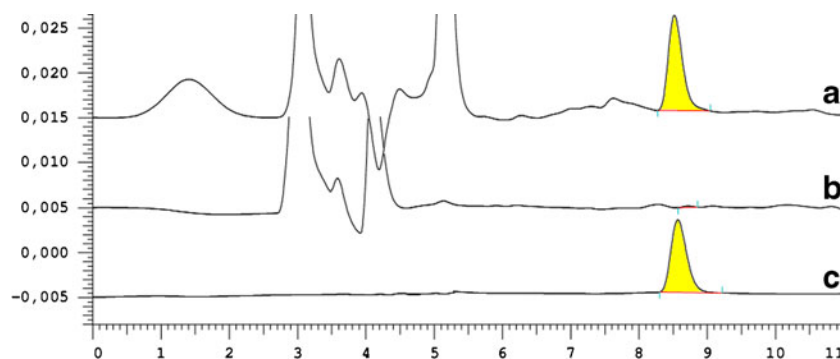


Fig. 4 (a) Chromatogram obtained after extraction by RDSE of a plasma sample from a pig treated with florfenicol (1 h after the oral administration of 2 % Duflosan). Chromatograms of (b) a blank plasma sample and (c) a

florfenicol standard (equivalent to $4.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ in plasma) are shown for reference. The signal of florfenicol was integrated, and is shown in yellow

Efficient stirring of the sample in contact with the extraction phase is mandatory to achieve partition equilibrium as rapidly as possible, because, in microextraction techniques, analyte mass transfer through the boundary layer in contact with the surface of the phase determines the rate of analyte extraction. Consequently, the rotating velocity of the disk was maintained at the maximum value allowed by the stirrer unit (1250 rpm).

The extraction time was determined under the established experimental conditions (Fig. 4). The samples were extracted by RDSE at different times, ranging from 15 to 150 min, and the extraction profile was obtained. Extraction time affects the amount of analyte concentrated in the Oasis HLB phase, as shown in Fig. 3. Extraction yield increases with extraction time until equilibrium is reached, after approximately 90 min.

As shown in Fig. 4, the chromatographic signal of florfenicol was clear and without interference when the proposed method was applied to a plasma sample under the selected conditions. For comparison, Fig. 4 also shows the chromatograms of a blank plasma sample and of a florfenicol standard.

Taking into account that C18 is the solid phase used in SPE extraction of florfenicol from plasma [14], this phase was also assessed in this new device for RDSE, by packing 80 mg C18 into the cavity of the extraction disk. The extraction capability of C18 was 20 % lower than that of Oasis HLB under the same extraction conditions.

A calibration plot and other analytical features were obtained after 90 min of extraction. The calibration plot was linear over the interval of 0.4–16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($n=6$), with $R^2=0.9999$. Detection (LOD) and quantification (LOQ) limits of the method were determined using the 3.3σ and 10σ criteria [22], respectively. The LOD and LOQ were found to be 48.1 and 145.9 ng mL^{-1} , respectively.

Repeatability and recovery were determined using different extraction disks ($n=6$) at a concentration of 4.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ florfenicol in the plasma. A recovery of 91.5 % and RSD of 8.8 % were obtained. The same study at concentrations of 0.4 and 8.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($n=6$) obtained recoveries of 106.4 % and 94.6 %, and RSD 7.6 % and 10.0 %, respectively. Precision was also determined, by sequential use of the same extraction disk (containing the same sorbent phase) for different aliquots of the same sample at a concentration of 4.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ florfenicol ($n=8$). The RSD under these conditions was 10.2 %, clearly indicating that the sorbent Oasis HLB could be re-used.

The pharmaceutical industry has developed diverse techniques to release drugs to animals in an optimum way. Consequently, pharmacokinetic studies are mandatory to establish whether release of the drug is optimum for the desired dose, or if it is necessary to use prolonged periods of drug release. In this context, the proposed method was used to determine the florfenicol concentration in porcine plasma in a

pharmacokinetic study. Figure 5 shows the curve obtained after analysis of 50 samples (10 different time points after administration to five pigs). The pharmacokinetic data obtained from porcine plasma are consistent with the data reported in the literature [14, 23].

Conclusions

A microextraction method using RDSE was developed to extract florfenicol from the plasma of livestock. The method used the sorbent Oasis HLB, which is typically used in SPE. The proposed method is a good sample preparation alternative to LLE, SPE, and SBSE. The main disadvantage of this method is the relatively long extraction and elution processing times compared with those of SPE methods.

These positive results indicate that this method could also be extended to other complex liquid matrices of animal origin (urine, milk, fluids, etc). Even in animal tissue, where the maximum residue limits (LRMs) are established [13], analysis could be performed through a sample pretreatment enabling the analytes to be transferred to an aqueous phase for extraction and/or clean-up by RDSE.

Acknowledgments The authors would like to thank FONDECYT (project 1100085) for financial support. One of the authors (AC) would like to thank CONICYT for her doctoral fellowship.

References

1. Lucena R (2012) Extraction and stirring integrated techniques: examples and recent advances. *Anal Bioanal Chem* 403:2213–2223
2. Cruz-Vera M, Lucena R, Cárdenas S, Valcárcel M (2009) Liquid-phase microextraction in bioanalytical sample preparation. *Bioanalysis* 1:135–149
3. Majors RE (2010) Solid phase extraction. In: Pawliszyn J, Lord HL (eds) *Handbook of sample preparation*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, p 53
4. Belardi RG, Pawliszyn J (1989) The application of chemically modified fused silica fibres in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. *Water Pollut Res J Can* 24:179–189
5. Baltussen E, Sandra P, David F, Cramers C (1999) Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *J Microcolumn* 11:737–747
6. Richter P, Leiva C, Choque C, Giordano A, Sepúlveda B (2009) Rotating disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples. *J Chromatogr A* 1216:8598–8602
7. Richter P, Cañas A, Muñoz C, Leiva C, Ahumada I (2011) Rotating disk sorbent extraction for pre-concentration of chromogenic organic compounds and direct determination by solid phase spectrophotometry. *Anal Chim Acta* 695:73–76
8. Giordano A, Richter P, Ahumada I (2011) Determination of pesticides in river water using rotating disk sorptive extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta* 85:2425–2429
9. Cañas A, Richter P (2012) Solid-phase microextraction using octadecyl-bonded silica immobilized on the surface of a rotating

- disk: determination of hexachlorobenzene in water. *Anal Chim Acta* 743:75–79
10. Jachero L, Sepúlveda B, Ahumada I, Fuentes E, Richter P (2013) Rotating disk sorptive extraction of triclosan and methyl-triclosan from water samples. *Anal Bioanal Chem*. doi:10.1007/s00216-012-6679-y
 11. Manzo V, Navarro O, Honda L, Sánchez K, Toral MI, Richter P (2013) Determination of crystal violet in water by direct solid phase spectrophotometry after rotating disk sorptive extraction. *Talanta* 106:305–308
 12. Grabowski T, Marczak M, Jaroszewski JJ, Whitmire M (2012) Comparison of bioequivalence study regulatory requirements for human and veterinary drugs. *Regul Toxicol Pharmacol* 64:233–242
 13. Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP) (1999) The European agency for the evaluation of medicinal products. Florfenicol (extension to pigs), Summary Report, EMEA/MRL/591/99-FINAL
 14. Vue C, Schmidt LJ, Stehly GR, Gingerich WH (2002) Liquid chromatographic determination of florfenicol in the plasma of multiple species of fish. *J Chromatogr B* 780:111–117
 15. Jianzhong S, Xiubo L, Haiyang J, Walter HH (2004) Bioavailability and pharmacokinetics of florfenicol in healthy sheep. *J Vet Pharmacol Ther* 27:163–168
 16. Melo LP, Nogueira AM, Lanças FM, Queiroz ME (2009) Polydimethylsiloxane/ polypyrrole stir bar sorptive extraction and liquid chromatography (SBSE/LC-UV) analysis of antidepressants in plasma samples. *Anal Chim Acta* 633:57–64
 17. EMEA (2000) Guidelines of good clinical practice (CVMP/VICH/595/98-FINAL London, 4 July 2000). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004343.pdf
 18. Liang Y, Liu AH, Qin S, Sun JH, Yang M, Li P, Guo DA (2008) Simultaneous determination and pharmacokinetics of five bufadienolides in rat plasma after oral administration of Chansu extract by SPE-HPLC method. *J Pharm Biomed Anal* 46:442–448
 19. Stolker AAM, Brinkman UAT (2005) Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review. *J Chromatogr A* 1067:15–53
 20. Pavlovic DM, Babic S, Horvat AJM, Kastelan-Macan M (2007) Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *Trends Anal Chem* 26:1062–1075
 21. Aguilera-Luiz MM, Martínez-Vidal JL, Romero-González R, Garrido-Frenich A (2012) Multiclass method for fast determination of veterinary drug residues in baby food by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem* 132: 2171–2180
 22. Veterinary International Conference on Harmonization” (VICH) (1998) Guideline of analytical procedures: methodology. CVPM/VICH/591/98-FINAL, London, 10 December 1998
 23. Mahmoudian M, Falahat-Pishe HR, Teyebi L, Falahati F, Dibazer S (2010) Pharmacokinetics of florfenicol in young male calves using HPLC. *J Pharm Sci Technol* 2:432–435



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca



Chemometrics-assisted excitation–emission fluorescence spectroscopy on nylon-attached rotating disks. Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of interferences

Alejandro Cañas^a, Pablo Richter^{a,**}, Graciela M. Escandar^{b,*}

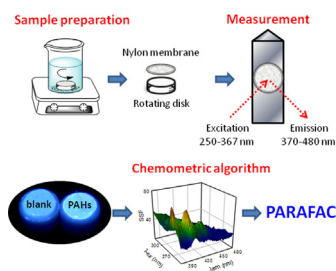
^a Departamento de Química Inorgánica y Analítica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile

^b Instituto de Química Rosario (CONICET-UNR), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531, 2000 Rosario, Argentina

HIGHLIGHTS

- Nylon-attached rotating disk successfully extracts PAHs from aqueous solutions.
- Fluorescence second-order data of adsorbed PAHs are easily obtained from the surface.
- A simple and safe analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons is developed.
- The PARAFAC algorithm allows the quantification in very interfering media.
- Determination is accomplished using green-chemistry principles.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 July 2014

Received in revised form 16 September 2014

Accepted 22 September 2014

Available online xxx

Keywords:

Rotating disk extraction

Nylon membrane

Excitation–emission fluorescence matrices

Second-order calibration

Polycyclic aromatic hydrocarbons

ABSTRACT

This work presents a green and very simple approach which enables the accurate and simultaneous determination of benzo[*a*]pyrene, dibenz[*a,h*]anthracene, benz[*a*]anthracene, and chrysene, concerned and potentially carcinogenic heavy-polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in interfering samples. The compounds are extracted from water samples onto a device composed of a small rotating Teflon disk, with a nylon membrane attached to one of its surfaces. After extraction, the nylon membrane containing the concentrated analytes is separated from the Teflon disk, and fluorescence excitation–emission matrices are directly measured on the nylon surface, and processed by applying parallel factor analysis (PARAFAC), without the necessity of a desorption step. Under optimum conditions and for a sample volume of 25 mL, the PAHs extraction was carried out in 20 min. Detection limits based on the IUPAC recommended criterion and relative errors of prediction were in the ranges 20–100 ng L⁻¹ and 5–7%, respectively. Thanks to the combination of the ability of nylon to strongly retain PAHs, the easy rotating disk extraction approach, and the selectivity of second-order calibration, which greatly simplifies sample treatment avoiding the use of toxic solvents, the developed method follows most green analytical chemistry principles.

* Corresponding author. Tel.: +54 341 4372704; fax: +54 341 4372704.

** Corresponding author.

E-mail addresses: prichter@ciq.uchile.cl (P. Richter), escandar@iquir-conicet.gov.ar, gmesandar@hotmail.com (G.M. Escandar).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2014.09.040>

0003-2670/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a class of bioaccumulative and toxic organic molecules that consist of two or more fused benzene rings. Humans are exposed to PAHs through different sources (wild fires, coal tar, grilled food, industrial processes, transportation, energy production, tobacco smoke, etc.). Because many PAHs have been identified as carcinogenic, mutagenic or teratogenic, the health risk involved may be very serious [1]. In this context, it is not surprising that continuous efforts are devoted to developing methods for PAH quantification, within the framework of green chemistry principles [2,3]. In fact, there is an increasing consciousness of the need to reduce the negative impact of certain analytical methodologies on the environment, and it is notable that one of the most important current trends in analytical chemistry is the development of new eco-friendly and sustainable methods, with no compromise of their good performances.

Most methods for the determination of PAHs in environmental samples are based on chromatographic techniques: high-performance liquid chromatography (HPLC) with either fluorescence or mass spectrometry (MS) detection, and gas chromatography (GC) with MS detection [4]. Chromatographic methods for determination of PAHs in water do not significantly differ from those applied to either soil or air [4]. However, since the levels of PAHs to quantify are very low, analyte enrichment is a prerequisite for the analysis of water samples. Several pre-concentration techniques have been developed for this purpose, including liquid–liquid extraction, solid-phase extraction (SPE), solid-phase microextraction, stir-bar sorptive extraction, and membrane extraction systems. In 2009, Richter et al. introduced an alternative and very useful extraction method called rotating disk sorptive extraction (RDSE) [5]. The typical RDSE technique consists of the extraction of selected analytes onto a rotating Teflon disk coated with a sorbent phase (e.g., polydimethylsiloxane film, octadecyl membrane) in one of its sides, with several advantages over traditional extraction procedures already discussed [5–8]. In addition to be a very simple, rapid and inexpensive approach, other advantages of the RDSE method can be mentioned: (1) the architecture of the device enables a convenient surface-area-to-volume ratio, (2) extractions are carried out from small amounts of aqueous samples, (3) the recirculating regime prevents the collapse of the filter in complex samples, allowing the continuous contact between solid and liquid phases, (4) the fact that the extraction phase is only in contact with the liquid sample permits one to stir at high speeds, and (5) the adsorptive phase is easily replaceable, allowing the use of either commercial or laboratory-synthesized sorbents.

In the present report, a new strategy is proposed which involves, for the first time, a nylon membrane attached to an RDSE device, aimed at the determination of selected heavy PAHs, namely benzo[*a*]pyrene (BaP), dibenz[*a,h*]anthracene (DBA), benz[*a*]anthracene (BaA) and chrysene (CHRY). According to the International Agency for Research on Cancer (IARC), BaP and DBA are classified as belonging to group 1 (carcinogenic to humans) and to group 2A (probably carcinogenic to humans) respectively, being the most serious PAH pollutants. The remaining studied compounds, BaA and CHRY, are included in the 2B group, indicating that they are possibly carcinogenic to humans.

Taking advantage of the known ability of the nylon membrane to retain and concentrate PAHs in its surface [9,10], the indicated analytes were simultaneously extracted from the sample with a nylon-based RDSE device, and then determined by excitation–emission fluorescence matrices

(EEFMs), directly recorded on the surface of the solid substrate. Neither organic solvents nor auxiliary reagents are involved in the experiments, and the required equipment can be found in laboratories of low complexity. Subsequently, the chemometric algorithm parallel factor analysis (PARAFAC) [11], which achieves the second-order advantage [12], was applied to the solid-phase EEFMs, in order to develop a fast and reliable procedure for the determination of the four investigated PAHs. The selectivity of the method was evaluated with solutions containing the four analytes and four additional PAHs which have solid-surface fluorescence spectra significantly overlapped with those of the studied analytes.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

BaP, DBA, BaA, CHRY, benzo[*b*]fluoranthene (BbF), benzo[*g,h,i*]perylene (BghiP), indeno[1,2,3-*d*]pyrene (IcdP), and pyrene (PYR) were purchased from Aldrich (Milwaukee, WI). Methanol was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All reagents were of high-purity grade and used as received. Stock solutions of all PAHs of about 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were prepared in methanol. From these solutions, more diluted methanol solutions (ranging from 50 to 250 ng mL^{-1}) were obtained. Working aqueous solutions were prepared immediately before their use by taking appropriate aliquots of methanol solutions, evaporating the methanol by use of nitrogen and diluting with water to the desired concentrations. The PAHs were handled with extreme caution, using gloves and protective clothing.

2.2. Apparatus

Fluorescence measurements were carried out on a PerkinElmer (Waltham, MA, USA) LS 55 luminescence spectrometer equipped with a xenon discharge lamp, using excitation and emission slit widths of 5 nm. The photomultiplier tube voltage (PMT) was set at 650 V. The data matrices were collected varying the excitation wavelength between 250 and 367 nm each 3 nm, and registering the emission spectra from 370 to 480 nm each 0.5 nm. A magnetic stirrer HI 190M Hanna (Woonsocket, RI, USA) with speed control was used for the PAHs extraction.

2.3. Rotating disk nylon extraction

The preparation of the rotating disks and the general procedure was similar to that previously described [9,10]. Briefly, a 0.2 μm pore size nylon membrane (Varian, Seattle, WA, USA) was attached with a double-coated sticking tape to one side of a Teflon disk

Table 1

Composition of the samples used in the calibration set^a.

Sample	BaP	CHRY	DBA	BaA
1	0	0	0	0
2	50	100	600	300
3	300	100	600	50
4	50	600	100	300
5	300	100	100	300
6	300	600	600	300
7	50	600	600	50
8	300	600	100	50
9	50	100	100	50
10	150	300	300	150

^a All concentrations are given in ng L^{-1} .

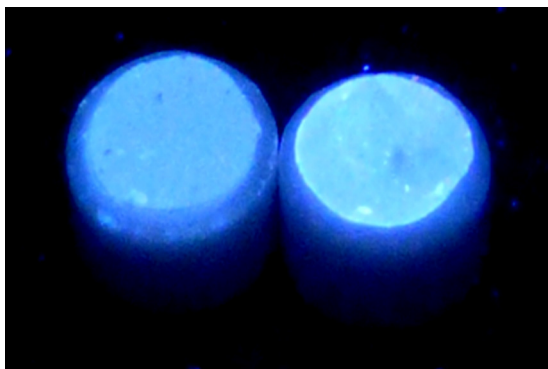


Fig. 1. Photograph of nylon-attached rotating disks irradiated with a UV lamp, after the RDSE treatment of 25 mL of water (left) and 25 mL of a solution containing BaP, DBA, BaA and CHRY (right), all at concentrations of 600 ng L^{-1} .

(1.5 cm diameter) containing a magnetic stirring bar (Teflon-coated micro stir bar from VWR International, Inc., Radnor, PA, USA). The rotating disk with the attached nylon phase was placed inside a beaker containing 25 mL of aqueous PAHs samples, and the disk was rotated at 1250 rpm for 20 min at room-temperature. After extraction, the nylon membrane was removed from the disk, and placed in a laboratory-made membrane holder. The latter was then introduced into the spectrofluorimeter, in such a way that the angle formed between the excitation and emission beams was 90° , with an incident angle of 45° .

2.4. Chemometric analysis over the nylon surface

Previous to the second-order calibration experiment, the linear relation of the fluorescence signals for BaP, DBA, BaA and CHRY with concentrations was investigated under the employed experimental conditions. The results indicated that linearity is maintained at least up to 600 ng L^{-1} for the four investigated PAHs, and no attempts were made to establish the upper concentration of the linear range. A calibration set of 10 samples containing the four analytes in the ranges $50\text{--}300 \text{ ng L}^{-1}$ (for BaP and BaA) and $50\text{--}600 \text{ ng L}^{-1}$ (for DBA and CHRY) was prepared from the corresponding working solutions (Table 1). Eight samples of the set corresponded to the concentrations provided by a two-level half-factorial design (i.e., 2^{4-1} samples). One of the remaining samples corresponded to a blank solution ($C_{\text{BaP}} = C_{\text{DBA}} = C_{\text{BaA}} = C_{\text{CHRY}} = 0$), and the remaining sample contained the studied analytes at intermediate concentrations ($C_{\text{BaP}} = C_{\text{BaA}} = 150$

ng L^{-1} ; $C_{\text{DBA}} = C_{\text{CHRY}} = 300 \text{ ng L}^{-1}$). Each sample was subjected to the RDSE procedure and the EEFM measurement described above, and the obtained EEFMs were then analyzed with second-order multivariate calibration. The spectral ranges 250–320 nm (excitation) and 380–480 nm (emission) for the four analytes were chosen after a suitable consideration of the spectral regions corresponding to their maximum signals, while avoiding useless background responses, which may be possibly due to intrinsic impurities of the nylon membrane or to physical dispersion effects.

A set of 13 validation samples, different from the calibration ones, was prepared and processed in a similar way as the calibration solutions. The concentrations of the analytes in the validation set were selected at random from the corresponding calibration ranges.

As will be demonstrated below, different PAHs, namely BbF, BghiP, IcdP, and PYR have fluorescence signals that significantly overlapped with those of the studied compounds. Hence, with the purpose of evaluating the method in the presence of these additional interfering PAHs, a 10-sample test set was prepared containing random concentrations of BaP, DBA, BaA and CHRY in the above evaluated ranges, as well as concentrations of each interferent agent, ranging between 600 and 1000 ng L^{-1} .

2.5. Software

The PARAFAC theory is well documented [11] and it is not described here. The routines employed for PARAFAC are written in MATLAB 7.6 [13]. PARAFAC was implemented using the graphical interface of the MVC2 toolbox, which is available on the internet [14].

3. Results and discussion

3.1. Preliminary studies

As already stated, a nylon membrane is able to retain PAHs and other organic compounds on its surface, and proved to be an appropriate support for their spectrofluorimetric determination [9,10]. Nylon membranes are made from nylon 6,6 (a polymer of adipic acid and hexamethylene diamine) with a chemical structure consisting of amide groups separated by methylene sequences. The amide group is essentially planar due to the partial double-bond character of the C–N bond. The chains are oriented in such a way as to maximize hydrogen bonding between the amino and carbonyl groups. Nonpolar interactions are expected between hydrophobic PAHs and the methylene chains of nylon. The mass transfer

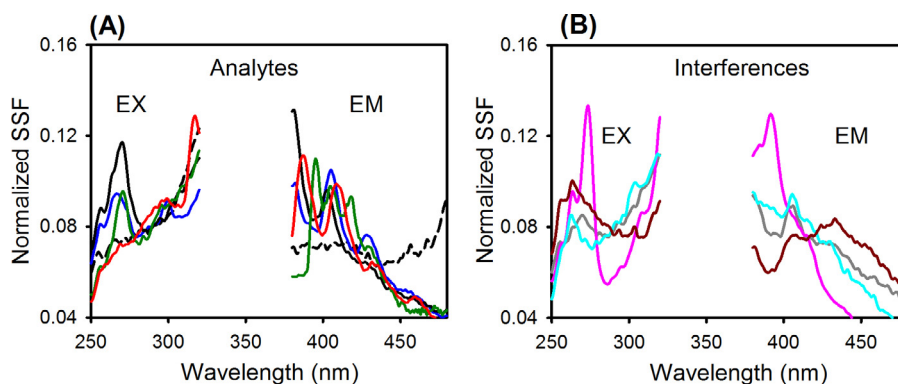


Fig. 2. (A) Normalized solid-surface fluorescence (SSF) excitation (EX) and emission (EM) spectra for BaP (blue), DBA (green), BaA (red), and CHRY (black), and (B) for BbF (brown), BghiP (cyan), IcdP (gray), and PYR (pink) immobilized onto nylon after the rotating disk procedure. The dashed-black lines in (A) correspond to the background signals. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

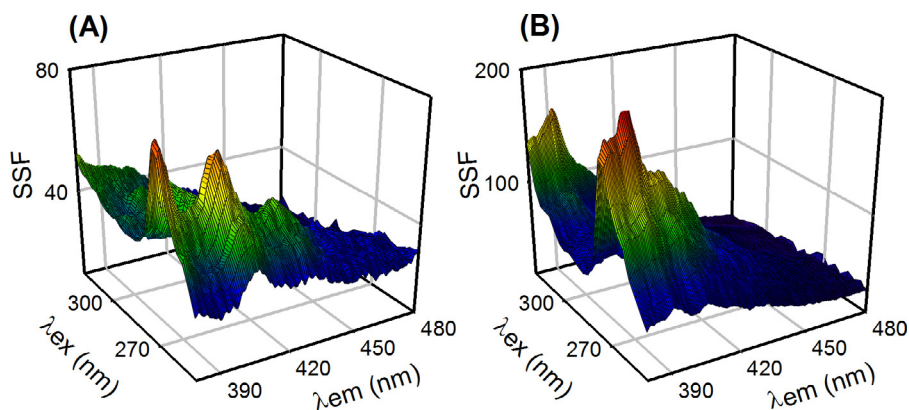


Fig. 3. Three-dimensional plots for solid-surface excitation–emission fluorescence matrices corresponding to nylon membranes treated with (A) a typical validation sample containing 100 ng L^{-1} BaP, 400 ng L^{-1} DBA, 100 ng L^{-1} BaA, and 200 ng L^{-1} CHRY, and (B) a test sample containing 140 ng L^{-1} BaP, 140 ng L^{-1} DBA, 200 ng L^{-1} BaA, 280 ng L^{-1} CHRY, 600 ng L^{-1} BbF, 800 ng L^{-1} BghiP, 700 ng L^{-1} IcdP, and 800 ng L^{-1} PYR.

towards the membrane is favored by the fact that PAHs are dissolved in an aqueous phase.

Different approaches, such as direct deposit or solid-phase extraction through a syringe procedure, can be performed in order to retain the analyte in the nylon surface. In the present work, a new strategy is proposed which consists in introducing a rotating disk attached with a nylon membrane in an aqueous PAHs solution, allowing the adsorption of the analytes onto the disk. The ability of the nylon membrane to retain PAHs dissolved in water through the rotating disk procedure can be appreciated in Fig. 1, which shows a photograph of two nylon-attached rotating disks irradiated with a UV lamp (365 nm), after the

corresponding RDSE approach using pure water (blank) and a solution of the four studied PAHs.

Exploratory experiments confirmed that fixing the extraction volume to 25 mL, optimal conditions to obtain higher signals are observed when 10 mm diameter nylon disks of $0.2 \mu\text{m}$ pore size are stirred at least 20 min at 1250 rpm and room-temperature, and these were the experimental conditions maintained in the subsequent experiments.

Fig. 2A shows the fluorescence excitation and emission spectra for BaP, DBA, CHRY, and BaA simultaneously adsorbed on the extraction nylon surface. Although these fluorescence signals, directly related to analyte concentrations, are welcome for the

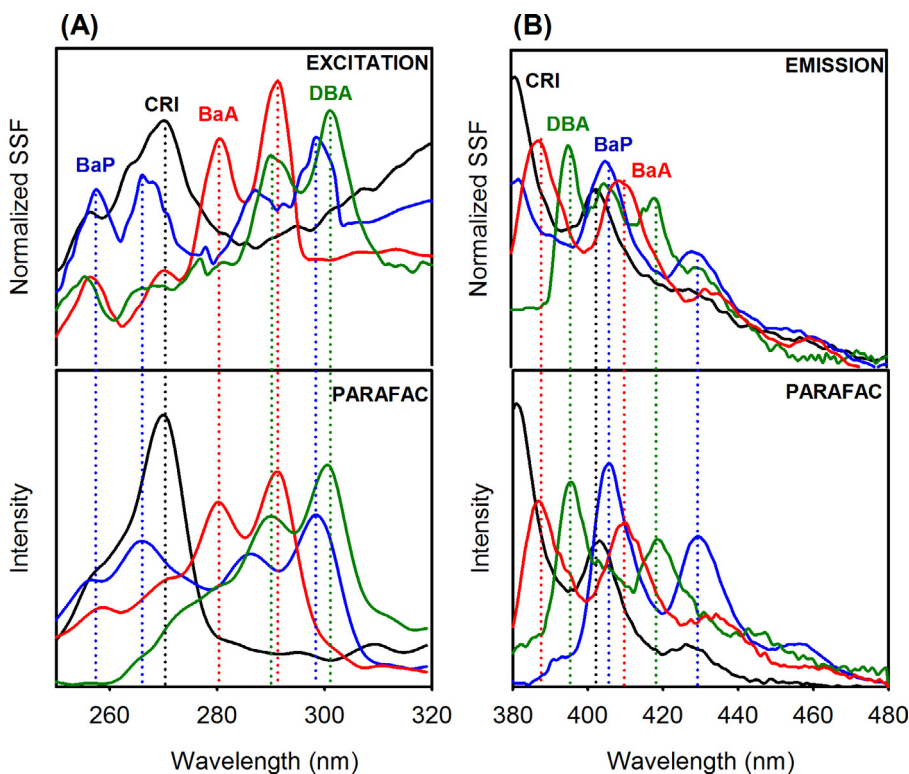


Fig. 4. Normalized solid-surface fluorescence (SSF) excitation (A) and emission (B) spectra for BaP (blue), CRI (black), BaA (red), and DBA (green), and the corresponding PARAFAC fluorescence excitation (A) and emission (B) loadings when processing a typical validation sample with the calibration set of samples. Loadings have been normalized to unit amplitude. Dotted vertical lines serve as guide for the eye. For clarity background signals have been avoided. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

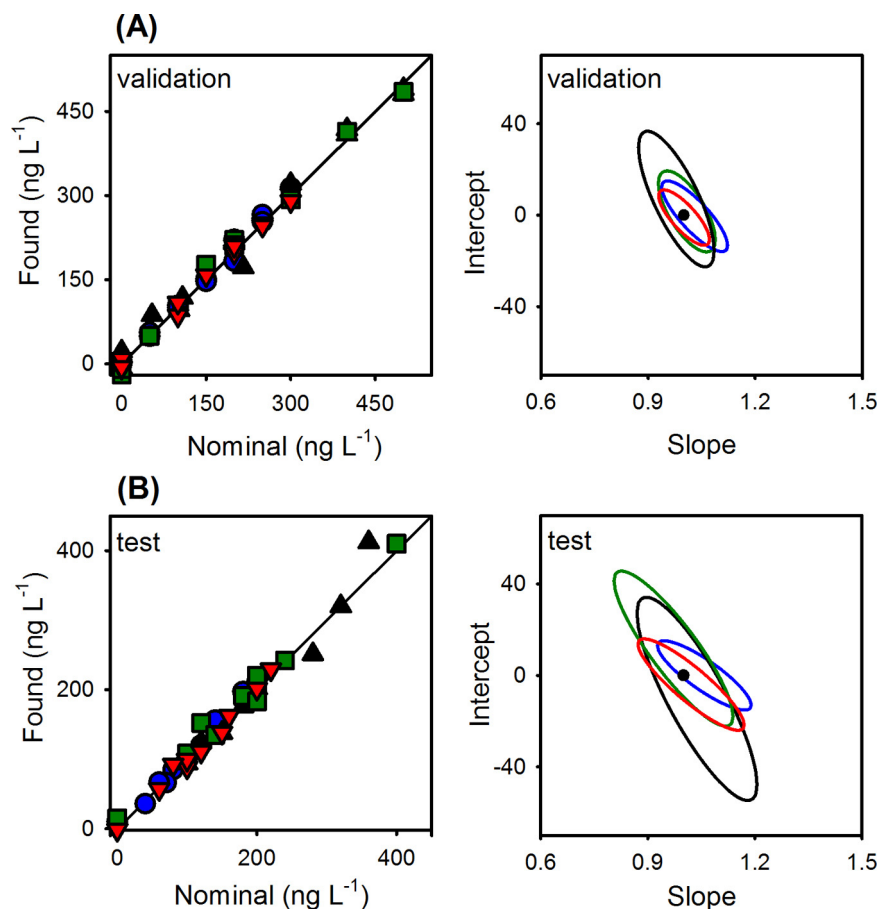


Fig. 5. Plots for the BaP (blue circle), DBA (green square), BaA (red down triangle), and CHRY (black up triangle) predicted concentrations as a function of the nominal values (the solid lines are the perfect fits), and elliptical joint regions (at 95% confidence level) for slope and intercept of the regression of the corresponding data. Black points mark the theoretical (intercept=0, slope=1) point. (A) Validation samples and (B) test samples. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

development of a solid-surface fluorescence (SSF) method for the determination of the studied compounds, it is apparent in this figure that the overlapping among the excitation and the emission spectra hinders their quantitation through a direct univariate or zeroth-order calibration. Moreover, the situation becomes critical if other PAHs are also present in samples (Fig. 2B). Therefore, in order to overcome the spectral overlapping problem, advanced chemometric modeling was applied.

3.2. Quantitative second-order analysis

After the rotating disk procedure under optimal conditions was carried out, the EEFMs were recorded on the nylon surface for calibration and validation samples (Fig. 3A), and were then subjected to chemometric analysis. It is known that a set of EEFMs can be arranged as a three-way array, which usually complies with the trilinearity conditions [15] and, thus, the chemometric analysis was performed using PARAFAC [16], a popular and easy to implement algorithm which achieves the second-order advantage [12]. Second-order advantage refers to the capacity of selected algorithms to predict the concentrations of the analytes in the presence of any number of unsuspected constituents which can be present in real samples. This useful property avoids the requirement of either interference removal, as in zeroth-order calibration, or the construction of a large and diverse calibration set, as in first-order calibration.

PARAFAC was applied to three-way data arrays built by joining the calibration data matrices with those for each of the validation samples in turn. The algorithm was initialized with the loadings giving the best fit after a small number of trial runs, selected from the comparison of the results provided by a method known as generalized rank annihilation (GRAM) and several random loadings [11]. The number of PARAFAC components was selected by the so-called core consistency analysis [17], and also through visual inspection of the spectral profiles produced by the addition of new components. The estimated number of components using

Table 2

PARAFAC statistical results for BaP, DBA, BaA, and CHRY in samples without interferences (validation set) and with BbF, BghiP, IcdP, and PYR as interferences (test set)^a.

	BaP	DBA	BaA	CHRY
Validation set				
RMSEP	10	14	8	21
REP	7	5	5	7
LOD	30	70	20	100
Test set				
RMSEP	10	16	8	21
REP	7	5	5	7
LOD	30	100	30	100

^a RMSEP (ng L⁻¹), root-mean-square error of prediction; REP (%), relative error of prediction; LOD (ng L⁻¹), limit of detection calculated according to Eq. (1).

the above technique was six, which can be justified taking into account the presence of analytes and background signals. No restrictions were applied during the PARAFAC least-squares fit. An advantage of the PARAFAC model is that it retrieves physically interpretable profiles. Identification of the chemical constituents of a sample is easily done with the aid of the estimated profiles, comparing them with those for a standard solution of each analyte of interest. Fig. 4 displays the spectral profiles retrieved by PARAFAC for a typical sample containing the analytes, where the corresponding signals are clearly distinguished.

Fig. 5A shows the prediction results after the application of PARAFAC to the complete set of validation samples. The elliptical joint confidence region (EJCR) [18] test for the slope and intercept of the predicted vs. nominal concentrations plot shows that the ideal point (1,0) lies inside the EJCR surface, suggesting that PARAFAC successfully resolves the studied system. The corresponding statistical results shown in Table 2 are also indicative of high-quality predictions.

In relation to the limits of detection (LODs), it is important to consider the low concentration levels of PAHs admitted by governmental agencies in environmental samples, especially water. The United State Environmental Protection Agency (USEPA) reports a value of 200 ng L^{-1} as a maximum concentration level for PAHs in safe drinking water [19]. As can be appreciated in Table 2, the low LODs attained are very favorable, especially for BaP (ranked first in the carcinogenic list) and BaA, taking into account the complexity of the evaluated system and the simplicity of the experimental determination. It is necessary to point out that these limits have been calculated using the expression recommended by the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC):

$$\text{LOD} = 3.3 \sqrt{hs_c^2 + \frac{hs_x^2 + s_x^2}{\text{SEN}^2}} \quad (1)$$

where h is the sample leverage at zero analyte concentration, s_c^2 is the variance in calibration concentrations, s_x^2 is the variance in the instrumental signal, SEN is the component sensitivity, and the factor 3.3 is the sum of t -coefficients accounting for Type I and II errors (false detects and false non-detects, respectively) at 95% confidence level. Eq. (1) takes into account the error propagation from both the slope and the intercept of the pseudo-univariate PARAFAC calibration curve [20].

A method is valuable when satisfactory predictions are obtained in complex systems where other constituents are also present, and may interfere the analysis. Thus, additional PAHs which demonstrated to interfere the analyte signals (Fig. 2B) were added to the samples, and they were evaluated applying the proposed strategy. Fig. 3B shows the three-dimensional plot for a solid-surface excitation–emission fluorescence matrix corresponding to a nylon membrane treated with a test sample containing analytes and interferences. Notice in this figure the scale of the intensity axis and compare it with that of Fig. 3A. The number of responsive components in these samples, selected by following a similar procedure to that indicated above for the validation samples, was in the range 7–9. It seems that in some samples, PARAFAC is not able to discern between the profiles of each individual foreign compound, grouping them into overall interfering components. However, this fact does not preclude the obtainment of good analytical results (Fig. 5B), demonstrating the high level of selectivity achieved by this method.

The statistical results shown in Table 2 for test samples are similar to those obtained for the validation ones, indicating that neither the accuracy and precision, measured through the root mean square error of prediction (RMSEP) and relative error of

prediction (REP), nor the sensitivity (LODs remain at the part-per-trillion levels) are significantly affected by the addition of these new PAHs.

Several advantages of the proposed methodology in comparison with the chromatographic ones currently employed for PAHs analysis (see Section 1) can be concluded, such as lower experimentally required time, no use of organic solvents, reduced human participation, and considerable more simplicity. In addition, the coupling to multivariate calibration significantly improves the sensitivity and selectivity of the method.

When the proposed approach is compared with that carried out in nylon but following a solid-phase extraction via a syringe procedure [8], we can conclude that although the latter one provides lower detection limits (the amide groups of nylon would enhance the water motion through the sorbent during the extraction, improving the mass transfer) [8] the main advantage of the present strategy is that the recirculating regime prevents collapse of the filter in turbid samples. Regarding the time involved in each experiment, if the extraction is simultaneously performed on several samples, the experimental time can be drastically reduced.

5. Conclusions

The extraction ability of a rotating disk attached with a nylon membrane towards PAHs from water samples has been demonstrated. After extraction, excitation–emission fluorescence matrices were directly measured in the solid-surface, and the analytes were quantified with the aid of PARAFAC algorithm at part-per-trillion levels in a very interfering medium. Beyond the outstanding sensitivity and selectivity achieved using the proposed approach, additional advantages should be mentioned. The coupling with an appropriate chemometric tool makes it unnecessary the use of clean up steps for the removal of interfering compounds, avoiding environmentally unsafe organic solvents, and saving experimental time and operator efforts. The excellent quality of the obtained results suggests that the developed method favorably competes with more sophisticated ones, representing a good choice for the rapid quantitation of PAHs in water samples, and offering routine laboratories the opportunity to work under green chemistry principles.

Acknowledgements

Fondecyt, Chile (Project 1140716), Universidad Nacional de Rosario and CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) are gratefully acknowledged for financial support.

References

- [1] A. Dipple, Q.A. Khan, J.E. Page, I. Pontén, I.J. Szeliga, DNA reactions, mutagenic action and stealth properties of polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens (review), *Int. J. Oncol.* 14 (1999) 103–111.
- [2] J.A. Linthorst, An overview: origins and development of green chemistry, *Found. Chem.* 12 (2010) 55–68.
- [3] A. Molina Díaz, J.F. García Reyes, B. Gilbert López, Solid-phase spectroscopy from the point of view of green analytical chemistry, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 654–666.
- [4] T. Wenzl, R. Simon, J. Kleiner, E. Anklam, Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 716–725.
- [5] P. Richter, C. Leiva, C. Choque, A. Giordano, B. Sepulveda, Rotating-disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8598–8602.
- [6] P. Richter, A. Cañas, C. Muñoz, C. Leiva, I. Ahumada, Rotating disk sorbent extraction for pre-concentration of chromogenic organic compounds and

- direct determination by solid phase spectrophotometry, *Anal. Chim. Acta* 695 (2011) 73–76.
- [7] A. Giordano, P. Richter, I. Ahumada, Determination of pesticides in river water using rotating disk sorptive extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Talanta* 85 (2011) 2425–2429.
- [8] V. Manzo, L. Honda, O. Navarro, L. Ascar, P. Richter, Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from waste water samples by rotating-disk sorptive extraction, *Talanta* 128 (2014) 486–492.
- [9] S.A. Bortolato, J.A. Arancibia, G.M. Escandar, A novel application of nylon membranes to the luminescent determination of benzo[a]pyrene at ultra trace levels in water samples, *Anal. Chim. Acta* 613 (2008) 218–227.
- [10] S.A. Bortolato, J.A. Arancibia, G.M. Escandar, Chemometrics-assisted excitation–emission fluorescence spectroscopy on nylon membranes. Simultaneous determination of benzo[a]pyrene and dibenz[a,h]anthracene at parts-per-trillion levels in the presence of the remaining EPA PAH priority pollutants as interferences, *Anal. Chem.* 80 (2008) 8276–8286.
- [11] R. Bro, PARAFAC: tutorial and applications, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38 (1997) 149–171.
- [12] K.S. Booksh, B.R. Kowalski, Theory of analytical chemistry, *Anal. Chem.* 66 (1994) 782A–791A.
- [13] MATLAB R2011b, The MathWorks Inc Natick, MA, USA.
- [14] www.iquir-conicet.gov.ar/descargas/mvc2.rar (accessed 09.14).
- [15] A.C. Olivieri, G.M. Escandar, A. Muñoz de la Peña, Second-order and higher-order multivariate calibration methods applied to non-multilinear data using different algorithms, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 607–617.
- [16] A.C. Olivieri, G.M. Escandar, *Practical Three-Way Calibration*, Elsevier, Waltham, MA, USA, 2014.
- [17] R. Bro, H.L. Kiers, A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models, *J. Chemom.* 17 (2003) 274–286.
- [18] A.G. González, M.A. Herrador, A.G. Asuero, Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays, *Talanta* 48 (1999) 729–736.
- [19] [19] Technical Factsheet on: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). <http://www.epa.gov/safewater/pdfs/factsheets/soc/tech/pahs.pdf> (accessed 09.14).
- [20] A.C. Olivieri, Analytical figures of merit: from univariate to multiway calibration, *Chem. Rev.* 114 (2014) 5358–5378.

DETERMINATION OF TRICLABENDAZOLE IN CATTLE PLASMA AS ITS SULPHOXIDE AND SULPHONE METABOLITES BY ROTATING DISK SORPTIVE EXTRACTION COMBINED WITH HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND ITS APPLICATION TO PHARMACOKINETIC STUDIES

ALEJANDRO CAÑAS-MÜLLER^{1,2}, MARCIAL VARGAS DEL CAMPO², PABLO RICHTER^{1,*}

¹Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Pharmaceutical Sciences, University of Chile, P.O. Box 233, Santiago, Chile.

²Veterquímica S.A. Camino a Lonquén 10.387, Santiago, Chile.

ABSTRACT

In this study, a new method for determination of triclabendazole (TCB) as its main metabolites, triclabendazole sulfoxide (TCB-SO) and triclabendazole sulfone (TCB-SO₂) in animal plasma was developed. TCB is widely used as antiparasitic in the veterinary industry. Rotating disk sorptive extraction (RDSE) was the selected sample preparation technique for extraction/clean up of the compounds from the samples followed by high performance liquid chromatography coupled to diode array detection (HPLC-DAD) for quantification.

Optimization of physicochemical variables was performed using a multivariate experimental design. Following the recommendations given in the Veterinary International Conference on Harmonization guides (VICH GL02 and VICH GL49), the validation of the method was performed, given rise to improved analytical features compared with those provided by other methods based on solid phase extraction (SPE). Linearity ($r > 0.99$) was achieved for both compounds when calibration was performed not only in standard solutions but also in animal spiked plasma. Selectivity, defined as the response ratio between blank and analyte at the limit of quantification, was 11.8% and 3.4% for TCB-SO and TCB-SO₂, respectively. Accuracy and precision, expressed in percentage, were always lower than -16.7% and 8.1%, respectively. Eco-efficiency was quantitatively assessed indicating that the method is an excellent green method.

The proposed analytical method was applied to the determination of the pharmacokinetic of two commercial products of TCB in cattle plasma after oral administration.

The good analytical performance, eco-efficiency and economy, make the method interesting for alternative use in routine laboratories.

Keywords: Triclabendazole; triclabendazole sulfoxide; triclabendazole sulfone; cattle plasma; Rotating disk sorptive extraction; HPLC.

INTRODUCTION

Triclabendazole (6-chloro-5-(2,3-dichloro phenoxy)-2-methyl-tiobenzimidazole; TCB) (Fig. 1) is an anthelmintic antiparasitic belonging to the family of benzimidazoles, which are highly effective for the treatment of the mature and immature forms of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in all ruminant species.¹ This drug is widely used for the treatment of this kind of disease in beef cattle.

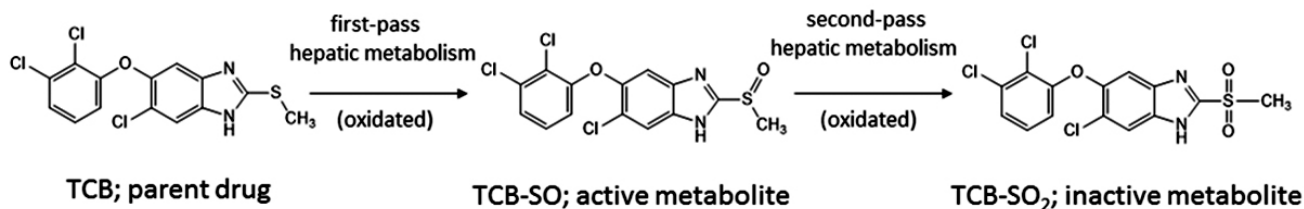


Fig. 1. Scheme for the hepatic metabolism of triclabendazole (TCB) to triclabendazole-sulfoxide (TCB-SO) and triclabendazole-sulphone (TCB-SO₂) metabolites.

The absorption, distribution, metabolism and excretion of TCB have been extensively studied and similar processes have been observed in both cattle and sheep.¹ After oral administration, a portion of the TCB is absorbed in the gastrointestinal tract, and then, it is rapidly oxidized by liver enzymes to triclabendazole sulfoxide (TCB-SO), followed by slow oxidation to triclabendazole sulfone species (TCB-SO₂) (Fig. 1). Despite its activity, TCB is practically absent in plasma, however, after distribution, its active metabolite TCB-SO is the responsible of the fasciolicide activity; meanwhile TCB-SO₂ is an inactive metabolite that accounts for the drug elimination stage.^{2,3} The antiparasitic activity of the TCB is time dependent. Its therapeutic effects occur when the administered product maintains effective concentrations of TCB and TCB-SO at the location of *Fasciola hepatica*.^{1,4}

A number of analytical methods have been described to determine TCB and its metabolites in different matrices.⁵⁻¹² The simultaneous determination of TCB and its metabolites has been reported in bovine and goat tissues by using an extraction of analytes from the tissues with acetonitrile, and then crude extracts are subjected to liquid-liquid extraction with n-hexane.^{9,19} A traditional liquid-liquid extraction has also been described for separation/determination of TCB from spiked human plasma using ethyl acetate.¹¹ Greener methodologies based on solid phase extraction (SPE) have also been proposed for preparation of samples containing anthelmintics. For instance, SPE using

hydrophilic-lipophilic polymeric based sorbent (Oasis HLB) was proposed to pre-concentrate the analytes from surface water samples and, considering the low concentration level of the analytes in the samples, ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry was applied for quantification.¹²

Taking into account the importance of the pharmacological activity of TCB and its metabolites and the distribution and presence of each of the species in plasma, it is important to develop analytical strategies to measure the metabolites in this matrix as a direct indicator of the efficiency and pharmacokinetic assessment of the product administered, which is in turn the main tool to assess the bioequivalence of pharmaceutical products. Currently the determination of TCB in animal plasma has been performed by solid phase extraction (SPE) of its metabolites using C₁₈ cartridges, followed by HPLC.⁵⁻⁸

Rotating disk sorptive extraction technique (RDSE) is a low-cost alternative microextraction technique, which has been recently described by our team for a simple preparation of environmental and biological samples. The extraction device used in RDSE contains a cavity into which the sorptive phase is loaded to extract the analyte from complex samples.^{13,14} By following this approach, in this work, we demonstrated that this extraction platform is equally applicable for determination of TCB as its metabolites sulphone and sulfoxide in cattle plasma. This method results in a greener and simpler

alternative compared with methods based on SPE.⁵⁻⁸ In addition, the extraction device is reusable and easily built in the laboratory.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Water from a Millipore-Q Plus water system (Billerica, MA) was used throughout. TCB-SO (99.6% purity) and TCB-SO₂ (99.1% purity) were provided by Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). A stock standard solution of the analyte of 1000 µg mL⁻¹ was prepared in methanol and were stable for at least 2 month at -18° C. Intermediate standard solutions of 10 µg mL⁻¹ were prepared by dilution with methanol and were stable for at least one week at 4° C. The powdered extraction sorbent Oasis HLB (60 µm particle size) was obtained from cartridges provided by Waters (Milford, MA, USA). Octadecyl C₁₈ provided by UCT (United Chemical Technologies, Bristol, England) was also assessed as sorptive phase. All solvents were HPLC grade and obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Instruments and apparatus

The rotating disks were driven using a 10-position magnetic stirrer, and in this experiment, an MS 52M (Jeio Tech, Korea) was used. Quantification was performed using a LaChrom Elite® HPLC System (Hitachi, Tokyo, Japan) with a L-2450 diode array detector (DAD) (Hitachi) and a C₁₈ HPLC column (250 mm x 4.6 mm x 5 µm, Waters).

Preparation of the rotating disks

The extraction device used in this study was a Teflon disk (1.5 cm diameter) containing an imbedded miniature magnetic stirring bar (Teflon-coated Micro Stir bar from VWR International). The disk has a cavity (0.44 cm³) on one of its surfaces in which 50 mg of Oasis™ HLB sorbent was loaded. The cavity was covered with a fiberglass filter (1.4 cm diameter, mean pore size 3 µm) and sealed with a Teflon ring.¹³

Analytical procedure

The scheme of the analytical procedure is shown in Fig. 2. Fifteen milliliters of phosphate buffer (pH 3; 10 mM) was poured into a 25 mL EPA vial, and a 400 µL aliquot of cattle plasma sample was added. The previously conditioned disk was submerged in the sample and rotated at 2000 rpm for 90 min. After the extraction, the disk was placed into a 15 mL vial that contained 8 mL of acetone as the desorption solvent. The disk was stirred at 1400 rpm for a desorption time of 60 min. The solvent was then evaporated to dryness under a N₂ stream, and the final extract was re-dissolved in 2 mL of the mobile phase. Ten samples were processed simultaneously by using a multi-position magnetic stirrer.

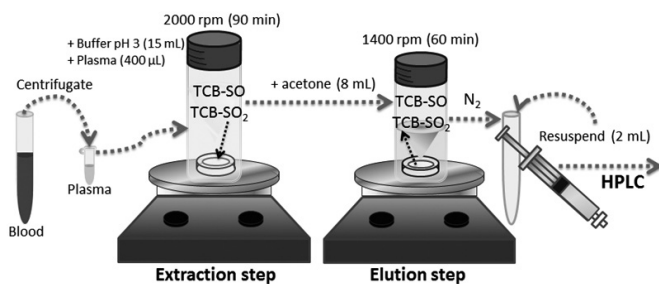


Fig. 2. RDSE methodology steps used for determination TCB-SO and TCB-SO₂ in cattle plasma.

The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile and water at a ratio of 1:1 (v/v). The injection volume was 50 µL, the monitoring wavelength was 294 nm, the oven temperature was at 25 °C, and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹.

The calibration curve for quantification was prepared using blank cattle plasma at a range of concentrations from 0.5 - 20 µg mL⁻¹ (n = 6, each point in triplicate), corresponding to an appropriate range for a pharmacokinetic study in oral doses of 12 mg kg⁻¹.

Spectrum match was used for confirmation of analytes in samples (HPLC-DAD).

Optimization of variables

Plasma volume (or dilution factor of plasma into buffer) and pH were optimized using a central composite experimental design (2k + 2k + 2) centered in the faces and with two centers. Sample volumes of 800, 400 and 200 µL, equivalent to dilution factors of 2.5, 5.0 and 10.0 and pH of 3, 4 and 5 were used. Other conditions for this study were 50 mg of sorbent, extraction time

of 90 min and rotation velocity of 2000 rpm. Blanks of cattle plasma were spiked at 2.5 µg mL⁻¹ of TCB-SO and TCB-SO₂ for optimization of variables. Recoveries of both metabolites were used as response.

The optimized method was then validated following standard criteria established in VICH GL02 and VICH GL49,^{15,16} and the following analytical features were determined: linearity of standards, linearity of spikes, selectivity, detection limit, quantification limit, accuracy and precision.

Animals and experimental design

Twelve healthy and parasite-free cattles of the same age were used in this pharmacokinetic study. All cattles were male (250 ± 5 kg). Before and during the study, the animals graze freely and were provided with drinking water. After seven days of acclimatization to the experimental conditions, the animals were housed in a collective farm for seven days of the study period. The frequency of sampling for pharmacokinetic is shown in Table 1. Animal experiments were performed in an approved ethical manner following the Guidelines of Good Clinical Practice.¹⁷ The cattles were weighed before administration of the drug, and the dose was adjusted accordingly. TCB was administered by oral route, in one single dose of 12 mg kg⁻¹ bodyweight of TCB formulation (10% oral Trisuvet Veterquímica®, Santiago, Chile) for six cattles (n=6). In parallel, for comparative purposes, a commercial formulation was administered to other six cattles (n=6), to perform the pharmacokinetic study. Blank samples were taken from each cattle just before drug administration. The samples were centrifuged for 10 min (1.5 G), and the plasma samples were frozen (-20 °C) until analysis. All samples were analyzed within two weeks after the experiments were performed.

Table 1. Acquisition test samples for pharmacokinetic study (n=6).

Day	1	2	3	4	5	6	7
Hours	0	24	48	72	96	120	144
	2	30	60				
	6	36					
	8	42					
	12						
	18						

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of Variables

Considering that both C₁₈⁵⁻⁸ and Oasis HLB¹² has been considered as sorptive phases in the determinations of these analytes using SPE, providing both good analytical performance, these same sorbents were preliminarily tested in RDSE for the extraction of both target compounds. It was observed that both sorbents provided high and comparable retention of the analytes in plasma, considering the pH range 3-5. However, a high variability in the retention of TCB-SO₂ was observed in C₁₈, with relative standard deviation over 40% in the pH range studied. Taking this into account, Oasis HLB was the selected phase for this study, showing in this preliminary experiment a better reproducibility.

Taking into account our previous experiences in RDSE procedures,^{13,14,18,19} the rotation velocity of the disk was kept at 2000 rpm, and all the optimization was made in absence of matrix modifiers. Rotation velocity was kept at the maximum velocity achieved by the magnetic stirrer, because under this condition the boundary layer formed on the surface of the sorptive phase decreases and analyte mass transfer is faster. Matrix modifiers were avoided, because these compounds are of intermediate polarity, and consequently the probability of adsorption on the walls of the sample container is low, together with a predictable minor effect of ion strength on the extraction efficiency. Intermediate polarity was also a reason to select the sorbent, considering also that some studies made by SPE used Oasis HLB as sorptive phase.⁹

Using a multivariate experimental design, the optimization of sample dilution factor and pH was performed. Optimization was performed using blank plasma samples spiked with a concentration of 2.5 µg mL⁻¹ of TCB-SO and TCB-SO₂. The recoveries of both compounds were used as response. As can be seen in Pareto charts (Fig. 3a), sample dilution shows a significant positive effect, and the increase of pH shown also a significant effect, but negative. When the slopes of the main effect plots (Fig. 3b) are analyzed, it is possible to observe that at pH 3 the signals tend to a maximum constant value. Plots also shows that dilution has an important effect on the recoveries, and the maximum response obtained, inside of the studied range, is 10. However a

value of 20 was selected (corresponding to 400 μL of sample) because it provides an adequate recovery for the range of concentration normally found in plasma for pharmacokinetics studies.

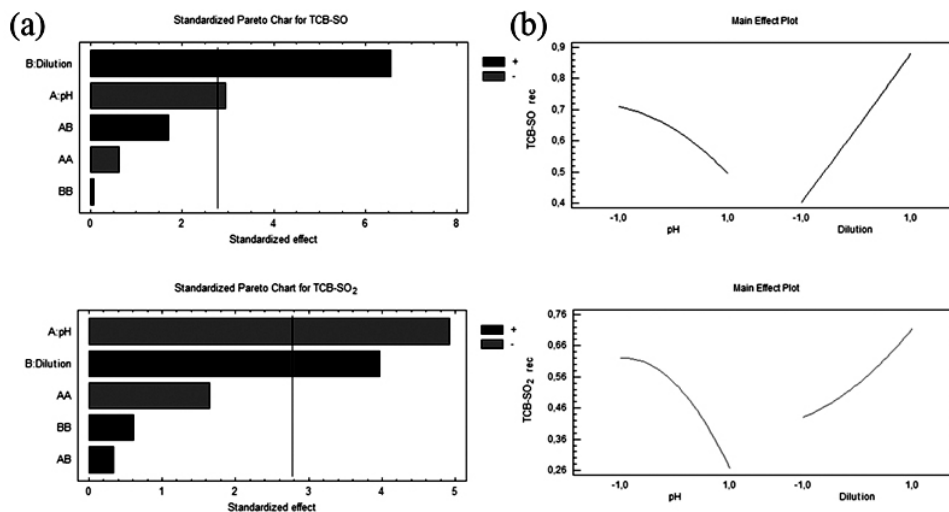


Fig. 3. (a) Pareto charts showing the effect of pH and sample dilution on extraction process for TCB-SO and TCB-SO₂ in cattle plasma. (b) Main effect plots of pH and sample dilution on extraction process of TCB-SO and TCB-SO₂ in cattle plasma.

The extraction profile of each metabolite was then assessed under the selected variables of the method (Fig. 4). As can be seen, extraction equilibrium time is achieved at 90-100 min, approximately.

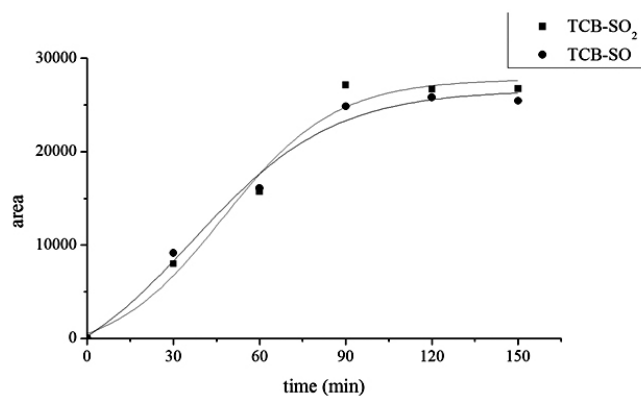


Fig. 4. Extraction profile for TCB-SO and TCB-SO₂ in plasma (2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) using RDSE.

Regarding to desorption of TCB-SO and TCB-SO₂ from the rotating disk, acetone was selected as the solvent. Normally methanol had been selected in previous studies with RDSE, in environmental samples such as waters, but in the present case, elution with methanol presented a higher chromatographic noise than the observed with acetone when a blank plasma was analyzed. A complete elution of both metabolites was obtained with of 8 mL of acetone at a rotation velocity of the disk of 1400 rpm for 60 min.

Fig. 5 shows the HPLC chromatograms obtained when a standard and a sample extract containing TBC-SO and TBC-SO₂ at a concentration of 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were injected. As can be seen, the signals are well resolved and no interference from the matrix are evidenced. Retention times of approximately 10 and 12 min were obtained for TBC-SO and TBC-SO₂, respectively, with a total chromatographic run of 13 min.

Analytical Features of the Method

Following the recommendations given in the VICH GL02 and VICH GL49 guides,^{15,16} the validation of the method was performed. Table 2 shows the analytical features of the method. For both target compounds, a very good linearity was obtained ($R > 0.99$) in both cases; when the analytes are present in standards and in spiked samples. The method resulted also selective and

sensitive enough to measure the concentration levels found in plasma sample in pharmacokinetic studies. According to Table 2, a very good accuracy and precision of the method were also achieved.

Application in a Pharmacokinetic Study

Pharmacokinetic studies are mandatory to establish that release of the drug is optimum for the desired dose or if is necessary to use prolonged periods of drug release. In this context, the proposed analytical method was applied to determine the pharmacokinetic in cattle plasma after the administration of a commercial product of TCB (10% p/v) by measuring the concentration of its metabolites TBC-SO and TBC-SO₂ in the plasma of the animals. Fig. 6 shows the curves obtained after analysis of 192 samples (16 different time points after administration to 12 cattles) considering both TCB formulations. The pharmacokinetics data obtained from TCB in plasma are consistent with the data reported in the literature,²⁰⁻²² and the pharmacokinetic parameters for both formulations were similar, as can be seen in Table 3. No significant differences were observed between C_{max} y ABC_{0-1} (p values > 0.05), obtained for both formulations, consequently both pharmaceutical products can be considered bioequivalent.

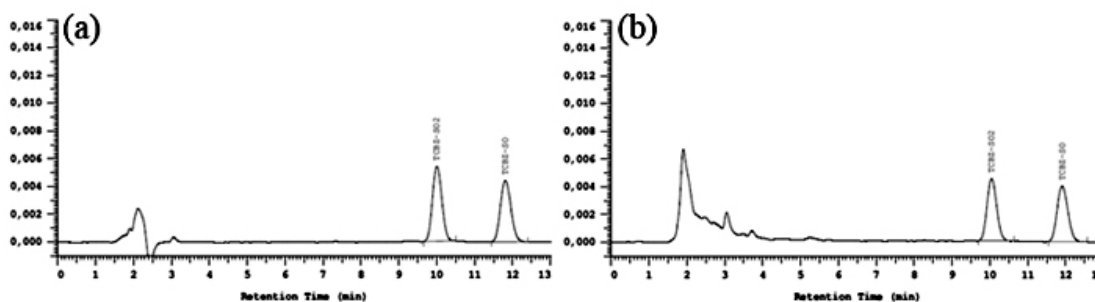


Fig. 5. Chromatograms of (a) standards of TCB-SO and TCB-SO₂ (0.5 µg mL⁻¹), (b) Cattle plasma samples spiked with TCB-SO and TCB-SO₂ (2.5 µg mL⁻¹).

Table 2. Analytical features calculated according to guides VICH GL02 and VICH GL49.

Analytical Feature	Concentration level	Replicates	TCB-SO	TCB-SO ₂
Linearity of standards	5	3	$y = 66176x - 3638$ $R^2 = 0.999$	$y = 72358x - 4850$ $R^2 = 0.997$
Linearity of spikes	5	3	$y = 11512x - 1641$ $R^2 = 0.996$	$y = 10973x - 1763$ $R^2 = 0.996$
Selectivity	1	6	11.8%	3.4%
Limit of Quantitation (LOQ)	5	3	108.4 ng mL ⁻¹	104.5 ng mL ⁻¹
Limit of Detection (LOD)	5	3	35.8 ng mL ⁻¹	34.5 ng mL ⁻¹
Accuracy	3	3	(low) +10.0 % (medium) -8.7 % (high) -8.1 %	(low) -7.7 % (medium) -16.7 % (high) -15.0 %
Precision	3	3	(CV _{low}) 8.1 % (CV _{medium}) 5.5 % (CV _{high}) 6.8 %	(CV _{low}) 8.0 % (CV _{medium}) 4.1 % (CV _{high}) 8.0 %

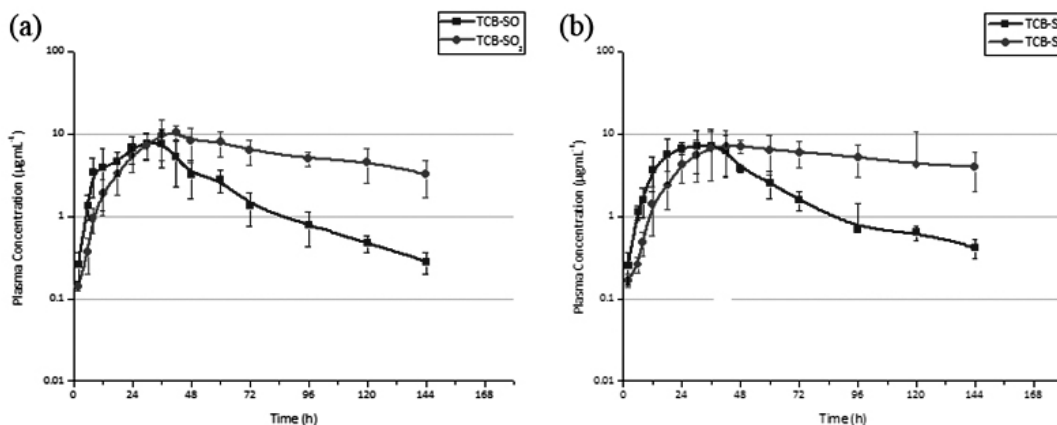


Fig. 6. Pharmacokinetics of two veterinary products of 10% triclabendazole (oral administration). (a) Trisuvet (Veterquímica S.A.) and (b) Commercial Product. (n=6 for both products).

When a critical comparison between the developed method with its counterparts using SPE,⁶⁻⁸ the main advantage of the present RDSE methodology is its simplicity and low-cost involved in the extraction device used. Regarding LOD, both alternatives resulted similar, as well as the efficiency (excellent green analysis) as can be seen in Table 4 and Table 5. The main drawback of the present method was the time involved in the extraction process, which is longer than the used in SPE (150 vs 50 min).

CONCLUSIONS

An analytical method based on RDSE and HPLC was developed and validated for the microextraction of the antiparasitic triclabendazole metabolites in cattle plasma matrix. The method developed is useful for bio-equivalence studies or to evaluate the pharmacokinetic effect of different formulations. The simplicity, economy and good performance of the process, make it interesting for alternative use in routine laboratories.

Table 3. Pharmacokinetic parameters obtained for TCB –SO cattle plasma levels, for two veterinary 10% Triclabendazole products. (a) Trisuvet 10%, Veterquímica S.A. and (b) other commercial product, both in doses of 12 mgkg⁻¹ in oral bolus.

Pharmacokinetic parameters of TCB-SO	Trisuvet 10%			Commercial formulation		
	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV
C _{max} (µgmL ⁻¹)	9.7	1.5	15.8	8.8	2.8	32.2
C _{min} (µgmL ⁻¹)	0.3	0.1	45.7	0.4	0.1	26.2
T _{max} (h)	36.0	9.3	25.8	36.0	7.6	21.1
ABC _{0-t} (µgmL ⁻¹ h ⁻¹)	408.8	85.7	21.0	410.6	91.5	22.3
ABC _{0-∞} (µgmL ⁻¹ h ⁻¹)	420.0	90.7	21.6	441.3	101.2	23.2

□ = average; σ = standard deviation; CV= coefficient of variation; C_{max} = maximum concentration; C_{min} = minimum concentration; T_{max} = time to reach maximum concentration; ABC_{0-t} = area under the curve from time 0 to the last measurement; ABC_{0-∞} = area under the curve from time 0 extrapolated to infinity; MRT= mean residence time; VD_{obs} = volume of distribution observed; CL_{obs} = clearance observed; T_{1/2} = elimination half-life.

Table 4. Comparison of analytical and efficiency parameters for RDSE and SPE method.

Parameters	RDSE method	SPE method (7,8)
LOD (µgmL ⁻¹)	35.8 (TCB-SO) 34.5 (TCB-SO ₂)	15.0 (TCB-SO) 23.0 (TCB-SO ₂)
Recovery (%)	91.3 (TCB-SO) 83.3 (TCB-SO ₂)	90.9 (TCB-SO) 79.9 (TCB-SO ₂)
CV (%)	5.5 (TCB-SO) 4.1 (TCB-SO ₂)	4.1 (TCB-SO) 5.9 (TCB-SO ₂)
Sample process time (min)	≅ 150	≅ 50
Analytical Eco-Scale score *	87	82

Table 5. Detailed information about the penalty points (PP) and eco-scale score for RDSE and SPE method (21).

RDSE method	SPE method (7,8)
Reagents	
Methanol: Re-used, < 1 mL per sample (4 PP)	Methanol: 7.5 mL (8 PP)
Acetone: 8 mL (4 PP)	Acetone: 1 mL (4 PP)
Water: 15 mL (0 PP)	Water: 15 mL (0 PP)
Instrumental	
Stirrer (1 PP)	Vacuum for manifold (2 PP)
HPLC-UV (1 PP)	Centrifuge (1 PP)
Waste (3 PP)	HPLC-UV (1 PP)
Risk (0 PP)	Waste (3 PP)
	Risk (0 PP)
Sum PP = 13	Sum PP = 19
Analytical Eco-Scale total score = 87	Analytical Eco-Scale total score = 81

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to FONDECYT (Grants numbers 1140716 and 7813110007) for financial support. One of the authors (AC) would like to thank to CONICYT the doctoral fellowship 21120020.

REFERENCES

- Bennett J., Köhler P. *Exp. Parasitol.* **63**, 49, (1987).
- Hennessy D.R., Lacey E., Steele J.W., Prichard R.K. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **10**, 64, (1987).
- Virkel G., Lifschitz A., Sallovitz J., Pis A., Lanusse C. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **29**, 213, (2006).

4. Arnorld D. (2012) Addendum to the monographs prepared by the 40th, 66th and 70th Meetings of the Committee and published in FAO Food & Nutrition Paper 41/5 & FAO JECFA Monographs 2 and 6, respectively. 1–75, Webpage visited at 10th May 2016. <ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jecfa/vetdrug/12-2012-triclabendazole.pdf>
5. Bull M.S., Shume G.R.E. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **5**, 527, (1987).
6. Sanyal P.K. *Ind. J. Pharmacol.* **26**, 200, (1994).
7. Formentini E.A., Mestorino N., Pesoa J.M., Lucas M., Reggiardo E., Marti-Diaz M., Reutemann S.H., Errecalde J.O. *Rev. FAVE – Cienc. Vet.* **3**, 39, (2004).
8. Mestorino N., Formentini E.A., Lucas M.F., Fernandez C., Modamio P., Mariño-Hernández E., Errecalde J.O. *Vet. Res. Commun.* **32**, 21, (2008).
9. Cai Ch., Xue F., Wang Z., Xiao S., Zhang L. *Food Anal. Methods* **5**, 1260, (2012).
10. Cai Ch., Zhang L., Xue F., Qiu M., Zheng W. *J. Chromatogr. B* **878**, 3106, (2010).
11. Belal F., El-Din M.K.Sh., Elenany N., Saad S. *Luminescence* **29**, 559, (2014).
12. Zrnčić M., Gros M., Babić S., Kaštelan-Macan M., Barcelo D., Petrović M. *Chemosphere* **99**, 224, (2014).
13. Cañas A., Valdebenito S., Richter P. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 2205, (2014).
14. Manzo V., Honda L., Navarro O., Ascar L., Richter P. *Talanta* **128**, 486, (2014).
15. Validation of Analytical Procedures: Methodology: Final Guidance VICH GL2 (1998) 1–10 Webpage visited at 10th May 2016. <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM052379.pdf>
16. Validation of Analytical Methods Used in Residue Depletion Studies VICH GL49 (2015) 1–23. Webpage visited at 10th May 2016. <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM207942.pdf>
17. Good Clinical Practice. VICH GL9 (2000) 1–31. Webpage visited at 10th May 2016. <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM052417.pdf>
18. Richter P., Cañas A., Muñoz C., Leiva C., Ahumada I. *Anal. Chim. Acta.* **695**, 73, (2011).
19. Jachero L., Sepúlveda B., Ahumada I., Fuentes E., Richter P. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 7711, (2013).
20. Blahová E., Brandšteterová E. *Chem. Pap.* **58**, 362, (2004).
21. Gałuszka A., Konieczka P., Migaszewski Z.M., Namiesnik J. *Trends Anal. Chem.* **37**, 61, (2012).