

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS Y AMBIENTALES

PROYECTO DE GRADUACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

“MAGÍSTER EN MANEJO INTEGRAL DE LABORATORIOS DE
DESARROLLO”

TEMA

**“EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE
NITROIMIDAZOLES EN CAMARÓN POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA
ACOPLADA CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS TÁNDEM”**

AUTOR:

JULLY TERESA SÁENZ SERRANO

Guayaquil – Ecuador

Año

2016

DEDICATORIA

Con todo mi cariño y amor dedico este proyecto a Dios por ser el
inspirador para cada uno de mis pasos en mi vivir;

A mis padres Carlos y Teresa, que hicieron todo en la vida para que yo
pudiera lograr mis sueños.

A mis hermanos Carlos, Catherine y a mi cuñada Lili, por estar siempre
apoyándome.

A mis familiares, amigos más queridos por motivarme y darme la mano
cuando sentía que el camino se terminaba.

Jully

AGRADECIMIENTOS

Gracias a cada persona importante en mi vida, que siempre estuvieron
brindándome su ayuda en especial agradecimiento:

A la PhD Olga González, que con su dedicación y apoyo permanente,
me permitió culminar con éxito este proyecto.

A todo el personal del Instituto Nacional de Pesca, en especial a mis
queridos amigos Dra. Fátima y Manolo con quienes he compartido
proyectos e ilusiones durante estos años; a Sully por estar desde un
principio en esta aventura,

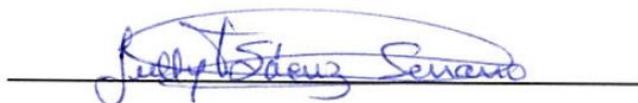
A mis amigos queridos que siempre me han prestado su cariño en cada
momento en que los he necesitado.

Pero sobre todo gracias a mis padres, hermanos y familia, por su
paciencia, comprensión, apoyo y amor eterno.

Jully

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por los hechos y doctrinas expuestas en este tipo de Proyecto de Graduación, me corresponde exclusivamente; el patrimonio intelectual del mismo, corresponde exclusivamente a la **Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Departamento de Ciencias Químicas y Ambientales** de la Escuela Superior Politécnica del Litoral.



July Teresa Sáenz Serrano

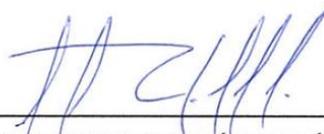
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



DAVID MATAMOROS CAMPOSANO Ph.D
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



OLGA GONZÁLEZ SÁNCHEZ Ph.D
DIRECTOR DEL PROYECTO



M.Sc MICHAEL RENDÓN MORÁN
VOCAL DEL TRIBUNAL

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
DECLARACIÓN EXPRESA	III
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ABREVIATURAS	XI
OBJETIVOS.....	XIII
Objetivo General	XIII
Objetivos Específicos	XIII
INTRODUCCIÓN	XV
GENERALIDADES	XV
DATOS SOCIOECONÓMICOS	XVI
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	XVII
JUSTIFICACIÓN	XIX
Capítulo I.....	1
1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Los Antibióticos y sus usos en la acuicultura	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. Uso de los antibióticos en la actividad acuícola	3
1.1.3. Nitroimidazoles (NIZs).....	4
1.1.4. Legislación de los Nitroimidazoles	7
1.2. Instrumentación para el análisis de los Nitroimidazoles	9
1.2.1. Espectrometría de Masa Tándem Cuadrupolar	10
Capítulo II.....	16
2. MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1. Metodología experimental	16
2.2. Fase I: Preliminar	17
2.2.1. Búsqueda bibliográfica.....	17
2.2.2. Reactivos y materiales	18
2.2.2.1. Preparación de los estándares.....	19
2.2.3. Instrumentación y software.....	21
2.2.4. Puesta a punto del método analítico	22
2.2.4.1. Optimización de las condiciones de espectrometría (MS Tune).....	22
2.2.4.2. Optimización de las condiciones cromatográficas	25
2.2.4.3. Optimización del método de extracción en matriz.....	31

2.3.	Fase II: Validación	35
2.3.1.	Diseño experimental	36
2.3.1.1.	Selectividad / Especificidad	37
2.3.1.2.	Función de respuesta / Linealidad.	38
2.3.1.2.1.	Efecto Matriz:	39
2.3.1.3.	Estabilidad	40
2.3.1.3.1.	Estabilidad en solución	40
2.3.1.3.2.	Estabilidad del analito en la matriz	42
2.3.1.4.	Robustez	42
2.3.1.4.1.	Método Cromatográfico:	43
2.3.1.4.2.	Método de extracción	43
2.3.1.5.	Exactitud	44
2.3.1.5.1.	Veracidad/Recuperación	44
2.3.1.1.	Precisión: Repetibilidad/Reproducibilidad.....	46
2.3.1.2.	Concentraciones Críticas.....	47
2.3.1.3.	Estimación de la Incertidumbre de Medida	48
2.3.2.	Muestreo y análisis de Muestras Reales	50
2.3.2.1.	Selección del área de muestreo	50
2.3.2.2.	Recolección de las muestras y almacenamiento	51
Capítulo III	53
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
3.1.	Puesta a punto del Método analítico.	53
3.1.1.	Optimización de las condiciones de espectrometría	53
3.1.2.	Optimización del método de extracción en matriz	57
3.2.	Validación	63
3.2.1.	Diseño experimental	63
3.2.2.	Selectividad / Especificidad	64
3.2.3.	Función de respuesta / Linealidad.	66
3.2.3.1.	Efecto Matriz:.....	69
3.2.4.	Estabilidad	72
3.2.4.1.	Estabilidad en solución	72
3.2.4.2.	Estabilidad del analito en la matriz	74
3.2.5.	Robustez	75
3.2.6.	Exactitud	77
3.2.6.1.	Veracidad/Recuperación.....	77
3.2.6.2.	Precisión: Repetibilidad/Reproducibilidad.....	78
3.2.7.	Concentraciones Críticas.....	79

3.2.8.	Estimación de la Incertidumbre de Medida	80
3.2.9.	Discusión de los resultados de la validación	82
3.3.	Análisis de muestras reales.....	84
Capítulo IV.....		88
4.	Conclusiones y Recomendaciones	88
4.1.	Conclusiones	88
4.2.	Recomendaciones.....	89
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	92
6.	ANEXOS	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de acción de los antibióticos.....	1
Figura 2: Anillo estructural de los nitroimidazoles y sus radicales.	5
Figura 3: Estructura molecular de los 5-nitroimidazoles y sus derivados hidroxilados.....	7
Figura 4: Cromatógrafo líquido acoplado a espectrómetro de masas Quatro Premier™ XE. Sistema HPLC/MS/MS	10
Figura 5: Esquema del Quatro Premier™ XE	11
Figura 6: Esquema del Z-spray™ en el Quatro Premier™ XE Fuente: Waters [25].....	12
Figura 7: Esquema del Travelling-wave (T-wave™) en modo rf y onda desplazamiento de los iones. Fuente: Waters [25].	12
Figura 8: Esquema del trayecto de los iones en la zona de la fuente en el Quattro Premier™ XE. Fuente: Waters	13
Figura 9: Esquema del trayecto de los iones a través del cuadrupolo. Fuente: Water [25]	14
Figura 10: Esquema de un detector tipo fotomultiplicador.	15
Figura 11: Pagina Tune y Espectro de barrido MS Scam del estándar de DMZ-D3.	23
Figura 12: Pagina Tune y Espectro de barrido MS Scam del estándar de DMZ.	24
Figura 13: Espectro de barrido Daughters Scam del estándar de DMZ	25
Figura 14: Cromatograma de 25 min, de estándares en solución de Niz s de 5 µg.kg ⁻¹ , gradiente de Journal de Chromatography [31]	27
Figura 15: Cromatograma de 18 min, de estándares en solución de Niz s de 5 µg.kg ⁻¹ , gradiente de Technical Report SIGMA-ALDRICH [27]	28
Figura 16: Cromatograma de 10 min, de estándares en solución de Nizs de 1.0 µg.kg ⁻¹ , gradiente de 10 min opción B	31
Figura 17: Procedimiento de extracción en SPE SupelMIP. Fuente: [27]	34
Figura 18: Formación de las MIP Fuente: Sigma-Aldrich	35
Figura 19: Proceso de estimación de la Incertidumbre de medida.	50
Figura 20: Sector camaronero de la Provincia del Guayas.	51
Figura 21: Comparación de las áreas de los picos cromatográficos de NIZs al optimizar el valor del Dwell.....	54
Figura 22: Comparación de la altura de los picos cromatográficos de NIZs al optimizar el valor del Dwell.....	55
Figura 23: Comparación del área de NIZs con MRM de uno y cinco canales.	56
Figura 24: Comparación de la altura de los picos cromatográficos de Niz s con MRM de uno y cinco canales.....	56
Figura 25: Comparación de las área de los picos cromatográficos de NIZs de los métodos de extracción en matriz Sigma, NaCl y Na ₂ SO ₄	59
Figura 26: Comparación de la altura de los picos cromatográficos de NIZ s de los métodos de extracción en matriz Sigma, NaCl y Na ₂ SO ₄	59
Figura 27: Evaluación de las áreas de NIZs obtenidas del método original y modificado de NaCl.....	61
Figura 28: Evaluación de las áreas de MNZ, RNZ, HMMNI, HMMNI-D3, entre el método original de NaCl, y los modificados de NaCl - Na ₂ SO ₄ y Na ₂ SO ₄	62
Figura 29: Cromatograma de blanco matriz de Niz s con estándar interno d 3ug.kg ⁻¹ de DMZ-D3, HMMNI-D3, IPZ-D3	65
Figura 30: Cromatograma de matriz fortificada de NIZs con estándar interno de 3.0 µg.kg ⁻¹ de DMZ-D3, HMMNI-D3, IPZ-D3 e interferentes de Nitrofuranos a 1.0 µg.kg ⁻¹	66
Figura 31: Curvas de calibración de los NIZs y sus márgenes de aceptabilidad.	69
Figura 32: Curvas de calibración en solución y en matriz del MNZ y RNZ.	70
Figura 33: Factor respuesta de los estándares internos DMZ-D3, HMMNI-D3, IPZ-D3, en solución y en matriz.....	70
Figura 34: “Adsorción de compuesto en el vaporizador del inyector del espectro de masas. ..	71

Figura 35: Curvas de calibración con estándar interno en solución y en matriz del DMZ, HMMNI, IPZ.....	72
Figura 36: Efecto en el área de NIZ s por el cambio de temperatura de evaporación de 50 °C a 70 °C.	76
Figura 37: Efecto de la concentración de los NIZs al disminuir las sales de 4g a 1g.....	76
Figura 38: Diagrama causa-efecto para la identificación de las fuentes de incertidumbre para el método analítico de NIZs.	80
Figura 39: Cuantificación y contribución de las fuentes de incertidumbre de los NIZs	82
Figura 40: Zonas y números de muestras de camarón tomadas en la Prov. Del Guayas. ...	85
Figura 41: Porcentaje de muestras analizadas de acuerdo a las zonas de muestreo	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de los antibióticos por su estructura química	2
Tabla 2: Alertas detectadas y emitidas por el RASFF de alimentos contaminados por residuos de nitroimidazoles en Europa.....	8
Tabla 3: Nomenclatura y propiedades de estándares de NIZs.....	18
Tabla 4: Nomenclatura y propiedades de los estándares internos de NIZs.....	18
Tabla 5: Preparación de los estándares NIZs de 100 mg.kg ⁻¹ (ppm), almacenamiento	20
Tabla 6: Preparación de los estándares NIZs de 100 µg.kg ⁻¹ (ppb), almacenamiento	20
Tabla 7: Preparación de los estándares NIZs de 25 µg.kg ⁻¹ (ppb), almacenamiento.....	20
Tabla 8: Condiciones de monitoreo de reacción múltiple (MRM) para los NIZs	25
Tabla 9: Gradiente cromatográfico de 23 min descrito Journal de Chromatography [31]	26
Tabla 10: Gradiente Cromatográfico 18 min descrito Technical Report SIGMA-ALDRICH [27].	27
Tabla 11: Gradiente cromatográfico de 10 min opción A	29
Tabla 12: Gradiente cromatográfico de 10 min opción B	30
Tabla 13: Etapas de extracción en matriz de los 3 métodos analíticos seleccionados en la revisión bibliográfica.....	33
Tabla 14: Diseño experimental para la validación de Nitroimidazoles en tejido de camarón. ...	36
Tabla 15: Preparación de la curva de calibración en matriz de tejido de camarón.	39
Tabla 16: Condiciones de almacenamiento para la determinación de la estabilidad del analito en solución	41
Tabla 17: Valor certificado de la concentración de los analitos de NIZs en el MRC ERM-BB124	45
Tabla 18: Monitoreo de reacción múltiple (MRM) de 5 canales	56
Tabla 19: Ion ratio de los analitos de NIZs, sus porcentajes de tolerancia y rangos mínimos y máximos seteados en el equipo del espectrómetro de masas	57
Tabla 20: Etapas del método de extracción en matriz del método optimizado.....	63
Tabla 21: Objetivos de validación y criterios establecidos para residuos de medicamentos de uso veterinarios	64
Tabla 22: Parámetros de las curvas de calibración y márgenes de aceptabilidad de pendiente e intercepto.....	68
Tabla 23: %Resto de analito en solución de DMZ, HMMNI, IPZ a diferentes condiciones de almacenamiento	73
Tabla 24: %Resto de analito en solución de MNZ y RNZ a diferentes condiciones de almacenamiento.	74
Tabla 25: %Resto de analito en matriz de los NIZ s almacenadas a T ≤ -20°C	74
Tabla 26: Valores de veracidad y recuperación obtenidos durante la validación	77
Tabla 27: Estadísticos de precisión de repetibilidad y reproducibilidad obtenidos en los niveles de 0.50 y 3.00 µg.kg ⁻¹ de la validación.....	78
Tabla 28: Estadísticos de precisión de repetibilidad y reproducibilidad obtenidos en el nivel de 7.00 µg.kg ⁻¹ de la validación.....	79
Tabla 29: Valores de límites críticos e incertidumbre expandida y sus porcentajes calculados durante la validación de NIZs.....	82
Tabla 30: Resultados de NIZs de las muestras y de los controles de calidad.....	87

ABREVIATURAS

%CV:	Coeficiente de variación
µg:	Microgramo
µL:	Micro litro
a:	Intercepto de la curva de calibración
ACN:	Acetonitrilo
API:	Ionización a presión atmosférica
CC α :	Límite de decisión
CC β :	Capacidad de detección
CL:	Cromatografía Líquida
CL-MS/MS:	Cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas tándem.
CRLs	Laboratorios de Referencia Comunitarios de la Unión Europea
DMZ:	Dimetridazol
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ESI:	Ionización por electrospray
H ₂ O:	Agua
HMMNI:	Hidroxidimetridazol
HPLC:	Cromatografía líquida de alta perfomancia o eficiencia
HPLC - MS/MS	Cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas tándem
INP:	Instituto Nacional de Pesca
IPZ:	Ipronidazol
IT-MS ⁿ :	Espectrometría de masas de trampa de iones.
k:	Factor de Cobertura
kg:	kilogramo
LC:	Cromatografía Líquida
L-L:	Extracción líquido-líquido
m:	Pendiente de la curva de calibración
MeOH:	Metanol
MIPs:	Moléculas impresas poliméricamente
mL:	Mililitro
MNZ:	Metronidazol
MRC:	Material de referencia certificado
MRL:	Límite máximo de residuo
MRM:	Monitoreo de reacción múltiple
MRPL:	Límite mínimo de funcionamiento exigido
MS/MS:	Espectrometría de masa cuadrupolar tándem
NIZs/Nizs:	Nitroimidazoles
OH-DMZ:	Hidroxidimetridazol
ppb:	Parte por billón
QqQ-MS:	Espectrometría de masas de triple cuadrupolo
r:	Coeficiente de regresión
r ² :	Coeficiente de determinación
RASFF	Sistemas de alertas rápidas alimentarias de Europa
RNZ:	Ronidazol
rpm:	Revoluciones por minuto
S _{y/x} :	Error aleatorio de la curva con respecto a la variable y

S_a :	Desviación estándar del intercepto
S_b :	Desviación estándar de la pendiente
S-L:	Extracción sólido-líquido
SPE:	Extracción en fase sólida
S_r :	Desviación estándar de repetibilidad
S_R :	Desviación estándar de reproducibilidad
U:	Incertidumbre expandida
uma:	Unidad de masa atómica
V:	Voltios.
Vdc:	Voltaje continuo
Vrf:	Voltaje alterno

OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar la presencia de residuos de nitroimidazoles en camarón provenientes de camaroneras acuícolas de la provincia del Guayas por un método de ensayo analítico de CL-MS/MS validado.

Objetivos Específicos

- Seleccionar métodos bibliográficos referenciales que permita establecer la técnica analítica para la determinación de nitroimidazoles: Metronidazol (MNZ), Dimetridazol (DMZ), Ipronidazol (IPZ) Ronidazol (RNZ) y 2-Hidroxi dimetridazol (HMMNI) más adecuada.
- Desarrollar y optimizar un método de análisis eficiente por cromatografía líquida acoplada a masas para la detección y cuantificación de los nitroimidazoles: MNZ, DMZ, RNZ, IPZ, HMMNI presentes en el tejido animal (camarón).
- Determinar la confiabilidad y el buen funcionamiento del método analítico por medio de pruebas de implementación y objetivos de desempeño de análisis como: exactitud (veracidad y precisión); linealidad, estabilidad, robustez, concentraciones críticas, y estimación de la incertidumbre.
- Evaluar los resultados obtenidos del proceso de validación por medio de métodos y herramientas estadísticas y establecer si el método analítico desarrollado es apto para el propósito que se desea aplicar como método de ensayo confirmatorio.
- Aplicar la metodología analítica desarrollada para la determinación de residuos de nitroimidazoles (MNZ, DMZ, RNZ, IPZ, HMMNI) en muestras de camarón seleccionadas del Plan Nacional de Residuos del INP provenientes de camaroneras de la provincia del Guayas.

- Evaluar los datos obtenidos de los análisis en las muestras seleccionadas de las camaroneras de la provincia del Guayas y determinar si sobrepasan los límites de decisión ($CC\alpha$) establecidos en el laboratorio para estos residuos de antibióticos prohibidos.

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

Los sistemas actuales de explotación intensiva de los animales de producción favorecen la aparición de procesos infecciosos y parasitarios que requieren la utilización de fármacos con fines profilácticos y/o terapéuticos. Asimismo, ciertos productos veterinarios pueden ser administrados fraudulentamente en los animales de abasto para ejercer un efecto promotor del crecimiento, reducir el estrés, evitar la muerte para mejorar la producción del producto final.

Si bien, para garantizar la salud y el bienestar de los animales, es completamente necesario disponer de medicamentos veterinarios, su utilización en animales productores de alimentos puede dejar residuos en los productos alimenticios obtenidos a partir de animales tratados.

Partiendo de esta situación, y con el fin de proteger la salud de los consumidores, se hace igualmente indispensable realizar una evaluación de la seguridad de estas sustancias teniendo en cuenta los riesgos toxicológicos, la contaminación medioambiental, y los efectos farmacológicos y/o microbiológicos no deseados de sus posibles residuos.

Por todo esto en el uso inadecuado de las drogas de uso veterinario, especialmente en los camarones hace necesario la utilización de metodología analíticas instrumentales con una alta sensibilidad y sensibilidad que permitan la detección de estos residuos en los alimentos.

La principal metodología utilizada por sus característica de alta sensibilidad y capacidad analíticas es la espectrometría de masas; es importante describir los fundamentos teóricos y los últimos avances tecnológicos en espectrometría de masa cuadrupolar en tándem (MS/MS) utilizados en el país y estudiar la aplicación de la esta tecnología con la cromatografía líquida(LC-MS/MS) para el análisis de residuos de antibióticos de nitroimidazoles en músculo de camarón de camaroneras de la provincia del Guayas.

Entre los últimos avances en espectrometría de masa destacan la tecnología de Z-sprayTM y T-WaveTM para la generación y transporte de iones respectivamente. Estas tecnologías incrementan la relación señal/ruido y ayudan a alcanzar límites de detección por debajo de una parte por billón (ppb), lo cual es de gran importancia en el análisis de trazas de contaminantes orgánicos.

DATOS SOCIOECONÓMICOS

En la economía ecuatoriana el sector camaronero tiene una importancia vital, por su alta generación de empleo y divisas, ya que representa el tercer producto de exportación después del petróleo y del banano; además el Ecuador está dentro de los 5 principales países exportadores de camarón a nivel mundial [1].

Este sector industrial tiene alrededor de 550 empresas activas y está compuesto por: laboratorios de maduración y de larvicultura, empresas camaroneras, empacadoras distribuidas en 175.748 hectáreas y la productividad a nivel de país está entre 800 y 1.400 libras de camarón por ciclo y se producen 2,5 ciclos al año. El precio de venta varía ente \$1,10 a 1,40 la libra. Según cifras económicas del Banco Central del Ecuador en el año 2013 se produjo 1,784,936 millones USD por las 223,142 toneladas exportadas de este producto y entre los principales compradores del camarón ecuatoriano

están los Estados Unidos y la Unión Europea, este mercado internacional es cada vez más exigente en precios y calidad [1], [2].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las principales preocupaciones de los consumidores es la obtención de alimentos inocuos por lo cual el uso incorrecto de medicamentos en el camarón, puede dar como resultado la contaminación del tejido con niveles de residuos y esto generará productos potencialmente nocivos, que la hará no apta para el consumo humano lo cual constituyen un riesgo para la salud de los consumidores produciendo toxicidad aguda o crónica que es causada por la exposición prolongada a bajos niveles de antibióticos, además puede producir efectos mutagénicos y carcinogénicos, desórdenes en el desarrollo corporal, reacciones alérgicas y fenómenos de resistencia bacteriana, alteración de la flora intestinal, entre otros [3].

Los consumidores esperan que los productos de origen animal no contengan residuos que puedan generar algún riesgo para la salud o el ambiente. Sin embargo los animales que tengan enfermedades necesitan ser tratados con medicamentos con el fin de evitarles sufrimientos así como también evitar que algunas de estas enfermedades se transmitan al ser humano. Por lo tanto debe haber un balance entre estos parámetros de la protección al consumidor, bienestar de los animales y la producción animal.

La utilización de antibióticos en producción animal, especialmente la administración de estos compuestos a bajas dosis durante períodos de tiempos relativamente largos, ha contribuido a la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, ejerciendo una presión selectiva y promoviendo la diseminación de bacterias resistentes en el medio ambiente y en los sistemas gastrointestinales de los animales. Estas bacterias pueden afectar a la salud humana si son patógenos o bien transferir genes de resistencia a patógenos [4].

Otros de los problemas radican también en la descarga del agua con residuos de estas sustancias a los distintos cuerpos receptores; si estos residuos llegan al ser humano, tienen un impacto en la salud que puede producir gastroenteritis, mareos, manchas en la piel y pérdida de peso [5].

Con el fin de tomar en cuenta lo anterior; el uso de Límites Máximos de Residuos (LMR) y los tiempos de retiro, basados en las Buenas Prácticas en el uso de Medicamentos Veterinarios juega un rol preponderante para evitar residuos inaceptables en los alimentos de origen animal y la protección de los consumidores.

Estos efectos adversos han hecho que organizaciones internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) con su Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (IPCS), la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), regulen con fundamento científico los residuos de fármacos de uso veterinario potencialmente peligrosos para la salud de los consumidores [6].

Los nitroimidazoles son drogas que se utilizan para el tratamiento y prevención de enfermedades producidas por protozoos y bacterias anaerobias y microaerófilas. El Metronidazol (MNZ), Dimetridazol (DMZ), Iprnidazol (IPZ) y Ronidazol (RNZ) estos y sus metabolitos son sustancias en las que se han comprobado que tienen efectos tóxicos carcinogénico y mutagénico en el hombre y los residuos de estos fármacos prohibidos en alimentos de origen animal como el camarón son considerados como un factor de riesgo en la salud pública y una limitante en el desarrollo económico de cualquier país, ya que este producto contaminado no puede ser comercializado.

La Unión Europea clasifica estas sustancias prohibidas en la tabla 2 de la Regulación de la Comisión 2010/37/EU [7]; en la que no poseen límite máximo residual que pueda ser fijado o controlado. El Instituto Nacional de Pesca (INP) como Autoridad Competente designado por la Comunidad Europea y de acuerdo a su reglamentación deberá establecer medidas de

control relativas a las sustancias y a los grupos de residuos que pueden estar presentes en los alimentos [8] , en su Plan de Monitoreo de Residuos [9] de los productos de acuicultura incluye a estos nitroimidazoles dentro de la lista de sustancias farmacológicamente activas prohibidas y para su control el INP cuenta con su laboratorio de Análisis químico y microbiológico de alimentos, en el área de Cromatografía LC/MS/MS que es encargado de realizar los análisis de antibióticos en alimentos e insumos acuícolas [10].

Los residuos de fármacos prohibidos en alimentos de origen animal como el camarón son considerados como un factor de riesgo en la salud pública y como limitante en el desarrollo económico de cualquier país [6] y el Ecuador en su continua intención de aumentar las ventas de sus productos en el exterior, se ha visto a la necesidad de reformar normas, generar reglamentaciones y renovar su capacidad tecnológica, con el fin de controlar los residuos de fármacos en alimentos de origen acuícola y de esta forma cumplir con las exigencias de los países con los que desea negociar.

El hallazgo de residuos de drogas prohibidas (nitroimidazoles) en el camarón pueda afectar a la salud de los consumidores y pone en peligro las exportaciones del Ecuador por lo que es necesario evaluar la calidad a través de la detección y cuantificación de trazas de nitroimidazoles por cromatografía líquida acoplada con detector de masas.

JUSTIFICACIÓN

El propósito principal que propone este proyecto es desarrollar e implementar un método confiable para detectar residuos de antibióticos de cuatro de las drogas de 5-nitroimidazoles prohibidas por su toxicidad que son Metronidazol (MNZ), Dimetridazol (DMZ), Ipronidazol (IPZ) y Ronidazol (RNZ), y un metabolito del Dimetridazol que es el 2-hidroxi-Dimetridazol (HMMNI) en tejido de camarón que se encuentra descrita en el Plan de monitoreo de Residuos del Instituto Nacional de Pesca, especialmente por las siguientes razones:

1. Varios métodos han sido publicados para la determinación de nitroimidazoles en alimentos y otras matrices biológicas en tejido animal como salmón, aves de corral, ganado vacuno, huevos, etc, pero muchas de ellas cuantifican solamente un principio activo de los nitroimidazoles por medio de cromatografía líquida acoplada con detectores UV (arreglo de diodos), estos métodos requieren el uso de grandes volúmenes de solventes clorados para su extracción, y los extractos desarrollan pico que eluyen en cromatogramas de tiempo de corridas de aproximadamente 60 minutos lo cual trae consigo complicaciones en tiempo y seguridad, sin considerar que los niveles de detección son alrededor de mg.kg^{-1} (ppm) o superiores [11] [12].

2. Al ser estos compuestos prohibidos, se requiere de desarrollo de técnicas con alta especificidad y sensibilidad que permita la detección a nivel de trazas en valores de $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (ppb), y la cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas Tándem que tienen entre sus principales ventajas de que es una técnica confirmatoria y de identificación que permite el monitoreo simultaneo de varios de los analitos a la vez con la sensibilidad y especificidad requerida.

Al tener un detector MS/MS que permita el desarrollo satisfactorio del monitoreo de los nitroimidazoles, se requiere de una metodología extractiva que permita la limpieza necesaria de las muestras de tejido de camarón así como también del perfeccionamiento de una técnica cromatográficos eficiente en resolución y tiempo de corrida.

Y todo en conjunto permitirá el desarrollo y la implementación de una técnica de análisis para la cuantificación de estas drogas prohibidas.

3. Además es importante potencializar la capacidad analítica local, desarrollando metodologías analíticas de alta precisión (LC-MS/MS), para controlar el uso de drogas prohibidas (Nitroimidazoles) en la actividad acuícola ecuatoriana que pueda afectar su exportación.

4. Cabe también recalcar que esta metodología analítica puede ser potencialmente usada no solamente en tejido de camarón sino también tejido de aves de corral, ganado vacuno y porcino, extendiendo su aplicación al área ganadera, pecuaria, y ser base en futuras investigaciones dentro de estas áreas en la inocuidad alimentaria del país y de los productos de exportación.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Los Antibióticos y sus usos en la acuicultura

1.1.1. Generalidades

El término Antibiótico proviene del griego *anti=contra* y *bios=vida*. Son sustancias químicas producidas por microorganismos especialmente por bacterias y hongos que originan la destrucción o supresión del crecimiento de otros microorganismos. La acción antibacteriana de los antibióticos ocasiona un cambio en la capacidad de reproducirse y /o alimentarse de las células microbianas.

Desde 1945 con el éxito terapéutico en la lucha contra enfermedades bacterianas, el uso de los antibióticos ha tenido como consecuencia el uso progresivo y continuo de estos medicamentos, y desde entonces se han desarrollado la preparación de varias moléculas en búsqueda del antibiótico ideal [13].

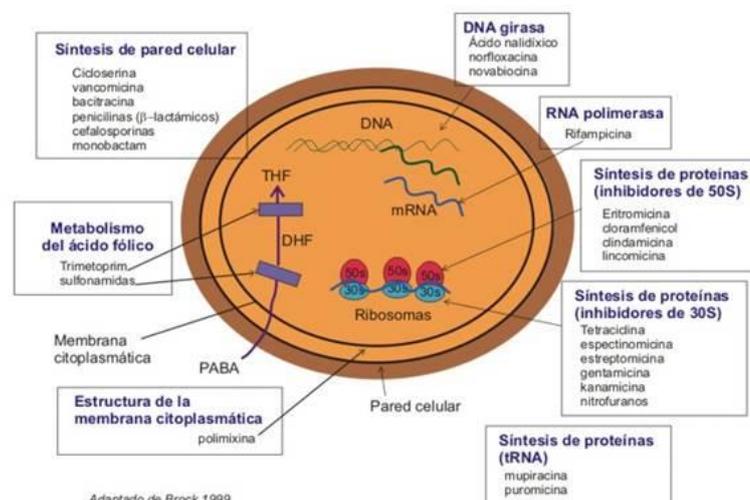


Figura 1: Mecanismo de acción de los antibióticos.

Fuente: [13]

Los antibióticos se pueden clasificar de diversas formas, pero la utilizada en este proyecto es la clasificación según su mecanismo de acción y la vía que utilizan para actuar sobre los microorganismos (Figura 1):

- a) Agentes que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana y afectan la formación del polímero peptidoglicano que conforma a estructuras de la pared bacteriana. Ej.: penicilinas, cefalosporinas, betalactámicos, antimicóticos imidazólicos, miconazol y clotrimazol.
- b) Agentes que afectan la síntesis de proteínas a nivel ribosomal como los que actúan sobre la subunidad 30s y subunidad 50s. Ej.: aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, anfenicoles.
- c) Agentes que afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos. Ej.: quinolonas, rifamicinas, y antivirales.
- d) Agentes antimetabólicos que antagonizan los pasos metabólicos en la síntesis de ácido fólico. Ej.: sulfonamidas y trimetoprima.
- e) Agentes que actúan en forma directa sobre la membrana celular del microorganismo.

Además de esta categorización, otra forma de clasificarlas es según su estructura o familia química, este punto de vista ayuda mucho en el análisis químico de los antibióticos, ya que muchos procesos de análisis de extracción y cuantificación se basan en la similitud química de las moléculas, que les confiere semejanzas en sus propiedades físico-químicas y farmacológicas por poseer en su estructura molecular un núcleo base parecido (**Tabla 1**).

Tabla 1: Clasificación de los antibióticos por su estructura química

PENICILINAS		CEFALOSPORINAS		TETRACICLINA	SULFONAMIDAS
Penicilinas Naturales	Penicilina G Sódica	Cefalosporina de Primera Generación	Cefadroxilo	Clortetraciclina	Sulfadiazina
	Penicilina G Potásica		Cefalexina	Tetraciclina CH	Sulfadoxima
	Penicilina G Benzatínica		Cefadrina	Doxiciclina	Sulfametoxazol
	Fenoximetil Penicilina		Cefalotina	Oxitetraciclina	Sulfacetamida
Amino penicilinas	Amoxicilina	Cefalosporina de Segunda Generación	Cefapirina	AMINOGLUCOSIDOS	QUINOLONAS
	Ampicilina		Ceforoxina	Amikina	Ácido oxolínico
	Epicilina		Cefuroxina-Axetil	Neomicina	Ciprofloxacina
Penicilina Isoxozólicas	Cloxacilina	Cefactor	Cefactor	Estreptomina	Narfloxacina
	Nafcilina		Cefoxilina	Gentamicina	Cinoxacino

	Meticilina	Cefalosporina de Tercera Generación	Ceftazidina	NITROFURANOS	Maxifloxacino
	Oxacilina		Cefodizina	Furazolidona	Esparfloxacino
Carboxipenicilinas	Carbonilina		Ceftriaxona	Nitrofurantoina	levofloxacino
	Ticarcilina		Cefixina	Nitrofurazona	NITROIMIDAZOLES
INHIBIDORES BETALACTÁMICOS			Cefpodoxina	Semicarbazida	Metronidazol
I.B.L	Ácido Clavulanico	Cefalosporina de Cuarta Generación	Cefepima	ANFENICOLES	Dimetridazol
	Sulbactam		Cefetecol	Cloranfenicol	Ronidazol
	Tazobactam		Cefpiroma	Tianfenicol	Ipronidazol

1.1.2. Uso de los antibióticos en la actividad acuícola

En el Ecuador desde la década de los años 60, el país fue un referente en exportación de camarón y estaba ubicado en los primeros países a nivel mundial proveedoras de camarón de calidad, y a pesar de las dificultades que ha debido soportar desde 1999, con el arribo de enfermedades en especial de la mancha blanca, motivo por el cual el país empieza disminuir su rentabilidad y mercados, después de esta época el Ecuador comienza a desarrollar medidas necesarias para que el sector camaronera sea más eficiente [1].

A partir de estas situaciones el acuicultor empieza a buscar soluciones a los problemas de enfermedad que están relacionadas al cultivo intensivo de camarón a gran escala que suponen la concentración de un gran número de animales en un espacio reducido, pero esto puede traer problemas como el relacionado con las enfermedades, que puede provocar la mortandad parcial o total de la población. En las enfermedades por bacterias más frecuente es la vibriosis y se presenta en la fase larvaria como en la de crecimiento del camarón [14].

Las enfermedades originadas por patógenos de tipo viral o bacteriana, ha hecho que los acuicultores empleen antibióticos durante los ciclos de producción: fase larvaria y de crecimiento. El uso excesivo de estos medicamentos trae consigo problemas especialmente en el área ambiental y de salud humana:

- a. Área ambiental: persistencia en el ambiente acuático y efectos sobre la biogeoquímica del sedimento, esto sucede cuando parte del alimento que se encuentra medicado no es ingerido por el camarón y cae al sedimento, otra forma de llegar es aquella porción del medicamento que no es absorbido y es liberado a través de las heces, la orina y fluidos biliares del camarón [14].
- b. Área de la salud humana: ya que los residuos de esos medicamentos pueden llegar al consumidor a través de la cadena alimentaria produciéndole efectos nocivos como reacciones alérgicas, toxicidad aguda, perturbación de la flora bacteriana intestinal [15].

1.1.3. Nitroimidazoles (NIZs)

Los Nitroimidazoles son drogas veterinarias sintéticas utilizadas para el tratamiento y prevención de enfermedades parasitarias (protozoarios) y bacterianas que se obtuvieron inicialmente de la azomicina (2-nitro-imidazol).

En su estructura química los NIZs son compuestos heterocíclicos relacionados con los nitrofuranos que se obtienen a partir de la nitrificación del anillo imidazólico, el grupo nitro se ubica en posición 5 y 2, con lo que se producen dos grupos: 5-nitroimidazoles y los 2-nitroimidazoles; pero solo los antibióticos derivados que poseen el anillo 5-nitroimidazol tienen un amplio espectro de acción contra las bacterias Gram negativas y algunas Gram positivas, además de utilizarse con gran eficacia en el tratamiento de enfermedades producidas por protozoarios. Además estas drogas han demostrado tener efectos en el desarrollo del crecimiento y el incremento en la eficacia alimentaria [16].

Estos antibióticos son usados como medicamentos de uso humano como veterinario, entre estos tenemos: metronidazol, tinidazol, secnidazol, nimorazol, benzinidazol.

Pero los 5-nitroimidazoles de uso veterinario exclusivo son el Ipronidazol, Ronidazol, Dimetridazol y el Metronidazol (**Figura 2**) que también es usado en tratamiento médicos humanos. Estas drogas ejercen su acción por medio de la reducción del grupo nitro, para formar compuestos intermedios inestables tóxicos, este proceso de reducción requiere seis electrones y es producido por potenciales redox bajos, especialmente esto sucede en bacterias anaerobias, al originar metabolitos en el radical nitro estos dañan severamente el ADN bacteriano mediante su oxidación lo que ocasiona la muerte celular, este fenómeno se puede producir en cualquier fase de crecimiento bacteriano [17].

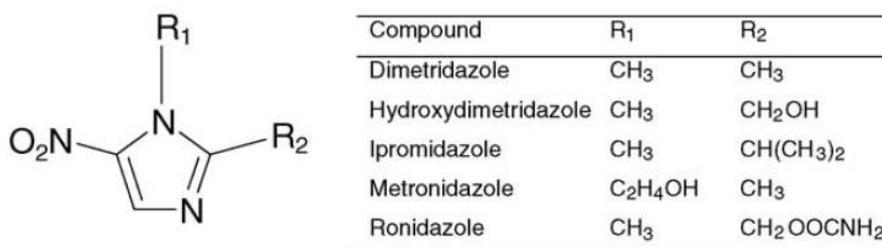


Figura 2: Anillo estructural de los nitroimidazoles y sus radicales.

El uso excesivo de estos medicamentos de uso veterinario puede inducir la presencia de trazas de estos 5-nitroimidazoles en alimentos de origen animal lo que puede producir problemas asociados con la aparición de cepas bacterianas resistentes en especial al Metronidazol que es un medicamento también administrado a humanos utilizado para el tratamiento de enfermedades producidas por infecciones articulares, óseas, cutáneas, pleuropulmonares, vaginales, etc. [13].

Los nitroimidazoles especialmente en posición 5 del grupo nitro poseen propiedades mutagénicas, carcinogénicas y tóxicas, se han realizado numerosos estudios de su actividad genotóxica de varios nitroimidazoles en ensayos *in vivo* e *in vitro*, en especial el metronidazol que es considerado como un antibiótico estándar; que demostró ser un importante mutágeno en sistemas bacterianos, es capaz de unirse y alterar el ADN, inducir roturas de simple y doble cadenas. Se han demostrado actividad clastogénica, que se debe a las rupturas de la cadena de ADN, este daño se puede expresar a nivel

cromosómico en la mitosis celular lo que puede producir un aumento en las aberraciones cromosómicas, además de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica y médula ósea de ratón [14].

Las pruebas realizadas en ratones han demostrado que el Metronidazol posee efectos de carcinogénesis por el desarrollo de cáncer de pulmón, y un aumento de linfomas malignos, hepatomas y tumores mamarios, pituitarios y testiculares, también se han demostrado efectos teratogénicos en *Drosophila melanogaster* y *Rattus norvegicus*; numerosos estudios toxicológicos son citados y recopilados por Marcela López y colaboradores en el artículo de la revista “*Los Nitroimidazoles como modelo de mutagénesis química y muerte celular*” [18].

Los nitroimidazoles son metabolizados rápidamente por medio de las enzimas del Citocromo P 450 (CYP) [18], en la mayoría de los casos el principal proceso de metabolización es la oxidación de las cadenas alifáticas laterales ubicados en la posición del carbono 2 en el anillo del imidazol de los nitroimidazoles, con lo que se obtiene metabolitos oxidados en especial hidroxilados y acetilados.

Para el dimetridazol el principal metabolito está formado por la hidroxilación del 2-metil para dar el hidroxidimetridazol (HMMNI), con este mismo mecanismo se produce el metabolito hidroxilado del metronidazol, además se da otro metabolito por oxidación de la cadena N-2-hidroxietyl para dar el acetilmetronidazol (**Figura 3**). Los metabolitos formados o metabolizados pueden poseer un potencial similar mutagénico, carcinogénico y tóxico a el compuesto padre que le dio origen ya que estos conservan aun el anillo imidazólico original [19].

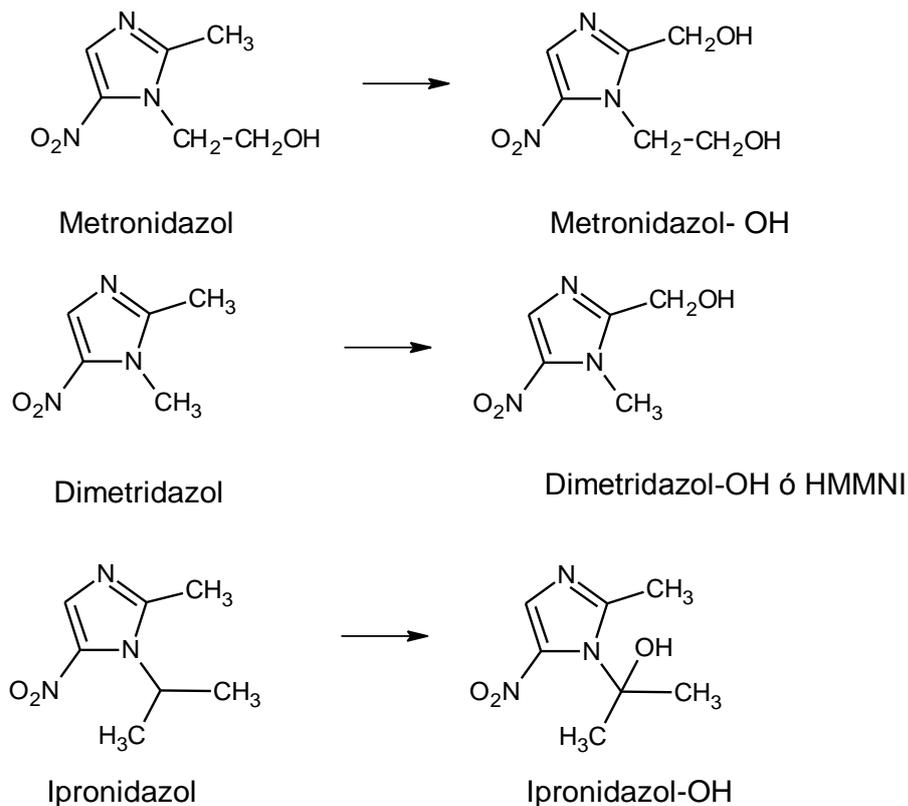


Figura 3: Estructura molecular de los 5-nitroimidazoles y sus derivados hidroxilados.
Fuente: Autor

1.1.4. Legislación de los Nitroimidazoles

La Unión Europea (UE) tomó la decisión de prohibir su utilización como antibiótico de uso veterinario en animales destinados a consumo humano, debido a los efectos tóxicos de los 5-nitroimidazoles: el dimetridazol, metronidazol y ronidazol están incluidos en el anexo IV del Reglamento CEE N° 2377/90 [20], estos nitroimidazoles están prohibidos ya que no se puede fijar la ingesta máxima admisible, y en consecuencia su límite máximo residual (LMR) ya que en cualquier concentración constituyen un peligro para la salud humana. Esto significa que cualquier residuo de estos compuestos hallados en animales productores de alimentos o en productos destinados al consumo humano ha de ser considerado como una violación a estos reglamentos [21].

Además de Europa, otros países como Estados Unidos a través de la FDA, restringe el uso de los nitroimidazoles como droga de uso veterinario, y

las declara como drogas prohibidas al metronidazol, dimetridazol, e ipronidazol [22].

Debido a la ausencia de límites máximos residuales, los Laboratorios de Referencia Comunitarios de la Unión Europea (CRLs) recomiendan que cualquier método analítico, destinado a la determinación y cuantificación de los 5-Nitroimidazoles deba permitir detectar una concentración mínima de $3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de residuos de estos compuestos en cualquier matriz [23].

Aunque existe legislación que regule y prohíba el uso de estos y otros antibióticos, hay productores de alimentos de origen animal que suelen emplearlos en la actualidad, este uso indebido puede ser detectado a través de análisis analíticos oportunos. Una evidencia de alimentos producidos e importados a Europa que vulneran esta legislación son presentados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) a través de su Sistema de Alertas Rápidas Alimentarias (RASFF), en la **Tabla 2** se presentan algunas de las alertas de nitroimidazoles en alimentos detectadas en los últimos años.

Tabla 2: Alertas detectadas y emitidas por el RASFF de alimentos contaminados por residuos de nitroimidazoles en Europa

Fecha RASFF	Referencia RASFF	País de notificación	Residuo veterinario prohibido	Tipo de alimento	País de Origen
07/12/2015	2015.1548	Republica Checa	Metronidazol (3.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ - ppb)	Miel	Ucrania
21/07/2011	2011.0982	Bélgica	Metronidazol	Miel y jalea real	Guatemala, vía Francia
24/05/2011	2011.0689	Bélgica	Metronidazol (0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ - ppb)	Miel y jalea real	China
11/06/2010	2010.0758	Bélgica	Metronidazol	Miel y jalea real	India
30/06/2008	2008.0777	Países Bajos	Metronidazol (0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ - ppb)	Pollo entero congelado sin vísceras	Argentina, vía Bélgica
07/06/2006	2006.BHM	Alemania	Ronidazol (30.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	Carne de pavo fresca refrigerada	Países Bajos
06/06/2008	2008.0668	Bélgica	Metronidazol (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ - ppb)	Carne empacado al vacío	USA
08/12/2005	2005.899	Dinamarca	Metronidazol (6.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ - ppb)	Filete de trucha ahumada	Dinamarca

En nuestro país en tema de legislación alimentaria en el uso de drogas veterinarias se acoge a la reglamentación y especificaciones europeas como el Reglamento (UE) N° 37/2010, Reglamento (CEE) 2377/90 que establece los límites de las sustancias autorizadas y prohibidas, estas normativas son reguladas y vigiladas por el Instituto Nacional de Pesca (INP), en su Plan de Control Nacional [24] y el Plan de Monitoreo de Residuos de los productos de acuicultura [9].

1.2. Instrumentación para el análisis de los Nitroimidazoles

En la actualidad casi el 80% de las técnicas analíticas para la determinación de drogas veterinarias y agentes promotores de crecimiento están basados en métodos cromatográficos en especial las de tipo de fase móvil líquida o cromatografía líquida acoplada con detectores de masas (LC-MS); la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) se define como una técnica analítica de separación para detectar o cuantificar compuestos de interés en una mezcla o matriz que se fundamenta en un gradiente líquido o fase móvil que requiere el uso de elevadas presiones para hacerla recorrer a través de una columna de sílica enlazada con un radical alquílico o fase estacionaria orgánica (cromatografía líquida de fase reversa).

La espectrometría de masas es una técnica que permite separar e identificar iones de acuerdo a su relación masa a carga (m/z). Hasta hace muy poco, la técnica de detección de masas usada en mayor frecuencia era la espectrometría de masa de simple cuadrupolo o de una sola etapa. Hoy esto está siendo reemplazado por el sistema de espectrometría de masas con la configuración del triple cuadrupolo (QqQ-MS) y de trampas de iones (IT-MSⁿ).

La espectrometría de masas de una sola etapa es todavía usada para propósitos de métodos de cribado o screening y para la cuantificación de sustancias en las cuales se han fijado límites máximos de residuos (MRL).

El sistema QqQ-MS posee una excelente selectividad basada en su reacción de monitoreo, y son usados preferentemente en estudios de análisis de confirmación [19] para muestras complejas, como por ejemplo residuos tóxicos (drogas o sustancias no permitidas) en fluidos biológicos, tejido animal; la detección de metabolitos como marcadores de enfermedades (aminoácidos, ácidos grasos) o la detección de residuos tóxicos en alimentos (antibióticos o pesticidas) que pueden ser un riesgo para el consumidor.

1.2.1. Espectrometría de Masa Tándem Cuadrupolar

El Quattro Premier™ XE, es un espectrómetro de masas tipo cuadrupolo tandem de alta performance, diseñado para operaciones de rutina de LC/MS/MS (**Figura 4**). Que consiste en un sistema que incluye (**Figura 5**):

- a) la zona de la fuente (source);
- b) la zona del analizador (analyzer)
- c) el detector



Figura 4: Cromatógrafo líquido acoplado a espectrómetro de masas Quattro Premier™ XE. Sistema HPLC/MS/MS
Fuente: Waters

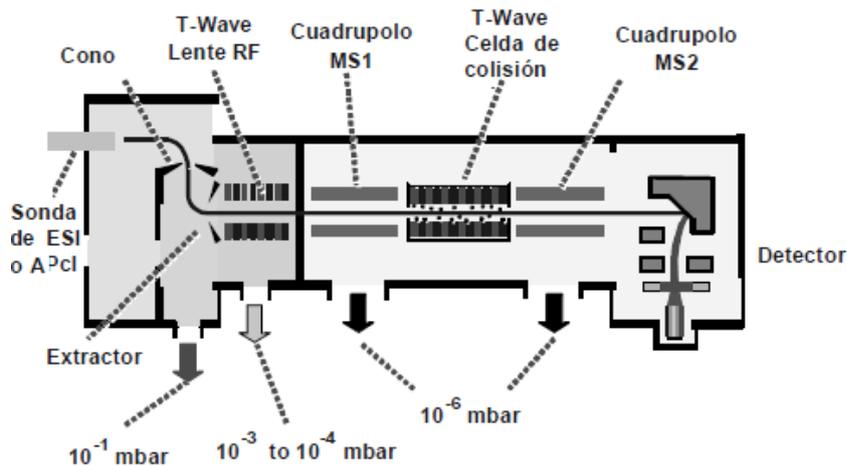


Figura 5: Esquema del Quatro Premier™ XE
Fuente: Waters

a) La zona de la fuente se encarga de generar los iones y transportarlos desde la región de presión atmosférica hacia la región de alto vacío. Los equipos de tándem cuadrupolos están diseñados para ejecutar ionización a presión atmosférica (API). Esta zona de la fuente contiene las siguientes partes:

- la sonda de ionización
- el cono
- el extractor
- la lente de transferencia rf

La generación de los iones tiene lugar en un aerosol formado al final de la **sonda o capilar de ionización**, bajo la influencia de un campo eléctrico con un voltaje de entre 1000 y 3500 Voltios (V), a través de una interface que forma una celda electroquímica a condiciones de presión atmosférica este es el caso de la Ionización por Electrospray (ESI). Los iones en solución son transferidos a la fase gaseosa. Una vez que los iones se generan, estos siguen una trayectoria lineal a través de dos ángulos consecutivos de 90 grados (Z-spray™) a través del **cono** y el **extractor** (Figura 6). Esta trayectoria de Z-spray™ permite tener una mejor relación de señal/ruido ya que la mayor parte del solvente se desvía del cono a través de la primera vuelta de 90 grados. Además, de esta manera se evita que el cono se contamine y ensucie rápidamente.

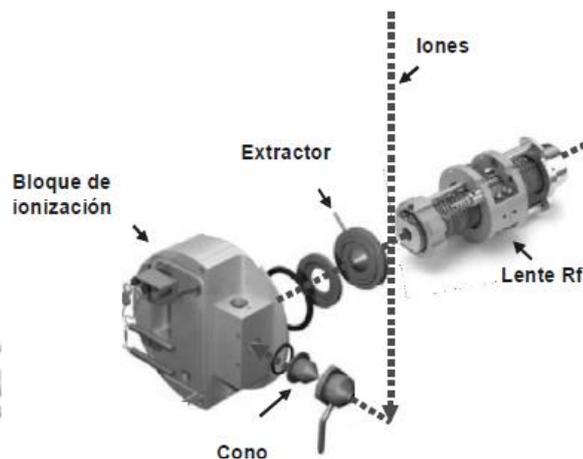


Figura 6: Esquema del Z-spray™ en el Quatro Premier™ XE Fuente: Waters [25]

El voltaje aplicado al cono varía de acuerdo a la muestra o analito a analizar pero es tal que los iones generados son acelerados y transportados a través del orificio del cono al bloque de ionización hacia el extractor, luego pasan a través del dispositivo Travelling wave (T-wave™) o llamado también **Lente de transferencia rf** que tiene una serie de placas en paralelo con voltajes alternos de fases opuestas que se aplican a cada par de placas en forma sucesiva lo que genera una onda que se desplaza y mueve los iones de un extremo al otro del dispositivo (**Figura 7**), este voltaje controla los iones en la celda de una manera rápida y los dirige el ingreso de los iones al primer cuadrupolo.

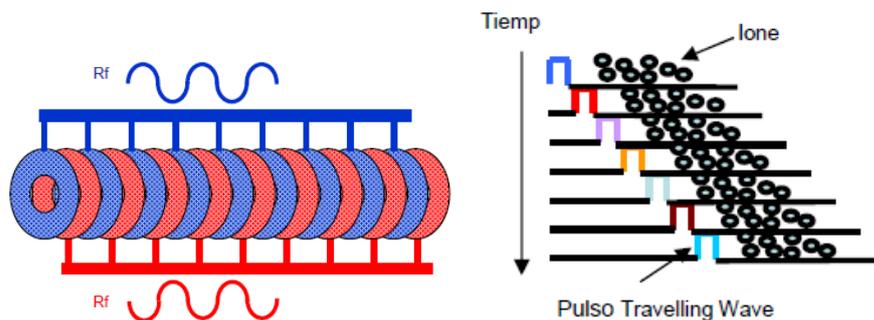


Figura 7: Esquema del Travelling-wave (T-wave™) en modo rf y onda desplazamiento de los iones. Fuente: Waters [25].

Además, la zona de la fuente está a presión atmosférica en la parte externa y por bombeo diferencial, en mediano vacío en la parte interna. Esto también permite la transferencia de iones hacia la zona del analizador que se encuentra en alto vacío (**Figura 8**).

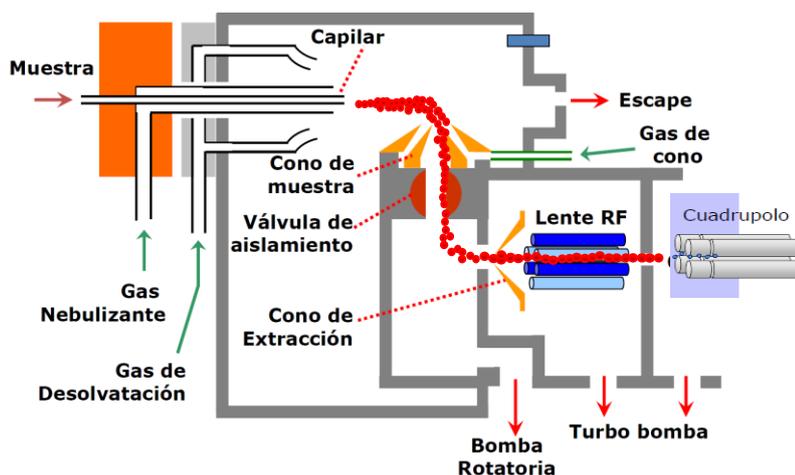


Figura 8: Esquema del trayecto de los iones en la zona de la fuente en el Quattro Premier™ XE. Fuente: Waters

b) **La zona del analizador** es el corazón de un espectrómetro de masas, éste lleva a cabo la función de separar los iones cargados en función de su relación masa/carga (m/z) y determina el rango de las masas, la exactitud y la sensibilidad. La zona del analizador Quattro Premier™ XE contiene las siguientes partes:

- el primer cuadrupolo (MS1)
- la celda de colisión T-wave™
- el segundo cuadrupolo (MS2)

Los **cuadrupolos (MS1 y MS2)** son el analizador más sencillo y de mayor uso, entre las principales características tenemos: actúan como filtros de iones de rango de masa de 2 a 3000 uma, resolución de 1000 para una masa de 650 uma, exactitud de 0.1 a 0.2 uma, velocidad máxima de rastreo de 5000 uma.s⁻¹.

Cada cuadrupolo consta de cuatro varillas cilíndricas, cada pareja de varillas opuestas está conectada a dos potenciales eléctricos iguales, aunque de signo contrario al de la otra pareja: uno es de corriente o voltaje alterna (V_{rf}) cuya frecuencia queda en la región de la radiofrecuencia (rf), está desfasado en 180° de una pareja de varilla a la otra; el otro es una corriente continua (V_{dc}). La diferencia de potencial oscilante puede ser variada en un rango de frecuencias, para crear un campo eléctrico oscilante entre las varillas.

Esto significa que un ion positivo será repelido por el par de varas de voltaje positivo, pero atraído al par de varas de voltaje negativo en un momento determinado. En un siguiente momento (nanosegundos) las polaridades de las varillas será intercambiadas y ahora el ion positivo (que se estaba acercando a las varillas negativas) sentirá el efecto repulsivo de las ahora varillas positivas y se dirigirá al otro par de varillas; este proceso de alternación de las polaridades continúa hasta que el ion sale del cuadrupolo. De esta manera, cada uno de los iones estables que entran en la región cuadrupolar traza una trayectoria del tipo onda sinusoidal en su camino hacia el detector.

Ajustando los potenciales aplicados a las varillas, se puede hacer estables y detectables iones seleccionados, un rango de masas o un ion en concreto. Los iones inestables impactan contra uno de las cuatro varillas, liberándose del influjo del campo oscilante, y son evacuados por las bombas del vacío al exterior. (Fig.9).

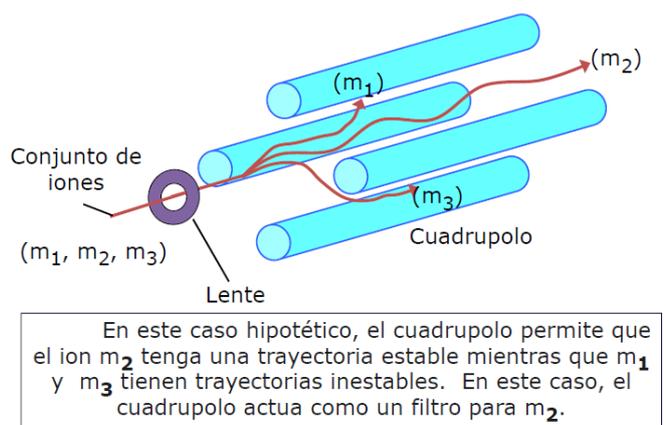


Figura 9: Esquema del trayecto de los iones a través del cuadrupolo. Fuente: Water [25]

La **celda de colisión** es un dispositivo de travelling-wave (T-wave™) que permite el ingreso de un gas inerte (argón) para efectuar la fragmentación de los iones en caso que opere bajo condiciones de MS/MS. Esta celda de colisión puede desplazar iones de interés en tiempos tan cortos como cinco milisegundos la celda está disponible para una segunda separación de iones.

c) El detector consiste en una serie de dispositivos que transforman los iones en electrones y luego en fotones. Los fotones son ampliados y detectados en el fotomultiplicador que registra la señal. (**Figura 10**).

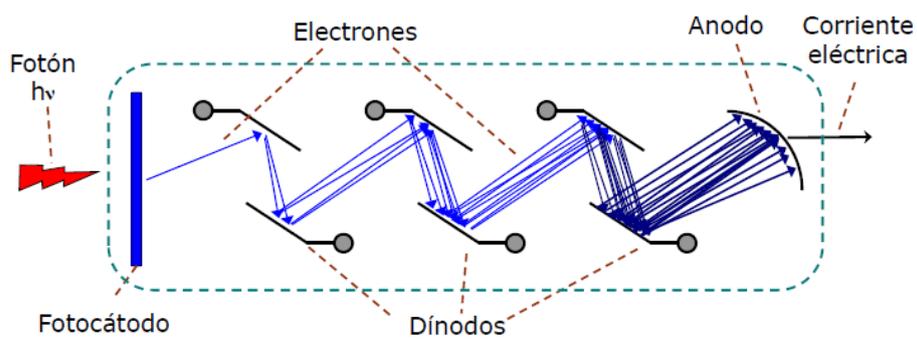


Figura 10: Esquema de un detector tipo fotomultiplicador.
Fuente: Waters [25]

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Metodología experimental

La Fase experimental de este proyecto se realizó en el Laboratorio de Análisis Físico-Químico y Microbiológico de Alimentos en el área de LC-MS/MS del Instituto Nacional de Pesca.

Para realizar la evaluación de la presencia de residuos de Nitroimidazoles: Metronidazol, Ipronidazol, Ronidazol, Dimetridazol y su metabolito 2-Hidroxy dimetridazol; es necesario el desarrollo de la metodología analítica tanto en su etapa instrumental como la extracción de la matriz de estudio que es el tejido de camarón.

En este proyecto se detalla las etapas realizadas para el logro de este objetivo, por lo que fue necesario dividir en tres fases el diseño experimental que son:

- **Fase I: Preliminar.-** Esta fase fue una de las más laboriosas y consta de: a.- búsqueda bibliográfica, b.-de la preparación de los reactivos y materiales, c.- puesta a punto del método de análisis tanto en su fase instrumental como extractiva, d.- selección del área de muestreo , recolección de las muestras y su almacenamiento.
- **Fase II: Validación y análisis de las muestras recolectadas.-** Luego del desarrollo del método de análisis, se debe comprobar a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que el método analítico cumple con los requisitos particulares para el uso específico que fue previsto por medio de la evaluación sistemática de los factores que

influyen en el resultado del análisis [26], para lograr este fin se usarán herramientas estadísticas que ayuden a medir las cualidades del método en términos de exactitud.

En esta etapa también se realizan los análisis de las muestras de tejido de camarón recolectadas de las piscinas camaroneras de la provincia del Guayas que se han cosechado en un periodo de tiempo.

- **Fase III: Evaluación.-** En esta fase se realizan la evaluación de los resultados obtenidos tanto en la validación del método análisis, como también las muestras analizadas en tejido de camarón.

Los resultados obtenidos en la Fase II y III serán tabulados y recolectados para su discusión en el apartado de Resultados y Discusión de este proyecto de investigación.

2.2. Fase I: Preliminar

2.2.1. Búsqueda bibliográfica

Durante este periodo se recolectaron varios artículos de revistas como los de *Journal of Chromatography*, *ARROW@DIT*, Reportes técnicos; en cada uno de ellos se estudió la factibilidad de reproducción *in situ* en el laboratorio de los ensayos de acuerdo a los equipos, materiales y reactivos mencionados en cada uno de ellos, de los cuales se seleccionaron los siguientes:

- Extracción de Nitroimidazoles en leche y huevos usando SupelMIP SPE y LC-MS-MS. SIGMA-ALDRICH [27]. Para las pruebas experimentales fue nombrado método Sigma.
- Método de confirmación Rápido multi-cales multi-residuos para cloranfenicol y once nitroimidazoles en leche y miel por LC-MS-MS [28]. Para las pruebas experimentales fue nombrado método Cloruro de sodio (NaCl).

- Desarrollo y validación de un método confirmatorio rápido multi-clases multi-residuos para catorce aditivos medicinales prohibidos en cerdo y alimentos compuesto para aves por LC-MS-MS [29]. Para las pruebas experimentales fue nombrado método Sulfato de sodio Anhidro (Na₂SO₄).

2.2.2. Reactivos y materiales

Los medicamentos de uso veterinarios estudiados en este proyecto son: Metronidazol (MNZ), Ronidazol (RNZ), Ipronidazol (IPZ), Dimetridazol (DMZ) y su metabolito hidroxilado 2-Hidroxy Dimetridazol (HMMNI); estos fueron obtenidos en grado estándar con la más alta pureza encontrado en el mercado, fueron adquiridos de la marca Dr. Ehrenstorfer y Witega, ver **Tabla 3**.

Además de esas sustancias, también se adquirió un juego de estándares internos deuterados D₃; con los que se trabajó en todo el proceso de desarrollo del método analítico: Dimetridazol-D₃; Ipronidazol-D₃, y 2-Hidroxy Dimetridazol-D₃. En la **Tabla 4** se describen las principales características de estos estándares.

Tabla 3: Nomenclatura y propiedades de estándares de NIZs.

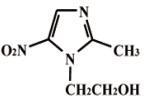
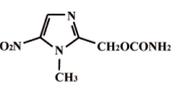
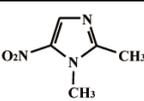
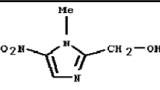
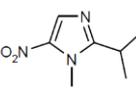
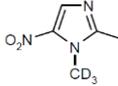
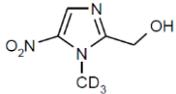
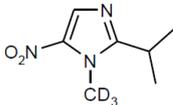
Estándar (Abreviatura)	Nombre Químico CA	Estructura Molecular	PM	Marca/ Pureza
Metronidazol MNZ	2-Methyl-5- nitroimidazole-1- etanol		171.16	Dr. Ehrenstorfer 99.5%
Ronidazol RNZ	2-carbamoyloxymethyl-1- methyl-5-nitro-imidazole		200.15	WITEGA 99.2%
Dimetridazol DMZ	1,2-Dimethyl-5-nitro-1H- imidazole		141.1	Dr. Ehrenstorfer 99.0%
2-Hidroxi Dimetridazol HMMNI	2-Hidroxyimethyl-1-methyl-5- nitro-1H-imidazole		157.13	Dr. Ehrenstorfer 98.5%
Ipronidazol IPZ	1-Methyl-2-(1-methyl)-5-nitro- 1H imidazole		169.18	Dr. Ehrenstorfer 99.0%

Tabla 4: Nomenclatura y propiedades de los estándares internos de NIZs.

Estándar	Nombre Químico	Estructura Molecular	PM	Marca/Pureza
Dimetridazol-D ₃ DMZ-D3	1-methyl-D ₃ -2-methyl-5-nitro-1H-imidazole		144.15	WITEGA 99.0%
2-Hidroxi Dimetridazol-D ₃ HMMNI-D3	2-Hidroxyimethyl-1-methyl-D ₃ -5-nitro-1H-imidazole		160.15	Dr. Ehrenstorfer 99.0%
Ipronidazol-D ₃ IPZ-D3	2-Isopropyl-1-methyl-D ₃ -2-5-nitro-1H.imidazole		172.2	Dr. Ehrenstorfer 99.0%

El agua utilizada fue grado tipo I o HPLC; que fue obtenida a partir de un purificador MILLI-Q suministrado por Millipore (Bedford, Massachusetts, USA), filtrada a 0.22 µm diámetro de poro.

Los solventes como acetonitrilo, metanol, hexano, fueron grado HPLC o de la más alta pureza ofertada en el mercado y ácido fórmico (98-100%) provisto de la marca MERCK (Darmstadt, Alemania). La sales de cloruro de sodio y sulfato de sodio anhidro son grado reactivo para análisis, con una pureza ≥ 99.0% provisto de la marca MERCK (Darmstadt, Alemania).

Para el desarrollo del método experimental Sigma, se utiliza cartuchos de extracción en fase sólida, Supel MIP Nitroimidazoles SPE, tubos de 50 mg.3mL⁻¹ (Cat. No. 52734-U) suministrados por Sigma-Aldrich.

2.2.2.1. Preparación de los estándares

Se preparó una solución stock de concentración de 100 mg.kg⁻¹ (ppm) independiente de cada uno de los estándares de nitroimidazoles, fueron disueltos cada uno en metanol grado HPLC, su preparación es descrita en la **Tabla 5**, a partir de esta solución stock se preparó una solución intermedia de concentración de 100 µg.kg⁻¹ (ppb) de HMMNI, HMMNI-D3 y IPZ-D3 de forma independiente, y una solución mix (mezcla) intermedia de 100 µg.kg⁻¹ (ppb) de los estándares de IPZ, RNZ, MNZ y DMZ; cada una de estas soluciones fueron

diluidas en acetonitrilo grado HPLC, ver la preparación en la Tabla 6. Para realizar las fortificaciones en matriz, se prepararon soluciones mix de trabajo de concentración de 25 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de estándares de NIZs internos y externos, ambas soluciones de trabajo se enrasaron con agua grado HPLC. La preparación se describe en la **Tabla 7**.

Tabla 5: Preparación de los estándares NIZs de 100 mg.kg^{-1} (ppm), almacenamiento

Estándar	Peso estándar	Volumen solvente (MeOH)	Condiciones almacenamiento
HMMNI	2.5 mg	25 mL	Oscuridad, -20°C
HMMNI-D3	2.5 mg	25 mL	
IPZ-D3	2.5 mg	25 mL	
MNZ	5.0 mg	50 mL	
RNZ	5.0 mg	50 mL	
DMZ	5.0 mg	50 mL	
DMZ-D3	5.0 mg	50 mL	

Tabla 6: Preparación de los estándares NIZs de 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (ppb), almacenamiento

Estándar	Volumen St 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (ppb)	Volumen solvente (ACN)	Condiciones almacenamiento
HMMNI	100 μL	100 mL	Oscuridad, 4 °C
HMMNI-D3	100 μL	100 mL	Oscuridad, 4 °C
IPZ	100 μL	100 mL Mezcla	Oscuridad, 4 °C
RNZ	100 μL		
DMZ	100 μL		
MNZ	100 μL		
IPZ-D3	100 μL	100 mL Mezcla	Oscuridad, 4 °C
DMZ-D3	100 μL		

Tabla 7: Preparación de los estándares NIZs de 25 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (ppb), almacenamiento.

Estándar	Volumen St 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (ppb)	Volumen solvente (H ₂ O)	Condiciones almacenamiento
HMMNI-D3	6.25 mL	12.50 mL Mezcla	Oscuridad, 4 °C
IPZ-D3/ DMZ-D3	6.25 mL		
HMMNI	6.25 mL	12.50 mL Mezcla	Oscuridad, 4 °C
IPZ/ RNZ/ DMZ/ MNZ	6.25 mL		

2.2.3. Instrumentación y software

Para el análisis cromatográfica se utilizó un equipo HPLC Alliance 2695, con desgasificador en línea, automuestreador, horno para columna. Este cromatógrafo es acoplado a un detector de masa tándem Quattro Premier™ XE, con fuente de ionización por Electro Spray, en mode ESI+, el sistema instrumental HPLC- MS/MS fue provisto por WATERS (Altrincham, Cheshire, UK).

El tipo de columna que se utilizó en las pruebas fue para cromatografía en fase de reversa, de naturaleza hidrofóbica por su relleno de cadena alquílica octadecil (C18), marca Waters (Altrincham, Cheshire, UK):

- *SunFire*™ C 18 de 5 µm de tamaño de partícula y de dimensiones de 4.6 x 250 mm
- Symmetry Waters C18, 3.5 µm de tamaño de partícula y de dimensiones de 2.1 x 100 mm, con pre-columna Waters C18, 3.5 µm.

Para las pruebas de instrumentación y de extracción se utilizaron los siguientes equipos auxiliares: Balanza analítica SHIMADZU Capacidad: 210g d=0.001 g , licuadora Osterizer clásica de 3 velocidades, agitador vórtex Heidolph, centrífuga refrigerada de 10 posiciones Hettich, baño de ultrasonido J. P. Selecta, bomba de vacío y presión, 20 Lts x min., Laboport, evaporador de muestras con flujo de nitrógeno, con capacidad de 18 tubos a la vez, sistema para filtración de fases móviles Millipore con membranas de filtración, tipo PVDF, tamaño de poro 0.22 µm, 47 mm diámetro, micropipetas de volumen variable marca Brand de 100-1000 µL, Micropipeta Hamilton 1000 µL, pipeta automática Fisherbrand de 1-5 mL.

Entre los materiales descartables utilizados para desarrollo de los ensayos fueron: viales de alta recuperación de 200 µL de capacidad para HPLC con tapas, tubos de centrífuga de polipropileno de 15 y 50 mL, filtros jeringa con membrana de PVDF de 0.22 µm de poro marca Millex

La cualificación y cuantificación de los analitos de interés se usó un espectrofotómetro de Masas con un sistema cuádruplo tándem Quattro Premier XE [30].

El Sistema HPLC-MS/MS, fue controlado por el software Masslynx versión 4.1 y el proceso de cuantificación y registro de los resultados se efectuará con el módulo Quanlynx. Estos softwares fueron desarrollados por la empresa WATERS. El programa utilizado para el tratamiento estadístico fue el software Microsoft EXCEL 2010.

2.2.4. Puesta a punto del método analítico

2.2.4.1. Optimización de las condiciones de espectrometría (MS Tune)

Los nitroimidazoles son sustancias incluidas en el Anexo IV del Reglamento (CEE) 2377/90, que corresponde a la lista de sustancias farmacológicamente activas para las que no puede establecerse límite máximo alguno [20]; es por este motivo que es necesario realizar un método de análisis confirmatorio, por lo que requiere un mínimo de 4 puntos de identificación que se obtuvieron por el monitoreo de un ion precursor (1.0 punto de identificación) y dos iones de segunda generación (1.5 punto de identificación por ion). [7]

Se procedió a optimizar las condiciones del espectrómetro de masas para alcanzar los requisitos mínimos de identificación que otorga la especificidad para cada analito que está presente en el estudio de este proyecto de investigación.

Se realizó la prueba para caracterizar mediante el uso de espectrómetro de cada uno de los analitos de nitroimidazoles (DMZ, MNZ, IPZ, RNZ, HMMNI) y de sus estándares internos (DMZ-D3, IPZ-D3, HMMNI-D3), preparando para ello una solución de 10 mL de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de cada uno de los estándares en MeOH, además se adiciono 100 μL de ácido fórmico para favorecer la

ionización, el espectrómetro fue operado en el modo de ionización de electro spray positivo (ESI⁺), con un flujo directo de la bomba de jeringa de 20 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Nitrógeno de alta pureza fue utilizado como gas de solvatación y gas de nebulización en la fuente de ionización y el cono de muestra, a un flujo de 800 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ y de 70 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ respectivamente; la temperatura de la fuente del bloque iónico fue de 120 $^{\circ}\text{C}$ y de la de solvatación fue de 350 $^{\circ}\text{C}$. El voltaje del capilar fue seteado a 4 kV. Se registró primero un espectro de barrido completo operado en MS Scam de 0.3 min, para seleccionar el voltaje del cono, y así obtener el valor más óptimo para cada ion precursor más abundante, $[\text{M}+\text{H}]^{+}$, de los analitos de nitroimidazoles (**Figura 11** y **Figura 12**).

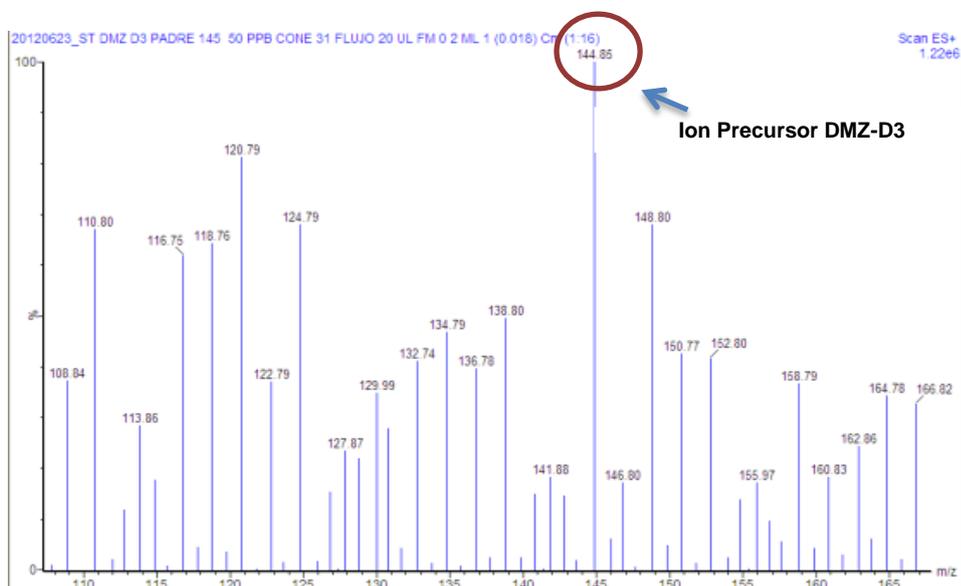
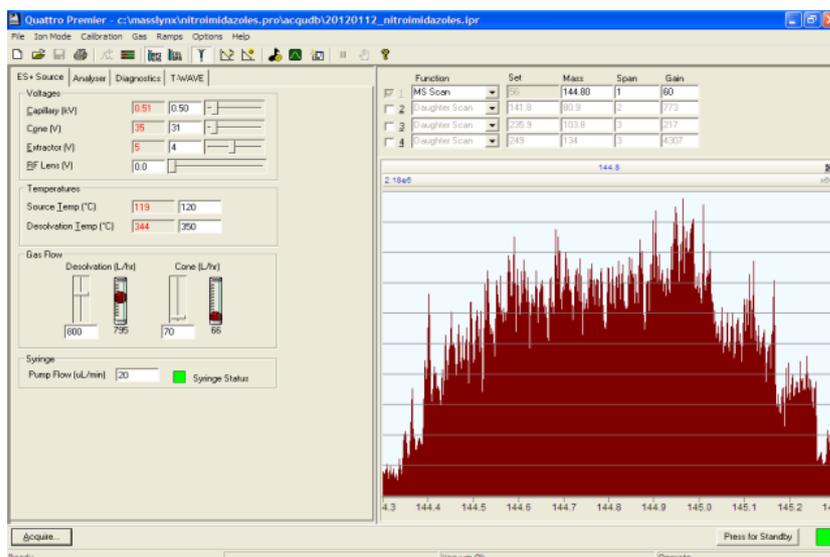


Figura 11: Pagina Tune y Espectro de barrido MS Scam del estándar de DMZ-D3.

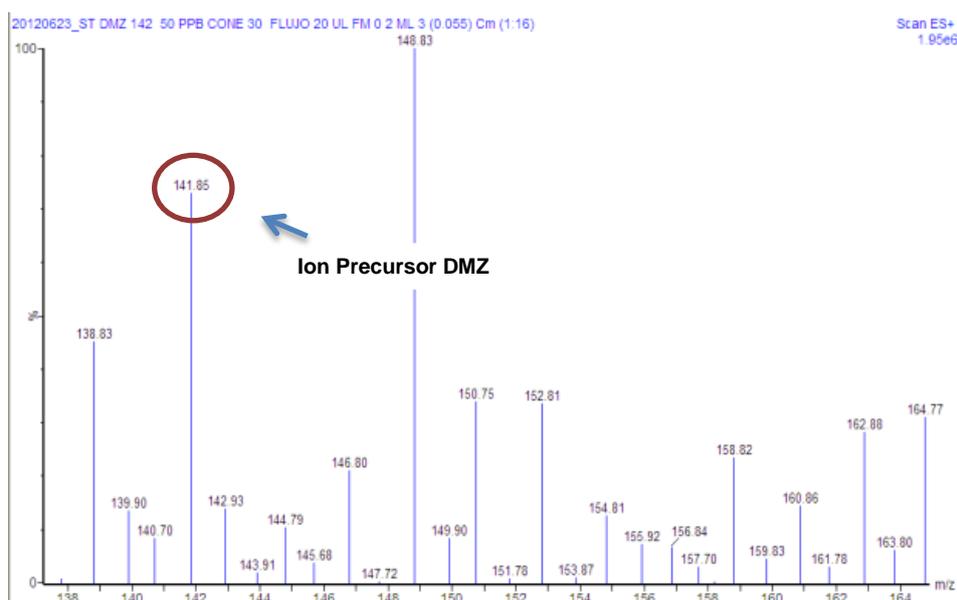
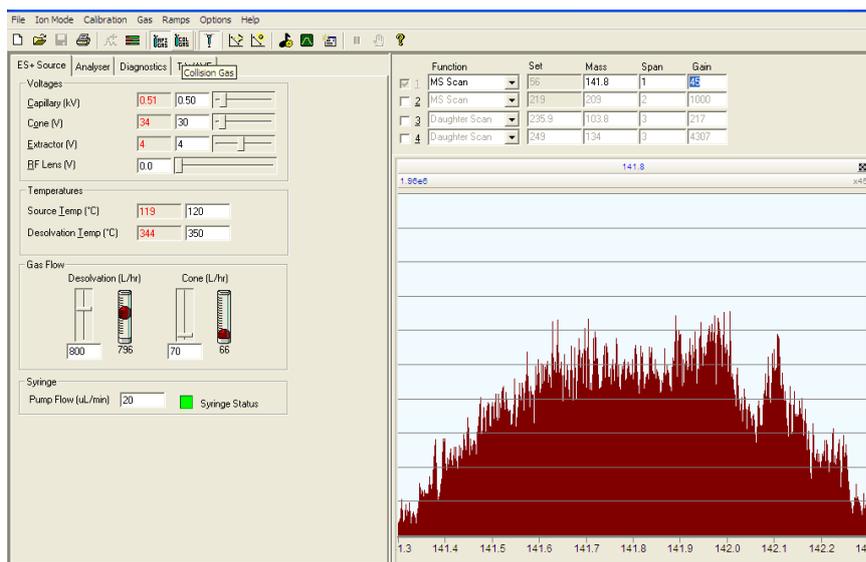


Figura 12: Pagina Tune y Espectro de barrido MS Scam del estándar de DMZ.

Una vez seleccionadas las energías de voltaje del cono de cada analito, trabajando en modo MS/MS, se sometieron a estudios las energías de colisión para fragmentar el ion precursor y así obtener e identificar los iones producto en el caso de los estándares de nitroimidazoles se seleccionaron dos transiciones una de ion de cuantificación (Q) y de otra de confirmación (c), como criterio de selección, se procedió a escoger aquellos iones producto con mayor masa carga m/z (selectividad) y mayor intensidad (sensibilidad); en los estándares internos se seleccionó un ión producto. Para el registro de los espectros de los analitos se realizó un barrido en MS Daughters Scam (Figura 13).

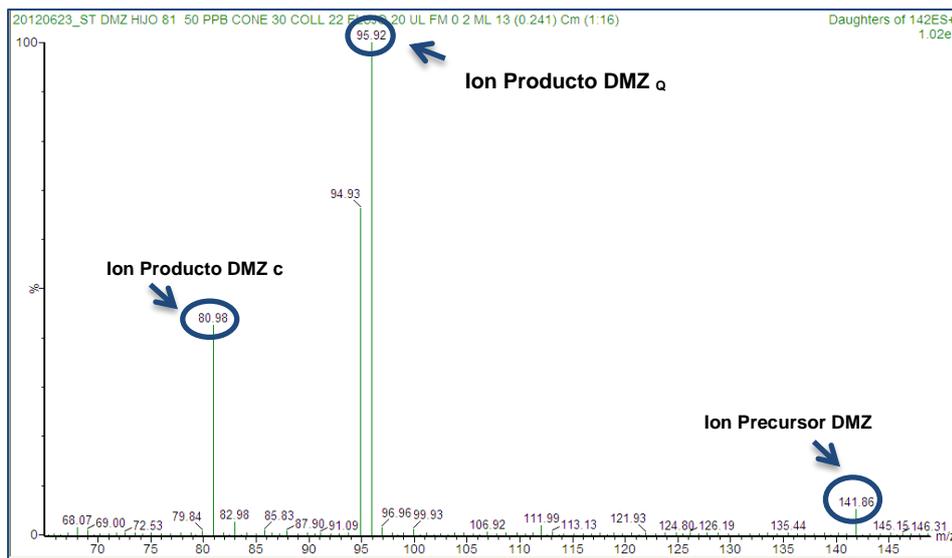


Figura 13: Espectro de barrido Daughters Scam del estándar de DMZ

Al haber obtenido las condiciones de monitoreo, se procedió a crear el “MS Method” para ello el instrumento fue operado en monitoreo de reacción múltiple (MRM), los valores seleccionados para los diferentes nitroimidazoles, se encuentra descritos en la **Tabla 8**.

Tabla 8: Condiciones de monitoreo de reacción múltiple (MRM) para los NIZs

NIZs	Iones de Monitoreo		Voltaje Cono (V)	Energía Colisión (eV)	Dwell (s)
	Ion Precursor (Da)	Ion Producto(Da)			
DMZ	141.80	Q 95.90	30	15	0.50
		c 81.00	30	22	0.50
MNZ	171.80	Q 127.9	20	15	0.50
		c 81.90	20	25	0.50
RNZ	200.85	Q 139.90	20	14	0.50
		c 55.00	20	25	0.50
IPZ	169.90	Q 123.90	35	18	0.50
		c 108.90	35	25	0.50
HMMNI	157.85	Q 139.90	25	12	0.50
		c 93.90	25	24	0.50
DMZ-D3	144.85	Q 98.95	31	15	0.50
IPZ-D3	172.90	Q 127.00	34	20	0.50
HMMNI-D3	160.85	Q 142.95	25	12	0.50

*Transiciones de cuantificación (Q) y confirmación (c)

2.2.4.2. Optimización de las condiciones cromatográficas

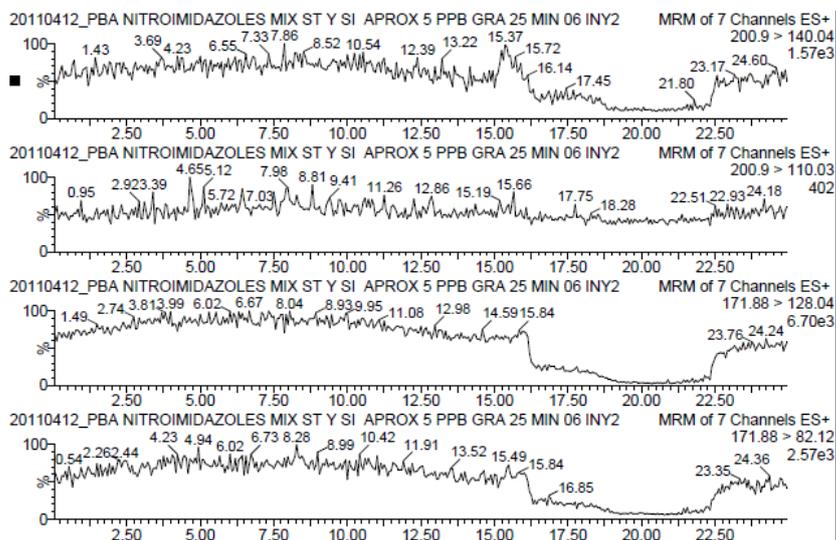
Una vez seleccionados los parámetros espectrométricos iniciales, se inyectó un vial con una mezcla de estándares de los cinco nitroimidazoles y de los tres estándares internos de concentración de $1.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$, en el

cromatografo líquido, probando condiciones iniciales cromatográficas descritas en la referencias bibliográficas [31] con una columna SunFire™ C18 de 5 µm de tamaño de partícula y de dimensiones de 4.6 x 250 mm; de fase móvil A compuesta por agua con ácido fórmico al 0.1%(v/v) y Fase móvil B de MeOH con ácido fórmico al 0.1%(v/v) con un flujo de trabajo de 0.30 mL.min⁻¹ , temperatura de columna de 25 °C y volumen de inyección de 20 µl, el gradiente utilizado en esta prueba esta descrita en la **Tabla 9**.

Tabla 9: Gradiente cromatográfico de 23 min descrito Journal de Chromatography [31]

Tiempo(min)	A	B	Flujo(mL.min ⁻¹)	Curva
0,0	94	6	0.3	1
10,0	94	6	0.3	6
20,0	70	30	0.3	6
23,0	70	30	0.3	6
23,1	94	6	0.3	6

A partir de este gradiente se obtuvieron tiempo de retención de 15.37 a 16.20 minutos, con señales bajas, en especial con las transiciones del analito de Ronidazol (**Figura 14**), además al inyectar en otra ocasión el vial se lograron cromatogramas con tiempo de retención diferentes, lo que demostraba que no había repetitividad entre corridas cromatográficas, y que el tiempo de transición y estabilización de la columna no era el suficiente, lo que originaba en un aumento en el tiempo de corrida del gradiente seleccionado, llegando inclusive a los 40 minutos de tiempo. Uno de los motivos de este retardo de estabilización puede ser ocasionado por la longitud de la columna de 250 mm y, por lo que se probó en posteriores pruebas con una columna de menor longitud.



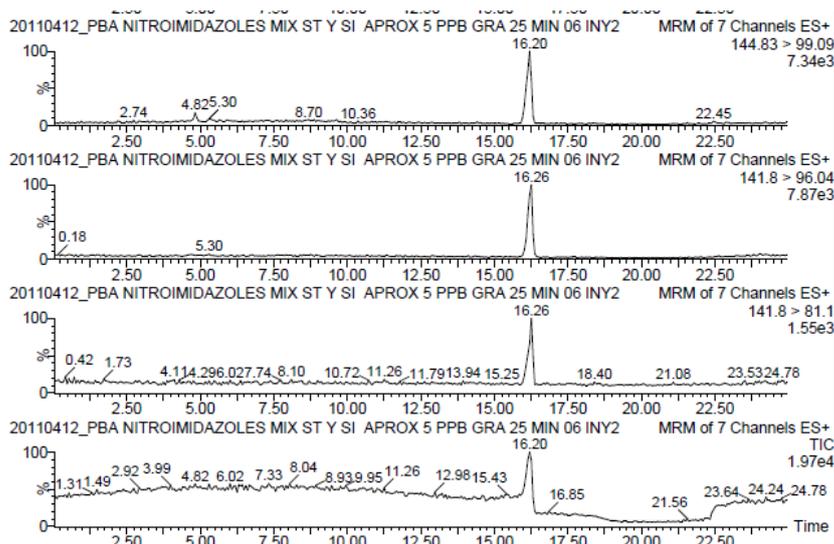


Figura 14: Cromatograma de 25 min, de estándares en solución de Niz s de $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, gradiente de Journal de Chromatography [31]

Para mejorar las condiciones cromatográficas, se utilizó un gradiente con un menor tiempo de corrida por lo que se seleccionó como punto de partida el gradiente descrito en la referencia bibliográfica [27] y en la **Tabla 10** se describe el gradiente que se utilizó, como fase móvil A una solución de ácido fórmico al 0,1% en agua grado HPLC, y como fase B se requirió acetonitrilo acidificado al 0,1% de ácido fórmico, y una columna Symmetry™ C 18 de $5 \mu\text{m}$ de tamaño de partícula y de dimensiones de $3.9 \times 150 \text{ mm}$.

Tabla 10: Gradiente Cromatográfico 18 min descrito Technical Report SIGMA-ALDRICH [27].

Tiempo(min)	A%	B%	Flujo($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	Curva
0.0	95	5	0.3	1
1.0	95	5	0.3	6
8.0	0	100	0.3	6
12.0	0	100	0.3	6
13.0	95	5	0.3	6
18.0	95	5	0.3	6

Al realizar estas corridas se pudo observar una mejor resolución de los picos y un aumento de señal para cada uno de los analitos (**Figura 15**), con tiempo de retención entre 8.40 a 8.80 min. Al obtener mejores resultados con esta columna se procedió a desarrollar pruebas para disminuir el tiempo de corrida y así optimizar tiempo y volumen de fases móviles utilizada. Como principales variables para realizar los cambios en el tiempo de corrida fue el flujo y la gradiente de trabajo, lo que originó alteraciones en los tiempos de

retención de los analitos de Nizs, además hay que recordar que se está trabajando con cinco nitroimidazoles y tres estándares internos, con lo que se debía asegurar que la resolución y la forma de los picos en su anchura y altura sea la ideal para realizar una buena integración de sus áreas de cada uno de los analitos.

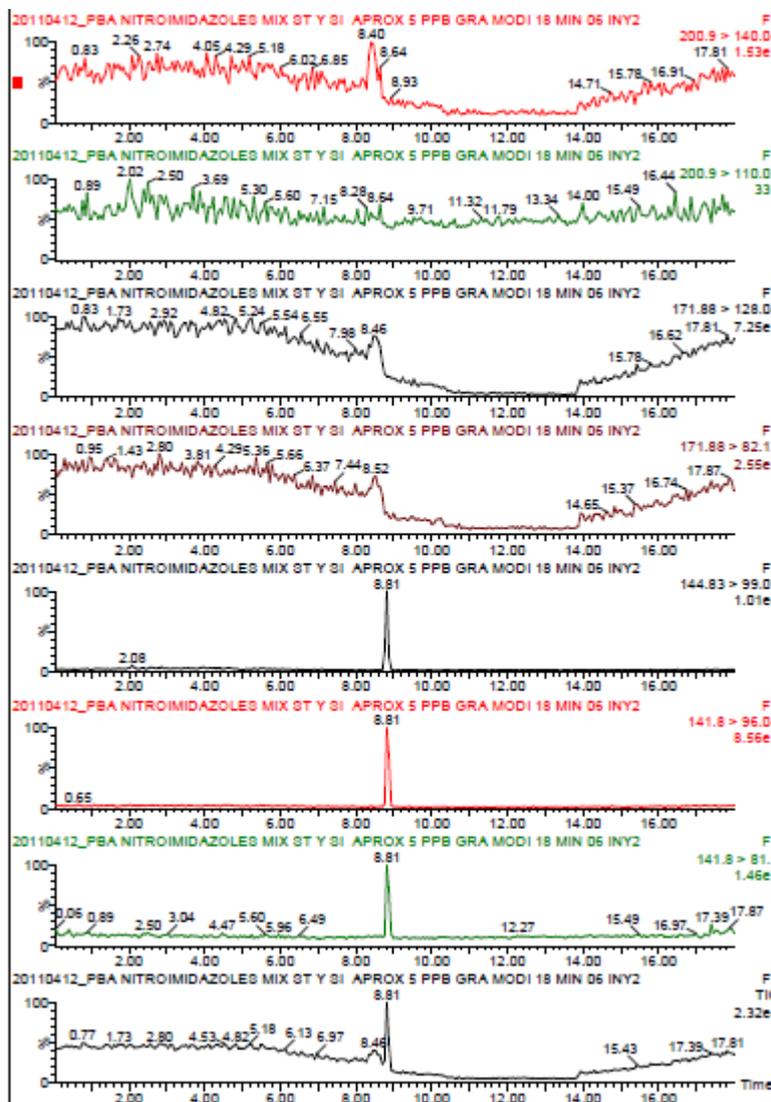


Figura 15: Cromatograma de 18 min, de estándares en solución de Niz s de $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, gradiente de Technical Report SIGMA-ALDRICH [27]

El tiempo de corrida a que se quería llegar es el de máximo 15 minutos, y en este tiempo se debe verificar que la columna se acondicione, resuelva y eluya cada uno de los analitos y finalice con un lavado que permite eliminar la mayoría de los interferentes o demás constituyentes que no son de interés y que puede poseer la matriz de camarón; después de varios intentos se pudo disminuir el tiempo de corrida de 18 a 10 minutos.

Unas de los gradientes cromatográficos en que se realizó pruebas fue la descrita en la **Tabla 11** denominado como Opción A, con la que se obtuvo picos de los analitos de MNZ, RNZ, HMMNI, HMMNI-D3 que tienen tiempo de retención muy semejantes que pueden ir desde de 7.05 a 7.20 minutos, esto se debe a que estas moléculas poseen en su estructura grupos funcionales oxigenados, que aumenta la polaridad del analito; el DMZ-D3 y DMZ con tiempo de elución de 7.40 minutos; el IPZ-D3 y IPZ con 8.05 minutos, estos analitos son los últimos en eluir por tener en su estructura un radical isopropílico que aumenta su carácter hidrofóbico en la molécula; además que en los cromatogramas de HMMNI y HMMNI-D3 muestran una línea base irregular que aumenta el ruido del cromatograma, lo que ocasiona diferencias en los tiempos de retención y que no se pueden diferenciar el inicio o fin los picos especialmente en la transición del ion de confirmación del HMMNI.

Tabla 11: Gradiente cromatográfico de 10 min opción A

Tiempo(min)	A%	B%	Flujo(mL/min)	Curva
0,0	95	5	0.4	1
0.5	95	5	0.4	6
4.0	0	100	0.4	6
6.0	0	100	0.4	6
7.0	95	5	0.4	6
7.5	95	5	0.4	6
8.0	95	5	0.8	6
9.5	95	5	0.8	6
10.0	95	5	0.4	6

A pesar de que se obtuvo un gradiente cromatográfico de 10 minutos, esto no es solo necesario, por las dificultades de elución que disminuye la resolución de los analitos y el aumento del ruido, es por esto que se realizaron nuevas pruebas para lograr obtener un cromatograma aceptable para todos los analitos de NIZs.

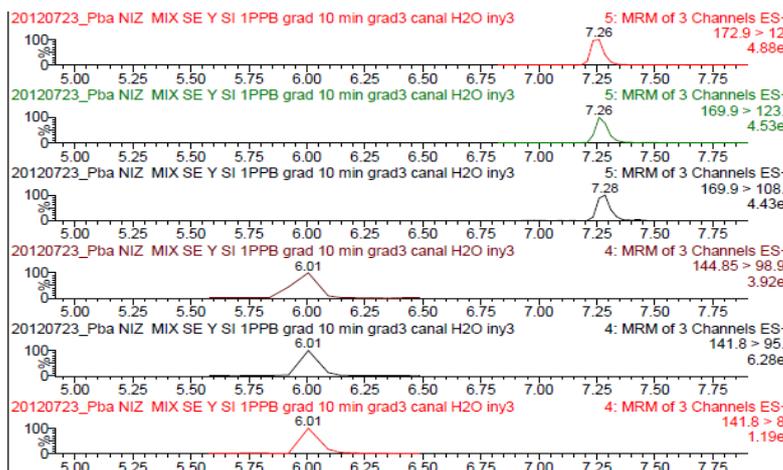
Con los resultados obtenidos del gradiente de la opción A, se realizaron cambios que ayuden a mejorar la elución de los analitos de MMNZ, RNZ, HMMNI, HMMNI-D3 por lo que a partir de los 5.30 a 7.00 minutos de la corrida se disminuirá el flujo de fase móvil para así aumentar la permanencia de los analitos en la columna y permitir que haya una mayor interacción entre la fase estacionaria y los analitos, a partir de los 7.00 a 7.50 minutos se aumentará el

flujo para tratar de eluir e un menor tiempo al IPZ y IPZ-D3; después en el gradiente se incrementó el flujo para permitir un mejor lavado de la columna y así eluir los componentes de la matriz que no son de interés en el análisis. Y para finalizar el gradiente con el restablecimiento de las condiciones iniciales de acondicionamiento. El gradiente completo se encuentra detallado en la **Tabla 12**.

Tabla 12: Gradiente cromatográfico de 10 min opción B

Tiempo (min)	A%	B%	Flujo (mL/min)	Curva	Fase del Gradiente
0.0	95	5	0.4	1	Acondicionamiento
0.5	95	5	0.4	6	
4.0	0	100	0.6	6	
5.2	0	100	0.6	6	
5.3	0	100	0.3	6	Elución de los analitos
6.0	0	100	0.3	6	
7.0	95	5	0.3	6	
7.5	95	5	0.6	6	
8.0	95	5	0.8	6	Lavado
9.5	95	5	0.8	6	
10.0	95	5	0.4	6	Acondicionamiento

Los cromatogramas obtenidos se puede evidenciar que se mejoró la separación de los analitos de MNZ, RNZ, HMMNI y su estándar interno con tiempos de retención de 5.60-5.8-5.70 minutos respectivamente, en el caso del DMZ con tiempo de elución de 6.00 y del IPZ que eluye a los 7.25 minutos; en la transiciones de los iones de cuantificación y de confirmación del HNNMI y HMMNI-D3 se obtuvo una línea base más uniforme que permite una mejor simetría de los picos de los analitos aumentando la intensidad de la señal que producen estos (**Figura 16**), y por estos motivos que se seleccionó este método cromatográfico (**Tabla 12**) para el desarrollo de este proyecto de investigación .



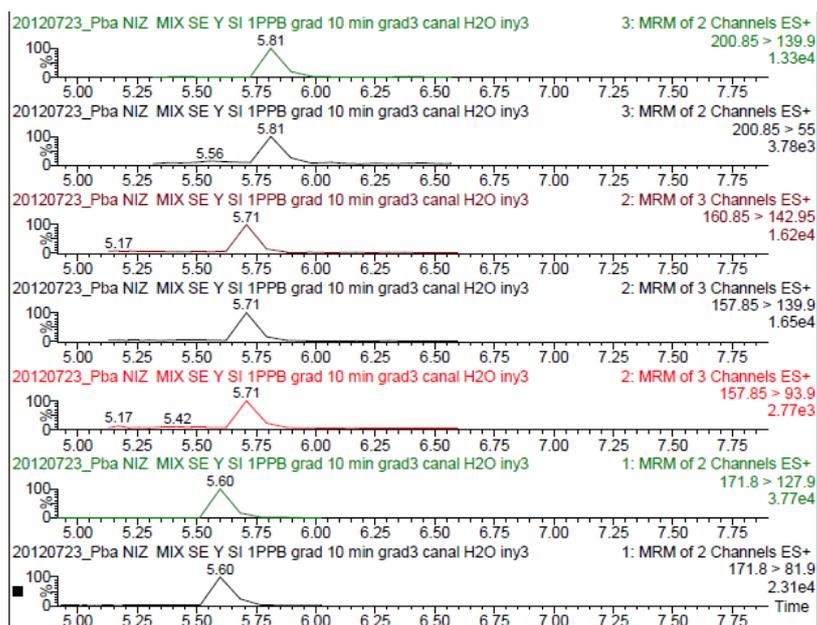


Figura 16: Cromatograma de 10 min, de estándares en solución de Nizs de $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, gradiente de 10 min opción B

Al estudiar los cromatogramas obtenidos con el gradiente y el método de monitoreo de reacción múltiple (MRM) escogido, se puede apreciar que los picos cromatográficos obtenidos no guardan simetría y algunos de ellos presentan deformidades que se alejan de la forma de curva gaussiana (campana) que se requiere para tener una mejor calidad de cromatogramas, es por esto que se decide realizar modificaciones al MRM del MS Method, para disminuir la banda cromatográfica de los picos. Las pruebas realizadas son tratadas en el capítulo 3 de RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

2.2.4.3. Optimización del método de extracción en matriz.

Al poseer unas las mejores técnicas de detección con el sistema LC-MS/MS, es necesario desarrollar una técnica extractiva que permita aumentar la eficiencia de este método analítico.

Las matrices de alimentos son altamente complejas por su composición química, posee carbohidratos, lípidos y proteínas como macronutrientes y diferentes micronutrientes como son vitaminas y minerales, además de enzimas, pigmentos demás sustancias químicas que son producidos naturalmente y que son característicos de cada alimento, son estos atributos lo

que le otorgan el color, aroma y sabor a cada tipo de alimento [32]. El tejido del músculo, que es la parte comestible del camarón, es la matriz utilizada para el desarrollo del método extractivo.

El término extracción se refiere a la transferencia del compuesto orgánico de interés (analito) de una fase acuosa a un solvente orgánico, el método más utilizado se basa en el uso de disolventes y se refiere a una extracción líquido-líquido (L-L), esto es que existe una distribución de los analitos entre disolventes inmiscibles en que el analito y la matriz tienen solubilidades diferentes, es durante este proceso que el analito se reparte entre ambos líquidos hasta alcanzar un equilibrio. Se puede referir en términos análogos a la extracción sólido-líquido (S-L), ya que se pone en contacto una cantidad de muestra sólida (matriz), con un disolvente orgánico que tenga afinidad con el analito.

Otra forma de extracción que se está utilizando actualmente y que es por medio de cartuchos o pequeñas columna rellenas de una fase estacionario alquílica o de compuestos químicos como grupos hidroxilos, aminos u oxigenados que permiten una mayor interacción con el analito, es la denominada extracción en fase sólida (SPE), esta se basa en una afinidad de alta especificidad que tiene el analito por una fase sólida estacionaria que se encuentra empaquetada en un cartucho de vidrio o polietileno, ya que al recorrer la muestra a través de una fase sólida que ha sido acondicionada anteriormente con un disolvente de propiedades similares a la muestra, al pasar los componentes de la muestra incluido los analito de interés por la fase estacionaria estos quedaran retenidos en ella, y los componentes que no tienen afinidad pasaran fácilmente sin ser alterados.

Los analitos de interés que quedaron retenidos, serán eluidos con un volumen de disolvente después de una etapa de lavado, que ayude a eliminar o disminuir las sustancias interferentes que son propias de la matriz (tejido de camarón). La **Figura 17** describe las etapas para la extracción en fase sólida.

De acuerdo a selección bibliográfica descrita en el apartado 2.2.1, se reprodujeron en el laboratorio la extracción en la matriz descritos en las fuentes bibliográficas: [27], [28] y [29], pero estas pruebas se realizaron en tejido de camarón que es la matriz de estudio de este proyecto, en la **Tabla 13** se describe de forma resumida el proceso extractivo de cada una de las metodologías que fueron utilizados en este proyecto.

Tabla 13: Etapas de extracción en matriz de los 3 métodos analíticos seleccionados en la revisión bibliográfica

Método	SIGMA [27]	NaCl [28]	Na ₂ SO ₄ [29]
Etapas			
Peso Matriz Camarón	10 g matriz	1 g matriz	2 g matriz
Solvente extracción	10 mL ACN mezclar y centrifugar 10min	2 mL ACN vortear	12 mL ACN, vortear
Efecto Salino	Adicionar 2g de NaCl mezclado con el supernadante, centrifugar	Adicionar 0,5g NaCl, agitar 30 s y centrifugar 4350 rpm x 10 min	Adicionar 3.5 g SO ₄ Na ₂ anhidro, agitar y centrifugar por 5100 rpm x 20 min
Separación fase orgánica	Extraer la fase orgánica y evaporar a sequedad	Transferir la fase orgánica a un vial y evaporar a sequedad	Separar la fase orgánica y evaporar a hasta más o menos 6 mL
Tratamiento lavado y extracciones adicionales	Reconstituir 2mL de agua y sónico x 3min	↓	Adicionar 5 mL de Hexano, vortear y centrifugar a 3750 x 20 min
	Extracciones SPE, específicas para los NIZs: Acondicionamiento, Lavado y Elución de los analito ver Tabla 17 .		La capa de hexano es descartada, y el extracto es evaporado a sequedad
Reconstitución del extracto	Se recolecta la fracción eluida de la SPE y es evaporada a 50 µL y es reconstituido a 500 µL con 0.1% Ácido Fórmico en agua y filtrada a través de filtro de jeringa de 0.22 µm	Reconstituir con 200 µL en Agua:ACN (95:5) y filtrar a través de filtro de jeringa de 0.22 µm PVDF	El extracto es reconstituido y vorteadado con 800 µL Agua:ACN (85:15), ultra centrifugar a 13750 rpm x 30 min, 200 µL de la porción de la capa inferior más clara es trasferida y filtrada a través de filtro de jeringa de 0.22 µm PVDF

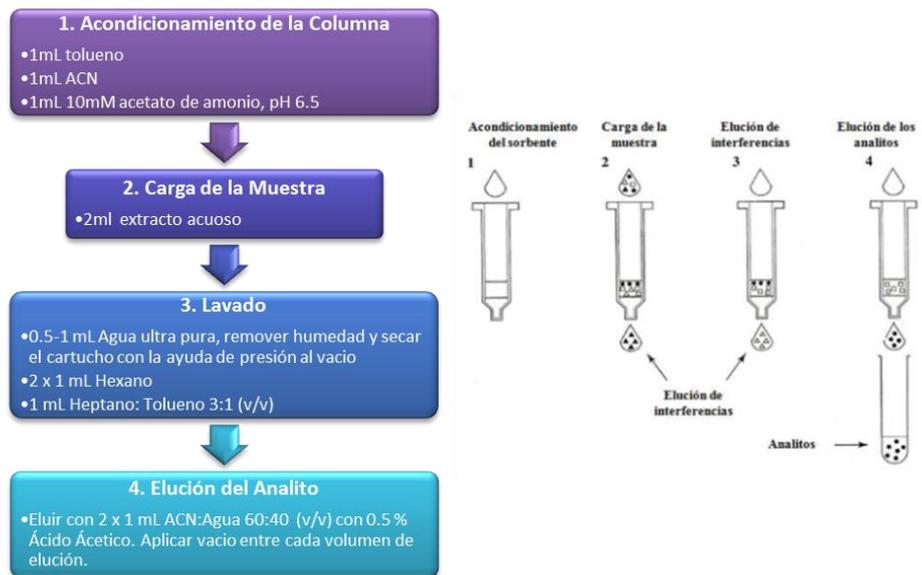


Figura 17: Procedimiento de extracción en SPE SupelMIP. Fuente: [27]

En el desarrollo del método extractivo de Sigma-Aldrich [27], se utilizó un proceso de extracción en fase sólida (SPE), con cartuchos de SupelMIP SPE-Nitroimidazoles, de 50 mg/3 mL (Cat. No. 52734-U), la fase estacionaria son nuevas moléculas de polímeros impresas (MIPs), que fueron desarrolladas para la extracción específica de nitroimidazoles (DMZ, MNZ, IPZ, RNZ, HMMNI).

Las moléculas MIPs son una clase de moléculas reticulares de reconocimiento molecular a base de polímeros diseñados para enlazar un compuesto objetivo relacionado estructuralmente con alta selectividad. Este atributo se introdujo durante la síntesis de MIP en la que una molécula plantilla, parecida estructuralmente al analito, guía la formación de cavidades específicas o impresiones que son esteárica y químicamente al analito (s) objetivo [33], el esquema de este proceso se resume en la **Figura 18**.

Para evaporar los extractos o fases orgánicas de cada uno de los métodos extractivos desarrollados, se utilizó un evaporador automático de 18 canales, con flujo de Nitrógeno a una temperatura controlada de 45 a 50°C. Cada extracto evaporado es reconstituido y filtrado a través de un filtro de jeringa de tamaño de poro de 0.22 µm de PVDF.

Los resultados obtenidos en cada una de las pruebas realizadas para la optimización del método de extracción en matriz se presentan en el capítulo 4 de RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

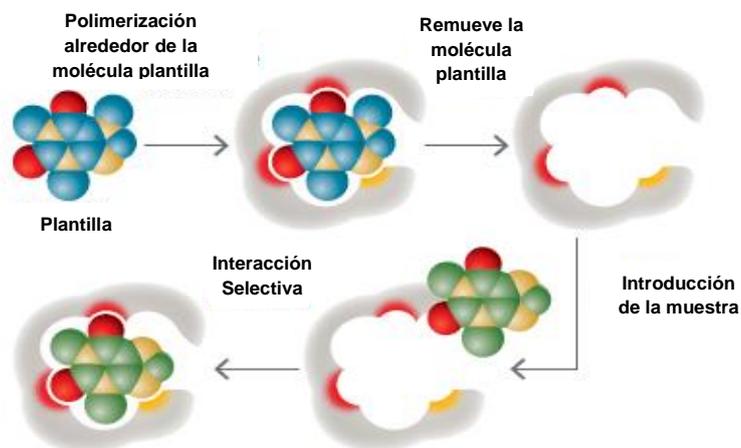


Figura 18: Formación de las MIP Fuente: Sigma-Aldrich

2.3. Fase II: Validación

Antes de iniciar con el proceso de validación se debe establecer un método estandarizado de medición, es por eso que la etapa de validación se realizó después de la puesta a punto de la metodología de ensayo descrita anteriormente, y esto se efectuó con el fin de que las mediciones que se llevaron a cabo en la validación se realicen de la misma manera.

De acuerdo al *Codex Alimentarius* se establece tres categorías de métodos analíticos para ser usados en un programa de control de residuos, como el método desarrollado en este proyecto de tesis, se encuentra dentro de la categoría del Nivel I, el cual está dirigido a identificar y cuantificar un analito [34], además al ser este método analítico utilizado para el análisis de las muestras oficiales, recolectadas en el Plan de Monitoreo de Residuos (PMR) [9], este debe de cumplir con los criterios comunes de interpretación de los resultados analíticos descritos en la decisión de la comisión europea 2002/657/EC [7] el cual clasifica a este método de ensayo como un método cuantitativo confirmatorio, ya que proporciona información total que permite identificar y cuantificar de manera inequívoca la sustancia al nivel de interés.

La validación de un método no solo comprende la determinación de la veracidad o sesgo y la precisión de un método analítico, sino además estimar los posibles errores que pueden suceder durante el ensayo, que pueden ser expresados por la incertidumbre de la medición asociada con los resultados.

2.3.1. Diseño experimental

Para asegurar la correcta aplicación del método de ensayo de nitroimidazoles se estableció la necesidad de un proceso de validación integral interlaboratorio (single-laboratory) que permita evaluar los criterios de desempeño de acuerdo a las directrices bibliográficas establecidas por el CODEX, IUPAC [35], ISO, 2002/657/EC, AOAC [36], en la **Tabla 14** se describe de forma resumida el diseño experimental que se llevó a cabo en este proyecto de investigación; la evaluación de los datos obtenidos en la validación y el cumplimiento de los objetivos permite establecer que el método es apto para el propósito que se desea aplicar, por lo que fue preciso demostrar mediante estudios sus características de funcionamiento, que puede incluir:

- Selectividad/Especificidad,
- Linealidad/Función respuesta
 - Efecto Matriz,
- Estabilidad de los analitos en solución y matriz,
- Robustez,
- Exactitud
 - Veracidad/Recuperación,
 - Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad),
- Concentraciones o límites críticos
 - Límite de decisión ($CC\alpha$),
 - Límite de detección ($CC\beta$),
- Estimación de la incertidumbre de la medida.

Tabla 14: Diseño experimental para la validación de Nitroimidazoles en tejido de camarón.

Característica de funcionamiento	Muestras de la Validación	Concentración NIZs ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
Selectividad/Especificidad	blancos matriz n=20 Blancos matriz fortificados con interferentes químicos	Estándares Internos a 3.00
Linealidad/ Función respuesta	Blancos de matriz fortificados en el rango de trabajo para obtener por lo menos 5 curvas de calibración en matriz	BI-0.50-1.50-3.00-4.50-7.00

Robustez	Blancos de matriz fortificados a nivel del MRPL	3.00
Estabilidad	Solución de estándares externos e internos	3.00
	Blancos matriz fortificados a nivel del MRPL	3.00
Veracidad/ Recuperación	MRC	Valor Asignado en el Certificado
	Blancos matriz fortificados en 3 niveles, con 6 repeticiones por nivel por 2 analistas. n=36	0.50-3.00-7.00
Repetibilidad	Blancos matriz fortificados en 3 niveles, con 6 repeticiones por nivel. n=18	0.50-3.00-7.00
Reproducibilidad intra-laboratorio	Blancos matriz fortificados en 3 niveles, con 6 repeticiones por nivel. Por 2 analistas. n=36	0.50-3.00-7.00
Límite de decisión (CCα)	Blancos fortificados en el rango de trabajo	0.50-3.00-7.00
Capacidad de detección (CCβ)	Blancos fortificados en el rango de trabajo	0.50-3.00-7.00

2.3.1.1. Selectividad / Especificidad

Es necesario identificar el poder de distinción entre el analito y sustancias afines como isómeros, metabolitos, productos de degradación, sustancias endógenas, y constituyente de la matriz. Para evaluar la selectividad y especificidad se seleccionaron una gama de compuestos químicamente relacionados u otras sustancias interferentes que potencialmente puedan encontrarse en las muestras y se analizaron muestras blanco de matriz pertinente para detectar posibles interferencias y para valorar sus efectos, por lo realizó los siguientes ensayos:

1. Análisis de muestras blancos de tejido de camarón ($n \geq 20$) en que se efectuó el método de extracción y luego se procedió al análisis instrumental en que se verificó las posibles interferencias (señal de pico, indicios de iones) en la región de interés en la que cabe esperar la elución del analito de interés en las transiciones de los iones de cuantificación y confirmación de los analitos de nitroimidazoles [7].
2. Se realizará prueba con interferentes químicos que son sustancias químicamente relacionados a los nitroimidazoles y se procederá a enriquecer con ellas muestras blancos y matrices fortificadas de 3.0 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ de NIZs en tejido de camarón a concentraciones adecuadas de

los interferentes que puedan obstaculizar la identificación o cuantificación de los analitos [7].

2.3.1.2. Función de respuesta / Linealidad.

En un método analítico de cuantificación es prioritario determinar el intervalo de concentraciones del analito o los valores de la propiedad relacionada, sobre los cuales el método puede aplicarse. En el extremo inferior del intervalo de trabajo está dado por los valores del límite de detección o cuantificación; mientras que el extremo superior del intervalo de concentración estará impuesto por varios efectos que depende del sistema de respuesta del instrumento y la aplicabilidad a la que se quiere llegar con el método analítico.

En los métodos analíticos instrumentales, dentro del intervalo de trabajo debe existir un intervalo de respuesta lineal que es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta instrumental que sea proporcional a la cantidad de analito que habrá de determinarse en la muestra. Esta proporcionalidad se expresa por una expresión matemática que caracterice a la curva de calibrado que puede contener mínimo cinco concentraciones más un blanco, y debería cubrir todo el intervalo del interés analítico. Comúnmente se desea una respuesta lineal y la curva se expresa estadísticamente en función de la correlación lineal. La extensión de este intervalo lineal puede establecerse durante la evaluación del intervalo de trabajo.

En el ensayo para la determinación del intervalo de trabajo y linealidad utilizada en este proyecto se definió el mismo intervalo tanto para el trabajo como el lineal, los cuales fueron realizado en blanco matriz de tejido de camarón, además en la preparación de la curva de calibración se realizó bajo el método del estándar interno.

Por este método una concentración fija de la sustancia pura (estándar interno), se añade a las muestras, como a la matriz blanco utilizado para la preparación de la curva de calibración. El estándar interno debe ser una

sustancia de naturaleza similar a la del analito, con una señal fácilmente medible y que no interfiera con la respuesta del analito.

Los métodos basados en la adición de un estándar interno se utilizan cuando uno o algunos de los componentes y el método de análisis es susceptible a errores tanto sistemáticos como al azar es por esto que tanto el analito como el estándar interno responden proporcionalmente a las fluctuaciones del método extracción y del instrumental empleado, entonces la razón de estas señales es independiente de tales fluctuaciones. De esta forma el método del estándar interno compensa por errores provenientes de la manipulación de la muestra por analizar [37].

La Directiva EC 657/2002 recomienda en cuanto a curvas de calibrado: emplear al menos cinco niveles (incluyendo el cero) en la construcción de la curva; describir la fórmula matemática de la curva, la bondad del ajuste de los datos a la curva; y describir los márgenes de aceptabilidad de los parámetros de la curva [7]. En la **Tabla 15** se describe la preparación la curva de calibración que fue utilizada en este ensayo, el rango de trabajo será de 0.5 a 7.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ y cada nivel de concentración tienen una concentración de estándar interno que fue de 3.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (MRPL).

Tabla 15: Preparación de la curva de calibración en matriz de tejido de camarón.

MEZCLA ESTÁNDARES NIZ'S	VOLUMEN FORTIFICAR MATRIZ	CONC. FINAL matriz $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	FORTIFICACIONES EN MATRIZ
St. Int Nizs 25 ppb	0.600 mL	3.00	Matrices blanco, estándares y muestras: 5 g c/u
	0.100 mL	0.50	5 g matriz tejido camarón
St. Nizs 25 ppb	0.300 mL	1.50	5 g matriz tejido camarón
	0.600 mL	3.00	5 g matriz tejido camarón
	0.900 mL	4.50	5 g matriz tejido camarón
	1.400 mL	7.00	5 g matriz tejido camarón

2.3.1.2.1. Efecto Matriz:

La matriz es todo lo que hay en la muestra de análisis, que no sea el analito de interés y muchas veces estos componentes de la matriz pueden dar señal analítica que pueden afectar por exceso o disminución la respuesta

instrumental del analito, a esta variación se denomina efecto matriz y esto puede afectar los resultados de un análisis químico, debido a este efecto que puede presentar en matrices complejas como el de alimentos es necesario determinar si se requiere la utilización de métodos de calibración que ayuden a minimizar este efecto [38].

Para determinar el efecto matriz es necesario realizar curvas de calibración en solvente y en matriz, deberán estar constituidas por lo menos en cinco niveles de concentración. Y evaluar si hay diferencia significativa entre ambas curvas, [39], [40].

2.3.1.3. Estabilidad

Para conocer si la inestabilidad de los estándares o de las sustancias de interés pueden dar origen a desviaciones significativas del resultado del análisis durante el almacenamiento o el ensayo de los analitos que se encuentra en la matriz, es necesario evaluar la estabilidad de los estándares utilizados en el método de análisis tanto en solución como en matriz (camarón).

Además el control de las condiciones de almacenamiento y tiempo de estabilidad de los estándares debe formar parte del sistema gestión de calidad habitual del laboratorio. Para conocer estas características se procedió a realizar las siguientes pruebas de ensayos:

2.3.1.3.1. Estabilidad en solución

Se preparó soluciones madre de los estándares y sus diluciones siguiendo las instrucciones descritas en el ítem 2.2.2.1 Preparación de estándares, hasta obtener los estándares de NIZs de concentración de $25 \mu\text{g.kg}^{-1}$, a partir de estos tomar el número suficiente de alícuotas de volumen de 2 mL, estos fueron vertidos en tubos de 15 mL de polipropileno etiquetados y almacenados el tiempo de 1, 2, 3 y 4 semanas o más si es necesario a las siguientes condiciones ambientales descritas en la Tabla 16:

Tabla 16: Condiciones de almacenamiento para la determinación de la estabilidad del analito en solución

Condición	- 20 °C	+ 4 °C	+ 20 °C
Oscuridad	10 alícuotas	10 alícuotas	10 alícuotas
Luz			10 alícuotas

Fuente: Decisión de la Comisión europea 2002/657/EC.

Cada semana se tomó de los tubos almacenados en las condiciones descritas una alícuota de 0.600 mL de la solución de estándares y se lo vertió en un tubo de vidrio de 30 mL, luego se procedió adicionar 0.600 mL de la solución de 25 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de los estándares internos de NIZs recién preparada, a esta mezcla se realizó una evaporación por secado con nitrógeno a una temperatura de 50 °C , al finalizar el secado se reconstituyó con 0.500 mL de H₂O:ACN (95:5) para obtener una concentración final de 3.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de los analitos de NIZs, que es el límite mínimo de funcionamiento exigido (MRPL), luego se procedió a la lectura en el LC-MS/MS.

Además para realizar una comparación más real y a las condiciones de cada semana del equipo LC-MS/MS se preparó un tubo con solución fresca de los estándares de NIZs a la concentración de 3.0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; el ensayo de estabilidad se realizará hasta que se observaron los primeros fenómenos de degradación durante la identificación o cuantificación de los analitos.

Se deberá calcular la concentración del analito en cada alícuota tomando como valor 100% la solución del analito recién preparado en el momento del análisis:

$$\text{Resto del analito (\%)} = \frac{C_i \times 100}{C_{\text{fresco}}}$$

C_i = concentración en el momento

C_{fresco} = concentración de la solución recién preparada

2.3.1.3.2. Estabilidad del analito en la matriz

Homogenizar 100.0 ± 5.0 g de matriz blanco de tejido de camarón a partir de esta masa se dividirá en alícuotas de 5.0 ± 0.50 g en tubos de polipropileno de 50 mL, a cada tubo se fortifico con 0.600 mL de la solución de estándares de NIZs de concentración de $25.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para obtener una concentración final de $3.00 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de los analitos de NIZs y se los almacenará a la oscuridad a una temperatura de -20 °C. Cada semana se tomó un tubo con la matriz fortificada y se procedió a realizar la extracción con el método seleccionado. A la par se pesará en un tubo de polipropileno 5.0 ± 0.50 g de matriz de tejido de camarón y se fortificará con solución de estándares fresca a la misma concentración que servirá de referencia para comparar con el tubo de matriz almacenada.

La prueba de estabilidad del analito en la matriz durará el tiempo necesario hasta que se observaron los primeros fenómenos de degradación durante la identificación o cuantificación.

2.3.1.4. Robustez

La robustez de un método analítico es una medida de resistencia al cambio o capacidad de permanecer inalterado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal [41] y su efectividad de desempeño aun inclusive sin una implementación perfecta.

El ensayo de robustez nos permite identificar las variables que tiene el efecto más significativo y en base a ello, controlarlas cuidadosamente cuando se aplica el método en el trabajo de rutina. Además nos permite reconocer las mejoras que se pueden realizar sobre aquellas etapas del método analítico que se saben, que son críticas.

En las prueba de ensayo de robustez se utilizó la introducción deliberada por el laboratorio de variaciones menores razonables e importantes

y la observación de sus consecuencias; para la realización de este ensayo se efectuaron variaciones en dos aspectos del método de ensayo de los analitos de NIZs:

2.3.1.4.1. Método Cromatográfico:

- Efecto del cambio de columna
- Efecto del cambio de flujo

2.3.1.4.2. Método de extracción

- Extracción líquido –líquido vs. extracción en fase sólida (SPE)
 - Efecto de la temperatura de evaporación o concentración de las muestras: a matriz blanco de tejido de camarón se fortifico con estándares de NIZs para obtener una concentración de $3.00 \mu\text{g.kg}^{-1}$; y se procedió a la extracción con el método seleccionado; y en la etapa de concentración por medio de evaporación con flujo de nitrógeno a una temperatura de $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - Efecto de la disminución de sales de sodio: a matriz blanco fortificado con $3.00 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de nitroimidazoles, en que se procedió a realizar la extracción disminuyendo la cantidad de sales de sodio.

En los ensayos para robustez algunas de las pruebas fueron identificadas y realizadas como parte del desarrollo del método, como las señaladas con las viñetas de ➤, y su ejecución se efectuó de acuerdo a lo descrito en los apartados: 2.2.4.2 Optimización de las condiciones cromatográficas y el ítem 2.2.4.3 Optimización del método de extracción en matriz. En el resto de las pruebas se realizaron durante el proceso de validación del método.

Luego de realizados los ensayos se procederá a determinar si estos factores influyen significativamente en los resultados de la medición por medio del estudio del tiempo de retención, área de los picos, cuantificación de los

analitos de NIZs y la comparación con matrices fortificadas a las condiciones normales y estandarizadas del método analítico de NIZs desarrolladas a la par con las pruebas de ensayo modificadas.

2.3.1.5. Exactitud

Se puede definir a la exactitud como la cercanía o concordancia de un resultado de un ensayo analítico al valor verdadero o de referencia aceptado [42]. De acuerdo a este criterio la validación de un método permite determinar cuantitativamente la exactitud de los resultados evaluando los efectos sistemáticos como los aleatorios, es por esto que se realiza el estudio en dos de sus componentes que son: La Veracidad y la Precisión.

Además de la veracidad y la precisión, adicionalmente se realizará el estudio de la incertidumbre de la medida, que de acuerdo al VIM (Vocabulario Internacional de términos básicos y Generales en Metrología) “*es un parámetro asociado con el resultado de una medición, que permite caracterizar la dispersión de los valores que podría ser atribuidos razonablemente al mesurando*” [43].

2.3.1.5.1. Veracidad/Recuperación

La Veracidad en un método de ensayo es el grado de concordancia que puede existir entre la media de un conjunto de resultados respecto al valor real. Puede ser expresada en términos de sesgo que es “*la diferencia entre el resultado del ensayo esperado y un valor de referencia aceptado*”. [42]

Para determinar de forma práctica este componente de la exactitud es necesario de material de referencia certificado (MRC), al que se le ha determinado o asignado una concentración de analito especificado, este material debe ser lo más cercana a la matriz y a la concentración de interés.

Si en la práctica no se dispone de MRC, se acepta como método alternativo una valoración de la veracidad por medio de la recuperación que consiste en la adición de patrones de referencia o estándares a muestras blancos de matriz.

Para el estudio de veracidad en este proyecto de investigación, se utilizará un material de referencia certificado (MRC), ERM-BB124, este material fue provisto por Materiales de Referencia Europeos (ERM) (Bélgica), de acuerdo al certificado de análisis este material posee los analitos de RNZ, MNZ, HMMNI, el nivel de contracción se encuentran detallados en la **Tabla 17**.

Tabla 17: Valor certificado de la concentración de los analitos de NIZs en el MRC ERM-BB124

NIZs en el material reconstituido	Valor Certificado $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Incertidumbre $k=2$ $\mu\text{g.kg}^{-1}$
Ronidazoles (RNZ)	2.09	0.25
Metronidazol (MNZ)	1.93	0.15
2-Hidroxi metronidazol (HMMNI)	0.69	0.09

Al no estar presentes todos los analitos de nitroimidazoles de interés es necesario recurrir al método alternativo de Recuperación, para poder determinar este componente de exactitud, es necesario que la prueba abarque a todo el rango de trabajo o función respuesta, por este motivo se realizará pruebas de recuperación en por lo menos en tres niveles de concentración a 0.50 - 3.00 - 7.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (alto, medio y bajo); en cada nivel se enriquecieron seis réplicas de matrices blanco a la concentración de interés. Esta prueba será realizada por dos analistas. [7].

Se determinará la veracidad o recuperación en términos de la desviación en porcentaje entre la fracción de masa medida, determinada experimentalmente, y el valor asignado o enriquecido en el nivel de interés.

$$\%Veracidad \text{ o Recuperación} = 100 \times \frac{\text{Contenido medido}}{\text{Valor asignado o enriquecido}}$$

2.3.1.1. Precisión: Repetibilidad/Reproducibilidad

A la precisión se define como “grado de concordancia entre los resultados de ensayo independientes obtenidos en condiciones estipuladas (predeterminadas). La precisión suele expresarse como impresión y calcularse como desviación estándar de los resultados de ensayo. Cuanto mayor es la desviación menor es la precisión” [42].

La precisión puede expresarse en términos de Repetibilidad que es la precisión en condiciones de Repetibilidad, esto quiere decir que son resultados de análisis independientes que se obtienen de un mismo método que se ejecuta por un solo analista, en ítems de ensayo idénticos, en el mismo laboratorio utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo, un ejemplo típico de este tipo de variabilidad que es la que se espera al analizar por duplicado una muestra. [44]

Otro término en que puede expresarse la precisión es en condiciones de Reproducibilidad (intra-laboratorio), o precisión intermedia, en que los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método de ensayo, idénticas muestras, en el mismo laboratorio con operadores o analistas diferentes.

Para este proyecto de investigación se determinará la precisión del método de ensayo por medio de blancos de muestras fortificadas en al menos tres niveles de concentración a 0.50-3.00-7.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de los analitos de NIZs, en cada nivel se realizó seis mediciones bajo condiciones de Repetibilidad y Reproducibilidad intermedia por medio de dos analistas. En cada nivel se calculará la concentración de cada muestra, y los estadísticos de concentración media, desviación estándar y coeficiente de variación en porcentaje (%CV) para cada nivel en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad [7].

Además del coeficiente de variabilidad se determinará la precisión por medio de una Análisis de Varianza o Estudio de ANOVA que permite medir el efecto cuantitativo de las variables de influencia sobre los resultados de un

método de ensayo, este estudio consiste en el análisis simple de varianza de las desviaciones estándar para cada nivel de ensayo, en condiciones de normalidad y homogeneidad de las varianzas. [44], [45], [46], [47], [48].

2.3.1.2. Concentraciones Críticas

2.3.1.2.1. Límite de decisión (CC_{α})

El límite de decisión de acuerdo a la decisión 2002/657/CE [7] establece “que es el límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error α que una muestra no es conforme, siendo el error α la probabilidad de que la muestra analizada sea realmente conforme, aunque se haya obtenido una medición no conforme”. El CC_{α} es usado como un umbral para poder estimar la sospecha, en especial para las sustancias en que están prohibidos su uso.

En un método analítico que es confirmatorio es necesario determinar el valor de CC_{α} como el valor contra el cual se debe confrontar el resultado de una medición para decidir si se detecta la presencia de un analito en una muestra, con un determinado nivel de confianza [49]. Si la sustancia detectada en la muestra está por encima del CC_{α} del método de ensayo, esta debe ser declarada no conforme, y para realizar esta declaración se debe cumplir con la condición de que el analito sospechoso cumpla con los criterios de identificación establecidos en la decisión 2002/657/CE [7].

2.3.1.2.2. Capacidad de detección (CC_{β})

La capacidad de detección de acuerdo a la decisión 2002/657/CE [7] establece “que es el contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con error β ; siendo el error β la probabilidad de que la muestra analizada sea realmente no conforme, aunque se haya obtenido una medición conforme”.

Estos límites críticos deberán establecerse según los requisitos de identificación más cuantificación [7], mediante el procedimiento de curva de calibración, de conformidad con la norma ISO 11843 [50], [51].

Para realizar la determinación de los límites críticos CC_{α} y CC_{β} se utilizará material blanco enriquecido hasta el límite de funcionamiento mínimo exigido (MRPL), en el caso de los nitroimidazoles es de $3.00 \mu\text{g.kg}^{-1}$, y además se fortificarán en niveles por encima y por debajo del MRPL, en incrementos equidistantes. Se analizarán las matrices fortificadas y se delimitará la señal frente a la concentración añadida. El límite de decisión será igual a la concentración correspondiente a la ordenada en el origen más 2.33 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intra-laboratorio de la ordenada en origen. Esto sólo se aplica a análisis cuantitativos ($\alpha = 1 \%$), y la capacidad de detección será igual a la concentración correspondiente al límite de decisión más 1.64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intra-laboratorio ($\beta = 5 \%$), del contenido medido en el límite de decisión. Las fórmulas estadísticas que permiten calcular estos límites críticos se describen en la norma ISO 11843 son las siguientes:

$$CC_{\alpha} = t(\alpha, IJ - 2) \cdot \frac{\hat{\sigma}}{\hat{b}} \cdot \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{IJ} + \frac{\hat{x}^2}{\sum (x_y - \hat{x})^2}}$$

$$CC_{\beta} = \delta \cdot \frac{\hat{\sigma}}{\hat{b}} \cdot \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{IJ} + \frac{\hat{x}^2}{\sum (x_y - \hat{x})^2}}$$

Inyección por muestra	=	K=L
Inyección por nivel	=	J
Niveles de calibración	=	I
Muestras por nivel	=	J
t de Student	=	$t(\alpha, IJ - 2)$
Pendiente	=	b
Residual SD f. regresión	=	$\hat{\sigma}$
CC_{β} a partir del CC_{α}	=	δ

2.3.1.3. Estimación de la Incertidumbre de Medida

La palabra incertidumbre tiene como significado “duda”, lo que en nuestro caso, en las mediciones analíticas significa “*la duda acerca de la validez del resultado de medida, así como la exactitud del resultado*” [52].

La definición otorgada por el VIM [43] a la incertidumbre es: “*Un parámetro asociado con el resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser atribuidos razonablemente al mesurando*”. Lo que significa que la incertidumbre de un método de ensayo, es un intervalo de valores en que se cree que puede estar atribuido en forma razonable al mesurando, este parámetro nos ayuda a evaluar la calidad de los resultados, con una confiabilidad de un 95% aproximadamente [53].

Los laboratorios que tienen métodos validados deben de estimar la incertidumbre, por medio de la identificación de los componentes o fuentes que están presentes durante la medición y estos pueden ser evaluados por dos tipos de métodos o clases de fuentes:

- Incertidumbre tipo A: Evaluación de una fuente por un análisis estadístico de una serie de mediciones u observaciones. Como por ejemplo desviaciones estándar de repetibilidad y reproducibilidad, cálculos de la curva de calibración.
- Incertidumbre de tipo B: Evaluación de una fuente de incertidumbre realizada por otros medios distintos a los del tipo A. Puede basarse a la evaluación de las informaciones obtenidas de certificados de calibración, bibliografía, datos del fabricante de equipos u otro medio [44].

La estimación de la incertidumbre de medida se basa en cuatro pasos (**Figura 19**), el primero es la determinación de la fuentes (tipo A o B), el segundo paso es expresarla como una desviación estándar que se conoce como incertidumbre estándar(u), luego el tercer paso es combinar las desviaciones en una incertidumbre total, a la que se denomina incertidumbre estándar combinada, no es otra cosa que la raíz cuadrado de la varianza total

que se obtiene de cada varianza que se aplica la ley de propagación y el cuarto paso es el cálculo de la incertidumbre expandida (U), que se obtiene multiplicando por un factor de cobertura k con un nivel de confianza de aproximadamente el 95%, esta incertidumbre expandida establece un intervalo entorno al resultado de la medición en el cual se cree que está el valor del mesurando [52], [54].

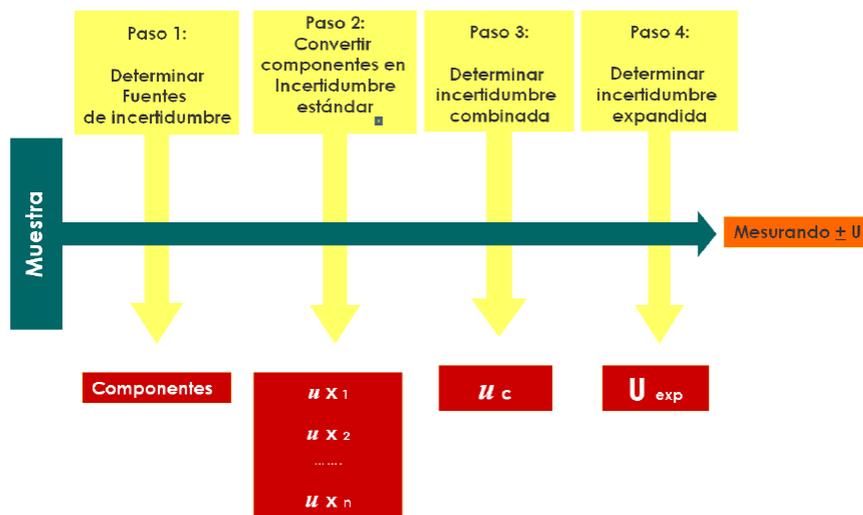


Figura 19: Proceso de estimación de la Incertidumbre de medida. Fuente: [44]

2.3.2. Muestreo y análisis de Muestras Reales

2.3.2.1. Selección del área de muestreo

En el Ecuador la producción de camarón de acuicultura, se concentra principalmente en la región costera del país (89%), esta producción se encuentra distribuida en las provincias de El Oro con 40.7%, Guayas con 40,1% y Manabí con el 8.5%. En estos sectores en que se promueve básicamente el valor agregado bruto (VAB) del sector camaronero, esta se ve beneficiado porque estas zonas productivas presentan un clima tropical sub-húmedo, con estación seca desde los meses de mayo a noviembre, y también una estación lluviosa de diciembre a abril, estas condiciones climáticas son las ideales para el cultivo de camarón [55].

El área de estudio seleccionado para este proyecto de investigación fue la Provincia del Guayas debido a las facilidades de logística que presentaban durante el tiempo en que se desarrolló este proyecto. Su capital es el ciudad de Guayaquil, el mayor centro financiero y comercial de la República del Ecuador, así como el mayor centro industrial; con sus 3.5 millones de habitantes, Guayas es la provincia más poblada del país.

El sector acuicultor en Guayas se encuentra distribuido en la zona costera, Golfo de Guayaquil y la zona cercana al manglar y esteros de la provincia; conformada por el sector de laboratorios de maduración, piscinas camaroneras, y emparadoras de camarón.



Figura 20: Sector camaronero de la Provincia del Guayas.
Fuente: Google Maps, Elaborado por el autor

2.3.2.2. Recolección de las muestras y almacenamiento

El muestreo fue realizado por el personal del departamento de Verificación del INP, y de acuerdo al Plan de Monitoreo de Residuos [9] desde el mes de mayo de año 2012 a abril de 2013. Las muestras fueron recolectadas de la misma forma que las muestras oficiales, en fundas plásticas selladas, identificadas con el nombre de la empresa, las misma fueron almacenadas en congeladores del área de frio del INP a una temperatura aproximada de -20 °C.

De cada muestra de camarón cultivado recolectada, se tomarán alrededor de 250 g, a esta porción de muestra se le descartará el exoesqueleto del camarón, y se seleccionará la porción comestible del músculo del abdomen del camarón el cual se procesará en una licuadora Osterizer hasta formar una masa homogénea, y esta masa se almacenará en fundas plásticas herméticas que contienen el nombre del sector de la provincia del cual provienen, el código de recepción de muestra emitida por el INP y la fecha de ingreso en el laboratorio, si la muestra homogenizada no es analizada al momento, esta deberá ser almacenada a temperatura de - 20 °C, a la oscuridad.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Puesta a punto del Método analítico.

El objetivo principal de este proyecto de investigación es evaluar la presencia de residuos de nitroimidazoles en muestras de camarón por un método analítico validado de cromatografía líquida acoplado con espectrometría de masas tándem. Para llevar a cabo este objetivo es necesario desarrollar un método de análisis eficiente, confiable y que cumpla con los requisitos particulares de acuerdo a normativas internacionales y para el uso previsto que requiere el Instituto Nacional de Pesca.

En este capítulo trataremos las pruebas que se ejecutaron para poder obtener y seleccionar el método analítico que se usara para el análisis de las muestras recolectadas de camarón y además de los resultados obtenidos en la validación del mismo.

3.1.1. Optimización de las condiciones de espectrometría

Las primeras pruebas de caracterización espectrométrica de los analitos de nitroimidazoles fueron tratadas en el capítulo anterior, y valores obtenidos fueron resumidos en la **Tabla 8**.

El primer cambio que se decidió realizar fue el de disminuir el tiempo del Dwell de 0.50 s a 0.20 s. El Dwell es un parámetro del espectrómetro de masas que sirve para medir la cantidad de tiempo, en segundos en que el analizador va estar adquiriendo información de monitoreo de un determinado ion [30] y así obtener el número suficientes de puntos de adquisición de

información para la formación de la señal del para formar los picos cromatográficos.

Con los cambios efectuados, se procedió a inyectar un vial con las mezcla de estándares externos e internos de NIZs de concentración de $1.00 \mu\text{g.kg}^{-1}$, al revisar los cromatogramas se observó una mayor simetría de los picos y que estos guardaban una mayor similitud a la forma gaussiana y que los valores de áreas de los picos cromatográficos eran similares entre los Dwell de 0.50 y 0.20 s seleccionados en las pruebas (**Figura 21**) pero al revisar la altura que presentaban los picos cromatográficos, se observó un incremento considerable en especial en los analitos de DMZ, HMMNI y IPZ (**Figura 22**).

Este aumento de la señal en la altura será de beneficio para la integraciones futuras de los cromatogramas y la obtención de límites de detección más bajos, ya que esto permite incrementar la señal/ruido de los analitos y que tiene mucho interés en las concentraciones menores y en especial si se requiere priorizar el factor de sensibilidad instrumental en los nitroimidazoles que son antibióticos prohibidos.

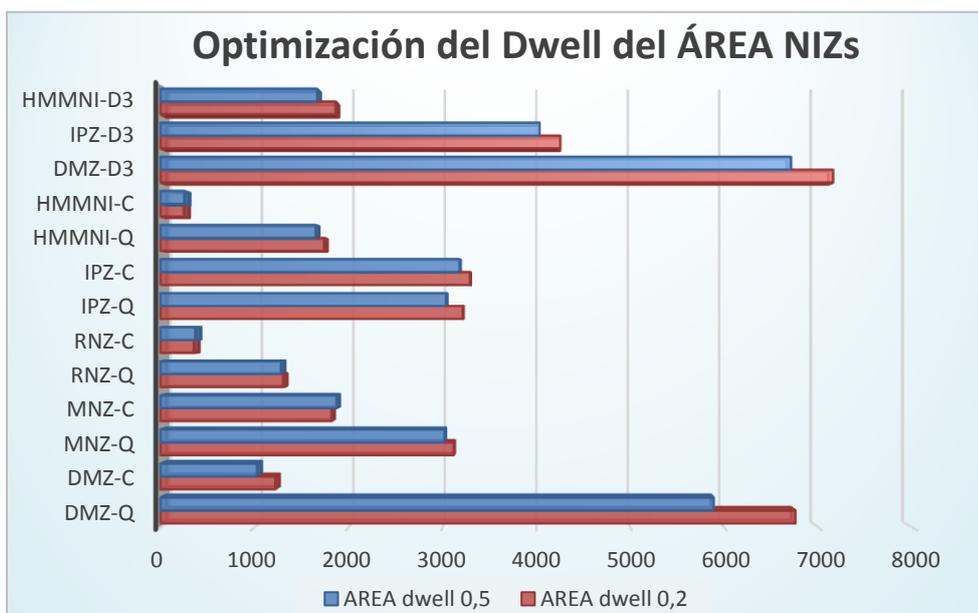


Figura 21: Comparación de las áreas de los picos cromatográficos de NIZs al optimizar el valor del Dwell.

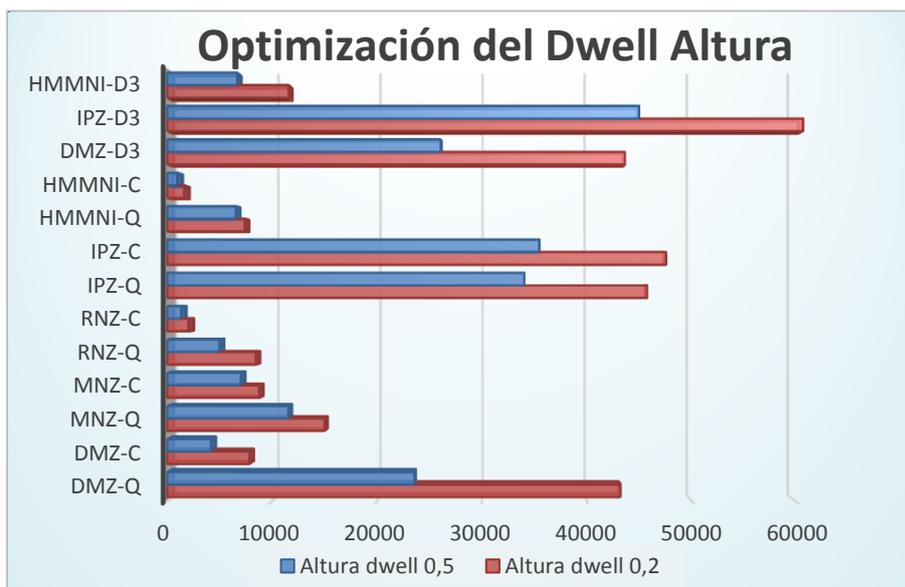


Figura 22: Comparación de la altura de los picos cromatográficos de NIZs al optimizar el valor del Dwell.

El Dwell es un factor analítico que interviene en la sensibilidad instrumental de los analitos y este factor depende además de la cantidad de iones que el espectrómetro de masas monitorea de forma simultánea, es por este motivo que se decidió realizar un cambio más que fue de trabajar en cinco canales de monitoreo de reacción múltiple (MRM) en vez de uno y en tiempos diferentes de acuerdo al tiempo de retención de cada analito de NIZs; para que así el analizador monitoree de forma selectiva un menor número de iones por canal.

Al evaluar los cromatogramas con respecto a las áreas y alturas de los picos de NIZs se detectó un incremento considerable en ambas características y especialmente en la altura de los picos cromatográficos, todos los analitos de NIZs demostraron una mejora en la relación señal/ruido, es especial al DMZ e IPZ que poseen tiempos de monitoreo de rango de 5.25-6.25 min y 6.90-8.00 min respectivamente y por estos beneficios se decidió cambiar el monitoreo de un canal a cinco canales (**Figura 23** y **Figura 24**). En la **Tabla 18** se detalla las condiciones del MRM y de Dwell que fue seleccionado finalmente y con que se trabajó en este proyecto.

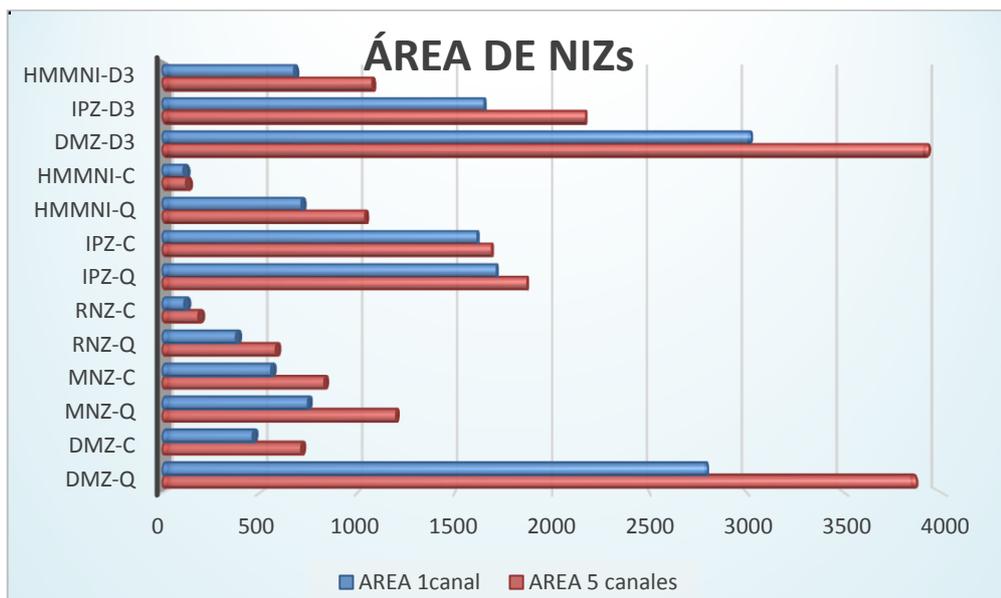


Figura 23: Comparación del área de NIZs con MRM de uno y cinco canales.

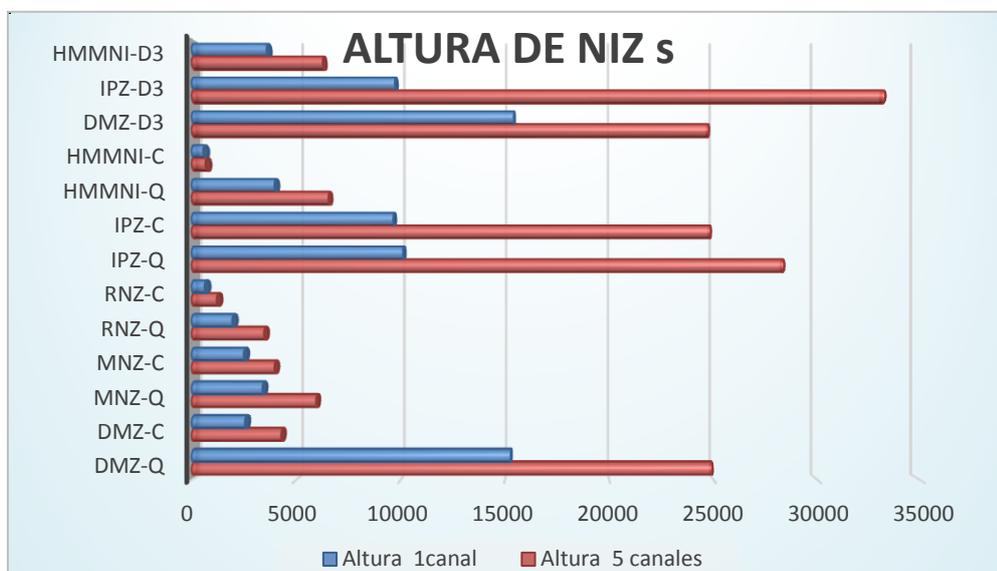


Figura 24: Comparación de la altura de los picos cromatográficos de Niz s con MRM de uno y cinco canales.

Tabla 18: Monitoreo de reacción múltiple (MRM) de 5 canales

NIZs	Prnt (Da)	Dau (Da)	Dwell (s)	Cono (V)	Colisión (eV)	Tiempo monitoreo (min)	tr (min)
Canal 1: MRM de 2 pares de masas							
MNZ	171.80	81.90	0.200	20.00	25.00	5.25	5.54
	171.80	127.90	0.200	20.00	15.00	6.25	
Canal 2: MRM de 3 pares de masas							
HMMNI	157.85	93.90	0.200	25.00	24.00	5.45 6.40	5.66
	157.85	139.90	0.200	25.00	12.00		
HMMNI-D3	160.85	142.95	0.200	25.00	12.00		

Canal 3: MRM de 2 pares de masas									
RNZ	200.85	55.00	0.200	20.00	25.00		5.60		5.76
	200.85	139.90	0.200	20.00	14.00		6.60		
Canal 4: MRM de 3 pares de masas									
DMZ	141.80	81.00	0.200	30.00	22.00		5.70 6.80		5.76
	141.80	95.90	0.200	30.00	15.00				
DMZ-D3	144.85	98.95	0.200	31.00	15.00				
Canal 5: MRM de 3 pares de masas									
IPZ	169.90	108.90	0.200	35.00	25.00		6.90 8.00		7.28
	169.90	123.90	0.200	35.00	18.00				
IPZ-D3	172.90	127.00	0.200	34.00	20.00				

Al no realizar más cambios a las condiciones de espectrometría, y al trabajar en el modo de MRM donde se monitorea dos iones de transición por cada analito de nitroimidazol fue necesario establecer el ion ratio o la relación entre las respuestas de los iones producto de cuantificación (Q) y confirmación (c), y de acuerdo a la Decisión 2002/6576/CE para el caso de las sustancias en el grupo A se deberá medir como mínimo un ion ratio y este debe estar dentro de las tolerancias máximas permitidas descritas en el cuadro 4 de dicha Decisión [7] (**Tabla 19**). Este ion ratio y sus tolerancias son seteados en el software Masslynx versión 4.1, y será un criterio para aceptar la identificación del analito de interés.

Tabla 19: Ion ratio de los analitos de NIZs, sus porcentajes de tolerancia y rangos mínimos y máximos seteados en el equipo del espectrómetro de masas

NIZs	DMZ	MNZ	RNZ	HMMNI	IPZ
Promedio n=20	5.47	1.64	3.43	7.64	1.05
%Tolerancia	30	20	25	30	20
Min.	3.83	1.31	2.57	5.35	0.84
Máx.	7.11	1.96	4.28	9.93	1.26

3.1.2. Optimización del método de extracción en matriz

Las primeras pruebas que fueron realizadas para seleccionar el método extractivo en matriz de tejido de camarón fue el de reproducir *in situ* la extracción descritas en las fuentes bibliográficas y que para este estudio se denominaron a estos métodos como Sigma [27], NaCl [28] y Na₂SO₄ [29], el

resumen de estas metodologías de extracción son mencionadas en el capítulo anterior en la **Tabla 13**.

La matriz blanco seleccionada para estas pruebas de extracción fue camarón silvestre de mar, matriz que no contiene residuos de ninguno de los antibióticos en estudio, además de que es la matriz blanco utilizado en el laboratorio para otras técnicas de análisis de residuos y para la realización de la curva de calibración fortificadas [10]. Se procedió a homogenizar a través de una licuadora alrededor de un kilogramo de tejido de camarón, que es almacenado a temperaturas inferiores a -10°C .

Con el tejido de camarón homogenizado se seleccionó la cantidad de matriz para cada método de extracción de acuerdo al peso que requería cada técnica, y se procedió a fortificar partir de una solución de $25.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de estándar interno de Dimetridazol- D_3 ; Ipronidazol- D_3 , y 2-Hidroxy Dimetridazol- D_3 , se obtuvo en cada matriz una concentración de $3.00 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de los nitroimidazoles deuterados. Además para evaluar las recuperaciones y la eficiencia extractiva también se fortifico con los estándares de $25.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de Metronidazol, Ronidazol, Ipronidazol, Dimetridazol y su metabolito hidroxilado 2-Hidroxy Dimetridazol, para obtener una concentración final en matriz de $3.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de los NIZs en estudio.

En los métodos seleccionados tuvieron en común la primera extracción con un disolvente orgánico polar que fue el acetonitrilo (ACN), que tiene afinidad con los analitos de interés (NIZs). Además de la característica de afinidad el disolvente que fue utilizado debe ser inmiscible con la fase acuosa y que sea fácilmente volátil para así facilitar su eliminación o separación por un proceso de evaporación, extracción acelerado, Soxhlet u otro medio que ayude a concentrar y separar el analito del disolvente.

En el método Sigma además de la extracción L/L, también se desarrolló una extracción en fase sólida con cartuchos de SupelMIP SPE, especializados para nitroimidazoles.

Los extractos de cada método de extracción fueron analizados a través del equipo de HPLC-MS/MS, y se evaluaron las áreas y la altura de los picos cromatográficos de cada nitroimidazol tanto en su ion de cuantificación como de confirmación.

Al comparar los resultados de los tres métodos de extracción, con igual concentración de NIZs en el tejido en todos los casos, se pudo determinar que el método donde se obtuvo mayor área (**Figura 25**) y altura (**Figura 26**) es el método de NaCl de la fuente bibliográfica “*Rapid multi-class multi-residue method for the confirmation of chloramphenicol and eleven nitroimidazoles in milk and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry*” [28].

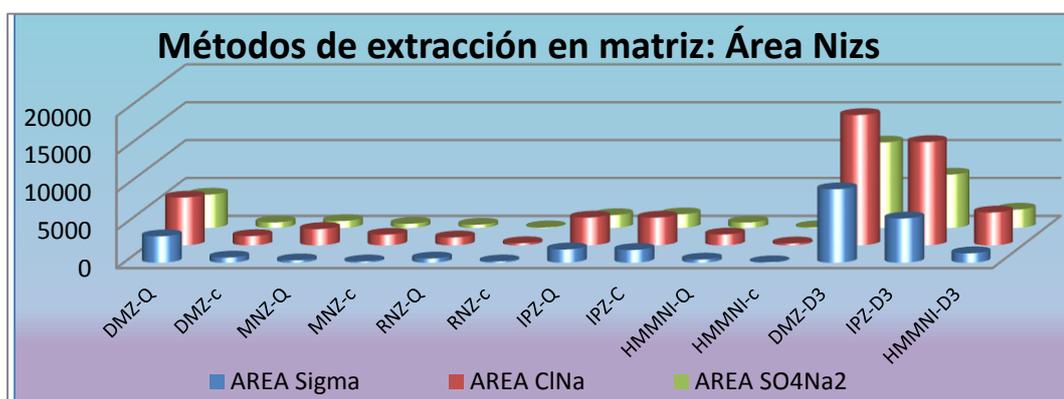


Figura 25: Comparación de las área de los picos cromatográficos de NIZs de los métodos de extracción en matriz Sigma, NaCl y Na₂SO₄

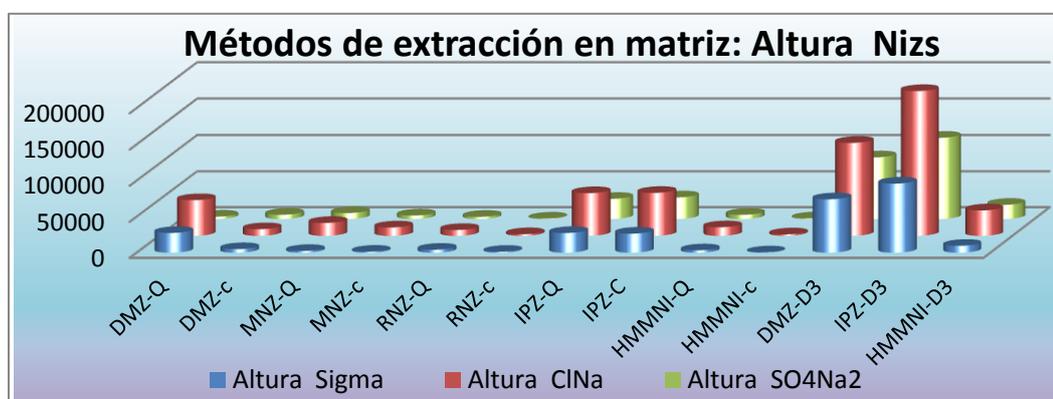


Figura 26: Comparación de la altura de los picos cromatográficos de NIZ s de los métodos de extracción en matriz Sigma, NaCl y Na₂ SO₄.

Se evidenció que para todos los analitos de nitroimidazoles presentaban una altura mayor en este método extractivo, lo que beneficio satisfactoriamente

la forma gaussiana de los picos cromatográficos, esto ayudará en el proceso de integración, además se observó elevados valores de señal instrumental de área y altura especialmente en el Dimetridazol, Ipronidazol de composición molecular normal y deuterada.

Los resultados adquiridos mostraron que de los tres métodos extractivos, el de Sigma con los cartuchos SPE especializados para NIZs, a pesar de que se obtuvo extractos más limpios y claros resultaron con recuperaciones menores con áreas de los analitos de NIZs de menor tamaño, a diferencia de los extractos del método de NaCl, que presentaban una ligera turbidez, pero con valores de área y altura mayores; esto evidenció que a mayor número de etapas de extracción aumenta la pérdida de los analitos durante el proceso en especial en los pasos de lavado de la SPE y pérdidas por deficiencia en la etapa de elución de los analitos.

Al método preseleccionado de NaCl, se procedió a optimizarlo y para ello se realizaron modificaciones al método original, como aumentar el peso de la muestra de un gramo a cinco gramos, y al aumentar la carga de muestra también se incrementó el volumen de acetonitrilo de dos a ocho mililitros. Este método está basado principalmente en la extracción L/L con acetonitrilo en un solo paso extractivo, para ayudar en la interacción del solvente con el tejido de camarón, se hidrató la muestra previamente con un mililitro de agua, luego se adicionó el solvente, se agitó vigorosamente y se incrementó el tiempo de contacto del solvente con la matriz a diez minutos.

Al tener estas modificaciones se realizaron pruebas extractivas para optimizar la extracción que permitan incrementar el efecto salino para una mejor separación de los analitos de Nitroimidazoles de la matriz de tejido de camarón por medio de dos pruebas una de ellas utilizar una combinación de sales de cloruro de sodio (NaCl) y sulfato de sodio (Na₂SO₄) anhidro en una proporción de 50:50 w/w, y la otra prueba es la de cambiar la sal de método de cloruro de sodio a solo sulfato de sodio anhidro.

Se procedió a fortificar matriz blanco a una concentración de $3.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ de estándar externo y deuterados de nitroimidazoles y se realizó las pruebas de extracción con las modificaciones detalladas anteriormente del método preseleccionado de NaCl, se obtuvieron las fases orgánicas de acetonitrilo que fueron evaporados con flujo de nitrógeno a una temperatura controlada de 45 a 50°C , y se reconstituyó el residuo con 500 μl de agua: acetonitrilo 95:5, si este extracto reconstituido presentaba turbidez se hizo necesario realizar una micro centrifugación a 15.000 rpm por 10 minutos, y se tomó la porción más clara y se procedió se pasar el reconstituido a través de un micro filtro de $0.22 \mu\text{m}$ de PVDF. El siguiente paso fue el análisis instrumental, por medio de la lectura en el HPLC-MS/MS por inyección de un volumen de 20 μL . Para poder realizar una comparación efectiva a la vez se corrió muestras blanco fortificadas con el método original de NaCl.

El comportamiento bajo estas condiciones de extracción fue diferente para los analitos de nitroimidazoles esto se evidenció en la **Figura 27**, por ejemplo, en el caso del Dimetridazol, que es uno de los analitos que presentan mayor respuesta instrumental, se observó que entre ambos métodos el de extracción original y de la modificación de la extracción con el cambio de la sal de NaCl a Na_2SO_4 anhidro no presentaron una diferencia significativa entre las recuperaciones y las áreas de este analito, a diferencia del Ipronidazol, que evidenció que en el método extractivo con Na_2SO_4 anhidro, se incrementó aún más la respuesta, obteniendo mayores valores de área tanto en el IPZ normal como el deuterado.

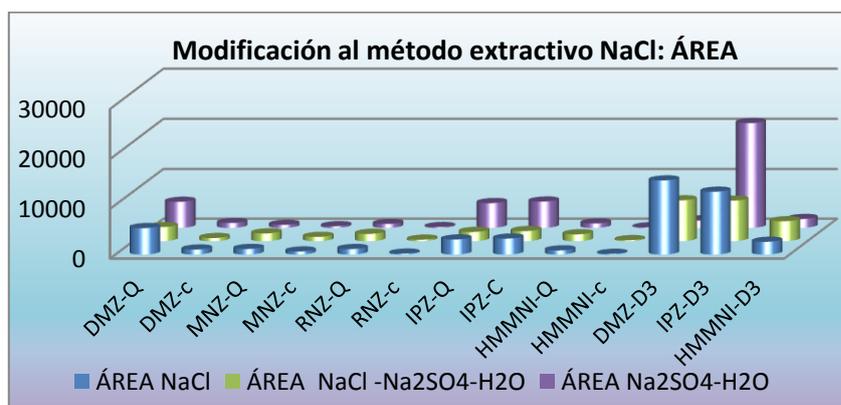


Figura 27: Evaluación de las áreas de NIZs obtenidas del método original y modificado de NaCl.

Se revisó las área de los analitos de los nitroimidazoles que presentan una menor respuesta analítica como el Metronidazol, Ronidazol y 2-Hidroxi Dimetridazol (**Figura 28**), se pudo evidenciar que existió una mayor respuesta en las área de estos analitos con el método modificado de la combinación de sales de NaCl y Na₂SO₄ anhidro en una proporción de 50:50 w/w, obteniéndose en estos analitos una mayor recuperación por poseer una área superior a la de los otros métodos probados. Al realizar la extracción se comprobó que el efecto salino por la combinación de las dos sales de sodio, incrementó la migración de los analitos de nitroimidazoles mas polares (MNZ, RNZ y HMMNI) al solvente orgánico de acetonitrilo, además se observó que la diferencia de la fases acuosa y orgánica fue más notoria, lo que permitió una mejor separación resultando ser más eficiente al método extractivo.

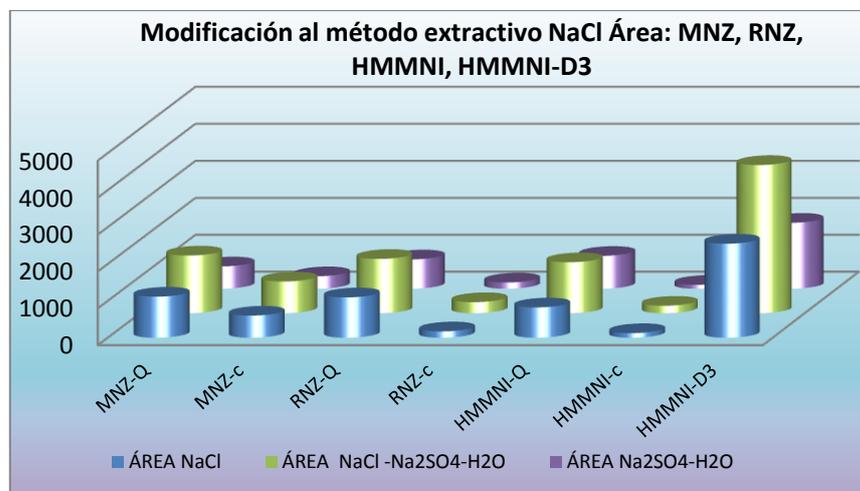


Figura 28: Evaluación de las áreas de MNZ, RNZ, HMMNI, HMMNI-D3, entre el método original de NaCl, y los modificados de NaCl - Na₂SO₄ y Na₂SO₄.

Al reevaluar los datos obtenidos y realizar el análisis del costo beneficio para determinar el método de extracción que se ajuste más a las necesidades de un método de cuantificación confirmatorio para la determinación de residuos de antibióticos, se decidió dar prioridad a los analitos de nitroimidazoles que poseen menor señal de respuesta analítica como son: MNZ, RNZ y HMMNI, es por este motivo que el método modificado con la combinación de sales de cloruro de sodio y sulfato de sodio anhidro (50:50 w/w) fue el método seleccionado. En la se esquematiza el proceso extracción utilizado en este proyecto de investigación.

Tabla 20: Etapas del método de extracción en matriz del método optimizado

Etapas	Método Extracción optimizado
Peso Matriz Camarón	5g matriz + 1 mL de agua grado HPLC, vortear para disgregar la muestra
Solvente extracción	8 LI ACN vortear x 10 min
Efecto Salino	4 g de una mezcla 50:50 W/W de NaCl y Na ₂ SO ₄ a cada una de las muestras, mezclar vigorosamente y vortear
Separación fase orgánica	Centrifugar a 5000 rpm por 10 minutos y transferir la fase orgánica a un vial y
Concentración	Evaporar a sequedad con flujo de N ₂ y Temperatura de 40-50 °C
Reconstitución del extracto	Reconstituir el residuo con 500 µl de agua: acetonitrilo 95:5 y agitar para disolver todo residuo
Limpieza del Extracto	Micro centrifugar a 15.000 rpm por 10 minutos.
Micro filtración	Pasar el extracto acuoso más claro con ayuda de una jeringa y filtrar a través de un micro filtro de 0.22 µm PVDF

3.2. Validación

Al finalizar la puesta a punto del método instrumental de HPLC-MS/MS, y el método de extracción en matriz, es necesario poner a prueba el funcionamiento del método analítico y así confirmar si son aptos para los fines previstos especialmente los especificados en la decisión de la comisión europea 2002/657/EC [7].

El objetivo de la validación de un método analítico es asegurar que los valores obtenidas de las mediciones futuras que se van a realizar de forma rutinaria sean lo suficientemente cercana al valor verdadero del analito contenido en la muestra [56].

3.2.1. Diseño experimental

De acuerdo a las directrices de normas internaciones como el CODEX, IUPAC, ISO, 2002/657/EC, se procedió a seleccionar los parámetros para

evaluar el desempeño del método analítico desarrollado en el proyecto de investigación, en la **Tabla 21** se detalla los objetivos mínimos que deben cumplir los parámetros o características de funcionamiento del método analítico de acuerdo a las normas y directivas internacionales que permitirán evaluar el desempeño de este método cuantitativo confirmatorio para residuos de antibióticos.

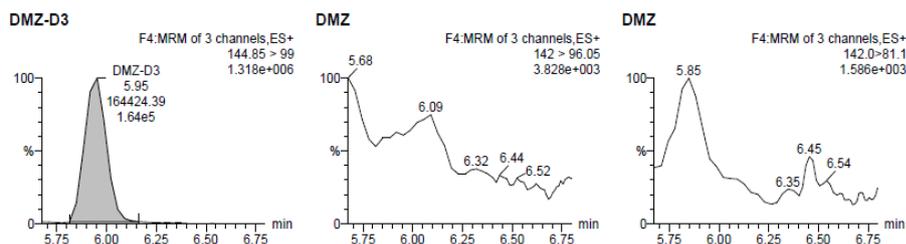
Tabla 21: Objetivos de validación y criterios establecidos para residuos de medicamentos de uso veterinarios

Parámetro de Validación	Objetivo	Criterio/Directiva/Normativa
Linealidad/Función respuesta	$r^2 \geq 0.98$	2002/657/EC
Veracidad/Recuperación	-50% a +20% ($< 1.00 \mu\text{g.kg}^{-1}$) -30% a +10% ($> 1.00 \mu\text{g.kg}^{-1}$)	2002/657/EC
Repetibilidad	$\leq 30\% \text{CV}$	Codex CX/RVDF 03/10
Reproducibilidad intra-laboratorio	$\leq 30\% \text{CV}$	Codex CX/RVDF 03/10
Límite de decisión (CC α)	$< 3.00 \mu\text{g.kg}^{-1}$ MRPL	2002/657/EC SANCO/2004/2726-rev 4
Límite de detección (CC β)	$\leq 3.00 \mu\text{g.kg}^{-1}$ MRPL	2002/657/EC SANCO/2004/2726-rev 4
Incertidumbre	$\leq 50\%$	Codex CAC/GL 59-2006

3.2.2. Selectividad / Especificidad

Para determinar esta característica de desempeño del método analítico se realizaron dos pruebas:

- Se analizaron 20 blancos matriz de tejido de camarón, en la evaluación de los cromatogramas se evidenció que no existe interferencias de la matriz en la región de interés de elución de los analitos de nitroimidazoles en sus transiciones de cuantificación y confirmación. **Figura 29.**



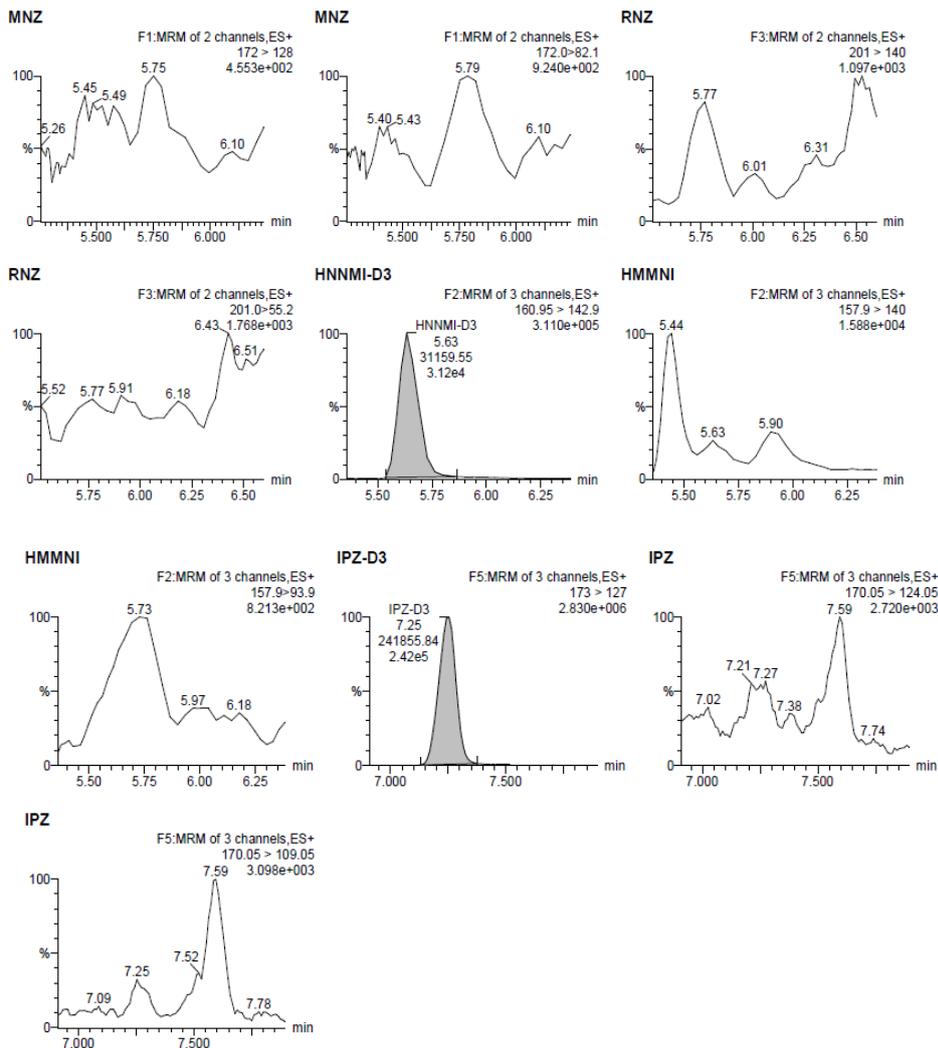


Figura 29: Cromatograma de blanco matriz de Niz s con estándar interno d $3\mu\text{g.kg}^{-1}$ de DMZ-D3, HMMNI-D3, IPZ-D3

- Se escogió como interferentes químicos a los metabolitos de nitrofuranos : furazolidona, furaltadona, nitrofurantoína, y nitrofurazona por ser compuestos químicos relacionados a los nitroimidazoles ya que ambos antibióticos poseen en su estructura química un anillo imidazólico y se procedió a enriquecer con ellas muestras blancos y matrices fortificadas de $3.00\ \mu\text{g.kg}^{-1}$ de NIZs en tejido de camarón a concentraciones adecuadas de los interferentes que puedan obstaculizar la identificación o cuantificación de los analitos [7], se evaluó los cromatogramas y se determinó que la presencia de los metabolitos de nitrofuranos no afectan la ionización y cuantificación de los analitos de nitroimidazoles, los valores

obtuvieron en concentración fueron de $3.00 \mu\text{g.kg}^{-1} \pm 20\%$, valores de concentración de NIZs que se encuentran dentro del margen de aceptabilidad (**Figura 30**).

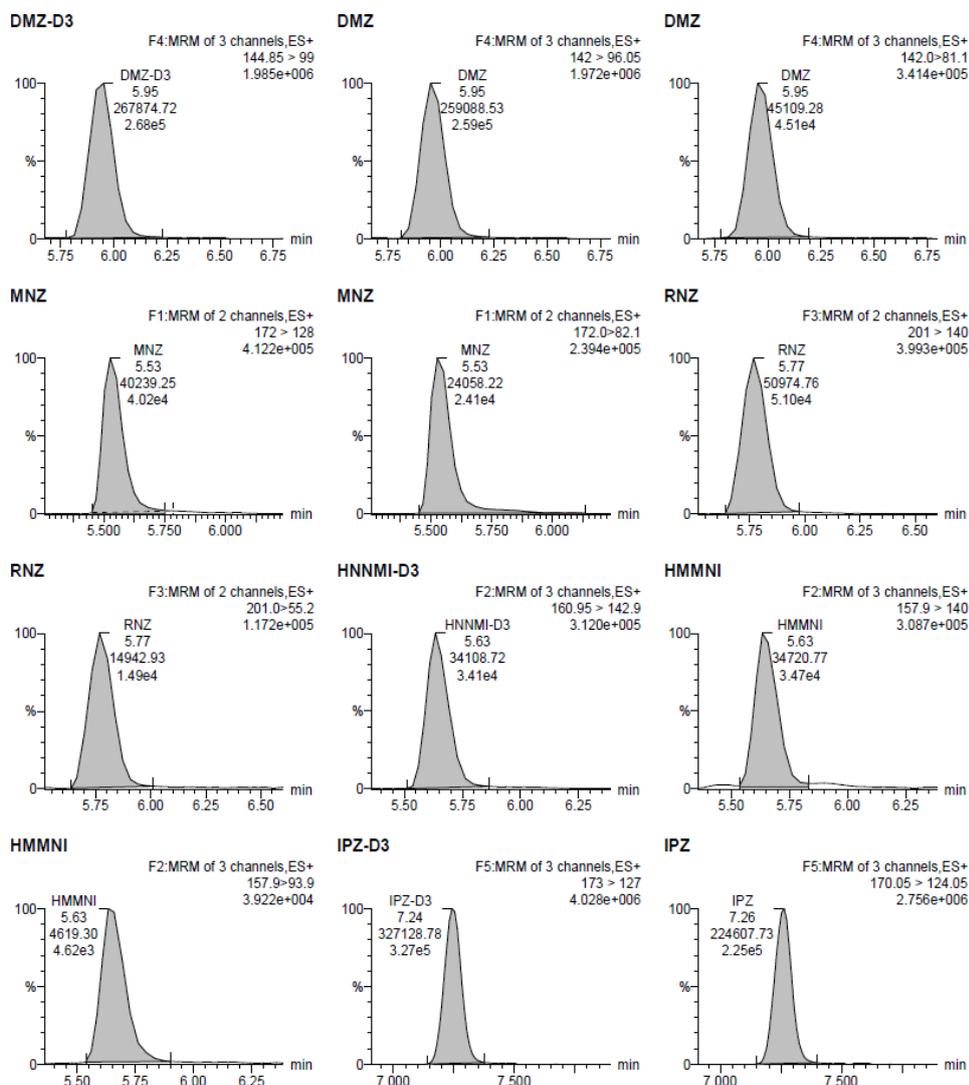


Figura 30: Cromatograma de matriz fortificada de NIZs con estándar interno de $3.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de DMZ-D3, HMMNI-D3, IPZ-D3 e interferentes de Nitrofuranos a $1.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

3.2.3. Función de respuesta / Linealidad.

La curva de calibración que fue utilizada es de 5 niveles de concentración de los analitos de NIZs más un blanco matriz de camarón ($BL-0.50-1.50-3.00-4.50-7.00 \mu\text{g.kg}^{-1}$) [7] y todos los niveles contenían una concentración de estándar interno que fue de $3.00 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (MRPL).

Para los estándares internos de DMZ-D3, HMMNI-D3 y IPZ-D3, el tipo de respuesta fue la de estándar externo (External Std) calculado a bases de sus áreas. El tipo de curva fue RF, es decir en base al factor de respuesta.

Para los estándares de DMZ, MNZ, HMMNI, IPZ, el tipo de respuesta fue relacionado con el estándar interno correspondiente para cada analito y fue calculada en base a la siguiente fórmula "Internal Std (St Int)= Área * (IS Conc../ IS Área)". En el caso de RNZ, y al no poseer estándar interno correspondiente se calculó como estándar externo de acuerdo a la señal o respuesta de su área, para todos los analitos la curva fue de tipo lineal, con origen excluido, ponderada 1/X.

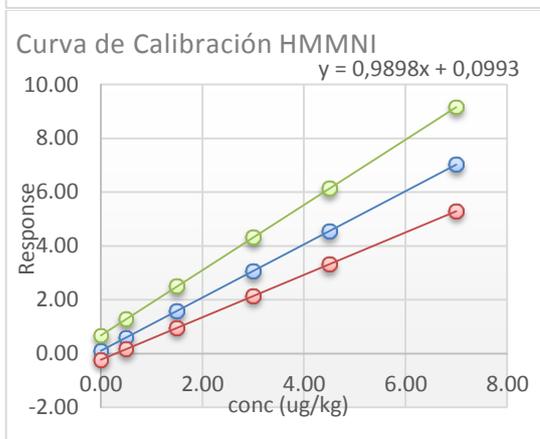
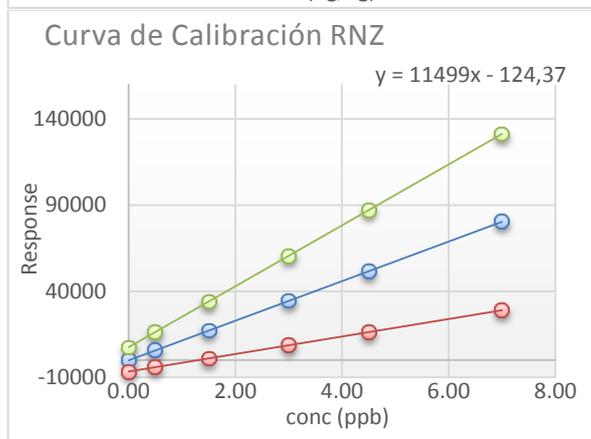
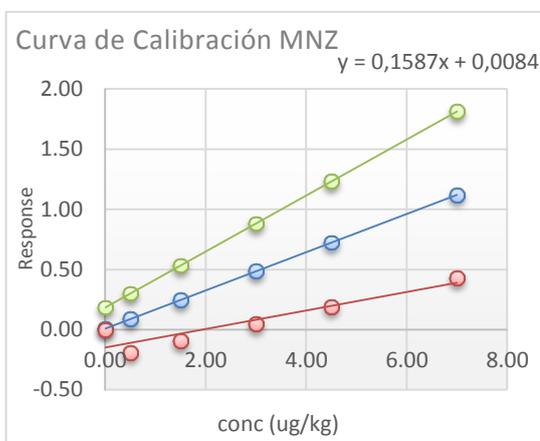
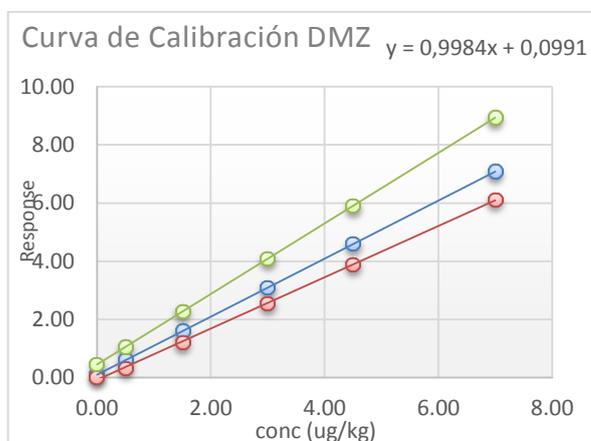
La función de respuesta del instrumento fue obtenida por regresión lineal ponderada 1/x de la respuesta instrumental versus la concentración de cada nivel de NIZs. El cálculo del grado de ajuste fue realizado a través del coeficiente de regresión (r^2), la pendiente, punto de corte, intercepto, residuales, estos datos estadísticos fue realizado por medio del software Masslynx versión 4.1 través de su módulo Quanlynx.

Además de la regresión lineal se debió determinar los márgenes de aceptabilidad de los parámetros de la curva como son pendiente (m) e intercepto (a), por medio de la desviación estándar de cada una de ellas (S_b y S_a), además se determinó el error tipo de la curva ($S_{y/x}$), James Miller en su libro "Estadística y Quimiometría para Química Analítica [57]" detalla de forma clara las formulas estadísticas necesarias y utilizadas en el proyecto, además se utilizó el software Excel versión 2010 para realizar los cálculos estadísticos correspondientes. Los valores de S_a y S_b fueron utilizados para estimar los límites de confianza, para la pendiente fue estimado por $b \pm t_{(n-2)} * S_b$, y en el caso del intercepto por $a \pm t_{(n-2)} * S_a$, estos fueron relacionados con valores de distribución de t que se obtuvieron con un nivel de probabilidad de 0.05 y de los grados de libertad (n-2).

Durante el periodo de estudio se seleccionaron diez curvas de calibración y se calcularon los parámetros de la curva (Tabla 22 y Figura 31) como el coeficiente de regresión lineal (r^2), error de la curva ($S_{y/x}$), y los límites de confianza de la pendiente e intercepto.

Tabla 22: Parámetros de las curvas de calibración y márgenes de aceptabilidad de pendiente e intercepto

NIZs	r^2	$S_{y/x}$	Pendiente (b)	Intercepto (a)	$b - t_{(3)} * Sb$	$a - t_{(3)} * Sa$	$b + t_{(3)} * Sb$	$a + t_{(3)} * Sa$	%CV $S_{y/x}$
DMZ	0.9994	0.0631	0.9984	0.0991	0.892	-0.1317	1.213	0.4487	6.3
MNZ	0.9905	0.0365	0.1587	0.0084	0.096	-0.2403	0.233	0.1832	23.0
RNZ	0.9940	2059.3	11498.6	-124.4	5093	-6669.8	17692.5	7406.2	17.9
HMMNI	0.99886	0.08487	0.98977	0.0993	0.789	-0.2331	1.213	0.6708	8.6
IPZ	0.9993	0.0455	0.7135	0.0890	0.567	-0.1090	0.981	0.4154	6.4



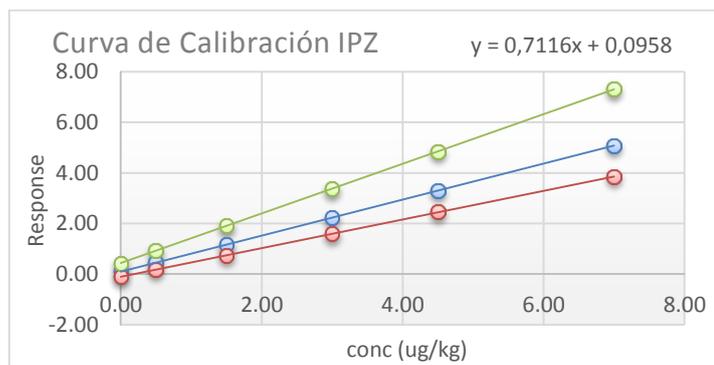


Figura 31: Curvas de calibración de los NIZs y sus márgenes de aceptabilidad.

Se evaluaron las curvas de calibración y se evidenció que para los analitos de MNZ y RNZ presentaron un mayor coeficiente de variación de la pendiente (23,0 % y 17,9 %) con proporción a los errores aleatorios o error tipo de la curva con respecto a la variable y , ($S_{y/x}$), y esto se debe que en el caso de MNZ se decidió utilizar como estándar interno a DMZ-D3, por poseer una estructura química similar, pero que no es igual, como es el caso del DMZ y su estándar interno DMZ-D3; al poseer estas diferencias el estándar interno no logró compensar las fluctuaciones de forma total que los errores que se produjeron durante el proceso de extracción e instrumental del método de análisis fueron mayores.

Esto ocurre de forma parecida con el RNZ, que al poseer una estructura diferente se decidió que no se va relacionar con ningunos de los estándares internos utilizados en el método de análisis, y al no poseer un estándar interno que ayude compensar los errores del proceso analítico, se produjeron de forma normal por la característica del análisis un porcentaje de dispersión mayor con respecto a los analitos que si trabajan de forma conjunta con sus estándares internos como son DMZ, HMMNI, IPZ que tuvieron coeficientes de variación menores al 10%.

3.2.3.1. Efecto Matriz:

Se estimó el efecto matriz que tuvo el tejido de camarón en el método de ensayo y se pudo determinar que existió una diferencia en la respuesta instrumental del analito al realizar las curvas de calibración en solución y en

matriz. Se detectó, que el comportamiento fue diferente en los analitos de nitroimidazoles, en el caso del RNZ en que el tipo de respuesta fue por estándar externo, se determinó que hay diferencia significativa en la pendientes de la curvas de calibración, y además existió un aumento en la sensibilidad en la curva que fue hecha en matriz blanco (**Figura 32**).

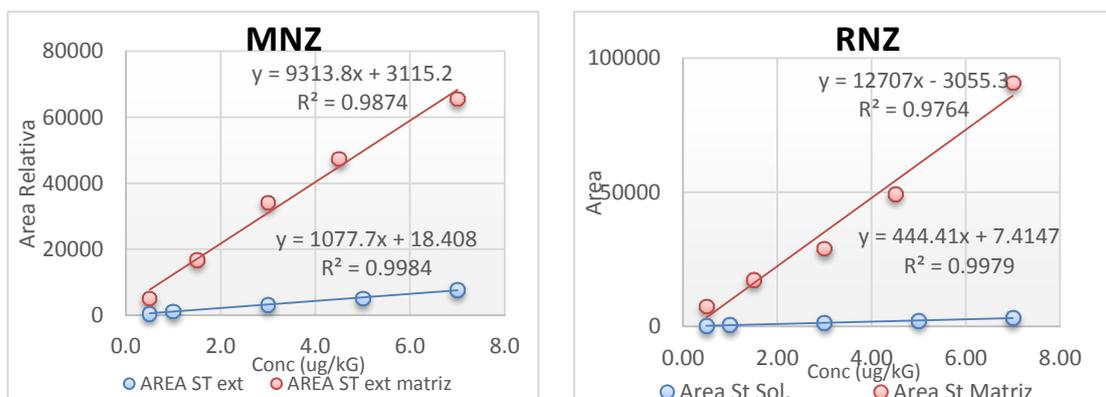


Figura 32: Curvas de calibración en solución y en matriz del MNZ y RNZ.

En la **Figura 33** se resume los factores de respuesta analítica que poseían los estándares internos de nitroimidazoles en solución y en matriz, con lo que se concluyó que la respuesta en matriz fue mucho mayor que en el analito en solución.

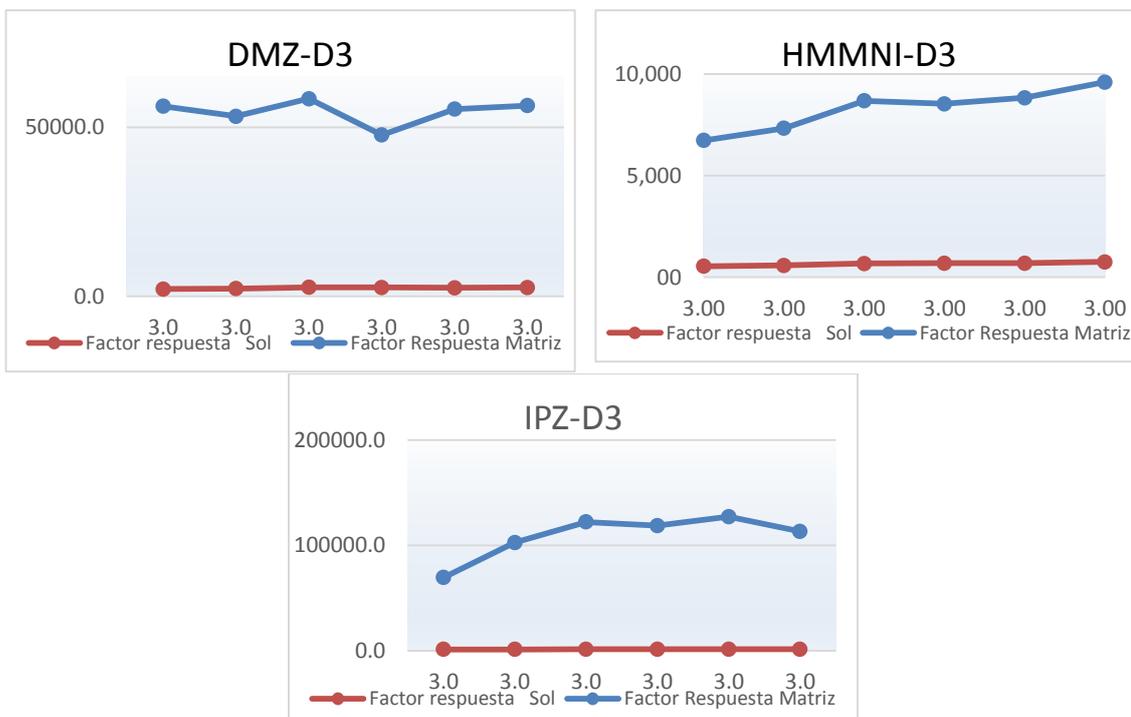


Figura 33: Factor respuesta de los estándares internos DMZ-D3, HMMNI-D3, IPZ-D3, en solución y en matriz.

Este efecto matriz se presentó especialmente en los compuestos orgánicos polares en los que se aplicaron calor para ionizar o inyectar la muestra para el ingreso al espectrómetro de masas, en nuestro caso la zona de la fuente es ejecutada por una ionización bajo la influencia de un campo eléctrico y de temperatura, este proceso produjo varios sitios activos que se encontraron en la superficies metálicas que fueron atribuidos a impurezas de metales presentes en el puerto de inyección o la fuente de ionización y además estos sitios activos también pudieron estar presentes en los grupos silanol libres en la superficie de la columna cromatográficos; estos sitios fueron responsables de la adsorción y/o descomposición catalítica de los analitos [39], [58].

Este fenómeno de mejora de la respuesta instrumental inducida por la matriz se debió ya que al inyectar los analitos junto a los componentes de la matriz se produjeron un proceso de competencia por los sitios activos presentes dejando libres una mayor cantidad de moléculas de analitos que ingresaron al sistema produciendo una mayor respuesta instrumental, proceso que no ocurrió al inyectar los analito en solución **Figura 34**.

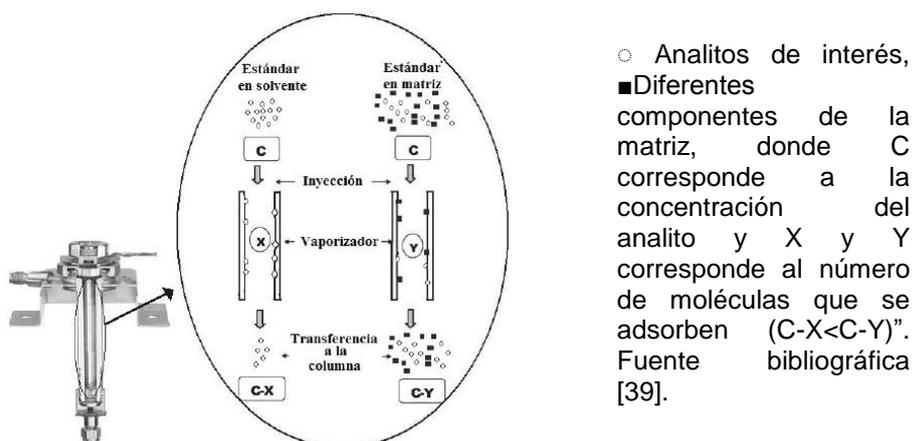


Figura 34: “Adsorción de compuesto en el vaporizador del inyector del espectro de masas.

El uso del estándar interno adecuado en la calibración ayudó a disminuir o eliminar, el efecto matriz, ya que compensó los errores aleatorios y sistemáticas producidos por las interferencias no espectrales de los componentes de la matriz, además de los errores provenientes del método

extractivo e instrumental, esta compensación fue reflejada en la rectas de calibración de DMZ, HMMNI, IPZ (**Figura 35**), que presentaron curvas que no poseían diferencias significativas entre las que se realizaron en solvente y en matriz, también se evidenció en los valores de pendiente que son muy parecidas en ambos casos.

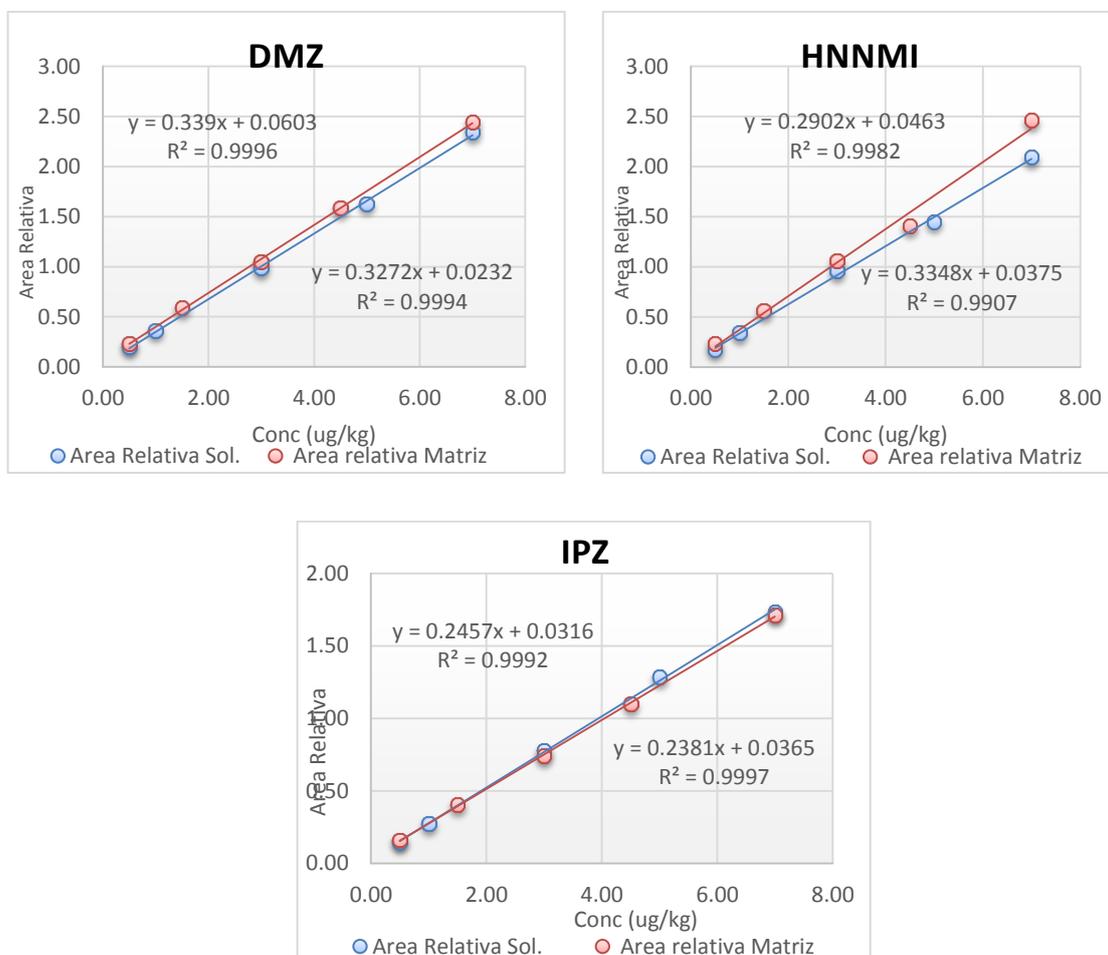


Figura 35: Curvas de calibración con estándar interno en solución y en matriz del DMZ, HMMNI, IPZ.

3.2.4. Estabilidad

3.2.4.1. Estabilidad en solución

Para poder evaluar este parámetro se procedió a leer en el equipo HPLC-MS/MS, soluciones estándar de los analitos de nitroimidazoles de acuerdo a lo descrito el apartado 2.3.1.3.1 para obtener una concentración de

25.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de los analitos de NIZs externos y a partir de este estándar se tomó una alícuota para obtener una concentración de 3.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, que es el límite mínimo de funcionamiento exigido (MRPL), las condiciones de almacenamiento fueron:

- Temperatura de 4 °C (refrigeradora) : 4 °C
- Temperatura ambiente a la luz: TAL
- Temperatura ambiente a la oscuridad: TAO
- Temperatura de -20 °C (congelador): - 20 °C.

Las pruebas de estabilidad en solución de los estándares de NIZs se realizaron de forma consecutiva por cuatro semanas, y al evaluar los datos se evidenció que no existen cambios significativos en el porcentaje de resto de analito, ya que para todos los analitos de nitroimidazoles bajo las diferentes condiciones de estudio de almacenamiento presentaron porcentajes mayores al 95% con respecto a la concentración del analito en solución de estándar fresca que se utiliza como control.

Al evidenciar que no existen cambios significativos, se procedió a continuar con la prueba por mayor tiempo, extendiéndolo a hasta diez semanas, en que se observaron los primeros fenómenos de degradación durante la cuantificación de los analitos. La condición de almacenamientos más desfavorable para los NIZs fue la temperatura ambiente a la luz y el analito que sufrió mayor degradación fue el MNZ.

Tabla 23: %Resto de analito en solución de DMZ, HMMNI, IPZ a diferentes condiciones de almacenamiento

NIZ s	DMZ				HMMNI				IPZ			
	%Resto Analito				%Resto Analito				%Resto Analito			
Tiempo	4 °C	TAL	TAO	- 20 °C	4 °C	TAL	TAO	- 20 °C	4 °C	TAL	TAO	- 20 °C
1 SEM	92	103	99	98	95	104	96	94	97	102	96	96
2 SEM	97	92	101	94	97	101	100	96	97	97	97	96
3 SEM	95	96	99	97	96	101	102	96	97	99	100	97
4 SEM	103	101	102	97	104	105	102	96	103	98	100	98
6 SEM	102	100	122	101	100	111	122	100	99	116	121	95
10 SEM	79	63	91	95	85	84	101	94	83	67	90	82

Tabla 24: %Resto de analito en solución de MNZ y RNZ a diferentes condiciones de almacenamiento.

NIZ s	MNZ				RNZ			
	%Resto Analito				%Resto Analito			
Tiempo	4 °C	TAL	TAO	- 20 °C	4 °C	TAL	TAO	- 20 °C
1 SEM	104	108	106	110	97	99	103	103
2 SEM	93	92	93	94	97	95	99	95
3 SEM	63	72	84	85	89	96	100	98
4 SEM	96	105	108	113	105	103	102	99
6 SEM	92	93	105	90	100	127	113	100
10 SEM	57	62	77	79	94	86	100	71

3.2.4.2. Estabilidad del analito en la matriz

De acuerdo a los datos que se obtuvieron durante estas pruebas (**Tabla 25**), se evidenció que los nitroimidazoles son compuestos orgánicos que persisten en la matriz de estudio durante un tiempo prolongado sin que sufran fenómenos de degradación, siempre que el almacenamiento se realice a temperaturas de -20 °C, que fue la temperatura normal de congelación en que se almacenaron las muestra de forma rutinaria en el laboratorio durante el periodo del proyecto.

El tiempo de estudio en que se realizó esta prueba fue de 12 semanas e inclusive en este tiempo se obtuvieron porcentajes de resto de analito mayores al 90% con respecto a la concentración de muestra control en matriz preparada al momento, esto nos ayudó a determinar que las muestras pueden ser almacenadas por periodos de tiempo de 3 a 4 meses antes de su análisis sin ninguna preocupación por la degradación de sus analitos.

Tabla 25: %Resto de analito en matriz de los NIZ s almacenadas a T ≤ -20°C

TIEMPO	% Resto del Analito				
	DMZ	MNZ	RNZ	HMMNI	IPZ
INICAL	100	100	100	100	100
1 SEM	89	68	110	73	88
2 SEM	99	92	76	92	98
3 SEM	90	96	101	91	92
4 SEM	94	33	97	96	98
6 SEM	99	102	101	100	96
12 SEM	97	93	104	90	87

3.2.5. Robustez

En cualquier método de ensayo habrá ciertas etapas las cuales, si no se lleva al cabo con suficiente cuidado, tendrán un efecto severo sobre el desempeño del método y pueden dar como resultado que definitivamente, el método no funcione. De esta manera es posible identificar las variables que tiene el efecto más significativo y en base a ello, controlarlas cuidadosamente cuando aplica el método. Cuando se requiere mejorar el método las mejoras se pueden realizar sobre aquellas partes que se sabe, son críticas. La robustez por lo general se evalúa durante el desarrollo del método.

Para poner a prueba la robustez del método desarrollado, se probaron ligeras modificaciones o variaciones que pueden darse lugar en el trabajo rutinario y que fue necesario determinar qué consecuencias pueden resultar de ellas para tener una idea de la confiabilidad a los cambios que puede alterar el método analítico y que pueden dar como resultado que el método no funcione.

Durante este proceso se realizaron dos modificaciones al método de extracción:

- **Efecto de la temperatura de evaporación** o concentración de las muestras: temperatura de 50 °C y 70 °C.

Se comparó las áreas de los analitos de NIZs con el método de extracción normal a 50 °C y el método extractivo modificado a 70 °C, se evidenció que los analitos de nitroimidazoles sufrieron de degradación térmica en especial el DMZ y el IPZ se obtuvieron en algunos casos pérdidas del analito hasta un 90% de sus áreas, las perdidos por degradación de todos los analitos pueden ser observadas en la **Figura 36** , por lo que es necesario que durante los análisis de rutina se controle que la temperatura de evaporación no sobrepase los 50°C .

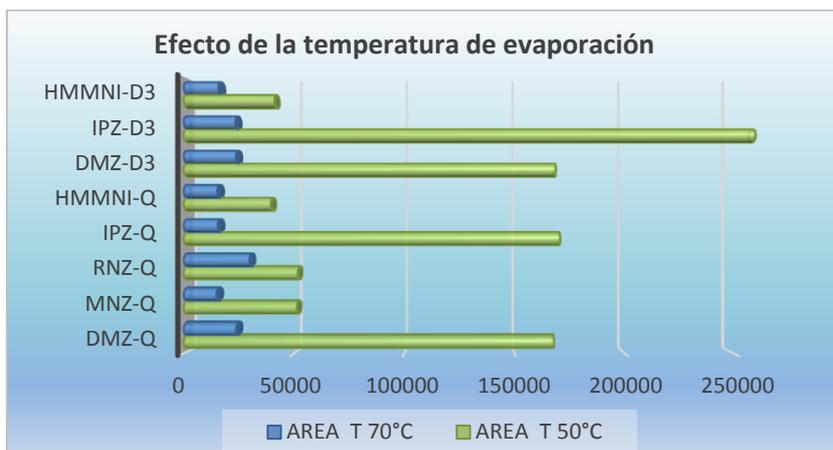


Figura 36: Efecto en el área de NIZ s por el cambio de temperatura de evaporación de 50 °C a 70 °C.

- **Efecto de la disminución de sales de sodio:** Extracción con 1 g y 4 g de Mezcla de cloruro de sodio y sulfato de sodio anhidro en una proporción de 50:50 w/w



Figura 37: Efecto de la concentración de los NIZs al disminuir las sales de 4g a 1g

Una disminución de los sales de cloruro de sodio y sulfato de sodio anhidro, afectó de forma considerable la recuperación de todos los analitos de NIZs, en especial para RNZ, MNZ, HMMNI, y esto se debió a pérdidas durante la extracción ya que al disminuir la sales, decrece de forma proporcional el efecto salino, y este resultado evitó la migración de las moléculas de Nizs trasladarse del tejido de la matriz que fue altamente acuoso al solvente de acetonitrilo ya que la solubilidad de los compuestos orgánicos en disoluciones acuosas saturadas con electrolitos fuerte es mucho menor que en agua y además de que complica la separación de la emulsión de fase acuosa y orgánica. (Figura 37).

3.2.6. Exactitud

3.2.6.1. Veracidad/Recuperación

Para determinar de forma práctica este componente de la exactitud se utilizó un material de referencia certificado (MRC), ERM-BB124, en matriz liofilizado de músculo de cerdo, este material provino de Materiales de referencia europeos (ERM), y es lo más parecido a la matriz en que trabajamos en este proyecto. Otra dificultad que tuvo este material es que además de su difícil adquisición, no tienen todos los nitroimidazoles de interés.

Al analizar este MRC se detectaron y cuantificaron tres nitroimidazoles que son RNZ, MNZ, HMMNI, se obtuvieron valores de veracidad de 75% y 81 %, valor que se encontraron dentro del margen de aceptabilidad de acuerdo a la Decisión 2002/657/EC.

Al no estar presentes todos los analitos de nitroimidazoles de interés, fue necesario recurrir al método alternativo de recuperación, en que se escogió porciones de matriz blanco de camarón en que se fortificaron en tres niveles de concentración de 0.50-3.00-7.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; valores que abarcaron todo el rango de trabajo y además estaban próximos al límite mínimo de funcionamiento exigido de 3.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (MRPL); en cada nivel se realizó seis réplicas y fueron realizadas por dos analistas. Los valores obtenidos de recuperación a partir de estas muestras fortificadas fueron del 91-105%. El resumen de los datos obtenidos de promedio, porcentajes de veracidad y recuperación son detallados en la **Tabla 26**.

Tabla 26: Valores de veracidad y recuperación obtenidos durante la validación

Nivel	0.50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$		3.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$		7.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$		MRC ERM-BB124		
	Promedio $\mu\text{g.kg}^{-1}$	% Recupe.	Promedio $\mu\text{g.kg}^{-1}$	% Recupe.	Promedio $\mu\text{g.kg}^{-1}$	% Recupe.	Valor asignado	Promedio $\mu\text{g.kg}^{-1}$	%Veracidad
DMZ	0.51	98	3.08	101	7.27	102			
MNZ	0.51	102	2.73	91	7.23	103	1.93	1.57	81
RNZ	0.53	105	3.04	101	7.15	102	2.09	1.53	75
HMMNI	0.51	103	3.02	101	7.15	102	0.69	0.56	81
IPZ	0.49	98	3.04	101	7.33	105			

3.2.6.2. Precisión: Repetibilidad/Reproducibilidad

La precisión fue evaluada en términos de repetibilidad y reproducibilidad intra-laboratorio, para esto se enriquecieron muestra blanco en tres niveles de concentración de 0.50-3.00-7.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, cada nivel se realizaron seis réplicas y para el estudio de reproducibilidad se repitió los mismos niveles pero con otro analista.

Las muestras fortificadas fueron analizadas de acuerdo al método analítico seleccionado, y con los datos de concentración se obtuvieron se realizaron un estudio estadístico de la precisión en términos de reproducibilidad y repetibilidad: promedio, desviación estándar y coeficiente de variación en porcentaje (%CV), Análisis de Varianza (ANOVA), límites de repetibilidad y reproducibilidad para duplicados.

Los datos por cada nivel se resumieron en la **Tabla 27** y **Tabla 28**, los coeficientes de variación para todos los nitroimidazoles tanto de repetibilidad como reproducibilidad son inferiores al 5 % con respecto a cada nivel de concentración, además del cálculo de este estadístico, también se determinó los límites de repetibilidad y reproducibilidad, que es la diferencia máxima entres dos resultados de pruebas de una misma muestras en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, el cual se espera con un nivel de confianza del 95% [59], [60], estos límites servirán posteriormente para evaluar la precisión de duplicados en el trabajo de rutina.

Tabla 27: Estadísticos de precisión de repetibilidad y reproducibilidad obtenidos en los niveles de 0.50 y 3.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de la validación

Niz s	0.50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$						3.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$					
	Sr	CV _r %	Lim. _r	SR	CV _R %	Lim. _R	Sr	CV _r %	Lim. _r	SR	CVR %	Lim. _R
DMZ	0.016	3.18	0.04	0.017	3.45	0.05	0.065	2.10	0.18	0.076	2.47	0.21
MNZ	0.013	2.51	0.04	0.014	2.70	0.04	0.131	4.78	0.36	0.137	4.99	0.38
RNZ	0.017	3.21	0.05	0.020	3.76	0.05	0.119	3.90	0.33	0.124	4.09	0.34
HMMNI	0.014	2.70	0.04	0.015	2.82	0.04	0.065	2.15	0.18	0.069	2.27	0.19
IPZ	0.018	3.64	0.05	0.019	3.81	0.05	0.058	1.92	0.16	0.073	2.38	0.20

Tabla 28: Estadísticos de precisión de repetibilidad y reproducibilidad obtenidos en el nivel de $7.00 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de la validación

NIZs	$7.00 \mu\text{g.kg}^{-1}$					
	Sr	CVR%	Lim. r	SR	CVR%	Lim. R
DMZ	0.13	1.78	0.36	0.16	2.24	0.45
MNZ	0.09	1.29	0.26	0.10	1.38	0.28
RNZ	0.25	3.44	0.68	0.25	3.48	0.69
HMMNI	0.11	1.58	0.31	0.13	1.87	0.37
IPZ	0.10	1.37	0.28	0.10	1.42	0.29

3.2.7. Concentraciones Críticas

El límite de decisión (CC_{α}) es límite por encima del cual se puede concluir con un probabilidad de error α de que la muestra que contiene el analito, y para el caso de los nitroimidazoles que son antibióticos prohibidos este es de una probabilidad de error del 1%. Una muestra puede solamente ser declarada no conforme cuando su resultado analítico supere este límite.

La capacidad de detección (CC_{β}) es el contenido mínimo de la sustancia que se puede detectar, identificar y cuantificar en una muestra con una certeza estadística de $1-\beta$, donde β es igual al 5%. Los límites críticos fueron calculados de acuerdo a lo descrito en la normativa ISO 11843 [50], [51], en la cual se establece las fórmulas para poder determinar los valores de las concentraciones críticas, los errores de CC_{α} y CC_{β} fueron determinados a partir del factor de t'Student con una probabilidad de error de 0.01 y 0.05 respectivamente.

Los valores que se obtuvieron de CC_{α} y CC_{β} para los nitroimidazoles están declarados en la **Tabla 29**, los resultados de CC_{α} no superaron la concentración de $0.50 \mu\text{g.kg}^{-1}$, y en caso de CC_{β} , los valores están por debajo del $0.80 \mu\text{g.kg}^{-1}$, siendo el NMZ el analito que posee los valores más altos entre los NIZs seguido del RNZ, esto se debió a que estos analitos presentaron una menor señal respuesta, lo que ocasiono que concentraciones menores a $0.50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ se dificultará su identificación y cuantificación, permitiendo más dispersión en los datos en torno al intercepto de la curva de calibración y el error de la curva ($S_{y/x}$) aumente. De acuerdo a lo establecido en los objetivos

de validación los valores de los límites críticos son menores al MRPL que es de $3.00 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

3.2.8. Estimación de la Incertidumbre de Medida

Al validar un método es necesario estimar la incertidumbre de medida y así conocer la dispersión de los valores que podrían ser atribuidos al mesurando, esto nos permite evaluar la calidad de los resultados.

Para poder realizar una estimación de la incertidumbre fue necesario determinar las posibles fuentes, que pudieron afectar en todo el proceso del ensayo, para poder detectar las fuentes se realizó un estudio con el diagrama de causa-efecto o de la espina de pescado (**Figura 38**) que es un método gráfico en que se detecta y analiza la relación entre un efecto y sus posibles causas o fuentes de incertidumbre del método de ensayo [61] y establecimos si estos son de tipo A o B, y las expresamos en forma de desviación estándar y luego las convertimos en varianzas relativas para poder combinarlas y así se cuantificó la incertidumbre total ; para obtener un nivel de confianza de 95%, se multiplicó esta incertidumbre por un factor de cobertura de $k=2$; a esta se la denominó como incertidumbre expandida.

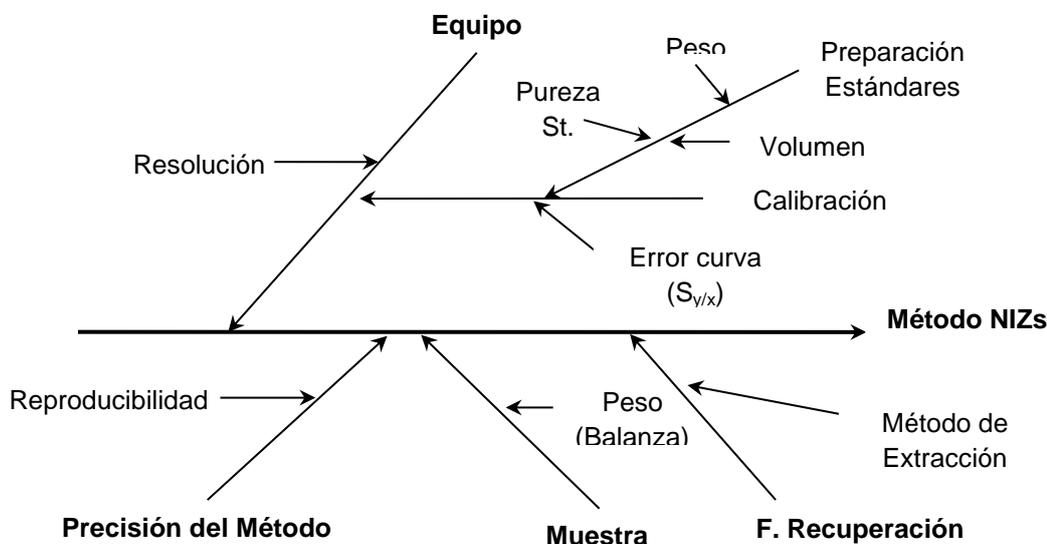


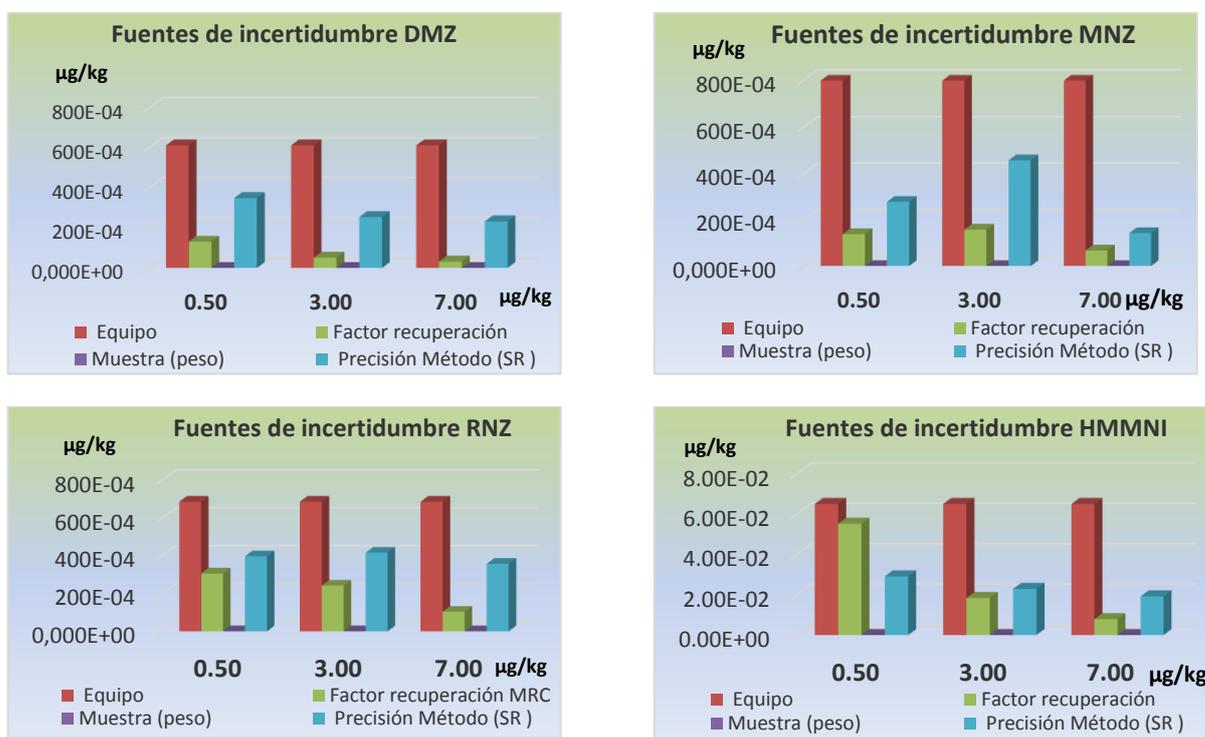
Figura 38: Diagrama causa-efecto para la identificación de las fuentes de incertidumbre para el método analítico de NIZs.

Fuente: Autor

Las principales fuentes de incertidumbre que se detectaron fueron:

- Equipo: dentro de esta fuente obtuvimos otras más como son las provenientes de la curva de calibración en donde se involucró el proceso de la preparación de los estándares externos e internos, y el error de la curva de calibrado ($S_{y/x}$).
- Muestra: El mayor factor fue el proceso de pesada de 5g.
- Método de extracción que se produjo por las posibles pérdidas del analito en el proceso extractivo. y esta se caracterizó como la recuperación y en caso de los analitos que se haya evaluado con MRC fue la veracidad.
- Presión del método: Esta representó la dispersión de las mediciones durante todo el proceso analítico, y en condiciones de reproducibilidad y reproducibilidad, para caracterizar esta fuente se seleccionó la desviación estándar de reproducibilidad por ser la mayor y así se abarcaba la dispersión por repetibilidad.

Al realizar la cuantificación de las fuentes de incertidumbres detectadas del método se pudo determinar que las contribuciones principales provinieron del equipo y la precisión del método (**Figura 39**).



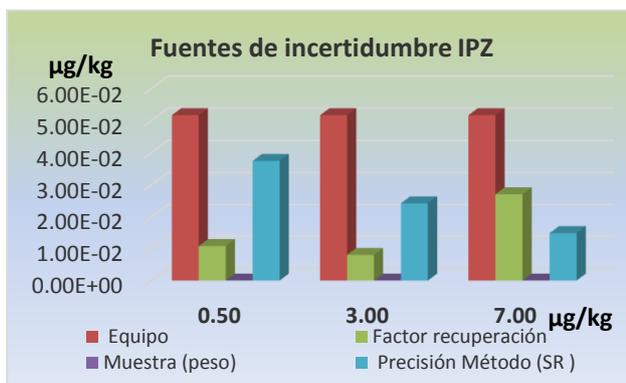


Figura 39: Cuantificación y contribución de las fuentes de incertidumbre de los NIZs

En la **Tabla 29** se detallaron las incertidumbres expandidas con sus respectivos porcentajes con respecto al nivel de concentración, y estas no superaron el 20% para todos los analitos de NIZ.

Tabla 29: Valores de límites críticos e incertidumbre expandida y sus porcentajes calculados durante la validación de NIZs

Nivel	Límites críticos $\mu\text{g.kg}^{-1}$		0.50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$		3.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$		7.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	
	CC_{α}	CC_{β}	U, k=2	U %	U, k=2	U %	U, k=2	U %
NIZs								
DMZ	0.23	0.39	0.07	14.33	0.40	13.29	0.92	13.11
MNZ	0.46	0.79	0.09	17.09	0.56	18.61	1.14	16.24
RNZ	0.39	0.66	0.08	16.93	0.50	16.70	1.09	15.55
HMMNI	0.20	0.35	0.09	17.98	0.43	14.24	0.95	13.61
IPZ	0.19	0.32	0.06	12.93	0.35	11.52	0.84	12.03

3.2.9. Discusión de los resultados de la validación

El método desarrollado fue puesto a prueba para evaluar su desempeño y eficacia, a través de una validación de acuerdo principalmente a las directrices europeas y del *Codex Alimentarius*, los datos obtenidos demostraron:

- El método de ensayo es selectivo y específico para los analitos de nitroimidazoles, se determinó que los interferentes de la matriz del tejido de camarón y otros interferentes químicos no afectan la señal instrumental en el tiempo de retención de los NIZs y que no se ha alterado la cuantificación de los analitos de interés.

- La linealidad e intervalo de trabajo en el método la asumimos como iguales, ya que la curva de calibración fue realizada en matriz blanco, en un rango de 0.50 a 7.00 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, en el caso del DMZ, MNZ, HMMNI, IPZ se aplicó el método de calibración con estándar interno a una concentración de 3.00 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, y para el analito de RNZ su curva es tipo de estándar externo, se obtuvieron para todos los analitos coeficientes de determinación $r^2 \geq 0.99$. Gracias al uso de estándares internos se pudo disminuir los errores por el proceso extractivo y del efecto matriz que se produjeron durante la ionización.
- En las prueba de estabilidad de los estándares en solución (Agua: ACN 50:50) se logró demostrar que los NIZs son altamente estables en el tiempo de dos meses; las mejores condiciones de almacenamiento fue a temperatura ambiente o en refrigeración a 4 °C a oscuridad. En el caso de su estabilidad en matriz fue aún mayor al ser almacenadas a temperaturas ≤ -20 °C, llegando inclusive a permanecer por un tiempo mayor a tres meses.
- En los método de ensayo hay ciertas etapas las cuales, si no se llevan a cabo con suficiente cuidado, tendrán un efecto severo sobre el desempeño del método, durante la prueba de robustez se determinó que el efecto de temperatura de evaporación fue crítico y se debió realizar en un rango de 40 °C a 50 °C, ya que en temperaturas mayores los analitos de NIZs sufren de degradación. Y otro etapa importante fue la cantidad de sales necesaria para sobresaturar el acetonitrilo (efecto salino) para la extracción fue de 4 gramos.
- Al determinar la exactitud del método se evaluó la veracidad y la precisión, el primer componente se determinó con MRC, se obtuvieron valores de 75 % para RNZ, y 81% para MNZ, HMMNI de veracidad, y para los otros analitos se determinó por la fortificación de blanco matriz se obtuvieron valores de 91-105% de recuperación. En cuanto a la precisión alcanzaron % CV de repetibilidad y reproducibilidad $\leq 5.0\%$ para todos los analitos de NIZs, en los tres niveles de ejecución (0.50-3.00-7.00 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$).

- Este método de ensayo fue aplicable para la determinación de trazas o residuos en donde la legislación requiere la ausencia del analito o donde no se ha establecido un límite residual (LMR) permitido, fue por este motivo que el límite de detección debió estimarse de forma rigurosa y su cálculo contempla la totalidad del proceso analítico y además se debe considerar las probabilidades de error α y β de tomar decisiones falsas. Para cumplir con estos requisitos se estimó los valores críticos de CC_{α} (0.19 a 0.46 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) y CC_{β} (0.32 a 0.79 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) en todos los casos en los límites críticos no sobrepasaron el MRPL sugerido de 3.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.
- Se pudo determinar que los principales fuentes de incertidumbre son el equipo, recuperación y la precisión del método, que sumadas dan una incertidumbre expandida que no sobrepasan el 20% con respecto al nivel de concentración de cada nivel de NIZs, valores que están dentro de los rangos aceptables.

El método de ensayo de nitroimidazoles se puede dar declarado como validado ya que los resultados que se obtuvieron de este estudio demuestran que se cumplen los objetivos de validación propuestos en el diseño experimental (**Tabla 21**).

3.3. Análisis de muestras reales

Las muestras de camarón provenientes de piscinas, laboratorios de larvas, camaronerías de la provincia del Guayas, fueron recolectadas en el periodo de 11 meses, donde se obtuvieron de forma aleatoria 110 muestras para los análisis de residuos de nitroimidazoles. En la **Figura 40**, se describe el número de muestras tomadas y las zonas en que se realizó el muestreo por el personal técnico del Instituto Nacional de Pesca y en la **Figura 41** se resume el porcentaje de las muestras tomadas por zonas de la provincia del Guayas. Las principales zonas de muestreo fueron:

- Las islas que conforman el Golfo de Guayaquil como la Mondragón, Puná, Sábana Grande, Escalante, Matorrillo, entre otros.

- Manglares y esteros que tienen grandes efluentes de agua salada: Naranjal, Balao, Tenguel
- Costera representada especialmente por Playas, Posorja, Puerto Morro. Zonas que actualmente están implementando infraestructura para el desarrollo del sector acuícola.
- Rural y cercanas a la ciudad de Guayaquil, con algunos puntos de muestreo en Vía a la Costa, Durán, Daule, Chongón.



Figura 40: Zonas y números de muestras de camarón tomadas en la Prov. Del Guayas. Fuente: Mapa Ruta del Pescador Elaborado: Por el autor

Las muestras recolectadas fueron analizadas, durante 6 meses, e intercaladas con los análisis de muestras para la validación del método analítico y de acuerdo a la disponibilidad de tiempo en el laboratorio de HPLC del INP.



Figura 41: Porcentaje de muestras analizadas de acuerdo a las zonas de muestreo

Las muestras recolectadas y homogenizadas fueron sometidas al proceso de extracción y análisis por el sistema HPLC-MS/MS, y se monitorearon los 5 nitroimidazoles de estudio: DMZ, MNZ; RNZ, HMMNI, IPZ. Además de las muestras se realizó en cada día de análisis una curva de calibración, un blanco, y un fortificado de $3.00 \mu\text{g.kg}^{-1}$, todos estos controles de calidad fueron realizados en matriz de camarón.

Se obtuvieron los cromatogramas, y estos fueron estudiados, en el caso de las muestras, todas presentaron recuperaciones de los estándares internos de DMZ-D3, HMMNI D3, e IPZ-D3 dentro de margen de aceptación de 80-120%, no se detectaron picos cromatográficos en los tiempos de elusión por cada analito de NIZs, en sus iones de cuantificación y confirmación. Para poder aceptar estos resultados se analizaron también los resultados de los controles de calidad efectuados en cada corrida, obteniéndose coeficientes de regresión (r) ≥ 0.98 en las curvas de calibración, en el caso de los blanco de matriz valores $< CC_{\alpha}$ de NIZs, y en los fortificados se obtuvieron recuperaciones de 80-120 %.

A partir de los datos adquiridos por las muestras y la aceptación de los controles de calidad, se pudo determinar que los resultados obtenidos de las muestras analizadas, en los 110 casos no superaron el valor del límite de decisión (CC_{α}) para todos los analitos de nitroimidazoles y por lo tanto las muestras de camarón analizadas en el periodo del proyecto fueron declaradas conforme o dentro de la especificación de acuerdo a lo descrito en la Decisión 2002/657/CE [7]; estos valores críticos pueden ser revisados en la **Tabla 29** y

en **Tabla 30** se encuentran resumidas los resultados obtenidos por día de análisis en cuento a las muestras y los controles de calidad realizados.

Tabla 30: Resultados de NIZs de las muestras y de los controles de calidad

Fecha de Análisis	Muestras analizadas /día	Resultados NIZs Muestras	Curva Calibración	Blanco Matriz	Fortificado matriz 3.00 µg.kg-1
20121120	2	<CCα	r ≥0.98	<CCα	80-120 %
20121221	2	<CCα			
20130117	3	<CCα			
20130124	17	<CCα			
20130215	11	<CCα			
20130219	18	<CCα			
20130302	23	<CCα			
20130316	2	<CCα			
20130319	2	<CCα			
20130408	16	<CCα			
20130503	14	<CCα			
Total Muestras	110	<CCα			

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

Al finalizar este proyecto de investigación se lograron los siguientes resultados:

- Se seleccionó como método de referencia bibliográfica al denominado como NaCl, este fue la base para desarrollar el método de ensayo utilizado en el proyecto.
- Se desarrolló y optimizó el método de NaCl, para así obtener un ensayo de análisis instrumental confirmatorio, para la determinación de cuatro residuos de nitroimidazoles (DMZ, MNZ, RNZ, IPZ) y un metabolito hidroxilado del Dimetridazol (HMMNI), para ello se trabajó con el detector del espectro de masas tándem en modo de ionización positiva (ESI⁺), se monitorearon un ion precursor (ion padre) y dos iones de segunda generación (ion de cuantificación y confirmación), para cada uno de los analitos de estudio, además se logró obtener un método cromatográfico con un tiempo de corrida de diez minutos y un método extractivo en la matriz de camarón que permite desarrollarse en corto tiempo por medio de una extracción con solvente orgánico como el acetonitrilo y un método de separación saturando con sales de cloruro de sodio y sulfato de sodio anhidro que permite optimizar el efecto salino para la extracción de los analitos de la matriz, en conjunto el método instrumental y extractivo es rápido y eficiente ya permite ejecutar varias muestras a la vez y en corto tiempo a un costo razonable, ya que los reactivos utilizados son de fácil

adquisición y su fase extractiva es relativamente sencilla, sin la necesidad de pasos o etapas múltiples o el uso de extracción en fase sólida (SPE).

- Para determinar la confiabilidad y el buen funcionamiento del método analítico se desarrollaron pruebas de implementación a través de un diseño experimental y se establecieron objetivos de desempeño de análisis como: exactitud (veracidad y precisión); linealidad, estabilidad, robustez, concentraciones críticas, y estimación de la incertidumbre.
- Se evaluaron los resultados obtenidos del proceso de validación por medio de métodos y herramientas estadísticas. Se estableció que el método analítico desarrollado es apto para el propósito que se desea aplicar como método de ensayo confirmatorio y pudo ser declarado como validado ya que los resultados que se obtuvieron de este estudio demostraron que se cumplieron los objetivos de validación propuestos en el diseño experimental.
- El objetivo principal de este proyecto de investigación es evaluar la presencia de residuos de NIZs, durante el periodo de estudio se pudo recolectar y analizar 110 muestras de camarón de las diferentes zonas camaroneras de provincia del Guayas, en todos los casos de las muestras recolectadas se obtuvieron como resultado valores que fueron inferiores al límite de decisión (CC_{α}), con lo que se pudo declarar a cada muestra conforme o dentro de especificación, esto nos sugiere que los productores camaroneros no están utilizando estas drogas prohibidas durante el proceso de cultivo del camarón.

4.2. Recomendaciones

Al término de este proyecto de investigación son necesarias plantear las siguientes recomendaciones:

- El método cromatográfico no deberá ser modificado, ya que pequeñas modificaciones pueden producir grandes cambios en los tiempos de retención de los analitos.
- Si en una muestra se detectan concentraciones superiores al 7.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, se recomienda realizar una dilución en la última etapa de extracción al reconstituir el extracto, y adicionar en esta etapa el estándar interno, en un volumen que permita mantener la concentración de 3.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.
- Se recomienda el uso de estándares internos para el caso del RNZ, MNZ, que sean más específicos para estos analitos, para así disminuir errores de extracción y efecto matriz.
- Al demostrar la estabilidad de los estándares de NIZs de concentración 3.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, es posible extrapolar la estabilidad de soluciones de mayor concentración y disueltas en solventes orgánicos, que pueden tener una estabilidad de un año, ya que las soluciones en solventes orgánicos son más estables, si son almacenados a la oscuridad y a 4 °C.
- En este proyecto se determinó los valores CC_{α} y CC_{β} , en el cálculo se utilizaron tres niveles de concentración, se recomienda que si se requirirá obtener mejores resultados es necesario aumentar los números de niveles, y que estos estén en concentraciones más próximos a los valores del límite inferior del intervalo o rango de trabajo de la curva de calibración (0.50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$).
- El método desarrollado en este proyecto puede ser utilizado para determinar NIZs en otras matrices de tejido animal, como en ganado vacuno, aviar, porcino entre otras, ya que se pudo evidenciar que al analizar el MRC, en músculo de cerdo se obtuvieron recuperaciones superiores al 70 %.
- Al analizar las muestras reales en un periodo de tiempo cercano de un año, del sector camaronero, se evidenció que estas drogas veterinarias no son usadas de forma rutinaria, por lo que se puede sugerir que en el Plan de monitoreo de Residuos del INP,

se pueden disminuir el número de muestras seleccionadas para el control de estos residuos y tomar mayor interés en aquellas drogas de uso veterinario en las cuales se han presentado alertas sanitarias.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] GLOBAL CONSULT, *Levantamiento de la estructura de costos producción y su evolución reciente para determinar el nivel de competitividad del Sector Camaronero Ecuatoriano*, 2010, p. 7.
- [2] Banco Central del Ecuador, *Evolución de la Balanza Comercial Enero-Diciembre 2012*, Febrero 2013, pp. 1-16.
- [3] M. Doyle, *Veterinary Drug residues in Processed Meat-Potencial Health Risk*, 2006, p. 2.
- [4] M. Gratacós Cubarsí, «Desarrollo de métodos rápidos para el análisis de residuos en producción animal,» 2007.
- [5] B. Alistair y L. Carol, «Veterinary medicines and the environment,» de *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 24, 2005, pp. 759-760.
- [6] M. C. Lozano A y D. Arias M, «Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia,» *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, nº 21, pp. 121-135, 28 febrero 2008.
- [7] Comisión de las Comunidades Europeas, *Decisión de la Comisión por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados (2002/657/CE)*, 2004, pp. 1-34.
- [8] Consejo de la Unión Europea, «DIRECTIVA 96/23/CE DEL CONSEJO,» pp. 10-32, 29 Abril 1996.
- [9] Instituto Nacional de Pesca, *Plan de Monitoreo de Residuos*, 2013, pp. 1-44.
- [10] F. Chalén, J. Sáenz, M. Cambisaca y F. Franco, «Residuos de Nitrofuranos en tilapia, camarones, harina de pescado y balanceado en Ecuador,» *Revista Ciencias del Mar y Limnología*, vol. 4 (1), pp. 75-88, 2010.
- [11] M. J. Sams, P. R. Strutt, K. A. Barnes, D. P. Andrew y M. D. Rose, «Determination of dimetridazole, ronidazole and their common metabolite in poultry muscle and eggs by high performance liquid chromatography

- with UV detection and confirmatory analysis by atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry,» *The Analyst*, pp. 2545-2549, 17 September 1998.
- [12] S. R. Shinde, A. M. Bhagwat y A. S. Ghumatkar, «High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Nitroimidazole Derivative Satranidazole Using a Liquid Extraction Method,» *International Journal of PharmTech Research*, vol. 2, nº 3, pp. 2032-2037, July-Sept 2010.
- [13] M. Hernández Mesa, *Desarrollo de un método MEKC para la determinación de 5-nitroimidazoles en agua de río*, Granada, 2011, pp. 1-74.
- [14] M. L. Santiago H., A. Espinosa P. y M. d. C. Bermúdez A., «Uso de antibióticos en la camaronicultura,» *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 40, nº 3, pp. 22-32, julio-septiembre 2009.
- [15] G. Montalvo Mimbbrero, L. Olivos Oré, J. Gilabert Santos y A. Rodríguez Artalejo, «Análisis del riesgo de los medicamentos veterinarios presentes en los alimentos.,» *Actualidad en Farmacología y Terapéutica*, vol. 2, nº 3, pp. 168-175, Septiembre 2004.
- [16] D. Lindsay y B. Blagburn, «Antiprotozoan drugs,» de *Veterinary Pharmacology*, Iowa, Blackwell Publishing, 2001, pp. 992-1016.
- [17] B. D. M. Nuñez Freile, *Nitrimidazoles*, pp. 24-28.
- [18] M. M. López Nigro y M. A. Carballo, *Los Nitroimidazoles como modelo de mutagénesis química y muerte celular*, vol. 17, 2008, pp. 47-62.
- [19] A. Stolker y U. T. Brinkman, *Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals-a review*, ELSEVIER, 2005, pp. 15-53.
- [20] *Reglamento (CEE) 2377/90 de Consejo de 26 de junio de 1990 por el que se establece un procedimiento comunitari de fijación de límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal*, 1990, pp. 1-139.
- [21] *Reglamento (UE) Nº 37/2010 de la Comisión relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal*, 2010, pp. 1-77.
- [22] USA Food and Drug Administration, «Food Animal Residue Avoidance

- Databank,» [En línea]. Available: <http://www.farad.org/eldu/prohibit.asp>. [Último acceso: 03 03 2016].
- [23] Laboratorios de Referencia Comunitarios de la Unión Europea (CRLs), «CRLs VIEW ON STATE OF THE ART ANALYTICAL METHODS FOR NATIONAL RESIDUE CONTROL PLANS,» 7 December 2007.
- [24] Instituto Nacional de Pesca, *Plan Nacional de Control*, 2006, pp. 1-56.
- [25] O. Lucas y O. Hernando , «Revista de Química,» WATERS, 2007. [En línea]. Available: http://departamento.pucp.edu.pe/ciencias/images/documentos/XXI-Orlando_%20Lucas.pdf. [Último acceso: 15 02 2013].
- [26] ISO/IEC: 17025-2005, *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración*, ISO copyright office, 2005, pp. 1-29.
- [27] O. Shimelis, A.-K. Wihlborg, M. Rudolfsson y B. Boyd, *Extraction of Nitrimidazoles from Milk and Egg samples using SupelMIP SPE Nitroimdazoles and LC-MS-MS*, pp. 1-3.
- [28] P. Behan, M. Cronly, B. Foley, L. Regan, S. Martin, M. Doyle y E. Malone, «Rapid multi-class multi-residue method for the confirmation of chloramphenicol and eleven nitroimidazoles in milk and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry,» *Food Additives and Contaminants*, pp. 1-10, 2010.
- [29] M. Cronly, P. Behan, B. Foley, L. Regan y M. Gallagher, «Development and Validation of Rapid Multi-class Method for the Confirmation of Fourteen Prohibited Medicinal Additives in Pig and Poultry Compound Feed by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry,» *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, pp. 1-13, 2010.
- [30] Waters, *Waters Micromass Quattro Premier Mass Spectrometer Operator's Guide*, Revision B ed., pp. 65-88.
- [31] L. Capitan-Vallvey, A. Ariza, R. Checa y N. Navas, «Determination of five nitroimidazoles in water by liquid chromatography-ms spectrometry,» *Journal od Chromatography A*, pp. 243-248, 23 August 2002.
- [32] S. Badui Dergal, *La ciencia de los alimentos en la práctica*, México: Pearson, 2012.
- [33] SIGMA-ALDRICH, «SUPELMIP Solid Phase Extraction,» 2014. [En línea].

Available: www.sigmaaldrich.com. [Último acceso: Septiembre 2015].

- [34] Comisión del Codex Alimentarius. Comité del Codex sobre residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos, *Revisión de los criterios basados en el rendimiento de los métodos de análisis para los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos*, 2002, pp. 1-12.
- [35] M. Thompson, S. L. Ellison y R. Wood, *Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC technical Report)*, vol. 74, International Union of Pure and Applied Chemistry, 2002, pp. 835-855.
- [36] AOAC International, «How to meet ISO 17025 Requirements for Method Verification».
- [37] J. Castillo R., *Aplicación del Método del Estándar Interno a la Cromatografía de Gases*, 2010.
- [38] M. A. Sánchez Palacios. [En línea]. Available: http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/angelisa/Downloads/tecnicascalibracio_vr1.pdf. [Último acceso: 01 11 2015].
- [39] D. A. Ahumada y J. A. Guerrero D., «Estudio del efecto matriz en el análisis de plaguicidas por cromatografía de gases,» *REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA*, vol. 17, nº 1, pp. 51-58, 2010.
- [40] A. Van Eeckhau, S. Sarre, . I. Smolders y Y. Michotte, «Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: Evaluation of matrix effects,» *Journal of Chromatography B*, vol. B 877 (2009), p. 2198–2207, 2009.
- [41] Eurachem A Focus for Analytical Chemistry in Europe, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods*, 1998.
- [42] ISO , Norma ISO 3534-1: Vocabulary and Symbols Part1: Applied Statistics, Ginebra, 2006.
- [43] ISO, International vocabulary of basic and general standard terms in Metrology, Ginebra, 1993.
- [44] Instituto de Salud Pública de Chile, *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos"*, vol. Guía Técnica N° 1, Santiago de Chile, 2010.
- [45] R. Boqué y A. Maroto, «El análisis de la varianza (ANOVA). 1

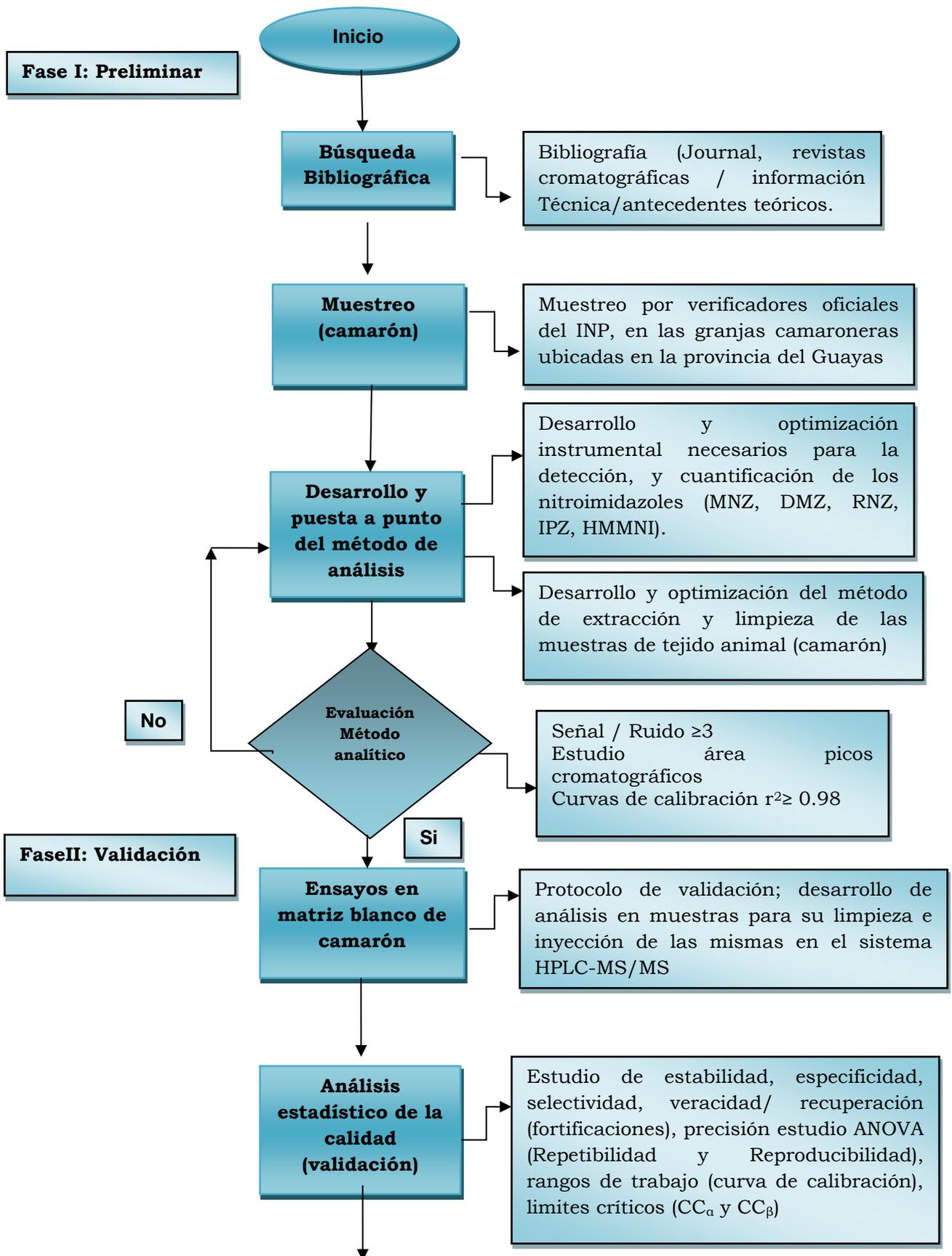
- Comparación de múltiples poblaciones,» Grupo de Quimiometría y Calimetría. Universitat Rovira i Virgil, [En línea]. Available: <http://rodi.urv.es/quimio/general/anovacast.pdf>. [Último acceso: 29 Octubre 2015].
- [46] A. Maroto y R. Boqué, «El análisis de la varianza (ANOVA). 2. Comparación de componentes de varianza,» Grupo de Quimiometría y Cualimetría Universitat Rovira i Virgili, [En línea]. Available: <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/anova2cast.pdf>. [Último acceso: 30 octubre 2015].
- [47] J. Marcos Jurado, «Aplicación de Microsoft Excel a la Química analítica: validación de métodos analíticos,» Departamento de Química Analítica, 1 abril 2008. [En línea]. Available: <http://personal.us.es/jmjurado/docs/AQAEXCEL.pdf>. [Último acceso: 30 octubre 2015].
- [48] D. Montoro Cazorla, «Análisis de la Varianza (un factor): ANOVA,» Universidad de Jaén. Departamento de Estadística e I. , [En línea]. Available: <http://www4.ujaen.es/~dmontoro/Metodos/Temas/Tema9.pdf>. [Último acceso: 30 octubre 2015].
- [49] Organismo Argentino de Acreditación (OAA), *Criterios para informar resultados de ensayo químicos a bajas concentraciones*, 2008, pp. 1-6.
- [50] ISO, «Capability of detection - Part 1: terms and definitions,» 1997.
- [51] ISO, «Capability of detection. Part 2: Methodology in the linear calibration case».
- [52] Eurachem, *Guía CG 4 EURACHEM / CITAC Cuantificación de la Incertidumbre en Mediciones Analíticas*, 2012, pp. 1-134.
- [53] Codex Alimentarius, «Guidelines on Measurement Uncertainty (CAC/GL 54-2004),» pp. 1-8, 2004.
- [54] Codex Alimentarius, «Directrices sobre la estimación de la incertidumbre de los resultados (CAC/GL 59-2006),» n° CAC/GL 59-2006, pp. 1-9.
- [55] FLACSO-MIPRO Centro de Investigaciones, «Boletín Mensual de análisis sectorial de MIPYMES Procesamiento de camarón para Exportación (R6 y R2),» p. 39, 21 Diciembre 2011.
- [56] A. G. González y M. A. Herrador, *A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles*, vol.

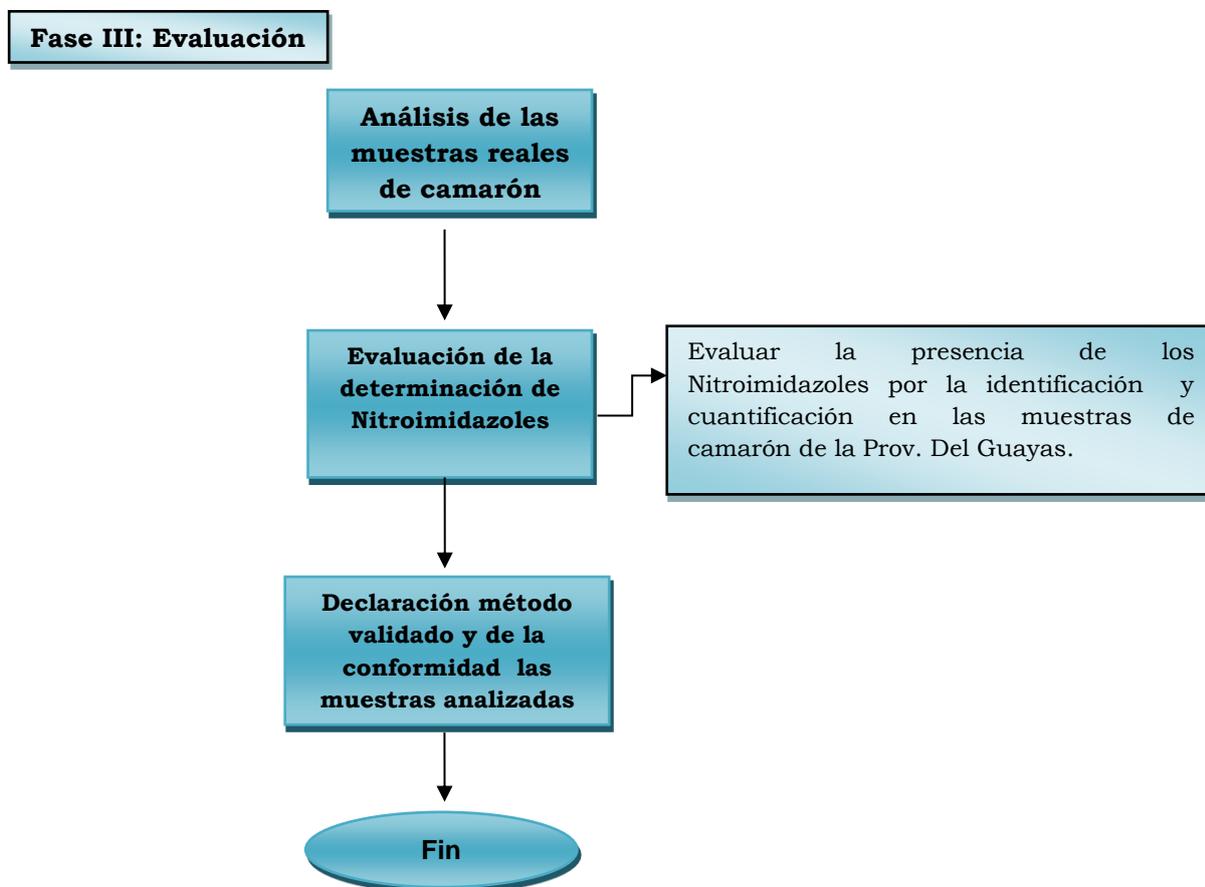
26, 2007, pp. 227-238.

- [57] J. N. Miller y J. C. Miller, *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, Quinta Edición ed., Madrid: Prentice Hall.
- [58] J. Hajslova y J. Zrostlíková, «Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food,» *Journal of Chromatography A*, vol. A 1000 (2003), p. 181–197, 2003.
- [59] EURACHEM, traducido por CENAM, «MÉTODOS ANALÍTICOS ADECUADOS A SU PROPÓSITO Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas relaciones Segunda Edición,» n° CNM-MRD-PT-030, pp. 1-67, Noviembre 2005.
- [60] Codex Alimentarius, «Directrices sobre la terminología Analítica (CAC/GL 72-2009),» pp. 1-17, 2009.
- [61] H. Guitérrez Pulido, «Calidad Total y Productividad,» México, Mc Graw Hill, pp. 192-195.

6. ANEXOS

ANEXO A: Diagrama de Flujo del proyecto de investigación





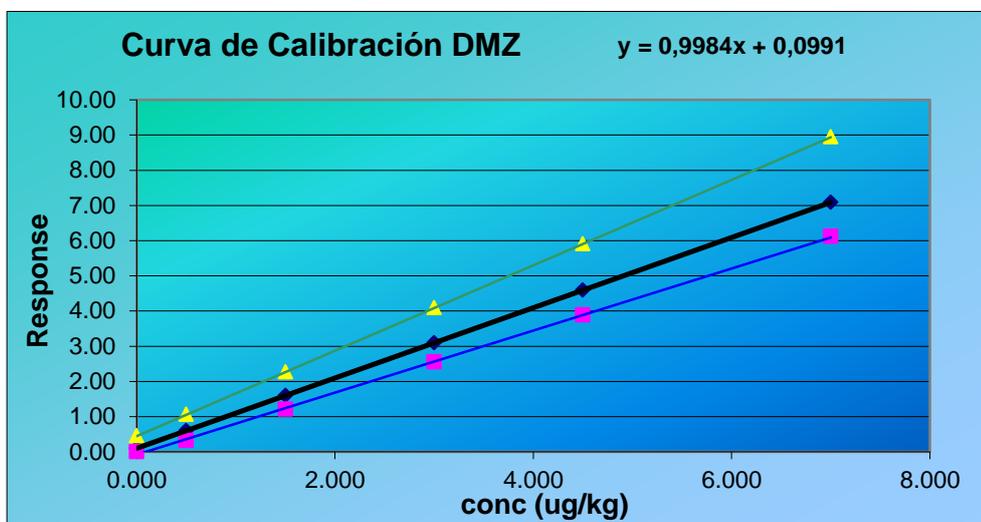
ANEXO B:

RESUMEN DE CURVAS DE CALIBRACION Y MARGENES DE ACEPTABILIDAD DMZ

	Fecha	matriz	r2	Syx	b(m)	a	b-	a-	b+	a+
1	20130318	CAMARÓN	0,9995	0,0639	0,9614	0,0566	0,9218	0,1026	1,0010	0,2158
2	20130317		0,9989	0,1118	1,1280	0,0829	0,9218	0,1026	1,0010	0,2158
3	20130318		0,9996	0,0592	1,0170	0,1807	0,9802	0,0330	1,0538	0,3285
4	20130124		0,9999	0,0287	0,9492	0,0780	0,9314	0,0065	0,9670	0,1495
5	20130319		1,0000	0,0135	0,9002	0,1402	0,8918	0,1066	0,9085	0,1738
6	20130408		0,9993	0,0629	1,1570	0,0976	1,1011	0,0828	1,2130	0,2780
7	20130115		0,9998	0,0417	0,9273	0,0630	0,9014	0,0411	0,9532	0,1671
8	20130124		0,9999	0,0287	0,9492	0,0780	0,9314	0,0065	0,9670	0,1495
9	20130219		0,9984	0,1144	0,9734	0,1635	0,9025	0,1216	1,0444	0,4487
10	20130316		0,9988	0,1064	1,0213	0,0505	0,9716	0,1317	1,0709	0,2327

	r ²	Syx	b(m)	a
Promedio	0,9994	0,0631	0,9984	0,0991
Valor min	0,9984	0,0135	0,8918	0,1317
Valor max	1,0000	0,1144	1,2130	0,4487

Conc	Response	Response min	Response max
0,000	0,0991	0,0000	0,4487
0,500	0,5983	0,3142	1,0552
1,500	1,5967	1,2061	2,2681
3,000	3,0943	2,5438	4,0876
4,500	4,5918	3,8815	5,9070
7,000	7,0878	6,1111	8,9394



ANEXO C: EJEMPLO DE UNO DE LOS ANALITOS DE NIZs DE LOS CALCULOS PARA DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN, RECUPERACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL DMZ

Analito	DMZ
Matriz:	Camarón
NIVEL:	0,50 ug/kg

N	Analista 1	Analista 2
1	0,48	0,50
2	0,47	0,50
3	0,51	0,53
4	0,52	0,52
5	0,51	0,53
6	0,51	0,50

			Total
Promedio	0,50	0,51	0,506
S.D.	0,018	0,014	0,017
C.V.	3,65	2,65	3,33
%Recovery	99,80	102,47	101,13

Analito	DMZ
Matriz:	Camarón
NIVEL:	3,00 ppb

N	Analista 1	Analista 2
1	2,998	3,05
2	3,017	3,12
3	3,070	3,14
4	3,069	3,13
5	2,985	3,02
6	3,139	3,22

			Total
Promedio	3,05	3,11	3,080
S.D.	0,058	0,071	0,071

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Analista 1	6	2,994	0,499	0,0003312
Analista 2	6	3,074	0,512333	0,0001847

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,000533333	1	0,000533	2,07	0,181	4,96
Dentro de los grupos	0,002579333	10	0,000258			

Total	0,003112667	11
--------------	-------------	----

Sr	0,016
S²L	0,0000459
SR	0,017

CVr	3,18
CV R	3,45

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Analista 1	6	18,278	3,046333	0,0033239
Analista 2	6	18,685	3,114167	0,005067

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,013804083	1	0,013804	3,29	0,100	4,96
Dentro de	0,041954167	10	0,004195			

C.V.	1,89	2,29	2,31
%Recovery	101,54	103,81	102,68

los grupos

Total	0,05575825	11
--------------	------------	----

Sr	0,065
S²L	0,0016014
SR	0,076

CVr	2,10
CV R	2,47

Analito	DMZ
Matriz:	Camarón
NIVEL:	7,00 ppb

N	Analista 1	Analista 2
1	7,28	7,27
2	7,26	7,54
3	7,16	7,26
4	7,12	7,54
5	7,14	7,10
6	7,16	7,38

			Total
Promedio	7,19	7,35	7,267
S.D.	0,066	0,171	0,148
C.V.	0,92	2,33	2,04
%Recovery	102,69	104,94	103,81

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Analista 1	6	43,129	7,188167	0,0043934
Analista 2	6	44,073	7,3455	0,0292451

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,074261333	1	0,074261	4,42	0,062	4,96
Dentro de los grupos	0,168192333	10	0,016819			

Total	0,242453667	11
--------------	-------------	----

Sr	0,130
S²L	0,0095737
SR	0,162

CVr	1,78
CV R	2,24

RESUMEN DMZ

Matriz: Camarón

Nivel	Valor	Promedio	Sr	CV,%	Límite de Repetibilidad	SR	CV _R %	Límite Reproducibilidad	Recuperación
Nivel I	0,50	0,51	0,016	3,18	0,04	0,017	3,45	0,05	101,13%
Nivel II	3,00	3,08	0,0648	2,10	0,18	0,0761	2,47	0,21	102,68%
Nivel III	7,00	7,27	0,1297	1,78	0,36	0,1625	2,24	0,45	103,81%

Limite por duplicado

1,96

*

raíz(2)= 2,8

PRESUPUESTO DE INCERTIDUMBRE W							
$u(W) = \sqrt{u_{cal\ eq}^2 + u_{res\ eq}^2}$							
$u_{cal\ eq} = \sqrt{u_{calpatDMZ}^2 + u_{calpatADMZD3}^2 + u_{regr.lineal}^2}$							
Presupuesto de la incertidumbre asociada a la preparación de los estándares DMZ y DMZ-D3							
$P_n = [patronST] \cdot \frac{P_{pat}}{V_1} * \frac{V_2}{V_3} * \frac{V_4}{V_5} * \frac{V_6}{P_{matriz}}$							
$\left(\frac{u_{calpat}}{calpat}\right)^2 = \left(\frac{uP}{P}\right)^2 + \left(\frac{u_{P_{pat}}}{P_{pat}}\right)^2 + \left(\frac{uV_1}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{uV_2}{V_2}\right)^2 + \left(\frac{uV_3}{V_3}\right)^2 + \left(\frac{uV_4}{V_4}\right)^2 + \left(\frac{uV_5}{V_5}\right)^2 + \left(\frac{uV_6}{V_6}\right)^2 + \left(\frac{u_{P_{matriz}}}{P_{matriz}}\right)^2$							
DMZ y DMZ-D3 25,0 ppb							
FACTORES DE INFLUENCIA	FACTOR	VALORES / FORMULA		u_i	u_i^2		
1,Pureza patrón	uP/P	Pureza	99	$\left(\frac{1/(2\sqrt{3})}{99}\right)^2$	2,92E-03	8,50E-06	
		Erromáx	1				
2,Peso Patrón	$\left(\frac{u_{P_{pat}}}{P_{pat}}\right)$	U balanza	0,14	$u_{cal} = \frac{U_{cal}}{k_{cal}}$	1,40E-02	1,96E-04	
		Peso del patrón	5	$\frac{U_{cal}}{k_{cal}} / \frac{P_{pat}}$			
3.-Volumen final (matraz 50ml)	$uV1/V1$	4,52E-02	$\frac{\sqrt{u_{emx}^2 + u_{temp}^2 + u_{precision}^2}}{50}$	9,03E-04	8,16E-07		
4.-Volumen del ST(pipeta 100 ul)	uV_2/V_2	2,95E+00	$\frac{\sqrt{u_{emx}^2 + u_{temp}^2 + u_{resol}^2 + u_{precision}^2}}{100}$	2,95E-02	8,68E-04		
5.-Volumen final (matraz 100ml)	uV_3/V_3	6,74E-02	$\frac{\sqrt{u_{emx}^2 + u_{temp}^2 + u_{precision}^2}}{100}$	6,74E-04	4,54E-07		
6.-Volumen del ST(pipeta 12500ul)	uV_4/V_4	3,25E+01	$\frac{\sqrt{u_{emx}^2 + u_{temp}^2 + u_{resol}^2 + u_{precision}^2}}{12500}$	2,60E-03	6,78E-06		
7.-Volumen final (matraz 50 ml)	uV_5/V_5	4,52E-02	$\frac{\sqrt{u_{emx}^2 + u_{temp}^2 + u_{precision}^2}}{50}$	9,03E-04	8,16E-07		
				total	1,08E-03	RAIZ	3,29E-02
Vial DMZ / DMZD3	3			ppb			
FACTORES DE INFLUENCIA	FACTOR	VALORES / FORMULA		u_i	u_i^2		
Volumen del ST (pipeta 600ul)	V_6/V_6	3,07E+00	$\frac{\sqrt{u_{emx}^2 + u_{temp}^2 + u_{resol}^2 + u_{precision}^2}}{600}$	5,11E-03	2,61E-05		
2,Peso Matriz	$\left(\frac{u_{P_{matriz}}}{P_{matriz}}\right)$	U balanza (mg), k=2	0,14	$u_{cal} = \frac{U_{cal}}{k_{cal}}$	1,40E-05	1,96E-10	
		Peso de la matriz (mg)	5000	$\frac{U_{cal}}{k_{cal}} / \frac{P_{pat}}$			
				total	1,11E-03	raiz	3,33E-02

Presupuesto de la incertidumbre asociada a la calibración del equipo LC/MS-MS

$$u_{cal eq} = \sqrt{u_{calpatDMZ}^2 + u_{calpatDMZD3}^2 + u_{regr.lineal}^2 + u_{res eq}^2}$$

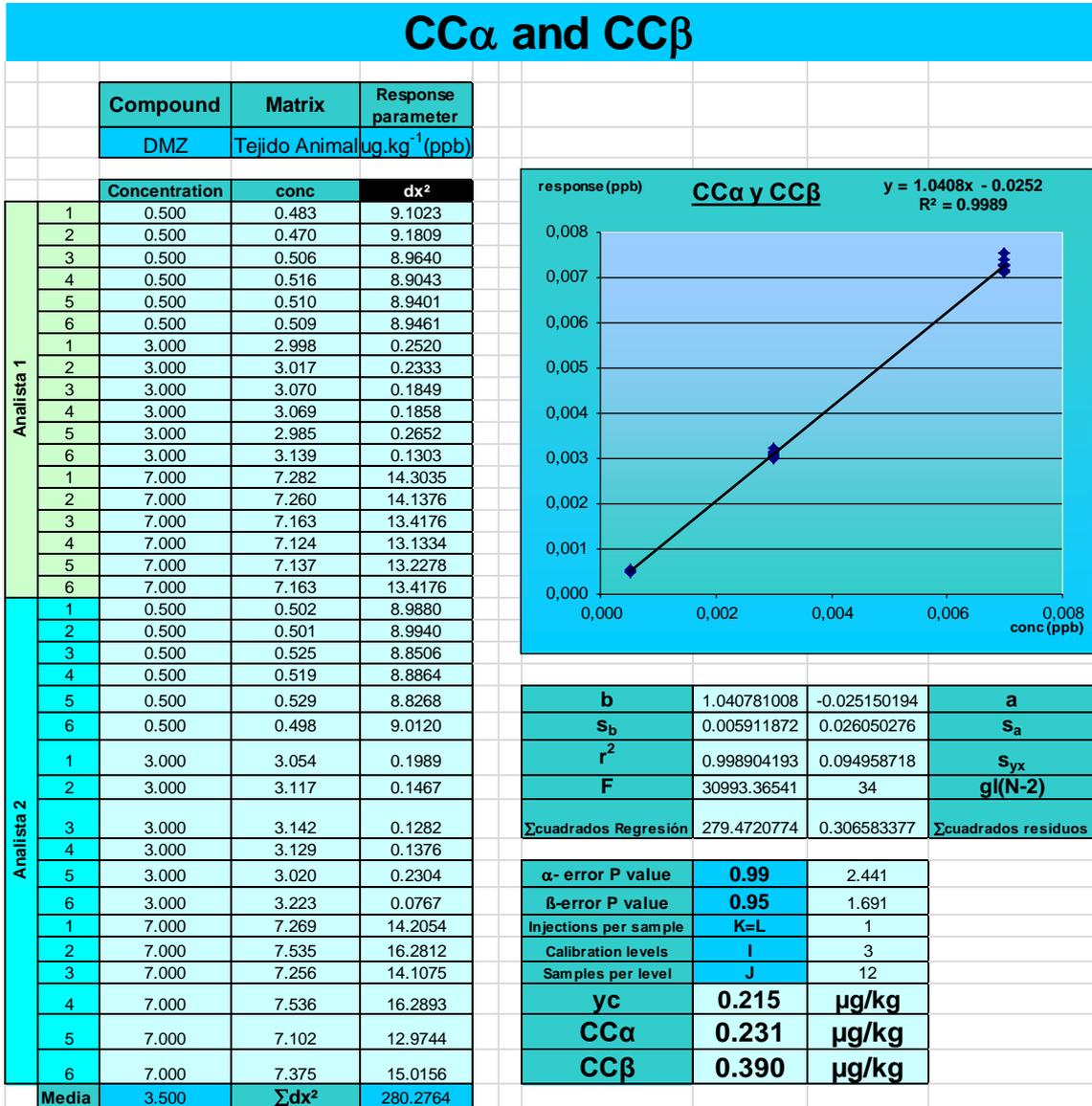
FACTORES DE INFLUENCIA	VALORES / FORMULA	u_i	u_i^2
μ^2 Cal pat DMZ	$u(con)^2 = u(calpat)^2 * W(ug/l)^2$	3,33E-02	1,11E-03
μ^2 Cal pat DMZ D3	$u(con)^2 = u(calpat)^2 * W(ug/l)^2$	3,33E-02	1,11E-03
μ^2 Regr. Lineal	$\frac{S_{y,x}}{m}$	1,14E-01	1,53E-03
		9,73E-01	
μ^2 Res eq	$\frac{resolucion}{\sqrt{3}}$	1,00E-03	3,33E-07
total			3,75E-03
raiz			6,12E-02

PRESUPUESTO DE INCETIDUMBRE COMBINADA

$$u_{DMZ} = \sqrt{u_{Equipo}^2 + u_{FR}^2 + u_{Pm}^2 + u_{PrecisiónSR}^2}$$

Incertidumbre Total (%)										
Nivel ug/kg	Valor (X)	Equipo	Factor recuperación	Muestra (peso)	Precisión Método (SR)	uc	uc(x).X	U	U%	U relativa
0,50	0,51	6,1E-02	1,31E-02	1,40E-05	3,5E-02	0,0717	0,0358	0,07	14,3	0,1433
3,00	3,08	6,1E-02	5,15E-03	1,40E-05	2,5E-02	0,0665	0,1994	0,40	13,3	0,1329
7,00	7,27	6,1E-02	3,14E-03	1,40E-05	2,3E-02	0,0655	0,4588	0,92	13,1	0,1311

ANEXO C: DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES CRÍTICOS



ANEXO D: INFORMES DE VALIDACIÓN DE LOS NITROIMIDAZOLES

	INFORME DE VALIDACIÓN DIMETRIDAZOL	
---	---	---

CUANTITATIVO <input checked="" type="checkbox"/>	Analito: DMZ
CUALITATIVO <input type="checkbox"/>	Unidades: $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (ppb)
DE IDENTIFICACIÓN <input type="checkbox"/>	Matriz: Tejido de camarón

FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL	RANGOS DE ACEPTACIÓN		OBSERVACIONES
r^2	≥ 0.99		Ver cálculos en hoja excell
m (b)	0.892	a 1.213	
Lo (a)	-0.1317	a 0.4487	
%CV S_{y/x}	≤ 10.0		

Concentración ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)		Repetibilidad			Reproducibilidad			%recuperación	U _{k=2} ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	% U
Nivel	Media	Sr	%CV _r	Limite r ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	S _R	%CV _R	Limite R ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)			
Nivel I 0.50	0.51	0.016	3.2	0.04	0.017	3.4	0.05	98.1	0.07	14.3
Nivel II 3.00	3.08	0.065	2.1	0.18	0.076	2.47	0.21	101.4	0.40	13.3
Nivel III 7.00	7.27	0.130	1,8	0.36	0.162	2.2	0.45	102.2	0.92	13.1
Límite Críticos		CCα ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)					CCβ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)			
		0.23					0.39			

INTERVALO DE TRABAJO VALIDADO: 0.50 - 7.00 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (ppb)

Selectividad/Especificidad	El método analítico, no presenta interferencia con los constituyentes de la matriz, compuestos químicamente relacionados u otras sustancias	
Robustez	El método es robusto a ligeros cambios. Temperatura evaporación: 40-50 °C Cantidad de sal (efecto salino): 4 g (NaCl: Na ₂ SO ₄). Sin cambios en el gradiente cromatográfico y monitoreo reacción múltiple.	
Estabilidad	Solución	Las soluciones de estándares de trabajo utilizadas en la fortificación de las matrices tienen una duración de 2 meses, almacenadas en la oscuridad y a 4 °C.
	Matriz	El tejido de camarón almacenado a temperaturas inferiores a -20 °C y a la oscuridad tiene un tiempo de estabilidad de 3 meses.
%CV Precisión	≤ 30 %CV	
%Recuperación	-50% a +20% (<1.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$) -30% a +10% (>1.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	
Límites Críticos	CCα	< 3.00 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ MRPL
	CCβ	≤ 3.00 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ MRPL

Los resultados obtenidos cumplen con los objetivos de validación

El presente método queda validado para uso en el laboratorio, por las personas cualificadas para ello.

Guayaquil, 15 diciembre del 2015.

Responsable de la actividad:

Q.F. July Sáenz Serrano

	INFORME DE VALIDACIÓN METRONIDAZOL	
---	---	---

CUANTITATIVO <input checked="" type="checkbox"/> X CUALITATIVO <input type="checkbox"/> DE IDENTIFICACIÓN <input type="checkbox"/>	Analito: MNZ Unidades: $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (ppb) Matriz: Tejido de camarón
---	---

FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL	RANGOS DE ACEPTACIÓN	OBSERVACIONES
r^2	≥ 0.99	Ver cálculos en hoja Excel
m (b)	0.096 a 0.233	
Lo (a)	-0.2403 a 0.1832	
%CV S _{y/x}	≤ 25.0	

Concentración ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)		Repetibilidad			Reproducibilidad			%recuperación	U _{k=2} ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	% U	
Nivel	Media	S _r	%CV _r	Limite r ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	S _R	%CV _R	Limite R ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)				
Nivel I 0.50	0.51	0.013	2.5	0.04	0.014	2.7	0.04	102.4	0.09	17.1	
Nivel II 3.00	2.73	0.131	4.8	0.36	0.137	5.0	0.38	91.1	0.56	18.6	
Nivel III 7.00	7.23	0.093	1.3	0.26	0.099	1.4	0.28	103.3	1.14	16.2	
Límite Críticos		CC α ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)					CC β ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)				
		0.46					0.79				

INTERVALO DE TRABAJO VALIDADO: 0.50 - 7.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (ppb)

Selectividad/ Especificidad	El método analítico, no presenta interferencia con los constituyentes de la matriz, compuestos químicamente relacionados u otras sustancias	
Robustez	El método es robusto a ligeros cambios. Temperatura evaporación:40-50 °C Cantidad de sal (efecto salino): 4 g (NaCl: Na2SO4). Sin cambios en el gradiente cromatográfico y monitoreo reacción múltiple.	
Estabilidad	Solución	Las soluciones de estándares de trabajo utilizadas en la fortificación de las matrices tienen una duración de 2 meses, almacenadas en la oscuridad y a 4 °C.
	Matriz	El tejido de camarón almacenado a temperaturas inferiores a -20 ° C y a la oscuridad tiene un tiempo de estabilidad de 3 meses.
%CV Precisión		≤ 30 %CV
%Recuperación		-50% a +20% (<1.00 $\mu\text{g/kg}$) -30% a +10% (>1.00 $\mu\text{g/kg}$)
Límites Críticos	CCα	< 3.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MRPL
	CCβ	≤ 3.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MRPL
Los resultados obtenidos cumplen con los objetivos de validación		

El presente método queda validado para uso en el laboratorio, por las personas cualificadas para ello.

Guayaquil, 15 diciembre del 2015.

Responsable de la actividad:

Q.F. Jully Sáenz Serrano

	INFORME DE VALIDACIÓN RONIDAZOL	
---	--	---

CUANTITATIVO <input checked="" type="checkbox"/> X CUALITATIVO <input type="checkbox"/> DE IDENTIFICACIÓN <input type="checkbox"/>	Analito: RNZ Unidades: $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (ppb) Matriz: Tejido de camarón
---	---

FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL	RANGOS DE ACEPTACIÓN		OBSERVACIONES
r^2	≥ 0.99		Ver cálculos en hoja Excel
m (b)	5093	a 17692.5	
Lo (a)	-6669.8	a 7406.2	
%CV S _{y/x}	≤ 25.0		

Concentración ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)		Repetibilidad			Reproducibilidad			%recuperación	U _{k=2} ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	% U	
Nivel	Media	Sr	%CV _r	Limite r ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	S _R	%CV _R	Limite R ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)				
Nivel I 0.50	0.53	0.017	3.2	0.05	0.020	3.8	0.05	105.3	0.08	16.9	
Nivel II 3.00	3.04	0.119	3.9	0.33	0.124	4.09	0.34	101.4	0.50	16.7	
Nivel III 7.00	7.15	0.246	3.4	0.68	0.249	3.5	0.69	102.1	1.09	15.5	
Límite Críticos		CC α ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)					CC β ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)				
		0.39					0.66				

INTERVALO DE TRABAJO VALIDADO: 0.50 - 7.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (ppb)

Selectividad/Especificidad	El método analítico, no presenta interferencia con los constituyentes de la matriz, compuestos químicamente relacionados u otras sustancias	
Robustez	El método es robusto a ligeros cambios. Temperatura evaporación: 40-50 °C Cantidad de sal (efecto salino): 4 g (NaCl: Na ₂ SO ₄). Sin cambios en el gradiente cromatográfico y monitoreo reacción múltiple.	
Estabilidad	Solución	Las soluciones de estándares de trabajo utilizadas en la fortificación de las matrices tienen una duración de 2 meses, almacenadas en la oscuridad y a 4 °C.
	Matriz	El tejido de camarón almacenado a temperaturas inferiores a -20 °C y a la oscuridad tiene un tiempo de estabilidad de 3 meses.
%CV Precisión		$\leq 30\%$ CV
%Recuperación		-50% a +20% (<1.00 $\mu\text{g/kg}$) -30% a +10% (>1.00 $\mu\text{g/kg}$)
Límites Críticos	CCα	< 3.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MRPL
	CCβ	≤ 3.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MRPL

Los resultados obtenidos cumplen con los objetivos de validación

El presente método queda validado para uso en el laboratorio, por las personas calificadas para ello.

Guayaquil, 15 diciembre del 2015.

Responsable de la actividad: Q.F. July Sáenz Serrano

	INFORME DE VALIDACIÓN HIDROXIDIMETRIDAZOL	
---	--	---

CUANTITATIVO <input checked="" type="checkbox"/> X CUALITATIVO <input type="checkbox"/> DE IDENTIFICACIÓN <input type="checkbox"/>	Analito: HMMNI Unidades: $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (ppb) Matriz: Tejido de camarón
---	---

FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL	RANGOS DE ACEPTACIÓN	OBSERVACIONES
r^2	≥ 0.99	Ver cálculos en hoja Excel
m (b)	0.789 a 1.213	
Lo (a)	-0.2331 a 0.6708	
%CV S _{y/x}	≤ 10.0	

Concentración ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)		Repetibilidad			Reproducibilidad			%recuperación	U _{k=2} ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	% U	
Nivel	Media	Sr	%CV _r	Limite r ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	S _R	%CV _R	Limite R ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)				
Nivel I 0.50	0.51	0.014	2.7	0.04	0.015	2.8	0.04	103.0	0.09	18.0	
Nivel II 3.00	3.02	0.0651	2.2	0.18	0.0686	2.3	0.19	100.8	0.43	14.2	
Nivel III 7.00	7.15	0.113	1.577	0.31	0.134	1.9	0.37	102.1	0.95	13.6	
Límite Críticos		CC α ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)					CC β ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)				
		0.20					0.35				

INTERVALO DE TRABAJO VALIDADO: 0.50 - 7.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (ppb)

Selectividad/Especificidad	El método analítico, no presenta interferencia con los constituyentes de la matriz, compuestos químicamente relacionados u otras sustancias	
Robustez	El método es robusto a ligeros cambios. Temperatura evaporación:40-50 °C Cantidad de sal (efecto salino): 4 g (NaCl: Na2SO4). Sin cambios en el gradiente cromatográfico y monitoreo reacción múltiple.	
Estabilidad	Solución	Las soluciones de estándares de trabajo utilizadas en la fortificación de las matrices tienen una duración de 2 meses, almacenadas en la oscuridad y a 4 °C.
	Matriz	El tejido de camarón almacenado a temperaturas inferiores a -20 ° C y a la oscuridad tiene un tiempo de estabilidad de 3 meses.
%CV Precisión		≤ 30 %CV
%Recuperación		-50% a +20% (<1.00 $\mu\text{g/kg}$) -30% a +10% (>1.00 $\mu\text{g/kg}$)
Límites Críticos	CCα	< 3.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MRPL
	CCβ	≤ 3.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MRPL
Los resultados obtenidos cumplen con los objetivos de validación		

El presente método queda validado para uso en el laboratorio, por las personas cualificadas para ello.

Guayaquil, 15 diciembre del 2015.

Responsable de la actividad:

Q.F. Jully Sáenz Serrano

	INFORME DE VALIDACIÓN IPRONIDAZOL	
---	--	---

CUANTITATIVO <input checked="" type="checkbox"/> X CUALITATIVO <input type="checkbox"/> DE IDENTIFICACIÓN <input type="checkbox"/>	Analito: IPZ Unidades: $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (ppb) Matriz: Tejido de camarón
---	---

FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL	RANGOS DE ACEPTACIÓN	OBSERVACIONES
r^2	≥ 0.99	Ver cálculos en hoja Excel
m (b)	0.567 a 0.981	
Lo (a)	-0.1090 a 0.4154	
%CV S _{y/x}	≤ 10.0	

Concentración ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)		Repetibilidad			Reproducibilidad			%recuperación	U _{k=2} ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	% U	
Nivel	Media	Sr	%CV _r	Limite r ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	S _R	%CV _R	Limite R ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)				
Nivel I 0.50	0.49	0.018	3.6	0.05	0.019	3.8	0.05	98.1	0.06	12.9	
Nivel II 3.00	3.04	0.058	1.9	0.16	0.073	2.38	0.20	101.4	0.35	11.5	
Nivel III 7.00	7.16	0.232	3.2	0.64	0.232	3.2	0.64	102.2	0.19	0.32	
Límite Críticos		CCα ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)					CCβ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)				
		0.19					0.32				

INTERVALO DE TRABAJO VALIDADO: 0.50 - 7.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (ppb)

Selectividad/Especificidad	El método analítico, no presenta interferencia con los constituyentes de la matriz, compuestos químicamente relacionados u otras sustancias			
Robustez	El método es robusto a ligeros cambios. Temperatura evaporación:40-50 °C Cantidad de sal (efecto salino): 4 g (NaCl: Na2SO4). Sin cambios en el gradiente cromatográfico y monitoreo reacción múltiple.			
Estabilidad	Solución	Las soluciones de estándares de trabajo utilizadas en la fortificación de las matrices tienen una duración de 2 meses, almacenadas en la oscuridad y a 4 °C.		
	Matriz	El tejido de camarón almacenado a temperaturas inferiores a -20 ° C y a la oscuridad tiene un tiempo de estabilidad de 3 meses.		
%CV Precisión	Los resultados obtenidos cumplen con los objetivos de validación			
%Recuperación				
Límites Críticos			CCα	$< 3.00 \mu\text{g.kg}^{-1}$ MRPL
			CCβ	$\leq 3.00 \mu\text{g.kg}^{-1}$ MRPL

El presente método queda validado para uso en el laboratorio, por las personas cualificadas para ello.

Guayaquil, 15 diciembre del 2015.

Responsable de la actividad;

Q.F. July Sáenz Serrano

ANEXO E: CERTIFICADO DE ANÁLISIS DEL MATERIAL DE REFERENCIA ERM-BB124



CERTIFICATE OF ANALYSIS

ERM[®] - BB124 N° . 59

PORK MUSCLE		
Nitroimidazoles in the reconstituted material ¹⁾	Mass fraction	
	Certified value ³⁾ [µg/kg]	Uncertainty ⁴⁾ [µg/kg]
Ronidazole (RNZ) ²⁾	2.09	0.25
Metronidazole (MNZ) ²⁾	1.93	0.15
2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole (HMMNI) ²⁾	0.69	0.09
Hydroxymetronidazole (MNZOH) ²⁾	6.2	0.9
Hydroxyipronidazole (IPZOH) ²⁾	1.67	0.12
<p>1) Values are applicable to the material when reconstituted according to the specified procedure (page 3). 2) The measurand is defined by quantification with liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry. Different sample preparation procedures (extraction and clean-up) were applied. 3) The certified values are the unweighted mean of 11 - 12 accepted set of results, independently obtained in 10 - 11 laboratories, using the calibration solution provided. The values are traceable to the International System of Units (SI). 4) Expanded uncertainty with a coverage factor k = 2 corresponding to a level of confidence of about 95 % estimated in accordance with the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM), ISO, 1995.</p>		
Nitroimidazole in the reconstituted material ¹⁾	Mass fraction	
	Certified value ³⁾ [µg/kg]	
Dimetridazole (DMZ) ²⁾	< 0.25	
<p>1) Values are applicable to the material when reconstituted according to the specified procedure (page 3). 2) The measurand is defined by quantification with liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry. 3) This value corresponds to the limit of quantification (LOQ) of the most sensitive method in the characterisation study. With a probability of 95% the certified value is below 0.25 µg/kg. The value is traceable to the International System of Units (SI).</p>		

This certificate is valid for one year after purchase.

Sales date: 16 JAN 2012

The minimum amount of sample to be used is 5 g reconstituted material (prepared using 1.25 g of powder).

Accepted as an ERM[®], Geel, October 2008

Signed: _____

Prof. Dr. Hendrik Emons
 Unit for Reference Materials
 EC-JRC-IRMM
 Retieseweg 111
 2440 Geel, Belgium

