



Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales y Agrimensura

**Análisis de principios activos de productos antiparasitarios externos en
muestras de baños por inmersión por Cromatografía Líquida de Alta precisión
(HPLC)**

Alumno: Contreras, Fabian Nicolás

Directora de trabajo: Dra. Laura Lozina

Asignatura: Prácticas Optativas Resolución N° 1436/19 D.

Lugar de desarrollo: Laboratorio de Analítica, Cátedra de Farmacología y
Toxicología, FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS, UNNE

OBJETIVOS:

Generales:

- Promover el desarrollo de competencias, destrezas y habilidades en técnicas analíticas para la determinación de pesticidas en muestras de Baños de inmersión.

Específicos:

- Consolidar las capacidades para llevar adelante técnicas analíticas para la determinación de drogas de interés veterinario.
- Introducir al alumno en el uso de técnicas analíticas por cromatografía líquida.
- Promover el manejo y la interpretación de datos producidos en el laboratorio de analítica.
- Profundizar conocimientos sobre los fundamentos de los equipos de Cromatografía Líquida de alta Precisión.
- Realizar la validación mediante ensayo de recuperación, de una técnica analítica para el dosaje de amitraz mediante HPLC teniendo en cuenta los requisitos de ingreso a la red de laboratorios de SENASA.
- Realizar el estudio de linealidad.
- Analizar estadísticamente los resultados obtenidos.

INTRODUCCIÓN:

Con el fin de adquirir destrezas en otras técnicas analíticas fuera del ámbito clínico surgió la posibilidad de realizar mis Práctica Electivas en el “Laboratorio de Analítica” de la Catedra de Farmacología y Toxicología, FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS, UNNE. El mismo contempla la adquisición de destreza en el uso de equipos de HPLC mediante la ejecución y validación de una técnica para determinar la concentración de Amitraz en muestras de baños de inmersión.

Para validación de la técnica de dosaje de amitraz actualmente utilizada por el equipo de investigación del laboratorio de analítica dependiente de la Catedra de Farmacología y Toxicología, dirigido por la Dra. Laura Lozina, se tendrá en cuenta los requerimientos de la Dirección General de laboratorios y control técnico de SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Animal).

La utilización de acaricidas químicos es la principal herramienta disponible en la actualidad para el control de la garrapata común del bovino. La técnica de aplicación basada en los baños de inmersión constituye, en ausencia de resistencia a los productos utilizados, un método eficaz y de bajo costo¹.

El Amitraz es un acaricida ampliamente utilizado en la industria ganadera para el control de garrapatas. En nuestro país, se comercializa como un concentrado emulsionable que se emplea en la preparación de bañaderos.

Como parte del control del proceso, continuamente se realizan muestreos y determinaciones de los niveles de Amitraz para evaluar el grado de agotamiento de los baños (stripping).

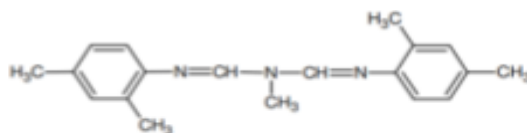
Para determinar la concentración de Amitraz en las muestras de agua de bañadero se utilizan técnicas de HPLC. Con la finalidad de brindar datos veraces, confiables y de fácil interpretación para los clientes del laboratorio es necesaria la validación del método analítico utilizado.

MARCO TEÓRICO:

La garrapata común del bovino *Rhipicephalus microplus* es un ectoparásito hematófago. Esta garrapata produce pérdidas físicas directas en los animales, como disminución en la ganancia de peso, daño de los cueros, mortalidad y menor producción láctea, a lo que se suman los costos relacionados a su control (productos garrapaticidas, mano de obra, infraestructura de bañaderos) y las pérdidas asociadas a la transmisión de enfermedades, debido a que *R. (B.) microplus* es el vector exclusivo de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, agentes causales de la babesiosis bovina. En la Argentina, se la encuentra principalmente en las provincias de Salta, Tucumán, Jujuy, Santiago del Estero, Santa Fe, Córdoba, Catamarca, Formosa, Misiones, Entre Ríos, Corrientes y Chaco¹

La utilización de acaricidas químicos es la principal herramienta disponible en la actualidad para el control de la garrapata común del bovino. La técnica de aplicación basada en los baños de inmersión constituye, en ausencia de resistencia a los productos utilizados, un método eficaz y de bajo costo. El manejo incorrecto de los baños (instalaciones deficientes, errores en la preparación y en la reposición y refuerzo del producto, acumulación de costras y sedimentos por mala limpieza, ausencias de controles periódicos del nivel del baño, animales incorrectamente sumergidos) actúa en detrimento de la eficacia de esta herramienta¹.

Las formamidinas son compuestos con un amplio espectro de actividad biológica, con efectos bactericidas y antiprotozoarios, pasando por propiedades funguicidas, antihelmínticas y herbicidas, hasta acciones insecticidas y acaricidas con actividad de contacto sobre todo contra garrapatas, ácaros y piojos. En nuestro país, se comercializa el Amitraz (N-metil-bis-(2,4-xililiminometil)-amina), un acaricida ampliamente utilizado en la industria ganadera para el control de garrapatas, como un concentrado emulsionable que se emplea en la preparación de bañaderos.



Estructura Química del
Amitraz

Un inconveniente del amitraz es que es inestable en los bañaderos de inmersión y debe ser estabilizado con cal (CaO), y luego de varios usos se debe recargar el baño hasta alcanzar la carga inicial.

Para realizar un correcto refuerzo de los baños, se debe conocer la concentración de amitraz en las agua de bañadero, para realizar esta determinación se utilizan técnicas de cromatografías (HPLC). Las muestras derivadas al laboratorio

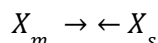
poseen resto de materia orgánica, como pastos, pelos de animales, etc., además de barro y restos de materia fecal por lo que deben someterse a un proceso de limpieza antes de inyectarse al equipo.

Cromatografía:

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define a las técnicas cromatográficas como: *“cromatografía es un método físico de separación, en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una estacionaria (fase estacionaria) y otra que se mueve (fase móvil) en una dirección definida”*³.

Los dos tipos principales de cromatografía, en la actualidad, son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos (LC). Si bien los mecanismos de retención en los diversos tipos de cromatografía difieren, todos se basan en establecer un equilibrio entre una fase estacionaria y una fase móvil.

Si se coloca un pequeño volumen de la muestra en la parte superior de la columna, llena con partículas cromatográficas (fase estacionaria) y disolvente. Y luego se agrega la fase móvil de disolvente a la columna y se deja que salga lentamente por su parte inferior los componentes individuales interactúan con la fase estacionaria con diversas intensidades:



El equilibrio de distribución se define con la constante de distribución:

$$K_c = \frac{[X_s]}{[X_m]}$$

Donde $[X_s]$ es la concentración del componente X sobre o en la fase estacionaria, y $[X_m]$ es su concentración en la fase móvil. Esta constante de equilibrio está gobernada por la temperatura, la naturaleza química del compuesto y las fases estacionaria y móvil. Los compuestos con un valor grande de K_c serán retenidos con mayor fuerza por la fase estacionaria que los que tienen un valor pequeño. Como resultado, estos últimos avanzarán por la columna (serán eluidos) con mayor rapidez⁴.

En la cromatografía moderna se coloca un detector al final de la columna que mida automáticamente los compuestos eluidos.

La cromatografía de líquidos clásica ha sido sustituida en gran medida por la técnica, mucho más poderosa y analíticamente útil, de cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

La rapidez de distribución de los solutos entre la fase estacionaria y la fase móvil, en la cromatografía de líquidos, está controlada por difusión principalmente. Para minimizar la difusión y el tiempo requerido para el movimiento de los componentes de la muestra hacia los sitios de interacción en la columna y desde

éstos, deben satisfacerse dos criterios. El primero es que el material de empaque debe estar finamente dividido y tener una alta regularidad esférica para permitir una óptima homogeneidad y densidad de empaque; en segundo lugar, la fase estacionaria debe estar en forma de una película delgada y uniforme, sin lugares para el estancamiento.

La fase estacionaria está formada por partículas esféricas que pueden empacarse de forma homogénea, estas son partículas de sílice de alta pureza con diámetros típicos que van desde los 5 μm a 10 μm y los tamaños de los poros entre partículas van desde los 60-100 Å^4 .

La mayor parte de las separaciones con HPLC se lleva a cabo en el modo líquido-líquido (cromatografía de partición). Las fases estacionarias líquidas se encuentran cubriendo a las partículas o químicamente enlazadas. Las fases no polares enlazadas más comunes (para cromatografía de fase inversa) son las que poseen C18 y C8; el más utilizado es C18 (llamado ODS, de octadecilsilano).

Como fase móvil se usan mezclas de solventes porque en la mayor parte de las aplicaciones, con un disolvente puro no se obtendrá la separación eficiente de una serie de compuestos, y deberá usarse una formulación con dos o más disolventes. Para obtener los porcentajes óptimos de los disolventes se pueden hacer tanteos.

En la cromatografía de fase normal la fase estacionaria es polar y se usa una fase móvil no polar, como n-hexano, cloruro de metileno o cloroformo. La fase estacionaria es un siloxano unido con un grupo funcional polar (orden de polaridad: ciano < diol < amino < dimetilamino). Esas fases retienen compuestos polares preferentemente a compuestos no polares.

En la cromatografía de fase inversa se usa una fase estacionaria relativamente no polar, y la fase móvil polar es, por ejemplo, metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, agua o, con frecuencia, una mezcla de agua con uno de los disolventes orgánicos. El disolvente orgánico se llama modificador, y el más común es acetonitrilo. El contenido de agua se hace variar para ajustar la polaridad. Con los compuestos ácidos se usa metanol, y para los básicos se usa acetonitrilo. El tetrahidrofurano se usa para los que tienen grandes dipolos. Estos disolventes son transparentes al UV y tienen poca viscosidad. Las fases enlazadas más comunes son cadenas de n-octadecilo (C18) o n-octilo (C8), o grupos fenilo. Las columnas polares, de fase inversa, como polietilenglicol (PEG) contienen grupos éter que interactúan con analitos polares. Se usan para analizar compuestos fenólicos y poliaromáticos con grupos hidroxil⁴.

Equipo para HPLC⁴:

Un aparato de cromatografía de líquidos de alta eficiencia se compone de cuatro partes principales:

1. *Sistema de suministro de fase móvil.* Este sistema tiene una bomba para llegar a las altas presiones que se requieren, y suele contener algún medio para producir un gradiente de elución (es decir, cambiar concentraciones del eluyente).
2. *Sistema de inyección de muestra.* Las muestras se pueden introducir en forma manual a la válvula con una jeringa que llena el circuito de la muestra. Hoy se usan, de manera sistemática, válvulas automáticas de muestreo en las que las muestras se toman de un muestreador automático.
3. *Columna.* Son de varios diámetros y longitudes, los cuales dependen de la aplicación. En general, el diámetro interno tiene 3.9 o 4.6 mm.
4. *Detector.* En la cromatografía de líquidos de alta eficiencia se requieren detectores con gran sensibilidad, en general para cantidades de microgramos a nanogramos. Los detectores que más se usan son refractómetros y detectores de ultravioleta (UV) pero existen otros como los detectores de fluorescencia de utilidad limitada por ser menos los compuestos que fluorescen. El detector ultravioleta tiene mucho mejor sensibilidad, alrededor de 10^8 g/mL (0.01 ppm). No es sensible a la temperatura, cuesta relativamente poco y se puede usar con gradiente de elución. Es sensible a una gran cantidad de compuestos orgánicos. Una característica común de los instrumentos de HPLC es un detector de serie de diodos.

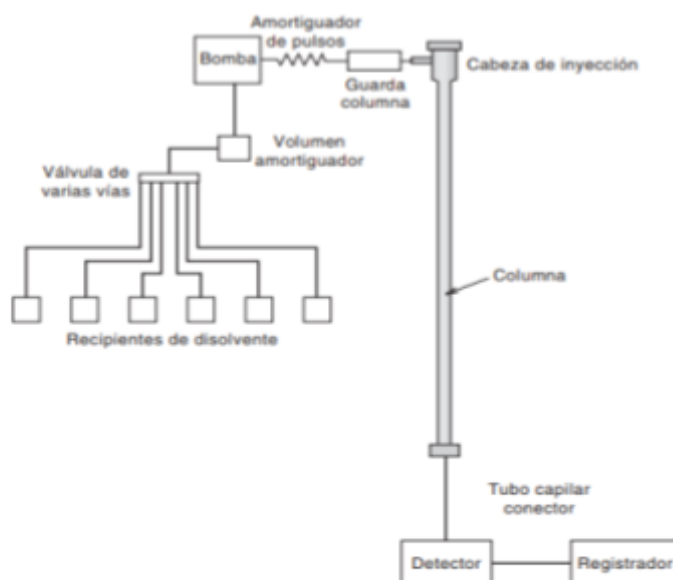


Imagen extraída: Garay D. C. (2009) "Química Analítica". Traducido de la sexta edición de: Analytical Chemistry. México D.C, México. Ed. Mc Graw Hill.

Validación:

Validar un método es básicamente el proceso para definir un requisito analítico, y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas⁵.

Cuando los clientes solicitan trabajos analíticos a un laboratorio, se supone que el laboratorio tiene un grado de conocimiento técnico que los clientes no tienen. El cliente espera confiar en los resultados recibidos. Así, el laboratorio y su personal tienen la responsabilidad de brindar confianza al cliente, proporcionando una respuesta correcta a la parte analítica del problema, en otras palabras, demostrar la ‘adecuación al uso’⁵.

Tabla 1 – Definiciones del concepto de ‘validación’ en ISO 9000, ISO/IEC 17025 y VIM

Definición	Referencia
confirmación, a través de la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para un uso o aplicación específico previsto	ISO 9000 [9] ^a
confirmación, a través del examen y aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto	ISO/IEC 17025 [1]
verificación, donde los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto	VIM [7] ^b
^a ISO 9000 define ‘proceso de calificación’, como “el proceso para demostrar la capacidad de cumplir los requisitos especificados” ^b VIM define ‘verificación’ como “aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados”	

Tabla extraída de: “Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016). Disponible en www.eurachem.org”

Un método debe ser validado cuando es necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto. Por ejemplo, se indica en las Norma ISO/IEC 17025 que el laboratorio debe validar⁵:

1. métodos no normalizados
2. métodos diseñados/desarrollados por el laboratorio.
3. métodos normalizados usados fuera de su ámbito de aplicación.
4. ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados.

El OAA (Organismo Argentino de Acreditación) establece que todo proceso de validación consta de tres pasos⁶:

1. Establecimiento de las condiciones a cumplir.
2. Determinación de los parámetros estadísticos del procedimiento.
3. Evaluación de los resultados de la validación por comparación de los parámetros estadísticos obtenidos con las condiciones establecidas previamente y toma de decisión sobre la validez del procedimiento para el propósito establecido.

Las especificaciones y alcances del método y por lo tanto de la validación pueden ser fijados por el cliente, un organismo oficial (en nuestro caso SENASA), o bien, deben ser definidos por el responsable del ensayo de manera científica y confiable.

Los parámetros típicos a evaluar durante una validación de un método de ensayo pueden ser los siguientes:

- Selectividad
- Linealidad
- Límite de Detección
- Límite de Cuantificación
- Precisión (repetibilidad y/o precisión intermedia).
- Veracidad (a veces llamada exactitud).
- Rango de trabajo
- Robustez

Cuando los requisitos de datos están mal concebidos o son irreales, las mediciones analíticas pueden ser innecesariamente costosas si el método seleccionado es más exacto de lo que se requiere, o pueden ser inadecuadas si el método es menos exacto de lo que se necesita, o de valor cuestionable si no se conoce la exactitud del método. El primer paso en el desarrollo y validación de métodos es el establecimiento de requisitos mínimos, que esencialmente son las especificaciones del método para el propósito que se persigue. ¿Qué tan exacto y preciso tiene que ser? ¿Cuál es la concentración que se tiene como objetivo?

No siempre es posible evaluar todos los parámetros por limitaciones económicas, de insumos, riesgos, o bien por falta de tiempo. Los parámetros mínimos que deben ser evaluados son la selectividad del método, linealidad, exactitud y sensibilidad.

Important Validation Characteristics For Various Assay Types

(International Conference on Harmonisation: Draft Guidelines on Validation Procedures for Pharmaceuticals; Availability)

Type of Assay Requirement	Identification	Impurity Test		Content or Potency
		Quantitative	Limit	
Accuracy	-	+	-	+
Precision:				
Repeatability	-	+	-	+
Intermediate	-	+	-	+
Reproducibility	-	-	-	-
Specificity	+	+	+	+
Detection Limit	-	+	+	-
Quantitation Limit	-	+	-	-
Linearity	-	+	-	+
Range	-	+	-	+

- = not normally evaluated + = normally evaluated

(1) may be needed in some cases (2) may not be needed in some cases

(3) if reproducibility has been performed, intermediate is not needed.

Figure 8. Important Validation Characteristics for Various Assay Types per the International Conference on Harmonization (ICH), reference 8.**MATERIALES Y MÉTODO:**

Reactivos: Acetonitrilo, grado HPLC (Biopack) y (J.T Backer); Agua, grado HPLC (obtenida por osmosis inversa); Acetato de Amonio 0.1 M (Biopack, Merck, Cicarelli); Oxido de Calcio (Estabilizante del producto comercial Garramix® provisto por el laboratorio Biogénesis Bagó S.R.L.).

Patrón: Nombre: Amitraz Origen: Vetanco S.A. Lote: 118523 Pureza: 98,6%

Droga Comercial: Garramix®

Materiales: Tubos cónicos con tapa a rosca Corning/Falcon de 50 mL; Gradilla para tubos cónicos; Micropipeta de 10 mL y de 1000 uL ó pipeta aforada de 10 mL y de 1 mL; Rack con tips 10 mL y de 1000 uL; Vasos de precipitados de 50 mL o 100 mL; Viales de vidrio para HPLC con septos de goma siliconada/teflón y tapa a rosca, de 2 mL de capacidad; Filtros de jeringa de 25 mm de diámetro, 0.22 µm de tamaño de poro y membrana de Nylon; Jeringas de 5mL o 10mL, Columna: Shim-Pack XR-ODS II, de 100 mm de largo x 3 mm de diámetro interno x 2.2 µm.

Equipos: Vórtex "D-Lab"; Centrífuga Digital "Rolco 2036" con cabezal doble (tubos de 15 y 50 mL); Peachímetro digital "Adwa" y Tiras medidoras de pH de rango variable (0-14)." MQuants"; Balanza Granataria de hasta 200 g "OHAUS Traveler"; Balanza analítica "Radwag"; Equipo de filtración al vacío "Glassco"; Lavador ultrasónico "Arcano"; Cromatógrafo líquida de ultra alta resolución (UHPLC): Shimadzu, modelo Prominence Serie 20A, fabricado en Japón. N/P 03-127.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el Software Microsoft Excel 2013.

Procedimiento:

El método a validar consiste en la Homogenización de la muestra de pie de baño. Luego se somete a un proceso de extracción a 10 mL de muestra en tubo cónico con 10 mL de acetonitrilo. Tapar y homogeneizar durante un minuto en el vórtex. Centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos. Se toma 1 mL del sobrenadante y mezclar con 9 mL de Fase Móvil: acetonitrilo + acetato de amonio 0.1 M (80:20). Y por último se filtra las soluciones con filtro de jeringa 0.22 μm de Nylon, eliminando las primeras porciones y enjuagando el vial donde se va a colocar. Poner los viales en el HPLC y medir con el detector PDA. Medir el pH de la muestra.

Condiciones cromatograficas:

Las condiciones cromatograficas fueron: Volumen de inyección: 20 μL . Fase móvil: acetonitrilo: acetato de amonio 0.1 M (80:20). Flujo: 0.7 mL/min. Temperatura de horno: 45 °C. Detector: Photodiode Array UV-Vis Detector, Shimadzu SPD-M20A, Longitud de onda de detección: 290 nm.

Preparación de las muestras de Garramix®:

Se preparó una solución madre de 500 ppm a partir del producto comercial Garramix®, según indicaciones de uso. Luego se efectuaron diluciones a fin de obtener las siguientes concentraciones: 375 ppm; 312,5 ppm; 250 ppm; 187,5 ppm y 125 ppm cada una por quintuplicado.

Se transfirió 1 mL de cada una de las soluciones anteriores a un matraz de 10 mL y se llevó a volumen con fase móvil. Las soluciones así obtenidas se filtraron con filtros de membranas de nylon 0,22 μm , se cargaron en los viales para su lectura en el equipo de UHPLC.

Preparación de la solución patrón:

Se pesó 25 mg de Amitraz, (pureza de 98,6%) y se diluyó con Acetonitrilo en matraz de 50 mL, para obtener una solución madre de 500 ppm (Estable por un período de 24 hs). Luego se realizaron diluciones para obtener las siguientes concentraciones 375ppm; 312,5ppm; 250ppm; 187,5ppm y 125ppm, cada una por triplicado. Por ultimo en matraces de 10 mL, colocar 1mL de cada solución y llevar a volumen final con fase móvil.

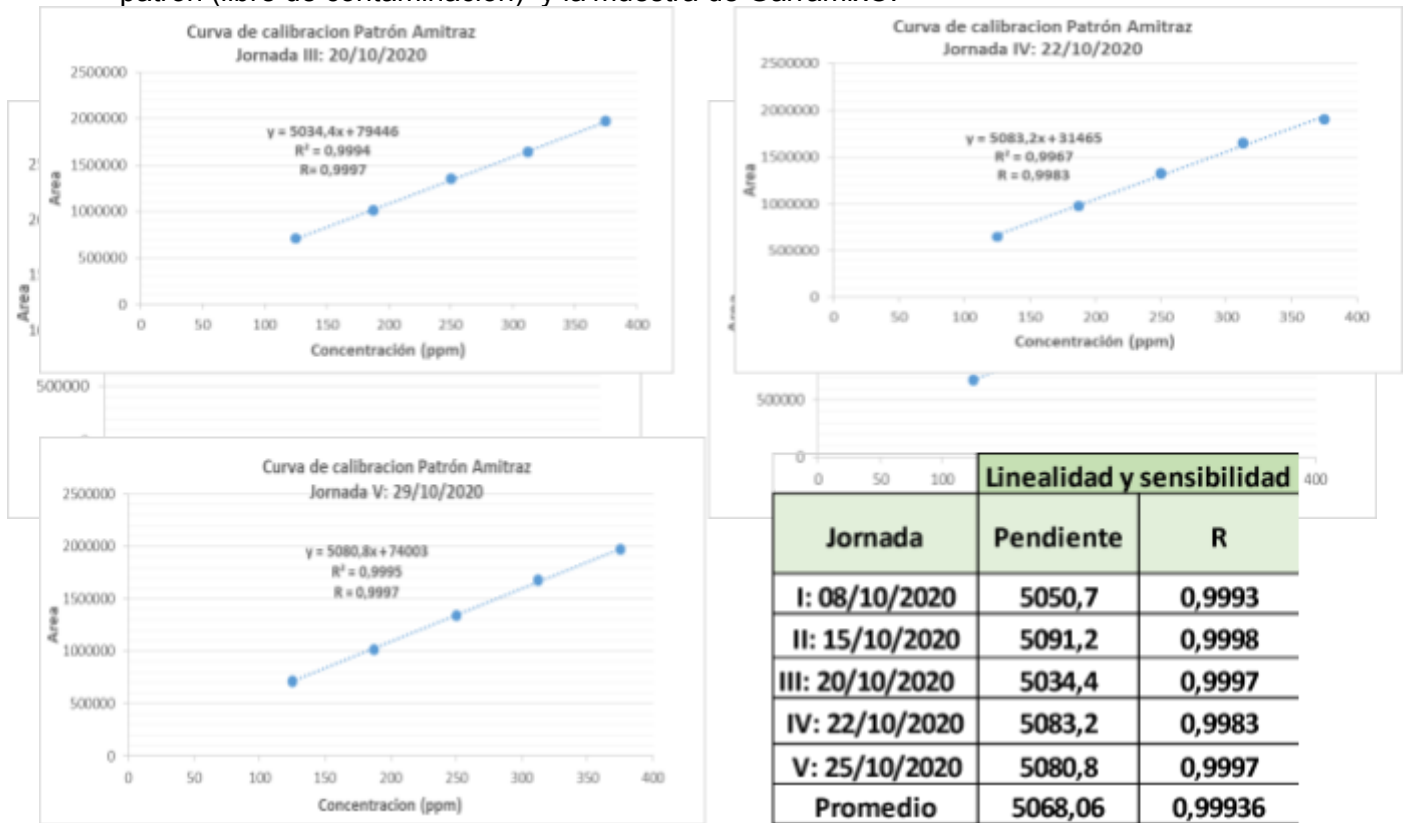
RESULTADOS:

Estudio de linealidad, sensibilidad, y especificidad²:

Se inyectaron cinco (5) niveles de concentración de Amitraz patrón: 375ppm; 312,5ppm; 250ppm; 187,5ppm y 125ppm por triplicado. Se realizó la integración de las señales cromatográficas, se obtuvo el área bajo la curva, la cual depende de la concentración del patrón. Con esta información se efectuó el tratamiento estadístico de los datos, determinando ecuación de la recta, pendiente (nos da la sensibilidad),

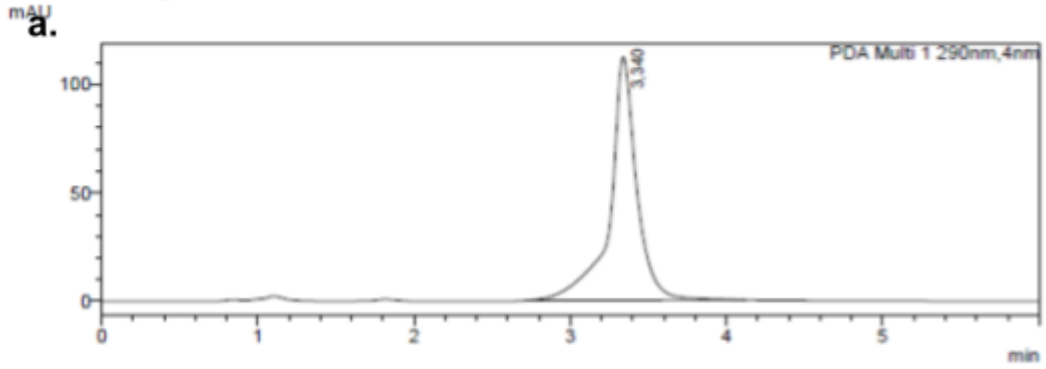
coeficiente de correlación y coeficiente de variación porcentual para cada nivel de concentración (Esto se efectuó para cinco jornadas de trabajo diferente).

Para determinar la especificidad, se realizó el barrido espectral (180-800 nm) para cada una de las concentraciones obteniéndose así los espectros de absorción. Se comparan los cromatogramas y los espectros de absorción de las soluciones patrón (libre de contaminación) y la muestra de Garramix®.

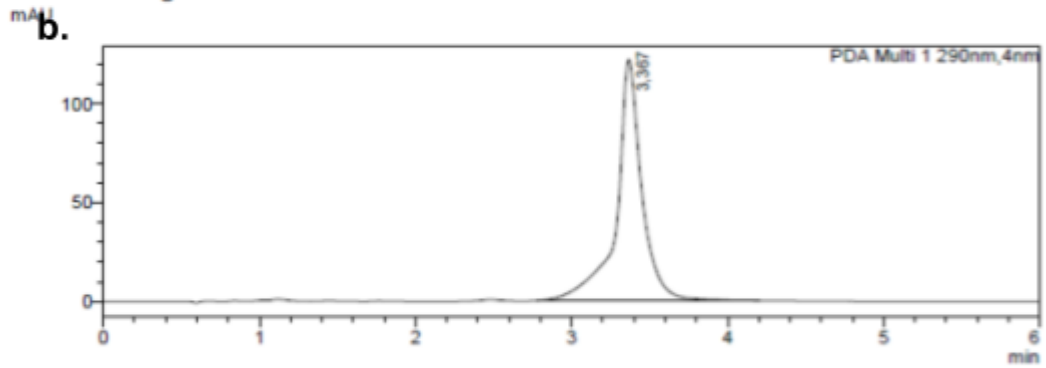


Especificidad:

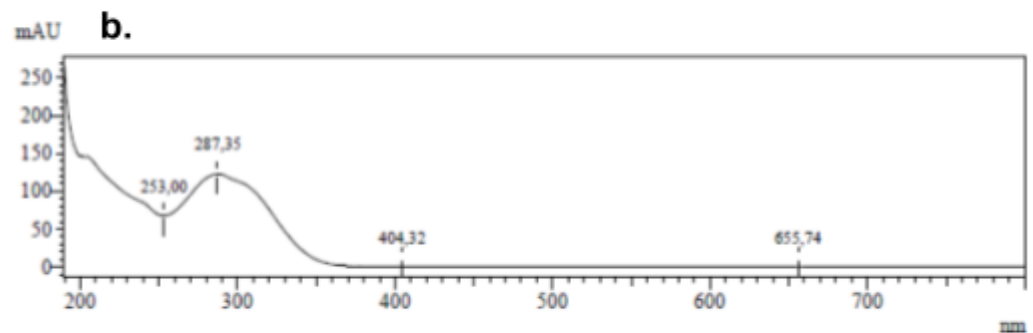
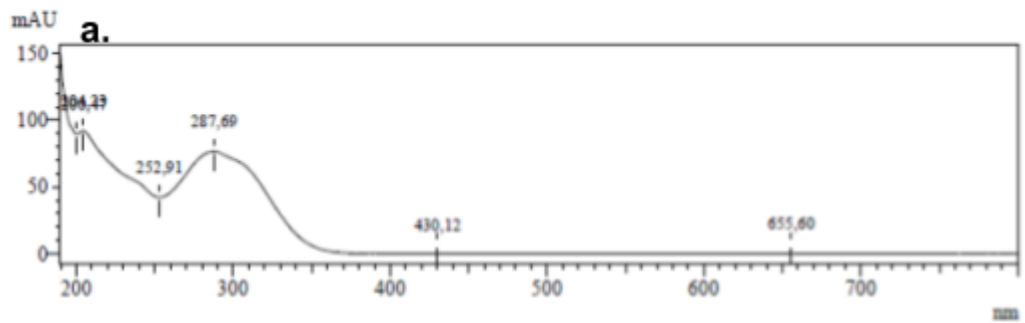
< Chromatogram >



< Chromatogram >



Cromatograma: a. 250 ppm patrón b. 250 ppm muestra Garramix.



Espectro UV: a. 250 ppm patrón. b. 250 ppm muestra Garramix

La comparación de espectros y cromatogramas se realizaron para cada concentración y las cinco jornadas de trabajo, a modo de ejemplo se eligieron los cromatogramas a la concentración al 100% de trabajo (250ppm) –los cromatogramas y espectros de las otras jornadas de trabajo y concentraciones se adjuntan en el anexo I. El promedio del tiempo de retención de todas las concentraciones y para cada jornada de trabajo fue: I: 3,345 min; II: 3,345 min; III: 3,345 min; III: 3,345 min; IV: 3,345 min; V: 3,345 min.

Precisión y Exactitud (veracidad)²:

Se corrieron las muestras en sentido ascendente de concentración (125ppm; 187,5ppm; 250ppm; 312,5ppm; 375ppm). La precisión se evaluó a través de la precisión del sistema cromatográfico. Los criterios de aceptación fueron: CV% menor o igual que 2% para la precisión del sistema y para la repetibilidad es un CV% menor o igual que 10% para cada concentración. Para la exactitud, el Er% debe ser menor al 10% para cada concentración.

Precisión del sistema cromatográfico:

Fue determinada sobre 3 repeticiones del patrón a las diferentes concentraciones y se realizó para las 5 jornadas de trabajo. Los valores de coeficiente de variación, tanto para el tiempo de retención como para el área son inferiores al 2%, lo cual demuestra que el método cumple con los criterios establecidos por SENASA² para la precisión del sistema.

Jornada I: 08/10/2021								
Conc.(ppm)	areas	promedio	desviación estandar	CV %	Tiempo de retencion (min)	Tiempo de retencion promedio	desviación estandar	CV %
125	710007				3,335			
125	710362	710187	178	0,025	3,338	3,34	0,003	0,090
125	710193				3,341			
187,5	998090				3,347			
187,5	996465	995104	3851	0,387	3,346	3,35	0,001	0,030
187,5	990757				3,345			
250	1351813				3,34			
250	1352514	1350350	3161	0,234	3,344	3,34	0,003	0,079
250	1346722				3,345			
312,5	1669156				3,348			
312,5	1668119	1666005	4590	0,275	3,346	3,35	0,002	0,060
312,5	1660739				3,344			
375	1950066				3,355			
375	1950627	1953080	4743	0,243	3,349	3,35	0,004	0,113
375	1958547				3,348			

Jornada II: 15/10/2021								
Conc.(ppm)	areas	promedio	desviación estandar	CV %	Tiempo de retencion (min)	Tiempo de retencion promedio	desviación estandar	CV %
125	675887				3,335			
125	670836	672679	2788	0,41	3,338	3,34	0,003	0,090
125	671314				3,341			
187,5	1000600				3,347			
187,5	996900	997575	2750	0,276	3,346	3,35	0,001	0,030
187,5	995226				3,345			
250	1303560				3,34			
250	1297724	1297204	6632	0,511	3,344	3,34	0,003	0,079
250	1290327				3,345			
312,5	1620688				3,348			
312,5	1619555	1620174	574	0,035	3,346	3,35	0,002	0,060
312,5	1620280				3,344			
375	1952500				3,355			
375	1958562	1952378	6246	0,320	3,349	3,35	0,004	0,113
375	1946072				3,348			

Jornada III: 20/10/2021								
Conc.(ppm)	areas	promedio	desviación estandar	CV %	Tiempo de retencion (min)	Tiempo de retencion promedio	desviación estandar	CV %
125	709980				3,335			
125	710030	710279	475	0,07	3,338	3,34	0,003	0,090
125	710827				3,341			
187,5	1019449				3,347			
187,5	1009505	1014217	4992	0,49	3,346	3,35	0,001	0,030
187,5	1013697				3,345			
250	1358257				3,34			
250	1354259	1354422	3756	0,28	3,344	3,34	0,003	0,079
250	1350750				3,345			
312,5	1647903				3,348			
312,5	1639275	1641332	5822	0,35	3,346	3,35	0,002	0,060
312,5	1636818				3,344			
375	1976332				3,355			
375	1967145	1969968,333	5523	0,280	3,349	3,35	0,004	0,113
375	1966428				3,348			

Jornada IV: 22/10/2021								
Conc.(ppm)	areas	promedio	desviación estandar	CV %	Tiempo de retención (min)	Tiempo de retención promedio	desviación estandar	CV %
125	652178				3,335			
125	650252	650999	1033	0,16	3,338	3,34	0,003	0,090
125	650567				3,341			
187,5	982037				3,347			
187,5	977325	978688	2917	0,30	3,346	3,35	0,001	0,030
187,5	976702				3,345			
250	1332192				3,34			
250	1326866	1325960	6791	0,51	3,344	3,34	0,003	0,079
250	1318821				3,345			
312,5	1661751				3,348			
312,5	1653728	1653613	8196	0,50	3,346	3,35	0,002	0,060
312,5	1645361				3,344			
375	1905378				3,355			
375	1906713	1902026	6994	0,37	3,349	3,35	0,004	0,113
375	1893987				3,348			

Jornada V: 29/10/2021								
Conc.(ppm)	areas	promedio	desviación estandar	CV %	Tiempo de retención (min)	Tiempo de retención promedio	desviación estandar	CV %
125	717175				3,335			
125	714381	713297	4518	0,63	3,338	3,338	0,003	0,090
125	708336				3,341			
187,5	1017238				3,347			
187,5	1017705	1017900	779	0,08	3,346	3,346	0,001	0,030
187,5	1018758				3,345			
250	1341106				3,34			
250	1340556	1340802	279	0,02	3,344	3,343	0,003	0,079
250	1340745				3,345			
312,5	1683175				3,348			
312,5	1673716	1678083	4771	0,28	3,346	3,346	0,002	0,060
312,5	1677357				3,344			
375	1971918				3,355			
375	1969569	1970964	1235	0,06	3,349	3,351	0,004	0,113
375	1971406				3,348			

Repetibilidad y Exactitud:

Fueron determinadas sobre 5 repeticiones de la muestra de Garramix a las diferentes concentraciones y se realizó para las 5 jornadas de trabajo. Los valores de coeficiente de variación, para cada concentración obtenida a partir del área del cromatograma y la curva de calibración de los patrones. El CV% fue menor al 10% para cada una de las concentraciones, lo cual demuestra que el método cumple con los criterios establecidos por SENASA² para la precisión del método. El error relativo es menor al 10%, esto puede deberse a un error en la preparación de las muestras de Garramix preparadas, a un error en el proceso de extracción y cuantificación o una combinación de ambos, para completar los estudios de exactitud, una vez aprobado el ingreso a la red de laboratorio de SENASA enviaran muestras de concentración conocida que deberán ser procesada por el método propuesto, se considera exacto si la diferencia porcentual (Er%) con respecto al valor nominal del analito es menor o igual que 10% e incorrecto si la diferencia porcentual (Er%) con respecto al valor nominal del analito es mayor que 10%.

Jornada I: 08/10/2021						
Concentración teórica (ppm)	Áreas muestras de Garramix	Concentración calculada (ppm)	Cocentación promedio (ppm)	DS (conc.)	CV (%) (conc.)	Error relativo (%) ^a
125	718755	131,95				
125	705518	131,32				
125	718990	132	131,65	0,57	0,44	5,32
125	719841	132,17				
125	709939	130,8				
187,5	1049776	193,53				
187,5	1043001	192,19				
187,5	1048679	193,32	192,12	1,38	0,72	2,50
187,5	1033056	190,22				
187,5	1038612	191,33				
250	1387883	260,48				
250	1384502	259,81				
250	1386894	260,29	259,81	0,60	0,23	3,92
250	1380450	259,01				
250	1382831	259,48				
312,5	1715943	339,74				
312,5	1711111	338,79				
312,5	1722591	341,06	339,84	0,85	0,25	8,75
312,5	1718172	340,18				
312,5	1714307	339,42				
375	2022844	400,5				
375	2023477	400,63				
375	2003383	396,65	398,29	2,08	0,52	6,21
375	2004459	396,87				
375	2004082	396,79				

Jornada II: 15/10/2021						
Concentración teórica (ppm)	Áreas muestras de Garramix	Concentración calculada (ppm) ^a	Cocentación promedio (ppm)	DS (ppm)	CV (%)	Error relativo (%) ^a
125	710729	132,68				
125	710384	132,62				
125	709717	132,49	132,56	0,14	0,10	6,05
125	710552	132,65				
125	709019	132,35				
187,5	1038914	197,15				
187,5	1034175	196,21				
187,5	1030430	195,48	196,14	0,72	0,37	4,61
187,5	1030117	195,42				
187,5	1035305	196,44				
250	1356597	259,54				
250	1350547	258,36				
250	1351571	258,55	258,66	0,51	0,20	3,46
250	1350196	258,29				
250	1351578	258,56				
312,5	1750203	336,86				
312,5	1749622	336,74				
312,5	1750997	337,01	336,88	0,11	0,03	7,80
312,5	1750202	336,85				
312,5	1750750	336,96				
375	1997600	385,45				
375	1991011	384,15				
375	1990018	383,96	384,37	0,62	0,16	2,50
375	1989972	383,95				
375	1991869	384,32				

Jornada III: 20/10/2021						
Concentración teórica (ppm)	Áreas muestras de Garramix	Concentración calculada (ppm)*	Cocentación promedio (ppm)	DS (ppm)	CV (%)	Error relativo (%)*
125	697803	122,83				
125	705920	124,44				
125	701210	123,5	123,73	0,62	0,50	1,01
125	702563	123,77				
125	704356	124,13				
187,5	1036539	190,11				
187,5	1031291	189,07				
187,5	1030152	188,84	188,94	0,95	0,50	0,77
187,5	1031922	189,19				
187,5	1023308	187,48				
250	1394111	261,14				
250	1382970	258,92				
250	1382476	258,82	260,18	1,21	0,47	4,07
250	1394793	261,27				
250	1392178	260,75				
312,5	1727592	327,38				
312,5	1726503	327,16				
312,5	1713269	324,53	326,83	1,30	0,40	4,59
312,5	1728170	327,49				
312,5	1728645	327,59				
375	1975473	376,61				
375	1973485	376,22				
375	1974763	376,47	376,35	0,46	0,12	0,36
375	1970512	375,63				
375	1976624	376,84				

Jornada IV: 22/10/2021						
Concentración teórica (ppm)	Áreas muestras de Garramix	Concentración calculada (ppm)	Cocentación promedio (ppm)	DS (ppm)	CV (%)	Error relativo (%)*
125	669894	125,6				
125	672449	126,09				
125	670665	125,75	125,71	0,56	0,45	0,56
125	673321	126,27				
125	665961	124,82				
187,5	1029256	196,29				
187,5	997551	190,05				
187,5	1007793	192,07	191,72	2,85	1,49	2,25
187,5	1004340	191,39				
187,5	991197	188,8				
250	1316207	252,74				
250	1308043	251,14				
250	1271565	243,96	248,15	3,69	1,49	0,74
250	1288092	247,21				
250	1280318	245,68				
312,5	1600110	308,59				
312,5	1618948	312,3				
312,5	1639533	316,35	314,02	3,54	1,13	0,49
312,5	1637158	315,88				
312,5	1642671	316,97				
375	1930179	373,52				
375	1930779	373,64				
375	1933558	374,19	373,97	0,46	0,12	0,39
375	1931801	373,85				
375	1935995	374,67				

Jornada V: 29/10/2021						
Concentración teórica (ppm)	Áreas muestras de Garramix	Concentración calculada (ppm)	Cocentación promedio (ppm)	DS (ppm)	CV (%)	Error relativo (%) ^a
125	704504	124,09				
125	710329	125,24				
125	716190	126,39	125,08	1,22	0,97	0,07
125	714649	126,09				
125	701986	123,6				
187,5	1050249	192,14				
187,5	1057901	193,65				
187,5	1055634	193,2	192,77	0,64	0,33	2,81
187,5	1052517	192,59				
187,5	1050984	192,29				
250	1344621	250,08				
250	1348417	250,83				
250	1323837	245,99	247,68	2,61	1,05	0,93
250	1326701	246,55				
250	1318594	244,96				
312,5	1675974	315,3				
312,5	1652216	310,62				
312,5	1678554	315,81	313,10	2,62	0,84	0,19
312,5	1667491	313,63				
312,5	1649736	310,13				
375	1989511	377,01				
375	2003804	379,82				
375	2001362	379,34	379,04	1,58	0,42	0,54
375	1994450	377,98				
375	2010069	381,05				

CONCLUSIÓN:

Durante el desarrollo de las practicas electivas se adquirió conocimiento y destreza en el manejo de un equipo de HPLC y en las técnicas utilizadas para el dosaje de drogas de interés veterinario en muestras de baños de inmersión, se adquirieron los conocimientos básicos del funcionamiento de estos equipos, destreza en el procesamiento de este tipo de muestras y con los resultados obtenidos en la etapa de validación se pudo realizar el tratamiento estadísticos de los mismos y verificar que el método empleado cumple con los requisitos del SENASA para el ingreso a red de laboratorio. Si bien esta fue una validación parcial, dada que la misma consta de una segunda etapa una vez que se ingresa a la red de laboratorios de SENASA, se comprendió la importancia de la misma y los pasos necesarios para llevar a cabo su ejecución.

BIBLIOGRAFIA:

1. Nava, S.; Mangold, A.J.; Morel, N.; Rossner, M.V.; Guglielmone, A.A. EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL DE LA GARRAPATA COMÚN DEL BOVINO RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS EN ARGENTINA. Información técnica de producción animal 2017. INTA – Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Publicación Miscelánea Año V - N°2. ISSN.
2. Dirección General de Laboratorios y Control Técnico: *SENASA. Requerimientos para la validación interna de métodos analíticos de principios activos en productos formulados*. Versión N°: 001. Fecha de vigencia: Junio de 2018.
3. L. S. Ettre, "Nomenclature for Chromatography", Pure Appl. Chem., Vol. 65 (1993) 819.
4. Garay D. C. (2009) "Química Analítica". Traducido de la sexta edición de: Analytical Chemistry. México D.C, México. Ed. Mc Graw Hill.
5. "Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016). Disponible en www.eurachem.org
6. OAA (Organismo Argentino de Acreditación). GUI-LE-03 v3, Fecha de entrada en vigencia: 12-marzo-2021. Disponible en: <https://oaa.org.ar/buscador/documentos-acreditacion/>
7. Dennis R. Jenke (1996): Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. I. General Concepts and Guidelines, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 19:5, 719-736. <http://dx.doi.org/10.1080/10826079608005533>

