



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

DESARROLLO DE ESTRATEGIAS ANALÍTICAS PARA ESTUDIOS DE
CINÉTICA DE RESIDUOS DE HALQUINOL EN CERDOS.

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. MIRIAM AIDE CASTILLO RODRÍGUEZ

TUTOR: DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, AGOSTO DE 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DESARROLLO DE ESTRATEGIAS ANALÍTICAS PARA ESTUDIOS DE
CINÉTICA DE RESIDUOS DE HALQUINOL EN CERDOS**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. MIRIAM AIDE CASTILLO RODRÍGUEZ

TUTOR: DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN



Ciudad de México, 2019.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:	Dra. Josefina de Gyves Marciniak
VOCAL:	Dr. Julio César Aguilar Cordero
VOCAL:	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez
VOCAL:	Dra. Patricia Ramírez Noguera
SECRETARIO:	Dra. Inés Fuentes Noriega

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio 5 de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4. Los trabajos con las unidades experimentales se realizaron dentro del Área de Experimentación Animal de la Coordinación General de Estudios de Posgrado en el Centro de Producción Agropecuaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4 de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Raquel López Arellano, con el apoyo del proyecto PAPIIT clave IN218115 DGAPA-UNAM y a la beca 576548 otorgada por CONACyT.

Productos del Proyecto:

Publicación: Castillo Rodríguez, M. A., Rodríguez Patiño, G., Revilla Vázquez, A. L., Rodríguez de San Miguel, E., & López-Arellano, R. Validation of a UPLC-PDA method to study the content and stability of 5-chloro 8-hydroxyquinoline and 5,7-dichloro 8-hydroxyquinoline in medicated feed used in swine farming. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 166, (2019) 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.12.037>.

Congreso: Parte del presente trabajo se presentó en el VIII CONGRESO IBEROAMERICANO DE CIENCIAS FARMACEUTICAS UAC-COIFFA 2019, realizado del 3 al 5 de julio de 2019 en San Francisco de Campeche, Campeche. Título del trabajo ESTUDIO DE ESTABILIDAD EN PREMEZCLAS MEDICADAS CON HALQUINOL.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por ser mi segundo hogar, por mi formación y por ser orgullosamente universitaria.

Al proyecto PAPIIT IN218115 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, por el apoyo financiero otorgado.

Al CONACyT por la beca otorgada (576548)

A mi asesora la Dra. Raquel López Arellano por su extraordinario apoyo brindado durante todo este tiempo.

A mi Comité Tutor Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez y el Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero, por sus valiosas aportaciones durante la realización de este proyecto.

Al H. jurado, por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo.

A la gran familia LEDEFAR porque se convirtieron en mi segundo hogar.

Al Ing. Juan Carlos Gómez por su apoyo en el manejo del XEVO TQ.

A los MVZ. Carlos Castañón Crespo, David Ortega Franco y Consuelo Belem Pérez Licona, principalmente al Dr. Juan Omar Hernández Ramírez, por todo su extraordinario apoyo en la realización del estudio in vivo.

A la Dra. Gabriela Rodríguez Patiño y al M. en C. Hugo Cuatecontzi Flores por su extraordinaria amistad, por los momentos inolvidables, por su apoyo en el estudio farmacocinético.

A Luis Antonio Gaspar Saucedo, por su amor y apoyo incondicional en el desarrollo de este proyecto.

A mis hijos Yaretzi Quetzalli y Ariel Barack por su paciencia y comprensión.

A mis padres, porque siempre han estado apoyándome.

ÍNDICE

Índice	i
Índice de Tablas	v
Índice de Figuras	viii
Abreviaturas	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
I.-Marco teórico	1
I.1 Antecedentes	1
I.2. Antibióticos como promotores de crecimiento	3
I.3 Técnicas para cuantificar halquinol.	6
I.4. Propiedades fisicoquímicas del halquinol	8
I.5. Metabolismo de hidroxiquinolinas halogenadas.	8
II. Hipótesis.	12
III. Objetivos.	13
IV. Plan Experimental.	14
V. Desarrollo experimental.	15
V.1 Localización	15
V.2 Unidades experimentales	15
V.2.1 Tratamiento	15
V.2.3 Alimentación	15
V.2.4 Suplementación de halquinol	16
V.2.5 Toma de muestra	16
V.3. Desarrollo y validación de método para la determinación de 5,7-HQ y 5-HQ como indicativo de estabilidad en premezclas alimentarias.	16
V.3.1 Materiales	16
V.3.2 Cromatografía	16
V.3.3 Preparación de la solución stock.	17
V.3.4 Pretratamiento de premezclas alimentarias (muestras).	17
V.3. 5. Validación.	17
V.3.5.1. Linealidad del sistema.	17
V.3.5.2. Linealidad del método	17

	Pág.
V.3.5.3. Exactitud y precisión	18
V.3.5.4 Selectividad	18
V.3.5.5 Límites de detección (LD) y cuantificación (LC).	18
V.3.5.6 Robustez.	19
V.3.5.7. Estudio de degradación forzada.	19
V.4. Desarrollo y validación de método para la determinación de 5,7-HQ y 5-HQ en premezclas alimentarias, plasma sanguíneo, músculo, hígado y riñón.	19
V.4.1 Materiales	19
V.4.2 Cromatografía	20
V.4.3 Espectrometría de masas	20
V.4.4 Procedimiento de extracción de 5,7-HQ y 5-HQ	21
V.4.5 Exactitud y precisión	21
V.4.6. Curvas de calibración.	21
V.4.7 Límites de detección y cuantificación	22
V.4 8 Estabilidad de la matriz a Corto Plazo y ciclos de congelación.	22
VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	23
VI.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO UPLC-PDA PARA PREMEZCLAS.	23
VI.1.1 Linealidad del sistema y del método.	23
VI.1.2 Estudio de degradación forzada.	26
VI.1.3. Aplicación a muestras reales.	28
VI.2. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE 5-HQ Y 5,7-HQ EN PLASMA DE CERDO.	29
VI.2.1. Optimización del método de detección.	29
VI.2.2 Optimización del método de separación cromatográfico.	33
VI.2.3. Optimización de la EFS para 5-HQ y 5,7-HQ.	35
VI.2.4. Desarrollo del método de EFS para plasma de cerdo.	38
VI.2.5. Validación del método para plasma de cerdo.	41
VI.2.5.1 Linealidad del sistema.	41
VI.2.5.2. Linealidad del método para plasma.	44
VI.2.5.3. Precisión y exactitud del método para plasma.	49

	Pág.
VI.2.5.4. Límites de detección y cuantificación para plasma.	51
VI.2.5.5. Estabilidad a Corto Plazo y 3 ciclos de congelación-descongelación de muestras de plasma.	51
VI.3. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE 5-HQ Y 5,7-HQ EN MÚSCULO DE CERDO.	53
VI.3.1. Desarrollo del método de EFS para músculo de cerdo.	53
VI.3.2. Validación o del método para músculo de cerdo	54
VI.3.2.1 Linealidad del método para músculo.	55
VI.3.2.2. Precisión y Exactitud del método para músculo.	59
VI.3.2.3. Límites de detección y cuantificación para músculo.	60
VI.3.2.5. Estabilidad a Corto Plazo para músculo.	60
VI.4. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE 5-HQ Y 5,7-HQ EN RIÑÓN DE CERDO.	62
VI.4.1. Desarrollo del método de EFS para riñón de cerdo	62
VI.4.2. Validación del método para riñón de cerdo.	64
VI.4.2.1. Linealidad del método para riñón.	64
VI.4.2.2 Precisión y Exactitud del método para riñón.	68
VI.4.2.3. Límites de detección y cuantificación para riñón.	69
VI.4.2.4. Estabilidad a Corto Plazo para riñón.	70
VI.5. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE 5-HQ Y 5,7-HQ EN HÍGADO DE CERDO.	71
VI.5.1. Desarrollo del método de EFS para hígado de cerdo.	71
VI.5.2. Validación del método para hígado de cerdo.	73
VI.5.2.1. Linealidad del método para hígado.	74
VI.5.2.2. Precisión y exactitud del método para hígado.	78
VI.5.2.3. Límites de detección y cuantificación para riñón.	79
VI.5.2.4. Estabilidad a Corto Plazo para hígado.	79
VI.6. SELECCIÓN DEL TIEMPO DE MEZCLADO EN LA ELABORACIÓN DE LA PREMEZCLA ALIMENTARIA.	81
VI.7. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE HALQUINOL EN CERDOS.	82

	Pág.
VI.7.1. Aclimatación de las unidades experimentales.	83
VI.7.2. Determinación de parámetros farmacocinéticos en cerdos.	85
VI.8. SUPLEMENTACIÓN DE HALQUINOL EN CERDOS.	88
VI.8.1. Efecto del halquinol sobre la toxicidad celular de músculo, riñón e hígado.	89
VII. Conclusiones.	93
VIII. Perspectivas.	94
IX. Referencias.	95
X. Anexos.	99

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Medicamentos registrados de halquinol ante la SAGARPA.	5
Tabla 2. Técnicas publicadas para cuantificar halquinol.	7
Tabla 3. características de la sustancia de referencia halquinol.	8
Tabla 4. Gradiente de elución optimizado.	20
Tabla 5. Parámetros cromatográficos de 5-HQ y 5,7-HQ (n=6)	23
Tabla 6. Resumen de la validación para 5-HQ and 5,7-HQ.	25
Tabla 7. Estudio de degradación forzada de 5-HQ y 5,7-HQ.	26
Tabla 8. Alimento medicado para cerdos después de 120 h a 60 ° C y 35% de HR	28
Tabla 9. Parámetros optimizados para cada analito.	29
Tabla 10. Optimización de método de detección	32
Tabla 11. Optimización de flujo del gas de colisión	32
Tabla 12 Optimización de la energía de colisión	33
Tabla 13. Optimización de las condiciones cromatografías.	33
Tabla 14. Optimización de la presión de carga de la muestra	36
Tabla 15. Optimización del pH de la muestra	37
Tabla 16. Optimización de la composición de la fase de elución	37
Tabla 17. Optimización de la presión de elución de la muestra	37
Tabla 18. Optimización del agente precipitante de proteínas en plasma de cerdo.	38
Tabla 19. Agente anticoagulante en la obtención de plasma	39
Tabla 20. Cantidad de agente precipitante	39
Tabla 21. Linealidad del sistema para halquinol.	41
Tabla 22. Intervalos de confianza para el origen y la pendiente del 5,7-HQ.	42
Tabla 23. Análisis de varianza con un factor realizado para determinar la relación lineal entre la concentración real de 5,7-HQ y su respuesta analítica.	43
Tabla 24. Intervalos de confianza para el origen y la pendiente 5-HQ	43
Tabla 25. Análisis de varianza con un factor realizado para determinar la relación lineal entre la concentración real de 5-HQ y su respuesta analítica.	44
Tabla 26. Fortificación de plasma para la linealidad del método plasma de 5,7-HQ.	45
Tabla 27. Fortificación de plasma para la linealidad del método plasma de 5-HQ.	45

	Pág.
Tabla 28. Resumen de la linealidad del método para 5,7-HQ en plasma.	47
Tabla 29. Resumen de la linealidad del método para 5-HQ en plasma.	48
Tabla 31. Estadísticas de regresión para la estimación de LD y LC.	50
Tabla 32. Plasma cargado con 5-HQ sometidas a congelación durante 24 horas.	52
Tabla 33. Plasma cargado con 5,7-HQ sometidas a congelación durante 24 horas.	52
Tabla 34. Optimización del agente precipitante de proteínas en músculo de cerdo.	53
Tabla 35 Cantidad de agente precipitante	53
Tabla 36. Fortificación de músculo para la linealidad del método de 5,7-HQ.	55
Tabla 37. Fortificación de músculo para la linealidad del método de 5-HQ.	55
Tabla No. 38. Resumen de la linealidad del método para 5,7-HQ.	57
Tabla 39. Resumen de la linealidad del método para 5-HQ.	58
Tabla 40. Porcentaje recuperado de Halquinol en músculo fortificado.	59
Tabla 41. Estimación de LD y LC para músculo.	60
Tabla 42. Estabilidad de músculo cargado con 5-HQ.	61
Tabla 43. Estabilidad de músculo cargado con 5,7-HQ.	61
Tabla 44. Optimización del agente precipitante de proteínas en riñón de cerdo.	62
Tabla 45. Precipitación de proteínas en riñón cargado con Halquinol	62
Tabla 46. Cantidad de agente precipitante	63
Tabla 47. Preparación de las muestras de la curva de calibración de 5,7-HQ.	64
Tabla 48. Preparación de las muestras de la curva de calibración en riñón de 5-HQ.	64
Tabla 49. Resumen de la linealidad del método para 5,7-HQ.	65
Tabla 50. Resumen de la linealidad del método para 5-HQ.	67
Tabla 51. Datos del porcentaje recuperado de Halquinol en riñón cargado.	69
Tabla 52. Estimación de LD y LC para riñón.	70
Tabla 53. Estabilidad de riñón cargado con 5-HQ.	70
Tabla 54. Estabilidad de riñón cargado con 5,7-HQ.	71
Tabla 55. Optimización del agente precipitante de proteínas en hígado de cerdo.	71
Tabla 56. Precipitación de proteínas en hígado cargado con 5-HQ y 5,7-HQ.	72
Tabla 57. Cantidad de agente precipitante.	72
Tabla 58. Preparación de las muestras de la curva de calibración de 5,7-HQ.	73
Tabla 59. Preparación de las muestras de la curva de calibración de 5-HQ.	74

	Pág.
Tabla 60. Resumen de la linealidad del método para 5,7-HQ.	75
Tabla 61. Resumen de la linealidad del método para 5-HQ.	77
Tabla 62. Datos del porcentaje recuperado de Halquinol en hígado cargado.	78
Tabla 63. Estimación de LD y LC para hígado.	79
Tabla 64. Estabilidad de hígado cargado con 5-HQ.	80
Tabla 65. Estabilidad de hígado cargado con 5,7-HQ.	80
Tabla 66. Identificación, pesos y consumo de alimento de cerdos.	83
Tabla 67. Datos de tiempos de muestreo en el estudio Farmacocinético.	85
Tabla 68. Parámetros farmacocinéticos de la 5,7-HQ.	87
Tabla 69. Parámetros farmacocinéticos de la 5-HQ.	87
Tabla 70. Residuos de Halquinol en tejidos de cerdo, a 10 días de tratamiento.	88
Tabla 71. Linealidad del sistema para los picos mayoritarios de halquinol.	100
Tabla 72. Linealidad del método para 5-HQ.	102
Tabla 73. Linealidad del método para 5,7-HQ.	103
Tabla 74. Porcentajes de recobro de 5-HQ y 5,7-HQ analistas diferentes	104
Tabla 75. Cortes Histológicos de riñón cerdos, después de suplementación de halquinol.	105
Tabla 76. Cortes Histológicos de hígado cerdos, después de suplementación de halquinol.	107
Tabla 77. Cortes histológicos de músculo cerdos, después de suplementación de halquinol.	109

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Halqui-aid 60%, antimicrobiano promotor de crecimiento no antibiótico	4
Figura 2. Halquinol 98% BP compuesto no antibiótico.	5
Figura 3. Modelo farmacocinético de los derivados halogenados del 8-quinolinol.	10
Figura 4. Etapas del proyecto.	14
Figura 5. Actividades generales del proyecto.	14
Figura 6 A) and C) Curva de calibración de 5-HQ and 5,7-HQ con estándar respectivamente, y B) y D) 5-HQ and 5,7-HQ con alimento fortificado para cerdos.	24
Figura 7. Cromatogramas a) 5-HQ (547.2 ng / mL y 5,7-HQ (1888.92 ng / mL, b) H ₂ SO ₄ 3N, c) H ₂ O ₂ 30%, d) HCl 6N, e) NaOH 6N y f) 24 h de luz UV (365 nm).	27
Figura 8. Espectro de masas de hija de 5-HQ a 22eV de energía de colisión.	30
Figura 9. Espectro de masas de hija de 5,7-HQ a 26eV de energía de colisión.	31
Figura 10. Cromatogramas de 5-HQ y 5,7-HQ a 58 ng/mL, obtenidos A) ácido fosfórico 0.1%, B) ácido fórmico 0.1%, y C) hidróxido de amonio a 0.1% de concentración.	34
Figura 11. Cromatogramas de 5-HQ y 5,7-HQ, flujo de 0.6 mL/min y a) AFO 0.1%: AcN (20:80), b) AFO 0.1%: AcN (25:75), c) AFO 0.1%: AcN (30:70), d) AFO 0.1%: AcN (40:60) y e) AFO 0.1%: AcN (50:50)	35
Figura 12. Estructura de los cartuchos Oasis ® MAX	36
Figura 13. Diagrama de tratamiento de muestra de plasma.	40
Figura 14. Linealidad del sistema para 5,7-HQ.	42
Figura 15. Linealidad del sistema para 5-HQ.	43
Figura 16. A) Linealidad del método para 5,7-HQ en plasma de cerdo, B) Residuales de la relación de la concentración adicionada de 5,7-HQ en función de la concentración estimada en plasma de cerdo.	46
Figura 17. A) Linealidad del método para 5-HQ en plasma de cerdo, B) Residuales de la relación de la concentración adicionada de 5-HQ en función de la concentración estimada en plasma de cerdo.	49
Figura 18. Diagrama de tratamiento de muestra de músculo.	54

	Pág.
Figura 19. A) Linealidad del método para 5,7-HQ en músculo de cerdo, B) Residuales de la relación de la concentración adicionada de 5,7-HQ en función de la concentración estimada en músculo de cerdo.	56
Figura 20. A) Linealidad del método para 5-HQ en músculo de cerdo, B) Residuales de la relación de la concentración adicionada de 5-HQ en función de la concentración estimada en músculo de cerdo.	56
Figura 21. Diagrama de tratamiento de muestra de riñón.	63
Figura 22. A) Linealidad del método para 5,7-HQ en riñón de cerdo, B) Residuales de la relación de la concentración adicionada de 5,7-HQ en función de la concentración estimada en riñón de cerdo.	66
Figura 23. A) Linealidad del método para 5,7-HQ en riñón de cerdo, B) Residuales de la relación de la concentración adicionada de 5,7-HQ en función de la concentración estimada en riñón de cerdo.	68
Figura 24. Diagrama de tratamiento de muestra de hígado.	73
Figura 25. A) Linealidad del método para 5,7-HQ en hígado de cerdo, B) Residuales de la relación de la concentración adicionada de 5,7-HQ en función de la concentración estimada en hígado de cerdo.	74
Figura 26. A) Linealidad del método para 5-HQ en hígado de cerdo, B) Residuales de la relación de la concentración adicionada de 5-HQ en función de la concentración estimada en hígado de cerdo.	76
Figura 27. Mezclador de pantalón	81
Figura 28. Optimización del tiempo de mezclado en la elaboración de la premezcla alimentaria adicionada con halquinol.	81
Figura 29. Unidades experimentales en la etapa de aclimatación.	83
Figura 30. a) Anestesia, b) Vena yugular y c) Fijación del catéter.	84
Figura 31. Perfil farmacocinético de 5-HQ en plasma de cerdo.	85
Figura 32. Perfil farmacocinético de 5,7-HQ en plasma de cerdo.	86
Figura 33. A) Sección del riñón 40X de cerdo después 10 días de la suplementación con halquinol y B) sección del riñón 40X de cerdo sin tratamiento.	90

	Pág.
Figura 34. Sección del riñón 40X de cerdo después de la suplementación con halquinol.	90
Figura 35. A) Sección del hígado 40X de cerdo después de la suplementación con halquinol y B) sección de hígado 40X de cerdo sin tratamiento	91
Figura 36. Sección del hígado cerdo después de la suplementación con halquinol.	92
Figura 37 Cromatogramas de a) estándares, b) alimento de cerdo, c) blanco de solvente y d) premezcla alimentaria medicada con halquinol.	99
Figura 38 Linealidad del sistema para 5-HQ.	100
Figura 39. Linealidad del sistema para 5,7-HQ.	101
Figura 40. Linealidad del método para 5-HQ usando como matriz alimento para cerdos.	101
Figura 41. Linealidad del método para 5,7-HQ usando como matriz alimento para cerdos.	101

ABREVIATURAS

5-HQ	5-Cloro-8-quinolinol
5,7-HQ	5,7-Dicloro-8-quinolinol
ICHQ	5-chloro-7-iodo-quinolin-8-ol
DBHQ	7-dibromo-quinolin-8-ol
UPLC-MS/MS	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplado a espectrometría de masas en tándem
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC-MS/MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem
DAD	Diode Array Detector
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
Redox	Oxido reducción
SPE	Extracción en Fase Sólida
ICH	International Conference on Harmonization
VICH	Veterinarian International Conference on Harmonization
FDA	Food and Drug Administration
FAO	Food and Agriculture Organization
SADER	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
LMR	Límite Máximo de Residuos
SAGARPA	Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
TLC	Thin Layer Chromatography
UV	Ultravioleta
AFO	Ácido fórmico
FM	Fase móvil
AcN	Acetonitrilo

RESUMEN

Durante las últimas décadas se ha experimentado un marcado avance tecnológico en la producción de alimentos derivados de animales; para lograrlo se han usado preparaciones farmacéuticas y compuestos agroquímicos, cuyo fin es incrementar la producción de estos alimentos. En el caso de los antimicrobianos, su empleo en la prevención de infecciones y como supuestos promotores de crecimiento ha provocado un aumento de la resistencia bacteriana. ^[1] El objetivo principal de la vigilancia de residuos de medicamentos de uso veterinario en animales de consumo es evitar que lleguen al consumidor con residuos de sustancias que puedan tener consecuencias negativas para la salud, entre ellas las alergias, y la resistencia bacteriana. Es por ello que se realizó una búsqueda de los antibióticos que no tienen asociado un LMR (Límite Máximo de Residuos), para lo cual se consultaron bases de datos internacionales como la de España, ^[2] FDA (Food and Drug Administration), ^[3] FAO (Food and Agriculture Organization), ^[4] Australia-Nueva Zelanda, ^[5] Japón, ^[6] y nacionales como SAGARPA (Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación), actualmente SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural); ^[7] como resultado de esta revisión se encontró que varios antibióticos no tienen un LMR permitido como lo son; avoparcina, bambemicina, cefotaxima, flavomicina, fosfomicina, halquinol y vancomicina. ^[8-11] El más utilizado en las granjas porcícolas y avícolas de México es el halquinol; debido a que los productores lo utilizan en el tratamiento de enfermedades infecciosas intestinales y como promotor de crecimiento; es importante mencionar que el halquinol está prohibido en otros países porque no existe información que demuestre su farmacocinética ni su estabilidad química. Los estudios de eliminación de residuos son de vital importancia para asegurar, la inocuidad alimentaria en alimentos de origen animal para consumo humano; por lo que el objetivo principal de este proyecto fue caracterizar y desarrollar métodos analíticos por UPLC-MS/MS, que permitieran cuantificar de manera eficaz residuos de medicamentos de halquinol (5,7-Dicloro-8-hidroxiquinolina y 5-Cloro-8-hidroxiquinolina) en plasma, músculo, riñón e hígado de cerdo; con la finalidad de establecer los tiempos de retiro de dichos medicamentos y detectar posibles riesgos sanitarios.

Palabras Clave: Halquinol, 5,7-Dicloro-8-hidroxiquinolina, 5-Cloro-8-hidroxiquinolina, cerdos, UPLC-MS/MS.

ABSTRACT

During the last decades there has been a marked technological advance in the production of animal derived food, to achieve this, pharmaceutical preparations and agrochemical compounds have been used, whose purpose is to increase the production of these foods. In the case of antimicrobials, their use in the prevention of infections and as supposed growth promoters has caused an increase in bacterial resistance. ^[1] The main objective of the monitoring of veterinary drugs residues in consumer animals is to prevent them from reaching the consumer with residues of substances that may have negative consequences for health, including allergies, and bacterial resistance. Therefore, a search was made for antibiotics that do not have an associated MRL (Maximum Residue Limit), for which international databases such as Spain, ^[2] FDA (Food and Drug Administration), ^[3] FAO (Food and Agriculture Organization), ^[4] Australia-New Zealand, ^[5] Japan, ^[6] and nationals such as SAGARPA (Secretariat of Livestock Agriculture, Rural Development, Fisheries and Food), currently SADER (Secretariat of Agriculture and Rural development) ^[7] have been consulted. As a result of this review, several antibiotics were found not to have an allowed MRL, such as: avoparcin, bambemicin, cefotaxime, flavomycin, fosfomicin, halquinol and vancomycin ^[8-11]. Out of these, the most widely used in pig and poultry farms in Mexico is halquinol due to its use in the treatment of infectious intestinal diseases and as a growth promoter. It is important to mention that halquinol is prohibited in other countries because there is no information available to prove its pharmacokinetics or chemical stability. Waste disposal studies are vital to ensure food safety in animal origin food for human consumption. Hence, the main objective of this project was to characterize and develop analytical methods by UPLC-MS / MS, which allowed effectively quantifying halquinol drug residues (5,7-Dichloro-8-hydroxyquinoline and 5-Chloro-8- hydroxyquinoline) in plasma, muscle, kidney and pig liver in order to establish the withdrawal times of these medications and detect possible health risks.

Key words: Halquinol, 5,7-Dichloro-8-hydroxyquinoline, 5-chloro-8-hydroxyquinoline, pigs, UPLC-MS / MS.

I.-MARCO TEÓRICO.

I.1 Antecedentes.

Durante las últimas décadas se ha experimentado un marcado avance tecnológico en la producción de alimentos derivados de animales. Mucho de este progreso se debe al desarrollo innovador de preparaciones farmacéuticas y de compuestos agroquímicos, cuyo fin es incrementar la producción de estos alimentos. Los agroquímicos y medicamentos veterinarios son compartidos por un gran número de países, sin embargo, los problemas de residuos surgen por el uso inadecuado que se les da, la falta de información sobre su toxicidad, riesgos a la salud y medio ambiente, esto sumado a la deficiencia de los sistemas gubernamentales de vigilancia y control. En el caso de los agentes antimicrobianos, su empleo en la prevención de infecciones y como supuestos promotores de crecimiento ha provocado un aumento de la resistencia bacteriana. ^[1]

En la mayoría de los países industrializados diversas reglamentaciones pretenden lograr un equilibrio entre la pérdida económica para el productor y el nivel de residuos inocuos tolerables por el hombre. Para encontrar este límite se requiere del conocimiento de la farmacocinética básica de los medicamentos y de metodologías cada vez más precisas para ubicar el nivel de los residuos, así como su implementación en países en vías de desarrollo. ^[12] Por lo que los estudios de eliminación de residuos son un parámetro técnico de inocuidad de vital importancia para asegurar, la no presencia de residuos de un medicamento o sus productos de biotransformación (metabolitos) en alimentos de origen animal para consumo humano, provenientes de animales tratados.

La contaminación de la leche, carne y huevo con diferentes fármacos como son; antibióticos, antisépticos, promotores de crecimiento, etc., es una secuela frecuente posterior al tratamiento o prevención de enfermedades que afectan a los animales que son utilizados como alimentos. Por lo que, al permitir la distribución de esos productos para la población, puede acarrear serios problemas de salud; como lo son alergias, resistencia bacteriana; e incluso puede afectar los procesos de industrialización. Y quizá el aspecto que más temor causa, es la incertidumbre de que aún no se sabe cuáles y que tan graves efectos tendrán los residuos de tantos fármacos ingeridos de manera frecuente.

Se ha estimado que la presentación de anemia aplásica en humanos se puede inducir con tan solo 1 ppm de cloranfenicol presente en productos de origen animal. [13, 14] Así pues, el uso intensivo de antibióticos en la producción de carne de cerdo es una práctica en las granjas de México, en las que estas sustancias se utilizan para aumentar su productividad y rentabilidad. Sin embargo, la utilización indiscriminada de antibióticos como aditivos en el alimento con el fin de estimular el crecimiento constituye una preocupación creciente en el ámbito de la Salud Pública y de los consumidores. En México existe el "Comité Intersecretarial de Evaluación y Seguimiento del Programa Nacional de Monitoreo para el Control de Residuos Tóxicos y Contaminantes en Productos y Subproductos de Origen Animal", coordinado por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), en el que participan otras dependencias del sector oficial como la Secretaría de Salud (SS), la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), cuya función principal es regular la presencia de residuos y contaminantes, tales como aditivos, promotores de crecimiento, medicamentos veterinarios, plaguicidas, entre los principales. Las muestras se analizan en el Laboratorio Oficial de Referencia denominado "Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal" (CENAPA), dependiente de la Dirección General de Salud Animal del SENASICA. El objetivo principal de la vigilancia de residuos de medicamentos de uso veterinario en alimentos es evitar que lleguen al consumidor alimentos con residuos de sustancias que puedan tener consecuencias negativas para la salud. [8]

Durante el proceso de evaluación y de autorización de nuevos productos veterinarios se establecen, entre otras cosas, el LMR del compuesto admisibles en los distintos tejidos y partes comestibles de los animales destinados al consumo humano. El LMR de una sustancia se define como "el contenido máximo de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario (expresado en mg/Kg o en $\mu\text{g}/\text{Kg}$ sobre la base de peso corporal) reconocido como admisible en un producto alimenticio". Los cálculos de estos valores (LMR) se basan en el tipo y en la cantidad de residuos que constituyen riesgo toxicológico significativo para la salud humana. Se tiene en cuenta la ingesta diaria admisible (IDA), un factor de seguridad adicional y otros riesgos relativos a la salud pública, así como aspectos relacionados con la tecnología alimentaria. [15]

I.2. Antibióticos como promotores de crecimiento

Al uso inadecuado de antibióticos por parte de médicos veterinarios y productores, así como la dispensación inapropiada en farmacias veterinarias privadas, se suman los siguientes problemas:

- Uso de antibióticos en dosis bajas (concentraciones sub-terapéuticas) para promover el crecimiento de los animales.
- El comercio de antibióticos de baja calidad, incluyendo productos sin bioequivalencia demostrada.
- La utilización de sales puras de antibióticos en la producción de pre-mezclas y mezclas de alimentos para animales.

Asimismo, estudios nacionales demuestran elevadas tasas de resistencia bacteriana en patógenos transmitidos por alimentos, tales como *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Campylobacter* en las carnes crudas ofrecidas en diversos puntos de venta. En ciertas zonas del país se han detectado cepas de *Salmonella* resistentes a múltiples antibióticos, las cuales se han asociado con infecciones graves e inclusive mortales en niños pequeños. En el estado de Yucatán, por ejemplo, estas cepas multi-resistentes no existían antes del 2002. Para el 2007, el 95% de todas las cepas de *Salmonella* Typhimurium eran resistentes a numerosos antibióticos, incluyendo los más nuevos, como las cefalosporinas de tercera generación. ^[13]

Durante el proceso de evaluación y autorización de nuevos productos veterinarios se define también un tiempo de espera, que es el tiempo que debe de transcurrir entre la administración de un medicamento y el aprovechamiento de los alimentos obtenidos del animal tratado, con el único objetivo de que no existan residuos de los medicamentos en los alimentos o que los residuos presentes estén por debajo de los respectivos LMR.

Para el control de residuos de medicamentos en los alimentos se debe de contar con métodos analíticos validados. La guía VICH GL 49, proporciona una descripción general de los criterios que son aceptados en la UE, Japón, Estados Unidos de América (EE. UU.), Australia, Nueva Zelanda y Canadá, para la validación de métodos analíticos utilizados en estudios de residuos de medicamentos veterinarios.

Es importante mencionar que SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) se basa en los LMRs publicados por estas Agencias. La SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural) clasifica a los productos farmacéuticos veterinarios en tres grupos: Grupo I, Grupo II y Grupo III. Los antibióticos veterinarios se encuentran actualmente clasificados en el Grupo II, los cuales requieren para su venta una receta médica simple expedida por un médico veterinario con cédula profesional.

De acuerdo a la SADER (antes SAGARPA) en 2017 se reportaron más de 10,500 productos veterinarios registrados pero no todos aparecen en el Vademécum Veterinario y PLM-Veterinario; es por ello que se han consultado los documentos publicados por la SADER y revisando estos con las bases de datos Internacionales que publican los LMR permitidos en las diversas matrices y diversos animales de consumo, se logró filtrar los antibióticos que se han agregado y reclasificado y de los cuales no existe LMR, que a saber son: avoparcina, bambermicina, cefotaxima, flavomicina, fosfomicina, halquinol y vancomicina; estos antibióticos están clasificados en el grupo II y los más utilizados son fosfomicina y halquinol en cerdos y pollos.



www.ferpac.com/productos/antimicrobianos/halqui-aid-60/

ferpac Inicio Productos Especies Nosotros Alianzas Calidad Contacto ES EN

HALQUI-AID® 60%

INDICACIONES:

Halquinol, antimicrobiano promotor de crecimiento y terapéutico no antibiótico. Mantiene la salud intestinal a través de su actividad contra bacterias (Gram positivas y Gram negativas), hongos y protozoarios. Actúa solamente en intestino, sin absorberse, por lo que tiene un amplio margen de seguridad y puede ser utilizado en cualquier etapa productiva.

Disminuye la actividad peristáltica del intestino (motilidad intestinal), permitiendo que los nutrientes y el agua tengan más tiempo de exposición para ser absorbidos.

Es compatible con otros tratamientos y resiste las temperaturas de peletizado.

BENEFICIOS:

- Mantiene controlados microorganismos dañinos del sistema digestivo.
- Heces más consistentes y menos diarreas.
- Reduce la cantidad de huevo sucio por heces.
- Tiene un efecto positivo en los parámetros productivos (calidad del huevo, conversión alimenticia).
- Mejora la uniformidad de los lotes.
- Reduce la mortalidad.
- No genera resistencia, por lo que puede utilizarse de manera continua.

PRESENTACIÓN



25

INDICADO PARA:



Figura 1. Halqui-aid 60%, antimicrobiano promotor de crecimiento no antibiótico.


Este antimicrobiano se presenta en mezcla como 5,7-Dicloro-8-quinolinol (57-74%) 5-Cloro-8-quinolinol (23-40%) y el 7-cloro-8-quinolinol (4%). Existen en el mercado muchos distribuidores de halquinol pero sólo se han registrado ante la SADER, los productos que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Medicamentos registrados de halquinol en México.

Producto	Establecimiento	Fórmula	Descripción	Dosis
3-care-forte	Animal Nutri México S.A. de C.V.	Halquinol 60%	Polvo	60-120 g/ton
Actelion	Ilender México S.A. de C.V.	Halquinol 60%	Polvo granular	crecimiento: 600 mg/kg al día (200g/ton) equivale a 120 ppm halquinol
Groquinol	Genéricos Veterinarios S.A. de C.V.	Cada 1000g contienen 300 g	polvo premezcla	50-100 g /ton
Halquinol 60%	Vimifos S.A. de C.V.	Halquinol 60g	polvo	iniciadores 200 g /ton crecimiento 100 g /ton
Quinodes 120	Distribuidora Especializada de Servicios y Productos Pecuarios de Occidente S.A. de C.V.	Cada 1000g contienen 120 g	polvo granular y premezcla medicada	600 mg/ kg 200 g/ton
Quixalud	Novartis Salud Animal S.A. de C.V.	Cada 100g contienen halquinol (clorhidroxiquinolina 60 g	polvo	Iniciador 500-1000 g/ton, equivalente a 60-120 ppm. Crecimiento: 500 g/tonelada de alimento.
Halquinox 500	Distrago Química México S.A. de C.V.	Cada 100 g contienen Halquinol 50 g	polvo premezcla y polvo oral	

www.aapsa.mx/halquinol

Inicio Betaina Enzimas **Halquinol** Compuestos Antioxidantes Etoxiquin Glucosa Oxidasa Contacto



Halquinol

HALQUINOL 98% BP – Compuesto no antibiótico que mejora la salud intestinal de aves, cerdos y especies acuáticas.
Funciones Específicas:

- Producto anti-diarreico, no antibiótico de acción triple contra bacterias, hongos, protozoos y una amplia variedad de microorganismos
- No crea resistencia.
- Unico con calidad respaldada por la British Pharmacopeia.
- No deja residuos en los tejidos animales
- Demostrada eficacia anti-protozoaria, actuando directamente sobre los trofozoitos.
- Actúa contra Entamoeba histolytica, Eimeria bovis y otras especies de Eimeria.

Obtener información detallada

Enviar



Figura 2. Halquinol 98% BP compuesto “no antibiótico”.

La SADER ^[8] ha publicado que el halquinol puede utilizarse como producto farmacéutico veterinario, pero no en animales de abasto en la última etapa de desarrollo; esto es porque no existen estudios que respalden información sobre la farmacocinética, la toxicidad, el tiempo de retiro y el LMR, por lo que es importante realizar este estudio de cinética de residuos para demostrar el comportamiento del halquinol. Es importante mencionar que para este proyecto solo se trabajará con 5,7-Dicloro-8-hidroxiquinolina y 5-Cloro-8-hidroxiquinolina, componentes mayoritarios del halquinol.

Teniendo en cuenta que el halquinol es muy utilizado en México y que no existe un período de retiro para el producto, además los distribuidores promueven que actúa solamente en intestino sin absorberse y que no deja residuos en los tejidos, como se muestra en las figuras 1 y 2. En este proyecto se consideró realizar la farmacocinética de los dos componentes mayoritarios que conforman el halquinol la 5,7-HQ (57-74% y 5-HQ (23-40%) y publicar los parámetros farmacocinéticos de las dos hidroxiquinolinas para establecer si este antibiótico se absorbe, además si debe tener un periodo de retiro antes del sacrificio.

I.3 Técnicas publicadas para cuantificar halquinol.

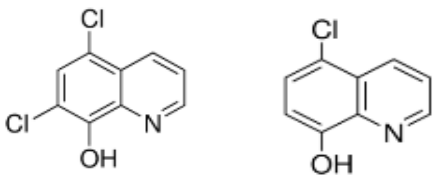
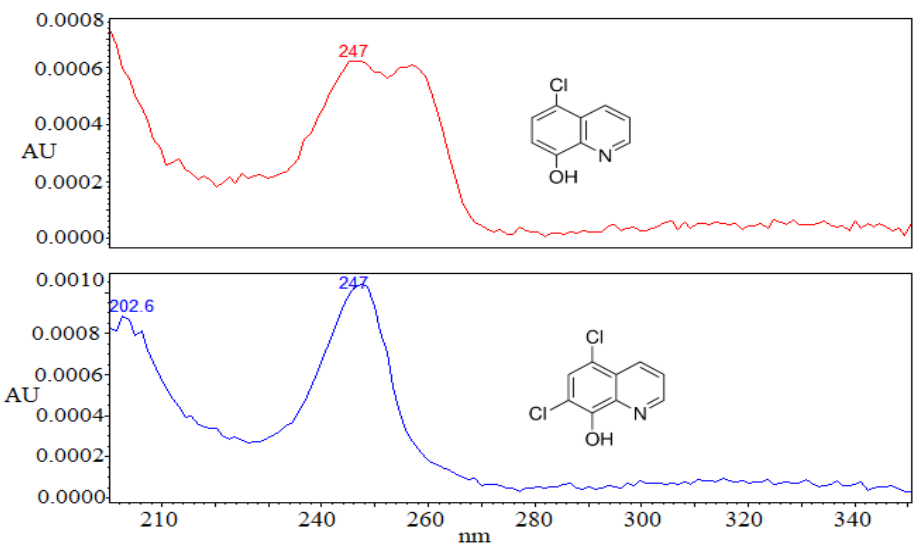
Hasta el momento se han reportado un método de identificación y seis diferentes métodos para cuantificar los principales componentes de halquinol: 5,7-Dicloro-8-hidroxiquinolina (5,7-HQ) y el 5-Cloro-8-hidroxiquinolina (5-HQ). En la tabla No. 2, se describen los métodos publicados por mencionados:

Tabla No. 2 Técnicas publicadas para cuantificar halquinol.

Técnica	Muestra	Concentraciones	Tiempo de análisis	Ventajas	Desventajas
Extracción líquido-líquido seguida de Espectrometría de fluorescencia [16]	Alimento medicado para cerdos	3.75-7.25 µg/mL	1.5 h aprox.	-Recobros del 93-106%	-Usan grandes cantidades de muestra -Gran consumo de solventes orgánicos -No está validado -Inadecuado en premezclas y concentrados.
Extracción líquido-líquido seguida de Cromatografía en Capa Fina. [17]	Alimento medicado para cerdos	No reportado Solo identificación	3 h por muestra aprox.	-	Usan grandes cantidades de muestra, -Gran consumo de solventes orgánicos -No está validado -El tiempo de análisis largo. -Identificación mediante Rf.
Espectrofotometría Visible. [18]	Alimento medicado para cerdos	57 ppm	1 h aprox.	- Recobros del 95-128%	Gran consumo de solventes orgánicos -No está validado -Cuantifican halquinol total
Cromatografía de Gases. [18]	Alimento medicado para cerdos	8 ppm 5-HQ 16 ppm 5,7-HQ	5 h aprox.	-Recobros del 73-117 % -Pueden cuantificar las dos hidroxiquinolinias	Usan grandes cantidades de muestra, -Gran consumo de solventes orgánicos -No está validado -Tiempo largo de pretratamiento de muestra
Cromatografía en Capa Fina fase normal. [19]	Materia prima y bolos	300 a 800 ng/mL	3 h aprox.	-Se demostró linealidad, exactitud y precisión.	-Gran consumo de solventes orgánicos -El tiempo de preparación de muestra largo.
HPLC. [20]	Suspensiones y bolos	12-28 µg/mL (5-HQ) 33-77 µg/mL (5,7-HQ)	30 min.	Recobros del 98-101.5 % -Sencillo. Validación completa	El tiempo de análisis largo
Cromatografía líquida espectrometría de masas de triple cuadrupolo (LC-MS/MS). [21]	Músculo porcino, huevo, leche, anguila, peces planos y camarones	5-20 µg/kg	1.7 h aprox.	70.6 y 101.7% El método está validado	El tiempo de análisis es largo Consumo de solventes orgánicos
UPLC-PDA	Alimento medicado Materia prima	LC _{5-HQ y 5,7-HQ} = 2.09 y 3.13 ng/mL LD _{5-HQ y 5,7-HQ} = 0.69 y 1.03 ng/mL	15 min.	-Recobros del 98-102% -Método sencillo. -Validación completa -Bajo consumo de solventes	-
UPLC-MS/MS	Plasma, músculo, hígado y riñón porcino	LC _{5-HQ y 5,7-HQ} = 339 Y 580 pg/mL plasma LC _{5-HQ y 5,7-HQ} = 480 Y 500 pg/g músculo LC _{5-HQ y 5,7-HQ} = 823 y 928 pg/mL riñón LC _{5-HQ y 5,7-HQ} = 278 y 465 pg/mL hígado	30 min	-Recobros del 98 al 102% -Métodos validados -Bajo consumo de solventes	-

I.4. Propiedades fisicoquímicas del halquinol

Tabla 3. Características de la sustancia de referencia halquinol.

Nombre Común	Halquinol, Chlorchinolinolum; Chloroxine; Chlorquinol; Cloroxinum.
Fórmula molecular:	$C_9H_5Cl_2NO$, C_9H_6ClNO
Fórmula estructural:	
Nombre IUPAC:	5,7-Dicloro-8-quinolinol (75.3%), 5-Cloro-8-quinolinol (23.2%)
Peso molecular:	176.61 y 214.05
Propiedades fisicoquímicas	Polvo gris, soluble en 50 partes de cloroformo, en ácido y base, en 130 partes de éter y en 250 partes de etanol (96%). Debe protegerse de la luz y resguardarse lejos de metales; ya que tiene fuertes propiedades quelantes Cu (II), Fe (III) y Zn (II).
Condiciones de almacenamiento:	Se debe mantener en un lugar seco, fresco, bien ventilado y el recipiente cerrado herméticamente.
Espectros de Absorción experimentales	

I.5. Metabolismo de hidroxiquinolinas halogenadas ^[25]

Derivados de la quinolina han sido usados durante mucho tiempo en el tratamiento de disentería amebiana humana y disentería bacilar. El núcleo 8-quinolinol provee las bases para una gran variedad de fármacos; diversos derivados halogenados con iodo, cloro o bromo como sustituyentes en posición 5 y/o 7.

El uso sistémico de los derivados halogenados del 8-quinolinol (HOX), ganaron gran aceptación, especialmente en aquellos países donde la amebiasis es común. Fue eficaz contra las formas móviles y quísticas de la enfermedad y, debido a su absorción sistémica relativamente “pobre”, muchos derivados halogenados de la 8-quinolinol también se han utilizado para la terapia antimicótica y antibacteriana tópica.

Los principales metabolitos de los derivados halogenados de la 8-quinolinol formados in vivo por las enzimas de fase II, son los conjugados de glucurónico y sulfato. Una pequeña fracción de la 8-quinolinol (HOX) halogenada administrada originalmente aún podría permanecer en forma libre. Más del 90% de los conjugados de glucurónido y sulfato, así como la forma libre de HOX, se excretan en la orina y la bilis. Una fracción insignificante podría sufrir una deshalogenación en la etapa Fase I de la ruta del metabolismo para formar metabolitos desconocidos. La literatura disponible ilustra estudios realizados en animales de laboratorio, estudios metabólicos radiomarcados en ratones y terneros y estudios realizados en seres humanos. Esta revisión restringiría la estructura de la relación de la actividad de las hidroxiquinolinas halogenados con respecto al metabolismo in vivo, como se muestra en la figura 3.

Como varios derivados halogenados de la hidroxiquinolina (HOX) se usaron ampliamente como amebicidas y bactericidas intestinales, se han informado algunos estudios sobre su metabolismo en humanos para ICHQ (5-chloro-7-iodo-quinolin-8-ol) y DBHQ (7-dibromo-quinolin-8-ol). Sin embargo, los datos disponibles son aún escasos para otros derivados halogenados de la hidroxiquinolina.

En humanos con dosis única de 0.1 a 12 mg de ICHQ, se excretó 43% en su orina como conjugados de glucurónico y sulfato dentro de los 10 a 18 días (Liewendahl and Lamberg, 1967). La eliminación urinaria en el hombre para la dosis única de DBHQ ascendió a 36% molar después de 24 horas y 48% molar después de 72 horas.

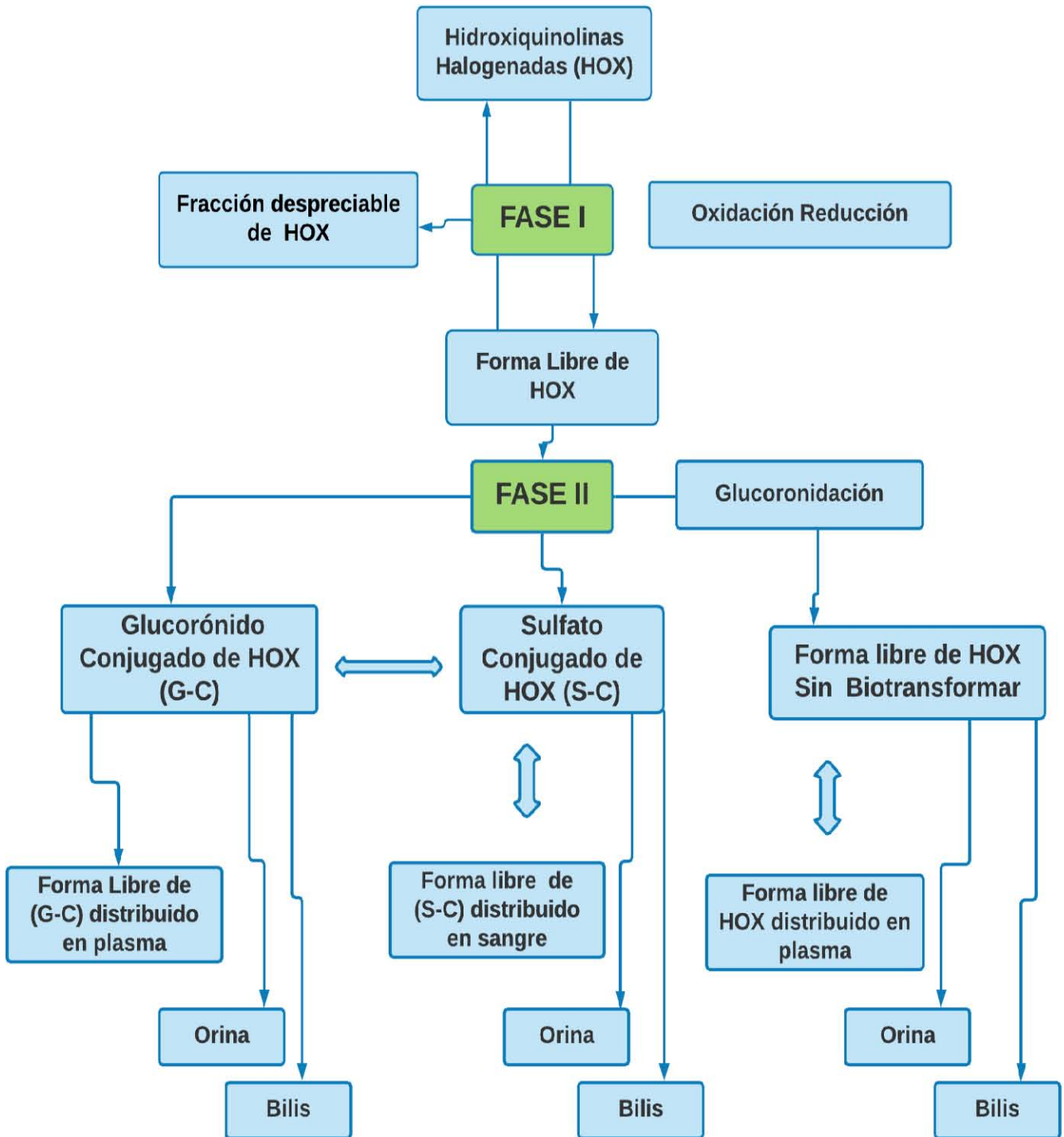


Figura 3. Modelo farmacocinético de los derivados halogenados del 8-quinolinol. [25]

(HOX)			
5,7-Dicloro-8-hydroxyquinolina (5,7-HQ)		5-Cloro-8-hydroxyquinolina (5-HQ)	
sulfato de 5,7-Dicloro-8-hidroxiquinolina (S-C)	5,7-Dicloro-8-hidroxiquinolina β-D-glucuronido (G-C)	Sulfato de 5-Cloro-8-hidroxiquinolina (S-C)	5-Cloro-8-hidroxiquinolina β-D-glucuronido (G-C)

Continuación de Figura 3. Modelo farmacocinético de los derivados halogenados del 8-quinolinol. [25]

El metabolito principal consiste en glucurónico de DBHQ se excreta como compuesto libre, pero en cantidades muy pequeñas menos de 1.3% molar mostró pérdida de bromo. Esto confirma con otros experimentos realizados en otras especies la pérdida de halógenos en los derivados halogenados de 8-quinolinol. [25]

De los análisis metabólicos y farmacocinéticos realizados en los diversos estudios, se observa que la mayoría del derivado de HOX permanece libre o se forman glucurónido conjugado (G-C) y sulfato conjugado (S-C), las formas de HOX que se excretan en la orina / bilis y la deshalogenación de estos compuestos es limitada. Se deben realizar estudios adicionales en granjas y especies como aves de corral y cerdos para validar estos hallazgos. [25]

II. HIPÓTESIS

Si se desarrollan estrategias de pretratamiento de diversas matrices biológicas (plasma, musculo, grasa, piel, riñón e hígado) que permitan extraer de manera eficaz 5,7-Dicloro-8-hidroxiquinolina y 5-Cloro-8-hidroxiquinolina, se podrá validar los métodos analíticos por cromatografía de líquidos-masas para estudiar su cinética de residuos en cerdos a fin de determinar el comportamiento farmacocinético y tiempos de retiro en cerdos, para garantizar la inocuidad de los productos alimenticios de origen animal como el cerdo.

III. OBJETIVOS

Objetivo General

- ✓ Desarrollar métodos analíticos por UPLC/MS-MS, que permitan cuantificar de manera eficaz residuos de 5,7-Dicloro-8-hidroxiquinolina (5,7-HQ) y 5-Cloro-8-hidroxiquinolina (5-HQ) en plasma, músculo, riñón e hígado de cerdo con la finalidad de establecer los tiempos de retiro de dichos fármacos y detectar posibles riesgos sanitarios.

Objetivos particulares

- ✓ Desarrollar y validar un método analítico indicativo de estabilidad de 5,7-HQ y 5-HQ en premezclas medicamentosas por Cromatografía de Líquidos de Ultra Desempeño con detector PDA.
- ✓ Realizar un estudio de estabilidad forzada de 5,7-HQ y 5-HQ a distintas condiciones; medios ácidos, alcalinos, oxido-reductores, luz y temperatura para conocer los factores con los que es posible su degradación.
- ✓ Desarrollar la metodología analítica que permita cuantificar a nivel de trazas, halquinol (5,7-HQ y 5-HQ), en hígado, riñón, músculo y plasma y para definir especificaciones de análisis de dichos analitos en estudios de cinética de residuos en cerdos.
- ✓ Validar los métodos analíticos desarrollados para demostrar que cumple con los requisitos que las guías de armonización ICH recomienda para cinética de residuos de medicamentos con el fin de generar resultados confiables en la determinación de ambos analitos en distintas matrices biológicas de cerdo.
- ✓ Realizar el estudio farmacocinético de 5,7-HQ y 5-HQ en cerdos para determinar los parámetros C_{max} , $t_{máx}$, ABC , K_{ab} , K_{el} , $t_{1/2}$.
- ✓ Realizar un estudio histopatológicos de músculo, hígado y riñón provenientes de los tejidos colectados después de la suplementación para demostrar si existe daño a nivel celular.

IV. PLAN EXPERIMENTAL

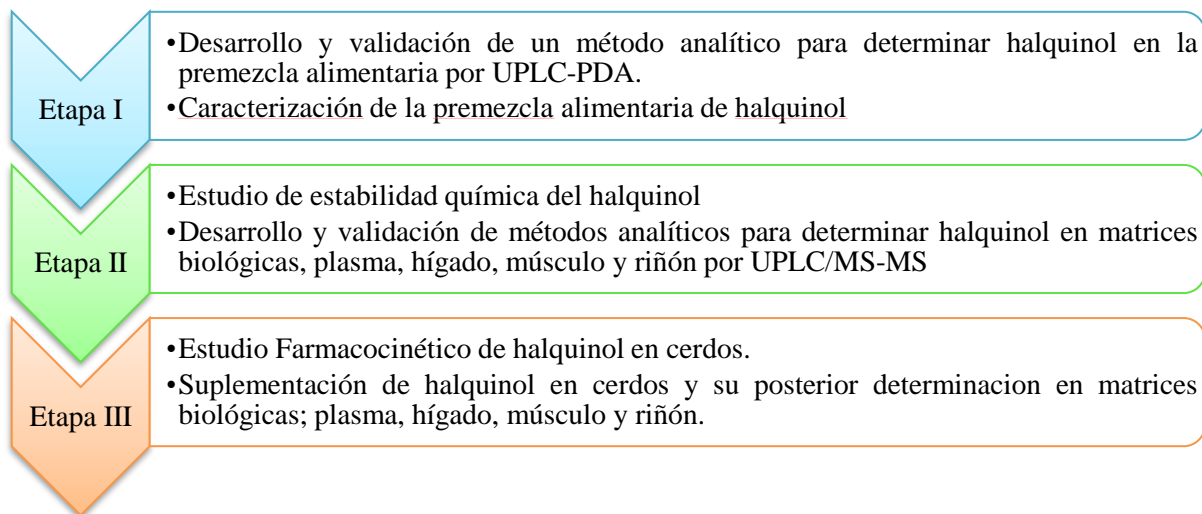


Figura 4. Etapas del proyecto.

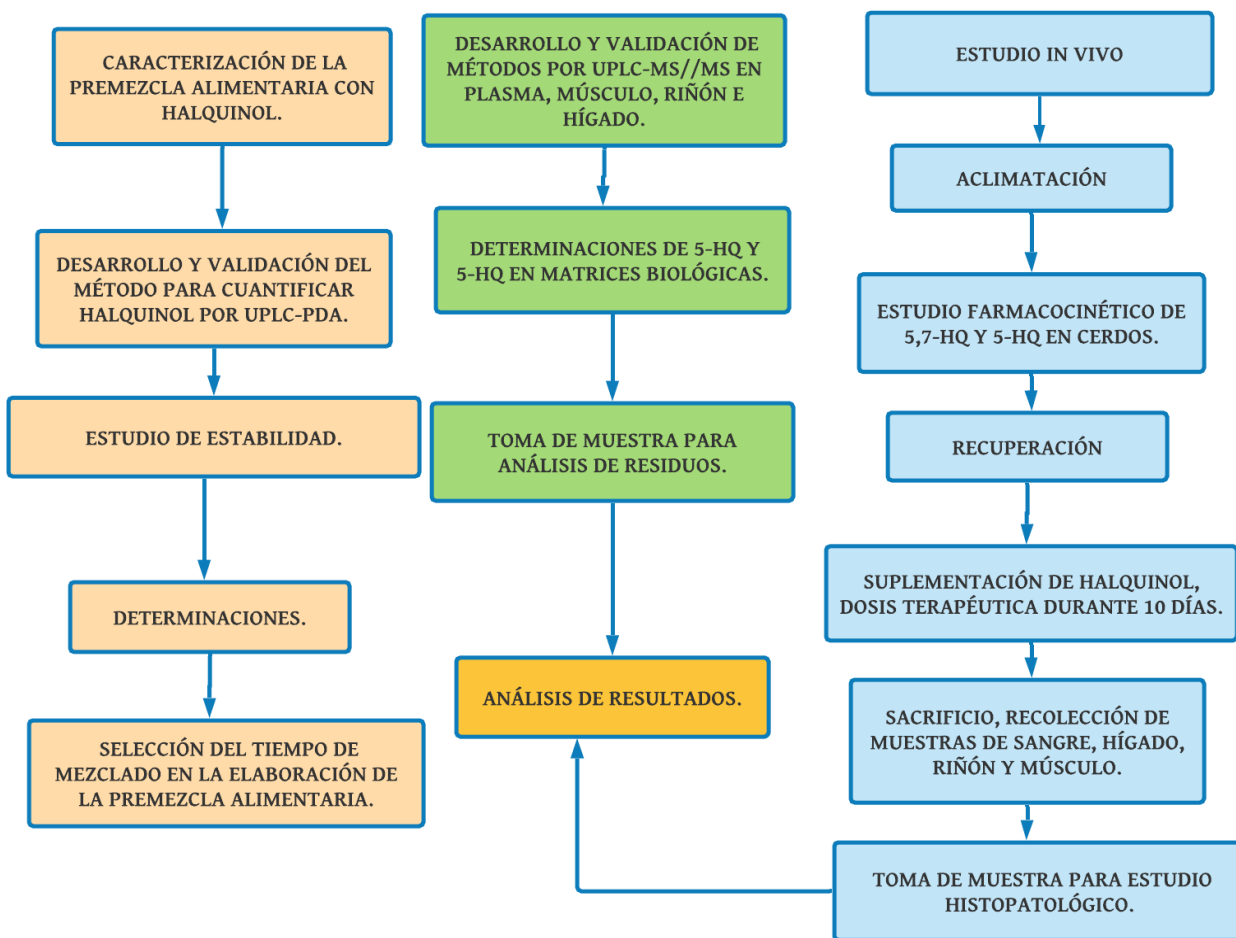


Figura 5. Actividades generales del proyecto.

V. DESARROLLO EXPERIMENTAL

V.1 Localización

El desarrollo del proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio 5 de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4. Los trabajos con las unidades experimentales se realizaron dentro del Área de Experimentación Animal de la Coordinación General de Estudios de Posgrado del Centro de Producción Agropecuaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4 de la Universidad Nacional Autónoma de México

V.2 Unidades experimentales

Se utilizaron 6 cerdos destetados de la misma camada de raza landrace, con una edad de 45 días, las unidades experimentales se identificaron, se pesaron y acondicionaron y los trabajos se realizaron dentro del Área de Experimentación Animal de la Coordinación General de Estudios de Posgrado en el Centro de Producción Agropecuaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4 de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales utilizados en el estudio no presentaron signos clínicos de ninguna enfermedad, ellos se manejaron con la aprobación del comité interno para el cuidado y uso de animales experimentales de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México. CICUAE- FESC C17_11.

V.2.1 Tratamiento

Las unidades experimentales 6 unidades, de 45 días de edad, 5 machos y 1 hembra, con peso promedio de 10.73 Kg, se dejó aclimatar durante 7 días, los cerdos se mostraron saludables y sin síntomas de enfermedad o estrés alguno. Un día después se administró el halquinol vía oral y se comenzó con las tomas de muestras a diferentes tiempos 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8 y 24 h.

V.2.3 Alimentación

Todas las unidades experimentales fueron alimentadas alrededor de las 10 de la mañana durante la primera etapa de la experimentación con alimento preiniciador mezclado 1:1 con pelets Inifin de Nupec y agua a libre acceso.

V.2.4 Suplementación de halquinol

Todas las unidades experimentales fueron alimentadas alrededor de las 10 de la mañana durante la segunda etapa después del estudio farmacocinético, se alimentaron con alimento preiniciador mezclado con halquinol materia prima a una concentración de 1g de halquinol materia prima por kg de alimento, ad libitum durante 10 días y agua a libre acceso.

V.2.5 Toma de muestra

Para el estudio farmacocinético se colocó un catéter en la yugular mediante una microcirugía. Las muestras de sangre se tomaron del catéter utilizando jeringas previamente heparinizadas y cuidadosamente se vaciaron en tubos al vacío de 6 mL con Heparina. Se almacenaron a 4°C inmediatamente después del muestreo, enseguida las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min., el plasma obtenido se separó en microtubos y se almacenó a una temperatura de -80°C hasta su análisis.

V.3. Desarrollo y validación de método para la determinación de 5,7-HQ y 5-HQ como indicativo de estabilidad en premezclas alimentarias.

V.3.1. Materiales.

Estándar de halquinol que específicamente contiene 5,7-Dicloro-8-hidroxiquinolinol (75.3 %) y 5-Cloro-8-hidroxiquinolinol (23.2 %) de pureza, se adquirieron de TLC Pharmachem Inc. Lote 1489-020^a 1, el acetonitrilo y el metanol (grado HPLC), ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico e hidróxido de sodio de J.T.Baker y agua Milli-Q (sistema Millipore).

V.3.2. Cromatografía.

Se utilizó un equipo de cromatografía de líquidos de ultra eficiencia ACQUITY UPLC[®] con detector de arreglo de diodos, columna C18 1.7 μ m 2.1x100mm ACQUITY BEH UPLC[®] de Waters, manteniéndose a 40 °C. Las fases móviles fueron (A) ácido fosfórico 0.1%, (B) acetonitrilo (45:55) a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. La separación se logró en modo isocrático y el volumen de inyección fue de 10 μ L y la temperatura en el auto muestreador se mantuvo a 15 °C.

V.3.3. Preparación de la solución stock.

5-HQ y 5,7-HQ se pesó aproximadamente con precisión 10 mg de estándar de halquinol que contiene a los dos analitos en 23.2% y 75.3% respectivamente. Se disolvió en metanol y se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL, se llevó a la marca de aforo con el mismo disolvente, obteniendo una concentración de 400 $\mu\text{g/ml}$ del halquinol. Se transfirió una alícuota de 500 μl a otro matraz aforado de 25 mL y se llevó al aforo con agua desionizada para obtener una solución stock de 8 $\mu\text{g/mL}$ de halquinol.

V.3.4. Pretratamiento de premezclas alimentarias (muestras).

Se pesó aproximadamente con precisión 100 mg de alimento cerdos (o el equivalente a 10 mg de halquinol), se transfirió a matraces volumétricos de 25 ml que contenían metanol y luego se sonicó durante 2 min, el volumen se ajustó a la marca de aforo con el mismo disolvente. Se transfirió una alícuota de 800 μL a otro matraz aforado de 25 mL y se llevó al aforo con agua desionizada. La cantidad de 5-HQ y 5,7-HQ se determinó por interpolación en la curva de calibración obtenida en las condiciones cromatográficas propuestas.

V.3.5. Validación.

El método fue validado determinando linealidad, precisión, exactitud, selectividad, límite de detección, límite de cuantificación y robustez.

V.3.5.1. Linealidad del sistema.

Las curvas de calibración se prepararon por triplicado de 6 niveles de concentración a partir de la solución, los gráficos se construyeron representando la concentración de cada hidroxiquinolina en función del área del pico ($n = 18$), que va de 111, 222, 333, 443, 554 y 665 ng/mL para 5-HQ y de 360, 720, 1079, 1439, 1799 y 2158 ng/mL para 5,7-HQ.

V.3.5.2. Linealidad del método.

Se pesó aproximadamente con precisión 10 mg de halquinol y 100 mg de alimento porcino, posteriormente se disolvió en metanol y se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL, después se sonicó durante 2 min, el volumen se ajustó a la marca de aforo con el mismo disolvente. Se transfirió una alícuota de 800 μL a otro matraz aforado de 25 mL y se llevó al aforo con agua desionizada.

Los gráficos se construyeron representando la concentración adicionada en función de la concentración recuperada de cada hidroxiquinolona ($n = 18$), que va de 148, 222, 296, 370, 445 y 519 ng/mL para 5-HQ y de 481, 721, 962, 1202, 1443 y 1683 ng/mL para 5,7-HQ. Los cromatogramas de esta solución se muestran en el anexo X.2.

V.3.5.3. Exactitud y precisión.

La precisión instrumental se evaluó en 3 niveles, 80, 100 y 120% de 5-HQ (296, 370 y 445 ng/mL) y 5,7-HQ (962, 1202 y 1443 ng/mL) por sextuplicado. Las cantidades de ambos analitos se estimaron por el método desarrollado, midiendo el área del pico y ajustando estos valores a la ecuación en línea recta de la curva de calibración. La precisión del método se determinó calculando las recuperaciones de cada analito en alimentos medicados fortificados con 5-HQ y 5,7-HQ. En cuanto a la precisión, se informó como el porcentaje de desviación estándar relativo (% RSD).^[26]

V.3.5.4. Selectividad.

La selectividad se determinó mediante el análisis de las premezclas alimentarias para cerdos (según el proveedor, contiene maíz, harina de soja, cáscara de arroz, cebada, trigo, harina de girasol, fosfato monocálcico, salvado, carbonato de calcio y bentonita) para identificar si hay interferencias de matriz con los analitos de interés (mediante la comparación de los diferentes cromatogramas y tiempos de retención de 5-HQ y 5,7-HQ en las muestras y los estándares).

Los blancos de la muestra se prepararon pesando aproximadamente 100 mg de alimento para cerdos, se transfirió en matraces volumétricos de 25 mL que contenían metanol y luego se sonico durante 2 min, el volumen se ajustó a la marca de aforo con el mismo disolvente. Se transfirió una alícuota de 800 μ L a otro matraz aforado de 25 mL y se llevó al aforo con agua desionizada y se midió por cromatografía para demostrar que no hay interferentes en los tiempos de retención de los analitos de interés.

V.3.5.5. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC).

Se prepararon soluciones de 0.72, 1.46 y 2.18 ng/mL de 5-HQ y 2.30, 4.61, 6.92 ng/mL de 5,7-HQ, y el límite de detección se calculó como $LD = 3 S_b / b_1$, mientras que el límite de cuantificación como $LC = 10 S_b / b_1$, donde S_b es la desviación estándar del blanco y b_1 es la pendiente, como se estima a partir de la curva de calibración.^[27-28]

V.3.5.6. Robustez.

La robustez del método se evaluó agregando 0.01% de EDTA a la fase acuosa, cambiando la relación de fase móvil H₃PO₄: Acetonitrilo (50:50), agregando 0.1% de HCOOH en lugar de 0.1% de H₃PO₄, y estudiando la estabilidad de la solución de muestra a 25 ± 2 °C a las 24 h.

V.3.5.7. Estudio de degradación forzada.

Se realizaron estudios de degradación forzada utilizando hidrólisis ácida y alcalina, oxidación química con peróxido de hidrógeno y degradación fotoquímica con una lámpara UV (365 nm). [29] Los experimentos se llevaron a cabo y se monitorizaron cromatográficamente. Para esto, se transfirieron 15.9 mg de 5,7-HQ estándar a un matraz aforado de 100 mL, se agregaron 70 mL de metanol y el volumen se ajustó a la marca con agua desionizada. Luego, se transfirieron 2 mL de esta solución a un matraz aforado de 10 mL, y el volumen se ajustó a la marca con HCl 6N. El mismo procedimiento se llevó a cabo usando H₂SO₄ 3 N, NaOH 6 N, H₂O₂ al 30% y para la degradación fotolítica el diluyente fue agua desionizada. Las soluciones para los estudios de estabilidad 5-HQ y 5,7-HQ se mantuvieron a 25 °C y se analizaron a las 24, 48 y 120 horas.

Para el análisis de las muestras de degradación, se transfirieron 600 µL de cada solución a un matraz volumétrico de 10 mL. Las soluciones alcalinas se ajustaron a pH 4.0 con 600 µL de H₂SO₄ 3 N, mientras que las soluciones ácidas se ajustaron a pH 4.0 con 550 µL de NaOH 6 N, y los volúmenes se ajustaron a la marca con agua desionizada para obtener una concentración final de 547.20 ng/mL para 5-HQ y 1888.92 ng/mL para 5,7-HQ. Las soluciones se analizaron en las condiciones cromatográficas propuestas. [30-31]

V.4. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE 5,7-HQ Y 5-HQ EN PREMEZCLAS ALIMENTARIAS, PLASMA SANGUÍNEO, MÚSCULO, HÍGADO Y RIÑÓN.

V.4.1. Materiales.

Los reactivos de 5,7-Dicloro-8-hidroxiquinolinol al 99% y 5-Cloro-8-hidroxiquinolinol al 95% de pureza, y ácido fórmico (grado reactivo 88 %) se adquirieron de Sigma Aldrich, el acetonitrilo, isopropanol y metanol (grado HPLC) e hidróxido de Amonio (grado reactivo 28 %) de J.T. Baker y agua Milli-Q (sistema Millipore).

Para la micro extracción en fase sólida (SPE) se utilizaron cartuchos de 96 pozos Oasis[®] MAX μ Elution que contiene un polímero de modo mixto, de fase reversa intercambio amónico fuerte, humectable con agua, que es selectivo para los ácidos y estable en eluyentes orgánicos, también se utilizó un procesador Positive Pressure-96 adquiridos de Waters.

V.4.2. Cromatografía.

Se utilizó un equipo ACQUITY UPLC[®] con una columna C18 1.7 μ m 2.1x50mm ACQUITY BEH UPLC[®] con detector de masas Waters, manteniéndose a 30°C. Las fases móviles fueron (A) ácido fórmico 0.1%, (B) acetonitrilo a una velocidad de flujo de 0.6 mL/min. La separación se logró con un gradiente lineal (Tabla 4). El volumen de inyección fue de 10 μ L y la temperatura en el auto muestreador se mantuvo a 15 °C.

Tabla 4. Gradiente de elución optimizado.

Tiempo (min)	% solvente A	% solvente B	Curva ^a
0.0	60	40	lineal
3.0	60	40	lineal
3.1	60	40	lineal
3.2	90	10	lineal
5.5	90	10	lineal
5.51	60	40	lineal
7.0	60	40	lineal

Curva de gradiente lineal para optimizar la resolución de los analitos ^a.

V.4.3. Espectrometría de masas.

Se utilizó un espectrómetro de masas en tándem XEVO[™] TQ, fue operado con ionización por electrospray en modo positivo (ESI+). Para encontrar las condiciones de detección, se infundieron en el equipo soluciones de 200 ng/mL de estándares de 5,7-Dicloro-8-hidroxiquinolinol y 5-Cloro-8-hidroxiquinolinol. Se aplicó el método de monitorización de múltiples reacciones (MRM) utilizando un tiempo dwell de 0.20 s. El voltaje fue de 0.8 kV para el capilar y 50 V para el cono, temperatura de desolvatación 650 °C, flujo del gas de desolvatación 1000 L/h, flujo del gas cortina 10 L/h.

V.4.4. Procedimiento de extracción de 5,7-HQ y 5-HQ.

Se transfirieron 500 μL de plasma sanguíneo de cerdo a viales de 2 mL se adicionó 50 μL de mezcla de concentración conocida de 5,7-HQ y 5-HQ, se agitó en vórtex durante 10 s, posteriormente se adicionó 400 μL de ácido tricloroacético en metanol. Los viales se homogeneizaron en vórtex durante 60 s. Después se centrifugaron a 15000 rpm 15 min 4°C . En otro vial se transfirió 500 μL de sobrenadante y se adicionó 100 μL de NH_4OH 14%, esta solución se limpió usando micro extracción en fase sólida (Oasis[®] MAX $\mu\text{Elution}$ de 96 pozos), para lo cual se acondicionó con 500 μL de metanol y con 500 μL de agua desionizada, después se cargó 150 μL de la muestra. Posteriormente se eluyó con 150 μL de una mezcla de (ácido fórmico) AF 2% en (acetonitrilo) ACN: 25:75, en placas de 96 pozos, se inyectaron 10 μL en el sistema UPLC-MS/MS.

V.4.5. Exactitud y precisión.

Con base en la guía de validación de métodos bioanalíticos de la Food and Drug Administration ^[26] se determinaron la exactitud y precisión del método. La evaluación se realizó con plasma sanguíneo de cerdo, adicionado con 3 niveles de concentración; 329, 1317 y 2305 pg/mL ($n=6$ por concentración) para 5-HQ y 389, 1558 y 2726 pg/mL ($n=6$ por concentración) para 5,7-HQ, se evaluaron los coeficientes de variación, los porcentajes de recobro y las desviaciones estándar.

V.4.6. Curvas de calibración.

La construcción de la curva de calibración se realizó con 7 niveles de concentración en un rango de 329-2305 pg/mL para 5-HQ y 389-2726 pg/mL para 5,7-HQ, para demostrar linealidad del sistema. Para demostrar la linealidad del método se realizó una curva utilizando plasma de cerdo y se cargó con concentraciones conocidas de 5-HQ Y 5,7-HQ en los mismos intervalos de concentración por triplicado. Posteriormente se evaluaron los coeficientes de determinación, correlación y los intervalos de confianza para el intercepto y la ordenada al origen utilizando Microsoft Excel para Office 365.

V.4.7. Límites de detección y cuantificación

Se prepararon soluciones de 329, 659 y 988 pg/mL de 5-HQ y 389, 779 y 1168 pg/mL de 5,7-HQ, y el límite de detección se calculó como $LD = 3 S_b / b_1$, mientras que el límite de cuantificación como $LC = 10 S_b / b_1$, donde S_b es la desviación estándar del blanco y b_1 es la pendiente, como se estima a partir de la curva de calibración. [27-28]

V.4.8. Estabilidad de la matriz a Corto Plazo y ciclos de congelación.

Como parte del procedimiento de validación se debe llevar a cabo un estudio de estabilidad para determinar las condiciones de almacenamiento apropiadas para las muestras. Para ello se fortificaron las muestras con cantidades conocidas de 5-HQ y 5,7-HQ y almacenarse a condiciones adecuadas, posteriormente las muestras se analizaron a 24 y 48 h. Muestras recién preparadas (R) y muestras congeladas a -80°C de estabilidad a Corto Plazo (ECP) y en ciclos de congelación-descongelación.

VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En la Tabla 5, se presentan los parámetros cromatográficos para los compuestos analizados obtenidos a partir de 6 inyecciones. Los valores de los coeficientes de variación (%CV) observados para 5-HQ y 5,7-HQ están dentro del valor USP aceptado [32] ($\leq 2\%$). También se calcularon los factores de capacidad (k) y selectividad (α), coleo, resolución (Rs) y número de platos teóricos por metro (eficiencia).

Tabla 5. Parámetros cromatográficos de 5-HQ y 5,7-HQ (n=6)

Analito	Factor de Capacidad (k)	Selectividad (α)	Coleo	Resolución (Rs)	Eficiencia (No. platos m^{-1})
5-HQ	0.77	1.35	1.09	2.58	8242.80
5,7-HQ	2.58	3.35	1.04	16.22	9740.28
RSD% _{5-HQ}	0.20	0.09	0.82	1.04	1.54
RSD% _{5,7-HQ}	0.20	0.23	0.77	1.14	1.84

VI.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO UPLC-PDA PARA PREMEZCLAS.

Los cromatogramas del placebo y el blanco no mostraron picos en los tiempos de retención de los analitos estudiados. La linealidad del sistema con coeficientes de correlación de 0.9993 para 5-HQ y 0.9988 para 5.7-HQ se considera aceptable. Los coeficientes de determinación fueron 0.9987 y 0.9978, respectivamente.

El intervalo de confianza para las ordenadas al origen incluye cero, y el intervalo de confianza para las pendientes incluye la unidad. Posteriormente, se calcularon los porcentajes de recuperación de las concentraciones añadidas. Los coeficientes de correlación fueron 0.9998 para 5-HQ y 0.9993 para 5.7-HQ, los coeficientes de determinación fueron 0.9997 para 5-HQ y 0.9987 para 5.7-HQ, el promedio de los porcentajes de recuperación fue de 99.83% para 5-HQ y 100,23% para 5,7-HQ, los valores de RSD fueron 0.40% y 1.39%, respectivamente. Los valores obtenidos cumplieron con los criterios de aceptación.

VI.1.1 Linealidad del sistema y del método.

La Figura 6A y 6C muestran los gráficos de las curvas de calibración del sistema (muestras estándar) para 5-HQ y 5,7-HQ, respectivamente. La Figura 6B y 6D muestran los gráficos del método (muestras de matriz fortificada) que presentan tanto la ecuación de regresión lineal como los coeficientes de correlación.

El límite de detección y cuantificación se determinó como 0.69 ng/mL y 2.09 ng/mL, respectivamente, para 5-HQ y el límite de detección y cuantificación se determinó como 1.03 ng/mL y 3.13 ng/mL, respectivamente, para 5, 7-HQ.

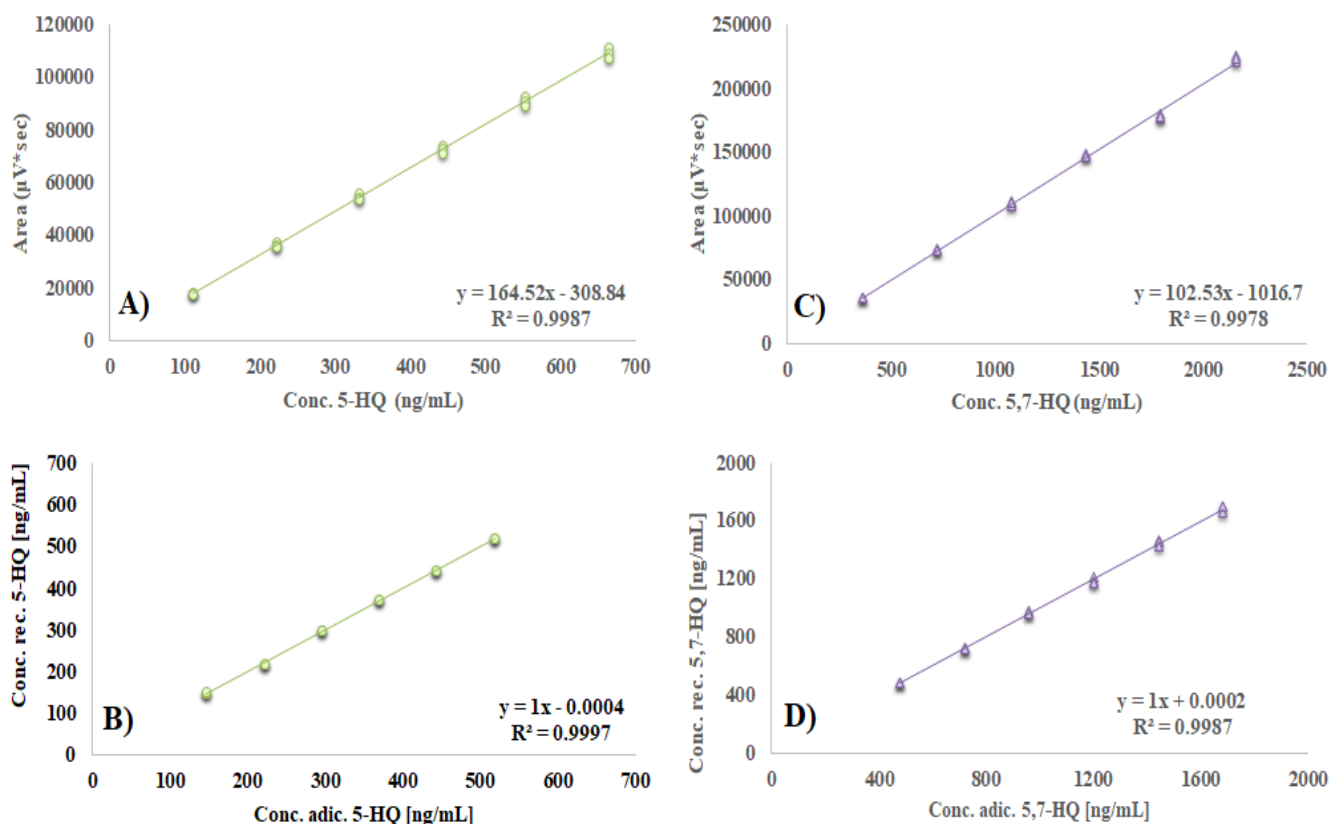


Figura 6 A) and C) Curva de calibración de 5-HQ and 5,7-HQ con estándar respectivamente, y B) y D) 5-HQ and 5,7-HQ con alimento fortificado para cerdos.

La precisión de un método analítico está relacionada con la dispersión de las mediciones alrededor de su valor promedio. Se analizó el alimento porcino preparado con cantidades conocidas de analito. La tabla 6 muestra los valores de RSD obtenidos para la determinación de la precisión.

Según lo observado, son menores al 2%, los porcentajes de recobro para 5-HQ fueron de 99.2 a 98.9% para cada analista, y los porcentajes de recobro para 5,7-HQ fueron de 100.6 a 100.3% para cada analista, lo que indica buenos resultados en la evaluación de la precisión. Los criterios de aceptación de cada parámetro evaluado se presentan en la Tabla 6 para 5-HQ y 5,7-HQ.

Tabla 6. Resumen de la validación para 5-HQ and 5,7-HQ.

Parámetros	5-HQ	5,7-HQ
Adecuabilidad	Coleo = 1.09 %RSD _{tr} = 0.09 %RSD _{área} = 0.65	Coleo = 1.04 %RSD _{tr} = 0.15 %RSD _{área} = 0.80
Linealidad del Sistema	$r > 0.9993$ $r^2 > 0.9987$	$r > 0.9993$ $r^2 > 0.9978$
Intervalo de concentración	111- 665 (ng/mL)	360 - 2158 (ng/mL)
Incertidumbre relativa	0.053 - 0.014	0.068 - 0.019
Exactitud y precisión	Recobro 100.56% % RSD = 0.71	Recobro 101.60% % RSD = 1.72
Linealidad del método (muestras fortificadas)	$r > 0.9998$ $r^2 > 0.9997$ Recobro 99.82 $\beta_0 = -0.0004$ $\beta_1 = 1$ % RSD = 0.40%	$r > 0.9993$ $r^2 > 0.9987$ Recobro 100.22 $\beta_0 = 0.0002$ $\beta_1 = 1$ % RSD = 1.40%
Reproducibilidad	Recobro _{Analista 1} 99.23% % RSD _{Analista 1} 0.79% Recobro _{Analista 2} 98.94% % RSD _{Analista 2} 0.62%	Recobro _{Analista 1} 100.68% % RSD _{Analista 1} 1.53% Recobro _{Analista 2} 100.40% % RSD _{Analista 2} 0.96%
Robustez		
Adicionando EDTA		
Cambiando a ácido fórmico	Recobro 98.40% d_i = 1.60	Recobro 99.99% d_i = 0.01
Cambiando proporción de f.m.	Recobro 100.97% d_i = 0.97 Recobro 99.14% d_i = 0.86	Recobro 98.99% d_i = 1.00 Recobro 100.19% d_i = 0.51
Estabilidad de la muestra (24 h)	Recobro 99.40 % d_i = 0.60	Recobro 99.99% d_i = 0.01
Límite de Cuantificación	2.09 ng/mL	3.13 ng/mL
Límite de Detención	0.69 ng/mL	1.03 ng/mL

La reproducibilidad del método se evaluó mediante determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, obteniendo porcentajes de recobro para 5-HQ de 99.2 con 0.7% RSD para el analista 1 y 98.9% y 0.6% RSD para el analista 2.

En cuanto a porcentajes de recobro 5,7-HQ fue 100.6% con 1.5% RSD para el analista 1 y 100.3% con 0.9% RSD para el analista 2, lo que demuestra que el método es reproducible. Se demostró robustez, desafiando el método propuesto haciendo modificaciones a la fase móvil y evaluando la estabilidad de la muestra en solución después de 24 h, en condiciones normales y diferentes, expresando los resultados como porcentajes de recobro y el valor absoluto de la diferencia aritmética $|d_i|$.

VI.1.2 Estudio de degradación forzada.

La Figura 7a muestra el pico de 5 HQ de un estándar de referencia con un tiempo de retención de 0,79 minutos y el pico de 5,7 HQ a 1,65 minutos. La Figura 7b muestra los picos de 5-HQ y 5,7-HQ en degradación con 3N H₂SO₄, como se puede ver, no hay picos adicionales. La Figura 7c muestra analitos expuestos a 30% de H₂O₂ sin mostrar picos de degradación. El pico observado en 0,4 min también se observa en el objetivo del disolvente. En la Figura 7d, en la que los analitos están bajo degradación con HCl 6N, se puede ver un pico adicional a 1.93 minutos. La Figura 7e muestra los picos después de exponerse a NaOH 6N y no se observan picos adicionales de degradación. Finalmente, en la Figura 7f se muestra el cromatograma de los analitos después de haber estado expuesto durante 24 horas a la luz UV.

Se ve que los picos prácticamente desaparecieron, ya que apenas se distinguen de la línea de base.

Tabla 7. Estudio de degradación forzada de 5-HQ y 5,7-HQ.

Condición	% Recobro 5-HQ			% Recobro 5,7-HQ		
	24 h	48 h	120 h	24 h	48 h	120 h
H ₂ SO ₄ (3 N)	100.12 ± 0.49	99.80 ± 0.20	99.95 ± 0.44	97.94 ± 0.12	98.55 ± 0.40	98.51 ± 0.34
H ₂ O ₂ (30 %)	98.26 ± 1.77	98.06 ± 0.83	93.22 ± 0.99	82.86 ± 0.86	80.47 ± 0.41	65.96 ± 1.66
HCl (6 N)	86.73 ± 0.12	86.70 ± 0.47	86.50 ± 0.24	100.02 ± 0.48	99.76 ± 0.19	99.65 ± 0.21
NaOH (6N)	96.37 ± 0.07	96.34 ± 0.05	96.43 ± 0.42	100.56 ± 0.66	100.52 ± 0.22	99.37 ± 0.47
UV light (365nm)	5.16 ± 0.48	3.79 ± 1.83	3.36 ± 1.790	11.36 ± 0.73	2.16 ± 1.50	2.07 ± 1.75

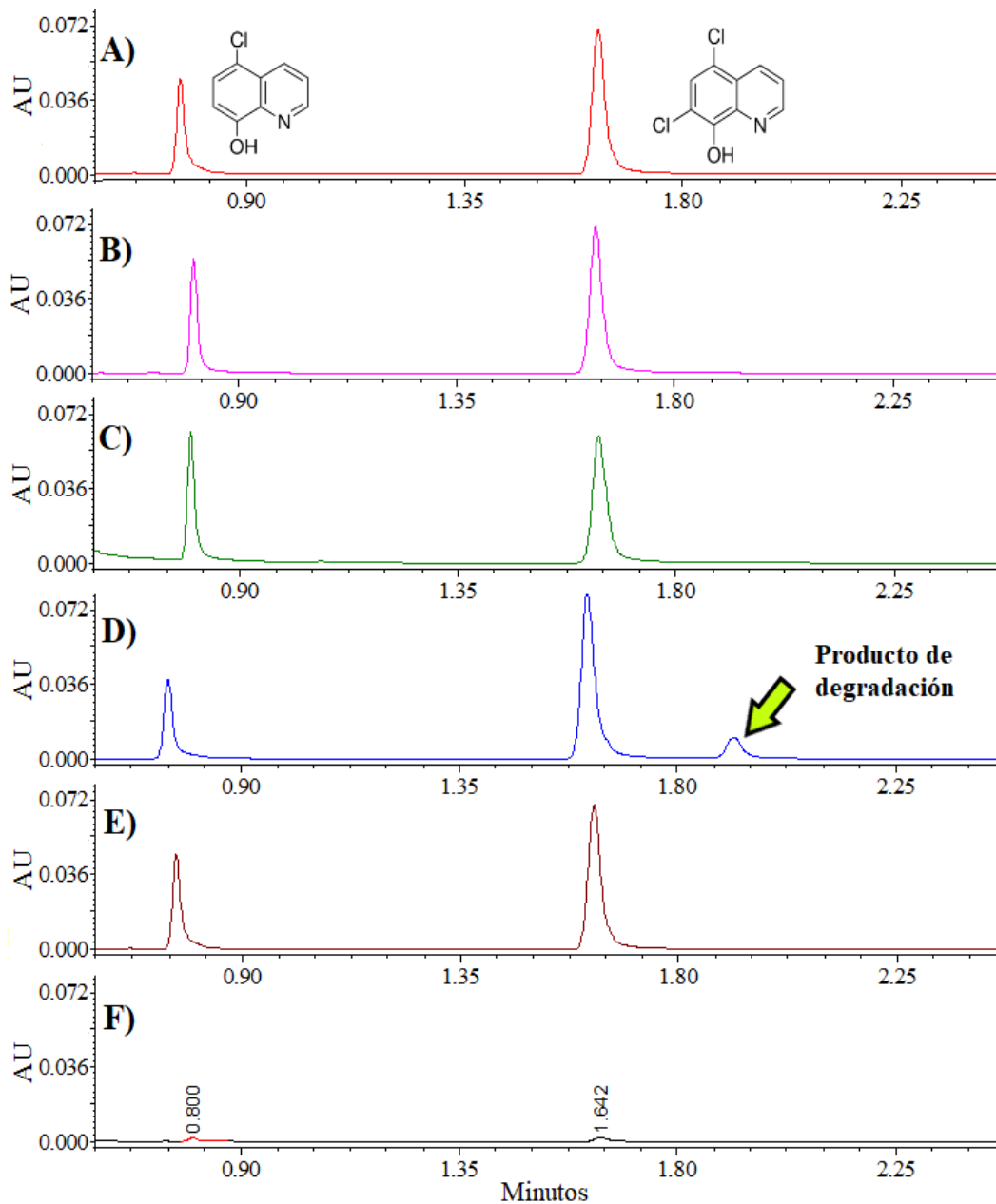


Figura 7. Cromatogramas a) 5-HQ (547 ng/mL y 5,7-HQ (1889 ng/mL, b) H_2SO_4 3N, c) H_2O_2 30%, d) HCl 6N, e) NaOH 6N y f) 24 h de luz UV (365 nm).

El peróxido de hidrógeno reaccionó con ambos analitos y se observó su degradación, ya que el valor de 5 HQ disminuyó un 7%, mientras que el valor de 5,7 HQ correspondiente disminuyó hasta un 34%. Entre todos los estudios de degradación, la luz UV causa una degradación mayor y rápidamente de ambos analitos. En 24 horas, el 95% de 5-HQ y el 89% de 5,7-HQ se degradaron.

Es importante mencionar que se hizo un barrido de 400 a 200 nm con el detector de arreglo de diodos, no hubo picos en otras longitudes de onda para relacionarlos como productos de degradación. Dado que el valor de RSD era inferior al 2%, el método se considera eficiente.

VI.1.3. Aplicación a muestras reales.

El método desarrollado se aplicó con éxito para cuantificar 5-HQ y 5,7-HQ en tres diferentes alimentos para cerdos (A, B y C), se expusieron a una temperatura de 60 ° C y 35% de HR según la referencia. [34] El objetivo de este estudio fue proponer un nuevo método para detectar 5-HQ, 5,7-HQ y los posibles productos de degradación de ambos analitos. Se propusieron condiciones adecuadas para futuros estudios y la cuantificación de 5-HQ y 5,7-HQ en menos de 2 minutos. Además, el método validado propuesto ha demostrado ser robusto, por lo que se puede utilizar en la determinación de 5-HQ y 5,7-HQ presentes en diferentes tipos de alimentos para cerdos.

Tabla 8. Alimento medicado para cerdos después de 120 h a 60 °C y 35% de HR.

Alimento medicado	% 5-HQ	Recobro (%) 5-HQ	% 5,7-HQ	Recobro (%) 5,7-HQ
A (tiempo inicial)	4.06	58.98 ± 1.16	9.95	83.17 ± 0.94
A_1	2.37		8.20	
A_2	2.39		8.36	
A_3	2.42		8.28	
B (tiempo inicial)	5.69	62.43 ± 0.32	12.10	57.37 ± 0.33
B_1	3.54		6.97	
B_2	3.57		6.93	
B_3	3.58		6.92	
C (tiempo inicial)	2.86	85.21 ± 1.30	7.24	98.73 ± 1.06
C_1	2.42		7.19	
C_2	2.47		7.06	
C_3	2.42		7.19	

La Tabla 8 muestra los porcentajes de recubro de 5-HQ y 5,7-HQ en el alimento medicado para cerdos, las muestras se sometieron a la cámara de estabilidad por triplicado de cada alimento A, B y C sujetas a degradación forzada. También se reportan los valores iniciales del contenido de los analitos.

Como se observa en la tabla 8, la cantidad de 5-HQ ha disminuido a 58.9% en el alimento A medicado y a 62.4% en el alimento B medicado, mientras que la comida C medicada disminuye a 85.2%. El contenido de 5,7-HQ en alimentos medicados A disminuye a 83.1%, y en alimentos medicados B disminuye a 57.3%, mientras que disminuye a 98.7% en alimentos medicados C. Estos resultados sugieren que la muestra C es la más estable ya que una disminución de aproximadamente el 15% de 5-HQ y 2% de 5,7-HQ está presente en esta muestra de alimento.

VI.2. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE 5-HQ Y 5,7-HQ EN PLASMA DE CERDO.

VI.2.1. Optimización del método de detección.

El primer paso para desarrollar el método de cuantificación fue optimizar y establecer las condiciones de detección de ambos analitos, fueron infundidos en el espectrómetro MS/MS para hallar los valores de medición del ion precursor y el ion hijo más abundante.

Por lo que primero se hizo infusión de halquinol, obteniendo los espectros de masas que se muestran en la figura 8, con ayuda de la aplicación IntelliStart, del software MassLynx del espectrómetro de masas en tándem XEVO™ TQ y arrojando los resultados de las transiciones y los parámetros optimizados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Parámetros optimizados para cada analito.

Analitos	Ion precursor (<i>m/z</i>)	Ion producto (<i>m/z</i>)	Voltaje del cono (V) ^a	Energía de colisión (eV) ^b
5,7-HQ	214.01	150.12	40	26
	214.01	123.06	40	34
5-HQ	180.01	145.05	38	22
	180.01	126.47	58	30
	180.01	117.02	58	24

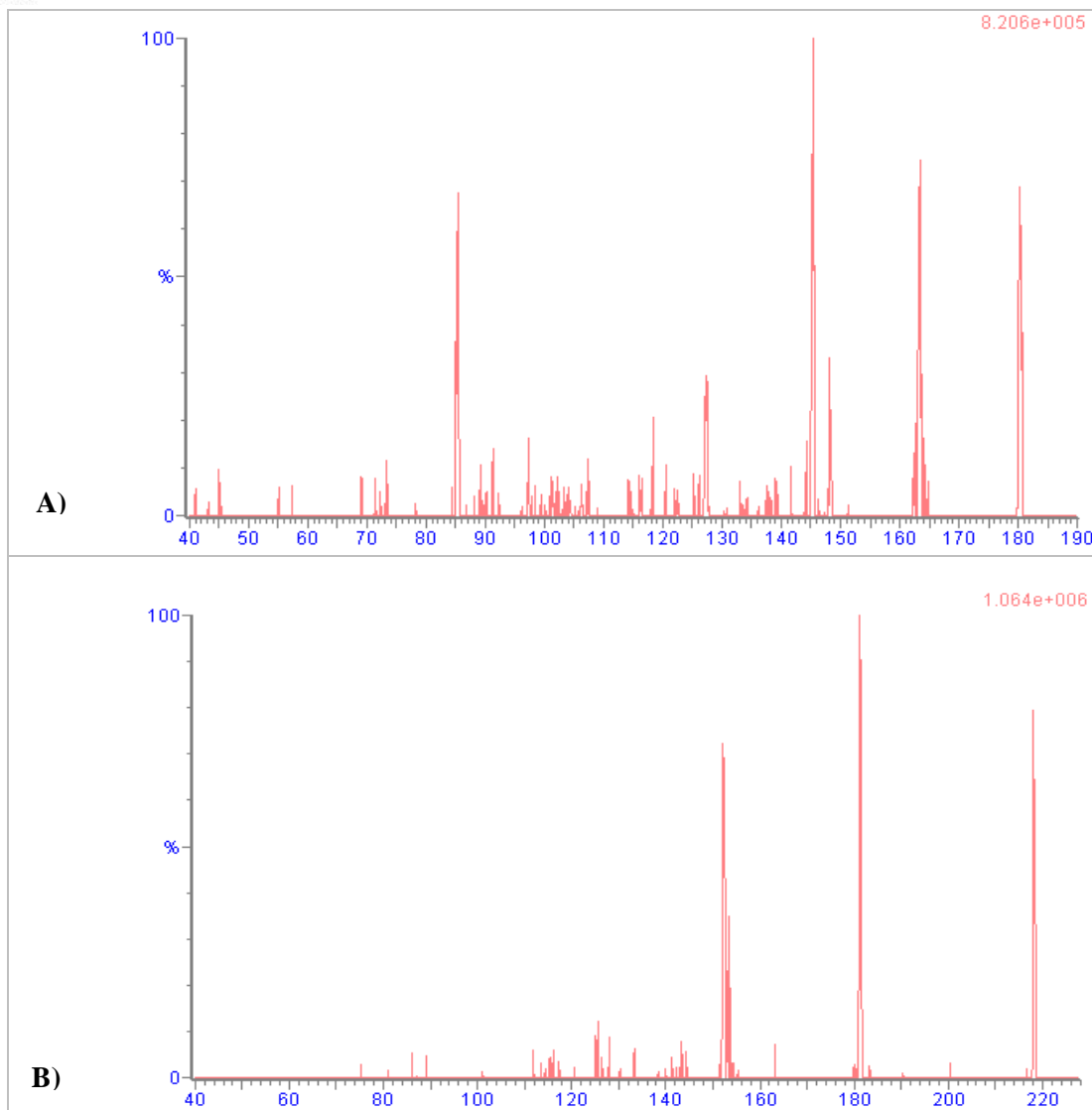


Figura 8. Espectro de masas modo positivo de A) 5-HQ y B) 5,7-HQ en Metanol/AFO 0.1% (1:1) por infusión.

Se observó que la relación masa carga (m/z), del fragmento más abundante para 5,7 HQ se fragmentaba dando 2 iones precursores, y se decide seguir el ion producto con una relación masa/carga (m/z) de 150.12 como se puede ver en la figura 9, respecto a 5-HQ tiene iones producto, pero el de mayor abundancia es el que tiene la relación masa/carga (m/z) de 145.05 como se observa en la figura 8.

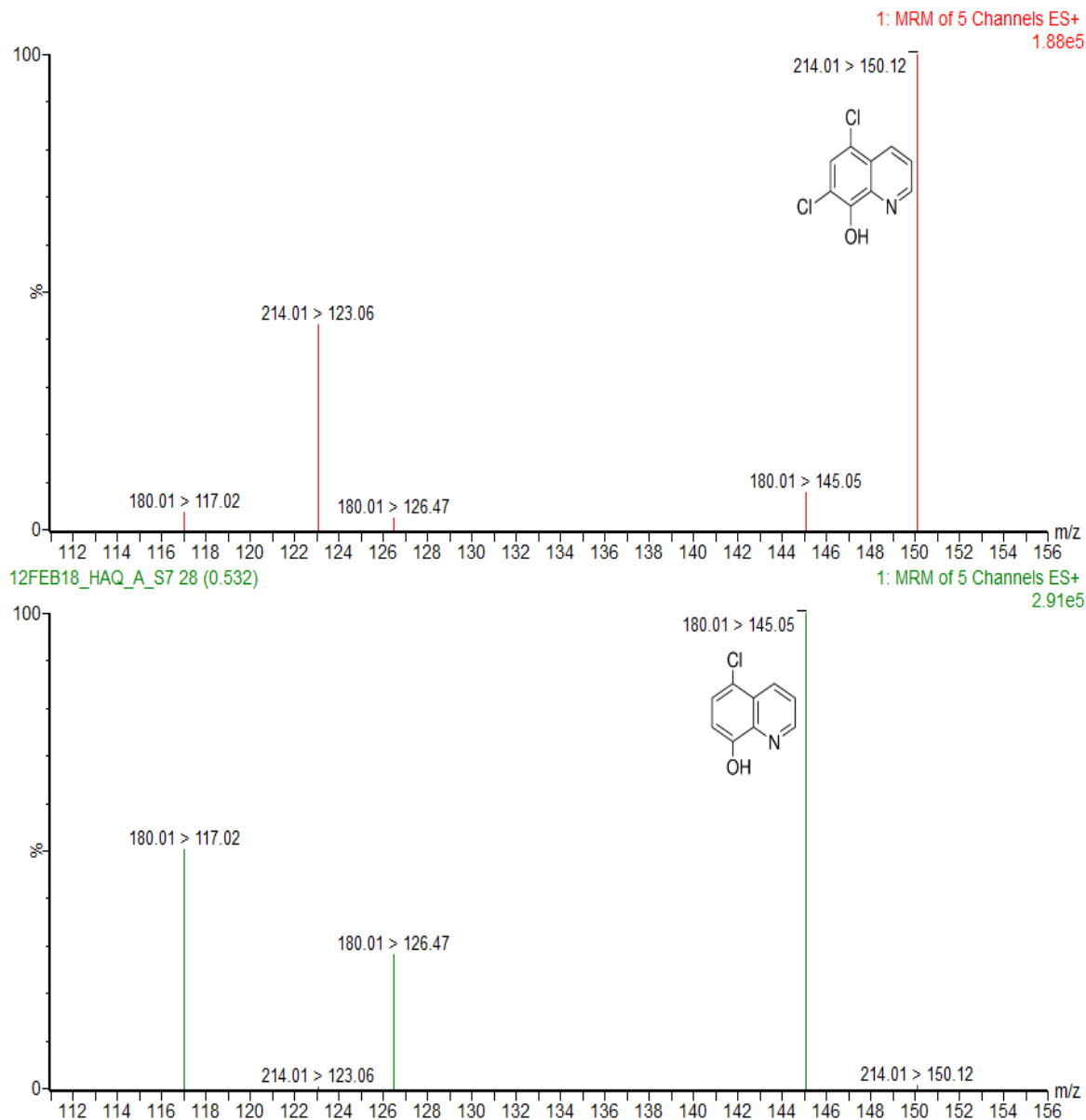


Figura 9. Espectro de masas de 5-HQ y 5,7-HQ a 1.2 ng/mL con una FM: AFO 0.1%/AcN flujo de 0.6 mL/min, columna: ACQUITY BEH UPLC® C18 1.7µm.

Se puede apreciar que a temperaturas mayores la relación señal ruido es mayor, por lo que es más conveniente trabajar a estas condiciones de temperatura de desolvatación de 650 °C y un flujo de gas 1000 L/h, así como un voltaje de cono de 10 Volts, ya que este gas cortina nos permite que la señal del blanco sea mucho menor que la del estándar de los dos analitos.

Tabla 10. Optimización de método de detección

Analitos	Voltaje cono	5,7-HQ			5-HQ		
		Estándar	Blanco	Relación señal/ruido	Estándar	Blanco	Relación señal/ruido
T_{desolv} =350 °C F gas=800 L/h	20	7202	792	9.09	24953	4884	5.11
	30	7369	928	7.94	24346	5380	4.53
	40	7127	854	8.35	24082	4930	4.88
T_{desolv} =550 °C F gas=1000 L/h	20	7437	818	9.09	24781	5166	4.80
	30	7781	30	259.37	25751	20	1287.55
	40	7267	14	519.07	24360	51	477.65
T_{desolv} =650 °C F gas=1000 L/h	10	26570	14	1897.86	93630	1	93630
	20	26673	74	828.43	108784	986	83.11
	30	25725	5	5145.00	89694	802	111.84
	40	24853	30	828.43	86934	1046	83.11

Tabla 11. Optimización de flujo del gas de colisión

Collision gas flow [mL/min]	Relación señal/ruido 5,7-HQ	Relación señal/ruido 5-HQ
0.05	6.43	0.52
0.1	8.52	0.91
0.15	16.05	1.56
0.2	13.58	1.25
0.3	18.06	1.52
0.35	18.73	1.60
0.4	18.24	1.52
0.5	13.66	1.33

También se optimizó el flujo del gas de colisión, como se muestra en la tabla 11, demostrando que trabajando con un flujo del gas de colisión de 0.35 mL/min, se obtiene la relación señal/ruido más alto.

Tabla 12 Optimización de la energía de colisión

Energía de colisión	Relación señal/ruido 5,7-HQ	Relación señal/ruido 5-HQ
2	18.73	1.6
20	16.13	1.61
30	19.25	1.59
35	18.09	1.56
40	19.10	1.48

VI.2.2 Optimización del método de separación cromatográfico.

Una vez optimizados los parámetros de la detección de los analitos, se establecieron las condiciones cromatográficas, para lo cual se realizaron varias corridas modificando las variables que se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Optimización de las condiciones cromatografías.

Variable	Observación
Fase móvil: Ácido Fórmico al 0.1 %, Ácido fosfórico, Hidróxido de amonio 0.01% en mezcla con acetonitrilo.	Con base en el pH de la fase y las características del analito.
Velocidad de flujo: 0.15 mL/min, 0.3 mL/min, 0.45 mL/min, 0.6 mL/min	Modifica el tiempo de retención de las moléculas.
Volumen de inyección: 10, 20, 30, 40 y 50 µl	Efecto en la respuesta
Temperatura columna: 30 °C	Modifica tiempos de análisis y cambios en la selectividad de la separación.
Columna: C8 1.7 µm, C18 1.7 µm	Tiempo de análisis resolución interacción con analito.

Para esto se evaluaron diferentes fases móviles; en la figura 10 se muestran los cromatogramas obtenidos usando A) ácido fosfórico 0.1%, B) ácido fórmico 0.1%, y C) hidróxido de amonio. También se evaluaron; la velocidad de flujo en un rango de 0.15 a 0.6mL/min y el volumen de inyección (10 a 50 µL).

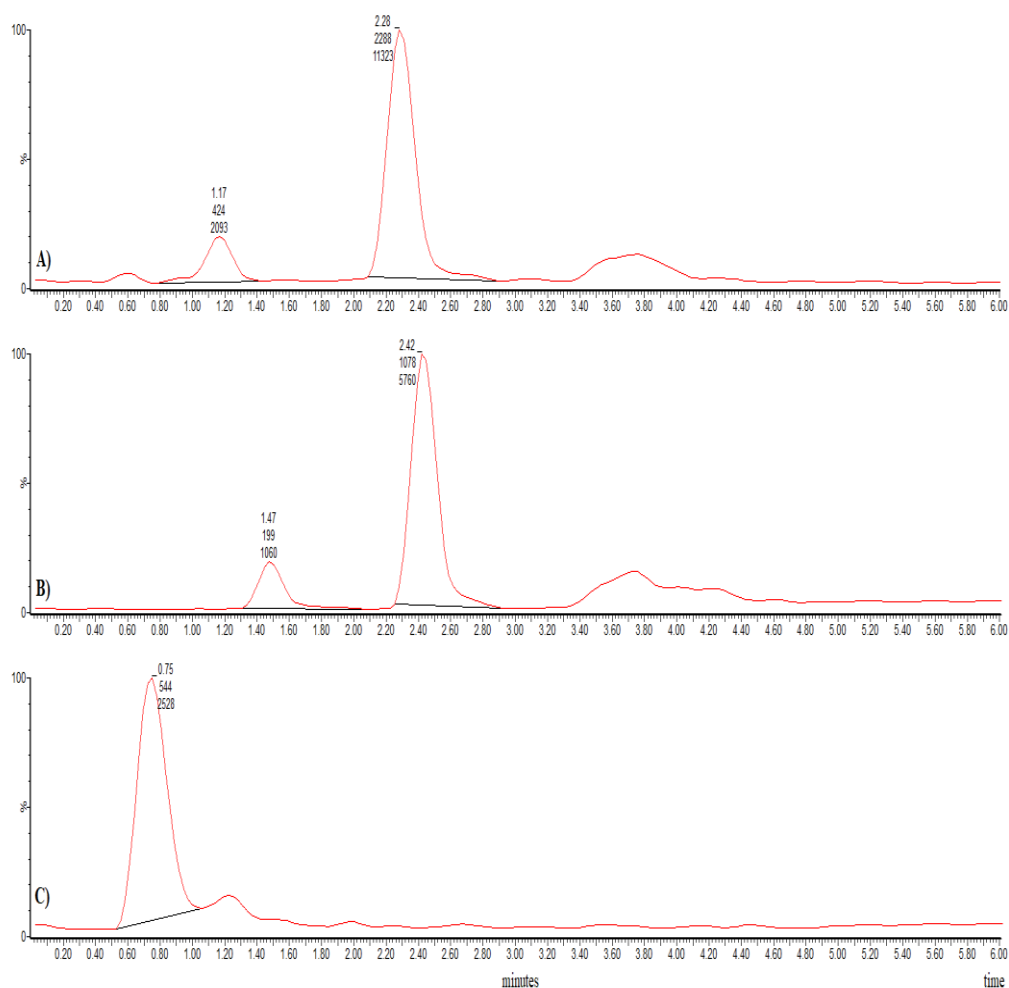


Figura 10. Cromatogramas de 5-HQ y 5,7-HQ a 58 ng/mL, obtenidos A) ácido fosfórico 0.1%, B) ácido fórmico 0.1%, y C) hidróxido de amonio a 0.1% de concentración.

En la figura 11 se puede observar la forma de los picos de los analitos a diferentes proporciones de fase móvil, y a partir de una proporción de AFO 0.1%:AcN (40:60) se observa buena forma de los picos, aunque es evidente que usando más cantidad de acetonitrilo mejora la forma de los picos, pero en este caso se pretende gastar menos cantidad de solventes orgánicos, por lo que las condiciones óptimas fueron; fase móvil con ácido fórmico 0.1%: acetonitrilo (40:60), una velocidad de flujo de 0.6 mL/min, 10 μ L de volumen de inyección y una columna ACQUITY BEH UPLC® C18 1.7 μ m.

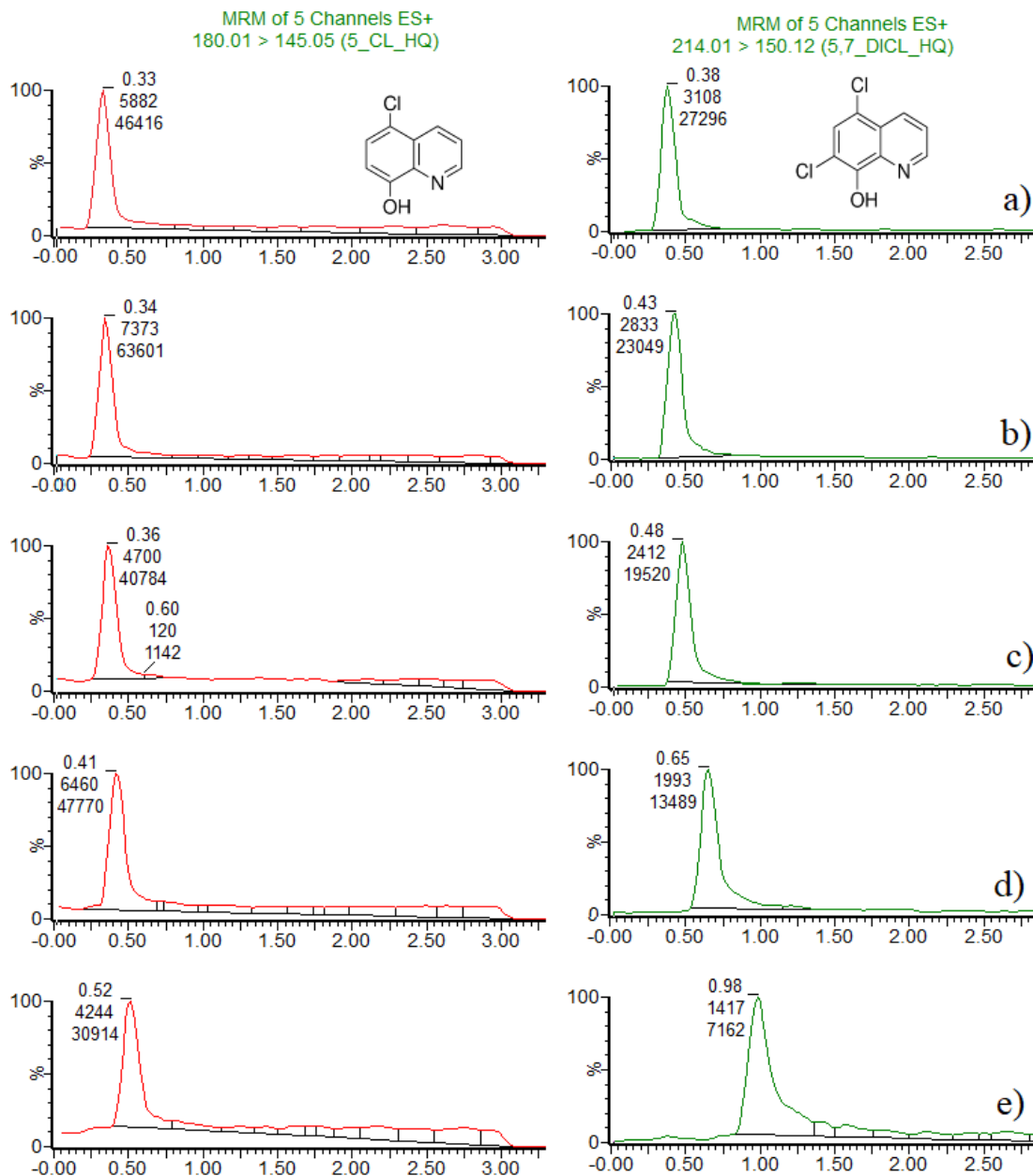


Figura 11. Cromatogramas de 5-HQ y 5,7-HQ, flujo de 0.6 mL/min y a) AFO 0.1%: AcN (20:80), b) AFO 0.1%: AcN (25:75), c) AFO 0.1%: AcN (30:70), d) AFO 0.1%: AcN (40:60) y e) AFO 0.1%: AcN (50:50)

VI.2.3. Optimización de la EFS para 5-HQ y 5,7-HQ.

Después de establecer las condiciones cromatográficas y de detección, se desarrolló y optimizó el proceso de extracción en fase sólida, utilizando cartuchos Oasis[®]MAX. La elección del tipo de cartucho se basó en las características del analito.



Figura 12. Estructura de los cartuchos Oasis® MAX

Los cartuchos Oasis®MAX contienen un polímero de modo mixto (fase reversa/intercambio aniónico fuerte) como se puede observar en la figura 12; es selectivo para los ácidos y estable en eluyentes orgánicos, a diferencia de los estudios reportados por los anteriores autores en nuestro método utilizamos placas de micro elución Oasis®MAX, para este tipo de placa no es necesario evaporar y reconstituir, se utilizan volúmenes de 50 a 500 μL , esto hace que el método sea más eficiente reduciendo pasos en el proceso y disminución en el consumo de solventes y reactivos.

Tabla 14. Optimización de la presión de carga de la muestra

Presión de carga	%Recobro 5,7-HQ	%Recobro 5-HQ
9 psi	46.40 \pm 2.05	40.92 \pm 2.41
12 psi	55.42 \pm 2.63	47.20 \pm 0.79
15 psi	64.95 \pm 0.34	56.93 \pm 2.32
18 psi	41.33 \pm 1.51	55.39 \pm 3.38
21 psi	46.84 \pm 1.87	53.61 \pm 1.12

En la optimización del proceso de extracción, se realizaron ensayos para establecer las condiciones de acondicionado y equilibrado del cartucho, la carga de la muestra, el lavado y la elución de 5-HQ y 5,7-HQ, usando únicamente estándares.

En la tabla 14 se muestra la variación de la presión de carga de la muestra, encontrando que usando a 15 psi se obtienen los mejores recobros. En la tabla 15 se varió el pH de la solución de carga para favorecer la ionización e interacción de los analitos con la fase estacionaria.

Tabla 15. Optimización del pH de la muestra

pH	%Recobro_{5,7-HQ}	%Recobro_{5-HQ}
3	7.11 ± 5.61	19.76 ± 2.83
5	44.74 ± 1.33	85.29 ± 2.96
9	44.16 ± 1.89	81.79 ± 2.9
10	48.23 ± 3.53	91.46 ± 5.39

En la tabla 16 se modificó la naturaleza del solvente de elución, para favorecer el arrastre de los analitos de la fase estacionaria y mejorar los rendimientos de ambos analitos de interés.

Tabla 16. Optimización de la composición de la fase de elución

Fase elución	%Recobro_{5,7-HQ}	%Recobro_{5-HQ}
AF 2%: AcN (10:90)	71.30 ± 1.20	104.03 ± 0.93
AF 2%: AcN (20:80)	80.26 ± 2.17	83.73 ± 1.98
AF 2%: AcN (30:70)	84.29 ± 2.28	83.98 ± 2.35
AF 2%: AcN (40:60)	75.42 ± 2.54	90.56 ± 0.12
AF 2%: AcN (50:50)	74.22 ± 1.06	46.47 ± 3.43
AF 2%: AcN (25:75)	92.44 ± 1.50	90.473 ± 0.62
AF 2%: AcN (75:25)	44.13 ± 4.72	85.16 ± 1.19

También se optimizó la presión de elución de la muestra demostrando que se obtienen mejores recobros usando 15 psi, como se muestra en la tabla 17.

Tabla 17. Optimización de la presión de elución de la muestra

Presión de elución	%Recobro_{5,7-HQ}	%Recobro_{5-HQ}
9 psi	77.87 ± 3.17	62.61 ± 2.82
12 psi	80.37 ± 2.15	65.94 ± 6.44
15 psi	105.09 ± 1.01	102.46 ± 1.74
18 psi	86.48 ± 4.54	113.78 ± 0.43
21 psi	83.32 ± 5.72	127.49 ± 2.29

VI.2.4. Desarrollo del método de EFS para plasma de cerdo.

Para realizar la EFS primero se deben eliminar interferentes como lo son proteínas y grasas, para lo cual se fortificó plasma de cerdo con concentraciones conocidas de 5-HQ y 5,7-HQ, posteriormente se adicionan varios agentes precipitantes de proteínas, como se muestra en la tabla 18.

También se optimizó el agente anticoagulante en la obtención de plasma, para seleccionar que tubos para muestras de sangre se usarían, por lo que se hizo una prueba usando heparina y EDTA como agente anticoagulante y el que presentó mejores recobros fue usando heparina además los sobrenadantes de las muestras se veían más limpios.

En la tabla 18 se puede apreciar que el mejor agente precipitante de proteínas es el ácido tricloroacético al 8% en metanol con porcentajes de recobro de 82.20 % para 5,7-HQ y 88.52 % para 5-HQ, hasta el momento, este procedimiento se realizó utilizando 1.2 mL de solución precipitante.

Tabla 18. Optimización del agente precipitante de proteínas en plasma de cerdo.

Plasma	Recobro _{5,7-HQ} (%)	Recobro _{5-HQ} (%)
Ácido perclórico 8% acuoso	29.22 ± 3.14	43.66 ± 1.23
Ácido tricloroacético 8% acuoso	50.37 ± 1.27	61.27 ± 1.82
Ácido perclórico 5% acuoso	29.51 ± 1.45	40.58 ± 3.46
Ácido tricloroacético 5% acuoso	40.89 ± 2.73	47.24 ± 2.28
Metanol 100%	30.91 ± 2.10	92.47 ± 2.32
Acetonitrilo 100%	29.62 ± 1.31	99.28 ± 0.45
Ácido tricloroacético 8% en Acetonitrilo	71.21 ± 1.06	86.00 ± 0.22
Ácido tricloroacético 8% en Metanol	82.20 ± 0.46	88.52 ± 0.46
Ácido perclórico 8% en Acetonitrilo	43.86 ± 3.77	97.70 ± 2.84
Ácido perclórico 8% en Metanol	64.56 ± 1.29	96.34 ± 0.92

Ahora que se sabe cuál es el mejor agente precipitante lo que se pretende es no diluir la muestra en el proceso de pretratamiento de ésta; por lo que se propuso utilizar ácido tricloroacético al 10% en metanol y optimizar el volumen utilizado como se muestra en la tabla 19.

Tabla 19 Volumen de agente precipitante.

Volumen Ac TCA 10% en metanol	% Recobro 5,7-HQ	% Recobro 5-HQ
100 μ L	48.91 \pm 0.90	64.51 \pm 1.58
200 μ L	62.92 \pm 0.48	81.29 \pm 0.87
300 μ L	65.46 \pm 1.57	88.95 \pm 2.43
400 μ L	85.76 \pm 0.55	99.16 \pm 0.10
500 μ L	57.64 \pm 1.70	77.98 \pm 0.53

Aunque el porcentaje de recobro de ambos analitos es bueno, se pretende optimizar la cantidad de agente precipitante en el pretratamiento de la muestra, por lo que se decide modificar la cantidad adicionada, observando que al adicionar 400 μ L de ácido tricloroacético al 10% en metanol, se obtienen recobros mayores.

Otro factor importante en la obtención de las muestras fue saber que agente anticoagulante funcionaba mejor para la obtención del plasma, por lo que se fortificaron las muestras y se realizó un ensayo usando heparina y EDTA.

Aparentemente los plasmas obtenidos fueron más transparentes usando heparina, con EDTA los plasmas obtenidos se veían completamente hemolizados. Como se muestra en la tabla 20 los coeficientes de variación usando heparina son menores que usando EDTA, por lo que se decide utilizar heparina en el proceso de extracción de sangre de cerdo.

Tabla 20 Agente anticoagulante en la obtención de plasma

Plasma	Heparina		EDTA	
	5,7-HQ	5-HQ	5,7-HQ	5-HQ
% Recobro	98.12	94.79	109.60	102.07
	74.85	77.85	72.91	55.09
	75.85	71.25	77.92	55.58
	89.52	69.75	72.43	57.43
	83.05	69.71	83.38	77.56
	promedio	84.28	76.67	83.25
%CV	11.58	13.92	18.48	29.40

Las variables estudiadas, en la optimización del proceso de extracción, se realizaron por triplicado y se modificó de una en una cada variable es decir no se aplicaron dos variables en un mismo ensayo.

Al cambiar el pH del sobrenadante, teóricamente el analito se encontraría ionizado y por lo tanto se retendría más en el cartucho. Se intentó lavar con metanol, acetonitrilo, hexano e isopropanol a pH alcalino y se perdía parte de los analitos, por lo que se eliminó este paso en la EFS. Cambio en la mezcla de elución, evitar que se retuviera el analito. En resumen, una vez que se optimizaron todas las variables se obtuvieron las mejores condiciones en el pretratamiento de plasma de cerdo para cuantificar 5-HQ y 5,7-HQ, en la figura 13 se presenta el diagrama de flujo para el pretratamiento de plasma porcino.

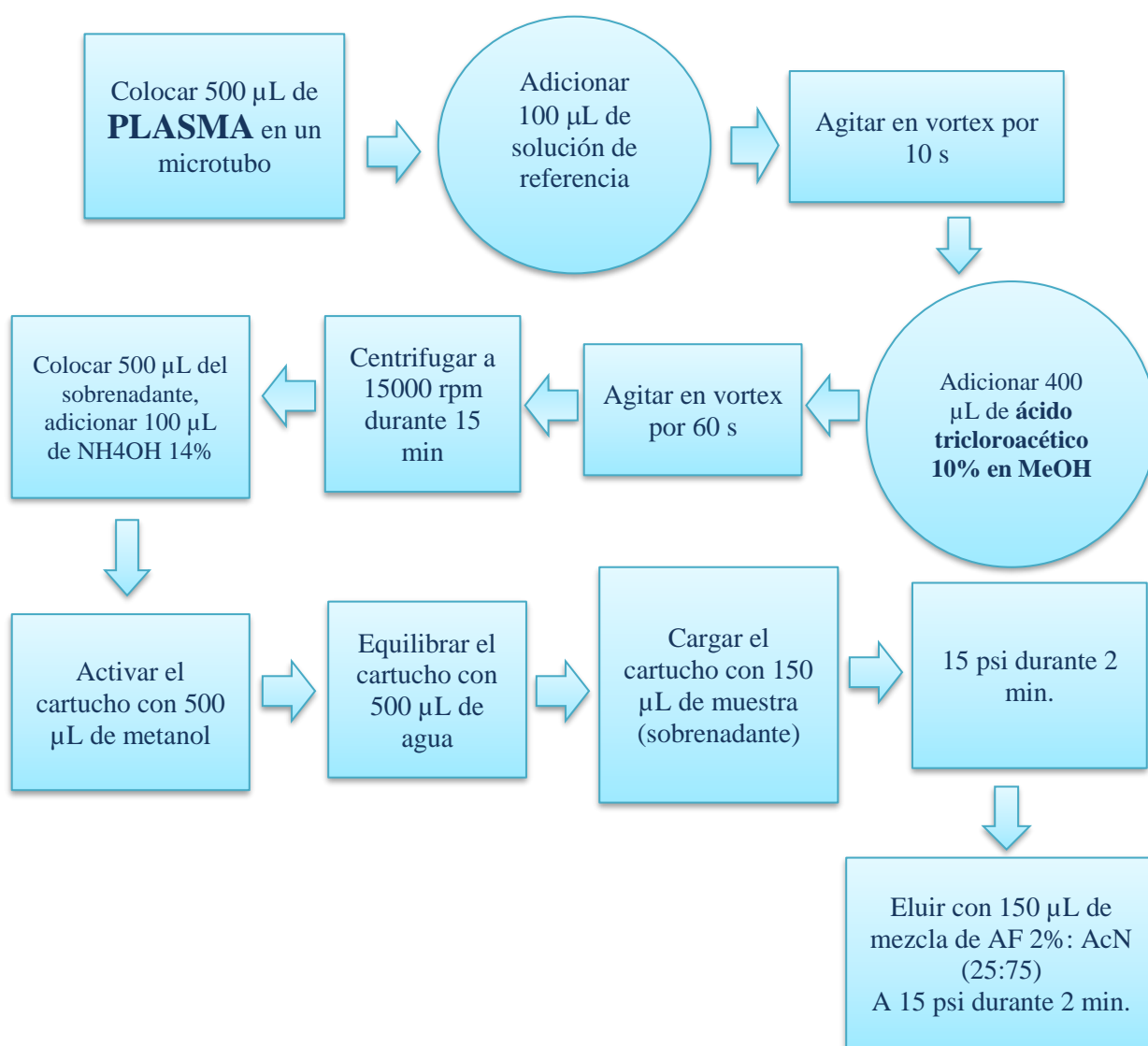


Figura 13 Diagrama de tratamiento de muestra de plasma.

VI.2.5. Validación del método para plasma de cerdo.

VI.2.5.1 Linealidad del sistema.

La linealidad de un procedimiento analítico es su habilidad para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, dentro de un rango específico. La linealidad del sistema se determina construyendo una curva de calibración, utilizando una preparación por triplicado de 5 niveles de concentración de una solución de referencia, en este caso se evaluaron soluciones correspondientes a la solución de referencia disuelta solamente en la solución blanco (sistema), se prepararon 6 niveles de concentración (ver figura 14 y 15), y cada nivel de concentración se preparó por triplicado como se muestra en la Tabla 21 para ambos analitos.

Tabla 21. Linealidad del sistema para halquinol.

Concentración (pg/mL)		Área	
5-HQ	5,7-HQ	5-HQ	5,7-HQ
329	389	654	201
659	779	1158	387
988	1168	1651	599
1317	1558	2289	839
1647	1947	2898	1010
1976	2336	3669	1216
2305	2726	3997	1389
329	389	646	224
659	779	1129	459
988	1168	1790	614
1317	1558	2392	897
1647	1947	2786	1002
1976	2336	3659	1314
2305	2726	4190	1431
329	389	666	216
659	779	1298	419
988	1168	1883	658
1317	1558	2419	889
1647	1947	2866	966
1976	2336	3822	1240
2305	2726	3976	1470

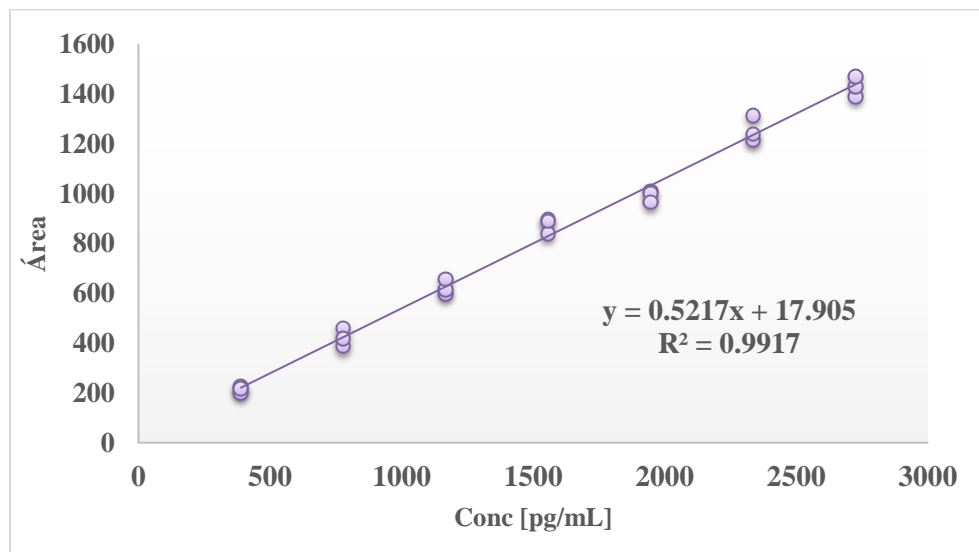


Figura 14. Linealidad del sistema para 5,7-HQ.

Tabla 22. Intervalos de confianza para el origen y la pendiente del 5,7-HQ.

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	17.9048	19.0684	0.9390	0.3595	-22.0058	57.8153
Conc [pg/mL]	0.5217	0.0109	47.6434	0.0000	0.4988	0.5446

Como se puede observar en la tabla 22 el intervalo de confianza para el intercepto incluye al cero y el intervalo de confianza para la pendiente no incluye al cero. Además, para demostrar que existe una relación lineal entre las variables en estudio se realizó un análisis de varianza y se estableció la siguiente hipótesis:

H₀: No existe una relación lineal entre la concentración y el área.

H_i: Existe una relación lineal entre la concentración y el área.

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{crítica}$ no se rechaza H₀.

Si $F_{cal} > F_{crítica}$ se rechaza H₀.

Tabla 23. Análisis de varianza con un factor realizado para determinar la relación lineal entre la concentración real de 5,7-HQ y su respuesta analítica.

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	3466429.7143	3466429.7143	2269.8940	3.09175E-21
Residuos	19	29015.5238	1527.1328		
Total	20	3495445.2381			

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza que se muestran en la tabla 23 y la hipótesis establecida, observamos que el valor de la F_{cal} es mucho mayor que la $F_{crítica}$ por lo que se rechaza H_0 por lo que existe una relación lineal entre la concentración y el área con un nivel de confianza del 95%; lo que significa que el área medida es debida a la variación de la concentración de 5,7-HQ.

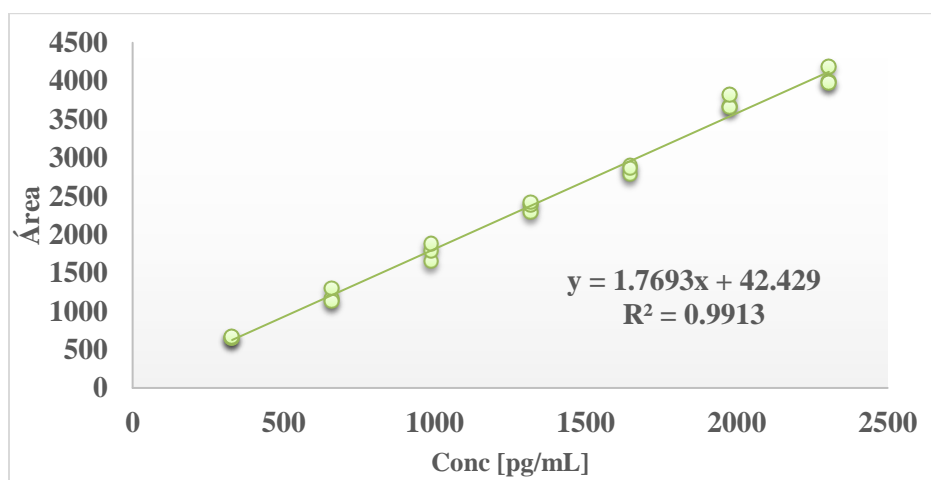


Figura 15. Linealidad del sistema para 5-HQ.

Tabla 24. Intervalos de confianza para el origen y la pendiente 5-HQ

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	42.4286	56.0530	0.7569	0.4584	-74.8916	159.7488
Conc [pg/mL]	1.7693	0.0381	46.4904	0.0000	1.6897	1.8490

Como se puede observar en la tabla No. 24 el intervalo de confianza para el intercepto incluye al cero y el intervalo de confianza para la pendiente no incluye al cero.

Para demostrar que existe una relación lineal entre las variables en estudio se realizó un análisis de varianza y se estableció la siguiente hipótesis:

H₀: No existe una relación lineal entre la concentración y el área.

H_i: Existe una relación lineal entre la concentración y el área.

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{crítica}$ no se rechaza H₀.

Si $F_{cal} > F_{crítica}$ se rechaza H₀.

Tabla 25. Análisis de varianza con un factor realizado para determinar la relación lineal entre la concentración real de 5-HQ y su respuesta analítica.

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	28521533.4405	28521533.4405	2161.3568	4.90589E-21
Residuos	19	250726.3690	13196.1247		
Total	20	28772259.8095			

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza que se muestran en la tabla 25 y la hipótesis establecida, observamos que el valor de la F_{cal} es mucho mayor que la $F_{crítica}$ por lo que se rechaza H_0 por lo que existe una relación lineal entre la concentración y el área con un nivel de confianza del 95%; lo que significa que el área medida es debida a la variación de la concentración de 5-HQ.

VI.2.5.2. Linealidad del método para plasma.

La linealidad del método se define como la capacidad del método de análisis, dentro de un cierto intervalo, para ofrecer una respuesta instrumental o resultados proporcionales a la calidad del analito a ser determinada en la muestra del laboratorio. Preparar a partir de los sistemas de la curva de calibración estándar, las soluciones indicadas en cada nivel de concentración para construir una curva de calibración de muestras cargadas, considerar las alícuotas y volúmenes finales indicados a continuación para cada matriz biológica.

Tabla 26. Fortificación de plasma para la linealidad del método plasma de 5,7-HQ.

Concentración de la solución estándar (ng/mL)	Volumen de solución estándar (µL)	Plasma de cerdo (µL)	Ácido tricloroacético (µL)	Concentración en plasma (pg/mL)
4.67	100	500	400	389.40
9.35	100	500	400	778.80
14.02	100	500	400	1168.20
18.69	100	500	400	1557.60
23.36	100	500	400	1947.00
28.04	100	500	400	2336.40
32.71	100	500	400	2725.80

La calibración se realiza por triplicado.

Tabla 27. Fortificación de plasma para la linealidad del método plasma de 5-HQ.

Concentración de la solución estándar (ng/mL)	Volumen de solución estándar (µL)	Plasma de cerdo (µL)	Ácido tricloroacético (µL)	Concentración en plasma (pg/mL)
3.95	100	500	400	329.33
7.90	100	500	400	658.67
11.86	100	500	400	988.00
15.81	100	500	400	1317.33
19.76	100	500	400	1646.67
23.71	100	500	400	1976.00
27.66	100	500	400	2305.33

La calibración se realiza por triplicado.

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que el método analítico es lineal para la cuantificación de la 5,7-HQ es lineal en un intervalo de 389 a 2726 pg/mL aun considerando los componentes de la matriz de plasma de cerdo, como se muestra en la tabla No. 28 la ecuación se ajusta al modelo con un coeficiente de determinación de 0.9846 y el intervalo de la pendiente incluye a la unidad; y el promedio del porcentaje de recobro es de 98.5%. En la figura 16A, se observa el comportamiento del modelo matemático que es lineal y en la figura 16B se muestra el gráfico de residuos nos deja ver que este comportamiento es homocedástico, es decir que no hay una tendencia en el error calculado para los datos.

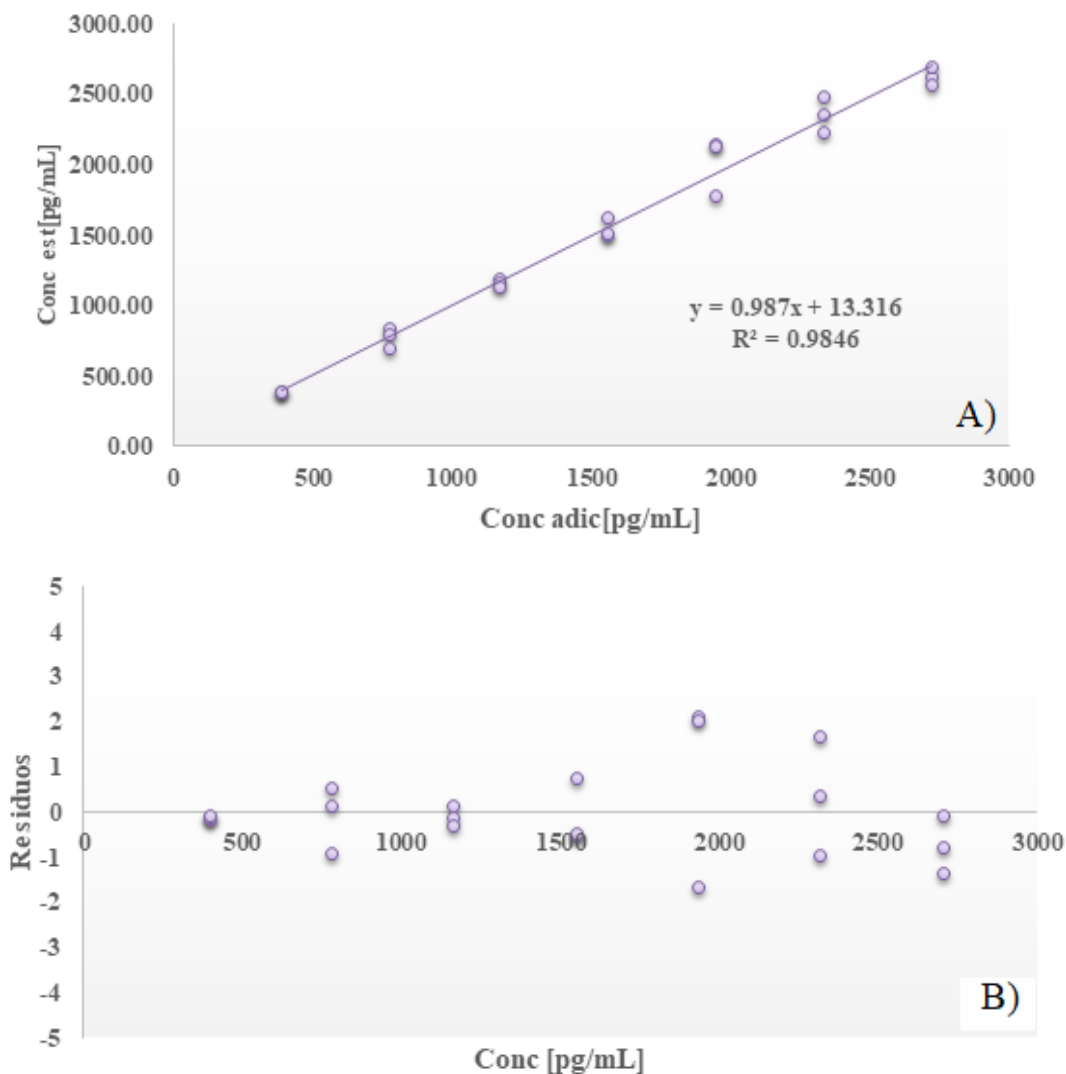


Figura 16 A) Linealidad del método para 5,7-HQ en plasma de cerdo, B) Residuales de la relación de la concentración adicionada de 5,7-HQ en función de la concentración estimada en plasma.

Así mismo el método analítico es lineal para la cuantificación de 5-HQ en el intervalo de 329 a 2305 pg/mL aun considerando los componentes de la matriz de plasma de cerdo, como se muestra en la tabla No. 29 la ecuación se ajusta al modelo con un coeficiente de determinación de 0.9846 y el intervalo de la pendiente incluye a la unidad; y el promedio del porcentaje de recobro es de 98.5%. En la figura 17A, se observa el comportamiento del modelo matemático que es lineal y en la figura 17B se muestra el gráfico de residuos nos deja ver que este comportamiento es homocedástico, es decir que no hay una tendencia en el error calculado para los datos.

Tabla 28. Linealidad del método para 5,7-HQ en plasma.

Conc adic [pg/mL]	Conc est [pg/mL]	Recobro (%)
389.40	378.12	97.10
389.40	385.16	98.91
389.40	388.67	99.81
778.80	835.39	107.27
778.80	793.18	101.85
778.80	691.17	88.75
1168.20	1180.09	101.02
1168.20	1151.95	98.61
1168.20	1134.37	97.10
1557.60	1623.29	104.22
1557.60	1496.66	96.09
1557.60	1503.69	96.54
1947.00	2143.86	110.11
1947.00	2133.31	109.57
1947.00	1771.02	90.96
2336.40	2354.91	100.79
2336.40	2224.76	95.22
2336.40	2481.53	106.21
2725.80	2625.75	96.33
2725.80	2696.10	98.91
2725.80	2569.47	94.26
Promedio del porcentaje de recobro		99.5064
CV del porcentaje de recobro		5.6350
Relación concentración adicionada vs la concentración estimada		
Ecuación		$y = 0.987x + 13.316$
r^2		0.9846
IC (β_0) Límite inferior		-89.92340
IC (β_0) Límite superior		116.5558
IC (β_1) Límite inferior		0.9277
IC (β_1) Límite superior		1.04624

Tabla 29. Resumen de la linealidad del método para 5-HQ en plasma.

Conc adic [pg/mL]	Conc est [pg/mL]	Recobro (%)
329.33	329.11	99.93
329.33	329.11	99.93
329.33	317.89	96.52
658.67	708.37	107.55
658.67	623.09	94.60
658.67	627.58	95.28
988	1045.00	105.77
988	955.23	96.68
988	1002.36	101.45
1317.33	1325.52	100.62
1317.33	1280.63	97.21
1317.33	1300.83	98.75
1646.67	1516.27	92.08
1646.67	1801.28	109.39
1646.67	1700.29	103.26
1976	2027.94	102.63
1976	1965.10	99.45
1976	1983.06	100.36
2305.33	2216.45	96.14
2305.33	2209.72	95.85
2305.33	2436.38	105.68
Promedio del porcentaje de recobro		99.96
CV del porcentaje de recobro		4.53
Relación concentración adicionada vs la concentración estimada		
Ecuación	$y = 1.0016x - 0.358$	
r^2	0.9901	
IC (β_0) Límite inferior	-71.3569	
IC (β_0) Límite superior	70.6409	
IC (β_1) Límite inferior	0.9534	
IC (β_1) Límite superior	1.0498	

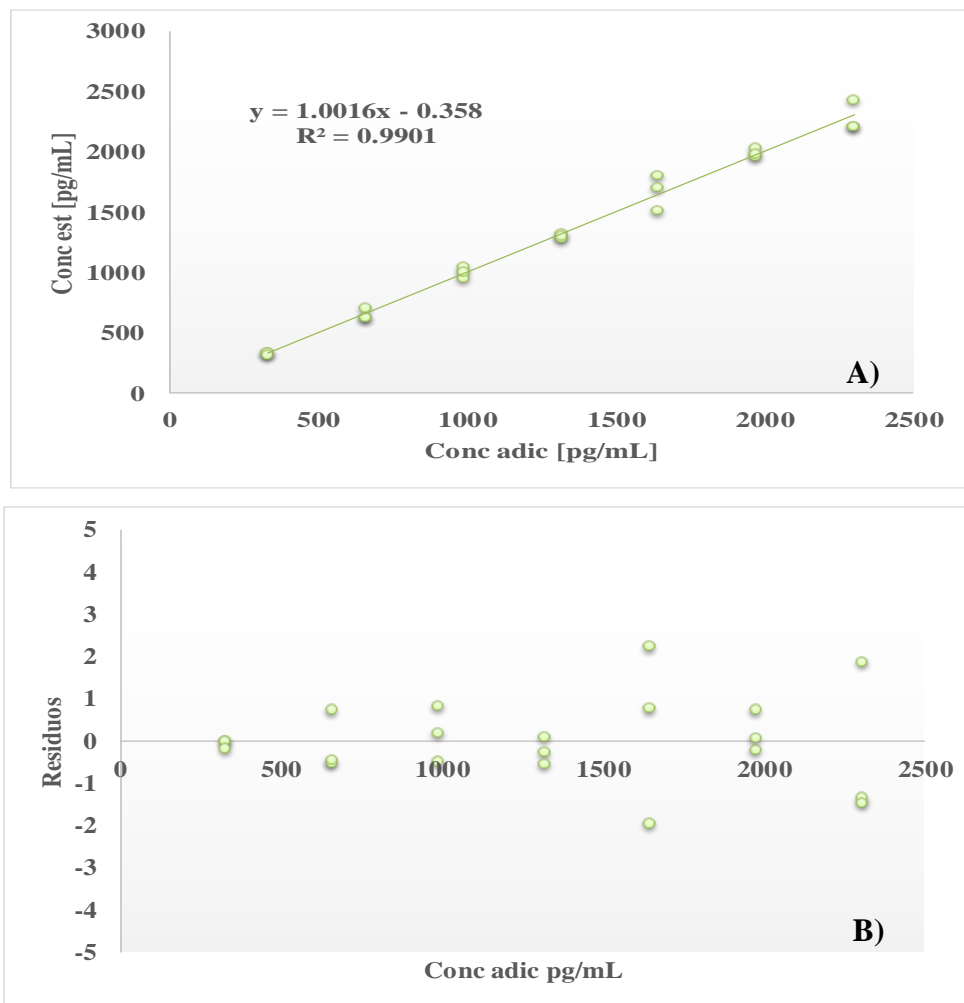


Figura 17 A) Linealidad del método para 5-HQ en plasma de cerdo, B) Residuales de la relación de la concentración adicionada de 5-HQ en función de la concentración estimada en plasma de cerdo.

En general el coeficiente de determinación (r^2) fue mayor de 0.98 para las dos hidroxiquinolinas (5-HQ y 5,7-HQ) el intervalo de confianza de la ordenada al origen considera al cero y que el intervalo de confianza para la pendiente incluye a la unidad y que el promedio del porcentaje de recobro está dentro del intervalo de 50-120 % y que el coeficiente de variación para el porcentaje de recobro es menor del 15%, lo aceptado para métodos biológicos.

VI.2.5.3. Precisión y exactitud del método para plasma.

La precisión de un método analítico está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio y corresponde al grado de concordancia o grado de dispersión.

Se evaluaron muestras preparadas con cantidades conocidas de analito, realizando 6 determinaciones por concentración y utilizando 3 niveles de concentración. La Tabla 30 muestra los resultados de los coeficientes de variación para la determinación de la precisión, los valores de la evaluación presentan coeficientes de variación menores al 15%.

La exactitud se evaluó con los porcentajes de recobro con los 3 niveles de concentración, los valores fueron de 88.35 hasta 107.27 % de recuperación para la 5-HQ y de 92.02 a 107.94 para la 5,7-HQ, indicando buenos resultados en la evaluación de la exactitud. El método resultó ser preciso en plasma de cerdo al obtenerse valores de CV menor al 15 % en todos los niveles de concentración analizados.

Tabla 30. Datos del porcentaje recuperado de Halquinol en plasma cargado.

Concentración (pg/mL)		% recobro	
5-HQ	5,7-HQ	5-HQ	5,7-HQ
329.33	389.4	99.93	101.62
329.33	389.4	88.35	97.10
329.33	389.4	99.93	98.91
329.33	389.4	94.48	105.23
329.33	389.4	96.52	107.94
329.33	389.4	88.35	99.81
1317.33	1557.6	100.62	104.22
1317.33	1557.6	97.21	96.09
1317.33	1557.6	105.22	92.02
1317.33	1557.6	88.87	101.96
1317.33	1557.6	98.75	95.41
1317.33	1557.6	107.27	96.54
2305.33	2725.8	89.43	90.39
2305.33	2725.8	96.14	105.49
2305.33	2725.8	95.85	96.33
2305.33	389.4	92.15	98.91
2305.33	389.4	106.85	94.26
2305.33	389.4	105.68	106.65
Promedio		90,02	97.31
Desviación estándar		12,61	6.34
%CV		14,01	6.51

VI.2.5.4. Límites de detección y cuantificación para plasma.

En la determinación del límite de detección y cuantificación se prepararon soluciones de 329.33, 658.67 y 988 pg / mL de 5-HQ y 389.4, 778.8 y 1168.2 pg / mL de 5,7-HQ, y el límite de detección se calculó como $LD = 3 S_b / b_1$, mientras que el límite de cuantificación como $LC = 10 S_b / b_1$, donde S_b es la desviación estándar del blanco y b_1 es la pendiente, como se estima a partir de la curva de calibración; los datos estadísticos se muestran en la tabla 31.

Tabla 31. Estadísticas de regresión para la estimación de LD y LC.

Estadísticas de la regresión	5,7-HQ	5-HQ
Coefficiente de correlación múltiple	0.9913	0.9935
Coefficiente de determinación r^2	0.9828	0.9870
r^2 ajustado	0.9815	0.9860
Error típico (S_b)	16.5284	16.0596
Pendiente (b_1)	0.2847	0.4731
Límite de Cuantificación (LC)	580.5562	339.4537
Límite de Detección (LD)	191.5835	112.0197

VI.2.5.5. Estabilidad a Corto Plazo y 3 ciclos de congelación-descongelación de muestras de plasma.

Datos de concentración adicionada y recuperada de muestras sometida a 1 semana de almacenamiento. Muestras recién preparadas (MRP) y muestras congeladas a -80°C de Estabilidad a Corto Plazo (ECP) durante 24 h y 48 h, y por último a 3 ciclos de congelación – descongelación Estabilidad Ciclos de Congelación (ECC) -80°C , los datos para 5-HQ se muestran en la tabla 32 y para la 5,7-HQ en la tabla 33.

En el presente estudio se simplificó el método de cuantificación de halquinol al utilizar la placa de micro extracción se pueden analizar hasta 96 muestras en aproximadamente 2 horas, considerando la extracción en fase sólida y el análisis en el UPLC-MS/MS, incrementamos la velocidad de análisis y disminución del consumo de solventes.

Tabla 32 Plasma cargado con 5-HQ sometidas a congelación durante 24 horas.

Condición	Conc. Adic. [pg/mL]	Conc. Rec. [pg/mL]	promedio	% CV	% recobro
MRP	1444	1323.26	1447.40	7.43	91.64
	1444	1508.85			104.49
	1444	1510.08			104.58
	2527	2421.36	2547.34	4.39	95.82
	2527	2585.36			102.31
	2527	2635.30			104.29
ECP (24 h)	1444	1404.41	1487.87	4.91	97.26
	1444	1539.80			106.63
	1444	1519.39			105.22
	2527	2641.99	2552.64	6.41	104.55
	2527	2363.72			93.54
	2527	2652.20			104.95
ECC	1444	1349.36	1432.17	4.91	93.45
	1444	1329.97			92.10
	1444	1617.18			111.99
	2527	2595.69	2533.15	6.41	102.72
	2527	2588.35			102.43
	2527	2415.40			95.58

Tabla 33 Plasma cargado con 5,7-HQ sometidas a congelación durante 24 horas.

Condición	Conc. Adic. [pg/mL]	Conc. Rec. [pg/mL]	promedio	CV	% recobro
MRP	1584	1558.93	1628.84	4.07	98.35
	1584	1639.40			103.50
	1584	1689.18			106.64
	2772	2691.67	2712.79	1.72	97.10
	2772	2766.35			99.80
	2772	2680.36			96.69
ECP (24 h)	1584	1379.62	1330.08	8.29	87.10
	1584	1406.84			88.82
	1584	1203.77			76.00
	2772	2649.91	2703.09	1.72	95.60
	2772	2735.93			98.70
	2772	2723.44			98.25
ECC	1584	1622.25	1652.47	1.81	102.41
	1584	1681.95			106.18
	1584	1653.21			104.37
	2772	2679.30	2741.96	3.22	96.66
	2772	2703.63			97.53
	2772	2842.95			102.56

VI.3. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE 5-HQ Y 5,7-HQ EN MÚSCULO DE CERDO.

VI.3.1. Desarrollo del método de EFS para músculo de cerdo.

Para desarrollar el método para analizar músculo se probaron solo 3 agentes precipitantes como se muestra en la Tabla No 34, debido a que en el desarrollo del método para plasma que era una matriz más simple que el músculo solo dieron buenos resultados el ácido perclórico y el ácido tricloroacético acuoso y en metanol.

Tabla 34 Optimización del agente precipitante de proteínas en músculo de cerdo.

Agente precipitante	% recobro 5,7-HQ	% recobro 5-HQ
Ac TCA 10% en metanol	79.53±8.53	210.12±1.89
Ac TCA 10% acuoso	87.53±3.18	36.36±12.03
Ac Perclórico 10%	77.85±11.14	125.47±12.65

Como se observa en la tabla 34 con el ácido tricloroacético al 10 % en metanol los recobros para la 5-HQ eran de más del 200 %, por lo que se decidió modificar la cantidad de ácido perclórico al 10%. En la tabla 35 se muestra el porcentaje de recobro de ambos analitos es bueno, se pretende optimizar la cantidad de agente precipitante en el pretratamiento de la muestra, por lo que se decide modificar la cantidad adicionada, observando que al adicionar 600 µL de ácido perclórico acuoso al 10%, se obtienen buenos recobros.

Tabla 35 Cantidad de agente precipitante

Cantidad de Ac Perclórico ac. 10%	5,7-HQ	5-HQ
300 µL	140.10 ± 7.96	94.88 ± 6.52
400 µL	144.24 ± 13.03	92.15 ± 8.75
500 µL	126.82 ± 2.58	91.55 ± 19.84
600 µL	99.49 ± 10.75	81.80 ± 5.43

Las variables estudiadas, en la optimización del proceso de extracción, se realizaron por triplicado y se modificó de una en una cada variable es decir no se aplicaron dos variables en un mismo ensayo.

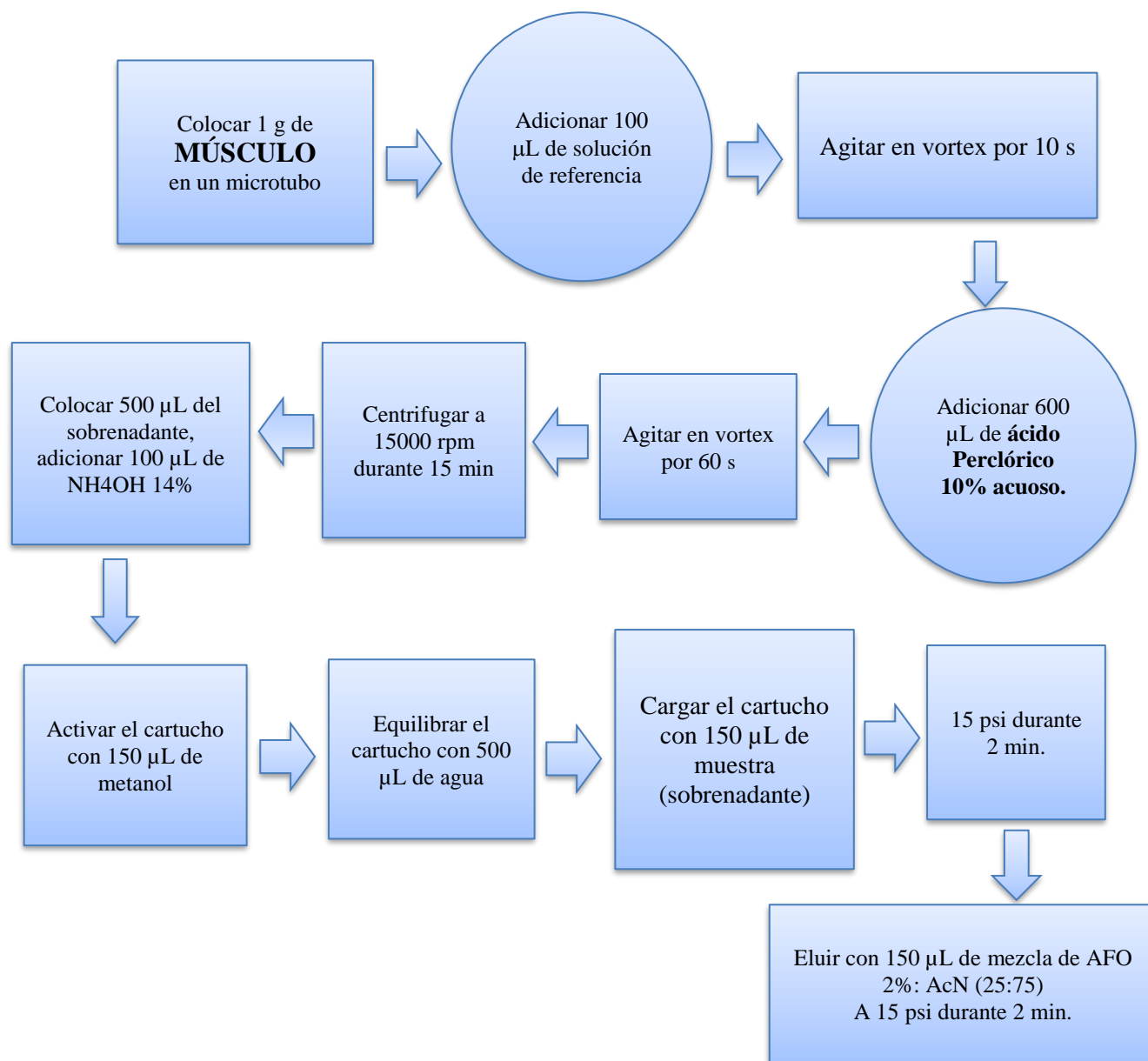


Figura 18 Diagrama de tratamiento de muestra de músculo.

VI.3.2. Validación o del método para músculo de cerdo

Una vez que se tienen recobros dentro de los que establecen las guías internacionales. Por lo que se decide validar el método precipitando proteínas con ácido perclórico. Como se muestra a continuación.

Tabla 36. Fortificación de músculo para la linealidad del método de 5,7-HQ.

Concentración de la solución estándar (ng/mL)	Volumen de solución estándar (µL)	Músculo de cerdo (g)	Ácido perclórico (µL)	Concentración en músculo (pg/mL)
6.43	100	1	600	267.96
12.86	100	1	600	535.92
19.29	100	1	600	803.88
25.72	100	1	600	1071.84
32.16	100	1	600	1339.80
38.59	100	1	600	1607.76
45.02	100	1	600	1875.72

La calibración se realiza por triplicado.

Tabla 37. Fortificación de músculo para la linealidad del método de 5-HQ.

Concentración de la solución estándar (ng/mL)	Volumen de solución estándar (µL)	Músculo de cerdo (g)	Ácido perclórico (µL)	Concentración en músculo (pg/mL)
7.34	100	1	600	305.90
14.68	100	1	600	611.80
22.02	100	1	600	917.70
29.37	100	1	600	1223.60
36.71	100	1	600	1529.50
44.05	100	1	600	1835.40
51.39	100	1	600	2141.30

La calibración se realiza por triplicado.

VI.3.2.1 Linealidad del método para músculo.

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que el método analítico es lineal para la cuantificación de 5,7-HQ en el intervalo de 268 a 1876 pg/mL aun considerando los componentes de la matriz de músculo de cerdo, como se puede ver en la figura 19A y 20A, se presenta la linealidad del método de 5,7-HQ Y 5-HQ cuyas pendientes son cercanas a la unidad, lo que indica recobros cercanos al 100% además en la figura 19B y 20B que muestran los gráficos de residuos nos deja ver que este comportamiento es homocedástico es decir que no hay una tendencia en el error calculado para los datos.

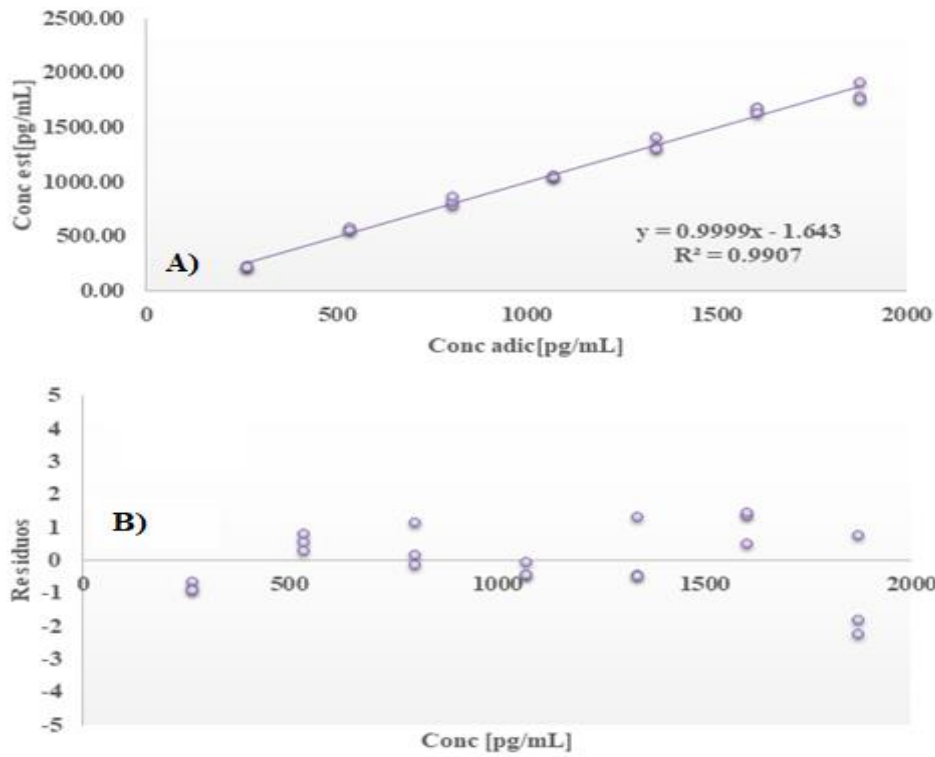


Figura 19 A) Linealidad del método para 5,7-HQ en músculo de cerdo, B) Residuales de la relación de la concentración adicionada de 5,7-HQ en función de la concentración estimada en músculo.

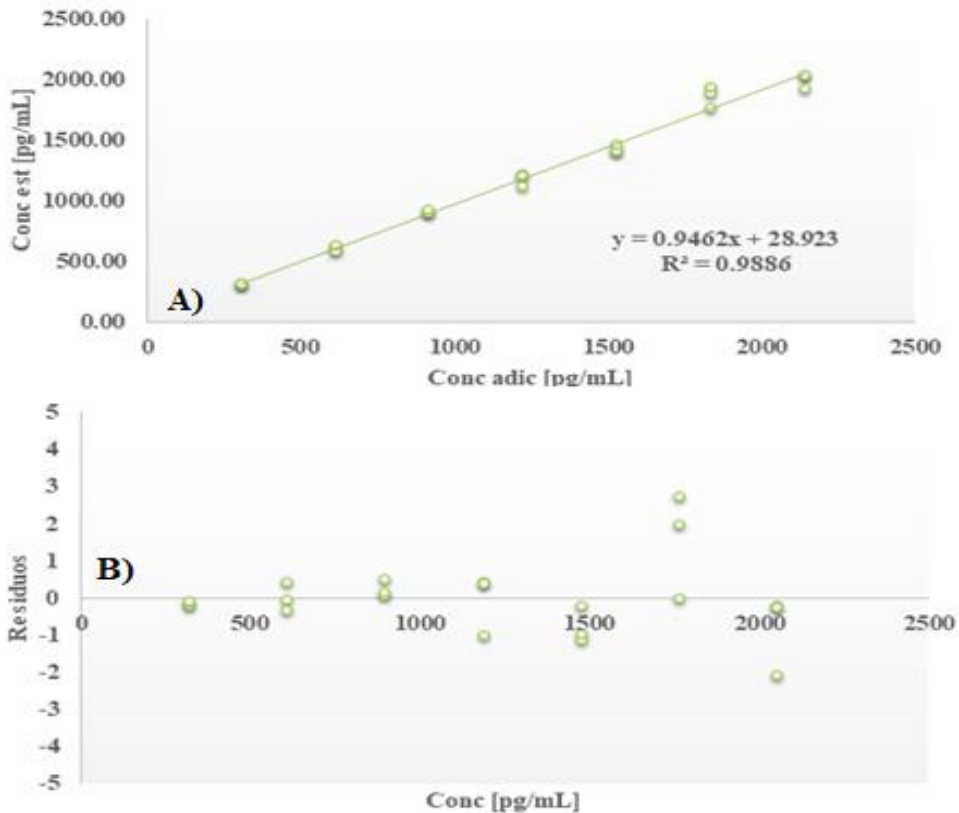


Figura 20 A) Linealidad del método para 5-HQ en músculo de cerdo, B) Residuales de la relación de la concentración adicionada de 5-HQ en función de la concentración estimada en músculo.

Tabla No. 38. Resumen de la linealidad del método para 5,7-HQ.

Conc adic [pg/mL]	Conc est [pg/mL]	Recobro (%)
268	231.93	86.55
268	219.43	81.89
268	218.18	81.42
536	564.35	105.30
536	578.09	107.87
536	550.60	102.74
804	795.54	98.96
804	810.53	100.83
804	863.02	107.36
1072	1047.98	97.77
1072	1066.72	99.52
1072	1047.98	97.77
1340	1314.16	98.09
1340	1311.66	97.90
1340	1407.89	105.08
1608	1679.07	104.44
1608	1684.07	104.75
1608	1632.83	101.56
1876	1914.01	102.04
1876	1779.04	94.85
1876	1755.30	93.58
Promedio del porcentaje de recobro		98.5844
CV del porcentaje de recobro		7.6105
Relación concentración adicionada vs la concentración estimada		
Ecuación	$y = 0.9999x - 1.643$	
r^2	0.9907	
IC (β_0) Límite inferior	-57.3759	
IC (β_0) Límite superior	54.0898	
IC (β_1) Límite inferior	0.95341	
IC (β_1) Límite superior	1.0464	

Tabla 39. Resumen de la linealidad del método para 5-HQ.

Conc adic [pg/mL]	Conc est [pg/mL]	Recobro (%)
306	303.87	99.34
306	311.02	101.67
306	312.80	102.26
612	605.61	98.99
612	585.97	95.78
612	634.17	103.66
918	901.98	98.29
918	905.55	98.68
918	930.55	101.40
1224	1214.43	99.25
1224	1210.86	98.96
1224	1123.37	91.81
1530	1403.68	91.77
1530	1414.39	92.47
1530	1462.60	95.63
1835	1891.09	103.03
1835	1939.30	105.66
1835	1764.33	96.13
2141	2042.85	95.40
2141	2039.28	95.24
2141	1923.23	89.82
Promedio del porcentaje de recobro		97.8676
CV del porcentaje de recobro		4.3812
Relación concentración adicionada vs la concentración estimada		
Ecuación	$y = 1.0016x - 0.358$	
r^2	0.9901	
IC (β_0) Límite inferior	-37.7509	
IC (β_0) Límite superior	95.5977	
IC (β_1) Límite inferior	0.8975	
IC (β_1) Límite superior	0.9950	

El coeficiente de determinación (r^2) fue mayor de 0.98 para las dos hidroxiquinolinas, el intervalo de confianza de la ordenada al origen considera al cero y que el intervalo de confianza para la pendiente incluye a la unidad y que el promedio del porcentaje de recobro está dentro del intervalo de 50-120 % y que el coeficiente de variación para el porcentaje de recobro es menos al 15% ver tabla No. 38 y 39.

VI.3.2.2. Precisión y Exactitud del método para músculo.

La exactitud de un método analítico indica el grado de cercanía entre el valor de referencia y el valor real encontrado. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos del porcentaje recuperado en cada una de las concentraciones analizadas.

Tabla 40. Porcentaje recuperado de Halquinol en músculo fortificado.

Concentración (pg/mL)		% recobro	
5-HQ	5,7-HQ	5-HQ	5,7-HQ
306	268	99.34	70.70
306	268	87.66	80.02
306	268	87.66	86.55
306	268	101.67	81.89
306	268	89.42	81.42
306	268	102.26	104.07
1224	1072	98.96	97.77
1224	1072	106.25	99.52
1224	1072	91.81	97.77
1224	1072	110.05	108.15
1224	1072	111.65	114.80
1224	1072	99.25	102.04
2141	1876	89.82	94.85
2141	1876	89.82	93.58
2141	1876	85.06	93.31
2141	1876	95.40	90.58
2141	1876	95.24	91.65
2141	1876	89.82	93.4521
Promedio		96.17	97.31
%CV		8.30	6.511

Se demostró la exactitud del método en músculo de cerdo al obtenerse un porcentaje de recuperación muy cercano al 100% en todos los casos como se puede apreciar en la tabla 40. El método resulto ser preciso en plasma de cerdo al obtenerse valores de CV menor al 15 % en todos los niveles de concentración analizados.

VI.3.2.3. Límites de detección y cuantificación para músculo.

En la determinación del límite de detección y cuantificación se prepararon soluciones de 306, 612 y 918 pg / mL de 5-HQ y 268, 536 y 804 pg / mL de 5,7-HQ, y el límite de detección se calculó como $LD = 3 S_b / b_1$, mientras que el límite de cuantificación como $LC = 10 S_b / b_1$, donde S_b es la desviación estándar del blanco y b_1 es la pendiente, como se estima a partir de la curva de calibración; los datos estadísticos se muestran en la tabla 41.

Tabla 41. Estimación de LD y LC para músculo.

Estadísticas de la regresión	5,7-HQ	5-HQ
Coefficiente de correlación múltiple	0.9923	0.9917
Coefficiente de determinación r^2	0.9848	0.9836
r^2 ajustado	0.9840	0.9827
Error típico (S_b)	42.7966	28.4831
Pendiente (b_1)	0.8562	0.5931
Límite de Cuantificación (LC)	499.8321	480.2108
Límite de Detección (LD)	164.9446	158.4695

VI.3.2.5. Estabilidad a Corto Plazo para músculo.

Datos de concentración adicionada y recuperada de muestras sometida a 1 semana de almacenamiento. Muestras recién preparadas (MRP) y muestras congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de Estabilidad a Corto Plazo (ECP) durante 24 h y 48 h, y por último a 3 ciclos de congelación – descongelación Estabilidad Ciclos de Congelación (ECC) $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, los datos para 5-HQ se muestran en la tabla 42 y para la 5,7-HQ en la tabla 43.

Tabla 42. Estabilidad de músculo cargado con 5-HQ.

Condición	Concentración adicionada	Concentración recuperada	promedio	% CV	% recobro
MRP	1551	1529.41	1506.33	1.61	98.61
	1551	1481.00			95.49
	1551	1508.60			97.27
	2714	2771.42	2755.41	1.05	102.11
	2714	2772.93			102.16
	2714	2721.87			100.28
ECP (24 h)	1551	1161.60	1208.59	3.44	74.90
	1551	1223.64			78.90
	1551	1240.54			79.99
	2714	1985.43	1986.43	1.88	73.15
	2714	2024.24			74.58
	2714	1949.60			71.83
ECC	1551	1362.53	1394.17	3.13	87.85
	1551	1375.96			88.72
	1551	1444.01			93.10
	2714	2119.78	2089.11	1.35	78.10
	2714	2083.41			76.76
	2714	2064.14			76.05

Tabla 43. Estabilidad de músculo cargado con 5,7-HQ.

Condición	Concentración adicionada	Concentración recuperada	promedio	CV	% recobro
MRP	1951	1861.96	1897.01	1.62	95.45
	1951	1910.27			97.93
	1951	1918.79			98.37
	3414	3448.58	3417.32	1.04	101.02
	3414	3424.90			100.33
	3414	3378.49			98.97
ECP (24 h)	1951	1811.91	1858.30	3.34	92.89
	1951	1928.92			98.88
	1951	1834.08			94.02
	3414	3376.14	3524.76	5.80	98.90
	3414	3440.19			100.78
	3414	3757.96			110.09
ECC	1951	777.19	750.63	3.28	39.84
	1951	728.58			37.35
	1951	746.13			38.25
	3414	1112.39	1091.98	3.81	32.59
	3414	1119.45			32.79
	3414	1044.11			30.59

VI.4. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE 5-HQ Y 5,7-HQ EN RIÑÓN DE CERDO.

VI.4.1. Desarrollo del método de EFS para riñón de cerdo.

Considerado que la matriz biológica riñón es más compleja que el músculo y plasma, para desarrollar el método se probaron 7 agentes precipitantes, para lo cual se fortificó riñón con halquinol y posteriormente se siguió la precipitación de proteínas como se muestra en la Tabla No 44.

Tabla 44. Optimización del agente precipitante de proteínas en riñón de cerdo.

Agente precipitante	% Recobro _{5,7-HQ}	% Recobro _{5-HQ}
Ac Perclórico 10%	18.08 ± 11.52	22.64 ± 3.04
Ac TCA 10% MeOH	101.87 ± 2.67	54.12 ± 5.06
Ac TCA 10% acuoso	22.09 ± 7.91	64.84 ± 5.90
Sulfato de amonio	12.86 ± 10.34	23.23 ± 11.31
Acetonitrilo	29.95 ± 4.21	67.36 ± 11.93
Metanol	16.67 ± 11.35	62.97 ± 7.81
Hidróxido de Zinc 10%	5.64 ± 4.33	30.16 ± 13.92

Como se puede observar el mejor agente precipitante es el ácido tricloroacético preparado en metanol, posteriormente se optimizó la concentración de este agente precipitantes como se muestra en la tabla 45.

Tabla 45. Precipitación de proteínas en riñón cargado con Halquinol

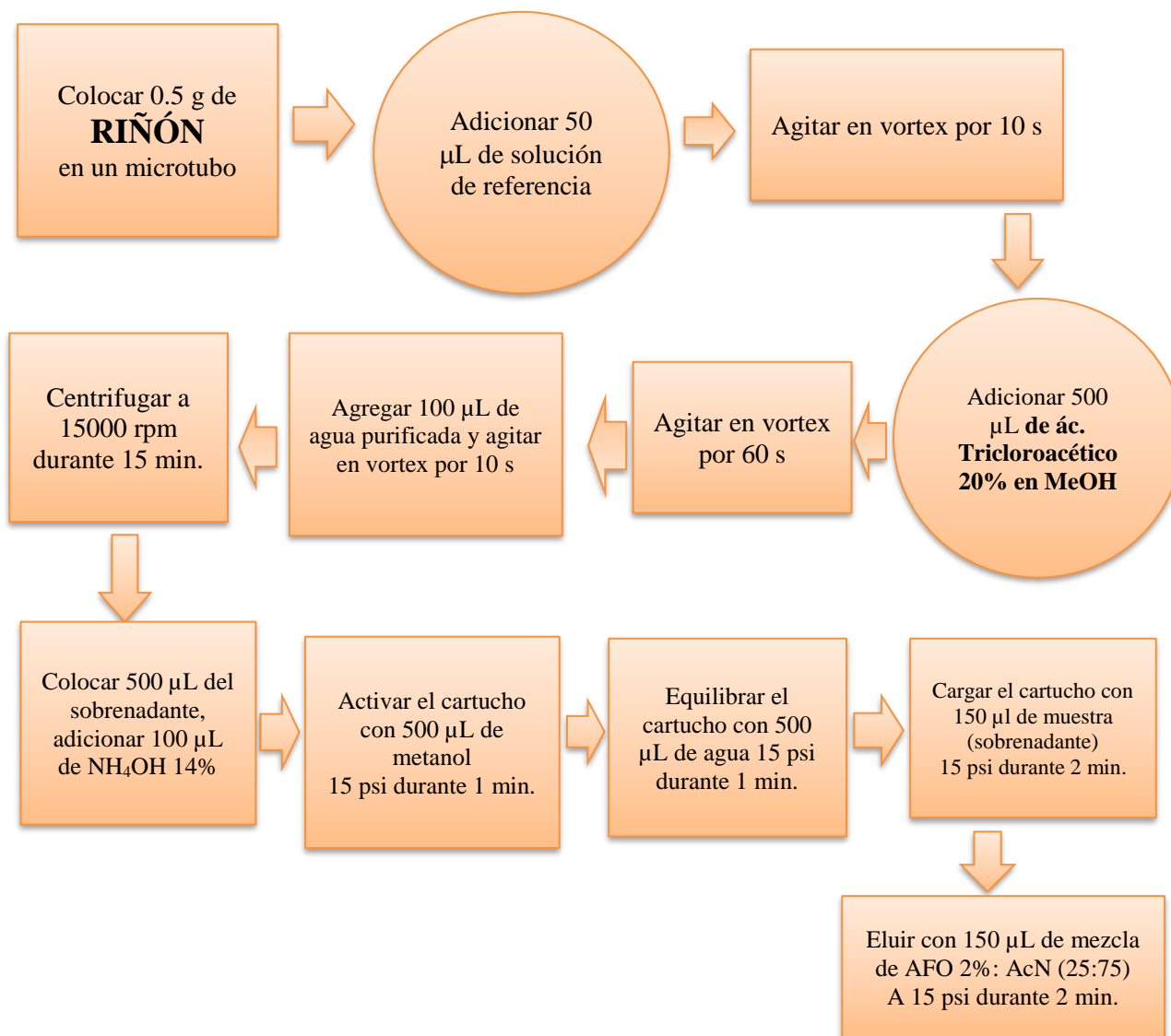
Agente precipitante	% Recobro _{5,7-HQ}	% Recobro _{5-HQ}
Ac TCA 10% AcN	21.49 ± 1.28	33.33 ± 1.07
Ac TCA 10% MeOH	35.16 ± 0.67	49.28 ± 15.78
Ac TCA 15% MeOH	31.89 ± 6.60	47.43 ± 5.19
Ac TCA 20% MeOH	80.15 ± 2.64	47.53 ± 1.69

Como se puede observar en la tabla 45 los mejores recobros se obtienen usando mayor concentración de agente precipitante, por lo que se decide optimizar el volumen de ácido tricloroacético y observar si hay una mejora en el porcentaje de recobro. En la tabla 46 se modifica la cantidad de agente precipitante para optimizar los recobros en riñón, en este caso los mejores recobros se obtienen al adicionar 500 µL de ácido tricloroacético al 20 % preparado en metanol.

Tabla 46. Cantidad de agente precipitante

Volumen Ac TCA 20% MeOH	% Recobro <i>5,7-HQ</i>	% Recobro <i>5-HQ</i>
300 μL	39.19 \pm 8.30	99.64 \pm 11.16
400 μL	87.939 \pm 6.07	100.67 \pm 8.38
500 μL	99.07 \pm 7.33	86.30 \pm 5.02
600 μL	99.46 \pm 0.29	65.66 \pm 3.00

Las variables estudiadas, en la optimización del proceso de extracción, se realizaron por triplicado y se modificó de una en una cada variable es decir no se aplicaron dos variables en un mismo ensayo.


Figura 21 Diagrama de tratamiento de muestra de riñón.

VI.4.2. Validación del método para riñón de cerdo.

A continuación, en la tabla 47 y 48 se muestra la forma como se fortificaron las muestras de riñón para demostrar las cualidades del método adicionando 5,7-HQ y 5-HQ respectivamente.

Tabla 47. Preparación de las muestras de la curva de calibración de 5,7-HQ.

Concentración de la solución estándar (ng/mL)	Volumen de solución estándar (µL)	Riñón de cerdo (g)	Ácido tricloroacético 20% (µL)	Agua purificada (µL)	Concentración de sobrenadante (pg/mL)
8.712	50	0.500	500	100	378.78
17.424	50	0.500	500	100	757.57
26.136	50	0.500	500	100	1136.35
34.848	50	0.500	500	100	1515.13
43.56	50	0.500	500	100	1893.91
52.272	50	0.500	500	100	2272.70
60.984	50	0.500	500	100	2651.48

La calibración se realiza por triplicado.

Tabla 48. Preparación de las muestras de la curva de calibración en riñón de 5-HQ.

Concentración de solución estándar (ng/mL)	Vol. solución estándar (µL)	Riñón de cerdo (g)	Ácido tricloroacético 20% (µL)	Agua purificada (µL)	Concentración de sobrenadante (pg/mL)
8.512	50	0.500	500	100	370.09
17.024	50	0.500	500	100	740.17
25.536	50	0.500	500	100	1110.26
34.048	50	0.500	500	100	1480.35
42.56	50	0.500	500	100	1850.43
51.072	50	0.500	500	100	2220.52
59.584	50	0.500	500	100	2590.61

La calibración se realiza por triplicado.

VI.4.2.1. Linealidad del método para riñón.

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que el método analítico es lineal para la cuantificación de la 5,7 Di-HQ es lineal en un intervalo de 413.22 a 2892.52 pg/mL, como se muestra en la tabla 49 y 50 para ambos analitos que conforman el halquinol.

Tabla 49. Resumen de la linealidad del método para 5,7-HQ.

Conc. adicionada [pg/mL]	Conc. estimada [pg/mL]	Recobro (%)
316	249.52	79.05
316	370.89	117.50
316	351.54	111.37
631	634.74	100.54
631	613.63	97.20
631	611.87	96.92
947	903.87	95.45
947	847.58	89.51
947	888.04	93.78
1263	1216.97	96.39
1263	1181.79	93.60
1263	1287.34	101.96
1578	1558.22	98.73
1578	1454.44	92.15
1578	1572.30	99.62
1894	1756.99	92.77
1894	2073.61	109.49
1894	1860.77	98.25
2210	2300.53	104.12
2210	2194.99	99.34
2210	2163.32	97.91
Promedio del porcentaje de recobro		97.5837
CV del porcentaje de recobro		4.9224
Relación concentración adicionada vs la concentración estimada		
Ecuación	$y = 0.987x + 13.316$	
r^2	0.9846	
IC (β_0) Límite inferior	-98.7476	
IC (β_0) Límite superior	45.3890	
IC (β_1) Límite inferior	0.9554	
IC (β_1) Límite superior	1.0543	

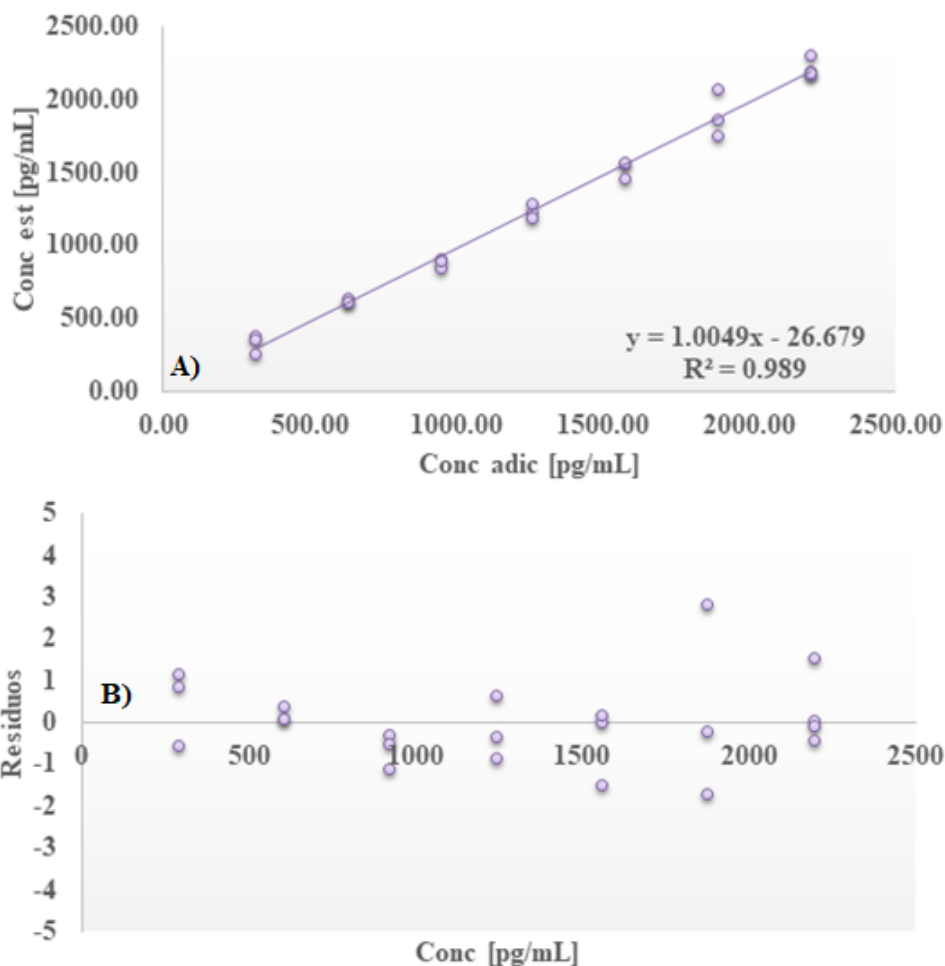


Figura 22 A) Linealidad del método para 5,7-HQ en riñón de cerdo, B) Residuales de la relación de la concentración adicionada de 5,7-HQ en función de la concentración estimada en riñón de cerdo.

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que el método analítico es lineal para la cuantificación de 5-HQ en el intervalo de 329 a 2305 pg/mL aun considerando los componentes de la matriz de riñón de cerdo.

Esta prueba determina la capacidad del método para dar una respuesta, independientemente de la cantidad en la que se encuentre el analito con respecto a los componentes de la matriz.

En la figura 22A y 23A, se presenta la linealidad del método cuya pendiente es cercana a 1 que indica recobros de caso el 100% además en la figura 22B y 23B que muestran los gráficos de residuos nos deja ver que este comportamiento es homocedástico es decir que no hay una tendencia en el error calculado para los datos.

Tabla 50. Resumen de la linealidad del método para 5-HQ.

Conc. adicionada [pg/mL]	Conc. estimada [pg/mL]	Recobro (%)
308	299.57	97.14
308	308.03	99.88
308	299.08	96.97
617	631.22	102.34
617	641.66	104.03
617	590.94	95.81
925	962.36	104.01
925	923.58	99.82
925	941.97	101.81
1234	1204.50	97.64
1234	1190.09	96.47
1234	1277.60	103.56
1542	1475.98	95.72
1542	1561.01	101.23
1542	1517.25	98.39
1850	1803.15	97.44
1850	2006.02	108.41
1850	2000.55	108.11
2159	2111.43	97.80
2159	2151.70	99.67
2159	2228.27	103.22
Promedio del porcentaje de recobro		100.4820
CV del porcentaje de recobro		3.8976
Relación concentración adicionada vs la concentración estimada		
Ecuación	$y = 1.0133x - 0.7.8401$	
r^2	0.9927	
IC (β_0) Límite inferior	-65.5422	
IC (β_0) Límite superior	49.8620	
IC (β_1) Límite inferior	0.9727	
IC (β_1) Límite superior	1.0538	

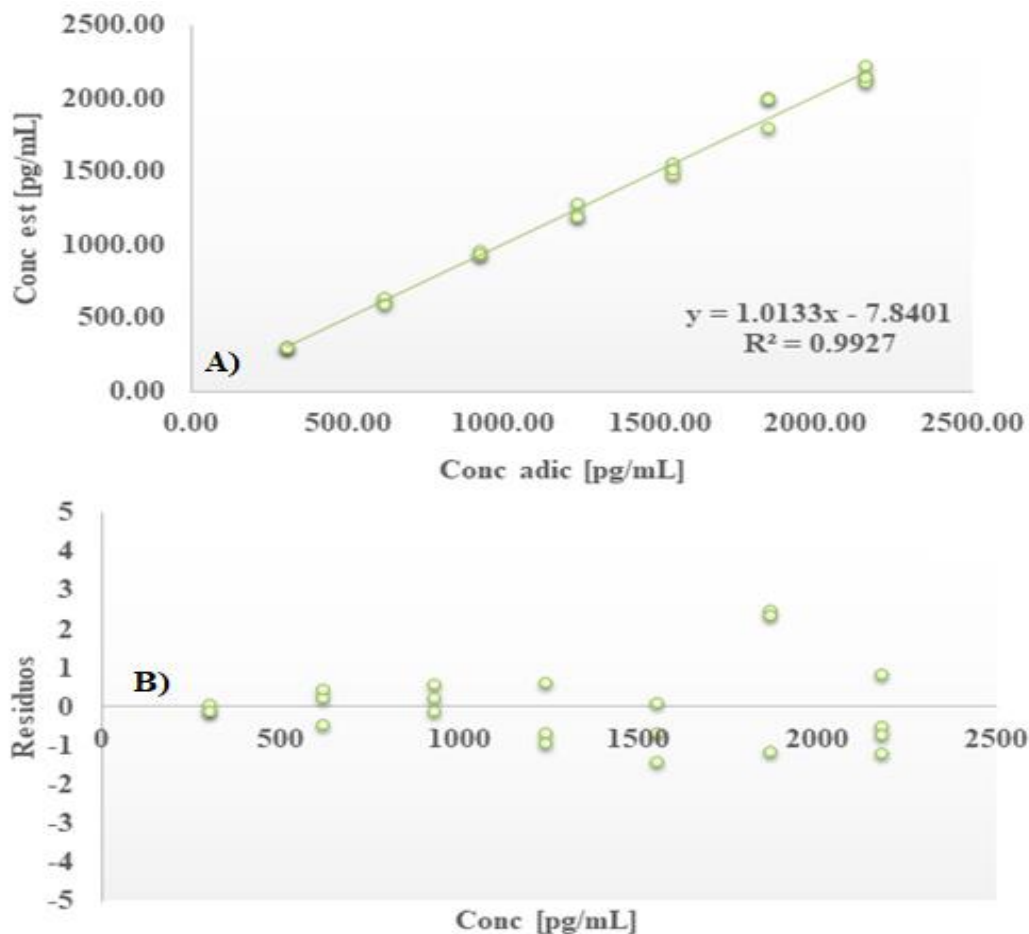


Figura 23 A) Linealidad del método para 5-HQ en riñón de cerdo, B) Residuales de la relación de la concentración adicionada de 5-HQ en función de la concentración estimada en riñón de cerdo.

El coeficiente de determinación (r^2) fue mayor de 0.98 para las dos hidroxiquinolinas, que el intervalo de confianza de la ordenada al origen considera al cero y que el intervalo de confianza para la pendiente incluye a la unidad y que el promedio del porcentaje de recobro está dentro del intervalo de 50-120 % y que el coeficiente de variación para el porcentaje de recobro es menos al 15% ver tabla 49 y 50.

VI.4.2.2 Precisión y Exactitud del método para riñón.

La exactitud de un método analítico indica el grado de cercanía entre el valor de referencia y el valor real encontrado. En la tabla 51 se muestran los resultados obtenidos del porcentaje recuperado en cada una de las concentraciones analizadas.

Tabla 51. Datos del porcentaje recuperado de Halquinol en riñón cargado.

Concentración (pg/mL)		% recobro	
5-HQ	5,7-HQ	5-HQ	5,7-HQ
308	316	123.63	97.14
308	316	117.50	99.88
308	316	133.10	96.97
308	316	124.19	104.71
308	316	131.43	104.71
308	316	111.37	106.16
1234	1263	96.39	108.40
1234	1263	105.44	93.41
1234	1263	93.60	97.64
1234	1263	101.96	105.94
1234	1263	90.26	96.47
1234	1263	91.09	103.56
2159	2210	104.12	108.41
2159	2210	99.34	108.11
2159	2210	107.70	97.80
2159	2210	95.76	107.34
2159	2210	97.91	99.67
2159	2210	98.94	103.22
Promedio		105.1615	103.0376
%CV		12.8370	4.7100

VI.4.2.3. Límites de detección y cuantificación para riñón.

En la determinación del límite de detección y cuantificación se prepararon soluciones de 308, 617 y 925 pg/mL de 5-HQ y 316, 631 y 947 pg/mL de 5,7-HQ, y el límite de detección se calculó como $LD = 3 S_b / b_1$, mientras que el límite de cuantificación como $LC = 10 S_b / b_1$, donde S_b es la desviación estándar del blanco y b_1 es la pendiente, como se estima a partir de la curva de calibración; los datos estadísticos se muestran en la tabla 52.

Tabla 52. Estimación de LD y LC para riñón.

Estadísticas de la regresión	5,7-HQ	5-HQ
Coefficiente de correlación múltiple	0.9917	0.9925
Coefficiente de determinación r^2	0.9835	0.9850
r^2 ajustado	0.9830	0.9846
Error típico (Sb)	52.8011	165.6956
Pendiente (b1)	0.5685	2.0112
Límite de Cuantificación (LC) [pg/mL]	928.7064	823.8468
Límite de Detección (LD) [pg/mL]	306.4731	271.8695

VI.4.2.4. Estabilidad a Corto Plazo para riñón.

Datos de concentración adicionada y recuperada de muestras de riñón sometida a 1 semana de almacenamiento. Muestras recién preparadas (MRP) y muestras congeladas a -80 °C de Estabilidad a Corto Plazo (ECP) durante 24 h y con 3 ciclos de congelación – descongelación Estabilidad Ciclos de Congelación (ECC) -80 °C, los datos para 5-HQ se muestran en la tabla 53 y para la 5,7-HQ en la tabla 54.

Tabla 53. Estabilidad de riñón cargado con 5-HQ.

Condición	Concentración adicionada	Concentración recuperada	promedio	% CV	% recobro
MRP	1256	1325.51	1235.41	6.33	105.56
	1256	1185.77			94.43
	1256	1194.96			95.17
	2197	2266.30	2207.47	5.81	103.14
	2197	2295.72			104.47
	2197	2060.37			93.76
ECP (24 h)	1256	1474.44	1554.94	4.49	117.42
	1256	1592.12			126.80
	1256	1598.25			127.28
	2197	2689.81	2736.39	2.10	122.41
	2197	2718.62			123.72
	2197	2800.75			127.46
ECC	1256	1027.17	955.97	6.45	81.80
	1256	920.59			73.32
	1256	920.15			73.28
	2197	1569.95	1576.37	0.42	71.45
	2197	1583.13			72.05
	2197	1576.04			71.72

Tabla 54. Estabilidad de riñón cargado con 5,7-HQ.

Condición	Concentración adicionada	Concentración recuperada	promedio	CV	% recobro
MRP	1377	1282.59	1335.28	5.11	93.12
	1377	1310.90			95.17
	1377	1412.36			102.54
	2410	2561.49	2431.71	6.88	106.27
	2410	2490.70			103.33
	2410	2242.94			93.05
ECP (24 h)	1377	1728.55	1680.57	6.59	125.49
	1377	1553.94			112.82
	1377	1759.23			127.72
	2410	2556.77	2592.17	1.25	106.07
	2410	2599.24			107.83
	2410	2620.48			108.71
ECC	1377	1037.19	1019.88	1.63	75.30
	1377	1018.31			73.93
	1377	1004.15			72.90
	2410	1905.52	1790.69	5.58	79.05
	2410	1723.83			71.52
	2410	1742.71			72.30

VI.5. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE 5-HQ Y 5,7-HQ EN HÍGADO DE CERDO.

VI.5.1. Desarrollo del método de EFS para hígado de cerdo.

Para desarrollar el método con hígado, al igual que riñón, se probaron 7 agentes precipitantes, para lo cual se fortificó hígado con halquinol y posteriormente se siguió la precipitación de proteínas como se muestra en la Tabla No 55.

Tabla 55. Optimización del agente precipitante de proteínas en hígado de cerdo.

Agente precipitante	% Recobro 5,7-HQ	% Recobro 5-HQ
Ac Perclórico 10%	24.14 ± 11.80	30.01 ± 7.74
Ac TCA 10% MeOH	57.41 ± 1.73	48.79 ± 8.74
Ac TCA 10% acuoso	9.34 ± 12.87	46.77 ± 11.15
Sulfato de amonio	7.47 ± 13.14	33.40 ± 16.04
Acetonitrilo	54.73 ± 15.80	49.67 ± 6.48
Metanol	13.67 ± 11.27	71.82 ± 8.17
Hidróxido de Zinc 10%	5.85 ± 11.52	37.15 ± 3.04

Como se puede observar el mejor agente precipitante es el ácido tricloroacético preparado en metanol, aunque también usando sólo acetonitrilo se muestran recobros mayores al 50%, por lo que se decidió modificar la concentración de ácido tricloroacético en metanol, y partiendo de los agentes precipitantes probados se decide además probar a otras concentraciones para observar si se podían aumentar los porcentajes de recobro.

Tabla 56. Precipitación de proteínas en hígado cargado con 5-HQ y 5,7-HQ.

Agente precipitante	% Recobro _{5,7-HQ}	% Recobro _{5-HQ}
Ac TCA 10% AcN	13.10 ± 16.17	28.26 ± 9.28
Ac TCA 10% MeOH	21.41 ± 2.73	39.50 ± 10.93
Ac TCA 15% MeOH	30.34 ± 3.95	36.97 ± 11.66
Ac TCA 20% MeOH	83.91 ± 5.61	35.26 ± 9.92

Como se puede observar en la tabla 56, los mejores recobros se obtienen usando mayor concentración de ácido tricloroacético, por lo que se decide optimizar el volumen de ácido tricloroacético y observar si hay una mejora en el porcentaje de recobro. En la tabla 57 se modifica la cantidad de agente precipitante para optimizar los recobros en hígado, en este caso los mejores recobros se obtienen al adicionar 500 µL de ácido tricloroacético al 20 % preparado en metanol.

Tabla 57. Cantidad de agente precipitante.

Volumen Ac TCA 20% MeOH	% Recobro _{5,7-HQ}	% Recobro _{5-HQ}
300 µL	14.08 ± 12.57	74.41 ± 10.00
400 µL	47.99 ± 5.04	87.87 ± 9.50
500 µL	75.95 ± 3.17	80.83 ± 10.70
600 µL	78.97 ± 8.89	67.50 ± 12.30

Las variables estudiadas, en la optimización del proceso de extracción, se realizaron por triplicado y el cálculo de los recobros es absoluto, es decir se comparó directamente con un estándar de la misma concentración.

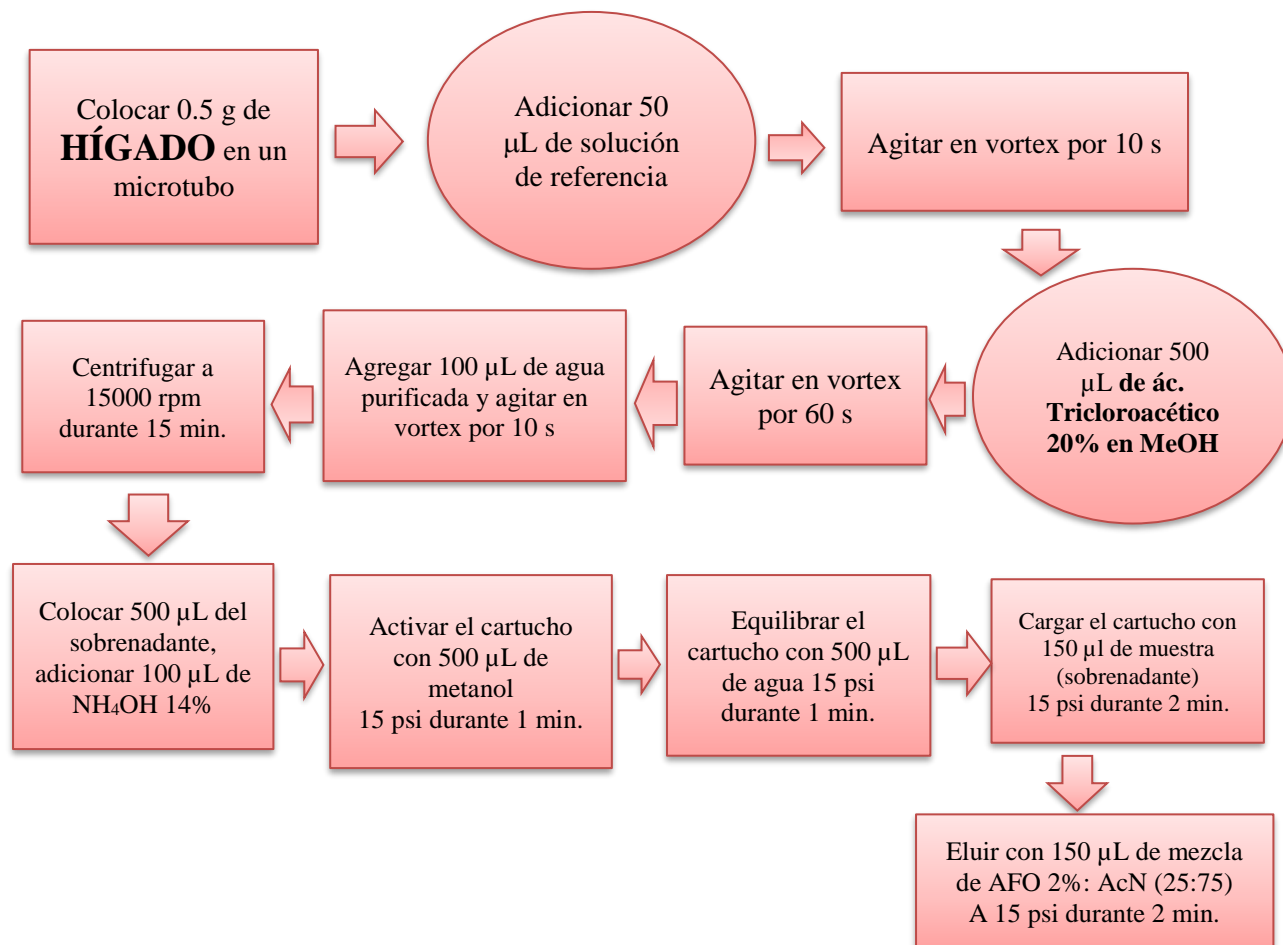


Figura 24 Diagrama de tratamiento de muestra de hígado.

VI.5.2. Validación del método para hígado de cerdo.

A continuación, en la tabla 58 y 59 se muestra la forma como se fortificaron las muestras de hígado para demostrar las cualidades del método adicionando 5,7-HQ y 5-HQ respectivamente.

Tabla 58. Preparación de las muestras de la curva de calibración de 5,7-HQ.

Concentración del estándar (ng/mL)	Volumen de solución estándar (µL)	hígado de cerdo (g)	Ácido tricloroacético 20% (µL)	Agua purificada (µL)	Concentración en sobrenadante (pg/mL)
8.8	50	0.500	500	100	379
17.4	50	0.500	500	100	758
26.1	50	0.500	500	100	1136
34.8	50	0.500	500	100	1515
43.6	50	0.500	500	100	1894
52.3	50	0.500	500	100	2278
61	50	0.500	500	100	2651

La calibración se realiza por triplicado.

Tabla 59. Preparación de las muestras de la curva de calibración de 5-HQ.

Concentración estándar (ng/mL)	Volumen de estándar (μL)	hígado de cerdo (g)	Ácido tricloroacético 20% (μL)	Agua (μL)	Concentración sobrenadante (pg/mL)
8.5	50	0.500	500	100	370
17.0	50	0.500	500	100	740
25.5	50	0.500	500	100	1110
34.0	50	0.500	500	100	1480
42.6	50	0.500	500	100	1850
51.1	50	0.500	500	100	2220
59.6	50	0.500	500	100	2591

La calibración se realiza por triplicado.

VI.5.2.1. Linealidad del método para hígado.

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que el método analítico es lineal para la cuantificación de la 5,7-HQ es lineal en un intervalo de 390 a 2732 pg/mL, como se puede apreciar en la tabla 60 en el resumen de los datos estadísticos cumple con los parámetros establecidos de ordenada y pendiente.

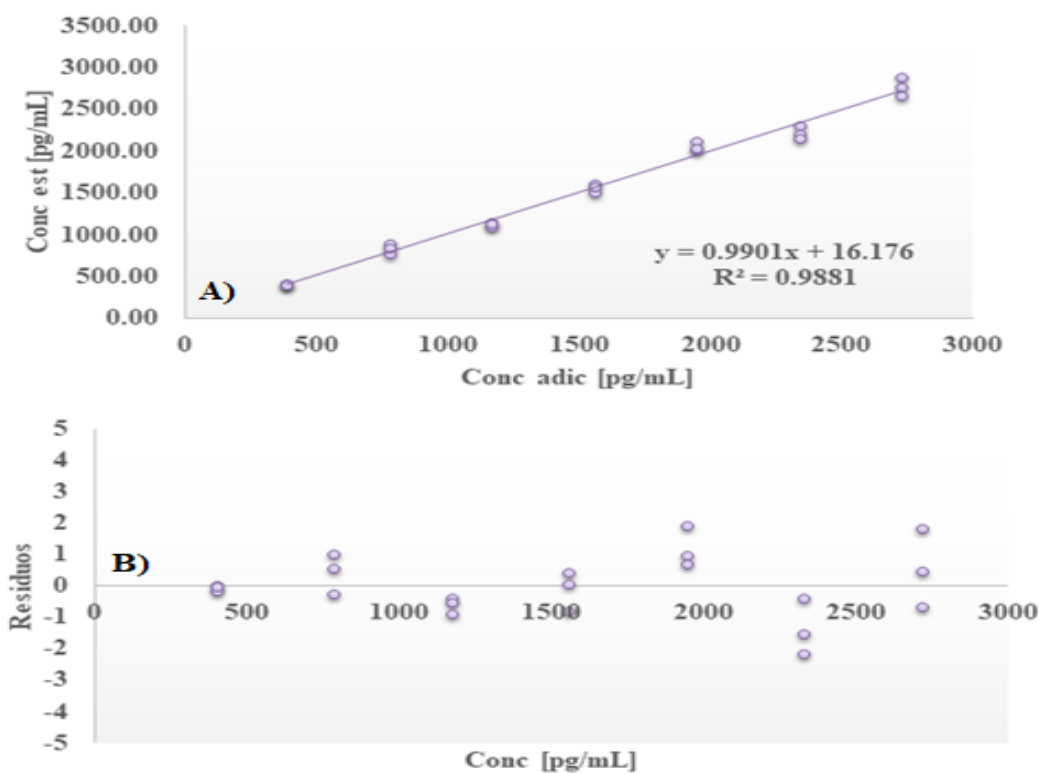


Figura 25 A) Linealidad del método para 5,7-HQ en hígado de cerdo, B) Residuales de la relación de la concentración adicionada de 5,7-HQ en función de la concentración estimada en hígado.

Tabla 60. Resumen de la linealidad del método para 5,7-HQ.

Conc adic [pg/mL]	Conc est [pg/mL]	Recobro (%)
390	385.70	98.83
390	403.40	103.37
390	399.86	102.46
781	767.87	98.38
781	877.57	112.43
781	835.10	106.99
1171	1139.42	97.32
1171	1096.96	93.69
1171	1128.80	96.41
1561	1599.43	102.46
1561	1493.28	95.66
1561	1567.59	100.42
1951	2116.06	108.44
1951	2006.37	102.82
1951	2031.14	104.09
2342	2300.07	98.23
2342	2200.99	93.99
2342	2144.37	91.58
2732	2880.40	105.44
2732	2760.08	101.03
2732	2661.00	97.41
Promedio del porcentaje de recobro		100.55
CV del porcentaje de recobro		5.20
Relación concentración adicionada vs la concentración estimada		
Ecuación	$y = 0.987x + 13.316$	
r²	0.9846	
IC (β_0) Límite inferior	-74.7728	
IC (β_0) Límite superior	107.1255	
IC (β_1) Límite inferior	0.9379	
IC (β_1) Límite superior	1.0422	

El coeficiente de determinación (r^2) fue mayor de 0.98 para las dos hidroxiquinolinas, que el intervalo de confianza de la ordenada al origen considera al cero y que el intervalo de confianza para la pendiente incluye a la unidad y que el promedio del porcentaje de recobro está dentro del intervalo de 50-120 % y que el coeficiente de variación para el porcentaje de recobro es menos al 15% ver tabla 60 y 61.

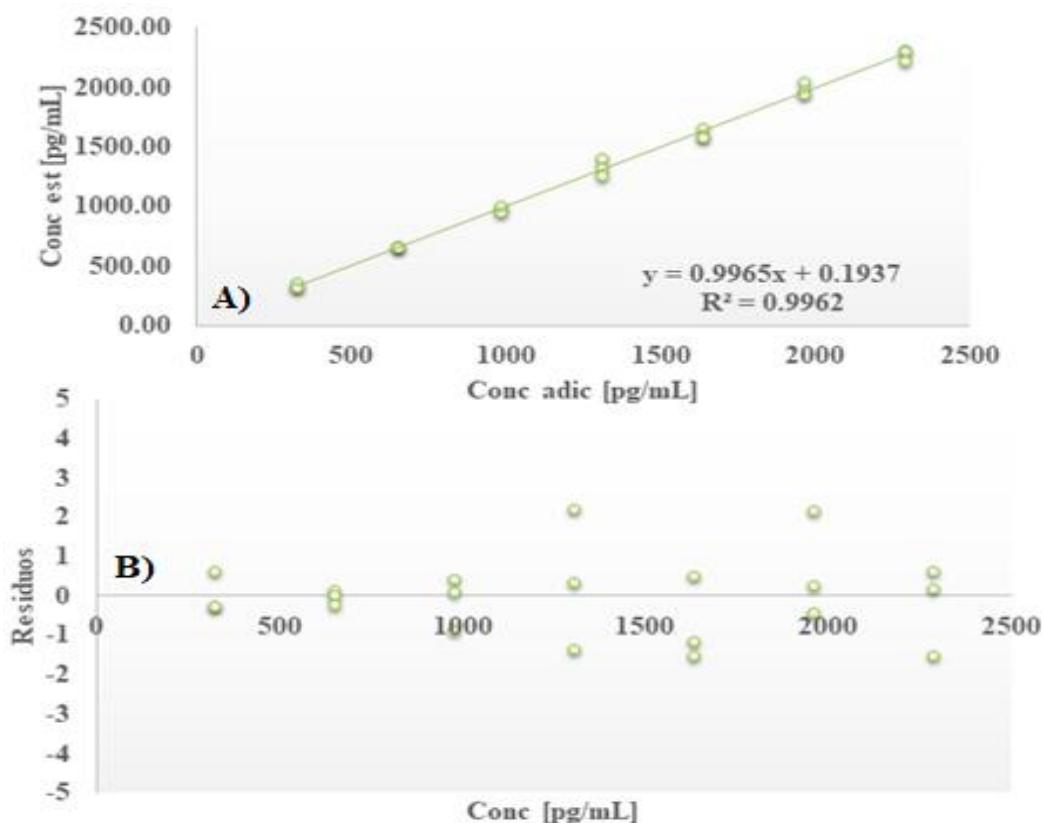


Figura 26 A) Linealidad del método para 5-HQ en hígado de cerdo, B) Residuales de la relación de la concentración adicionada de 5-HQ en función de la concentración estimada en hígado de cerdo.

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que el método analítico es lineal para la cuantificación de 5-HQ en el intervalo de 328 a 2294 pg/mL aun considerando los componentes de la matriz de hígado de cerdo. En la figura 25A y 26A, se presenta la linealidad del método cuya pendiente es cercana a 1 que indica recobros de caso el 100% además en la figura 25B y 26B se muestran los gráficos de residuos nos deja ver que este comportamiento es homocedástico es decir que no hay una tendencia en el error calculado para los datos.

Tabla 61. Resumen de la linealidad del método para 5-HQ.

Conc. adic. [pg/mL]	Conc. Est. [pg/mL]	Recobro (%)
328	316.22	96.50
328	351.80	107.36
328	315.20	96.19
655	658.87	100.54
655	653.79	99.76
655	644.64	98.36
983	984.24	100.12
983	943.57	95.98
983	997.46	101.47
1311	1319.78	100.69
1311	1398.07	106.66
1311	1249.62	95.34
1638	1585.16	96.75
1638	1570.92	95.88
1638	1653.28	100.91
1966	1969.50	100.17
1966	1941.03	98.73
1966	2048.81	104.21
2294	2312.15	100.80
2294	2293.85	100.00
2294	2223.69	96.94
Promedio del porcentaje de recobro		99.6844
CV del porcentaje de recobro		3.3607
Relación concentración adicionada vs la concentración estimada		
Ecuación	$y = 0.9965x + 0.1937$	
r^2	0.9927	
IC (β_0) Límite inferior	-43.0233	
IC (β_0) Límite superior	43.4107	
IC (β_1) Límite inferior	0.9670	
IC (β_1) Límite superior	1.0259	

Esta prueba determina la capacidad del método para dar una respuesta, independientemente de la cantidad en la que se encuentre el analito con respecto a los componentes de la matriz; el coeficiente de determinación (r^2) fue mayor de 0.98 para las dos hidroxiquinolinas, que el intervalo de confianza de la ordenada al origen considera al cero y que el intervalo de confianza para la pendiente incluye a la unidad y que el promedio del porcentaje de recobro está dentro del intervalo de 50-120 % y que el coeficiente de variación para el porcentaje de recobro es menos al 15% ver tabla 60 y 61.

VI.5.2.2. Precisión y exactitud del método para hígado.

La exactitud de un método analítico indica el grado de cercanía entre el valor de referencia y el valor real encontrado. En la tabla 62 se muestran los resultados obtenidos del porcentaje recuperado en cada una de las concentraciones analizadas.

Tabla 62. Datos del porcentaje recuperado de Halquinol en hígado cargado.

Concentración (pg/mL)		% recobro	
5-HQ	5,7-HQ	5-HQ	5,7-HQ
328	390	96.50	98.83
328	390	107.36	91.58
328	390	112.33	90.67
328	390	88.74	105.18
328	390	107.36	103.37
328	390	96.19	102.46
1311	1561	100.69	102.46
1311	1561	109.38	95.66
1311	1561	109.30	111.30
1311	1561	106.66	100.42
1311	1561	92.93	106.09
1311	1561	95.34	95.66
2294	2732	94.73	105.44
2294	2732	100.80	101.03
2294	2732	100.00	107.64
2294	2732	106.56	95.08
2294	2732	104.61	97.41
2294	2732	96.94	109.32
Promedio		101.4694	101.0884
%CV		6.6244	5.8659

Se demostró la exactitud del método en hígado de cerdo al obtenerse un porcentaje de recuperación muy cercano al 100% en todos los casos. El método resultó ser preciso en plasma de cerdo al obtenerse valores de CV menor al 15 %.

VI.5.2.3. Límites de detección y cuantificación para riñón.

En la determinación del límite de detección y cuantificación se prepararon soluciones de 308, 617 y 925 pg/mL de 5-HQ y 316, 631 y 947 pg/mL de 5,7-HQ, y el límite de detección se calculó como $LD = 3 S_b / b_1$, mientras que el límite de cuantificación como $LC = 10 S_b / b_1$, donde S_b es la desviación estándar del blanco y b_1 es la pendiente, como se estima a partir de la curva de calibración; los datos estadísticos se muestran en la tabla 63.

Tabla 63. Estimación de LD y LC para hígado.

Estadísticas de la regresión	5,7-HQ	5-HQ
Coefficiente de correlación múltiple	0.9913	0.9955
Coefficiente de determinación r^2	0.9827	0.9911
r^2 ajustado	0.9812	0.9904
Error típico (S_b)	12.9518	26.49
Pendiente (b_1)	0.2782	0.9528
Límite de Cuantificación (LC) [pg/mL]	465.56	278.09
Límite de Detección (LD) [pg/mL]	139.67	83.43

VI.5.2.4. Estabilidad a Corto Plazo para hígado.

Datos de concentración adicionada y recuperada de muestras de hígado sometidas a diferentes condiciones de almacenamiento; Muestras Recién Preparadas (MRP) y muestras congeladas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ de Estabilidad a Corto Plazo (ECP) durante 24 h y con 3 ciclos de congelación – descongelación, Estabilidad Ciclos de Congelación (ECC) $-80\text{ }^\circ\text{C}$, los datos para 5-HQ se muestran en la tabla 64 y para la 5,7-HQ en la tabla 65.

Tabla 64. Estabilidad de hígado cargado con 5-HQ.

Condición	Concentración adicionada	Concentración recuperada	promedio	% CV	% recobro
MRP	1256	1235.63	1240.78	0.40	98.41
	1256	1241.14			98.84
	1256	1245.56			99.20
	2197	2179.23	2238.09	2.28	99.17
	2197	2270.83			103.34
	2197	2264.21			103.04
ECP (24 h)	1256	1293.32	1296.38	0.65	103.00
	1256	1289.95			102.73
	1256	1305.88			104.00
	2197	2219.82	2228.06	0.68	101.02
	2197	2245.46			102.19
	2197	2218.91			100.98
ECC	1256	1082.00	1064.75	2.83	86.17
	1256	1082.31			86.20
	1256	1029.94			82.02
	2197	1794.54	1763.56	1.73	81.67
	2197	1733.65			78.90
	2197	1762.49			80.21

Tabla 65. Estabilidad de hígado cargado con 5,7-HQ.

Condición	Concentración adicionada	Concentración recuperada	promedio	CV	% recobro
MRP	1377	1532.38	1455.03	4.64	111.25
	1377	1425.28			103.48
	1377	1407.43			102.18
	2410	2278.54	2407.07	5.34	94.53
	2410	2535.59			105.19
	2410	2407.07			99.86
ECP (24 h)	1377	1372.94	1352.71	3.30	99.68
	1377	1383.65			100.45
	1377	1301.54			94.49
	2410	2408.28	2407.09	0.23	99.91
	2410	2401.14			99.61
	2410	2411.85			100.06
ECC	1377	1205.14	1152.78	7.34	87.49
	1377	1198.00			86.98
	1377	1055.19			76.61
	2410	1987.00	1912.03	6.16	82.43
	2410	1776.37			73.69
	2410	1972.72			81.84

VI.6. SELECCIÓN DEL TIEMPO DE MEZCLADO EN LA ELABORACIÓN DE LA PREMEZCLA ALIMENTARIA.

Antes de empezar el estudio se analizó el alimento mediante el método indicativo de estabilidad desarrollado por UPLC-PDA para premezclas alimentarias que se presentó en la sección VI.1. Para asegurar que el alimento a utilizar no trajera otros fármacos, primero se analizó el alimento para cerdos y posteriormente se hizo la premezcla alimentaria con el alimento para cerdos y el halquinol, en un mezclador de pantalón como se muestra en la figura 27.



Figura 27. Mezclador de pantalón

Posteriormente se realizaron 3 muestreos por tiempo es decir en tres posiciones de la bayoneta, se muestreo abajo en medio y arriba para conocer el tiempo óptimo de mezclado. Se construyó el gráfico de la figura 28 y como se puede observar, al mezclar durante 15 minutos se tiene menor desviación estándar relativa; por lo que se decide que las mezclas alimentarias con halquinol se realizarán con un tiempo de 15 minutos.

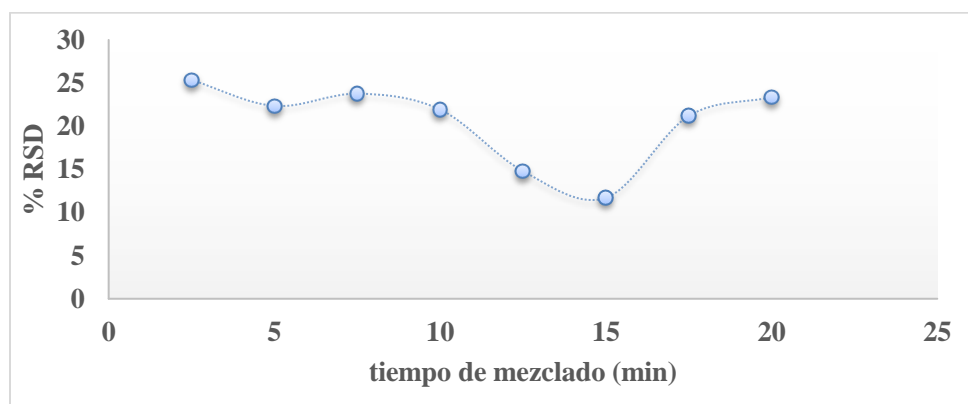


Figura 28. Optimización del tiempo de mezclado en la elaboración de la premezcla alimentaria adicionada con halquinol.

Aunque el coeficiente de variación es grande en la elaboración de la premezcla se puede ver que él es el menor esto es debido a que se tiene mezcla de granos molidos con distinto tamaño, por lo que hay más variación en los tiempos de muestreo.

VI.7. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE HALQUINOL EN CERDOS.

Un estudio farmacocinético consiste en saber que tras la administración de un medicamento se están transfiriendo por unidad de tiempo de un sitio a otro del organismo un determinado número de moléculas, ya sea desde el sitio de absorción a la circulación general o de la circulación general a los diferentes órganos y tejidos o que desaparece de la circulación general porque ha sufrido procesos de biotransformación o eliminación.

Un fármaco no se comporta igual a otro y hallamos que algunos se absorben casi en su totalidad y que de otros solo se absorbe una fracción de la dosis administrada. Algunos se absorben rápidamente y otros lentamente. Algunos presentan una buena distribución y otros ni siquiera salen de la circulación general. Algunos se eliminan rápidamente y otros lentamente. Pero decir mucho o poco, rápido o lento son solo apreciaciones subjetivas cuando lo que en realidad se necesita es disponer de información confiable acerca del comportamiento de un medicamento y que la misma descansa en una base científica y racional.

Uno de los objetivos de la farmacocinética es identificar las variables más importantes que determinan el comportamiento de un medicamento y asignarles un valor numérico, es así como surgen los parámetros farmacocinéticos; tales como las constantes de absorción (k_a) o eliminación (k_{el}), volumen de distribución (V_d) y aclaramiento corporal (Cl) entre otros, no son otra cosa que expresiones numéricas de procesos biológicos y que justamente al tener un valor numérico podemos evaluarlos, compararlos y establecer diferencias. Para realizar la farmacocinética de halquinol en cerdos, se planteó la primera etapa del proyecto, que consistió en el periodo de aclimatación; para lo cual la alimentación fue muy importante, fue necesario asegurar que el alimento que consumieran las unidades experimentales no tuviera antibióticos o algún otro fármaco. Por lo que se analizó previamente con el método desarrollado en la sección VI.1.

VI.7.1. Aclimatación de las unidades experimentales.

Se compraron seis cerdos 6 destetados, de 45 días de nacidos, se pesaron y se dejó que se aclimataran por 5 días, los cerdos se mostraron saludables y sin síntomas de enfermedad o estrés alguno como se muestra en la figura No. 29. Se puede observar la tolva de alimentación y el bebedero, el alimento y agua es ad libitum.



Figura 29. Unidades experimentales en la etapa de aclimatación.

Tabla 66. Identificación, pesos y consumo de alimento de cerdos.

Cerdo	identificación	Peso [Kg]			
		1	Dorsal	11.8	13.8
2	lumbar	9.8	10.2	12.2	18.0
3	nuca	11.7	11.7	13.5	19.2
4	frente	11.3	11.2	14	20.2
5	brazo izquierdo	10.2	10.8	12.2	16.3
6	brazo derecho	9.6	9.2	10.6	16.3
Peso promedio		10.73	11.15	13.02	18.62
Ganancia de peso promedio [Kg]		0	0.42	1.87	5.60
Consumo alimento (g/día/cerdo)		600	800	1 kg	1.3 kg
Edad		45 días	52 días	59 días	65 días

En la tabla 66 se puede ver los pesos de los cerdos al inicio del proyecto recién llegados es decir a los 45 días de edad, es importante mencionar que en la primer semana de aclimatación sólo ganaron en promedio 420 gramos, en la segunda semana de recuperación después del estudio farmacocinético e inicio de la suplementación, ganaron 1.870 Kg y en los últimos 7 días con la suplementación de halquinol ganaron en promedio 5.60 Kg, lo que demuestra la razón por la que se usa como promotor de crecimiento, ya que los cerdos aumentan su capacidad de ganar peso.

Una vez aclimatados, se realizó el estudio farmacocinético, para lo cual se colocó un catéter heparinizado mediante una microcirugía, al día siguiente se administró el halquinol vía oral y se comenzó con las tomas de muestra cómo se presentan en la tabla 67. Para la toma de muestras se sometieron a cirugía para colocar el catéter y facilitar la toma de muestra en el estudio farmacocinético, para lo cual se anestesiaron con Zoletil® 100, como se muestra en la figura 30, es importante mencionar que las unidades experimentales se aislaron en jaulas individuales para evitar se quitaran el catéter.

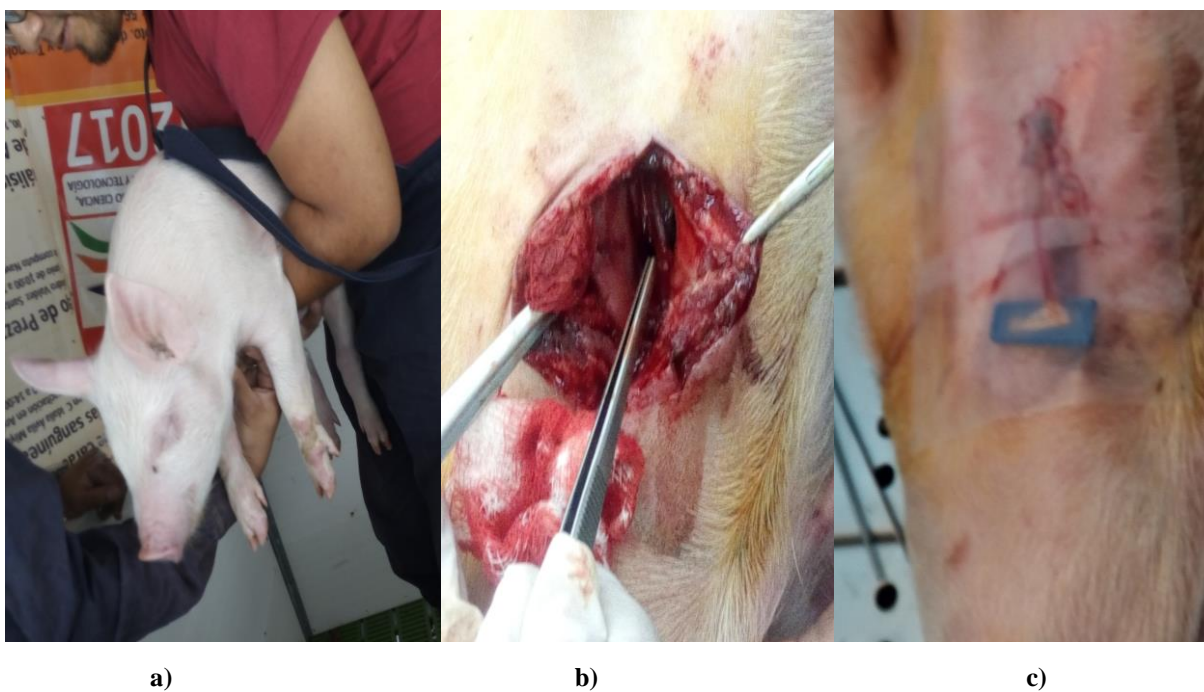


Figura 30. a) Anestesia, b) Vena yugular y c) Fijación del catéter.

En la figura 30 se pueden observar los pasos previos al estudio farmacocinético, que nos garantizó el poder muestrear repetidamente, ocho muestreos en durante 24 horas. En la figura 30 a) se indujo la anestesia con Zoletil® 100, en la figura 30 b) podemos ver la localización de la vena yugular, y en la figura 30 c) se muestra el catéter heparinizado ya colocado y tapado para su posterior utilización en el muestreo.

Tabla 67. Datos de tiempos de muestreo en el estudio Farmacocinético.

Tiempo teórico	t0	t1 (0.5 h)	t2 (1 h)	t3 (1.5 h)	t4 (2 h)	t5 (4 h)	t6 (8 h)	t7 (24 h)
Dorsal	0	0.85	1.82	2.15	3.00	4.87	8.92	24.75
lumbar	0	0.62	1.10	1.60	2.65	4.63	6.60	24.17
nuca	0	0.75	1.52	2.02	2.87	4.75	5.83	24.82
frente	0	0.50	1.02	1.43	2.52	4.48	7.47	24.13
brazo izquierdo	0	0.43	0.93	1.43	2.45	4.42	8.43	24.15
brazo derecho	0	0.53	1.43	1.92	2.75	4.75	8.82	24.12

Las unidades experimentales se dejaron recuperar de la anestesia a cada cerdo en jaulas individuales para evitar que se quiten los catéteres. En la tabla 67 los tiempos de muestreo se realizaron a tiempo inicial 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 8 y 24 horas.

VI.7.2. Determinación de parámetros farmacocinéticos en cerdos.

Se hizo el estudio farmacocinético con 6 cerdos destetados de 11 Kg en promedio, con una dosis única vía oral de 380 mg de Halquinol, equivalente a 54 mg de 5-HQ y 304 mg de 5,7-HQ.

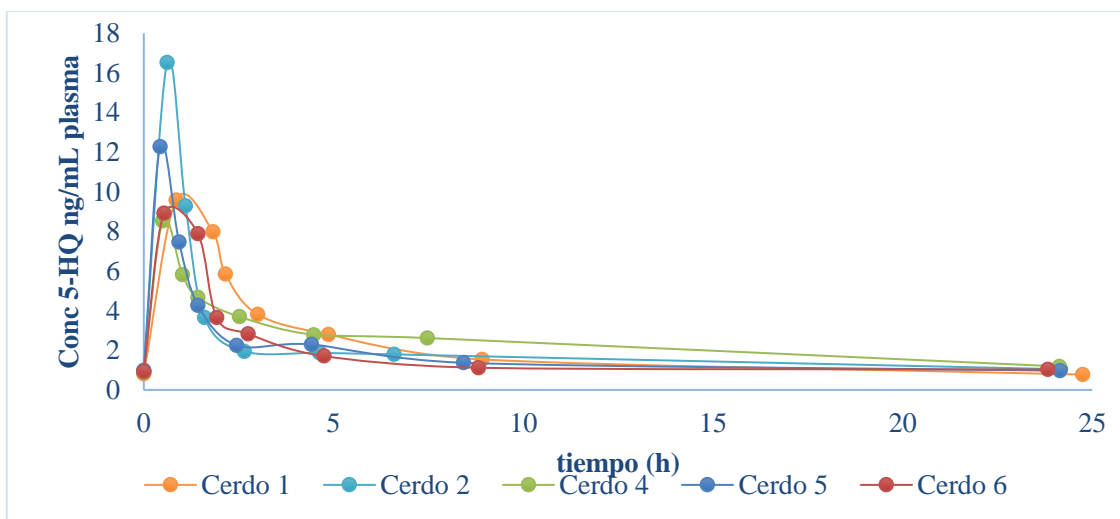


Figura 31. Perfil farmacocinético de 5-HQ en plasma de cerdo.

En el gráfico de la figura 31 y 32 se puede observar el perfil farmacocinético de la 5-HQ y de la 5,7-HQ respectivamente para los seis cerdos, y se puede apreciar que las concentraciones plasmáticas exceden de lo que se esperaba. El halquinol es un antimicrobiano que teóricamente no se absorbe, o al menos eso dicen los distribuidores del producto que lo utilizan como promotor de crecimiento, por lo que inicialmente se planteó desarrollar los métodos para poder detectar cantidades pequeñas del orden de picogramos, de hecho, originalmente incluso se pretendía pre concentrar las muestras de plasma para lograr límites de detección menores. Y como se pueden observar en la figura 31 el orden de concentración para la 5-HQ es de 16 $\mu\text{g/mL}$ y en la figura 32 el orden de concentración es del orden de 2 mg/mL cantidades mayores a las que se esperaban.

Las muestras de sangre fueron obtenidas mediante la colocación de un catéter heparinizado en la vena yugular externa en todos los cerdos en estudio. Dicha técnica nos permitió tomar muestras seriales de sangre sin infligir estrés adicional en estos animales altamente sensibles.

Las concentraciones plasmáticas de halquinol fueron analizadas por metodología UPLC-MS/MS descrita previamente en el apartado VI.2. que muestra el desarrollo y la validación del método.

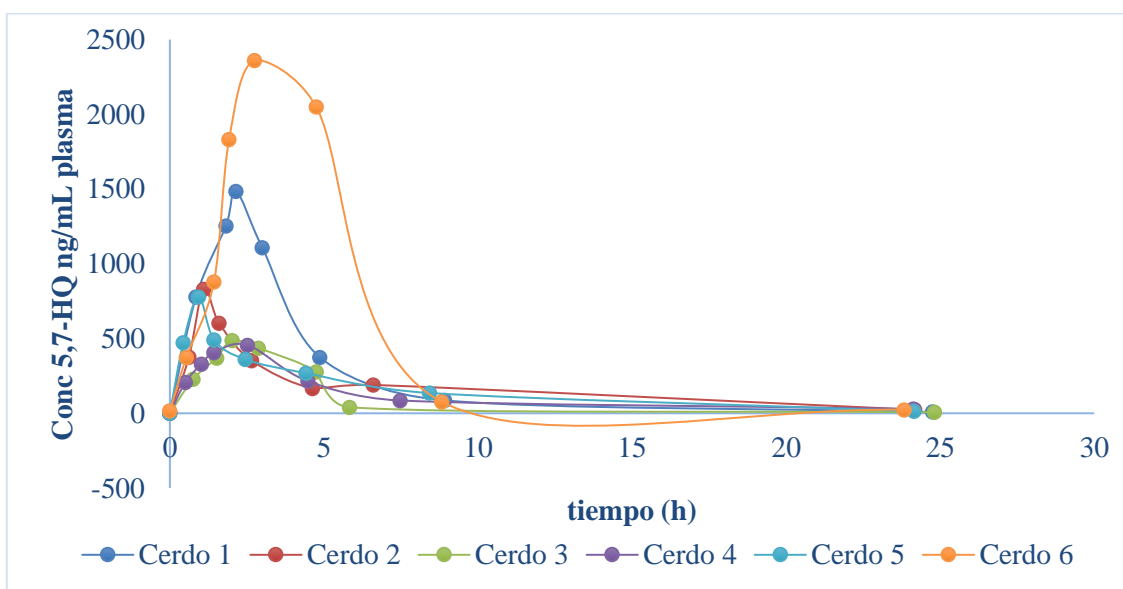


Figura 32. Perfil farmacocinético de 5,7-HQ en plasma de cerdo.

El estudio de la disposición plasmática y biodisponibilidad luego de la administración vía oral de 380 mg de halquinol, equivalente a (5 mg/kg) de 5-HQ y (28 mg/Kg) de 5,7-HQ, en lechones de 50 días de edad, se consideró que fueran destetados, debido a que es un período crítico de estrés en la etapa del lechón que los hace susceptibles a diversas infecciones, por lo que fue de gran importancia que las unidades experimentales se encontraran sanos al momento de comenzar el estudio.

Tabla 68. Parámetros farmacocinéticos de la 5,7-HQ.

UE	C _{máx} (ng/mL)	t _{máx} (h)	K _{el}	t _{1/2} (h)	K _{ab}	ABC _{0-t}	ABC _{0-Cmax}
2	401.3	1.6	0.2237	3.10	0.1607	2318.03	48.8
3	208.8	2.02	0.3358	2.06	0.1972	1781.6	37.2
4	208.3	2.52	0.1964	3.53	0.2422	1240.6	22.3
5	337.7	1.43	0.349	4.05	0.2113	1651.2	44.5
6	347.0	2.75	0.2246	3.09	0.1308	1828	44.7
promedio	300.61	2.06	0.27	3.17	0.19	1763.9	39.5
%RSD	29.11	27.60	26.67	23.09	23.10	21.9	26.5

Las muestras de plasma recolectadas para el estudio farmacocinético se almacenaron por 12 horas a -80° C, e inmediatamente después se analizaron, para evitar que se degradara el halquinol.

Tabla 69. Parámetros farmacocinéticos de la 5-HQ.

UE	C _{máx} (ng/mL)	t _{máx} (h)	K _{el}	t _{1/2} (h)	K _{ab}	ABC _{0-t}	ABC _{0-Cmax}
3	11.72	0.85	0.0277	25.02		58.73	4.71
4	11.59	0.62	0.028	24.75	0.8891	61.56	4.86
5	14.78	0.75	0.0264	30.41		52.67	3.41
6	10.73	0.53	0.0228	30.40		52.78	3.13
promedio	12.20	0.69	0.0262	27.65	0.8891	56.44	4.03
%RSD	14.52	20.51	9.1005	11.51	-	7.86	22.10

Se determinó la desviación estándar relativa (%RSD) o coeficiente de variación de los parámetros farmacocinéticos determinados, se eliminaron algunos datos del cerdo 1 para la 5,7-HQ y para la 5-HQ, los datos del cerdo 1 y 2, para tener menor variación entre 7% y el 29%, como se muestra en la tabla 68 y 69.

Después de la administración de halquinol por vía oral en cerdos, se puede observar que la 5,7-HQ se absorbe y distribuye rápidamente alcanzando una concentración máxima en sangre a las 2 horas y la 5-HQ alcanza esta concentración máxima más rápido aún a los de 41 minutos. Sin embargo, la eliminación de la 5,7-HQ es a las 3.2 horas y para la 5-HQ es de lentamente con una vida media de 3.17 horas para la 5,7-HQ y de 27.64 horas para la 5-HQ. En la tabla 68 y 69 se presentan los resultados de los parámetros farmacocinéticos de ambas hidroxiquinolinas.

VI.8. SUPLEMENTACIÓN DE HALQUINOL EN CERDOS.

Después del muestreo farmacocinético se dejaron descansar durante 5 días y recuperar del estrés generado por la manipulación en la toma de muestras, posteriormente se comenzó a dar la premezcla medicada con halquinol durante 10 días y posteriormente se sacrificaron y se colectaron muestras de hígado, riñón, músculo (lomo) y plasma las cuales se molieron y congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabla 70. Residuos de Halquinol en tejidos de cerdo, a 10 días de tratamiento.

Tejido	Conc. [ng/g] de 5-HQ	Conc. [ng/g] de 5,7-HQ
Plasma [ng/mL]	5.29 a 7.32	68.48 a 104.81
Músculo	1.10 a 4.74	35.03 a 179.22
Riñón	104.05 a 360.58	1084.69 a 2826.89
Hígado	22.68 a 32.10	282.32 a 413.05

Como se puede observar en la tabla 70, las cantidades encontradas de halquinol en las matrices biológicas analizadas es mucho mayor a lo que se esperaba, considerando que según los proveedores de halquinol no se absorbe y no requiere periodo de retiro. El objetivo de este estudio es demostrar si había o no absorción, lo que se evidencia con el estudio farmacocinético; si bien la 5,7-HQ se elimina rápidamente del cerdo, la 5-HQ requiere 27.6 horas para eliminar el 50% del organismo del cerdo. Por lo tanto, es muy importante demostrar que si no tiene periodo de retiro entonces el consumidor estaría ingiriendo esas cantidades por gramo de carne, hígado o riñón, lo que significa que depende de los gramos que consuma será la cantidad de halquinol que estaría ingiriendo indirectamente.

Por lo que en este proyecto nuestro objetivo fue desarrollar técnicas analíticas que permitan cuantificar halquinol en diversos tejidos a nivel de trazas y con ello demostrar que éste antimicrobiano puede llegar a músculo, hígado y riñón, por lo que se dejan las herramientas y las evidencias que demuestran que debe haber un tiempo de retiro porque si se absorbe y ahora ya se conoce el comportamiento de halquinol en cerdos.

VI.8.1. Efecto del halquinol sobre la toxicidad celular de músculo, riñón e hígado.

Durante la etapa experimental ninguno de los especímenes mostró patrones patológicos asociados a enfermedad, lo que se confirma al realizar las necropsias, no obstante, bajo estudio histopatológico se muestran lesiones asociadas de forma independiente a los tratamientos farmacológicos.

Después del ayuno nocturno, las unidades experimentales se pesaron y se sacrificaron en el día 11 con pentobarbital sódico usando una dosis de 80 mg/kg de peso. Se realizó toma de muestra para estudio histopatológico, basándose en un patrón de 4 cortes de 1 cm², 2 en lóbulos laterales derecho y 2 en izquierdo para hígado; zona cortical a medular central (1 cm x 1.5 cm para riñón), y un segmento de 2 cm² de músculo multífido en zona torácica (T4).

Posteriormente de la selección de los tejidos se embebieron en una solución amortiguada de formalina al 10% sin marcaje de bordes de extracción (sin teñir). Las muestras ya fijadas se procesaron en un laboratorio de histotecnología de la FES-Cuautitlán, con un corte de 4 µm de espesor y pigmentadas bajo tinción de hematoxilina y eosina para su posterior observación microscópica. Para evaluar la toxicidad celular se consultó al experto en el área de histopatología el Dr. Juan Omar Hernández Ramírez quien hizo la lectura de las placas de histología.

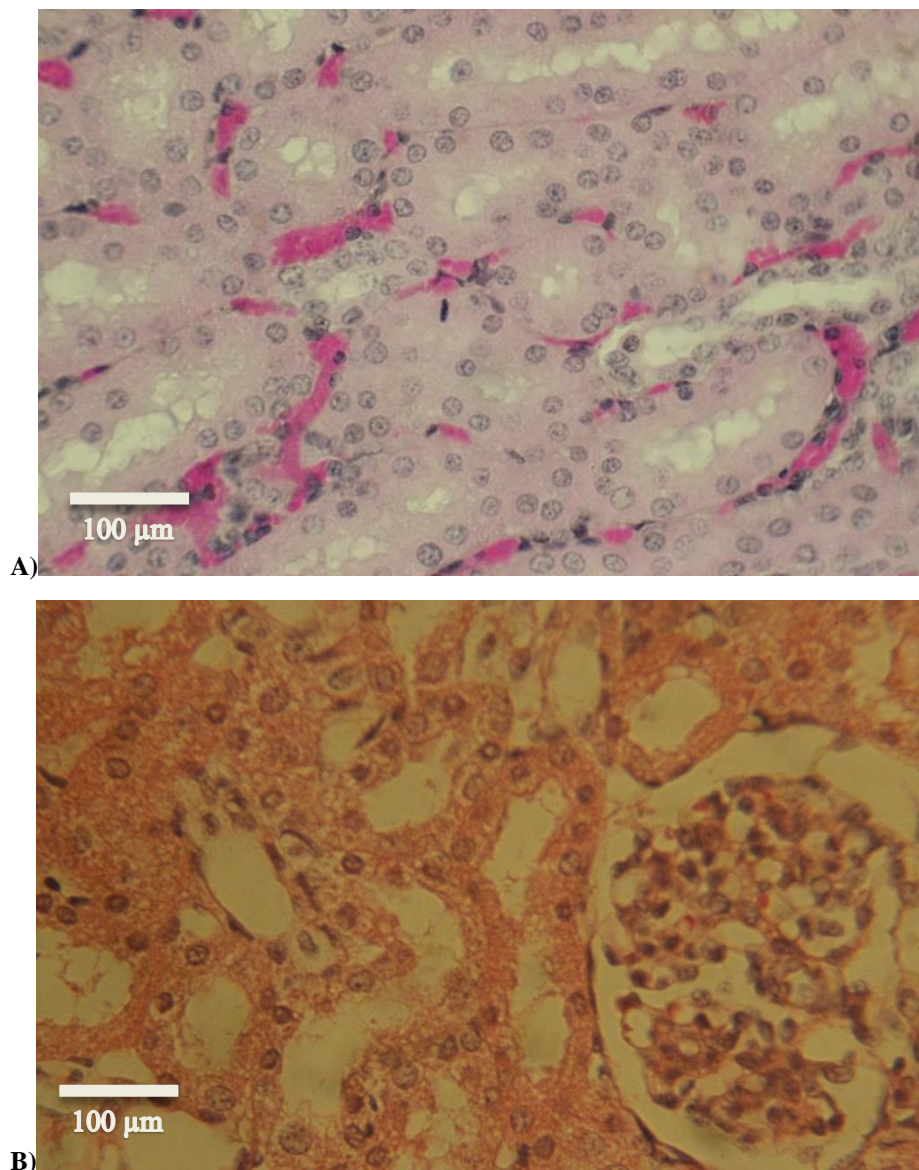


Figura 33. A) Sección de corteza renal 40X de cerdo después 10 días de la suplementación con halquinol y B) sección de corteza renal 40X de cerdo sin tratamiento.

En la figura 33A se observa corte de riñón 40X, en zona cortical en donde se pueden asociar células renales en trastorno degenerativo albuminoso con cambios vasculares moderados (congestión) en la periferia tubular. En la figura 34, se observa corte histológico en zona medular donde se aprecian zonas marcadas por células linfoides periféricas a túbulos (asas de Henle) las cuales presentan un cambio degenerativo moderado (albuminoso); por otra parte en algunos puntos se observa hiperperfusión vascular asociada a las células inflamatorias antes mencionadas.

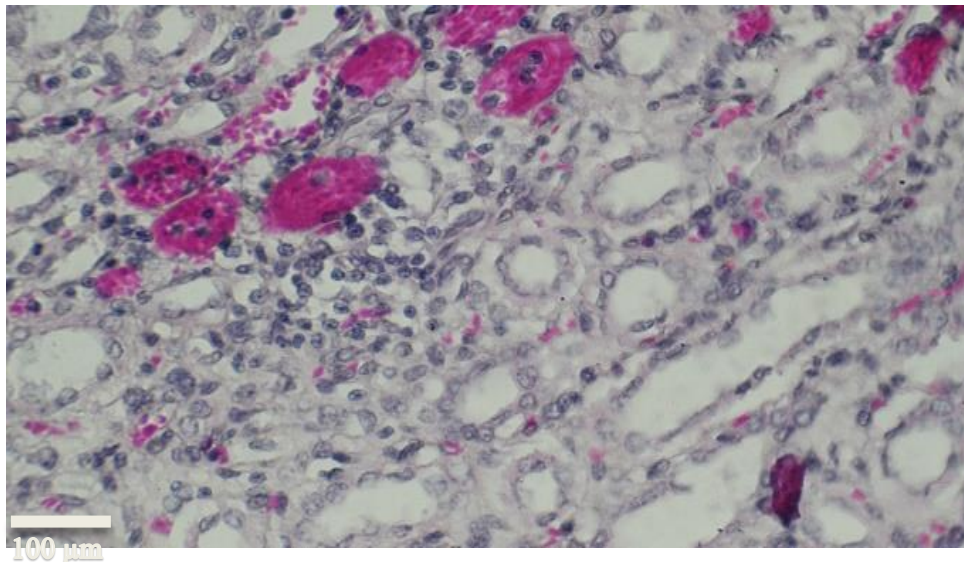
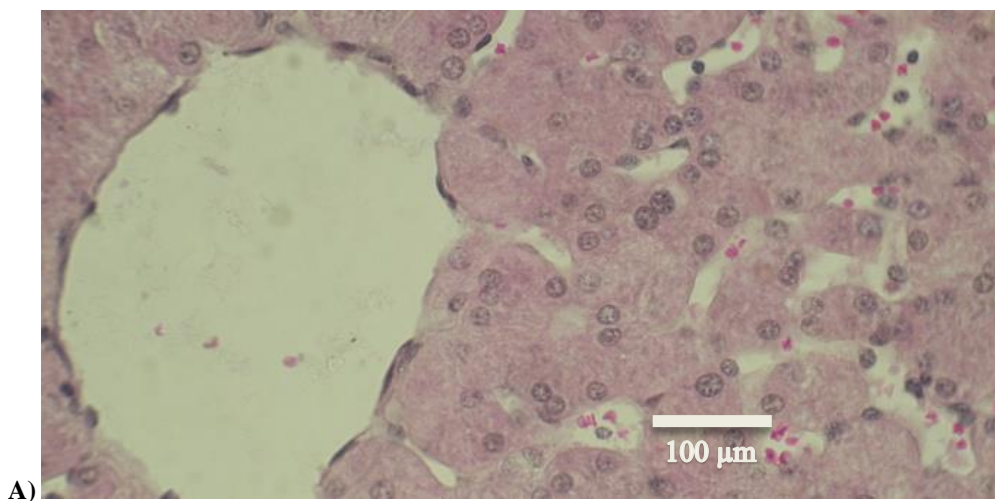
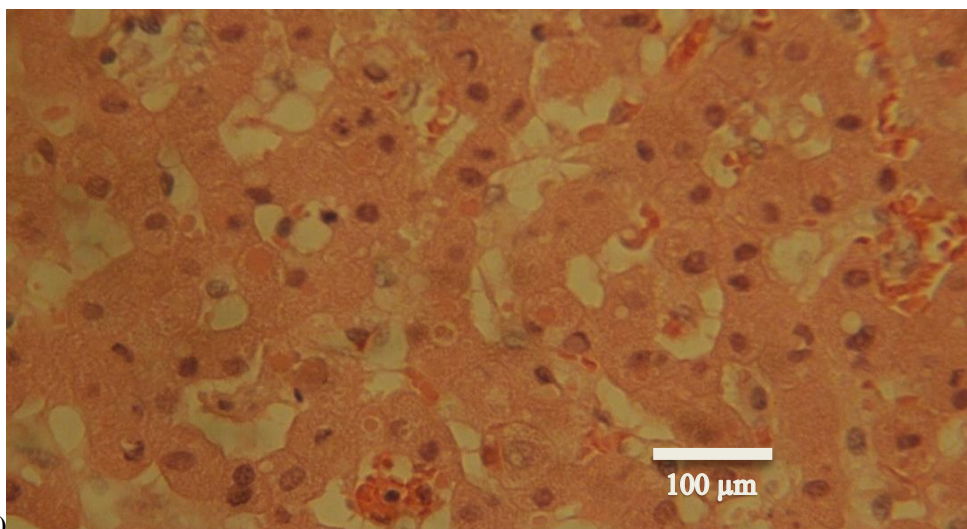


Figura 34. Sección cortico-medular renal 40X de cerdo después de la suplementación con halquinol.



A)



B)

Figura 35. A) Sección centro-lobulillar hepática 40X de cerdo después de la suplementación con halquinol y B) sección parénquima hepático 40X de cerdo sin tratamiento

A la revisión histológica del tejido se puede observar que el tejido hepático presenta un ligero daño degenerativo de tumefacción celular y las sinusoides hepáticas presentan una moderada dilatación haciéndose más evidente en el espacio venoso central como se aprecia en la figura 35.

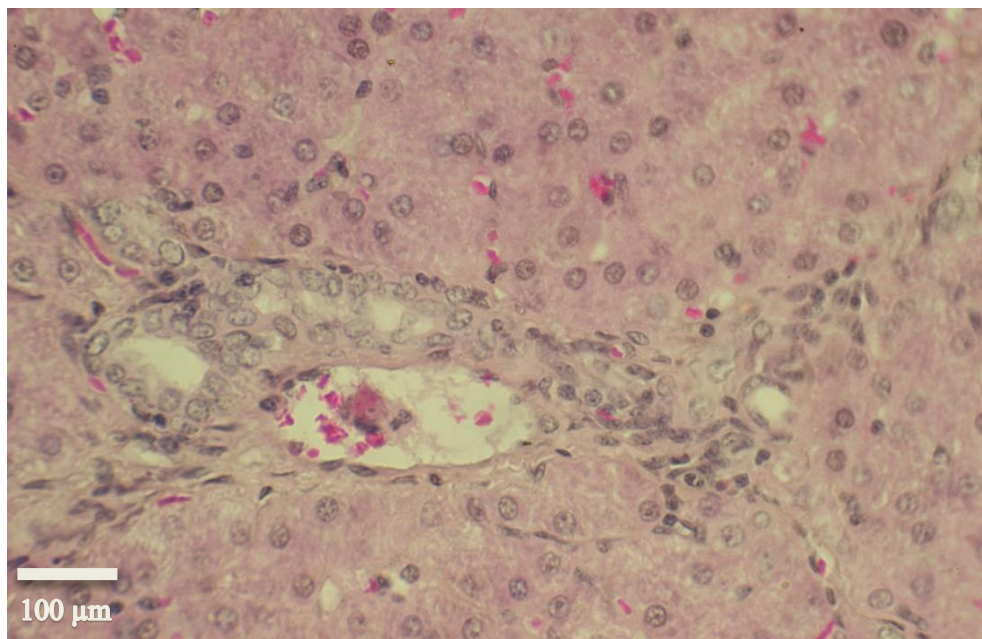


Figura 36. Sección periportal hepática 40X de cerdo después de la suplementación con halquinol.

En la figura 36, de la inspección del órgano se puede observar trazos degenerativos en hepatocitos de forma albuminosa, así mismo la presencia de espacios vasculares dilatados que adjuntos se entrelazan con células linfoides moderadas circundando el espacio portal, por otra parte, e incluyéndose en el mismo paquete tisular la presencia de múltiples conductos biliares algunos de forma desordenada y algunos en células aparentemente blásticas conformando un patrón evolutivo de circulación biliar.

El hígado microscópicamente mostró hiperplasia de conductos biliares severa con necrosis multifocal leve y proceso inflamatorio grado 1, linfoide.

VII. CONCLUSIONES.

En base a los objetivos planteados:

- Se desarrollaron y validaron los métodos analíticos para cuantificar de manera eficaz residuos de 5,7-Dicloro-8-hidroxiquinolina (5,7-HQ) y 5-Cloro-8-hidroxiquinolina (5-HQ) en plasma, musculo, riñón e hígado de cerdo usando UPLC-MS/MS, demostrando que son exactos, precisos, lineales y específicos.
- Los métodos desarrollados para la cuantificación de 5-HQ y 5,7-HQ en las diversas matrices biológicas demostraron sensibilidad, precisión, exactitud, linealidad, menor tiempo de análisis, bajo consumo de solventes, comparado con la extracción en fase solida convencional.
- Se realizó el estudio farmacocinético en cerdos con éxito de 5,7-HQ y 5-HQ y se determinaron los parámetros $C_{m\acute{a}x}$, $t_{m\acute{a}x}$, ABC, K_{ab} , K_{el} , $t_{1/2}$, cuyas constantes no se habían reportado antes.
- El análisis de muestras de plasma, músculo, hígado y riñón colectadas después de la suplementación en cerdos, demostraron que el halquinol se encuentra en todos los tejidos incluso en músculo y esto no se había reportado antes, por lo que se recomienda establecer periodos de retiro.
- Se desarrolló y validó un método para cuantificar 5-HQ y 5,7-HQ en mezclas alimentarias, demostrando que es selectivo, sensible, preciso y exacto; para el análisis de muestras de estabilidad y como método rutinario en el análisis de 5-HQ y 5,7-HQ en alimento de cerdo.
- Los estudios de degradación forzada demostraron que 5,7-HQ es más susceptible a la degradación que 5-HQ con peróxido de hidrógeno porque las recuperaciones son más bajas que 5,7-HQ, pero 5-HQ es más susceptible que 5,7-HQ al ácido clorhídrico, y, específicamente, la luz UV fue un método que degradó la mayoría de ambos analitos.
- Se analizaron las placas de los cortes histopatológicos de músculo, hígado y riñón después de la suplementación en cerdos las que sugieren susceptibilidad en hígado y riñón a la exposición por halquinol
- Se publicó el artículo “Validation of a UPLC-PDA method to study the content and stability of 5-chloro 8-hydroxyquinoline and 5,7-dichloro 8-hydroxyquinoline in medicated feed used in swine farming” en la revista *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.

VIII. PERSPECTIVAS

En el presente proyecto se sientan las bases para cuantificar halquinol en tejidos biológicos provenientes del cerdo mediante métodos de micro-extracción en fase sólida y UPLC-MS/MS específicamente para cuantificar 5-HQ y 5,7-HQ en plasma, hígado riñón y músculo, por lo que se dejan las herramientas para abrir una nueva línea de investigación en LEDEFAR-FESC y brindar un servicio para apoyar a distribuidores de éste fármaco y que ante SADER debería realizar el estudio de depleción de residuos de su producto y demostrar los periodos de retiro.

En el presente proyecto, faltó realizar el estudio de depleción de residuos; debido a que, para ello, se necesitaban al menos 20 cerdos, los recursos, tiempo y espacios no fueron suficientes además de que no era el objetivo principal de este proyecto. Pero mejor aún se han planteado las estrategias analíticas para realizar los estudios de depleción de residuos con todas las unidades experimentales necesarias.

Los métodos desarrollados pueden ser aplicados como métodos de rutina para evaluar:

- a) contenido químico en materia prima, b) en mezclas alimentarias, c) en plasma de cerdo, d) en tejidos biológicos como músculo, hígado y riñón.

El presente proyecto demuestra la importancia en la estimación del riesgo asociado a la exposición de este tipo de fármacos; por lo que se sientan las bases continuar el estudio biológico desde el punto de vista de la toxicidad.

IX. REFERENCIAS.

1. Errecalde, J. 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. pp 67.
2. <https://sinaem.agemed.es/lmrs/consultas.aspx?Idioma=ES>, consultado en febrero de 2015.
3. Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals, Food and Drug Administration Department of Health and Human Services, septiembre, 2014
4. <http://www.fao.org/3/y7300s/y7300s06a.htm>, consultado en marzo de 2015.
5. Standard 1.4.2 Food Standards as amended, taking into account amendments up to Australia New Zealand Food Standards Code Standard 1.4.2 Maximum Residue Limits Amendment Instrument No. APVMA 2, 2015. http://www.comlaw.gov.au/Details/F2015C00185/Html/Volume_2, consultado en marzo de 2015.
6. The Japan Food Chemical Research Foundation, Maximum Residue Limits (MRLs) List of Agricultural Chemicals in Foods. <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html>, consultado en marzo del 2015.
7. ACUERDO por el que se establecen los criterios para determinar los límites máximos de residuos tóxicos y contaminantes, de funcionamiento de métodos analíticos, publicado en el Diario Oficial el 9 de octubre del 2014. <http://www.sagarpa.gob.mx>.
8. B. Cancho Grande, M. S. García Falcón & J. Simal Gándara (2000) El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual, Ciencia y Tecnología Alimentaria, 3:1, 39-47, DOI: 10.1080/11358120009487647 Consultado en enero del 2015, <http://dx.doi.org/10.1080/11358120009487647>.
9. Botsoglou N A, Fletouris D J (2001). Drugs residues in foods, pharmacology, food safety and analysis. Edición N° 1. New York (Basel), USA. Editorial Marcel Dekker.
10. ACUERDO por el que se modifica el diverso por el que se establece la clasificación y prescripción de los productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos, publicado el 5 marzo de 2012. <http://www.sagarpa.gob.mx>
11. Comisión del codex alimentarius. Revisión de los criterios basados en el rendimiento de los métodos de análisis para los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos.

- <http://www.codexalimentarius.org/codex-home/es/>.
12. Grupo de Investigación Medicamentos en Salud Pública: Acceso, Uso y Resistencia Antimicrobiana del Instituto Nacional de Salud Pública. 2010. Regulación y promoción para el uso adecuado de antibióticos en México. Propuesta de lineamientos para la acción.
 13. <http://www.senasica.sagarpa.gob.mx>, consultado en febrero del 2015
 14. Grupo de Investigación Medicamentos en Salud Pública: Acceso, Uso y Resistencia Antimicrobiana del Instituto Nacional de Salud Pública. (2010)
 15. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2009/11/WC500008770.pdf , consultado en febrero del 2015.
 16. Services, H. (2010). Guidance for Industry Studies to Evaluate the Metabolism and Residue Kinetics of Veterinary Drugs in Studies to Establish Product Withdrawal Periods, consultado en marzo de 2015.
 17. J.E. Fairbrother, W.F. Heyes, (1973). The determination of chlorhydroxyquinoline in medicated pig feeds, *Analyst* 98 797–801, <http://dx.doi.org/10.1039/AN9739800797>.
 18. D. R. Williams, A. G. Croft, et al., (1978). Analytical Methods Committee Identification of Prophylactic and Growth-promoting Drugs in Animal Feedingstuffs. *Analyst*, 103 513-520.
 19. Hatfull, S. (1981). Determination of Halquinol (Chloroquinolin-8-01s) in Pre-mixes and Medicated Feeding Stuffs. 106, 105–113.
 20. Mohan, K., Prakash, N., Shuaib, A., Pavithra, B., Jayakumar, K., & Bhat, A. (2011). Determination of 5,7-dichloroquinolin-8-ol and 5-chloroquinolin-8-ol in bulk drug powder and pharmaceutical preparation by TLC. *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), 47. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79350>
 21. DEVI.V, A. (2012). RP-HPLC Method for Quantitative Estimation of Halquinol in Pharmaceutical Dosage Forms. *Eurasian J Anal Chem* 7(1): 7-12.
 22. Aty, A. M. A. El. (2018). Determination of halquinol residual levels in animal - derived food products using liquid chromatography – tandem mass spectrometry. (May), 1–8. <https://doi.org/10.1002/bmc.4339>.
 23. Elisa, I., Arres, A., Cubarsí, M. G., Pérez/, A. G., Errecalde, J. O., Veterinario, M., Supplier, C. (2012). Regulatory considerations in veterinary toxicology. *Journal of*

- Chromatography A, 6(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/B978-012370467-2/50104-8>.
24. Sw, R., J, K., N, M., Shr, N. B., & Rao, S. (2007). Organ directed toxicity of halquinol in a repeated dose 28-day oral toxicity study in female rats Swetha R, Jayakumar K, Narayanaswamy M, Shridhar N B, Sanganal J, Rao S - Indian J Pharmacol. 39(2), 97–103.
 25. Grazyna Karpinska, Aleksander P. Mazurek, Jan Cz. (2010) On tautomerism and substituent effect in 8-hydroxyquinoline-derived medicine molecules. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM 961. 101–106.
 26. Abhilekha P.M., Shiva Kumar, Shardamma K.C. (2012). Metabolism of Halogenated Hydroxyquinolines. International Journal of Applied Chemistry 8, (2) 79-92. ISSN 0973-1792
 27. F. and D. A. FDA, Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. 2001.
 28. ICH, Guidance for Industry. Validation of Analytical procedures: Methodology, (1999) 4–14. <http://www.regulations.gov.http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/default.htm>.
 29. VICH, Guidance for Industry Stability Testing of New Veterinary Drug Substances and Medicinal Products (Revision), 3 (2010) 21. <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/ucm052387.pdf>.
 30. G. Ngwa, Forced degradation as an integral part of HPLC stability-indicating method development, Drug Deliv. Technol. 10 (2010) 56–59.
 31. S. Venkataraman, M. Manasa, (2018). Review Article Forced degradation studies: Regulatory guidance, characterization of drugs, and their degradation products - a review, 10.
 32. E. Of, Stability testing of Drugs, ICH Guid. (2003). doi:10.1136/bmj.333.7574.873-a.
 33. USP-NF, First Supplement to USP 40–NF 35, United States Pharmacopeia. Natl. Formule. (USP 40-NF 35). (2017) 621:1-12.
 34. U.K. Chhalotiya, K.K. Bhatt, D.A. Shah, (2014) Original article Quantification of Clioquinol in Bulk and Pharmaceutical Dosage Forms by Stability Indicating LC Method, 11 67–78.
 35. CVM, Guidance for Industry stability testing for medicated premixes VICH GL8, n.d.

<http://www.regulations.gov>, consultado en diciembre de 2018.

36. Comisión del codex alimentarius. Revisión de los criterios basados en el rendimiento de los métodos de análisis para los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos.
37. VICH GL 1 Validation of analytical procedures: Definition and terminology

X. ANEXOS

X.1. - Artículo publicado.

Título: Validation of a UPLC-PDA method to study the content and stability of 5-chloro 8-hydroxyquinoline and 5,7-dichloro 8-hydroxyquinoline in medicated feed used in swine farming.

Revista: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

DOI: 10.1016/j.jpba.2018.12.037

Editorial: Elsevier.

X.2. – Validación del método de estabilidad de las premezclas alimentarias.

X.2.1 Cromatogramas del método de estabilidad.

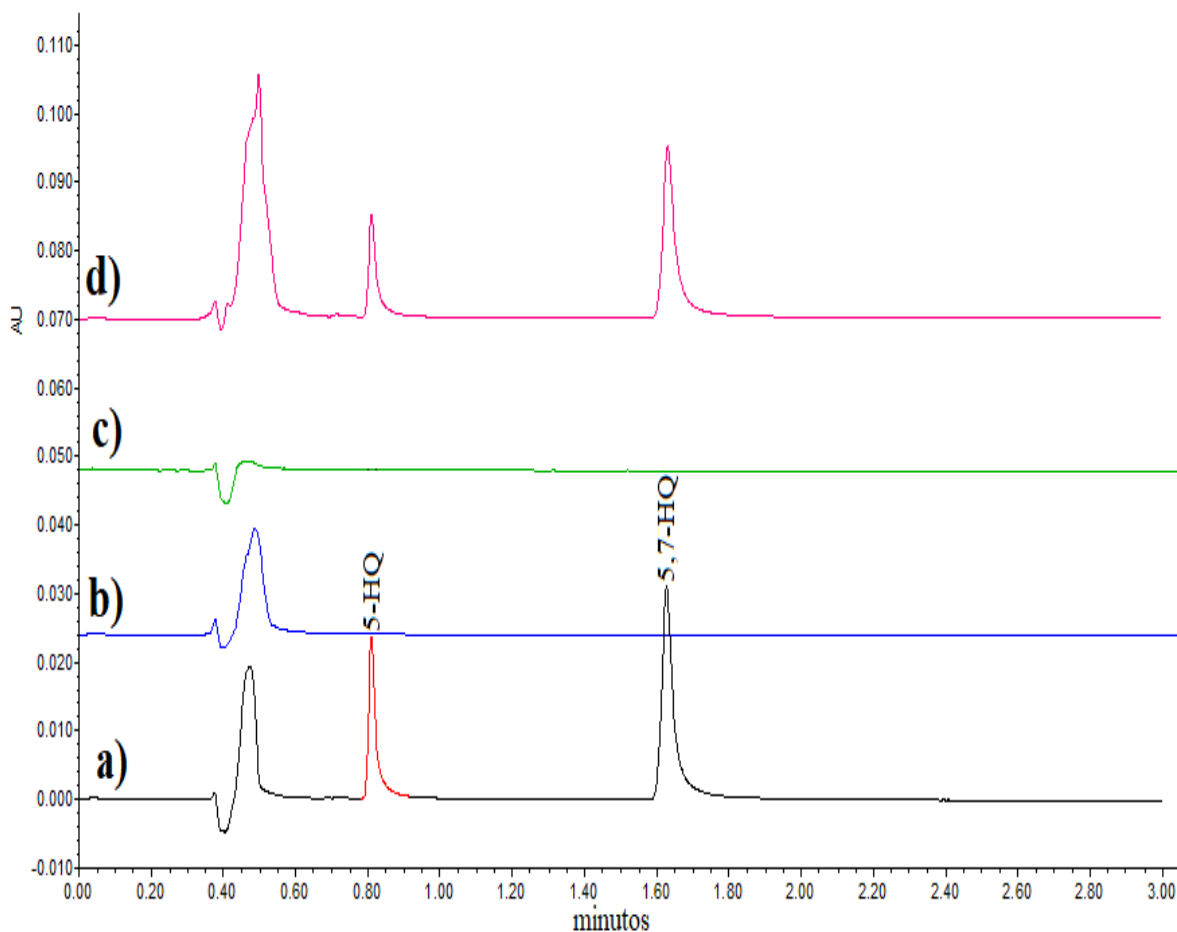


Figura 37 Cromatogramas de a) estándar de halquinol, b) alimento de cerdo, c) blanco de solvente y d) premezcla alimentaria medicada con halquinol.

X.2.2 – Linealidad del sistema.

Tabla 71. Linealidad del sistema para los picos mayoritarios de halquinol.

Concentración (ng/mL)		Área	
5-HQ	5,7-HQ	5-HQ	5,7-HQ
110.8322	359.726925	18222	36161
110.8322	359.726925	17869	35732
110.8322	359.726925	17352	35819
221.6644	719.45385	37118	73067
221.6644	719.45385	36304	73780
221.6644	719.45385	35535	72973
332.4966	1079.180775	55878	111156
332.4966	1079.180775	54068	108265
332.4966	1079.180775	53423	110139
443.3288	1438.9077	74017	147109
443.3288	1438.9077	72498	149294
443.3288	1438.9077	70954	146749
554.161	1798.634625	92502	179958
554.161	1798.634625	90905	175997
554.161	1798.634625	89224	178107
664.9932	2158.36155	111240	221003
664.9932	2158.36155	108845	225986
664.9932	2158.36155	107257	223987

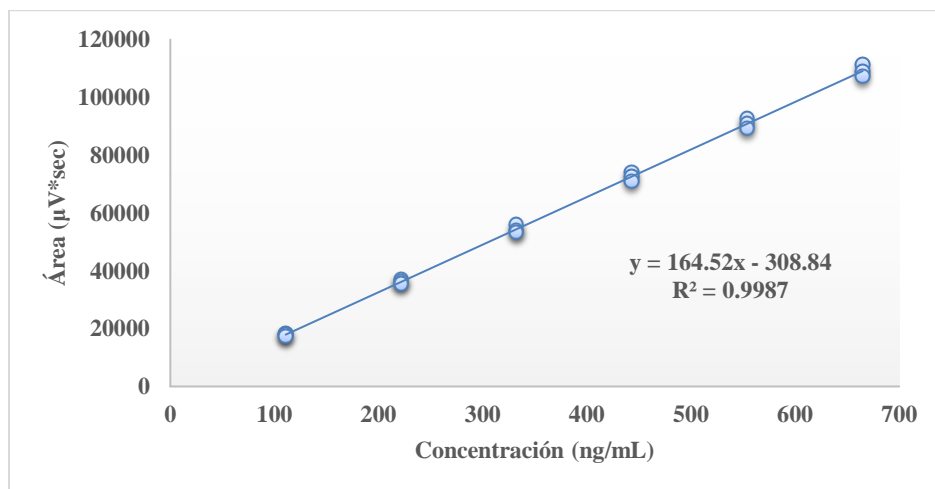


Figura 38 Linealidad del sistema para 5-HQ.

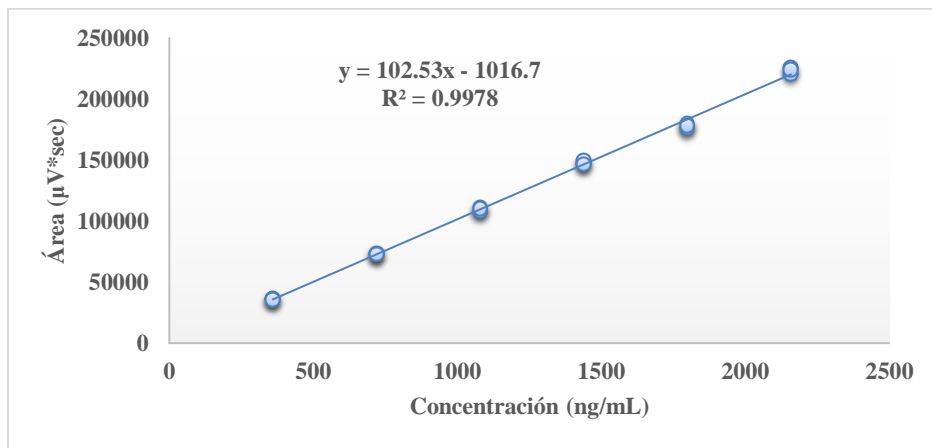


Figura 39. Linealidad del sistema para 5,7-HQ.

X.2.3. – Linealidad del método.

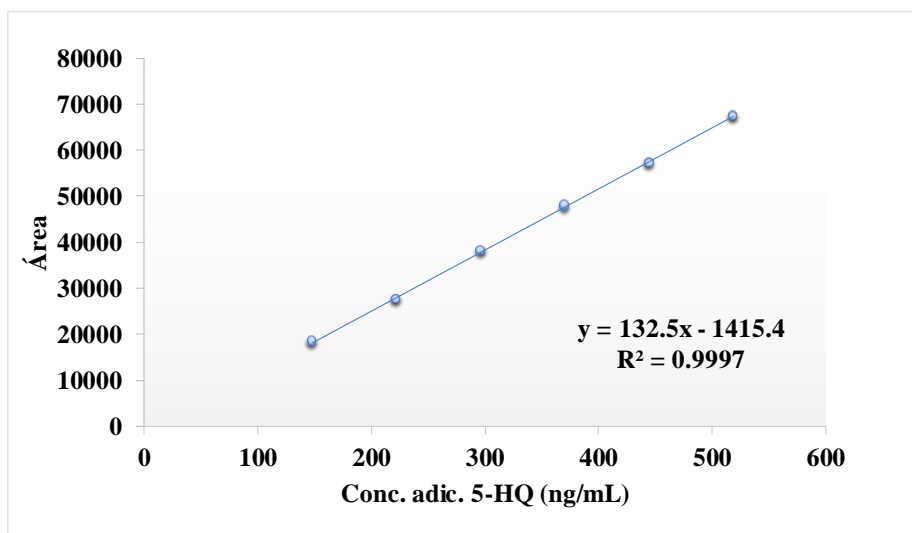


Figura 40. Linealidad del método para 5-HQ usando como matriz alimento para cerdos.

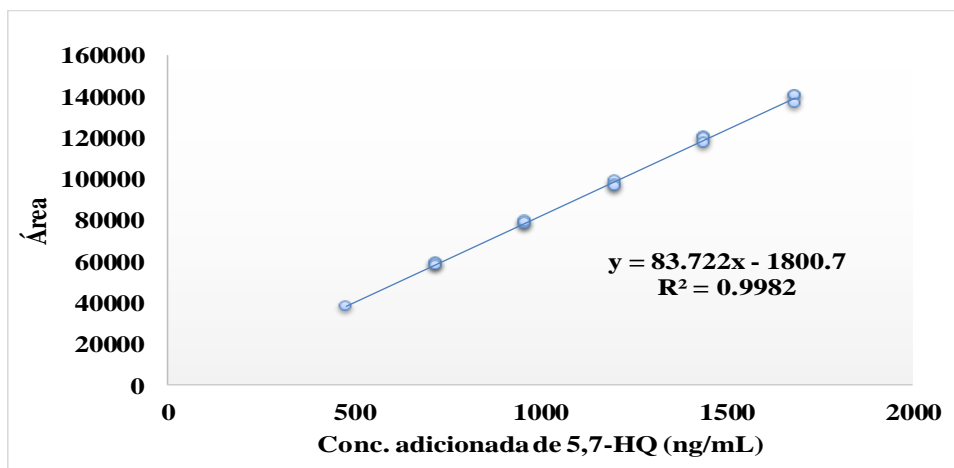


Figura 41. Linealidad del método para 5,7-HQ usando como matriz alimento para cerdos.

Tabla 72. Linealidad del método para 5-HQ.

% 5-HQ	Concentración 5-HQ (ng/mL)		Recobro (%)
	Adicionada	Estimada	
70	148.18	149.30	100.76
	148.18	148.97	100.53
	148.18	150.63	101.65
80	222.27	218.65	98.37
	222.27	218.94	98.50
	222.27	218.77	98.42
90	296.37	297.89	100.51
	296.37	298.19	100.62
	296.37	298.70	100.79
100	370.46	370.83	100.10
	370.46	371.53	100.29
	370.46	373.60	100.85
110	444.55	441.28	99.26
	444.55	443.76	99.83
	444.55	442.13	99.46
120	518.64	519.13	100.09
	518.64	520.14	100.29
	518.64	518.81	100.03
Porcentaje de recobro			
Promedio del porcentaje de recobro			99.8265
CV del porcentaje de recobro			0.3959
Relación concentración adicionada vs la concentración estimada			
Ecuación			$y = 1x + 0.0004$
r²			0.9997
CV_{y/x}			0.5957
IC (β₀) Límite inferior			-3.2724
IC (β₀) Límite superior			3.2724
IC (β₁) Límite inferior			0.9908
IC (β₁) Límite superior			1.0091

Tabla 73. Linealidad del método para 5,7-HQ.

% 5,7-HQ	Concentración 5,7-HQ (ng/mL)		Recobro (%)
	Adicionada	Estimada	
70	480.9	482.4	100.3
	480.9	481.9	100.2
	480.9	481.1	100.0
80	721.4	729.3	101.1
	721.4	720.7	99.9
	721.4	717.4	99.4
90	961.9	957.6	99.5
	961.9	978.5	101.7
	961.9	962.7	100.1
100	1202.4	1209.5	100.6
	1202.4	1184.8	98.5
	1202.4	1173.8	97.6
110	1442.9	1464.7	101.5
	1442.9	1453.8	100.7
	1442.9	1424.3	98.7
120	1683.3	1699.5	100.9
	1683.3	1653.4	98.2
	1683.3	1703.3	101.2
Promedio del porcentaje de recobro			100.2
CV del porcentaje de recobro			1.38
Relación concentración adicionada vs la concentración estimada			
Ecuación			$y = 1x + 0.0002$
r²			0.9987
CV_{y/x}			1.4024
IC (β₀) Límite inferior			-22.39
IC (β₀) Límite superior			22.39
IC (β₁) Límite inferior			0.9806
IC (β₁) Límite superior			1.0193

X.2.4. –Precisión intermedia (Reproducibilidad).

Tabla 74. Porcentajes de recobro de 5-HQ y 5,7-HQ analistas diferentes

Analista	A1/D1 (5-HQ)	A2/D1 (5-HQ)	A1/D1 (5,7-HQ)	A2/D1 (5,7-HQ)
Nivel	% Recobro	% Recobro	% Recobro	% Recobro
80	98.19	98.02	100.88	99.73
80	99.89	98.02	102.49	100.18
80	99.60	99.135	99.80	98.80
80	98.14	98.93	101.49	101.32
80	98.30	99.71	101.14	99.04
80	98.23	99.04	99.72	99.33
100	99.15	98.31	102.01	100.78
100	99.14	99.45	99.88	100.44
100	99.71	98.20	99.72	100.30
100	99.52	98.90	101.49	100.51
100	99.35	98.44	100.68	101.77
100	98.76	99.64	96.21	99.87
120	99.64	99.66	100.71	100.65
120	100.82	99.12	101.75	102.23
120	100.06	99.66	102.24	101.01
120	99.74	99.13	101.72	101.49
120	100.34	99.06	102.35	100.14
120	98.65	100.38	98.29	100.79
Promedio	99.23	98.95	100.68	100.40
Desv. Est.	0.786	0.618	1.545	0.963
% CV	0.792	0.625	1.534	0.959

X.3. – Cortes histológicos de todas las unidades experimentales.

Tabla 75. Cortes Histológicos de riñón cerdos, después de suplementación de halquinol.

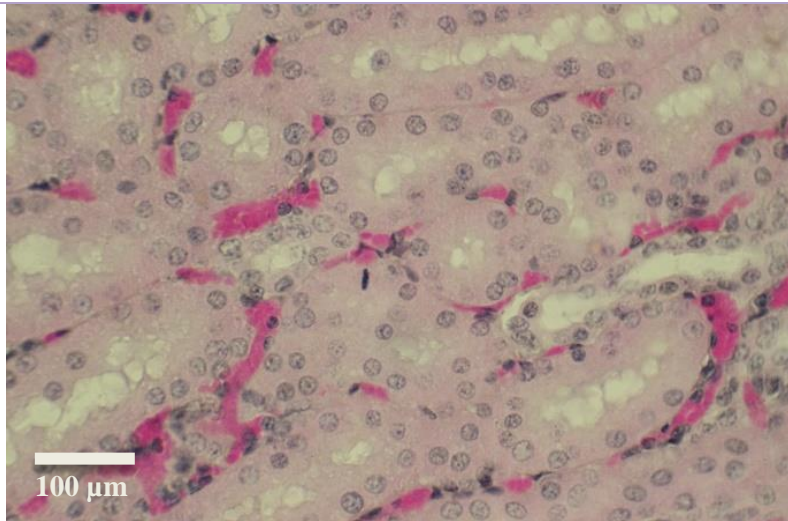
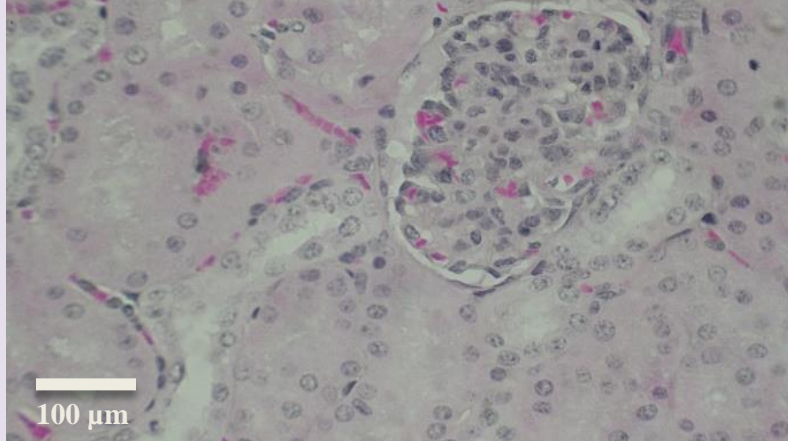
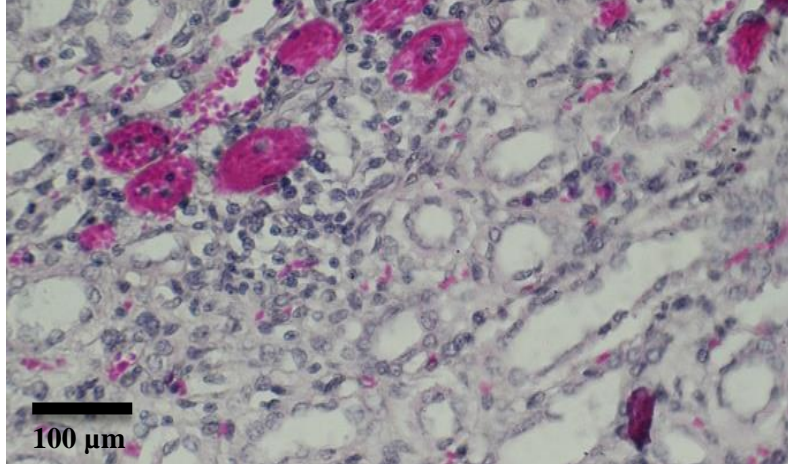
<p>RIÑÓN 40X H.E. Zona cortical. Mostrando degeneración albuminosa y congestión renal moderada.</p>	
<p>RIÑÓN 40X H.E. Zona cortical. Mostrando degeneración albuminosa y congestión renal leve.</p>	
<p>RIÑÓN 40X H.E. Zona medular. Mostrando degeneración albuminosa y congestión renal severa e inflamación intersticial moderada.</p>	

Tabla 75. Continuación.

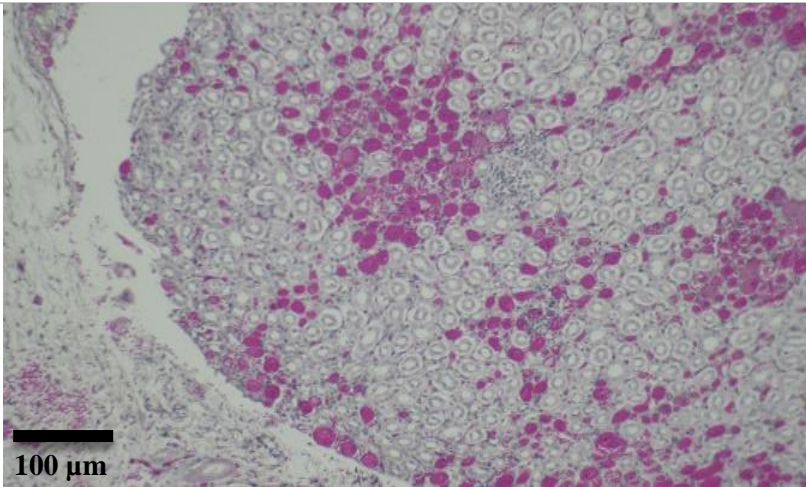
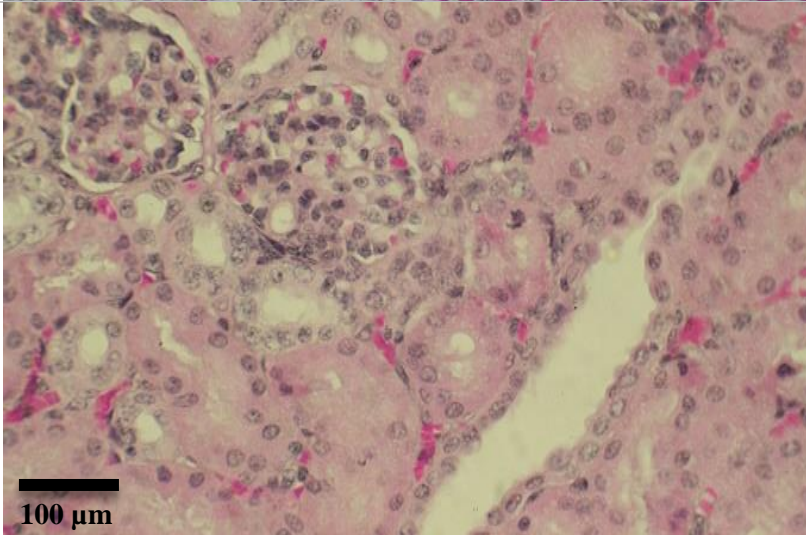
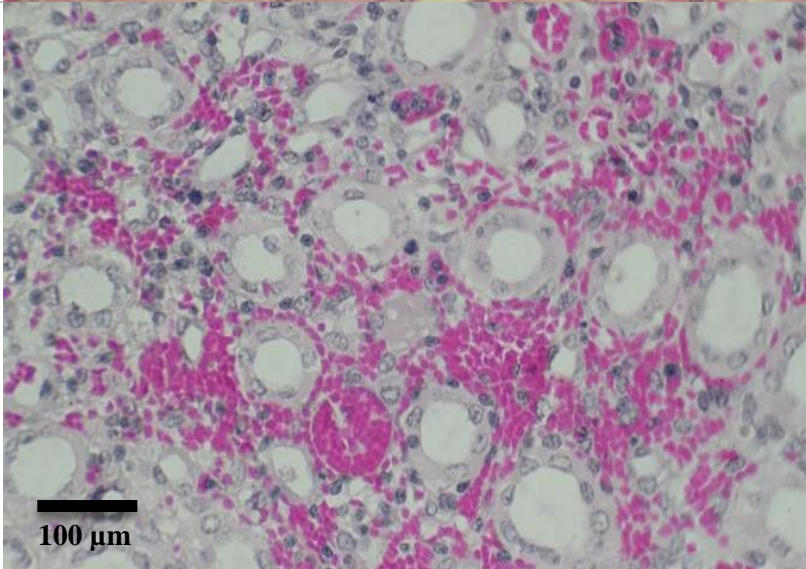
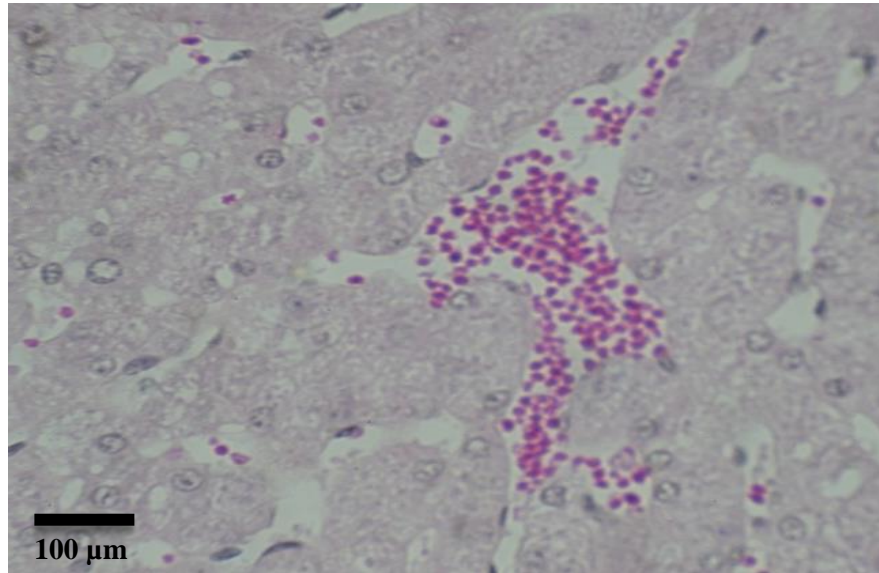
<p>RIÑÓN 10X H.E. Zona medular. Mostrando degeneración albuminosa y congestión renal severa y algunos focos hemorrágicos leves.</p>	 <p>100 μm</p>
<p>RIÑÓN 40X H.E. Zona cortical. Mostrando degeneración albuminosa y congestión renal moderada.</p>	 <p>100 μm</p>
<p>RIÑÓN 40X H.E. Zona medular. Mostrando degeneración albuminosa y congestión renal severa y algunos focos hemorrágicos severos, además de algunas células inflamatorias infiltradas en el intersticio.</p>	 <p>100 μm</p>

Tabla 76. Cortes Histológicos de hígado cerdos, después de suplementación de halquinol.

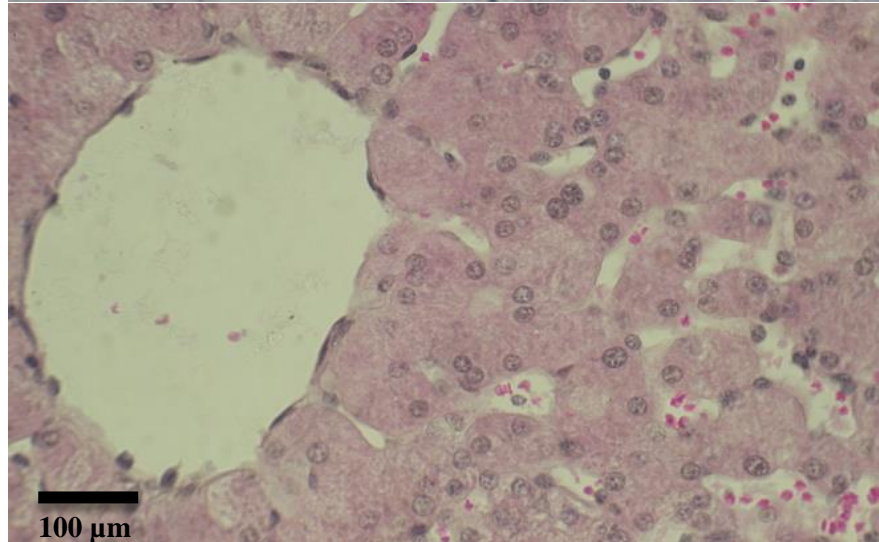
HÍGADO 40X H.E.

Parénquima.
Mostrando
degeneración
albuminosa y
congestión
moderada.



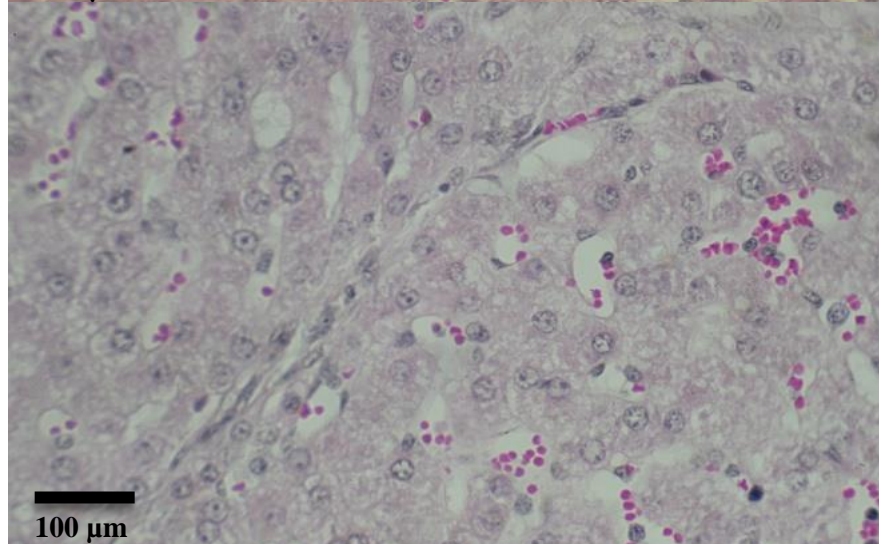
HÍGADO 40X H.E.

Parénquima.
Mostrando
degeneración
albuminosa y
congestión
moderada.



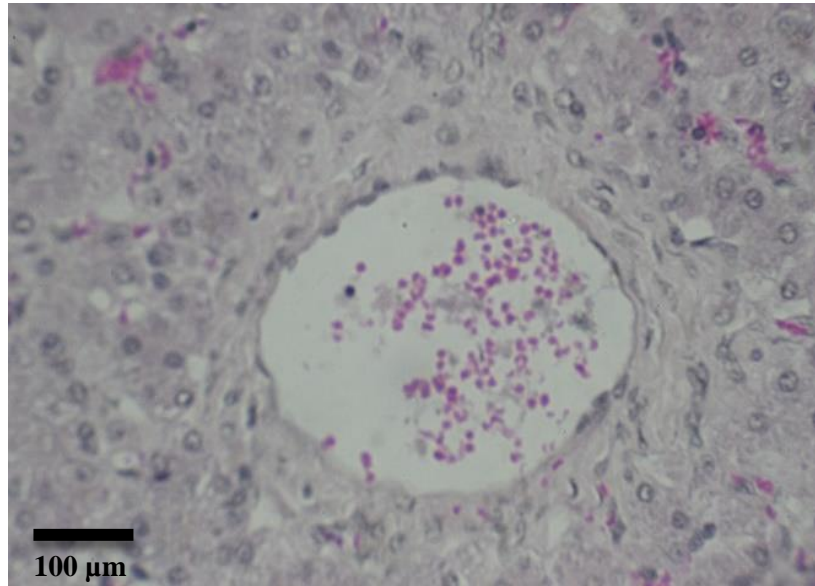
HÍGADO 40X H.E.

Parénquima.
Mostrando
degeneración
albuminosa y
congestión
moderada.

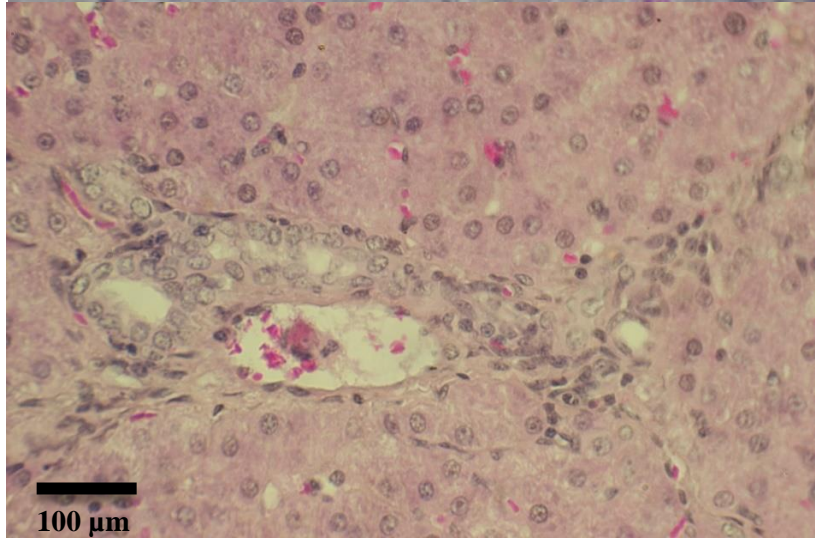


Continuación Tabla 76. Cortes Histológicos de hígado cerdos.

HÍGADO 40X H.E.
 Parénquima.
 Mostrando degeneración
 albuminosa y
 congestión moderada.



HÍGADO 40X H.E.
 Parénquima.
 Mostrando degeneración
 albuminosa y
 congestión moderada,
 mostrando infiltrado
 linfoide periportal,
 además de encontrar
 figuras tubulares biliares
 en crecimiento.



HÍGADO 40X H.E.
 Parénquima.
 Mostrando degeneración
 albuminosa y
 congestión moderada.

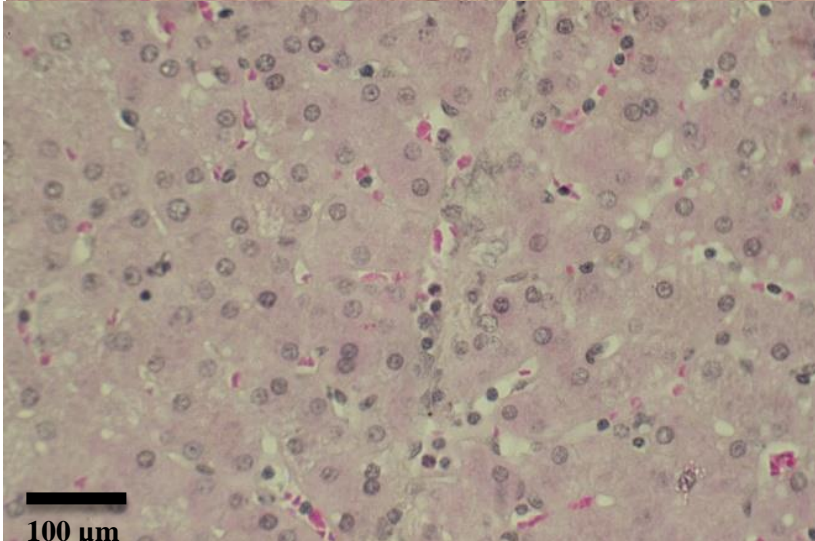
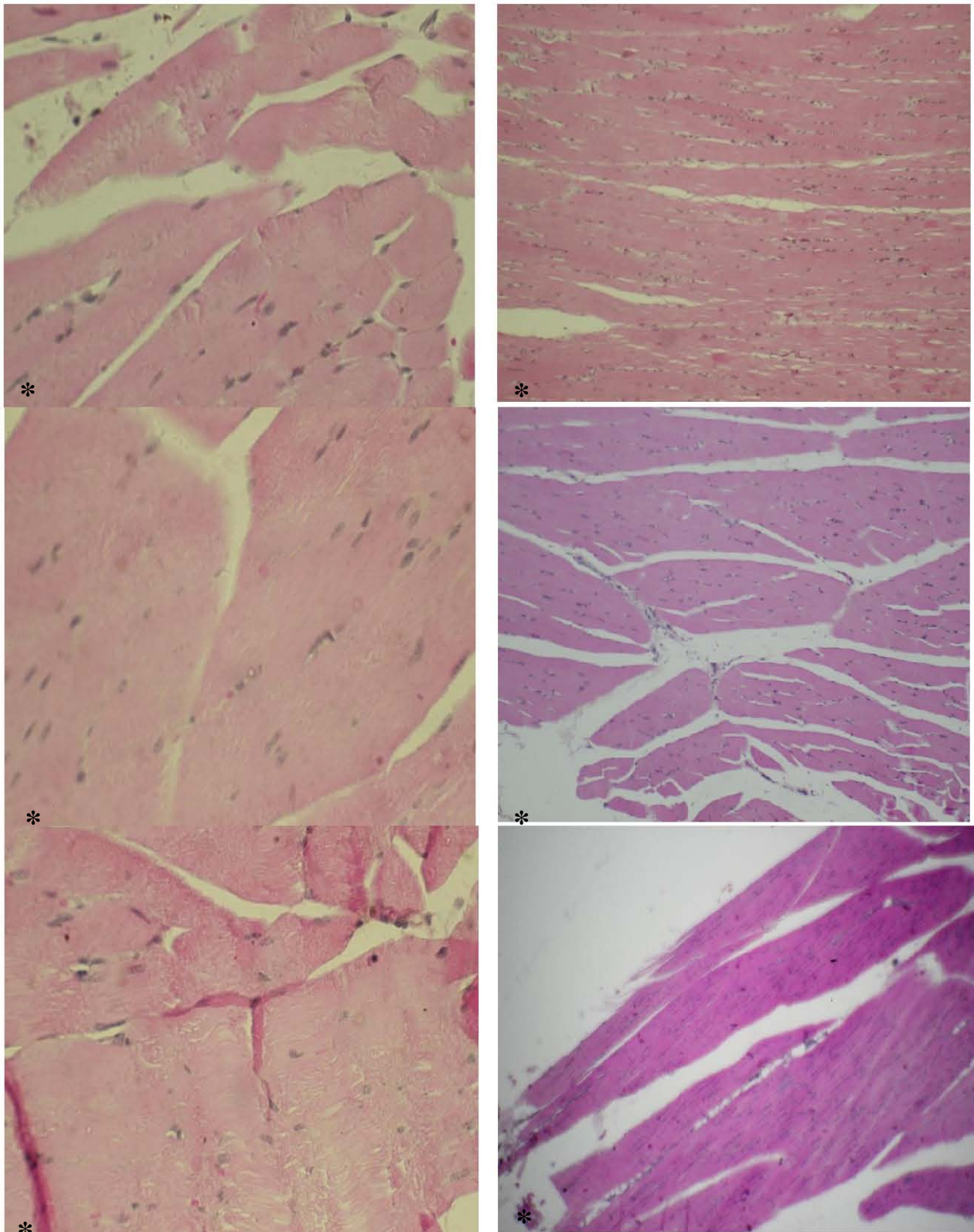


Tabla 77. Cortes histológicos de músculo cerdos, después de suplementación de halquinol.



*Sin cambios patológicos aparentes.



Validation of a UPLC-PDA method to study the content and stability of 5-chloro 8-hydroxyquinoline and 5,7-dichloro 8-hydroxyquinoline in medicated feed used in swine farming

Castillo Rodríguez Miriam Aide^a, Rodríguez Patiño Gabriela^a,
 Revilla Vázquez Alma Luisa^b, Rodríguez de San Miguel Eduardo^c,
 López-Arellano Raquel^{a,*}

^a National Autonomous University of Mexico, Cuautitlan, Multidisciplinary Research Unit, Cuautitlan Izcalli, Edo, Mexico, CP 54714, Mexico

^b National Autonomous University of Mexico, Cuautitlán, Department of Analytical Chemistry Laboratory, Cuautitlan Izcalli, Edo, México, CP 54740, Mexico

^c National Autonomous University of Mexico, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University City, Coyoacán, Mexico City, CP 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 July 2018

Received in revised form

20 December 2018

Accepted 21 December 2018

Available online 21 December 2018

Keywords:

5-chloro 8-hydroxyquinoline and

5,7-dichloro 8-hydroxyquinoline

Forced degradation

UPLC

Validation

ABSTRACT

A new, rapid, simple and specific method to determine 5-chloro 8-hydroxyquinoline (5-HQ) and 5,7-dichloro 8-hydroxyquinoline (5,7-HQ) stability in swine feed was optimized and validated. A system consisting of an ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm), a mobile phase of acetonitrile–0.1% *o*-phosphoric acid (55:45 v/v) with a 0.5 mL/min flow rate, and a PDA detector (247 nm) were used. The retention times of 5-HQ and 5,7-HQ, were 0.77 min and 1.6 min, respectively. The pure drug was subjected to acid and alkali hydrolysis, chemical oxidation and UV light degradation to perform forced degradation studies. 5,7-HQ was more susceptible to degradation than 5-HQ. The figures of merit of the method (linearity, accuracy, precision, and robustness) were determined. The method was successfully applied to estimate the stability of both analytes in medicated feed.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Halquinol is a mixture of 5,7-dichloro 8-hydroxyquinoline (57–74%), 5-chloro 8-hydroxyquinoline (23–40%) and 7-chloro 8-hydroxyquinoline (less than 3%) obtained by chlorinating quinolin-8-ol [1–4]. Halquinol has antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities [4,5]; in Asia and South America is widely used against microbial infections in swine farming as well as growth promoter [6,7] by incorporating it with feed (medicated feed) at different levels [8].

Medicated feed is one method that can be used to administer pharmaceuticals to animals. It complements other forms of dosification such as injections and in-water intake, tablets or drench. It is an effective way to treat animals in a controlled, safe and wel-

fare friendly manner [9]. Evidently, an exhaustive quality control of the concentration of the pharmaceutical in the feed should be carried out, as the pharmaceutical dose will be fixed to a determined species of animal, and the content of the product might change or decay over time resulting in a loss in biological or therapeutic activity. In a stability study, one of the keys is to quantify the active substances and highlight any type of degradation that may alter the integrity of the molecules studied, and the analytical technique plays an essential role in this type of studies.

The main objective of the present study was to validate an analytical method by ultra-pressure liquid chromatography (UPLC) to quantify 5-HQ and 5,7-HQ in medicated feed and perform the first study of stability of both analytes under forced degradation circumstances (drastic conditions of temperature, humidity, ultraviolet light). As manufacturers are demanding reliable, fast, precise and reproducible methods that can be used for quality control protocols in pharmaceutical analysis of medicated feed, the new developed method allows shorter retention times and lower consumption of solvents [4].

* Corresponding author at: Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, FES Cuautitlán Campo 4, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Laboratorio 5, Carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km. 2.5, San Sebastián Xhala Cuautitlán Izcalli, Estado de México, MX 54714, Mexico.
 E-mail address: lopezar@unam.mx (R. López-Arellano).

2. Experimental Part

2.1. Materials and methods

2.1.1. Chemicals and reagents

5-chloroquinolin-8-ol (5-HQ) and 5,7-dichloroquinolin-8-ol (5,7-HQ) standards from Sigma Aldrich were employed. Acetonitrile, and methanol (HPLC grade), *o*-phosphoric acid, were purchased from J.T. Baker. Sodium EDTA (AR grade) was purchased from Sigma Aldrich, and Milli-Q water (Millipore system) was used throughout the experiments. Membrane filters (Nylon 0.45 μm) were purchased from Millipore.

2.1.2. Swine feed

Swine medicated feed are generally composed by corn, soybean meal, rice husk, barley, wheat, sunflower meal, monocalcium phosphate, bran, calcium carbonate and bentonite) according to the local food processing plant. Three representative and recommended swine medicated feeds (A, B and C), were employed in this work. For method applicability these medicated feeds were exposed in a stability chamber at 60 °C of temperature and 35% HR then, each feed was packed in a plastic bag and a triple layer of kraft paper.

2.1.3. Equipment

A Waters UPLC system (Ultra Pressure Liquid Chromatography) Acquity Class H, equipped with a quaternary pump, auto sampler, column oven and photo diode array detector, was used. Data collection and processing were performed with Empower 3.0 software (version 7.1, 2010). A stability chamber Caron at 60 °C of temperature and 35% HR was employed.

2.1.4. Chromatographic conditions

An ACQUITY UPLC BEH C18 column (50 mm \times 2.1 mm \times 1.7 μm), mobile phase: 0.1% *o*-phosphoric acid, was prepared in deionized water and acetonitrile (45:55 v/v). Column temperature: 40 °C, autosampler Temperature: 15 °C, detection: 247 nm, flow rate: 0.5 mL/min, injection volume: 10 μL and run time 3.0 min. All chromatographic separations were carried out at controlled room temperature (25 \pm 2 °C). The mobile phase was prepared by mixing 235 μL of *o*-phosphoric acid in 200 mL of deionized water (pH 2.5), filtering through Pall PVDF 0.45 μm filters and sonicating for 15 min prior to use.

2.1.5. Stock solution preparation

5-HQ and 5,7-HQ were accurately weighed (10.0 mg), dissolved in methanol and transferred to a 25 mL volumetric flask. The volume was adjusted to the mark with the same solvent, obtaining 400 $\mu\text{g/mL}$ of the drug. An aliquot of 500 μL was transferred to another 25 mL volumetric flask and filled with deionized water to obtain a standard stock solution of 8 $\mu\text{g/mL}$ of drug.

2.1.6. Samples solution preparation

Medicated swine feed was accurately weighed of 100 mg (or the equivalent to 10 mg of analytes), transferred in 25 mL volumetric flasks containing methanol and then sonicated for 2 min. The volume was adjusted to the mark with the same solvent. An aliquot of 800 μL was transferred to another 25 mL volumetric flask and filled with deionized water. The amount of 5-HQ and 5,7-HQ was determined by interpolation in the calibration curve obtained under the proposed chromatographic conditions.

2.2. Validation

The method was validated by determining the accuracy, precision, specificity, detection limit, quantification limit and robustness.

2.2.1. Linearity of the calibration curve

Calibration curves were constructed by plotting peak area versus concentration ($n = 18$), at six concentration levels from 70 to 120% (148.18, 222.27, 296.36, 370.45, 444.54 and 518.64 ng/mL) of 5-HQ and six (480.95, 721.43, 961.91, 1202.39, 1442.86 and 1683.34 ng/mL) of 5,7-HQ and regression equations were computed.

2.2.2. Precision and accuracy

The instrumental precision was evaluated in 3 levels, 80, 100 and 120% of 5-HQ (296.36, 370.46, 444.54 ng/mL) and 5,7-HQ (961.91, 1202.39, 1442.86 ng/mL) six times repeatedly. The amounts of both analytes were estimated by the developed method, measuring the peak area and fitting these values to the straight-line equation of the calibration curve. The accuracy of the method was determined by calculating recoveries of each analyte in medicated feed fortified with 5-HQ and 5,7-HQ. As for precision, it was reported as the relative standard deviation percentage (% RSD).

2.2.3. Selectivity

The selectivity was carried out by analysing swine feed, (according to the supplier it contains corn, soybean meal, rice husk, barley, wheat, sunflower meal, monocalcium phosphate, bran, calcium carbonate and bentonite) to identify whether there are interferences from the matrix with the analytes of interest (through comparison of the different chromatograms and retention times of 5-HQ and 5,7-HQ in the samples and the standards).

2.2.4. Detection (LOD) and quantification (LOQ) limits

Solutions from 0.72, 1.46 and 2.18 ng/mL of 5-HQ and 2.30, 4.61, 6.92 ng/mL of 5,7-HQ were prepared, and the detection limit was calculated as $LOD = 3Sb/b1$, while the quantitation limit as $LOQ = 10Sb/b1$ where Sb is the standard deviation of the blank and $b1$ is the slope, as estimated from the calibration curve [10,11].

2.2.5. Robustness

The robustness of the method was evaluated by adding 0.01% EDTA to the aqueous phase, by changing the mobile phase ratio H_3PO_4 : Acetonitrile (50:50), adding 0.1% HCOOH instead of 0.1% H_3PO_4 , and studying the stability of the sample solution at 25 \pm 2 °C at 24 h.

2.2.6. Forced degradation study

Forced degradation studies using acid and alkali hydrolysis, chemical oxidation with hydrogen peroxide and photo degradation with a UV lamp (365 nm) were performed [11]. The experiments were carried out and monitored chromatographically. For this, 15.9 mg of 5,7-HQ standard was transferred to a 100 mL volumetric flask, 70 mL of methanol was added, and the volume was adjusted to the mark with deionized water. Then, 2 mL of this solution was transferred to a 10 mL volumetric flask, and the volume was adjusted to the mark with 6 N HCl. The same procedure was carried out using 3 N H_2SO_4 , 6 N NaOH, 30% H_2O_2 and for photolytic degradation the diluent was deionized water. The solutions for the 5-HQ and 5,7-HQ stability studies were kept at 25 °C and analysed at 24, 48 and 120 h.

For the analysis of the degradation samples, 600 μL of each solution was transferred to a 10 mL volumetric flask. Alkali solutions were adjusted to pH 4.0 with 600 μL of 3 N H_2SO_4 , while acid solutions were adjusted to pH 4.0 with 550 μL of 6 N NaOH, and the

Table 1
Suitability Parameters of 5-HQ and 5,7-HQ (n = 6).

Analyte	Capacity (k)	Selectivity (α)	Tailing	Resolution (Rs)	Efficiency (plates m ⁻¹)
5-HQ	0.77	1.35	1.09	2.58	8242.80
5,7-HQ	2.58	3.35	1.04	16.22	9740.28
5-HQ (RSD%)	0.20	0.09	0.82	1.04	1.54
5,7-HQ (RSD%)	0.20	0.23	0.77	1.14	1.84

volumes were adjusted to the mark with deionized water to obtain a final concentration of 547.20 ng/mL for 5-HQ and 1888.92 ng/mL for 5,7-HQ. The solutions were analysed under the proposed chromatographic conditions [12–14].

3. Results and discussion

In Table 1, the suitability parameters obtained for the analysed compounds are reported for 6 separate injections. The values of %RSD observed for 5-HQ and 5,7-HQ are within the accepted USP value [15] ($\leq 2\%$). Capacity (k) and selectivity (α) factors, tailing, resolution (Rs) and theoretical plates per metre (efficiency) were also calculated.

3.1. Method Validation

The chromatograms of the placebo and the target solvent showed no peaks in the retention times of the studied analytes. The linearity of the system with correlation coefficients of 0.9993 for 5-HQ and 0.9988 for 5,7-HQ is considered as acceptable. The coefficients of determination were 0.9987 and 0.9978, respectively. The confidence interval for the ordinates to the origin includes zero, and the confidence interval for the slopes includes the unit. Subsequently, the recovery percentages of the added concentrations were calculated. The correlation coefficients were 0.9998 for 5-HQ and 0.9993 for 5,7-HQ, the coefficients of determination were 0.9997 for 5-HQ and 0.9987 for 5,7-HQ, the average of the recovery percentages were 99.83% for 5-HQ and 100.23% for 5,7-HQ, RSD values were 0.40% and 1.39%, respectively. The values obtained met the acceptance criteria. Fig. 1A and C show the graphs for the calibration curves of the system (standard samples) for 5-HQ and 5,7-HQ, respectively; Fig. 1B and D show the graphs for the method (fortified

matrix samples) presenting both the linear regression equation and correlation coefficients. The limit of detection and quantification were determined as 0.69 ng/mL and 2.09 ng/mL, respectively, for 5-HQ and the limit of detection and quantification were determined as 1.03 ng/mL and 3.13 ng/mL, respectively, for 5,7-HQ.

The precision of an analytical method is related to the dispersion of the measurements around their average value. Swine feed prepared with known quantities of analyte was analysed. Table 2 shows the RSD values obtained for the determination of the precision. As observed, they are less than 2% (Table 2). The recovery values for 5-HQ were from 99.2 to 98.9% for each analyst, and the recovery values for 5,7-HQ were from 100.6 to 100.3% for each analyst, indicating good results in the evaluation of the accuracy. The figures of merit of the method, as well as the acceptance criteria of each evaluated parameter, are reported in Table 2 for 5-HQ and 5,7-HQ.

The reproducibility of the method was assessed by independent determinations made by different analysts, obtaining recoveries for 5-HQ of 99.2 with 0.7% RSD for analyst 1 and 98.9% and 0.6% RSD for analyst 2. As for 5,7-HQ recovery was 100.6% with 1.5% RSD for analyst 1 and 100.3% with 0.9% RSD for analyst 2, showing that the method is reproducible. Robustness was demonstrated, challenging the proposed method by making modifications to the mobile phase and evaluating the stability of the sample in solution after 24 h, at normal and different conditions, expressing the results as % recovery and the absolute value of the arithmetic difference $|d_i|$.

3.2. Forced degradation study

Fig. 2a shows the 5-HQ peak of a reference standard with a retention time of 0.79 min and the 5,7-HQ peak at 1.65 min. Fig. 2b shows the peaks of 5-HQ and 5,7-HQ under degradation with 3 N

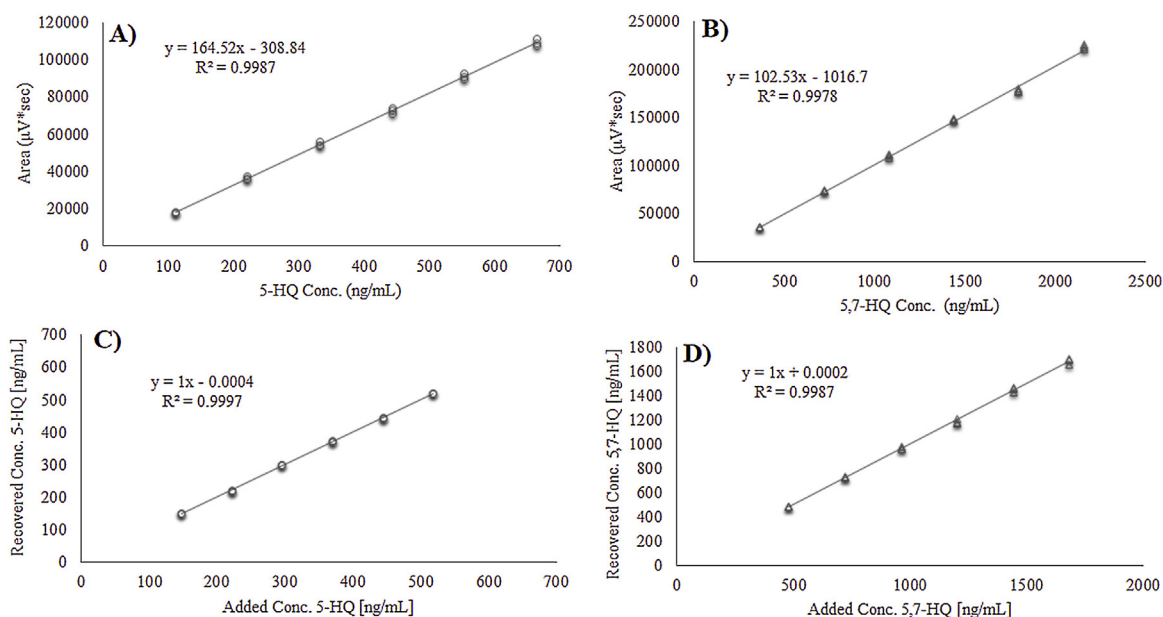


Fig. 1. A) and C) Calibration curves of 5-HQ and 5,7-HQ standard respectively, and B) and D) 5-HQ and 5,7-HQ in fortified swine feed, presenting the linear regression equation and correlation coefficient (r).

Table 2
Validation summary for 5-HQ and 5,7-HQ.

Figures of merit	5-HQ	5,7-HQ
Suitability	Tailing = 1.09 %RSD _{tr} = 0.09 %RSD _{area} = 0.65	Tailing = 1.04 %RSD _{tr} = 0.15 %RSD _{area} = 0.80
Linearity (standards)	$r > 0.9993$ $r^2 > 0.9987$	$r > 0.9993$ $r^2 > 0.9987$
Accuracy and precision	Recovery 100.56% % RSD = 0.71	Recovery 101.60% % RSD = 1.72
Linearity of the method (fortified samples)	$r > 0.9998$ $r^2 > 0.9997$ Recovery 99.82 $\beta_0 = -0.0004$ $\beta_1 = 1$ % RSD = 0.40%	$r > 0.9993$ $r^2 > 0.9987$ Recovery 100.22 $\beta_0 = 0.0002$ $\beta_1 = 1$ % RSD = 1.40%
Reproducibility	Recovery _{Analyst 1} 99.23% % RSD _{Analyst 1} 0.79% Recovery _{Analyst 2} 98.94% % RSD _{Analyst 2} 0.62%	Recovery _{Analyst 1} 100.68% % RSD _{Analyst 1} 1.53% Recovery _{Analyst 2} 100.40% % RSD _{Analyst 2} 0.96%
Robustness	Recovery 98.40% $ d_i = 1.60$ Recovery 100.97% $ d_i = 0.97$ Recovery 99.14% $ d_i = 0.86$ Recovery 99.40% $ d_i = 0.60$	Recovery 99.99% $ d_i = 0.01$ Recovery 98.99% $ d_i = 1.00$ Recovery 100.19% $ d_i = 0.51$ Recovery 99.99% $ d_i = 0.01$
Quantitation limit	2.09 ng/mL	3.13 ng/mL
Detection limit	0.69 ng/mL	1.03 ng/mL

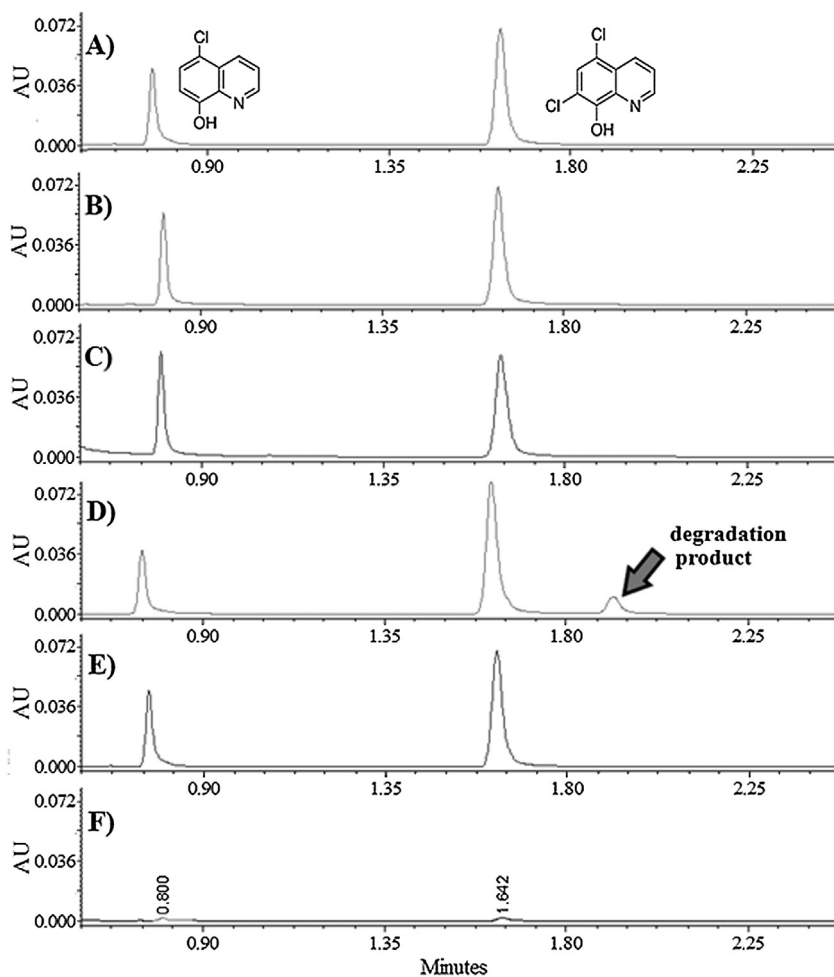
**Fig. 2.** Chromatograms of a) 5-HQ (547.2 ng/mL and 5,7-HQ (1888.92 ng/mL), b) 3 N H₂SO₄, c) 30% H₂O₂, d) 6 N HCl, e) 6 N NaOH and f) 24 h UV light (365 nm).

Table 3
Forced degradation study of 5-HQ and 5,7-HQ.

Condition	5-HQ % recovery			5,7-HQ % recovery		
	24 h	48 h	120 h	24 h	48 h	120 h
Sulphuric acid (H2SO4) 3 N	100.12 ± 0.49	99.80 ± 0.20	99.95 ± 0.44	97.94 ± 0.12	98.55 ± 0.40	98.51 ± 0.34
Hydrogen peroxide (H2O2) 30%	98.26 ± 1.77	98.06 ± 0.83	93.22 ± 0.99	82.86 ± 0.86	80.47 ± 0.41	65.96 ± 1.66
Hydrochloric acid (HCl) 6 N	86.73 ± 0.12	86.70 ± 0.47	86.50 ± 0.24	100.02 ± 0.48	99.76 ± 0.19	99.65 ± 0.21
Sodium hydroxide (NaOH), 6 N	96.37 ± 0.07	96.34 ± 0.05	96.43 ± 0.42	100.56 ± 0.66	100.52 ± 0.22	99.37 ± 0.47
UV light (365 nm)	5.16 ± 0.48	3.79 ± 1.83	3.36 ± 1.790	11.36 ± 0.73	2.16 ± 1.50	2.07 ± 1.75

H₂SO₄, as can be seen there are no additional peaks. Fig. 2c shows analytes exposed to 30% H₂O₂ without showing peaks of degradation; the peak observed in 0.4 min is also observed in the solvent target. In Fig. 2d in which the analytes are under degradation with 6 N HCl an additional peak can be seen at 1.93 min. Fig. 2e shows the peaks after being exposed to 6 N NaOH and no additional peaks of degradation are observed. Finally, in Fig. 2f the chromatogram of the analytes is shown after being exposed for 24 h to UV light; it is seen that the peaks practically disappeared since they are barely distinguishable from the baseline. With all this information and that presented in Table 3 in which the percentages of recovery determined after the analysis are shown it is concluded that:

No degradation peaks in 3 N sulphuric acid (acid hydrolysis) was observed, even at 120 h (Fig. 2b). However, using 6 N hydrochloric acid, a degradation product peak with a retention time of 1.93 min (representing 8.27% of the total area) was observed (Fig. 2d). Alkaline hydrolysis showed no degradation products, and no other peaks appeared in the chromatogram (Fig. 2e); therefore, 5-HQ and 5,7-HQ seems to be stable in alkali medium [12,16].

Hydrogen peroxide reacted with both analytes and its degradation was observed since the 5-HQ value diminished 7%, while the corresponding 5,7-HQ value decreased up to 34%. Among all the degradation studies, UV light causes larger and faster degradation of both analytes. Within 24 h, 95% of 5-HQ and 89% of 5,7-HQ were degraded, although no degradation products were detected by PDA. Since the RSD value was less than 2%, the method is considered efficient.

3.3. Application to Real Samples

The developed method was successfully applied to quantify 5-HQ and 5,7-HQ in three different swine feed (A, B and C) exposed to 60 °C temperature and 35% RH according to reference [17]. The objective of this study was to propose a new method to detect 5-HQ, 5,7-HQ and the possible degradation products of both analytes. Suitable conditions were proposed for future studies and quantification of 5-HQ and 5,7-HQ in less than 2 min. In addition, the proposed validated method has been proved to be robust, so it can be used in the determination of 5-HQ and 5,7-HQ present in different types of pig food.

Table 4 shows the percentages of recovery of 5-HQ and 5,7-HQ in the swine feed for three replicates of the samples of A, B, C subject to forced degradation. The initial values of the content of the analytes are also reported. As observed the amount of 5-HQ has decreased to 58.9% in the medicated food A and to 62.4% in the medicated food B, while the medicated feed C diminish to 85.2%. The content of 5,7-HQ in medicated food A decreases to 83.1%, and in medicated food B decreases to 57.3%, while decreases to 98.7% in medicated food C. These results suggest that sample C is the most stable as only a decrease of about 15% of 5-HQ and 2% 5,7-HQ is present in this feed sample.

Table 4
Medicated Swine Feed (MSF) after 120 h at 60 °C and 35% RH.

MSF	% 5-HQ	% recovery 5-HQ	% 5,7-HQ	% recovery 5,7-HQ
A (initial time)	4.06		9.95	
A.1	2.37	58.98 ± 1.16	8.20	83.17 ± 0.94
A.2	2.39		8.36	
A.3	2.42		8.28	
B (initial time)	5.69		12.10	
B.1	3.54	62.43 ± 0.32	6.97	57.37 ± 0.33
B.2	3.57		6.93	
B.3	3.58		6.92	
C (initial time)	2.86		7.24	
C.1	2.42	85.21 ± 1.30	7.19	98.73 ± 1.06
C.2	2.47		7.06	
C.3	2.42		7.19	

4. Conclusions

A new method to quantify 5-HQ and 5,7-HQ in swine feed was developed and validated, fulfilling the requirements specified in the ICH validation guidelines [10]. The validated method was found to be selective, sensitive, accurate and precise. Statistical analysis revealed that the method was repeatable and selective for the analysis of 5-HQ and 5,7-HQ without any interference. Forced degradation studies showed that 5,7-HQ is more susceptible to degradation than 5-HQ with hydrogen peroxide because the recoveries are lower than 5,7-HQ, but 5-HQ is more susceptible than 5,7-HQ to hydrochloric acid, and, specifically, UV light was the method that degraded the majority of both. The suitability of the method can be used for the analysis of stability samples obtained during accelerated stability experiments, and swine feed.

Funding

The authors thank CONACyT for doctoral grant number 576548 and the funding obtained by the PAPIIT IN218115 project of DGAPA-UNAM.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Mexican Program to Support PAPIIT IN218115 project of DGAPA-UNAM - Universidad National Autonomy of Mexico for their funding. Additionally, thanks are given to CONACyT for the doctoral grant of Miriam Aide Castillo Rodríguez (scholarship number 576548).

References

- [1] M.I. Yattoo, A. Saxena, P.M. Deepa, B.P. Habeab, S. Devi, R.S. Jatav, U. Dimri, Role of trace elements in animals: a review, *Vet. World* 6 (2013) 963–967, <http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2013.963-967>.
- [2] L. Molognoni, N.C. de Souza, L.A. de Sá Ploêncio, G.A. Micke, H. Daguer, Simultaneous analysis of spectinomycin, halquinol, zilpaterol, and melamine in feedingstuffs by ion-pair liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1569 (2018) 110–117, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.048>.

- [3] R. Swetha, K. Jayakumar, M. Narayanaswamy, N.B. Shridhar, Jagadish Sanganal, Suguna Rao, Organ directed toxicity of halquinol in a repeated dose 28 day oral toxicity study in female rats, *Indian J Pharmacol* 39 (2007) 97–103.
- [4] N. Kandepu, S.C. Kodaganur, A.P. Mantri, S. Saha, R.M. Pallipadi, RP-HPLC method for quantitative estimation of halquinol in pharmaceutical dosage forms, *Eurasian J. Anal. Chem.* 7 (2012) 7–12.
- [5] S. Hatfull, Determination of hlquinol (Chloroquinolin-8-01s) in pre-mixes and medicated feeding stuffs, *Analyst* 106 (1981) 105–113.
- [6] J.E. Fairbrother, W.F. Heyes, The determination of chlorhydroxyquinoline in medicated pig feeds, *Analyst* 98 (1973) 797–801, <http://dx.doi.org/10.1039/AN9739800797>.
- [7] W. Zheng, J.-M. Choi, S.-K. Kim, J.-H. Shim, Y.-S. Kang, A.M. Abd El-Aty, A. Hacımüftüoğlu, H.-C. Shin, Determination of halquinol residual levels in animal-derived food products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Biomed. Chromatogr.* 32 (2018), e4339, <http://dx.doi.org/10.1002/bmc.4339>.
- [8] K. Mohan, N. Prakash, A. Shuaib, B. Pavithra, K. Jayakumar, A. Bhat, Determination of 5,7-dichloroquinolin-8-ol and 5-chloroquinolin-8-ol in bulk drug powder and pharmaceutical preparation by TLC, *Chronicles Young Sci.* 2 (2011) 47, <http://dx.doi.org/10.4103/2229-5186.79350>.
- [9] Medicated feed - NOAH (National Office of Animal Health), (n.d.), <https://www.noah.co.uk/focus-areas/medicated-feed/> (Accessed 18 December 2018).
- [10] ICH, Guidance for Industry, Validation of Analytical procedures: Methodology, 1999, pp. 4–14 <http://www.regulations.gov/http/www.fda.gov/AnimalVeterinary/default.htm>.
- [11] VICH, Guidance for Industry Stability Testing of New Veterinary Drug Substances and Medicinal Products (Revision), ReVision, 3, 2010, pp. 21 <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/ucm052387.pdf>.
- [12] G. Ngwa, Forced degradation as an integral part of HPLC stability-indicating method development, *Drug Deliv. Technol.* 10 (2010) 56–59.
- [13] S. Venkataraman, M. Manasa, ReView Article Forced dEgradation Studies : Regulatory Guidance, Characterization of Drugs, and Their Degradation Products – a Review, vol. 10, 2018.
- [14] E. Of, Stability testing of Drugs, ICH Guid. (2003). doi:10.1136/bmj.333.7574.873-a.
- [15] USP-NF, First supplement to USP 40–NF 35, United States Pharmacop. Natl. Formul. 621 (2017) 1–12 (USP 40–NF 35) <https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c621.1SUSP40.pdf>.
- [16] U.K. Chhalotiya, K.K. Bhatt, D.A. Shah, Original Article Quantification of Clloquinol in Bulk and Pharmaceutical Dosage Forms by Stability Indicating LC Method, vol. 11, 2014, pp. 67–78.
- [17] CVM, Guidance for Industry stability testing for medicated premixes VICH GL8, n.d. <http://www.regulations.gov>. (Accessed 18 December 2018).