



# Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias  
Escuela de Química y Farmacia

**PROFESOR PATROCINANTE:** Dr. Ricardo Enríquez S.  
**INSTITUCIÓN:** Patología Animal  
**FACULTAD:** Ciencias Veterinarias

**PROFESOR CO-PATROCINANTE:** Dr. Rafael Burgos A.  
**INSTITUCIÓN:** Farmacología  
**FACULTAD:** Ciencias Veterinarias

“DETERMINACIÓN DE LA FARMACOCINÉTICA DE ÁCIDO OXOLÍNICO Y FLUMEQUINA EN ABALÓN ROJO (*Haliotis rufescens*) A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN (HPLC).”

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al Título de Químico Farmacéutico.

**ROSSANA KARIME ROMERO ZÚÑIGA**

VALDIVIA-CHILE

2008

*Dedicado a mis Padres.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a Dios, por haberme dado la oportunidad de estudiar una hermosa profesión, en la cual puedo ayudar a mi prójimo con mis conocimientos académicos y a la vez poder brindar una palabra de ánimo y esperanza a personas que sufren de enfermedades.

Agradezco a mi familia por su amor, esfuerzo y constante apoyo que incondicionalmente me han brindado en toda mi vida.

Doy mis agradecimientos al Dr. Ricardo Enríquez del Instituto de Patología Animal por haberme aceptado como tesista; por su dirección, entusiasmo y buena disposición en el desarrollo de este trabajo de tesis.

De la misma forma, quiero agradecer al Dr. Rafael Burgos del Instituto de Farmacología de Veterinaria ya que fue guía fundamental en este trabajo, además de valorar su buena disposición a consultas y críticas. Al mismo tiempo, le agradezco por permitir la realización de esta tesis en sus laboratorios.

También quisiera agradecer al Dr. Humberto Dölz, por su buena disposición, gestión y constante apoyo tanto como Director de Escuela, así como profesor informante de este trabajo de tesis.

Finalmente, doy las gracias a los académicos Sr. Raúl Cristi del Instituto de Farmacología y al Sr. Joel Pardo del Instituto de Farmacia por el apoyo, colaboración y orientación respecto a la técnica de HPLC.

Este trabajo fue financiado por el Proyecto FONDEF D01i1074.

## ÍNDICE

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRAC</b>	<b>2</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
3.1 El abalón	3
3.2 Las quinolonas	7
3.3 Validación de la metodología analítica	8
3.3.1 Linealidad	8
3.3.2 Precisión	8
3.3.3 Exactitud/recuperación	9
3.3.4 Especificidad y selectividad	10
3.3.5 Sensibilidad	10
<b>4. HIPOTESIS</b>	<b>12</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>12</b>
<b>6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>12</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>13</b>
7.1 Animales de experimentación	13
7.2 Reactivos	13
7.3 Exposición de los abalones a antibióticos vía baño.	13
7.4 Extracción orgánica de antibióticos en los tejidos estudiados	15

<b>7.4.1</b>	Extracción orgánica de ácido oxolínico y flumequina desde músculo.	<b>15</b>
<b>7.4.2</b>	Extracción orgánica de ácido oxolínico y flumequina en glándula digestiva	<b>16</b>
<b>7.4.3</b>	Extracción orgánica de ácido oxolínico y flumequina en hemolinfa	<b>16</b>
<b>7.5</b>	Cromatografía líquida a alta presión, HPLC	<b>18</b>
<b>7.5.1</b>	Preparación de curva de calibración	<b>18</b>
<b>7.5.2</b>	Preparación de fase móvil	<b>19</b>
<b>7.6</b>	Determinación de parámetros farmacocinéticos	<b>19</b>
<b>7.7</b>	Validación del método analítico para ácido oxolínico y flumequina	<b>20</b>
<b>7.7.1</b>	Linealidad	<b>20</b>
<b>7.7.2</b>	Precisión	<b>21</b>
<b>7.7.2.1</b>	Determinación de la precisión del sistema instrumental	<b>22</b>
<b>7.7.2.2</b>	Determinación de la precisión del método analítico	<b>23</b>
<b>7.7.3</b>	Exactitud/recuperación	<b>24</b>
<b>7.7.4</b>	Especificidad y selectividad	<b>25</b>
<b>7.7.5</b>	Sensibilidad	<b>25</b>
<b>8. RESULTADOS</b>		<b>27</b>
<b>8.1</b>	Validación de ácido oxolínico	<b>27</b>
<b>8.1.1</b>	Linealidad	<b>27</b>
<b>8.1.2</b>	Precisión	<b>29</b>
<b>8.1.2.1</b>	Determinación de la precisión del sistema instrumental	<b>29</b>

<b>8.1.2.2</b>	Determinación de la precisión del método	<b>33</b>
<b>8.1.3</b>	Exactitud / recuperación	<b>37</b>
<b>8.1.4</b>	Especificidad y selectividad	<b>41</b>
<b>8.1.5</b>	Sensibilidad (límite de detección y límite de cuantificación)	<b>42</b>
<b>8.2</b>	Validación de flumequina	<b>47</b>
<b>8.2.1</b>	Linealidad	<b>47</b>
<b>8.2.2</b>	Precisión	<b>49</b>
<b>8.2.2.1</b>	Determinación de la precisión del sistema instrumental	<b>49</b>
<b>8.2.2.2</b>	Determinación de la precisión del método	<b>52</b>
<b>8.2.3</b>	Exactitud / recuperación	<b>56</b>
<b>8.2.4</b>	Especificidad y selectividad	<b>60</b>
<b>8.2.5</b>	Sensibilidad (límite de detección y límite de cuantificación)	<b>61</b>
<b>8.3</b>	Análisis de muestras para la cuantificación de ácido oxolínico y flumequina.	<b>65</b>
<b>8.3.1</b>	Comparación de los parámetros farmacocinéticos de ácido oxolínico y flumequina	<b>66</b>
<b>8.3.1.1</b>	Análisis de ácido oxolínico y flumequina en músculo	<b>66</b>
<b>8.3.1.2</b>	Análisis de ácido oxolínico y flumequina en hemolinfa	<b>69</b>
<b>8.3.1.3</b>	Análisis de ácido oxolínico y flumequina en glándula digestiva	<b>72</b>
<b>9. DISCUSIÓN</b>		<b>75</b>
<b>9.1</b>	Validación de los métodos analíticos para ácido oxolínico y flumequina	<b>75</b>
<b>9.1.1</b>	Linealidad	<b>75</b>

<b>9.1.2</b>	<b>Precisión</b>	<b>75</b>
<b>9.1.2.1</b>	<b>Determinación de la precisión del sistema instrumental</b>	<b>76</b>
<b>9.1.2.2</b>	<b>Determinación de la precisión del método analítico</b>	<b>76</b>
<b>9.1.3</b>	<b>Exactitud / recuperación</b>	<b>77</b>
<b>9.1.4</b>	<b>Especificidad y selectividad</b>	<b>78</b>
<b>9.1.5</b>	<b>Sensibilidad (límite de detección y límite de cuantificación)</b>	<b>79</b>
<b>9.2</b>	<b>Farmacocinética de ácido oxolínico y flumequina</b>	<b>79</b>
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>86</b>
<b>11.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA CITADA</b>	<b>89</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>96</b>

## 1. RESUMEN

Los abalones son moluscos gastrópodos, herbívoros de hábitos reproductivos y alimentarios nocturnos y pertenecen a la familia *Haliotidae*.

La utilización de antibióticos en abalones es limitada y se ha basado principalmente en el uso de oxitetraciclina. De acuerdo a esto, y por la necesidad de encontrar terapias para las enfermedades infecciosas en abalones de cultivo, se decidió determinar la farmacocinética de ácido oxolínico y flumequina en tejidos de abalón. Para ello, se aplicaron 100 ppm de ambos antibióticos, vía baño, a 10 abalones. Se tomaron muestras de tejido muscular (pie), glándula digestiva y hemolinfa, a los 5, 15, 30, 90, y 900 min para la cinética de absorción. Posterior a los 900 min, los muestreos se realizaron cada 8 horas tomando un total de 4 muestras para la cinética de eliminación. Las muestras fueron sometidas a una extracción orgánica para posteriormente cuantificar los analitos obtenidos por medio de la técnica de HPLC. Las cinéticas de absorción y eliminación para flumequina en tejido muscular y hemolinfa fueron similares a las registradas para ácido oxolínico. Flumequina no fue detectada en glándula digestiva.

Se logró determinar los parámetros farmacocinéticos: concentración máxima ( $C_{max}$ ), área bajo la curva (ABC), vida media de absorción ( $t_{1/2\text{ abs}}$ ) y vida media de eliminación ( $t_{1/2\text{ eli}}$ ). Comparativamente no existen mayores diferencias en la cinética de absorción de ácido oxolínico y flumequina, pero sí en la cinética de eliminación de flumequina la que fue mucho más rápida que la de ácido oxolínico.

**Palabras claves:** Ácido oxolínico, flumequina, abalón, farmacocinética.



## 2. SUMMARY

The abalone is a mollusk gastropod, herbivore, reproductive and nourishing behavior that belongs to the *Haliotidae* family. The antibiotics utilization in abalones is limited and it has been based on oxytetracycline use principally. In according to above, is necessary to found therapies for the control of infectious diseases in abalones. In this study, the pharmacokinetic of oxolinic acid and flumequine was determinate in abalone tissues. The pharmacokinetic was determinate in abalone exposed to oxolinic acid and flumequine by bath. The samples of muscular tissue, digestive gland and haemolymph were obtained at 5, 15, 30, 90 min. and 15 h for kinetic absorption. After 15 hours, four samples were obtained each 8 h for kinetic elimination. Using organic extraction and the HPLC technique, the presence of both antibiotics was determinate in the tissues. The flumequine absorption and elimination kinetic in muscular tissue and haemolymph were similar to oxolinic acid. However, flumequine was not detected in digestive gland.

In addition, we obtain the follow pharmacokinetics parameters: maximum concentration ( $C_{max}$ ), area under the curve (AUC), absorption half-life ( $t_{1/2\text{ abs}}$ ), and of elimination half-life ( $t_{1/2\text{ eli}}$ ), for each antibiotic. Comparatively, high differences do not found between the absorption kinetics of oxolinic acid and flumequine. However, the kinetics elimination of the flumequine was faster to kinetics elimination of oxolinic acid.

**Key words:** Oxolinic acid, flumequine, abalone, pharmacokinetic.

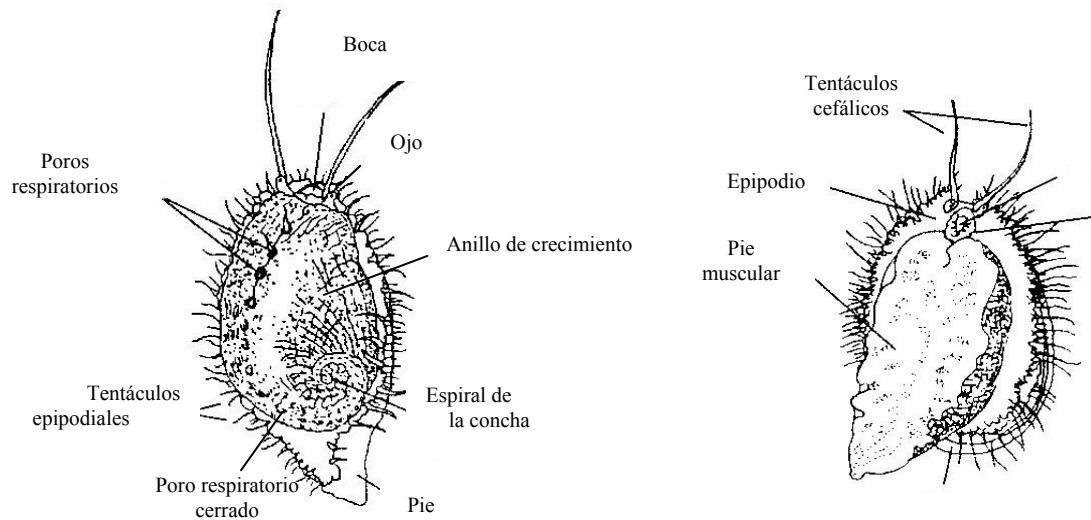
### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 El Abalón

Los abalones son moluscos gastrópodos, pertenecientes a la familia *Haliotidae*, que significa “oreja de mar” (Hahn y col., 1989; Vidal 2002). En el mundo existen alrededor de 100 especies de abalón todas ellas pertenecientes al género *Haliotis*, las cuales se encuentran distribuidas mayoritariamente en las zonas templadas del planeta y donde sólo 10 especies son consideradas de importancia comercial (Hand y col., 1989).

Anatómicamente el abalón se conforma de una concha oval que en su margen izquierdo posee una fila de orificios o poros respiratorios que varían de número según la especie. La parte interna de la concha está cubierta de nácar, otorgándole un aspecto atractivo, y por ende valor al producto, llegando a ser en algunos casos tan valiosa como la propia carne (Vidal 2002; Guzmán 2003).

Poseen un pie carnoso con el que se arrastran y que le permite un fuerte asentamiento en los fondos rocosos. En la cabeza posee un par de ojos y dos tentáculos sensoriales. La boca posee en su interior una rádula: órgano que permite roer el alimento; y un sistema digestivo compuesto por esófago, estómago, glándula digestiva e intestino (Ver figura N°1) (Hahn y col., 1989; Vidal 2002; Guzmán 2003).



**Fig. N°1:** Anatomía general de un abalón (vista superior, vista inferior)

De hábitos reproductivos y alimentarios nocturnos el abalón es considerado vegetariano estricto, alimentándose especialmente de *Macrocystis sp.* y *Eisenia sp.* (Hickmann y col., 1992).

El abalón es un molusco cotizado internacionalmente siendo considerado en el extranjero como una exquisitez; de esta manera la demanda de esta especie está por sobre lo que ofrece el mercado (Guzmán 2003). Uno de los motivos principales, se debe a la sobreexplotación de este recurso junto con su lento crecimiento y destrucción de su hábitat natural. Esto ha provocado que el valor comercial de las diferentes especies se haya elevado lo suficiente como para catalogar al abalón como recurso exótico. Por esto, su cultivo se ha convertido en una actividad muy atractiva, tanto para su engorda comercial como para satisfacer

los programas de repoblación para la recuperación de la especie en su medio natural (Viana 2004).

Desde el punto de vista comercial *Haliotis rufescens* (Abalón rojo) y *Haliotis corrugata* (Abalón amarillo) son las especies consideradas de mayor valor, debido al crecimiento y tamaño que pueden alcanzar, junto con otras especies como el *Haliotis discus hannai* (abalón japonés), (Bautista y col., 1989).

El abalón rojo (*H. rufescens*) a diferencia del abalón japonés (*H. discus hannai*) es la especie más grande del mundo, alcanzando longitudes máximas de 27,5 cm y un peso de hasta 1,7 Kg (Shepherd y col., 1992; Guzmán 2003).

El abalón no existe naturalmente en Sudamérica, por esta razón, en 1978 Fundación Chile junto a la Universidad Católica del Norte (UCN) desarrollaron proyectos para introducir el abalón rojo en nuestro país. En 1988 se presentó el primer Estudio de Impacto Ambiental de la Acuicultura, para cultivar abalón rojo en la X región, cuyos favorables resultados permitieron autorizar el cultivo abierto de la especie en la zona comprendida al sur del canal de Chacao (Vidal 2002, Guzmán 2003).

Hoy día, Chile se perfila como país clave en el mercado internacional. La producción de abalón rojo se sitúa con ventaja sobre otros países competidores que no producen esta especie, compitiendo directamente con Estados Unidos y México en el mercado norteamericano. Sin embargo, la producción intensiva de esta especie es aún incipiente en nuestro país al compararla con la producción de salmones (Vidal 2002).

Entre las enfermedades infecciosas más relevantes se encuentran aquellas producidas por bacterias pertenecientes al género *Vibrio sp*, que puede causar un 80% de mortalidad en post larvas (Faune 2003), y el Síndrome de marchitamiento o deshidratación de la oreja de mar (*Whithering Syndrome*) cuyo agente etiológico es un procarionte tipo rickettsia denominado *Xenohalotis californiensis* y que puede causar entre un 1-10% de mortalidad (Friedman y col., 2006).

Entre las enfermedades no infecciosas se encuentran el abultamiento de la glándula digestiva o “bloat”, deformaciones de la concha y el síndrome de mortalidad aguda que afecta a las semillas de abalón rojo (Cáceres 2000, Vidal 2002, Friedman y col., 2003; Guzmán 2003).

De lo anterior, es urgente desarrollar nuevas técnicas para la prevención de enfermedades infecciosas y no infecciosas en los cultivos de abalón, aplicando y monitoreando el uso controlado de antibióticos.

La utilización de antimicrobianos en la acuicultura chilena se aplica en las distintas etapas de la producción de peces en cautiverio, principalmente con fines profilácticos y terapéuticos en las enfermedades bacterianas. En abalón, las quinolonas podrían utilizarse como medida de prevención y control de enfermedades infecciosas que afectan a estos moluscos (1) y su aplicación reducirá el riesgo de diseminación de enfermedades.

(1) <http://www.fondef.cl/bases/fondef/PROYECTO/01/I/D0111074.HTML>

### 3.2 Las Quinolonas

Las quinolonas se caracterizan por actuar sobre un amplio espectro de bacterias Gram negativas, Gram positivas y micobacterias, y por estar dotadas de propiedades farmacológicas que los hacen útiles para el tratamiento de estas infecciones en peces y moluscos (Florez 1997; Robert y col., 1998; Roudaut y col., 2002).

Las quinolonas son bactericidas totalmente sintéticos que inhiben la síntesis del DNA bacteriano (Hustvedt y col., 1991; Touraki y col., 2001; Wu y col., 2001; Su y col., 2003). Entran a la célula a través de porinas (canales de agua de la membrana), e interfieren con la acción de la DNA girasa bacteriana (topoisomerasa II) formando complejos enzimáticos con la misma no permitiendo el superenrollamiento y desenrollamiento del DNA bacteriano. La inhibición de la actividad de estas enzimas impide a la célula bacteriana producir las proteínas necesarias para su reparación, crecimiento y reproducción, llevándolas a la muerte (Andriole 1989, Florez 1997). Esto ocurre en general para gérmenes Gram-negativos. Para gérmenes Gram-positivos la acción es mayoritariamente a nivel de los complejos de la topoisomerasa tipo IV (Robert y col., 1998).

La utilización de antibióticos en abalones es limitada y se ha basado principalmente en el uso de oxitetraciclina utilizando la alimentación y la inyección como vías de administración del antibiótico (Friedman y col., 2003). En consecuencia, al probar la utilización de quinolonas se debe decidir una vía de administración del antibiótico al molusco, además de desarrollar una metodología de extracción orgánica desde los tejidos del abalón. Además, para determinar la

presencia de los analitos de ácido oxolínico y flumequina en órganos de abalón se deberá implementar y validar la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

### **3.3 Validación de la metodología analítica**

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece por medio de estudios de laboratorio, que un método es apropiado para el uso propuesto (Quattrochi y col., 1992). Es la confirmación mediante exámenes y pruebas específicas y efectivas de que se cumplen los requisitos particulares de un uso específico previsto (Diario Oficial de las Comunidades Europeas 2002).

Para la validación de un método analítico se deben evaluar los siguientes parámetros:

#### **3.3.1 Linealidad:**

La linealidad de un método analítico es su capacidad de producir resultados directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo dado (Quattrochi y col., 1992).

#### **3.3.2 Precisión:**

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002).

La precisión será considerada en dos niveles: repetibilidad y reproducibilidad.

♦ *La repetibilidad* es la medida de la precisión de un método efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de la misma serie de análisis efectuados, generalmente en un corto intervalo de tiempo (Quattrochi y col., 1992; Diario Oficial de las Comunidades Europeas 2002).

♦ *La reproducibilidad* es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) (Quattrochi y col., 1992; Diario Oficial de las Comunidades Europeas 2002).

### **3.3.3 Exactitud/Recuperación**

La exactitud de un método analítico se define como la proximidad o grado de concordancia entre el resultado obtenido y el valor real (Diario Oficial de las Comunidades Europeas 2002). Un estudio de exactitud permite establecer el porcentaje de recuperación promedio (Touraki y col., 2001; Puentes 2004).

Para la determinación, en el caso de la valoración de una sustancia, la exactitud puede determinarse por la aplicación del método analítico o una muestra de pureza conocida (como por ejemplo una muestra de referencia), o por comparación de los resultados del método analítico propuesto con los de otro método cuya exactitud haya sido establecida (Quattrochi y col., 1992).



### 3.3.4 Selectividad y Especificidad:

La selectividad es la capacidad de un método para distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias. Esta característica es ante todo una función de la técnica de medición descrita, pero puede variar en función del tipo de compuesto o matriz (Diario Oficial de las Comunidades Europeas 2002), así como también es la capacidad de detectar simultánea o separadamente sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra (Universidad de Salamanca 1997). La selectividad se determinará por el tiempo de retención (o tiempo relativo de retención) del analito en la porción del ensayo y que corresponderá al patrón de calibración dentro un análisis. Esta banda de tiempo de retención será acorde con el poder de resolución del sistema cromatográfico (Diario Oficial de las Comunidades Europeas 2002).

En el caso de disponer de estándares, la coinyección de éstos y la comparación cuidadosa de los cromatogramas resultantes (observando la posible aparición de ensanchamiento de bandas, de hombros, etc.) puede contribuir a la determinación y/o confirmación experimental de la selectividad (Quattrochi y col., 1992; Puentes 2004).

### 3.3.5 Sensibilidad (Límite de Detección y Límite de Cuantificación):

La sensibilidad es la capacidad de un método analítico de registrar ligeras variaciones de la concentración.

• **El límite de detección** es la concentración más baja de analito que puede detectarse (Touraki y col., 2001), pero no necesariamente cuantificarse, en una muestra bajo las condiciones experimentales establecidas.

- ***El límite de cuantificación*** es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas. El límite de cuantificación se expresa en las mismas unidades de concentración empleada para el analito de la muestra.

#### **4. HIPOTESIS**

“Analitos de ácido oxolínico y flumequina pueden ser detectados y cuantificados por medio de HPLC en tejidos de abalón.”

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

➤ Determinar la absorción y eliminación del ácido oxolínico y flumequina en tejido muscular, glándula digestiva y hemolinfa de abalón, utilizando la técnica de cromatografía líquida a alta presión, HPLC.

#### **6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

➤ Establecer una metodología de administración de ácido oxolínico y flumequina en abalón.

➤ Establecer una metodología de extracción orgánica de alta recuperación cuantitativa, precisa y confiable para ácido oxolínico y flumequina en tejido muscular, glándula digestiva y hemolinfa de abalón

➤ Implementar y validar una técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), para la determinación de los analitos de antibióticos ácido oxolínico y flumequina.

➤ Establecer y comparar la cinética de absorción y eliminación de ácido oxolínico y flumequina en abalón vía baño.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 Animales de experimentación

- Se utilizaron abalones adultos provenientes de centros de producción de abalón de la zona de Chiloé y de la 4ª región, con un peso promedio de 10,02 g y 4,5 × 2,8 cm de longitud de concha; mantenidos en un estanque de 200 litros con agua de mar de 30,0% de salinidad, sin filtrar.

### 7.2 Reactivos

- Ácido oxolínico obtenido desde Pasteur.
- Flumequina y Sulfato de sodio anhidro obtenido desde Sigma.
- Acetato de etilo, Hexano, Acetonitrilo y agua grado HPLC obtenido desde Merck.
- Ácido ortofosfórico, 85% p/p obtenido desde Sigma.
- Hidróxido de sodio obtenido desde Merck.

### 7.3 Exposición de los abalones a antibióticos vía baño.

Para la determinación de la cinética de absorción y eliminación de ácido oxolínico y flumequina en abalón, se siguió el mismo protocolo de procedimiento, efectuándose cada experimento por separado teniendo como única variable la temperatura del baño, registrándose un promedio de 11°C para ácido oxolínico y 14°C para flumequina.

Los abalones (10 individuos) se introdujeron en un depósito de 6 litros agua de mar sin filtrar; con 30,0% de salinidad, siendo sometidos a la exposición del

antibiótico (ácido oxolínico y flumequina respectivamente), obteniendo una concentración final de 100 ppm. Los abalones fueron tomados al azar y los tiempos de toma de muestras fueron a los 5, 15, 30, 90 y 900 minutos (15 horas) posteriores a la exposición de los abalones al baño. Cuando llegaron las 15 horas se comenzaron a hacer cambios de agua, para determinar la cinética de eliminación. Los tiempos de tomas de muestras para la cinética de eliminación posteriores a las 15 horas fueron cada 8 horas tomando un total de 4 muestras. El tiempo cero correspondió al abalón control exento de antibiótico. En cada toma de muestras se extrajeron los órganos correspondientes a músculo, glándula digestiva y hemolinfa, siguiendo el procedimiento del Manual de Necropsia y Envío de Muestras de Abalón (*Haliotis sp.*). (Enríquez y col., 2003). Estas muestras fueron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , en espera de su posterior procesamiento. En la tabla N°1 y N°2 se presentan los pesos totales de tejido muscular y glándula digestiva para estos experimentos.

**Tabla N°1:** Tiempos de muestreos y pesos totales de tejido muscular y glándula digestiva, obtenidos de Abalón rojo (*Haliotis rufescens*) para experimento de cinética de absorción y eliminación de ácido oxolínico.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Peso tejido muscular (mg)</b>	<b>Peso glándula digestiva (mg)</b>
Control	2.263,5	189,6
5	2.157,0	259,4
15	1.703,0	258,7
30	3.686,8	130,3
90	4.395,3	259,1
900	2.247,2	239,8
1.380	1.476,0	308,7
1.860	1.761,0	356,5
2.340	9.65,40	313,8
2.820	1.353,0	369,7

**Tabla N°2:** Tiempos de muestreos y pesos totales de tejido muscular y glándula digestiva, obtenidos de Abalón rojo (*Haliotis rufescens*) para experimento de cinética de absorción y eliminación de flumequina vía baño.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Peso tejido muscular (mg)</b>	<b>Peso glándula digestiva (mg)</b>
Control	2.234,0	642,0
5	2.183,0	755,4
15	2.146,6	717,5
30	2.606,0	757,5
90	4.948,3	452,3
900	3.011,0	853,0
1.380	2.289,0	730,0
1.860	2.386,6	560,4
2.340	3.099,0	995,0
2.820	3.767,8	997,9

#### **7.4 Extracción orgánica de antibióticos en los tejidos estudiados.**

Para realizar la extracción orgánica de los órganos del abalón se siguieron los procedimientos utilizados por Delépée y Pouliquen (2002) efectuando modificaciones químicas necesarias para obtener el mayor porcentaje de recuperación desde los tejidos estudiados.

##### **7.4.1 Extracción orgánica de ácido oxolínico y flumequina desde músculo.**

Las muestras de músculo, se trituraron utilizando un mortero de porcelana, dejándolo de consistencia pastosa. Se pesaron en duplicado 100 mg del homogeneizado de músculo en un tubo de 1,6 ml al que se le adicionó 1ml de acetato de etilo y se agitó en vortex. A este homogenizado se le adicionó sulfato de sodio anhidro y se agitó nuevamente en vortex. La mezcla se centrifugó a  $10.000 \times g$  por 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido se almacenó en un tubo de vidrio y al precipitado se adicionó nuevamente 1ml de acetato de etilo. Se realizó una segunda centrifugación a  $10.000 \times g$  por 5 minutos y el sobrenadante se almacenó junto al de la etapa anterior. Posteriormente los sobrenadantes se secaron por completo utilizando nitrógeno gaseoso en un baño termostático a  $37^{\circ} C$ . La muestra seca se resuspendió con 500 $\mu$ l de fase móvil (Fase móvil: Ácido ortofosfórico 0.2Mm, y acetonitrilo 3:1). A ésta se le adicionó 1ml de hexano y se agitó en vortex. El sobrenadante (hexano) se eliminó quedando la muestra lista para ser inyectada a la columna cromatográfica.

#### **7.4.2 Extracción orgánica de ácido oxolínico y flumequina en glándula digestiva**

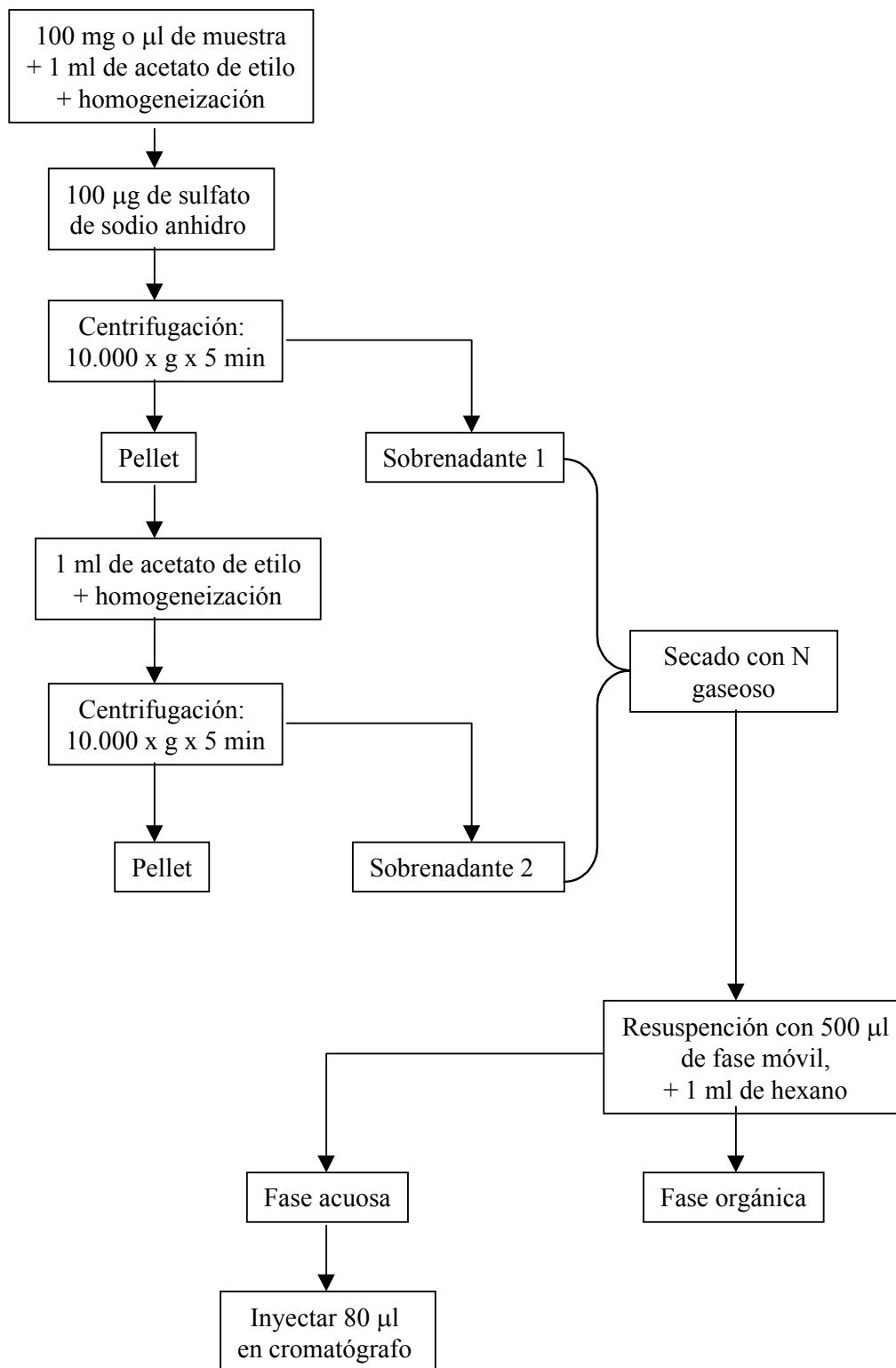
Se siguió el mismo protocolo de extracción orgánica descrito para músculo (punto 7.4.1), pero con una tercera adición de acetato de etilo con su respectiva homogeneización y centrifugación.

#### **7.4.3 Extracción orgánica de ácido oxolínico y flumequina en hemolinfa**

La hemolinfa extraída del abalón, según Manual de Necropsia y Envío de Muestras de Abalón (Enríquez y col., 2003) se centrifugó a  $10.000 \times g$  por 5 minutos para descartar los contaminantes presentes en la muestra, tales como arena, bacterias y membranas. Una vez que la muestra quedó limpia se traspasaron 100 $\mu$ l de hemolinfa (en duplicado) a un tubo de 1,6 ml. A continuación se siguió el mismo protocolo de extracción orgánica descrito para músculo (punto 7.4.1).

El siguiente diagrama muestra el protocolo a seguir para el tratamiento previo a la inyección de la muestra.



**Protocolo general de extracción orgánica de ácido oxolínico y flumequina.**

## **7.5 Cromatografía Líquida a Alta Presión, HPLC**

Con el objeto de analizar cualitativa y cuantitativamente las quinolonas extraídas desde los distintos tejidos, se utilizó la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) en fase reversa a temperatura ambiente y con elusión isocrática. Para la implementación de la técnica analítica y establecimiento de las condiciones cromatográficas, se utilizó el estudio Robert y Sherri (1998), la cual fue optimizada de acuerdo al los requerimientos del estudio de manera de conseguir una separación adecuada de los analitos en estudio.

El equipo cromatográfico (HPLC) utilizado fue Perkin Elmer<sup>R</sup>, con detector UV-visible y la columna para la separación eficiente de los antibióticos ácido oxolínico y flumequina fue una columna Kromasil<sup>R</sup> C<sub>18</sub> (250 x 4,6 m) y con el objeto de aumentar la vida de la columna se utilizó una precolumna C<sub>18</sub> de 5µm que elimina la materia en suspensión y contaminantes.

### **7.5.1 Preparación de curva de calibración**

Se preparó una curva de calibración a partir de una solución stock de 1000 ug/ml de ácido oxolínico y flumequina respectivamente resuspendida en agua destilada.

Los puntos de la curva de calibración preparada fueron de 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml y 100 µg/ml. Los estándares de trabajo fueron preparados diariamente por dilución de la solución stock (Touraki y col., 2000).

### 7.5.2 Preparación de fase móvil

La preparación de la fase móvil fue implementada a partir del desarrollo de métodos previos (Robert y col., 1998; Roudaut y col., 2002, Su y col., 2003). Para la preparación de 1 litro de fase móvil se utilizaron distintamente las siguientes cantidades de solventes

#### *Ácido oxolínico:*

- ✓ 670ml de ácido ortofosfórico 0.2mM
- ✓ 330ml acetonitrilo grado HPLC.

#### *Flumequina:*

- ✓ 580 ml de ácido ortofosfórico 0.2mM
- ✓ 420 ml acetonitrilo grado HPLC.

A continuación la fase móvil fue filtrada utilizando para ello una bomba de vacío con el objetivo de eliminar cualquier partícula que pueda dañar la columna y a la vez disminuir la cantidad de burbujas presentes en la fase móvil y que eventualmente puedan interferir en la lectura cromatográfica. Ambas soluciones registraron pH 2,5.

### 7.6 Determinación de parámetros farmacocinéticos

Posterior a la extracción orgánica desde los tejidos de abalón, fueron inyectados al cromatógrafo 80  $\mu$ L de muestra limpia, para efectuar las lecturas

cromatográficas. De dichas lecturas se obtuvieron las áreas del pico cromatográfico ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ), las que fueron graficadas contra las concentraciones de los estándares ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) de la curva de calibración, utilizando para ello la fórmula de regresión lineal para finalmente obtener las concentraciones de las muestras analizadas en  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Quattrochi y col., 1992). Con este dato fue posible obtener los  $\mu\text{g}$  totales en el órgano analizado y ppm ( $\mu\text{g}/\text{g}$ ), tanto de ácido oxolínico como de flumequina (Ver Anexo N° 1, ejemplo de cálculo N° 3 y N° 4). Además se tabularon los coeficientes de correlación ( $r$ ) y las pendientes ( $m$ ), usados para la determinación de los parámetros farmacocinéticos vida media de absorción ( $t_{1/2}^{\text{abs}}$ ), vida media de eliminación ( $t_{1/2}^{\text{eli}}$ ), y área bajo la curva ( $\mu\text{g}/\text{ml} \times \text{min}$ ) (ABC), usando para ello la fórmula de la ecuación de la recta:  $Y = bX + a$ .

El tiempo máximo ( $t_{\text{max}}$ ) y concentración máxima ( $C_{\text{max}}$ ) fueron obtenidos directamente de los resultados de las lecturas del HPLC.

## **7.7 Validación del método analítico para ácido oxolínico y flumequina**

Para la implementación de la técnica analítica de validación y establecimiento de las condiciones cromatográficas, se utilizó el estudio Robert y Sherri (1998), y la metodología de trabajo de Manosalva (2005).

### **7.7.1 Linealidad**

Para la determinación del parámetro de linealidad de ácido oxolínico, se usó una curva de calibración con un rango de concentraciones de:  $1,25\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $2,5\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $25\mu\text{g}/\text{ml}$  y  $50\mu\text{g}/\text{ml}$ . preparada a partir de una solución

madre de 100 mg/ml. El rango de concentraciones usadas para la determinación de la linealidad de flumequina fue el mismo de ácido oxolínico, con la excepción de que fue incluida la lectura del estándar de concentración 100 $\mu$ g/ml. Se inyectó por triplicado cada concentración obteniéndose un total de 18 y 21 inyecciones para ácido oxolínico y flumequina respectivamente.

La cuantificación fue realizada por análisis de regresión del área bajo la curva del pico cromatográfico contra la concentración del estándar  $Y = bX + a$  (Quattrochi y col., 1992).

La determinación se realizó en condiciones de repetibilidad, es decir, único analista, mismos instrumentos y reactivos, mismo día y cortos intervalos de tiempo entre cada análisis (Quattrochi y col., 1992).

Se determinaron los coeficientes de correlación y el grado de significación con una tabla de prueba de coeficiente de correlación (Quattrochi y col., 1992).

### **7.7.2 Precisión**

Se determinó la precisión del sistema instrumental y del método analítico. Los resultados obtenidos fueron sometidos al manual de verificación de rangos para métodos analíticos: A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists), que incluye tablas con datos de precisión en función de la concentración del analito (anexo N° 2, tabla N° 28). Basado en esta tabla, se puede determinar si los valores promedios de los coeficientes de variación se encuentran dentro de los rangos aceptados.

### 7.7.2.1 Determinación de la precisión del sistema instrumental

#### ➤ ***Repetibilidad del sistema instrumental***

Para evaluar este parámetro se utilizaron las concentraciones de 2,5µg/ml; 10µg/ml; y 50µg/ml. de estándares de ácido oxolínico y 10µg/ml; 25µg/ml; y 50µg/ml de estándares de flumequina.

La determinación de la precisión se llevó a cabo evaluando la dispersión de diez inyecciones por cada nivel de concentración en condiciones de repetibilidad.

Los estimadores de la precisión del sistema instrumental determinados fueron desviación estándar (S.D.) y coeficiente de variación (C.V.), que permitieron evaluar la incertidumbre (error aleatorio) en la estimación de la medida (Quattrochi y col., 1992).

#### ➤ ***Reproducibilidad del sistema instrumental***

La reproducibilidad del sistema instrumental se determinó por el coeficiente de variación y se considera suficiente efectuar ensayos de reproducibilidad en condiciones de repetibilidad tomando en cuenta solamente la variable tiempo (Quattrochi y col., 1992).

Se analizaron las inyecciones en triplicado, de una solución de estándar que contenía 10µg/ml tanto de ácido oxolínico como de flumequina respectivamente, en cuatro días diferentes consecutivos, determinándose posteriormente el promedio, la desviación estándar (S.D.) y el coeficiente de variación (C.V.).

### 7.7.2.2 Determinación de la precisión del método analítico

#### ➤ ***Repetibilidad del método analítico***

Para determinar la precisión del método, se realizó el estudio en condiciones de repetibilidad en todo el método analítico. Para ello se utilizó hemolinfa a la cual se adicionó externamente 100  $\mu\text{l}$  de estándar de ácido oxolínico de 2,5  $\mu\text{g/ml}$ ; 10  $\mu\text{g/ml}$ ; y 50  $\mu\text{g/ml}$  y se siguió todo el procedimiento de extracción orgánica descrito para el análisis. Se utilizaron, las concentraciones de 10  $\mu\text{g/ml}$ ; 25  $\mu\text{g/ml}$ ; y 50  $\mu\text{g/ml}$  para el análisis de este parámetro y se realizaron diez determinaciones por concentración y se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de las lecturas (Quattrochi y col., 1992).

#### ➤ ***Reproducibilidad del método analítico***

Para la determinación de esta variable se utilizó hemolinfa, agregando externamente estándares de ácido oxolínico o flumequina; sometiéndolos a todo el proceso analítico en cuatro días diferentes. Las determinaciones se realizaron en condiciones de repetibilidad teniendo en cuenta únicamente la variable tiempo. Las concentraciones de ácido oxolínico utilizadas fueron: 2,5  $\mu\text{g/ml}$ ; 10 $\mu\text{g/ml}$ , y 50 $\mu\text{g/ml}$ . Por otro lado, las concentraciones de flumequina utilizadas para la determinación de este parámetro fueron: 10 $\mu\text{g/ml}$ ; 25 $\mu\text{g/ml}$ , y 50 $\mu\text{g/ml}$ . Posteriormente se determinaron el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de las lecturas (Quattrochi y col., 1992).

### 7.7.3 Exactitud/recuperación

La exactitud se calculó como el porcentaje de recuperación, obtenido a partir de la valoración de una cantidad agregada conocida del analito en la muestra (Quattrochi y col., 1992; Diario Oficial de las Comunidades Europeas 2002).

Para la determinación del porcentaje de recuperación se utilizó la siguiente fórmula:

$$R=(X_i /X_0) \times 100$$

Donde  $X_i$  corresponde al valor entregado por el equipo y  $X_0$  el valor verdadero.

La recuperación esperada va a depender de la matriz de la muestra, el procedimiento de proceso de la muestra y de la concentración del analito. La AOAC (Association of Official Analytical Chemists) incluye una tabla de aceptabilidad con la recuperación estimada en función de la concentración del analito (anexo N° 2, tabla N° 29). Además se aplicó el método de t de student para corroborar la legitimidad de los resultados (Roudaut 2002) (ver anexo N°2, tabla N°31).

Para la determinación de este parámetro se usaron 100 $\mu$ l de las soluciones estándar de ácido oxolínico, con concentraciones de 2,5  $\mu$ g/ml; 10 $\mu$ g/ml; y 50 $\mu$ g/ml. Las concentraciones utilizadas para este mismo estudio en flumequina fueron: 10  $\mu$ g/ml; 25 $\mu$ g/ml; y 50 $\mu$ g/ml. Estas soluciones fueron agregadas



externamente en los tres tejidos estudiados (tejido muscular, glándula digestiva y hemolinfa), las que posteriormente fueron sometidas a toda la metodología de extracción orgánica. Cada una de concentraciones fueron inyectadas por triplicado, obteniendo un total de 9 inyecciones por tejido (Roudaut y col., 2002).

Luego se calculó el promedio de las lecturas, la desviación estándar (S.D.) y el coeficiente de variación (C.V.).

#### **7.7.4 Especificidad y Selectividad**

Para la determinación de la selectividad se analizaron los tiempos de retención del estándar de concentración  $10\mu\text{g/ml}$  tanto para ácido oxolínico como para flumequina. Estos fueron inyectados diez veces y se midió la desviación estándar (S.D.) y el coeficiente de variación (C.V.).

Además se coinyectó estándar de ácido oxolínico y flumequina donde los cromatogramas resultantes se compararon cuidadosamente, observando el posible ensanchamiento de banda, aparición de hombros, etc. (Quattrochi y col., 1992).

#### **7.7.5 Sensibilidad**

Para la determinación de la sensibilidad se aplicó el método de análisis repetido del blanco de la muestra (Quattrochi y col., 1992).

Se realizó una curva de calibración con concentraciones bajas del analito a partir de una solución madre de  $2,5\mu\text{g/ml}$  tanto de ácido oxolínico como de flumequina. Las concentraciones preparadas fueron  $0,01562\mu\text{g/ml}$ ;  $0,03125$

$\mu\text{g/ml}$ ; 0,06250  $\mu\text{g/ml}$ , 0,125  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,25  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ; 1  $\mu\text{g/ml}$  y 1,25  $\mu\text{g/ml}$  para el estudio de ácido oxolínico y 0,125  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,25  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,5  $\mu\text{g/ml}$  y 1  $\mu\text{g/ml}$  para el estudio de flumequina, inyectando cada estándar por triplicado. Con estos valores se obtuvo de la ecuación de la recta del tipo  $y = a + bx$ , de donde se determinó la pendiente.

A continuación se realizó el análisis de 10 blancos de la muestra (fase móvil), calculando la media de la respuesta del blanco (**Ybl**) y la desviación estándar de las respuestas obtenidas (**Sbl**) (Quattrochi y col., 1992).

Con los datos obtenidos de la curva de calibración y el análisis de la respuesta de los blancos, se calculó el límite de detección y el límite de cuantificación de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$L(x) = \frac{Y_{bl} \times K \times S_{bl}}{b}$$

Donde:

$L(x)$  = Límite de Cuantificación o Detección.

$K$  = Constante 3. Usualmente  $K = 3$  para Límite de Detección y  $K = 10$  para Límite de Cuantificación.

$Y_{bl}$  = Promedio de las áreas.

$S_{bl}$  = Desviación estándar de la respuesta de los "n" blancos.

$b$  = Pendiente de la recta de calibración a bajas concentraciones (Quattrochi y col 1992).

## 8. RESULTADOS

En la implementación de la técnica analítica se establecieron las siguientes condiciones cromatográficas:

Se inyectó un volumen de 80  $\mu$ l de muestra a un flujo de 1,5 ml/min, a temperatura ambiente. La longitud de onda se eligió de acuerdo a los espectros de absorción de las muestras y estándares y a la comparación de las alturas, separaciones y resoluciones de los picos cromatográficos que permitieran una buena identificación y cuantificación de las quinolonas en las corridas cromatográficas, obteniendo una longitud de onda de detección de 265nm para las lecturas de ácido oxolínico y 285nm para el análisis de flumequina, y un tiempo total análisis de 4,5 y 5,5 minutos respectivamente. Los tiempos de retención obtenidos fueron: 3,619 minutos  $\pm$  0,01197 para ácido oxolínico (ver tabla N° 11) y 4,024 minutos  $\pm$  0,02757 para flumequina (ver tabla N° 22).

### 8.1 Validación de ácido oxolínico

#### 8.1.1 Linealidad

Los resultados para el parámetro de linealidad se presentan en la tabla N° 3 encontrándose los datos de la curva de calibración con concentración en  $\mu$ g/ml y área en  $\mu$ V·s. También se muestra la ecuación de la recta su pendiente, intercepto y coeficiente de correlación y en el gráfico N° 1 se muestra la representación gráfica de la curva de calibración.

**Tabla N° 3:** Curva de Calibración de Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ) v/s Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	N° de Inyección	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área Promedio ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )
1,25	1	84.950	85.356
	2	85.639	
	3	85.479	
2,5	1	202.500	201.897
	2	203.290	
	3	199.903	
5	1	380.403	366.571
	2	390.028	
	3	401.283	
10	1	750.160	758.541
	2	767.050	
	3	758.413	
25	1	1.862.515	1.943.872
	2	1.978.132	
	3	1.990.970	
50	1	4.222.040	4.137.859
	2	4.133.657	
	3	4.057.882	

La ecuación de la recta obtenida en el análisis es:

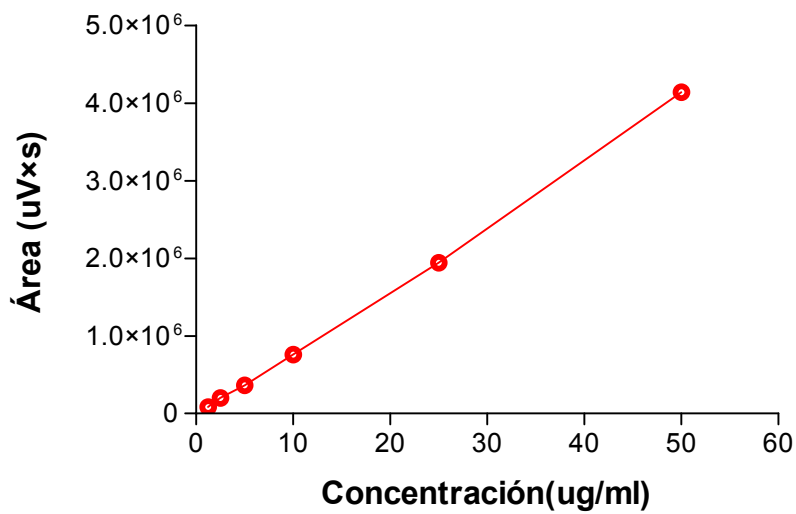
$$y = 82.781 x - 44.441$$

Donde:

a: -44.441

b: 82.781

r: Coeficiente de correlación: 0,9995



**Gráfico N°1:** Curva de calibración de concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ) v/s Área ( $\mu\text{V/s}$ ).

## 8.1.2 Precisión

### 8.1.2.1 Determinación de la precisión del sistema instrumental

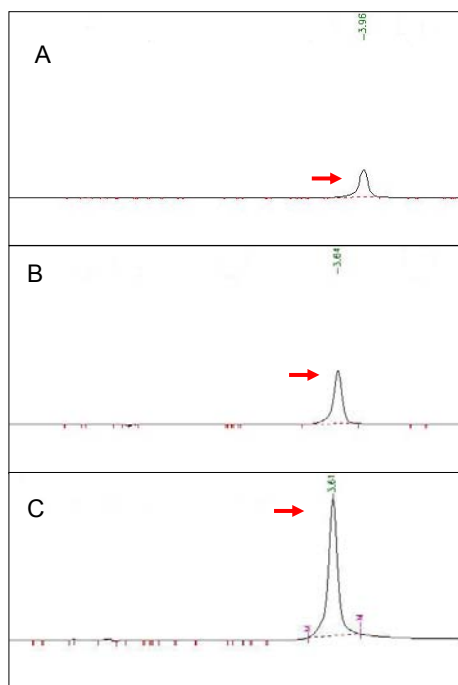
#### ➤ *Repetibilidad del sistema instrumental*

En la tabla N° 4 se presentan los resultados cromatográficos obtenidos bajo condiciones de repetibilidad del sistema, indicando el área promedio, la desviación estándar (S.D.) y el coeficiente de variación (C.D).

En la figuras N° 2, se muestran los cromatogramas representantes de cada una de las concentraciones analizadas.

**Tabla N° 4:** Valores de área promedio, S.D. y C.V. para el parámetro de precisión del sistema instrumental bajo condiciones de repetibilidad.

<b>Concentración</b>	<b>2,5(<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>10(<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>25(<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<b>N° de Área</b>	<b>Área (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>	<b>Área (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>	<b>Área (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>
<b>1</b>	206.376	963.968	2.592.359
<b>2</b>	211.693	977.702	2.720.489
<b>3</b>	212.617	996.923	2.660.711
<b>4</b>	215.403	1.004.105	2.511.614
<b>5</b>	212.505	994.854	2.455.431
<b>6</b>	220.488	995.272	2.580.531
<b>7</b>	220.722	1.004.070	2.573.186
<b>8</b>	224.598	986.288	2.619.346
<b>9</b>	224.134	997.858	2.594.632
<b>10</b>	216.240	1.003.554	2.524.822
<b>Área Promedio</b>	<b>216.500</b>	<b>992.500</b>	<b>2.580.000</b>
<b>S.D</b>	<b>5.921</b>	<b>13.010</b>	<b>75.530</b>
<b>C.V.</b>	<b>2,74%</b>	<b>1,31%</b>	<b>2,92%</b>



**Fig. N°2:** Cromatogramas representativos del parámetro de repetibilidad del sistema instrumental, con diferentes concentraciones de ácido oxolínico. (A) 2,5µg/ml, (B) 10µg/ml, (C) 50µg/ml.

➤ ***Reproducibilidad del sistema instrumental***

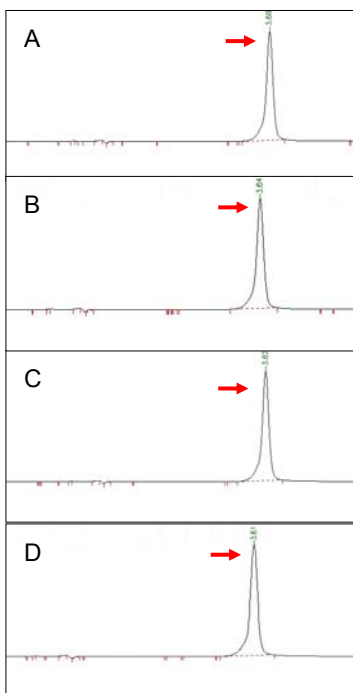
En la tabla N° 5 se presentan los resultados para la determinación de la reproducibilidad del sistema instrumental, mostrando los valores promedio de las lecturas realizadas por triplicado del estándar de ácido oxolínico de concentración de 10 µg/ml en cuatro días diferentes junto con los C.V y S.D.

La figura N° 3 muestra los cromatogramas correspondientes a cada uno de los cuatro días en los que se realizó el parámetro de reproducibilidad del sistema.

**Tabla N° 5.** Valores de las áreas, área promedio, S.D. y C.V. realizadas en cuatro días diferentes bajo condiciones de reproducibilidad.

<b>Periodo (N° de día)</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Área (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>	<b>Área Promedio</b>	<b>S.D.</b>	<b>C.V.</b>
1	10	963.968	985.700	18.270	1,85%
		977.702			
		996.923			
		1.004.105			
2	10	963.338	990.800	18.740	1,89%
		994.393			
		1.002.980			
		1.002.563			
3	10	994.857	995.100	7.262	0,73%
		995.272			
		1.004.070			
		986.288			
4	10	997.858	1.006.065	8.679	0,86%
		1.003.554			
		1.004.537			
		1.018.312			





**Fig. N°3:** Cromatogramas representativos del parámetro de reproducibilidad del sistema instrumental del estándar de ácido oxolínico de concentración 10  $\mu\text{g/ml}$ . (A) primer día, (B) segundo día, (C) tercer día, (D) cuarto día.

#### 8.1.2.2 Determinación de la precisión del método analítico

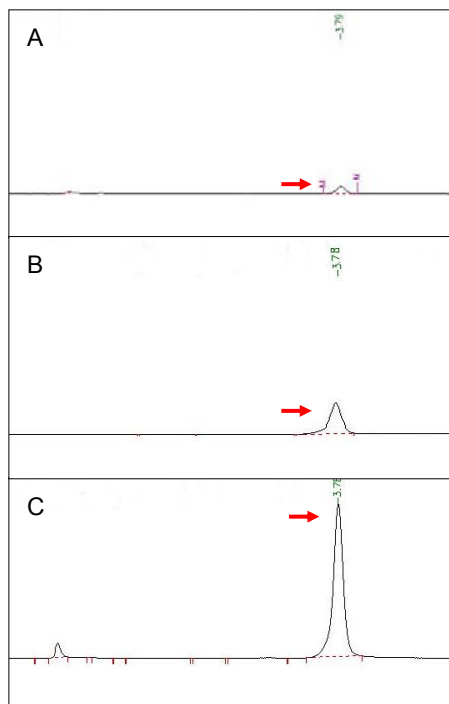
##### ➤ *Repetibilidad del método analítico*

En la tabla N°6 se observan los valores de los resultados de los análisis de las muestras.

La figura N°4 muestra los cromatogramas representativos de cada una de las concentraciones utilizadas para la determinación de la reproducibilidad del método analítico.

**Tabla N° 6:** Valores de área promedio, S.D. y C.V. para el parámetro de precisión del método analítico bajo condiciones de repetibilidad.

<b>Concentración</b>	<b>2,5(<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>10(<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>50(<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<b>N° de Área</b>	<b>Área (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>	<b>Área (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>	<b>Área (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>
<b>1</b>	29.707	152.587	718.724
<b>2</b>	31.286	155.411	748.712
<b>3</b>	33.323	163.190	763.707
<b>4</b>	29.402	152.851	771.336
<b>5</b>	30.329	147.588	772.324
<b>6</b>	29.743	150.883	782.507
<b>7</b>	30.215	156.069	773.569
<b>8</b>	30.215	158.386	775.822
<b>9</b>	31.003	153.965	774.536
<b>10</b>	30.214	169.761	775.102
<b>Área Promedio</b>	<b>30.220</b>	<b>156.100</b>	<b>765.600</b>
<b>S.D</b>	<b>1.131</b>	<b>6.409</b>	<b>18.820</b>
<b>C.V.</b>	<b>3,70%</b>	<b>4,11%</b>	<b>2,46%</b>



**Fig. N°4:** Cromatogramas representativos del parámetro de repetibilidad del método analítico, con diferentes concentraciones del estándar de ácido oxolínico. (A) 2,5µg/ml, (B) 10µg/ml, (C) 50µg/ml.

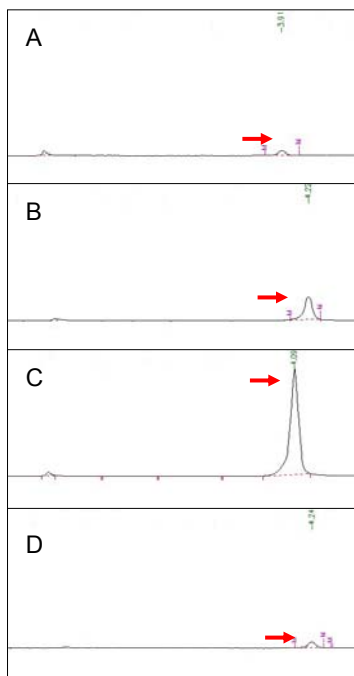
➤ **Reproducibilidad del método analítico**

En la tabla N°7 se observan los valores del promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de las lecturas.

La figura N° 5 muestra los cromatogramas que representan cada uno de los cuatro días de análisis.

**Tabla N° 7:** Valores de área promedio, coeficiente de variación y desviación estándar para el parámetro de precisión del método analítico bajo condiciones de reproducibilidad en cuatro días sucesivos.

<b>Período (N° de día)</b>	<b>Áreas (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>) para 2,5 (<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>	<b>Áreas (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>) para 10 (<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>	<b>Áreas (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>) para 50 (<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>
<b>1</b>	29.641	152.587	745.655
	34.650	155.411	763.054
	32.898	163.190	775.404
<b>2</b>	37.604	169.761	786.613
	38.272	169.313	798.044
	40.577	172.226	799.791
<b>3</b>	39.526	152.851	866.073
	38.335	147.588	885.980
	38.464	150.883	885.250
<b>4</b>	37.788	156.069	751.944
	38.605	158.386	793.288
	38.248	153.965	817.358
<b>Área Promedio</b>	<b>37.050</b>	<b>158.500</b>	<b>805.700</b>
<b>S.D.</b>	<b>3.109</b>	<b>8.169</b>	<b>48.990</b>
<b>C.V.</b>	<b>8,39%</b>	<b>5,15%</b>	<b>6,08%</b>



**Fig. N°5:** Cromatogramas representativos del parámetro de reproducibilidad del método analítico del estándar de ácido oxolínico en diferentes días y concentraciones. (A) primer día, 2,5 $\mu$ g/ml, (B) segundo día, 10 $\mu$ g/ml (C) tercer día, 50 $\mu$ g/ml (D) cuarto día 2,5 $\mu$ g/ml.

### 8.1.3 Exactitud / Recuperación

En las tablas N° 8, 9 y 10 se presentan los valores de los porcentajes de recuperación y concentraciones interpoladas para el parámetro de exactitud, de los tres tejidos analizados.

**Tabla N° 8:** Valores de los porcentajes de recuperación y concentraciones interpoladas para el parámetro de exactitud en tejido muscular.

Concentración (µg/ml)	Área (µV·s)	Concentración interpolada (µg/ml)	Área Promedio (µV·s)	S.D.	%C.V.	% Recuperación	Promedio % de Recuperación
<b>2.5</b>	20.709	0,414	28.510	8,91	28,26	82,8	<b>97,1</b>
	30.979	0,619				99,6	
	33.843	0,544				108,8	
<b>10</b>	153.772	1,726	159.700	8,535	5,34	86,4	<b>89,2</b>
	155.831	1,746				87,3	
	169.477	1,881				94,0	
<b>50</b>	726.039	7,257	729.900	10,160	1,39	72,57	<b>73,0</b>
	722.189	7,219				72,19	
	741.389	7,408				74,08	
<b>Promedio</b>				<b>9,51</b>	<b>12,64</b>	<b>86,4</b>	<b>86,4</b>

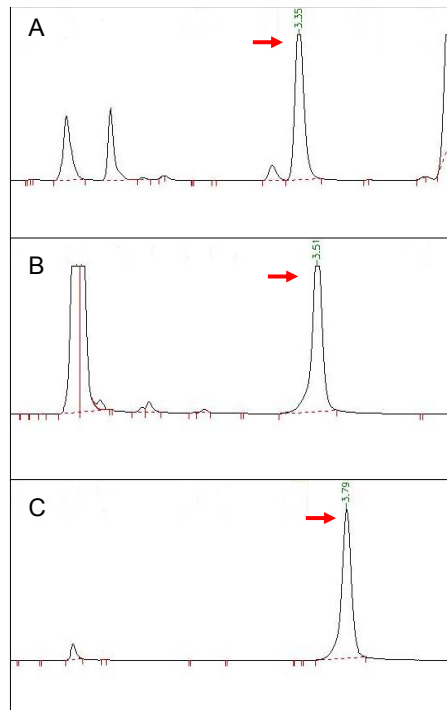
**Tabla N° 9:** Valores de los porcentajes de recuperación y concentraciones interpoladas para el parámetro de exactitud en glándula digestiva.

Concentración (µg/ml)	Área (µV·s)	Concentración interpolada (µg/ml)	Área Promedio (µV·s)	S.D.	%C.V.	% Recuperación	Promedio % de Recuperación
<b>2.5</b>	34.621	0.552	38.900	3,732	9,59	110,4	<b>118,7</b>
	41.490	0.619				123,8	
	40.583	0.610				122,0	
<b>10</b>	112.474	1.467	115.500	2,813	2,43	73,35	<b>74,8</b>
	117.993	1.521				76,05	
	116.182	1.503				75,15	
<b>50</b>	850.494	8.716	864.500	16,230	1,88	87,16	<b>88,5</b>
	882.284	9.028				90,28	
	860.683	8.816				88,16	
<b>Promedio</b>				<b>8,59</b>	<b>4,63</b>	<b>94,0</b>	<b>94,0</b>

**Tabla N° 10:** Valores de los porcentajes de recuperación y concentraciones interpoladas para el parámetro de exactitud en hemolinfa.

Concentración (µg/ml)	Área (µV·s)	Concentración interpolada (µg/ml)	Área Promedio (µV·s)	S.D.	%C.V.	% Recuperación	Promedio % de Recuperación
<b>2.5</b>	29.707	0,437	31.440	1,813	5,77	87,4	<b>90,9</b>
	31.281	0,453				90,6	
	33.323	0,473				94,6	
<b>10</b>	153.772	1,726	159.700	8,535	5,34	86,4	<b>89,3</b>
	155.831	1,746				87,3	
	169.477	1,881				94,1	
<b>50</b>	771.336	7,735	775.400	6,184	0,80	77,4	<b>77,8</b>
	772.324	7,745				77,5	
	782.507	7,845				78,5	
<b>Promedio</b>				<b>5,51</b>	<b>3,97</b>	<b>86,0</b>	<b>86,0</b>

La figura N°6 muestra los cromatogramas representantes de 50µg/ml de ácido oxolínico en músculo, glándula digestiva y hemolinfa.



**Fig. N°6:** Cromatogramas representativos del parámetro de exactitud. (A) 10 $\mu$ g/ml de ácido oxolínico en tejido muscular, (B) 10 $\mu$ g/ml de ácido oxolínico en glándula digestiva, (C) 10 $\mu$ g/ml de ácido oxolínico en hemolinfa.

Los porcentajes de recuperación de ácido oxolínico en músculo, glándula digestiva y hemolinfa fueron los siguientes: (ver anexo N°1, ejemplo de cálculo N°1).

- Tejido muscular: 86,4%.
- Glándula digestiva: 94,0%.
- Hemolinfa: 86,0%.



Además al aplicar el método de t de student resultó que el t de student tabulado para  $p= 0.05$  y  $n-1$  grados de libertad es de 1,860 (ver anexo N°2, tabla N°31).

De acuerdo al t de student tabulado se obtuvieron los siguientes valores de aceptabilidad (ver anexo N°1, ejemplo de cálculo N°2):

- Tejido muscular: 3,22.
- Glándula digestiva: 3,88.
- Hemolinfa: 10,57

#### **8.1.4 Especificidad y Selectividad**

En la tabla N° 11 se muestran las diez inyecciones de concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  con sus respectivas áreas y tiempos de retención.

Además se muestra el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los tiempos de retención de las diez inyecciones del estándar de ácido oxolínico.

**Tabla N° 11:** Parámetro de especificidad, tiempos de retención para 10 inyecciones de concentración 10 $\mu$ g/ml.

<b>N° de Inyección del Estándar</b>	<b>Área (<math>\mu</math>V·s)</b>	<b>Tiempo de Retención (minutos)</b>
<b>1</b>	963.968	3,63
<b>2</b>	977.702	3,63
<b>3</b>	996.923	3,63
<b>4</b>	1.004.105	3,63
<b>5</b>	994.854	3,62
<b>6</b>	995.272	3,62
<b>7</b>	1.004.070	3,62
<b>8</b>	986.288	3,61
<b>9</b>	997.858	3,60
<b>10</b>	1.003.554	3,60
<b>Promedio</b>	<b>992.500</b>	<b>3,619</b>
<b>Desviación Estándar</b>	<b>13.010</b>	<b>0,01197</b>
<b>Coefficiente de Variación</b>	<b>1,31%</b>	<b>0,33%</b>

Además se confirmó la selectividad coinyectando estándar de ácido oxolínico a la muestra, observándose el aumento del pico que eluía a los 3,61 minutos. Se observó un pico cromatográfico sin hombros y sin ensanchamientos.

#### **8.1.5 Sensibilidad (límite de detección y límite de cuantificación).**

La tabla N° 12 muestra los resultados de la curva de calibración de concentraciones bajas, junto con mostrar la ecuación de la recta su coeficiente de

correlación, pendiente e intercepto y en el gráfico N° 2 se muestra la representación gráfica de la curva de calibración.

**Tabla N° 12:** Valores de concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ) y áreas ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ) para obtener el parámetro de sensibilidad del método.

<b>Concentración (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Áreas (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>) por triplicado</b>	<b>Área (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>) promedio</b>
0.01562	47	30
	32	
	11	
0.03125	747	739
	725	
	747	
0.0625	1.958	2.045
	1.971	
	2.208	
0.125	9.385	9.463
	9.799	
	9.206	
0.25	15.917	17.555
	18.318	
	18.431	
0.5	37.940	38.385
	37.626	
	39.589	
1	81.062	81.427
	81.065	
	82.155	
1.25	97.997	98.733
	99.482	
	98.720	

La ecuación de la recta obtenida en el análisis es:

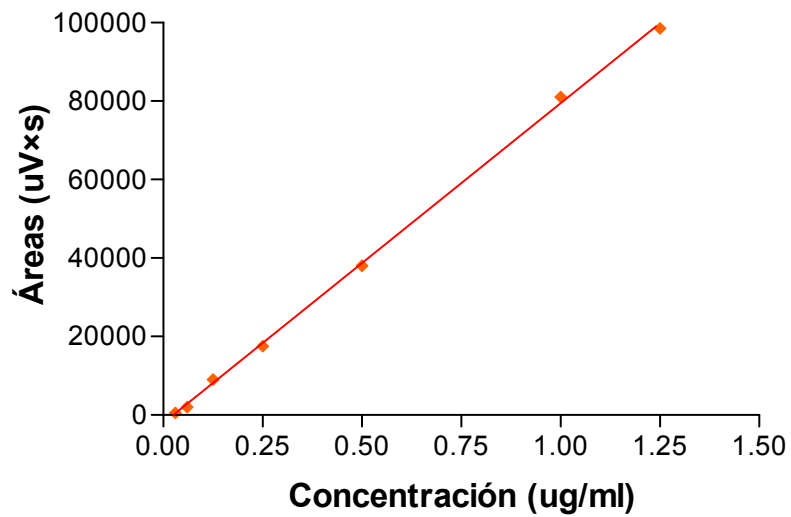
$$Y = 81.443 X - 1.880$$

**Donde:**

**a:** -1.880

**b:** 81.443

**Coefficiente de correlación:** 0,9991



**Gráfico Nº 2:** Curva de Calibración de Concentración (µg/ml) v/s Área (µV·s) para obtener el parámetro de sensibilidad

En la tabla N° 13 se indican los resultados de las diez inyecciones de blancos (fase móvil), con el promedio ( $Y_{bl}$ ) y la desviación estándar ( $S_{bl}$ ).

También se indican los cálculos para la obtención del límite de cuantificación y límite de detección.

**Tabla N° 13:** Valores de áreas de 10 inyecciones de soluciones blancos para el parámetro de sensibilidad del método.

<b>N° de Inyección de Fase Móvil</b>	<b>Áreas (<math>\mu V \cdot s</math>)</b>
1	20,05
2	20,07
3	19,00
4	22,70
5	14,04
6	13,85
7	18,84
8	12,10
9	18,30
10	10,80
<b>Promedio (<math>Y_{bl}</math>)</b>	<b>16,98</b>
<b>Desviación Estándar (<math>S_{bl}</math>)</b>	<b>3,964</b>

Utilizando la siguiente fórmula se determinó el parámetro de sensibilidad.

$$L(x) = \frac{Y_{bl} \times K \times S_{bl}}{b}$$

Donde:

$L(x)$  = Límite de Cuantificación o Detección.

$K$  = Constante  $\leq 3$

Usualmente  $K = 3$  para el Límite de Detección y  $K = 10$  para Límite de Cuantificación.

$Y_{bl}$  = Promedio de las áreas.

$S_{bl}$  = Desviación estándar de la respuesta de los  $n$  blancos.

$b$  = Pendiente de la recta de calibración a bajas concentraciones

**Límite de Detección:**  $L(x) = \frac{16,98 \times 3 \times 3,964}{81643,3} = 0,002473(\mu\text{g/ml})$

81643,3

**Límite de Cuantificación:**  $L(x) = \frac{16,98 \times 10 \times 3,964}{81643,3} = 0,008244(\mu\text{g/ml})$

81643,3

## 8.2 Validación de flumequina

### 8.2.1 Linealidad

Los resultados para el parámetro de linealidad se presentan en la tabla N° 14 encontrándose los datos de la curva de calibración con concentración en  $\mu\text{g/ml}$  y área en  $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ . También se muestra la ecuación de la recta, su pendiente, intercepto y coeficiente de correlación y en el gráfico N° 3 se muestra la representación gráfica de la curva de calibración.

**Tabla N° 14:** Curva de Calibración de Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ) v/s Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	N° de Inyección	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área Promedio ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )
1,25	1	10.329	10.659
	2	10.140	
	3	11.529	
2,5	1	22.039	21.656
	2	21.690	
	3	21.241	
5	1	43.449	44.474
	2	45.027	
	3	44.947	
10	1	90.835	93.907
	2	95.121	
	3	95.767	
25	1	230.992	239.391
	2	242.800	
	3	244.381	
50	1	480.894	483.484
	2	480.954	
	3	488.606	
100	1	1.002.586	1.003.497
	2	1.003.359	
	3	1.004.546	

La ecuación de la recta obtenida en el análisis es:

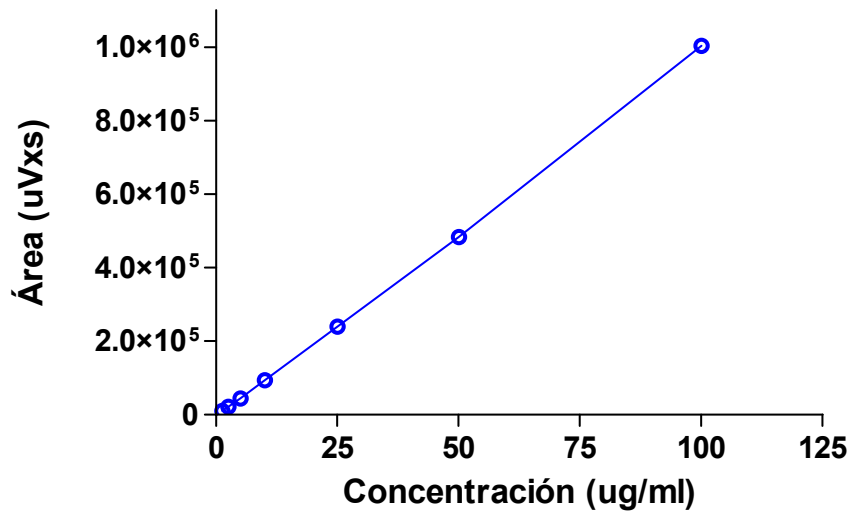
$$Y = 10.040 X - 6.753$$

Donde:

a: -6.753

b: 10.040

Coefficiente de correlación: 0,9997



**Gráfico N° 3:** Curva de Calibración de Concentración (µg/ml) v/s Área (µV/s)



## 8.2.2 Precisión

### 8.2.2.1 Determinación de la precisión del sistema instrumental

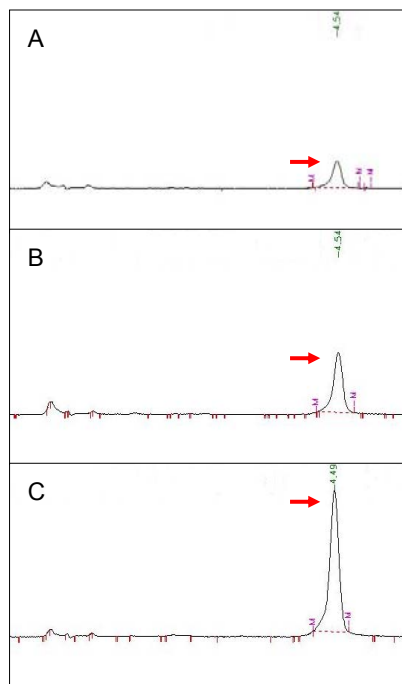
#### ➤ *Repetibilidad del sistema instrumental*

La tabla N° 15 presenta los resultados cromatográficos obtenidos bajo condiciones de repetibilidad del sistema, indicando el área promedio, desviación estándar (S.D.) y coeficiente de variación (C.V.).

La figura N°7 muestra los cromatogramas representantes de cada una de las concentraciones analizadas.

**Tabla N° 15:** Valores de área promedio, S.D. y C.V. para el parámetro de precisión del sistema instrumental bajo condiciones de repetibilidad.

Concentración	10( $\mu\text{g/ml}$ )	25( $\mu\text{g/ml}$ )	50( $\mu\text{g/ml}$ )
N° de Área	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )
1	90.338	245.701	488.196
2	93.292	250.338	497.685
3	94.089	251.247	494.080
4	94.650	254.763	504.206
5	98.021	254.027	502.590
6	97.128	252.343	506.161
7	94.598	252.318	510.077
8	97.260	255.174	504.376
9	98.062	253.772	511.436
10	99.357	254.718	504.062
<b>Área Promedio</b>	<b>95.680</b>	<b>252.400</b>	<b>502.300</b>
<b>S.D</b>	<b>2.754</b>	<b>2.860</b>	<b>7.132</b>
<b>C.V.</b>	<b>2,88%</b>	<b>1,13%</b>	<b>1,42%</b>



**Fig. N°7:** Cromatogramas representativos del parámetro de repetibilidad del sistema instrumental, con diferentes concentraciones de flumequina. (A) 10  $\mu\text{g/ml}$ , (B) 25 $\mu\text{g/ml}$ , (C) 50 $\mu\text{g/ml}$ .

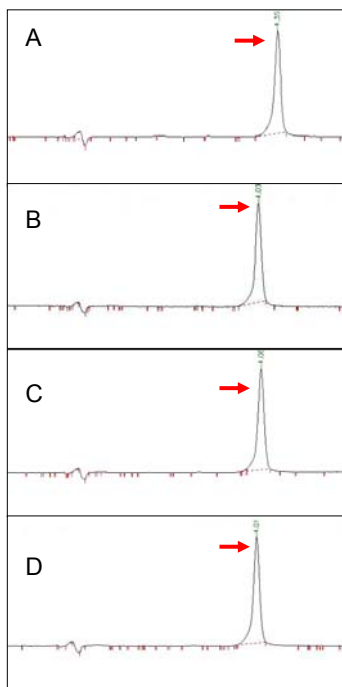
➤ ***Reproducibilidad del sistema instrumental***

La tabla N° 16 presenta los valores promedio de las lecturas realizadas por triplicado del estándar de ácido oxolínico de concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  en cuatro días diferentes junto con los C.V y S.D.

La figura N°8 muestra los cromatogramas correspondientes a cada uno de los cuatro días en los que se realizó el parámetro de reproducibilidad del sistema.

**Tabla N° 16:** Valores de las áreas, área promedio, S.D. y C.V. realizadas en cuatro días diferentes bajo condiciones de reproducibilidad.

<b>Periodo (N° de día)</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Área (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>	<b>Área Promedio</b>	<b>S.D.</b>	<b>C.V.</b>
1	10	90.835	94.350	2.358	2,5%
		95.121			
		95.767			
		95.662			
2	10	90.338	93.090	1.919	2,06%
		93.292			
		94.089			
		94.650			
3	10	98.021	96.752	1.489	1,54%
		97.128			
		94.598			
		97.260			
4	10	98.062	98.128	961,1	0,98%
		99.357			
		98.086			
		97.008			



**Fig 8:** Cromatogramas representativos del parámetro de reproducibilidad del sistema instrumental de la solución estándar de flumequina de concentración 10 µg/ml. (A) primer día, (B) segundo día, (C) tercer día, (D) cuarto día.

#### 8.2.2.2 Determinación de la precisión del método analítico

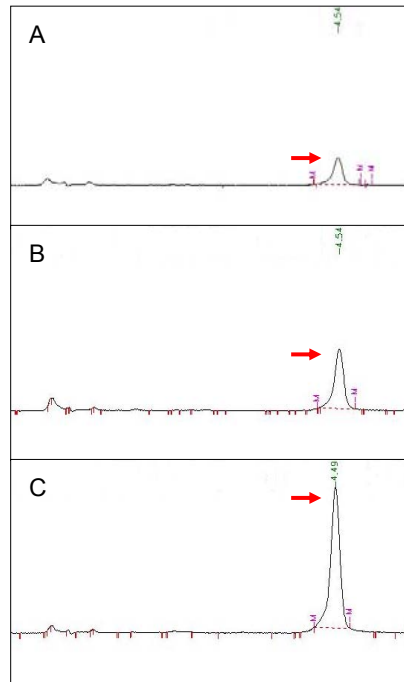
➤ ***Repetibilidad del método analítico***

En la tabla N° 17 se observan los valores de los resultados de los análisis de las muestras.

La figura N°9 muestra los cromatogramas representantes de cada una de las concentraciones utilizadas para la determinación de la reproducibilidad del método analítico.

**Tabla N° 17:** Valores de área promedio, S.D. y C.V. para el parámetro de repetibilidad del método analítico.

<b>Concentración</b>	<b>10(<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>25(<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>50(<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<b>N° de Área</b>	<b>Área (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>	<b>Área (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>	<b>Área (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>
<b>1</b>	16.568	34.991	78.416
<b>2</b>	16.156	36.886	78.782
<b>3</b>	17.876	35.200	78.670
<b>4</b>	17.016	37.642	79.420
<b>5</b>	16.549	35.786	78.456
<b>6</b>	16.459	35.789	78.560
<b>7</b>	17.365	35.498	79.532
<b>8</b>	16.348	36.749	78.654
<b>9</b>	16.480	36.255	77.988
<b>10</b>	16.428	37.443	76.998
<b>Área Promedio</b>	<b>16.725</b>	<b>36.224</b>	<b>78.548</b>
<b>S.D</b>	<b>533,3</b>	<b>924,3</b>	<b>711,2</b>
<b>C.V.</b>	<b>3,19%</b>	<b>2,55%</b>	<b>0,91%</b>



**Fig. N°9:** Cromatogramas representativos del parámetro de repetibilidad del método analítico, con diferentes concentraciones de flumequina. (A) 10µg/ml, (B) 25µg/ml, (C) 50µg/ml.

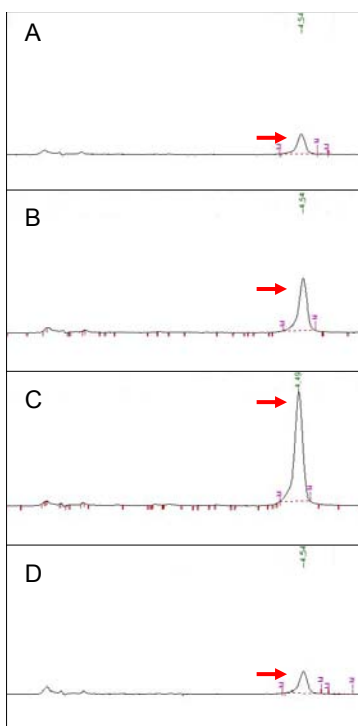
➤ ***Reproducibilidad del método analítico***

Posteriormente se determinaron el promedio la desviación estándar y el coeficiente de variación de las lecturas (ver tabla N° 18).

La figura N°10 muestra los cromatogramas que representan cada uno de los cuatro días de análisis.

**Tabla N° 18:** Valores de área promedio, coeficiente de variación y desviación estándar para el parámetro de precisión del método bajo condiciones de reproducibilidad en cuatro días sucesivos.

<b>Período (N° de día)</b>	<b>Áreas (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>) para 10 (<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>	<b>Áreas (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>) para 25 (<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>	<b>Áreas (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>) para 50 (<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>
<b>1</b>	16.568	34.991	78.416
	16.156	36.886	78.782
	17.876	35.200	78.670
<b>2</b>	17.016	37.642	79.420
	16.635	35.518	78.878
	17.695	35.945	81.432
<b>3</b>	16.703	42.099	88.246
	17.481	38.842	85.643
	16.988	38.670	87.629
<b>4</b>	16.865	36.786	85.674
	16.988	36.784	85.677
	17.004	36.455	84.665
<b>Área Promedio</b>	<b>16.998</b>	<b>37.152</b>	<b>82.761</b>
<b>S.D.</b>	<b>488,1</b>	<b>1.984</b>	<b>3.839</b>
<b>C.V.</b>	<b>2,87%</b>	<b>5,34%</b>	<b>4,64%</b>



**Fig 10:** Cromatogramas representativos del parámetro de reproducibilidad del método analítico en diferentes días y concentraciones. (A) primer día 10 $\mu$ g/ml, (B) segundo día, 25 $\mu$ g/ml (C) tercer día, 50 $\mu$ g/ml (D) cuarto día 10 $\mu$ g/ml.

### 8.2.3 Exactitud / Recuperación

Los resultados se adjuntan en las tablas N° 19, 20 y 21 donde se calcularon las áreas bajo la curva de los cromatogramas y el porcentaje de recuperación de los analitos en cada una de las muestras.



**Tabla N° 19:** Valores de los porcentajes de recuperación y concentraciones interpoladas para el parámetro de exactitud en tejido muscular.

Concentración (µg/ml)	Área (µV·s)	Concentración interpolada (µg/ml)	Área Promedio (µV·s)	S.V.	%C.V.	% Recuperación	Promedio % de Recuperación
<b>10</b>	15.468	1,911	16.027	1,074	6,70	95,55	<b>98,75</b>
	15.348	1,897				94,85	
	17.265	2,117				105,85	
<b>25</b>	36.241	4,301	39.449	2,778	7,04	86,03	<b>93,41</b>
	41.052	4,855				97,10	
	41.055	4,855				97,11	
<b>50</b>	95.475	11,119	101.183	4,992	4,93	111,19	<b>117,76</b>
	103.343	12,025				120,25	
	104.732	12,185				121,85	
<b>Promedio</b>				<b>2,94</b>	<b>6,22</b>	<b>103,3</b>	<b>103,3</b>

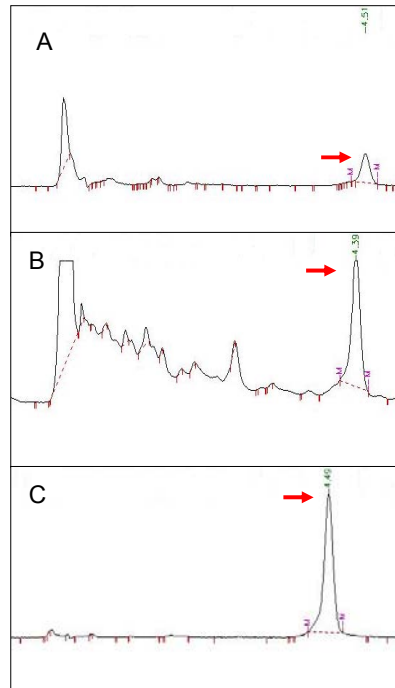
**Tabla N° 20:** Valores de los porcentajes de recuperación y concentraciones interpoladas para el parámetro de exactitud en glándula digestiva.

Concentración (µg/ml)	Área (µV·s)	Concentración interpolada (µg/ml)	Área Promedio (µV·s)	S.V.	%C.V.	% Recuperación	Promedio % de Recuperación
<b>10</b>	13.971	1,736	13.527	468,1	3,46	86,80	<b>84,25</b>
	13.572	1,690				84,50	
	13.038	1,629				81,45	
<b>25</b>	36.640	4,345	35.774	750,2	2,10	86,90	<b>84,90</b>
	35.369	4,191				83,98	
	35.314	4,192				83,84	
<b>50</b>	77.941	9,098	76.585	1.187	1,55	90,98	<b>89,42</b>
	76.078	8,884				88,84	
	75.736	8,844				88,44	
<b>Promedio</b>					<b>2,37</b>	<b>86,19</b>	<b>86,19</b>

**Tabla N° 21:** Valores de los porcentajes de recuperación y concentraciones interpoladas para el parámetro de exactitud en hemolinfa.

Concentración (µg/ml)	Área (µV·s)	Concentración interpolada (µg/ml)	Área Promedio (µV·s)	S.V.	%C.V.	% Recuperación	Promedio % de Recuperación
<b>10</b>	17.876	2,041	17.684	197,7	1,12	102,05	<b>101,05</b>
	17.695	2,022				101,10	
	17.481	2,000				100,00	
<b>25</b>	42.099	4,615	39.870	1,932	4,85	92,30	<b>87,56</b>
	38.842	4,269				85,38	
	38.670	4,251				85,02	
<b>50</b>	88.246	9,517	87.173	1,360	1,56	95,17	<b>94,03</b>
	85.643	9,241				92,41	
	87.629	9,452				94,52	
<b>Promedio</b>					<b>2,51</b>	<b>94,22</b>	<b>94,22</b>

La figura N°11 muestra los cromatogramas representantes de cada una de las concentraciones analizadas, en músculo, glándula digestiva y hemolinfa.



**Fig 11:** Cromatogramas representativos del parámetro de exactitud (A) 10  $\mu\text{g/ml}$  de ácido oxolínico en tejido muscular, (B) 50 $\mu\text{g/ml}$  de ácido oxolínico en glándula digestiva, (C) 50 $\mu\text{g/ml}$  de ácido oxolínico en hemolinfa,

Los porcentajes de recuperación de flumequina en músculo, glándula digestiva y hemolinfa fueron los siguientes: (ver anexo N°1, ejemplo de cálculo N°1).

- Tejido muscular: 103,3%.
- Glándula digestiva: 86,2%.
- Hemolinfa: 94,2%.

Además al aplicar el método de t de student resultó que el t tabulado para  $p= 0.05$  y  $n-1$  grados de libertad es de 1,860 (ver anexo N°2, tabla N°31).

De acuerdo al t tabulado se obtubieron los siguientes valores de aceptabilidad (ver anexo N°1, ejemplo de cálculo N°2):

- Tejido muscular: -1,59.
- Glándula digestiva: 17,48.
- Hemolinfa: 6,90

#### **8.2.4 Especificidad y Selectividad**

En la tabla N° 22 se muestran diez inyecciones de concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  con sus respectivas áreas y tiempos de retención.

Además se muestra el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los tiempos de retención de las diez inyecciones.

**Tabla N° 22:** Parámetro de especificidad, tiempos de retención para 10 inyecciones de concentración 10 $\mu$ g/ml.

<b>N° de Inyección del Estándar</b>	<b>Área (<math>\mu</math>V·s)</b>	<b>Tiempo de Retención (minutos)</b>
<b>1</b>	90.338	4,08
<b>2</b>	93.292	4,04
<b>3</b>	94.089	4,03
<b>4</b>	94.650	4,02
<b>5</b>	98.021	4,07
<b>6</b>	97.128	4,06
<b>7</b>	94.598	4,02
<b>8</b>	97.260	4,01
<b>9</b>	98.062	4,00
<b>10</b>	99.357	4,01
<b>Promedio</b>	<b>95.680</b>	<b>4,024</b>
<b>Desviación Estándar</b>	<b>2.754</b>	<b>0.02757</b>
<b>Coefficiente de Variación</b>	<b>2,88%</b>	<b>0,68%</b>

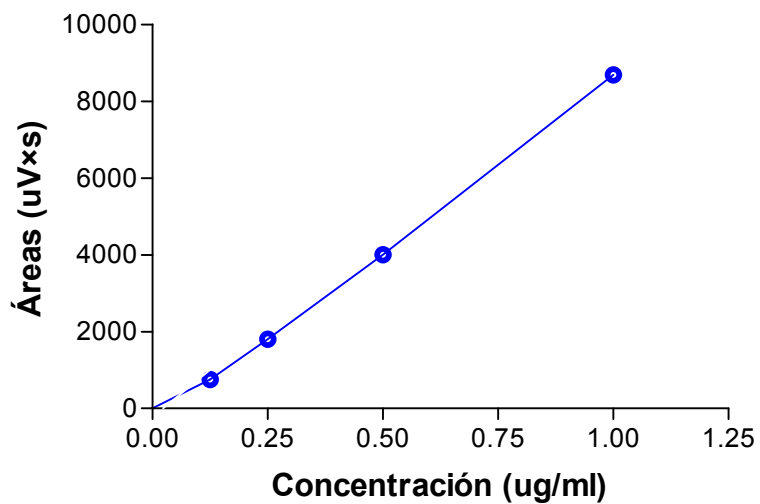
Además se confirmó la selectividad coinyectando estándar de flumequina a la muestra observándose el aumento del pico que eluía a los 4,04 minutos. Se observó un pico cromatográfico sin hombros y sin ensanchamientos.

### **8.2.5 Sensibilidad (límite de detección y límite de cuantificación).**

La tabla N° 23 muestra los resultados de la curva de calibración de concentraciones bajas, junto con mostrar la ecuación de la recta su coeficiente de correlación, pendiente e intercepto y en el gráfico N° 4 se muestra la representación gráfica de la curva de calibración.

**Tabla N° 23:** Valores de concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ) y áreas ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ) para obtener el parámetro de sensibilidad.

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Áreas ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ) por triplicado	Áreas ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ) promedio
0.125	844	752
	726	
	687	
0.25	2.131	1.805
	1.507	
	1.779	
0.5	3.904	4.008
	4.143	
	3.979	
1	9.121	6.686
	8.449	
	8.489	



**Gráfico N° 4:** Curva de Calibración de Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ) v/s Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ) para obtener el parámetro de sensibilidad

La ecuación de la recta obtenida en el análisis es:

$$Y = 6.731 X - 157.4$$

Donde:

a: 157.4

b: 6.731

Coefficiente de correlación: 0,9917

En la tabla N° 24 se indican los resultados de las diez inyecciones de blancos (fase móvil), con el promedio ( $Y_{bl}$ ) y la desviación estándar ( $S_{bl}$ ).

**Tabla N° 24:** Valores de áreas de 10 inyecciones de soluciones blancos para el parámetro de sensibilidad del método.

N° de Inyección de Fase Móvil	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )
1	18.8
2	19.7
3	32.6
4	23.7
5	19.9
6	24.8
7	22.3
8	19.5
9	21.9
10	19.1
<b>Promedio (<math>Y_{bl}</math>)</b>	<b>22,23</b>
<b>Desviación Estándar (<math>S_{bl}</math>)</b>	<b>4,180</b>

A continuación se indican los cálculos y fórmula utilizada para la obtención del límite de cuantificación y límite de detección.

$$L(x) = \frac{Y_{bl} \times K \times S_{bl}}{b}$$

Donde:

$L(x)$  = Límite de Cuantificación o Detección.

$Y_{bl}$  = Promedio de las áreas.

$K$  = Constante  $\leq 3$ . Usualmente  $K = 3$  para el Límite de Detección y  $K = 10$  para Límite de Cuantificación.

$S_{bl}$  = Desviación estándar de la respuesta de los  $n$  blancos.

$b$  = Pendiente de la recta de calibración a bajas concentraciones (Quattrochi y col, 1992).

**Límite de Detección:**  $L(x) = \frac{22,23 \times 3 \times 4,180}{6,731} = 0,0414 (\mu\text{g/ml})$

6.731

**Límite de Cuantificación:**  $L(x) = \frac{22,23 \times 10 \times 4,180}{6,731} = 0,1380 (\mu\text{g/ml})$

6.731



### **8.3 Análisis de muestras para la cuantificación de ácido oxolínico y flumequina.**

Al término de la extracción orgánica descrita en material y métodos, se procedió a la lectura de las muestras por medio de la técnica de HPLC.

El Anexo N°2 muestra las tablas N° 32, 33, 34, 35 y 36 en las cuales se detallan los resultados obtenidos en las distintas lecturas ajustadas a los porcentajes de recuperación determinados en la validación del método cromatográfico descrito anteriormente para ambos antibióticos (Anexo N°1, ejemplo de cálculo N°3). Los parámetros tabulados son: tiempo de toma de muestra (min), peso total del órgano analizado (mg), concentración obtenida de la lectura cromatográfica ( $\mu\text{g/ml}$ ),  $\mu\text{g}$  totales en el órgano analizado y ppm ( $\mu\text{g/g}$ ), presentes en músculo, glándula digestiva y hemolinfa tanto para ácido oxolínico como para flumequina (Ver Anexo N° 1, ejemplo de cálculo N° 3 y N° 4).

La tabla N°25 muestra los resultados de los coeficientes de correlación ( $r$ ) y las pendientes ( $b$ ), provenientes de las lecturas cromatográficas obtenidas de los distintos tejidos estudiados. A partir de estos datos (ver anexo N°2, tablas 32 a 36) en se determinaron los parámetros farmacocinéticos  $t_{1/2}$  absorción ( $h$ ),  $t_{1/2}$  eliminación ( $h$ ) y área bajo la curva ( $\mu\text{g/ml} \times \text{min}$ ) (ABC), determinados tanto para ácido oxolínico como para flumequina.

**Tabla N° 25:** Coeficiente de correlación (R) y pendiente (m) para ácido oxolínico y flumequina en músculo, glándula digestiva y hemolinfa en abalón rojo (*Haliotis rufescens*)

Tejido	Etapa de la cinética	Antibiótico	Coeficiente de correlación (R)	m (1/h)
Músculo	Absorción	Ácido oxolínico	0,8564	0,002163
G. Digestiva	Absorción	Ácido oxolínico	0,9661	0,016100
Hemolinfa	Absorción	Ácido oxolínico	0,8599	0,019370
Músculo	Eliminación	Ácido oxolínico	0,9480	0,076280
G. Digestiva	Eliminación	Ácido oxolínico	0,8275	0,057550
Hemolinfa	Eliminación	Ácido oxolínico	0,9807	0,106500
Músculo	Absorción	Flumequina	0,9441	0,001525
Hemolinfa	Absorción	Flumequina	0,9851	1,092000
Músculo	Eliminación	Flumequina	0,9974	0,207000
Hemolinfa	Eliminación	Flumequina	0,9970	0,258400

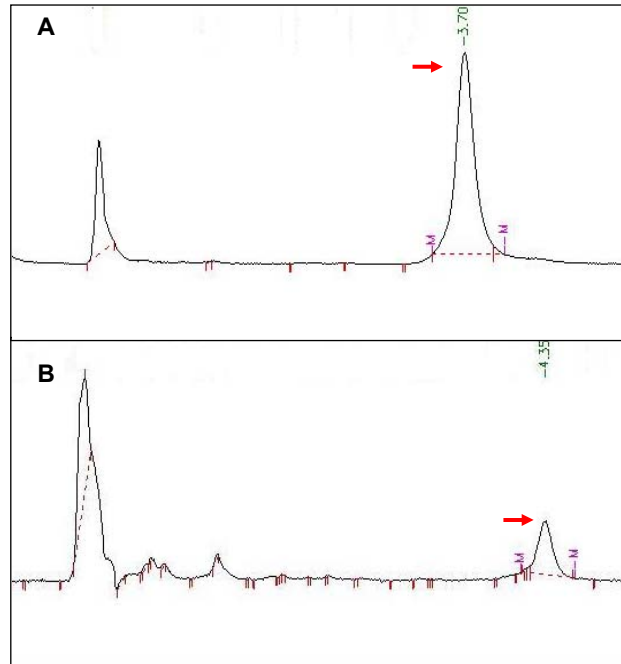
### 8.3.1 Comparación de los parámetros farmacocinéticos de ácido oxolínico y flumequina.

#### 8.3.1.1 Análisis de ácido oxolínico y flumequina en músculo

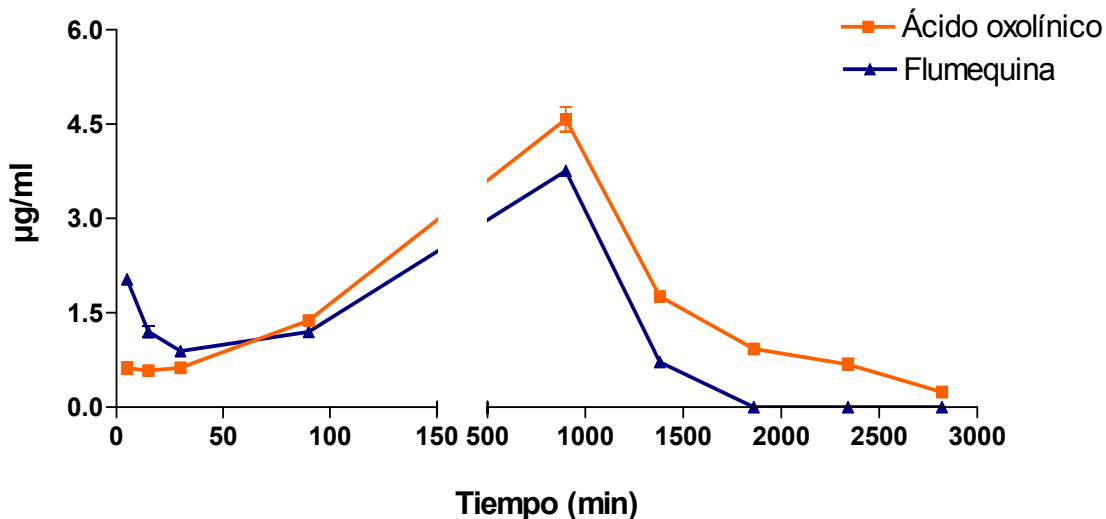
La figura N° 11 muestra los cromatogramas representantes de ácido oxolínico y flumequina en tejido muscular.

El gráfico N°5 muestra las curvas de absorción y eliminación de ácido oxolínico y flumequina en músculo, expresados en  $\mu\text{g/ml}$  versus tiempo.

La tabla N° 26 resume los parámetros farmacocinéticos obtenidos en este estudio.



**Fig. N°11: (A)** Cromatograma de cinética de eliminación de ácido oxalínico en tejido muscular a los 1380 min (23 h). **(B)** Cromatograma de cinética de absorción de flumequina en tejido muscular a los 30 min



**Gráfico N°5:** Absorción y eliminación de flumequina y ácido oxolínico en músculo, expresados en  $\mu\text{g/ml}$  versus tiempo. Cada punto representa la media aritmética  $\pm$  S.D. de al menos 2 experimentos en triplicado.

**Tabla N° 26** Parámetros farmacocinéticos determinados para ácido oxolínico y flumequina en músculo de abalón rojo (*H. rufescens*).

Antibiótico	$t_{1/2}$ de absorción (h)	$t_{1/2}$ de eliminación (h)	Área bajo la curva ( $\mu\text{g/ml} \times \text{min}$ ) (ABC)
Ácido oxolínico	184,6	9,08	2183,9
Flumequina	454,4	3,34	2235,4

La curva que describe el comportamiento de ácido oxolínico en músculo (color naranja), muestra una cinética de absorción lineal comenzando con  $0,62 \mu\text{g/ml}$  a los 5 min hasta llegar a un máximo de  $4,57 \mu\text{g/ml}$  a los 900 min. De la misma forma se observó una cinética de eliminación lineal registrando  $0,24 \mu\text{g/ml}$  en la última muestra tomada a las 47 h (2820 min), de iniciado el estudio.

La curva que describe el comportamiento de flumequina en músculo (color azul) comienza con una concentración de 2,03 µg/ml a los 5 min el cual desciende hasta 0,87 µg/ml a los 30 min. Desde aquí prosigue con una cinética de absorción lineal hasta alcanzar una concentración máxima de 3,75 µg/ml a los 900 min. Al comenzar el estudio de la cinética de eliminación se observó un rápido descenso en la curva (desde 3,75 µg/ml hasta 0,71 µg/ml) registrando presencia de analito sólo 8 h después del primer cambio de baño libre de antibiótico. En las posteriores tres tomas de muestra no se registró presencia de analito por medio de la técnica de HPLC.

El  $t_{1/2}$  de absorción de flumequina (454,4 h), dobla al  $t_{1/2}$  de absorción de ácido oxolínico (184,6 h). Flumequina es eliminada más rápidamente que ácido oxolínico al observar que la  $t_{1/2}$  de eliminación de ácido oxolínico es tres veces mayor que flumequina, con valores de 9,08 y 3,34 h respectivamente.

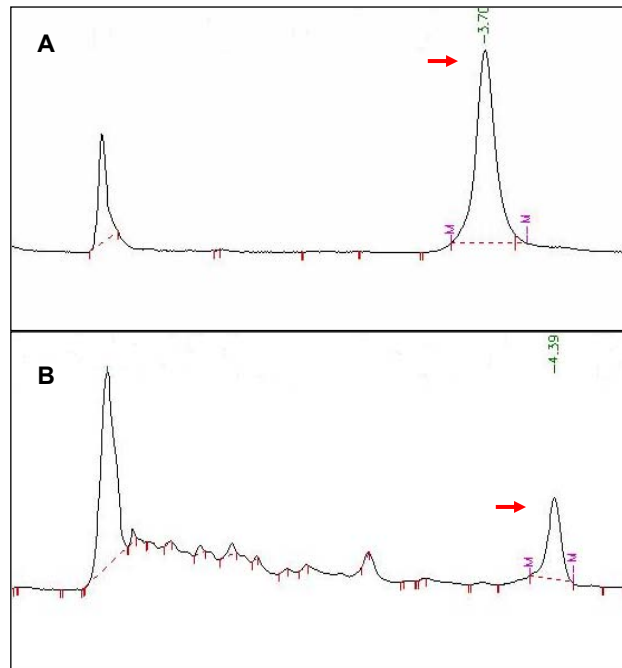
Los valores del área bajo la curva (ABC), son similares para ambos antibióticos (ver tabla N°26).

### **8.3.1.2 Análisis de ácido oxolínico y flumequina en hemolinfa**

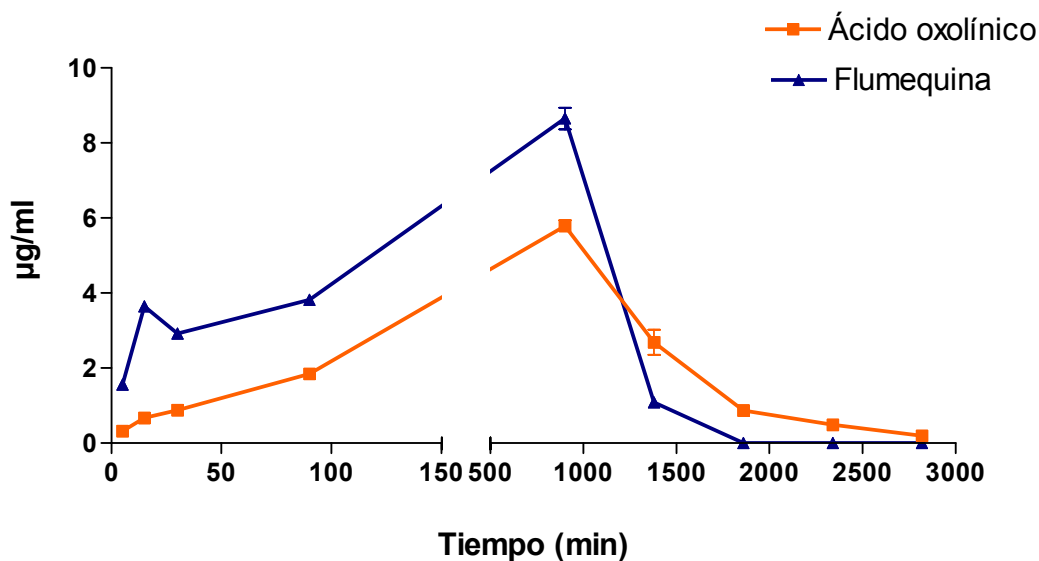
La figura N° 12 muestra los cromatogramas representantes de ácido oxolínico y flumequina en hemolinfa.

El gráfico N°6 muestra las curvas de absorción y eliminación de flumequina y ácido oxolínico en hemolinfa, expresados en µg/ml versus tiempo.

La tabla N° 27 resume los parámetros farmacocinéticos obtenidos en este estudio.



**Fig. N°12:** (A) Cromatograma de cinética de absorción de ácido oxalínico en hemolinfa a los 90 min. (B) Cromatograma de cinética de absorción de flumequina en hemolinfa a los 5 min.



**Gráfico N°6:** Absorción y eliminación de flumequina y ácido oxolínico en hemolinfa, expresados en  $\mu\text{g/ml}$  versus tiempo. Cada punto representa la media aritmética  $\pm$  S.D. de al menos 2 experimentos en triplicado.

**Tabla N° 27:** Parámetros farmacocinéticos determinados para ácido oxolínico y flumequina en hemolinfa de abalón rojo (*H. rufescens*).

Antibiótico	$t_{1/2}$ de absorción (h)	$t_{1/2}$ de eliminación (h)	Área bajo la curva ( $\mu\text{g/ml} \times \text{min}$ ) (ABC)
Ácido oxolínico	64,58	6,5	4848,5
Flumequina	0,63	2,68	5085,8

La curva que describe el comportamiento de ácido oxolínico en hemolinfa (color naranja) muestra una cinética de absorción lineal comenzando con 0,15  $\mu\text{g/ml}$  a los 5 min hasta llegar a una concentración máxima de 5,79  $\mu\text{g/ml}$  a los 900 min. De la misma forma se observó una cinética de eliminación lineal llegando a registrar 0,11  $\mu\text{g/ml}$  en la última muestra tomada a las 47 h (2820 min).

La curva que describe la cinética de absorción de flumequina en hemolinfa (color azul) comienza con una concentración de 1,45 µg/ml hasta 3,64 µg/ml desde los 5 a los 15 min; para luego descender hasta 2,92 µg/ml en la muestra tomada a los 30 min. Desde aquí prosigue con una cinética de absorción lineal hasta alcanzar una concentración máxima de 8,65 µg/ml a los 900 min. Al comenzar el estudio de la cinética de eliminación se observó un rápido descenso en la curva (desde 8,65 µg/ml hasta 1,11 µg/ml), registrando presencia de analito sólo 8 h después del primer cambio de baño libre de antibiótico. En las posteriores tres tomas de muestra no se registró presencia de analito por medio de la técnica de HPLC.

El  $t_{1/2}$  de absorción de flumequina (0,63 h), es extremadamente menor en comparación a la  $t_{1/2}$  de absorción de ácido oxolínico (64,58 h). Flumequina es eliminada más rápidamente que ácido oxolínico al observar que la  $t_{1/2}$  de eliminación fue de 2,68 h y 6,50 h respectivamente

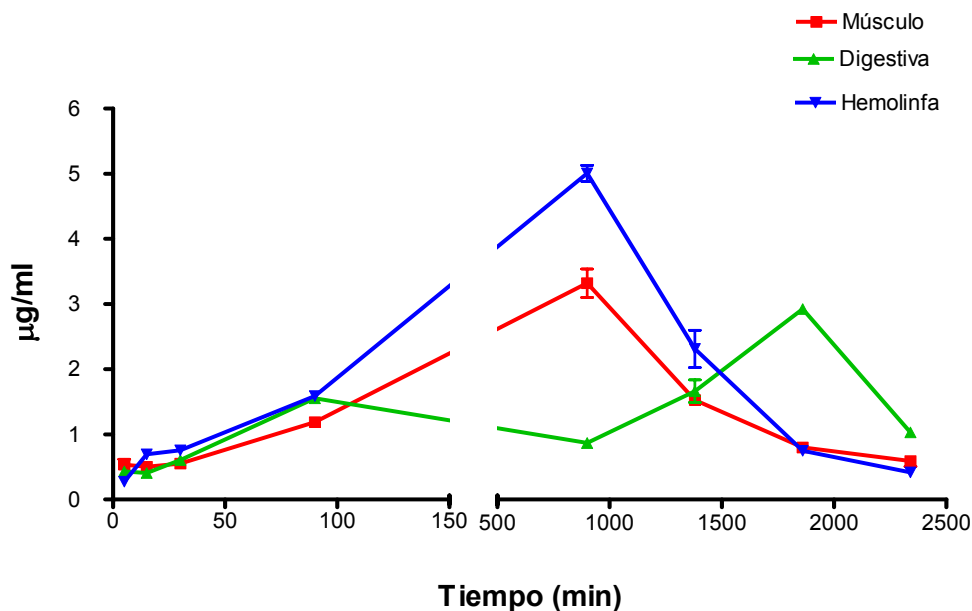
Los valores del área bajo la curva son similares para ambos antibióticos (Ver tabla N°27).

### **8.3.1.3 Análisis de ácido oxolínico y flumequina en glándula digestiva.**

Ácido oxolínico fue detectado y cuantificado en glándula digestiva. Flumequina no fue detectada en este órgano por medio de HPLC.

El gráfico N°7 muestra las curvas de absorción y eliminación ácido oxolínico en los tres tejidos estudiados, expresados en µg/ml versus tiempo.





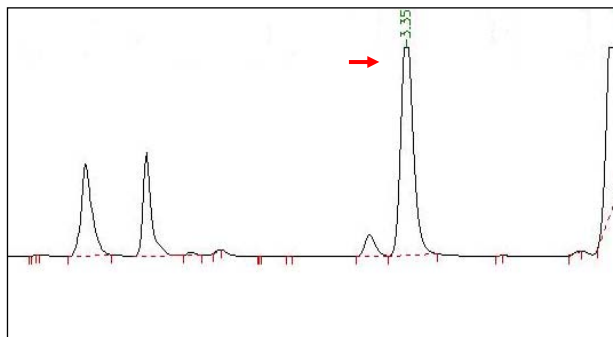
**Gráfico N° 7:** Absorción y eliminación de ácido oxolínico en músculo, glándula digestiva y hemolinfa expresados en µg/ml versus tiempo en Abalón rojo (*Haliotis rufescens*). . Cada punto representa la media aritmética  $\pm$  S.D. de al menos 2 experimentos en triplicado.

La curva que describe el comportamiento de ácido oxolínico en glándula digestiva (color verde), muestra una cinética de absorción lineal comenzando con 0,45 µg/ml a los 5 min llegando a 1,65 µg/ml a los 90 min. Posteriormente se observa un descenso de la curva llegando a 0,92 µg/ml a los 900 min en el estudio de absorción de ácido oxolínico. Al comenzar el estudio de la cinética de eliminación se observó que a las 8 h después del primer cambio de baño libre de antibiótico registró una cinética lineal en ascenso desde 0,92 µg/ml a 3,11 µg/ml

(desde 900 a 1860 min respectivamente), para luego volver a descender hasta 1,11  $\mu\text{g/ml}$  (2360min).

Los parámetros farmacocinéticos determinados para ácido oxolínico en glándula digestiva fueron:  $t_{1/2}$  absorción: 43,04 h,  $t_{1/2}$  eliminación: 12,04 h y área bajo la curva (ABC): 1073,2  $\mu\text{g/ml} \times \text{min}$ .

La figura N°13 muestra el cromatograma representante de ácido oxolínico en glándula digestiva.



**Fig. N°13:** Cromatograma de cinética de eliminación de ácido oxolínico en glándula digestiva a los 1860 min. (31 h).

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1 Validación de los métodos analíticos para ácido oxolínico y flumequina

#### 9.1.1 Linealidad.

El coeficiente de correlación  $r$  es de 0,9995 y 0,9997 para ácido oxolínico y flumequina respectivamente. Touraki (2000), Roudaut (2002) y López (2005), plantean que para que el método se considere lineal, el coeficiente de correlación debe ser mayor que 0,999. Como los valores obtenidos son mayores a esta cifra el sistema cumple con los requisitos de linealidad dentro del rango de trabajo, tanto para ácido oxolínico como para flumequina, esto quiere decir que existe una proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta (Roudaut y col., 2002).

#### 9.1.2 Precisión.

La A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists), en el manual de verificación de rangos para métodos analíticos incluye una tabla con datos de precisión en función de la concentración del analito (anexo N° 2, tabla N° 28). Los resultados obtenidos en este parámetro tanto para ácido oxolínico como para flumequina fueron óptimos y aceptables según la A.O.A.C.; a excepción de la reproducibilidad del método analítico con ácido oxolínico. Este resultado no quiere decir que el parámetro de precisión sea deficiente dentro de la validación, sólo deja la posibilidad de corregir errores en la técnica utilizada.

### 9.1.2.1 Determinación de la precisión del sistema instrumental

#### ➤ ***Repetibilidad del sistema instrumental***

Basado en la tabla de la A.O.A.C. se estima que los valores promedios de los coeficientes de variación tanto para ácido oxolínico como para flumequina se encuentran dentro de los rangos aceptados, puesto que para concentraciones que van de 2,5 a 50 ppm (para ácido oxolínico) y 10 a 50 ppm (para flumequina), deben tener %CV bajo 5,3%, por lo tanto el sistema instrumental es preciso para ambos antibióticos bajo condiciones de repetibilidad

#### ➤ ***Reproducibilidad del sistema instrumental***

En el caso de la reproducibilidad del sistema instrumental se estima que los valores promedios de los coeficientes de variación tanto para ácido oxolínico (CV: 1,33%), como para flumequina (CV: 1,77%), se encuentran dentro de los rangos aceptados, según la A.O.A.C., puesto que para ambos antibióticos se usó una concentración de 10 ppm lo que corresponde a tener un %CV bajo 7,3%. De esta forma, el sistema instrumental es preciso para ambos antibióticos bajo condiciones de reproducibilidad

### 9.1.2.2 Determinación de la precisión del método analítico

#### ➤ ***Repetibilidad del método analítico***

Basado en la tabla de la A.O.A.C. (anexo N° 2, tabla N° 28) se estima que los valores promedios de los coeficientes de variación tanto para ácido oxolínico (CV: 3,42%), como para flumequina (CV: 2,21%), se encuentran dentro de los rangos aceptados, puesto que para concentraciones que van de 2,5 a 50ppm para

ácido oxolínico y 10 a 50 ppm para flumequina deben tener %CV bajo 5,3%, por lo tanto el método es preciso bajo condiciones de repetibilidad.

➤ **Reproducibilidad del método analítico**

En el caso de la reproducibilidad del método se estima que los valores promedios de los coeficientes de variación (anexo N° 2, tabla N° 28), para flumequina (CV: 4,28%), se encuentran dentro de los rangos aceptados según la A.O.A.C. ya que se usaron concentraciones de 10 a 50 ppm correspondiendo a tener un %CV bajo 5,3%, por lo tanto el método es preciso bajo condiciones de repetibilidad.

Por el contrario, ácido oxolínico (CV: 6,54%), se encuentra fuera del rango de aceptabilidad, ya que para concentraciones de trabajo de 2,5 – 50 ppm el %CV debe ser inferior a 5,3%. Esto puede deberse a factores tales como errores en la preparación de las soluciones estándar, o una mala manipulación de las muestras en el transcurso del análisis, dejando la posibilidad de corregir errores en la técnica utilizada.

### **9.1.3 Exactitud / Recuperación.**

Las recuperaciones para ácido oxolínico en músculo, glándula digestiva y hemolinfa fluctuaron entre 86% - 94% y para flumequina en los mismos tejidos fluctuaron entre 86% - 104%. Según la tabla de criterios de la A.O.A.C. (anexo N° 2, tabla N° 29) que relaciona la concentración del analito con el porcentaje de recuperación, los resultados tanto para ácido oxolínico como para flumequina estarían dentro de los rangos de aceptabilidad. Lo anterior indica que el método

analítico implementado es exacto para los tres tejidos analizados, debido a que la A.O.A.C. establece que para este rango de concentraciones (2,5 a 50ppm) el porcentaje de recuperación aceptado debe ser de 80 a 110 %.

Por otro lado al aplicar la *t* de student se obtuvieron valores de *t* experimental que fluctuaron entre 3,22 y 10,57 para ácido oxolínico y -1,59 y 17,48 para flumequina. Los valores obtenidos se alejan del *t* tabulado para  $p=0,05$  y  $n-1$  grado de libertad que es de 1,86 (anexo N° 1, tabla N°31) especialmente para el *t* tabulado de ácido oxolínico en hemolinfa (10,57) y flumequina en glándula digestiva (17,48). La diferencia entre el valor obtenido y el valor verdadero se puede deber a que la técnica en el análisis es laboriosa y que los tejidos analizados son de diferente composición orgánica dificultando una óptima extracción del analito. Esto se puede corregir analizando los errores que se puedan cometer en la elaboración de los estándares y/o optimizando las técnicas de extracción orgánica de las diferentes matrices analizadas. Así, por ejemplo, se tuvo que adicionar una tercera extracción con acetato de etilo para la extracción de flumequina en glándula digestiva, ya que esta matriz por su diversidad orgánica presentó una mayor dificultad en la extracción del analito.

#### **9.1.4 Selectividad.**

Los tiempos de retención para ácido oxolínico y flumequina fueron de 3,619 minutos  $\pm$  0.01197 y 4,024 minutos  $\pm$  0.02757 (ver tablas N° 11 y N°22). Además la identidad de ambos antibióticos se confirmó co-inyectando estándar a la muestra y se observó el aumento del pico sin la aparición de ensanchamiento de

bandas, tampoco se observó la formación de hombros, lo que confirma una selectividad adecuada del método (Quattrochi y col., 1992).

#### **9.1.5 Sensibilidad.**

A partir de una curva de calibración de bajas concentraciones y la inyección de 10 blancos (fase móvil) se obtuvo el límite de detección y cuantificación para ácido oxolínico cuyo valor es de 0,002473  $\mu\text{g/ml}$  y 0,008244  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. Para flumequina los valores tabulados fueron: 0,0414  $\mu\text{g/ml}$  para el límite de detección y 0,1380  $\mu\text{g/m}$  para el límite de cuantificación. Estos valores nos indican que la sensibilidad del método es adecuada al compararlos con los valores encontrados en la bibliografía, donde los valores de sensibilidad son poco eficientes al compararlos con los resultados obtenidos en este estudio (Touraki y col., 2000; Roudaut y col., 2002).

De esta forma podemos decir que en la determinación de ácido oxolínico y flumequina se pueden cuantificar y detectar los analitos de manera confiable.

## **9.2 Farmacocinética de ácido oxolínico y flumequina**

En Chile la acuicultura es la segunda industria exportadora más grande del momento, en la cual el abalón es una de las nuevas especies emergentes (Monje y col., 2006). El abalón rojo (*H. rufescens*) es cultivado en Chile desde 1988 y en pocos años a experimentado un gran crecimiento (Woywood y col., 2006). Dentro de las enfermedades infecciosas más relevantes de este molusco se encuentra el *Whithering Síndrome* o Síndrome de Deshidratación. Esta enfermedad es fatal

para la especie *Haliotis spp*, pues causa la degeneración de la glándula digestiva, desestabilizando la función de este órgano y conduciendo al catabolismo del músculo del pie que finalmente origina la muerte (Friedman y col., 2000, Friedman y col., 2003). De acuerdo a esto, a partir de estudios de desafío y farmacocinética de oxitetraciclina (OTC), se observó que el agente causal del *Whithering Syndrome* es sensible a esta droga. Tomando en cuenta este evento, nuestro estudio consistió en evaluar la farmacocinética de las quinolonas ácido oxolínico y flumequina. Como objetivo fundamental se planteó el diseño y modificación, a partir de la bibliografía existente, de un sistema de detección y cuantificación de quinolonas en órganos de abalón, obteniendo de esta forma los datos para establecer la farmacocinética de ambos antibióticos.

Los estudios realizados con OTC utilizan como vías de administración la inyección y la alimentación (Beverly y col., 2005; Friedman y col., 2003). En este estudio se diseñó un plan piloto cuya vía de administración de la droga fue baño, ya que desde un punto de vista productivo su manejo es más aplicable, sencillo y de bajo presupuesto. En esta vía sólo se debe disponer de una solución que se vierte en el agua y se debe esperar un corto período de tiempo para que los moluscos integren el antibiótico a su organismo. Al respecto, Friedman y col., (2003), utilizando alimento sólo lograron una concentración de OTC en músculo de 25 ppm, luego de 14 días. En nuestras condiciones experimentales, se detectaron concentraciones de 23 ppm de ácido oxolínico y 18 ppm de flumequina en este mismo tejido al cabo de tan sólo 15 horas (900 min). Otras desventajas, para vías de administración distintas de baño, son en cuanto al manejo y costos implicados para su ejecución. Podemos ver que el uso de inyección implica la administración



periódica de la dosis, a lo que se suma el estrés provocado a los animales cada vez que se debe aplicar la inyección. Asimismo, cuando se administra un antibiótico vía alimentación, implica la compleja preparación del alimento y el pesaje periódico de este para determinar si la dosis administradas son suficientes para llegar a los órganos diana. Otra desventaja es que los abalones sufren de inanición, en el caso de la infección con *Whithering Síndrome*, lo que conlleva a obtener un tratamiento no efectivo, como se describió en Frieman y col., 2003.

Si bien, varios métodos de extracción orgánica (Touraki y col., 2001; Roudaut y col., 2002), y de HPLC (Robert y col., 1998; Touraki y col., 2001; Delepee y col., 2002; Roudaut y col., 2002) han sido desarrollados y publicados para una buena extracción orgánica y cuantificación de quinolonas en otros organismos, este estudio es el primero en describir un método eficiente, simple y rápido en cuanto a la alta recuperación de sus analitos desde tejidos de abalón (ver punto 9.1.3), que se refleja en el alto nivel de especificidad, sensibilidad y buena selectividad del proceso cromatográfico (HPLC), validado en este trabajo. El desarrollo de la extracción orgánica y HPLC, servirá para promover la detección y control de residuos de ácido oxolínico y flumequina en órganos de abalón lo cual apunta a minimizar el riesgo de la salud humana asociada al consumo de residuos (Gesche y col., 1998; Prado y col., 2002).

De acuerdo a los resultados analíticos y cromatográficos obtenidos, se pudo establecer y comparar la cinética de absorción y eliminación de ácido oxolínico y flumequina y comparar estos resultados con los descritos para OTC como antibiótico (Friedman y col., 2000, Friedman y col., 2003).

Al analizar el comportamiento de ambos antibióticos en tejido muscular se evidencian las diferencias entre los resultados de la  $t_{1/2}$  de absorción y eliminación (ver tabla N°26, gráfico N°5), donde se observa que ácido oxolínico se absorbe más rápidamente y se elimina más lentamente que flumequina. Esto sugiere que ácido oxolínico se encuentra con mayores barreras fisiológicas para ser incorporado al molusco que al eliminarlo de su organismo. Por consiguiente, la cinética de absorción y eliminación de flumequina ocurre inversamente a ácido oxolínico. En cuanto al ABC, no existen mayores diferencias entre ambas moléculas.

Por otro lado, en hemolinfa (ver gráfico N°6), flumequina se absorbe y se elimina más rápidamente que ácido oxolínico (ver tabla N°27). Esto puede deberse a que posee un alto coeficiente de partición ( $pK_{ow}$ : 0,97), teniendo de esta forma una mayor facilidad para atravesar membranas.

Con respecto a las altas concentraciones del área bajo la curva tanto de ácido oxolínico como de flumequina en hemolinfa (ver tabla N°27), se puede decir que es beneficioso desde el punto de vista de una eventual terapia antibiótica pues aseguraría que ambos fármacos son transportados desde este tejido móvil (hemolinfa) hacia la mayoría de los órganos de este molusco. Además, este mismo hecho, sugiere que el abalón integra el fármaco vía branquias o por difusión pasiva y que posteriormente es distribuido hacia el músculo y glándula digestiva.

El gráfico N° 7 presenta el comportamiento de ácido oxolínico en los tres tejidos estudiados, observándose una cinética lineal tanto en músculo como en hemolinfa, mientras que la concentración en glándula digestiva permanece baja.

Una vez que se suspende la exposición del antibiótico al molusco, es decir cuando debería comenzar la cinética de eliminación, se observa un incremento en la concentración ácido oxolínico en glándula digestiva a medida que disminuye la concentración en músculo y hemolinfa. Esto sugiere que existe una recirculación desde músculo y hemolinfa hacia la glándula digestiva antes de eliminar el fármaco. Este hecho se corrobora al observar la  $t_{1/2}$  de eliminación de glándula digestiva, (12,04 h) siendo ésta la más alta del estudio, ya que eventualmente debería de eliminar tanto la concentración de antibiótico presente en la glándula digestiva como también el remanente proveniente de músculo y hemolinfa, tejidos donde se registraron las ABC más altas del estudio de ácido oxolínico.

En resumen se sugiere que el abalón integra ácido oxolínico vía branquias y/o difusión pasiva, llegando primero a hemolinfa y distribuyéndose hacia otros órganos como músculo y glándula digestiva. Posteriormente al ser interrumpida la entrega de fármaco vía baño el molusco comienza a eliminar lo que ha concentrado en sus tejidos utilizando como vía de eliminación la glándula digestiva acumulándose en este tejido por un mayor tiempo.

El hecho de que flumequina no fue detectada en glándula digestiva puede deberse a que su presencia esté por debajo de su límite de detección (0,00414ppm), lo cual podría ser explicado por la diferencia en los niveles de detección entre ácido oxolínico y flumequina, donde éste último fue 16 veces menos sensible.

Dentro de este estudio lo más relevante es que al compararlo con los estudios realizados con OTC, ácido oxolínico y especialmente flumequina tienen

una cinética de eliminación extremadamente rápida. Así por ejemplo en el estudio de Friedman y col. (2003), se observó que en un período de 15 días OTC disminuyó de 25 ppm a 2 ppm en músculo de abalón, correspondiendo al 93% de su concentración máxima y registraron la ausencia total del antibiótico en este tejido en un período de 22 días. En este estudio se observó que luego de 32 h ácido oxolínico disminuyó en un 73% su concentración máxima en tejido muscular (23 ppm), y en tan sólo 8 h se detectó que el 80% de la concentración máxima de flumequina (30 ppm), había sido eliminada en este mismo tejido.

La importancia de determinar el período exacto en que el molusco está libre de fármaco, es evitar su posterior ingesta por parte de los consumidores ya que esto conllevaría a la aparición de cepas bacterianas mutantes resistentes a los antibióticos e hipersensibilidad (Gesche y col., 1998; Díaz y col., 2001; Farias y col., 2002; Prado y col., 2002; Cabello y col., 2004; Molero-Saras y col., 2006; Cabrera y col., 2007; Fortt y col., 2007).

En este sentido, se debe considerar que flumequina y ácido oxolínico son las quinolonas de mayor importación y uso en acuicultura en nuestro país y que muchos antibacterianos usados en producción animal y en especial en medicina veterinaria están relacionados estructuralmente a aquellos antimicrobianos que son utilizados en medicina humana (Millanao 2002).

De esta forma se sugiere que los centros de cultivo de abalón tengan un exhaustivo control sobre el nivel de residuos de medicamentos proponiendo procedimientos de muestreos oficiales que consideren la toma de muestras en las plantas de procesos (Diario Oficial de las Comunidades Europeas 2002), Lo

anterior permitirá incentivar el uso responsable de estas drogas y aplacar al máximo el eventual impacto negativo al medio ambiente.

## 10. CONCLUSIONES.

- Se estableció una metodología de administración de ácido oxolínico y flumequina vía baño en abalón rojo (*H. rufescens*).
- Se estableció una metodología de extracción orgánica de alta recuperación, precisa y confiable para ácido oxolínico y flumequina en tejido muscular, glándula digestiva y hemolinfa de abalón rojo.
- Se implementó y validó una técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), donde se logró determinar cualitativa y cuantitativamente los analitos de los antibióticos ácido oxolínico y flumequina.
- Se logró detectar analitos de ácido oxolínico en músculo, hemolinfa y glándula digestiva por medio de la técnica de HPLC. Las concentraciones máximas y mínimas (5,79 y 0,19 µg/ml respectivamente) se detectaron en hemolinfa.
- Se logró detectar analitos de flumequina en músculo y hemolinfa por medio de la técnica de HPLC. La concentración máxima fue 3,82 µg/ml y la mínima fue 0,71 µg/ml detectadas en hemolinfa y músculo respectivamente. No se detectó la presencia de flumequina en glándula digestiva.
- Se logró determinar los parámetros farmacocinéticos de concentración máxima, área bajo la curva, vida media de absorción y vida media de eliminación, de ácido oxolínico y flumequina en órganos de abalón rojo.
- Las curvas de absorción y eliminación son similares para ácido oxolínico y flumequina.

➤ Hemolinfa y músculo presentaron mayores niveles de ácido oxolínico que en glándula digestiva, lo que podría sugerir que el abalón integra el analito vía branquias y/o difusión pasiva.

## Proyecciones

Al haber establecido una técnica de detección de analitos de ácido oxolínico y flumequina en tejidos de abalón rojo (*H. rufescens*) se entregaron las herramientas para que se efectúen estudios de desafío con el agente *Candidatus Xenohaliotis Californiensis* u otras bacterias que afecten los abalones. De esta forma se podrá probar y establecer medidas efectivas para el control de enfermedades bacterianas en abalón rojo.

El desarrollo de la extracción orgánica y HPLC, servirá para promover la detección y control de residuos de ácido oxolínico y flumequina en órganos de abalón. Esto apuntará a minimizar el riesgo de la salud humana asociada al consumo de productos de la acuicultura que contengan residuos de antibióticos.

Además servirá en un futuro para determinar el límite máximo de residuos para estos compuestos, en posteriores estudios y utilización de estos antibióticos en enfermedades infecciosas de abalón.

De esta forma se sugiere que los centros de cultivo de abalón tengan un exhaustivo control sobre el nivel de residuos de medicamentos proponiendo procedimientos de muestreos oficiales que consideren la toma de muestras en las plantas de procesos, tal como se hace con la industria salmonera.



## 11. BIBLIOGRAFÍA

**ANDRIOLE, V. (1989).** Las Quinolonas. London: Academia Press Limited.  
Capítulo 1: Las Quinolonas. Mecanismo de acción. pp: 3-4

**ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). (1990).**  
Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Analytical Chemists,  
Arlington, VA, pp. 115-118, 126-137.

**BAUTISTA, C. (1989).** Moluscos, tecnología de cultivo. Editorial Mundi-  
Prensa, Madrid España pp 54-55 y 143-144.

**BRAID, B., MOORE, J., ROBBINS, T., HEDRICK, R., TJEERDEMA, R.,  
FRIEDMAN, C. (2005).** Health and survival of red abalone, *Haliotis rufescens*,  
under varying temperature, food supply, and exposure to the agent of Withering  
syndrome. Invertebrate Pathologic. 89: 219-231.

**CABELLO, F. (2004).** Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias  
para la salud humana y animal. *Rev. méd. Chile*, vol.132, no.8, p.1001-1006. ISSN  
0034-9887

**CABRERA, C., GOMEZ, F., ZUNIGA, A. (2007).** La resistencia de bacterias  
a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos  
de supervivencia y adaptación. *Colomb. Med.*, ene./mar., vol.38, no.2, p.149-158.  
ISSN 1657-9534.

**CACERES, J. (2000).** Enfermedades de los abalones. En: Seminario: El  
cultivo de abalón en Chile, situación actual y perspectivas, Fundación Chile.  
Puerto Montt, Chile.

**DEPARTMENT OF FISH AND GAME. (1995).** California abalone. Technical Bulletin. The Resources Agency. State of California.

**DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. (2002).** Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto el funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. pp: 5-15.

**DÍAZ, D., PICCO, E.J., ENCINAS, T. (2001).** Residuos tisulares de nicotinato de norfloxacin administrado por vía oral en cerdos. *Arch. med. vet.*, vol.33, no.1, p.37-42.

**DÍAZ, P., FERNÁNDEZ, P. (2002).** Determinación del tamaño muestral para calcular la significación del coeficiente de correlación lineal. *Cad. Aten. Primaria* 9, 209-211.

**DELÉPÉE, R., POULIQUEN, H. (2002).** Determination of oxolinic acid in the bryotype *Fontinalis antipyretica* by liquid chromatography with fluorescent detection. *Journal of Chromatography B.* 775: 89-95

**ENRIQUEZ, V., GODOY, M., MONRAS, M., MUÑOZ, G. (2003),** Manual de Necropsia y Envío de Muestras de Abalón (*Haliotis sp.*). Proyecto FONDEF D 01 1074.

**FALLU, R. (1991).** Abalone Farming. Editorial Fishing News Books. Oxford.

**FARIAS, J., GARCIA, A., IZQUIERDO, P. (2002).** Aislamiento de bacterias gram positivas de leche cruda con residuos de antimicrobianos. *ALAN*, mar. vol.52, no.1, p.68-73. ISSN 0004-0622

**FAUNE, C. (2003).** Principales causas de mortalidad bacteriana en los primeros estadios de desarrollo de abalón rojo (*Haliotis rufescens*) Memoria de Titulación. Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile. pp 5.

**FLOREZ, J. (1997)**, Farmacología Humana. 3ª Edición. Masson, S.A. Barcelona España. Capítulo 68: J.R. Azanza, B. Badaba, A. Mediavilla: Quinolonas. Sulfamidas. Trimetoprina. Clotrimoxazol. Nitrofurantoína: Quinolonas. pp: 1145-1149.

**FORTT, A., CABELLO, F., BUSCHMANN, A. (2007)**. Residuos de tetraciclina y quinolonas en peces silvestres en una zona costera donde se desarrolla la acuicultura del salmón en Chile. *Rev. chil. infectol.*, vol.24, no.1, p.14-18. ISSN 0716-1018.

**FRIEDMAN, C., TJEERDEMA, R., MOORE, J., VIANT, M. (2006)**. Pharmacokinetics and efficacy of oxytetracycline in RLP-infected abalone. [http://repositories.edlib.org/csgc/rp/PPAqua06\\_01](http://repositories.edlib.org/csgc/rp/PPAqua06_01).

**FRIEDMAN, C., HEDRICK, R., MOORE, J. (2003)**. Tools for management of Withering syndrome in abalone, *Haliotis spp*: PCR detection and feed-based therapeutic treatment. [http://repositories.edlib.org/csgc/rer/Aqua03\\_02](http://repositories.edlib.org/csgc/rer/Aqua03_02).

**FRIEDMAN, C., TREVELYAN, G., ROBBINS, T., MULDER, E., AND FIELDS, R. (2003)**. Development of an oral administration of oxytetracycline to control losses due to Withering syndrome in cultured red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture* 224: 1-23

**FRIEDMAN, C., ANDREE, K., BEAUCHAMP, K., MOORE, J., ROBBINS, T., SHIELDS, J., HEDRICK, R. (2000)**. "*Candidatus Xenohaliotis californiensis*", a newly described pathogen of abalone, *Haliotis spp.*, along the west coast of North America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 847-855.

**GESCHE, E. Y EMILFORK, C. (1998)**. Residuos de antimicrobianos en canales de vacas. vol.30, no.2, pp.137-143.

**GUZMÁN, C. (2003).** Fotografía de una industria cautivante. AquaNoticias 76:33-40

**HAHN, K. (1989).** Handbook of culture of abalone and other marine gastropods. Ed. Cre press.London, England.

**HASSOUAN, M. (2006).** Desarrollo de nueva metodología analítica para la determinación de quinolonas en alimentos de origen animal. Tesis doctoral. Departamento de química analítica. Universidad de Granada, España.

**HUBER, L. (1998).** Validation of analytical methods en [www.labcompliance.com](http://www.labcompliance.com).

**HUSTVEDT, S.O., AND SALTE, R. (1991).** Distribution and elimination of oxolinic acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) after a single rapid intravascular injection. Aquaculture 92: 297-303.

**LOPEZ, L., BARONI, A., RODRIGUEZ, V. (2005).** Desarrollo y validación de un método por HPLC para la determinación de niveles de vitamina A en leche materna. Su aplicación a una población rural de Argentina. *ALAN*, vol.55, no.2, p.140-143.

**MANOSALVA, C. (2005).** Desarrollo, implementación y validación de una metodología analítica por HPLC para la identificación y cuantificación de alantoína en baba de caracol chileno (*Helix aspersa müller*). Memoria de Titulación. Escuela de Química y Farmacia. Universidad Austral de Chile.

**MILLANAO, A. (2002).** Estudio cualitativo y cuantitativo de las Quinolonas y Fluoroquinolonas importadas y autorizadas para uso y disposición en Medicina y en Veterinaria en Chile, en el período 1998-2001. Consideraciones sobre su

impacto para la Salud Pública y el Medio Ambiente. Memoria de Titulación. Escuela de Química y Farmacia. Universidad Austral de Chile.

**MONJE, V., MONRÁS, M., QUINTEROS, V., ENRÍQUEZ, R.** Characterization of the aerobic bacterial biota of *Haliotis rufescens* digestive tract. *Book of abstracts. VI International Abalone Symposium.* Puerto Varas, Chile. pp:111

**MOLERO-SARAS, L., PEREZ-AREVALO, M., SANCHEZ-VILLALOBOS, A. et al. (2006).** Residuos de enrofloxacin en tejido hepático y muscular de pollos beneficiados en el municipio san francisco del estado zulia, venezuela. *Rev. Cient. (Maracaibo)*, vol.16, no.6, p.629-633.

**PUENTES, P. (2004).** Ivens S.A. Introducción a la cromatografía de líquidos de alto performance. pág: 77.

**PRADO, G., CARABIAS, R., RODRÍGUEZ, G., HERNÁNDEZ, E. (2002),** Presencia de residuos y contaminantes en leche humana. *Rev. Esp. Salud Publica*, mar., vol.76, no.2, p.121-132. ISSN 1135-5727.

**QUATTROCHI, O. A., ABELAIRA DE ANDRIZZI, S. I., LABA, R..F. (1992).** Introducción a HPLC aplicación y práctica. Buenos Aires, Argentina. Pag: 381

**ROBERT, K., MUNNS, SHERRI B, TURNIPSEED, ALLEN P.PFENNING, JOSÉ E. ROYBAL, DAVID C. HOLLAND, AND AUSTIN R. LONG. (1998).** Liquid Chromatographic Determination of Flumequine, Nalidixid Acid, Oxolinic Acid, and Piromidic Acid Residues in Catfish (*Ictalurus punctatus*). *Journal of AOAC International* 81(4): 825-838.

**ROUDAUT, B., YORKE, J. (2002).** High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the screening and quantification of oxolinic acid, flumequine and sarafloxacin in fish. *Journal of Chromatography B* 780: 481-485.

**SHEPHARD, S.A., TEGNER, M. J., GUZMAN, S.A. (1992).** Abalone of the world. Ed. Fishing News Books. Oxford, England.

**SU, SH., CHANG, M., CHANG, P., CHANG, C., CHOU, S. (2003).** Simultaneous determination of quinolones in livestock and marine product by high performance liquid chromatography. Vol 11, N°2: 114-127.

**TOURAKI, M., LADOUKAKIS, M., PROKOPIOU, C. (2001).** High-performance liquid chromatographic determination of, Oxolinic Acid, and Flumequine in the live fish feed *Artemia*. *Journal of Chromatography B* 751: 247-256.

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA. (1997).** Curso de determinación de fármacos por HPLC en fluidos biológicos. Salamanca. Pág.: 107.

**VIANA, M. (2004).** Avances en la Nutrición, Fisiología Digestiva y Metabolismo del Abulón. Boletín informativo trimestral de la Sociedad Mexicana de Abulón.

**VIDAL, L. (2002).** Mitos y verdades sobre el uso de antibióticos en salmones. *Aquanoticias* 68: 80-87.

**WOYWOOD, D., ENRIQUEZ, R. (2006).** Tolerance of the red abalone *Haliotis rufescens* to the exposure to air, sea water with low levels of salinity and fresh water. *Book of abstracts. VI International Abalone Symposium*. Puerto Varas, Chile. pp:111.

**WU, P., LAWRENCE, L., DENBLEYKER, K., BARRETT J. (2001)**  
Mechanism of action of the Des-F(6) quinolone BMS-284756 measured by supercoiling inhibition and cleavable complex assays. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. B 45: 3660-3662.

## ANEXOS

### Anexo N°1: Ejemplo de cálculo

#### Ejemplo N° 1: Ejemplo de cálculo para recuperación de tejido muscular (primera inyección; concentración 2,5µg/ml)

Para el cálculo del porcentaje de recuperación se usó la siguiente formula:

$$R=(X_i /X_0) \times 100$$

Donde  $X_i$  corresponde al valor entregado por el equipo y  $X_0$  el valor verdadero

Datos:

$X_i$ : 0,414(µg/ml)

$X_0$ : 0,5(µg/ml)

**%Recuperación =  $\frac{0,414(\mu\text{g/ml})}{0,5(\mu\text{g/ml})} \times 100$**

0,5(µg/ml)

**%Recuperación = 82,8 %**



**Ejemplo N° 2: Ejemplo de cálculo para el t experimental en recuperación de tejido muscular**

Según la siguiente fórmula:

$$t_{exp} = \frac{(100-R) \sqrt{n}}{C.V.}$$

Donde R es el porcentaje de recuperación obtenido, n el total de inyecciones realizadas y C.V. el coeficiente de variación.

Datos:

R: 86,4

C.V: 12,64

n: 9

$$t_{exp} = \frac{(100-86,4) \sqrt{9}}{12,64}$$

12,64

$$t_{exp} = 3,22$$

**Ejemplo N° 3:** Ajuste de datos en base al % de recuperación (Tabla N° 5):

**Datos:**

Tiempo (min): 5

Peso total del músculo: 2.157 mg

Concentración detectada por HPLC: 0,349 µg/ml

Recuperación en músculo: 86,4%

0,349  $\mu\text{g}/\text{m}$   $\rightarrow$  86,4%  $\rightarrow$  porcentaje de recuperación

X  $\rightarrow$  100%

---

X = 0,403  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\rightarrow$  concentración modificada

0,403  $\mu\text{g}$   $\rightarrow$  1000  $\mu\text{l}$

X  $\rightarrow$  500  $\mu\text{l}$

---

X = 0,2019  $\mu\text{g}$   $\rightarrow$  en la muestra inyectada al HPLC

0,2019  $\mu\text{g}$   $\rightarrow$  100 mg  $\rightarrow$  cantidad de muestra analizada

X  $\rightarrow$  2.157 mg  $\rightarrow$  peso total del músculo de abalón

---

X = 4,356  $\mu\text{g}$   $\rightarrow$  cantidad total de antibiótico  
en músculo del abalón.

4,356  $\mu\text{g}$   $\rightarrow$  2.157 mg

X  $\rightarrow$  1.000 mg

---

X = 2,019 ppm  $\rightarrow$  concentración en partes por  
millón.

**Ejemplo N° 4:** Obtención de resultados para experimento de eliminación de ácido oxolínico en hemolinfa de abalón (Tabla N° 7):

**Datos:**

Tiempo: 900 min

Concentración detectada por HPLC: 4,583 µg/ml

Recuperación en hemolinfa: 86,0%

$$\begin{array}{l} 4,583 \text{ µg/ml} \rightarrow 86,0\% \rightarrow \text{porcentaje de recuperación} \\ X \rightarrow 100\% \end{array}$$


---

$$X = 5,329 \text{ µg/ml} \rightarrow \text{concentración modificada}$$

$$\begin{array}{l} 5,329 \text{ µg} \rightarrow 1.000 \text{ µl} \\ X \rightarrow 500 \text{ µl} \end{array}$$


---

$$X = 2,6645 \text{ µg} \rightarrow \text{en la muestra inyectada al HPLC}$$

$$\begin{array}{l} 2,6645 \text{ µg} \rightarrow 100 \text{ µl} \rightarrow \text{volumen de hemolinfa analizada} \\ X \rightarrow 1.500 \text{ µl} \rightarrow \text{volumen aproximado total de hemolinfa} \\ \text{en abalón.} \end{array}$$


---

$$X = 39,96 \text{ µg} \rightarrow \text{antibiótico total en hemolinfa de abalón.}$$

$$\begin{array}{l} 39,96 \text{ µg} \rightarrow 1.500 \text{ µl} \\ X \rightarrow 1.000 \text{ µl} \end{array}$$


---

$$X = 26,64 \text{ ppm} \rightarrow \text{concentración en partes por millón}$$

## Anexo N°2: Tablas

**Tabla N°28:** Criterios de aceptación para el parámetro de precisión en función de la concentración del analito de la AOAC

Analito%	Radio analito	Unidad	C.V. (%)
100	1	100%	1.3
10	10-1	10%	2.8
1	10-2	1%	2.7
0.1	10-3	0.1%	3.7
0.01	10-4	100ppm	5.3
0.001	10-5	10ppm	7.3
0.0001	10-6	1ppm	11
0.00001	10-7	100ppb	15
0.000001	10-8	10ppb	21
0.0000001	10-9	1ppb	30

**Tabla N°29:** Criterio de aceptación del parámetro de exactitud, relacionando el % de recuperación en función de la concentración del analito.

Analito%	Radio analito	Unidad	Porcentaje de recuperación
100	1	100%	98-102
$\geq 10$	10-1	10%	98-102
$\geq 1$	10-2	1%	97-103
$\geq 0.1$	10-3	0.1%	95-105
0.01	10-4	100ppm	90-107
0.001	10-5	10ppm	80-110
0.0001	10-6	1ppm	80-110
0.00001	10-7	100ppb	80-110
0.000001	10-8	10ppb	60-115
0.0000001	10-9	1ppb	40-120

**Tabla N° 30:** Valores críticos de la r de Pearson para una prueba unilateral según grados de libertad (N-2).

N - 2	0.05	0.025	0.01	0.005
1	0.988	0.997	0.9995	0.9999
2	0.900	0.950	0.980	0.990
3	0.805	0.878	0.934	0.959
4	0.729	0.811	0.882	0.917
5	0.669	0.754	0.833	0.874
6	0.622	0.707	0.789	0.834
7	0.582	0.666	0.750	0.798
8	0.549	0.632	0.716	0.765
9	0.521	0.602	0.685	0.735
10	0.497	0.576	0.658	0.708
11	0.476	0.553	0.634	0.684
12	0.458	0.532	0.612	0.661
13	0.441	0.514	0.592	0.641
14	0.426	0.497	0.574	0.623
15	0.412	0.482	0.558	0.606
16	0.400	0.468	0.542	0.590
17	0.389	0.456	0.528	0.575
18	0.378	0.444	0.516	0.561
19	0.369	0.433	0.503	0.549
20	0.360	0.423	0.492	0.537
21	0.352	0.413	0.482	0.526
22	0.344	0.404	0.472	0.515
23	0.337	0.396	0.462	0.505
24	0.330	0.388	0.453	0.496
25	0.323	0.381	0.445	0.487
26	0.317	0.374	0.437	0.479
27	0.311	0.367	0.430	0.471
28	0.306	0.361	0.423	0.463
29	0.301	0.355	0.416	0.456
30	0.296	0.349	0.409	0.449
35	0.275	0.325	0.381	0.418
40	0.257	0.304	0.358	0.393
45	0.243	0.288	0.338	0.372
50	0.231	0.273	0.322	0.354
60	0.211	0.250	0.295	0.325
70	0.195	0.232	0.274	0.302
80	0.183	0.217	0.256	0.283
90	0.173	0.205	0.242	0.267
100	0.164	0.195	0.230	0.254

**Tabla N°31:** Valores de t de Student y probabilidad P asociada en función de los grados de libertad (gl)

gl	P (de una cola)									
	0.4	0.25	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005	0.0025	0.001	0.0005
2	0.289	0.816	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	14.089	22.326	31.596
3	0.277	0.765	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	10.215	12.924
4	0.271	0.741	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	0.267	0.727	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
6	0.265	0.718	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	0.263	0.711	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
8	0.262	0.706	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	0.261	0.703	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	0.260	0.700	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	0.260	0.697	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	0.259	0.695	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	0.259	0.694	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	0.258	0.692	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	0.258	0.691	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	0.258	0.690	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	0.257	0.689	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	0.257	0.688	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	0.257	0.688	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	0.257	0.687	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	0.257	0.686	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	0.256	0.686	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	0.256	0.685	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.104	3.485	3.768
24	0.256	0.685	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	0.256	0.684	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	0.256	0.684	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.067	3.435	3.706
27	0.256	0.684	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.057	3.421	3.690
28	0.256	0.683	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	0.256	0.683	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.038	3.396	3.659
30	0.256	0.683	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
40	0.255	0.681	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
60	0.254	0.679	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
120	0.254	0.677	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	2.860	3.160	3.373
Infinito	0.253	0.674	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	2.807	3.090	3.291

**Tabla N° 32:** Absorción y eliminación de ácido oxolínico en músculo de abalón

Tiempo (min)	Peso (mg)	N° Muestra	C (µg/ml)	Ajuste por recuperación (µg/ml)	µg Totales	ppm
5	2.157,0	A	0,349	0,403	4,356	2,0
			0,368	0,425	4,593	2,1
			0,364	0,421	4,543	2,1
		B	0,683	0,790	8,520	4,0
			0,741	0,857	9,249	4,3
			0,717	0,829	8,950	4,1
15	1.703,0	A	0,464	0,537	4,572	2,7
			0,491	0,568	4,838	2,8
			0,497	0,575	4,898	2,9
		B	0,502	0,581	4,947	2,9
			0,524	0,606	5,164	3,0
			0,533	0,616	5,252	3,0
30	3.686,8	A	0,574	0,664	12,246	3,3
			0,598	0,692	12,758	3,4
			0,591	0,684	12,609	3,4
		B	0,539	0,623	11,499	3,1
			0,520	0,601	11,094	3,0
			0,504	0,583	10,753	3,0
90	4.395,3	A	1,123	1,299	28,564	6,5
			1,211	1,401	30,802	7,0
			1,188	1,375	30,217	6,8
		B	1,192	1,378	30,284	6,9
			1,221	1,413	31,057	7,0
			1,202	1,391	30,573	7,0
900	2.247,2	A	4,137	4,788	53,800	23,9
			4,423	5,119	57,517	25,6
			4,401	5,093	57,233	25,5
		B	3,479	4,026	45,243	20,1
			3,642	4,215	47,362	21,0
			3,648	4,222	47,438	21,1
1.380	1.476,0	A	1,436	1,666	12,265	8,9
			1,528	1,768	13,051	8,8
			1,513	1,751	12,923	8,7
		B	1,577	1,823	13,454	9,1
			1,569	1,815	13,401	9,0
			1,526	1,766	13,034	8,8
1.860	1.761,0	A	0,792	0,916	8,071	4,5
			0,778	0,900	7,928	4,6
			0,794	0,918	8,091	4,6
		B	0,868	1,004	8,845	5,0
			0,801	0,927	8,162	4,6
			0,777	0,899	7,918	4,5
2.340	965,40	A	0,479	0,554	2,676	2,7
			0,368	0,425	2,055	2,1
			0,400	0,462	2,23	2,3
		B	0,754	0,872	4,212	4,3
			0,774	0,895	4,324	4,4
			0,767	0,887	4,285	4,4
2.820	1.353,0	A	0,215	0,248	1,683	1,2
			0,184	0,212	1,440	1,1
			0,182	0,210	1,425	1,1
		B	0,223	0,258	1,746	1,3
			0,228	0,263	1,785	1,3
			0,222	0,256	1,738	1,3

**Tabla N° 33:** Absorción y eliminación de ácido oxolínico en glándula digestiva de abalón.

Tiempo (min)	Peso (mg)	N° Muestra	C (µg/ml)	Ajuste por recuperación (µg/ml)	µg Totales	ppm
5	259,4	A	0,431	0,458	0,594	2,3
			0,436	0,463	0,601	2,4
			0,447	0,475	0,616	2,4
		B	0,381	0,405	0,525	2,0
			0,407	0,432	0,561	2,2
			0,492	0,523	0,678	2,6
15	258,7	A	0,382	0,406	0,525	2,0
			0,384	0,408	0,526	2,0
			0,389	0,413	0,535	2,1
		B	0,421	0,447	0,579	2,2
			0,423	0,450	0,582	2,3
			0,444	0,472	0,610	2,4
30	130,3	A	0,608	0,646	0,421	3,2
			0,608	0,646	0,421	3,2
			0,607	0,645	0,420	3,2
90	259,1	A	1,390	1,478	1,915	7,4
			1,650	1,755	2,274	8,7
			1,453	1,545	2,002	7,7
		B	1,549	1,647	2,134	8,3
			1,675	1,781	2,308	9,0
			1,622	1,725	2,235	8,6
900	239,8	A	1,050	1,117	1,339	5,6
			0,928	0,987	1,183	5,0
			1,017	1,081	1,296	5,4
		B	0,700	0,744	1,070	4,5
			0,807	0,858	1,029	4,3
			0,710	0,755	0,905	3,8
1.380	308,7	A	1,275	1,356	2,093	6,8
			1,391	1,479	2,284	7,4
			1,296	1,378	2,128	7,0
		B	2,056	2,187	3,375	11,0
			1,694	1,802	2,781	9,0
			2,271	2,415	3,729	12,1
1.860	356,5	A	2,697	2,869	5,114	14,3
			2,938	3,125	5,571	15,6
			3,047	3,241	5,777	16,2
		B	2,762	2,938	5,237	14,7
			3,028	3,221	5,741	16,1
			3,087	3,284	5,853	16,4
2.340	313,8	A	0,824	0,876	1,375	4,4
			0,979	1,041	1,634	5,2
			1,077	1,145	1,797	5,7
		B	1,100	1,170	1,836	5,8
			1,097	1,167	1,831	5,8
			1,112	1,182	1,856	5,9
2.820	369,7	A	0,298	0,317	0,586	1,6
			0,474	0,504	0,932	2,5
			0,487	0,518	0,957	2,6
		B	0,414	0,440	0,814	2,2
			0,428	0,455	0,841	2,3



**Tabla N° 34:** Absorción y eliminación de ácido oxolínico en hemolinfa de abalón.

Tiempo (min)	N° Muestra	C (µg/ml)	Ajuste por recuperación (µg/ml)	µg Totales	ppm
5	A	0,327	0,380	0,190	2,0
		0,331	0,384	0,192	2,0
		0,361	0,419	0,209	2,1
	B	0,218	0,253	0,126	1,3
		0,196	0,227	0,113	1,1
		0,218	0,253	0,126	1,3
15	A	0,719	0,836	0,418	4,2
		0,713	0,829	0,414	4,1
		0,724	0,841	0,420	4,2
	B	0,689	0,801	0,400	4,0
		0,660	0,767	0,383	3,8
		0,664	0,772	0,386	3,9
30	A	0,719	0,836	0,418	4,2
		0,855	0,994	0,497	5,0
		0,748	0,869	0,434	4,3
	B	0,737	0,856	0,428	4,3
		0,735	0,854	0,427	4,3
		0,744	0,865	0,432	4,3
90	A	1,561	1,815	0,907	9,1
		1,537	1,787	0,893	9,0
		1,760	2,046	1,023	10,2
	B	1,608	1,869	0,934	9,3
		1,614	1,876	0,938	9,4
		1,449	1,684	0,842	8,4
900	A	4,583	5,329	2,664	26,6
		4,782	5,560	2,700	27,8
		4,971	5,580	2,890	29,0
	B	5,246	6,100	3,050	30,5
		5,072	5,897	2,948	29,5
		5,396	6,274	3,137	31,4
1.380	A	2,923	3,398	1,699	17,0
		2,958	3,439	1,719	17,1
		2,971	3,454	1,727	17,3
	B	1,594	1,853	0,926	9,3
		1,688	1,962	0,981	10,0
		1,739	2,022	1,011	10,1
1.860	A	0,726	0,844	0,422	4,2
		0,750	0,872	0,436	4,4
		0,774	0,900	0,450	4,5
2.340	A	0,341	0,396	0,198	2,0
		0,368	0,427	0,213	2,1
		0,358	0,416	0,208	2,1
	B	0,450	0,523	0,261	2,6
		0,497	0,577	0,288	2,8
		0,485	0,563	0,281	2,8
2.820	A	0,198	0,230	0,115	1,2
		0,166	0,193	0,096	1,0
		0,176	0,214	0,102	1,0
	B	0,150	0,174	0,087	0,9
		0,149	0,173	0,086	0,9
		0,150	0,174	0,087	0,9

**Tabla N° 35:** Absorción y eliminación de flumequina en músculo de abalón.

Tiempo (min)	Peso (mg)	N° Muestra	C (µg/ml)	Ajuste por recuperación (µg/ml)	µg Totales	ppm
5	2183	B	2,200	2,129	23,22	10,3
			2,408	2,330	25,44	11,6
			1,878	1,818	19,84	9,1
			2,126	2,058	22,46	10,3
			1,851	1,791	19,55	9,0
			2,129	2,060	22,49	10,0
15	2146	A	1,188	1,150	12,34	6,0
			1,066	1,031	11,07	5,1
			1,132	1,095	11,75	4,5
		B	1,161	1,123	12,05	5,5
			1,208	1,169	12,54	5,8
			1,203	1,164	12,49	5,8
1,231	1,191	12,78	6,0			
30	2606	A	0,986	0,954	12,43	4,8
			0,898	0,869	11,32	4,3
			0,891	0,862	11,23	4,3
		B	0,869	0,841	10,96	4,2
			0,855	0,827	10,77	4,1
			0,929	0,899	11,71	4,5
90	4948	A	1,193	1,154	28,57	5,8
			1,267	1,226	30,34	6,1
			1,198	1,159	28,69	5,8
		B	1,268	1,227	29,38	5,9
			1,337	1,294	32,01	6,4
			1,176	1,138	28,16	5,7
900	3011	A	4,206	4,071	61,29	20,4
			4,063	3,933	59,21	19,7
			3,845	3,722	56,03	18,6
		B	3,749	3,629	54,63	18,1
			3,741	3,621	54,52	18,1
			3,696	3,577	53,86	17,9
1.380	2289	A	0,752	0,727	8,33	3,6
			0,727	0,703	8,05	3,5
			0,706	0,683	7,82	3,4
		B	0,717	0,694	7,94	3,5
			0,773	0,748	8,56	3,7
			0,772	0,747	8,55	3,7
1.860			0	0	0	0
			0	0	0	0
			0	0	0	0
2.340			0	0	0	0
			0	0	0	0
			0	0	0	0
2.820			0	0	0	0
			0	0	0	0
			0	0	0	0

**Tabla N° 36:** Absorción y eliminación de flumequina en hemolinfa de abalón.

Tiempo (min)	N° Muestra	C (µg/ml)	Ajuste por recuperación (µg/ml)	µg Totales	ppm
5	A	1,498	1,598	0,795	8,0
		1,708	1,815	0,906	9,1
		1,532	1,623	0,813	8,1
	B	1,314	1,398	0,697	7,0
		1,259	1,336	0,668	6,9
		1,502	1,594	0,797	8,0
15	A	3,359	3,562	1,782	17,8
		3,133	3,321	1,662	16,6
		3,098	3,288	1,644	16,4
	B	3,382	3,590	1,795	18,0
		3,861	4,098	2,049	20,5
		3,763	3,994	1,997	20,0
30	A	2,881	3,058	1,529	15,3
		2,691	2,856	1,428	14,3
		2,699	2,856	1,432	14,3
90	A	3,552	3,770	1,885	18,9
		3,797	4,030	2,015	20,2
		3,893	4,132	2,066	20,6
	B	3,587	3,807	1,903	19,0
		3,378	3,585	1,792	18,0
		3,400	3,609	1,804	18,0
900	A	7,397	7,852	3,926	39,3
		7,657	8,128	4,064	40,6
		7,605	8,073	4,036	40,4
	B	8,98	9,532	4,766	47,7
		8,574	9,101	4,550	45,5
		8,681	9,215	4,607	46,1
1.380	A	1,032	1,095	0,547	5,5
		1,064	1,129	0,564	5,6
		1,038	1,101	0,550	5,5
	B	1,033	1,096	0,548	5,5
		1,032	1,095	0,547	5,5
		0,972	1,031	0,515	5,2
1.860		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
2.340		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
2.820		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0