



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY



# Evaluación de estrategias para implementar la trazabilidad de las mediciones analíticas para el desarrollo de posibles materiales de referencia o la asignación de valores de referencia en ensayos de aptitud para su aplicación en la salud y el ambiente.

Qca. Ana Inés Silva Terra

Programa de Posgrado en Química

Facultad de Química

Universidad de la República

Montevideo – Uruguay

Mayo de 2020



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY



# Evaluación de estrategias para implementar la trazabilidad de las mediciones analíticas para el desarrollo de posibles materiales de referencia o la asignación de valores de referencia en ensayos de aptitud para su aplicación en la salud y el ambiente.

Tesis de Maestría presentada al Programa de Posgrado en Química, Facultad de Química de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Magíster en Química

Director de tesis:

Dra. Prof. Mariela Pistón

ACTA DEFENSA DE TESIS

v.01  
2015/08/20

FECHA	27 de mayo de 2020		
CARRERA	MAESTRIA		
PLAN	2004		
	LUGAR	FECHA	HORA
EXAMEN	Fac Química	27/5/2020	15:00
DIRECTORES DE TESIS:			
Dra. Mariela Pistón 			
TRIBUNAL:			
Dr. Eduardo Dellacassa  Dr. Gonzalo Hernández  Dr. Andrés Pérez			
ESTUDIANTE		CALIFICACIÓN	
APELLIDO Y NOMBRE	Cédula de Identidad	NUMERO	SIMBOLO
Ana Silva	4491612-0	9	MUY SATISFACTORIA
NOMBRE DE TESIS: "Evaluación de estrategias para implementar trazabilidad de las mediciones analíticas para el desarrollo de posibles materiales de referencia o la asignación de valores de referencia en ensayos de aptitud para su aplicación en la salud y el ambiente"			

N. PISTÓN



## Agradecimientos

Siendo esta una de las primeras tesis de Maestría en Química con una fuerte orientación a la Metrología Química a nivel nacional, mi primer y más profundo agradecimiento va hacia mi Directora de Maestría, la Dra. Mariela Pistón, que decidió confiar en mi desde un inicio y me alentó a seguir adelante más allá de los obstáculos y los desalientos. Extiendo mi agradecimiento a mi amiga Mona, tanto por el apoyo técnico, como por darme la fuerza para seguir adelante diciéndome “los pasos siempre son para adelante, ni para el costado, ni para atrás para tomar impulso”. A UNIFAM Laboratorio Analítico, que desinteresadamente me permitió acceder al equipamiento necesario para poder avanzar con la investigación. A Gonzalo por todo el apoyo en RMN y el tiempo dedicado a responder mis mil y una preguntas con respuestas muy interesantes. A mis estimados colegas de INMETRO, en especial a Wagner, Bruno y Jane, que me introdujeron al fascinante mundo del análisis de pureza y RMN, y que además generosamente me dieron las herramientas y el apoyo necesario para sacar esta idea adelante. Espero que este trabajo le haga honores a todo lo que me brindaron. A Florencia que estuvo a la orden para ayudarme en los ensayos que se precisaran y me impulsó a seguir. A mis compañeros del Departamento de Metrología Química por el apoyo, en especial a Ramiro y Romina del Área Inorgánica por el análisis de impurezas inorgánicas. A Graciela Ferrari por acercarme el problema metrológico que forma parte de este trabajo y darme la oportunidad de explorar una nueva idea. A Mauricio Rodríguez del CURE por los análisis de TGA y DSC y la ayuda en la interpretación de los datos. A Bruno Villamarín del LATU por los resultados de análisis elemental. Al LATU por facilitarme tomar esta oportunidad. A toda la gente que me ayudó a revisar esta tesis cuando tantos temas dificultaron el hilvanarlos, en especial a Mona, Florencia y Victoria. A los amigos que aguantaron tantos relatos de mi Maestría. Las palabras no alcanzan para transmitir mi agradecimiento a mi familia, que me han apoyado y motivado cuando peleaba con aquel libro enorme en las tardes de siesta en Solís. Cuando me pareció no dar la talla, no faltaban las palabras de mi madre: “vos podes”, palabras que hoy me llevan a territorios inexplorados. A James, que me acompañó cercanamente durante todo este proceso, que fue mucho más que académico y sin quién esto no hubiera sido posible.

A todos ustedes: ¡Gracias!

## Lista de abreviaturas y siglas

$^{13}\text{C}$ -RMN	experimento de RMN de $^{13}\text{C}$
$^1\text{H}$ -RMN	experimento de RMN de $^1\text{H}$
AE	análisis elemental
BIPM	Buró Internacional de Pesas y Medidas ( <i>Bureau International des Poids et Mesures</i> , BIPM)
CCQM	Comité Consultativo de Cantidad de Materia (CCQM, <i>Comité Consultatif pour la Quantité de Matière</i> )
CE-DAD	electroforesis capilar acoplado a detector de arreglo de diodos
CIPM	Comité Internacional de Pesas y Medidas ( <i>Comité International des Poids et Mesures</i> , CIPM)
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
DSC	calorímetro diferencial de barrido ( <i>differential scanning calorimetry</i> )
GC	cromatografía gaseosa
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC-DAD	cromatografía líquida de alta performance acoplada a detector de arreglo de diodos
HPLC-FLD	cromatografía líquida de alta performance acoplada a detector de fluorescencia
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence spectroscopy</i>
ICP-SFMS	espectrómetro de masas de sector magnético con plasma acoplado inductivamente
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IDMS	dilución isotópica con espectrometría de masa
INM	Instituto Nacional de Metrología
JCTLM	Comité Conjunto para Trazabilidad en Medicina Laboratorial ( <i>Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine</i> )
KF	titulación coulombimétrica Karl Fischer
LATU	Laboratorio Tecnológico del Uruguay
LC-MS/MS	cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas tandem
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
PC	ficocianina
PCB	ficocianobilina
RMN	espectroscopía de resonancia magnética nuclear
SI	Sistema Internacional
SIR	<i>single ion recording</i>
TGA	análisis termogravimétrico ( <i>thermogravimetric analysis</i> )

## Resumen

Se desarrollaron y optimizaron herramientas para la implementación de la trazabilidad al sistema internacional de mediciones analíticas orgánicas a nivel nacional, no disponibles hasta la fecha. Este trabajo constituye un aporte relevante a las actividades designadas al Instituto Nacional de Metrología uruguayo, con un enfoque principal hacia las áreas salud y ambiente. En primera instancia, se trabajó sobre la determinación de creatinina en suero humano mediante el método primario de dilución isotópica con espectrometría de masas. Para obtener resultados metrológicamente trazables, se optimizó un método primario (basado en uno de referencia), permitiendo la obtención de resultados de alta veracidad con mayor eficiencia de uso de recursos. En la segunda parte de este trabajo, se desarrolló una estrategia para la determinación de pureza de compuestos orgánicos con el objetivo de generar patrones primarios. Se estudió la pureza de una muestra purificada de ficocianobilina para desarrollar un estándar cuya potencial aplicación sería la calibración de sensores para la determinación de cianobacterias en muestras acuáticas. Esta muestra purificada mostró un elevado grado de impurezas, que, combinado con la no disponibilidad comercial de sus respectivos estándares, resultó en una gran dificultad para asignar un valor de pureza y una incertidumbre asociada adecuada. Se emplearon diversas técnicas analíticas, dentro de las cuales se destaca la cromatografía líquida y espectroscopía de resonancia magnética nuclear. El conocimiento científico generado, en base a una estrategia de trabajo como la utilizada, permitirá el desarrollo de patrones químicos primarios de una numerosa variedad de compuestos químicos orgánicos según las necesidades nacionales.

Palabras clave: Metrología, Química Analítica, creatinina, ficocianobilina, patrones primarios, dilución isotópica con espectrometría de masas, balance de masa, resonancia magnética nuclear

## Abstract

In this work, previously unavailable tools were developed and optimized for the establishment of traceability to the international system of units of organic chemical measurements. This outcome represents an important input to the activities delegated to the Uruguayan National Metrology Institute, particularly in the areas of health and environment. Firstly, this research focuses on the optimization of a primary method for the determination of creatinine in human serum using isotope dilution mass spectrometry. This optimized procedure, which was based on a published reference method, delivers traceable results in a more efficient way without sacrificing accuracy. Secondly, a strategy for purity assessment of organic compounds was developed, which was specifically applied to phycocyanobilin, in order to prepare primary standards. The intended purpose of such a standard would be the calibration of sensors for *in situ* determination of cyanobacteria in water ways. The purified sample under study showed a large and complex array of impurities, with commercially unavailable standards, which represented a challenge when it came to assigning a fit-for-purpose purity value and uncertainty. Multiple analytical techniques were used as part of the purity assessment, such as liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy to name a few. The generated knowledge base, along with the working strategy proposed within this thesis, will permit the development of primary chemical measurement standards of a diverse nature, according to the demands presented on a national scale.

Key words: Metrology, Analytical Chemistry, phycocyanobilin, primary measurement standards, isotope dilution mass spectrometry, mass balance, nuclear magnetic resonance

## Tabla de contenidos

Agradecimientos .....	v
Lista de abreviaturas y siglas .....	vi
Resumen .....	vii
Abstract .....	viii
Capítulo 1. Introducción.....	1
PARTE A: CREATININA.....	4
Capítulo 2. Introducción específica.....	4
Capítulo 3. Fundamentos teóricos.....	7
3.1 Trazabilidad metrológica a partir de métodos primarios.....	7
3.2 Dilución isotópica con espectrometría de masa .....	7
3.3 Derivatización e interferencias.....	10
Capítulo 4. Metodología.....	12
4.1 Reactivos y materiales.....	12
4.2 Instrumentos .....	12
4.3 Preparación de muestra y determinaciones analíticas .....	13
Capítulo 5. Presentación de resultados y discusión.....	18
5.1 Impacto de la estrategia de secado de solvente y de agente derivatizante sobre la eficiencia de derivatización.....	18
5.2 Separación cromatográfica por resina de intercambio iónico. ....	20
5.3 Linealidad de curva de calibración e influencia del solapamiento isotópico. ....	22
5.4 Optimización de tiempo de equilibrado isotópico, tiempo y temperatura de derivatización. ....	26
Capítulo 6. Conclusiones parciales .....	29
PARTE B: FICOCIANOBILINA .....	30
Capítulo 7. Introducción específica.....	30
Capítulo 8. Fundamentos teóricos.....	33
8.1 Estructura y propiedades espectroscópicas de ficocianina y ficocianobilinas. ....	33
8.2 Monitoreo de cianobacterias con sensores en tiempo real .....	36
8.3 Implementación de la trazabilidad a partir de patrones primarios .....	37
8.4 Estrategias de determinación de pureza .....	38
Capítulo 9. Metodología.....	51
9.1 Muestra de estudio .....	51
9.2 HPLC-DAD/FLD .....	51
9.3 LC-MS/MS.....	53

9.4	Karl Fischer .....	56
9.5	Análisis de termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido .....	58
9.6	Análisis elemental .....	58
9.7	ICP-SFMS .....	59
9.8	Resonancia Magnética Nuclear .....	61
Capítulo 10. Presentación de resultados y discusión.....		64
10.1	Estudio de estructura molecular y detección de potenciales impurezas .....	64
10.2	Balance de masa .....	74
10.3	Resonancia Magnética Nuclear .....	87
10.4	Calorimetría diferencial de barrido .....	91
10.5	Análisis elemental .....	92
10.6	Pureza global .....	92
10.7	Aplicabilidad al uso del resultado de pureza .....	93
Capítulo 11. Conclusiones parciales.....		95
Capítulo 12. Conclusiones globales .....		96
Capítulo 13. Perspectivas a futuro.....		97
Referencias bibliográficas .....		98
Apéndices .....		108
Apéndice 1: Información complementaria del análisis por HPLC-DAD.....		108
Apéndice 2: Información complementaria del análisis por RMN.....		112
Apéndice 3: Estimación de incertidumbre para determinación de pureza por balance de masa		119
Anexos.....		122
Anexo 1: Presentaciones en congresos y publicaciones.....		122

## Listado de figuras

Figura 1 Estructura de creatinina (2-Imino-1-metil-2,5-dihidro-1H-imidazol-4-ol , N° CAS 60-27-5). Tomado de ChemSpider (2020c). .....	4
Figura 2 Creatinina-d <sub>3</sub> propuesta como estándar interno (2-Amino-1,5-dihidro-1-(metil-d <sub>3</sub> )-4H-imidazol-4-ona, N° CAS 143827-20-7). Tomado de Santa Cruz Biotechnology (s. f.).....	10
Figura 3 Reacción general de trimetilsililación de una molécula conteniendo un grupo hidroxilo. Adaptado de Orata (2012). .....	10
Figura 4 Agente sililante N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) N° CAS 24589-78-4. Tomado de ChemSpider (2020d). .....	11
Figura 5 Agente sililante N, O-Bistrifluoroacetamida (BSTFA) N° CAS 25561-30-2. Tomado de ChemSpider (2020a). .....	11
Figura 6 Estructura de la creatina (N-carbamimidoil-N-metilglicina, N° CAS 6020-87-7). Tomado de (ChemSpider, 2020b). .....	19
Figura 7 Reacción de trimetilsililación de creatinina. Adaptado de (Tomita & Nishioka, 2005). ...	19
Figura 8 Estructura de cromóforos comunes en fitocromas: ficocromobilina (PΦB), ficocianobilina (PCB), ficoviolobilin (PVB) y biliverdina (BV). Imagen adaptada de (Rockwell & Lagarias, 2010). .....	33
Figura 9 Secuencia de aminoácidos de la cadena α de c-ficocianina. En amarillo se resalta el aminoácido cisteína donde ocurre la unión covalente al cromóforo PCB. Tomado de ( <i>cpcA</i> - <i>C-phycocyanin alpha chain</i> - <i>Arthrospira platensis</i> - <i>cpcA gene &amp; protein</i> , s. f.).....	34
Figura 10 Secuencia de aminoácidos de la cadena β de c-ficocianina. En amarillo se resaltan los aminoácidos cisteína donde ocurre la unión covalente al cromóforo PCB. Tomado de <i>CpcB</i> - <i>C-phycocyanin beta chain</i> — <i>Arthrospira platensis</i> — <i>CpcB gene &amp; protein</i> (s. f.). .....	34
Figura 11 Conformaciones helicoidales cíclicas en sentido horario (P) y antihorario (M) del isómero ZZZ de PCB. Tomado de Göller et al. (2001).....	35
Figura 12 (R,E,E,E,E)-PCB .....	66
Figura 13 (R,Z,E,E,E)-PCB .....	66
Figura 14 (R,E,E,E,E)-PCB-OMe.....	67
Figura 15 (R,E,E,E,E)-PCB-OEt.....	67
Figura 16 (R,E,E,E,E)-PCB-C .....	68
Figura 17 (R,E,E,E,E)-PCB-CA.....	68
Figura 18 (R,E,E,E,E)-PCB-AC.....	69
Figura 19 (R,E,E,E,E)-PCB-CL.....	69
Figura 20 (R,E,E,E,E)-PCB-CK.....	70
Figura 21 (R,E,E,E,E)-PCB-ACK.....	70
Figura 22 (R,E,E,E,E)- PCB-DC.....	71
Figura 23 (R,E,E,E,E)-PCB-DCA.....	71
Figura 24 (R,E,E,E,E)-PCB-ACL .....	72
Figura 25 Cromatograma del análisis por HPLC-DAD de la muestra de estudio a un volumen de inyección de 10 μL.....	74
Figura 26 Cromatograma del análisis de la muestra de estudio por LC-MS/MS con un experimento SIR de búsqueda de m/z 299 uma. Las etiquetas verdes muestran compuestos identificados y con	

señal visible en el SIR, las etiquetas rojas, los que se identificaron como presentes, pero sin señal visible en el SIR y las etiquetas amarillas, los que están posiblemente presentes.....	80
Figura 27 Contribución a la incertidumbre estándar combinada de las variables de influencia al resultado final de fracción molar de PCB.....	84
Figura 28 Contribución a la incertidumbre estándar combinada de las variables de influencia al resultado final de fracción de masa de PCB.....	84
Figura 29 Termograma del análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido de la muestra problema de ficocianobilina.....	85
Figura 30 Estructura de ficocianobilina (PCB) y su numeración de acuerdo con nomenclatura IUPAC. Adaptado de Röben et al (2011). Los anillos se identifican como A (extremo izquierdo), B (centro izquierdo), C (centro derecho) y D (extremo derecho). ....	88
Figura 31 Ácido benzoico (N° CAS 65-85-0). La numeración se corresponde con los grupos de señales en el espectro de <sup>1</sup> H-RMN. ....	90
Figura 32 Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de ácido benzoico. La identificación de las señales se corresponden con la numeración de la Figura 31. ....	90
Figura 33 Cromatograma obtenido tras el análisis de la muestra de estudio de PCB en un HPLC-FLD. ....	94

## Listado de tablas

Tabla 1 Diseño experimental y codificación para cada experimento (entre paréntesis). tI: tiempo de equilibrado isotópico (en minutos), td: tiempo de derivatización (en minutos) y TD: temperatura de derivatización (en °C). .....	16
Tabla 2 Resultados del estudio de optimización de la etapa de derivatización. PIR 72h, PIR 4h y PIR ST corresponde a los tratamientos de secado aplicado al solvente piridina, descritos en la sección Optimización de solvente y agente de derivatización dentro de Materiales y Métodos.....	20
Tabla 3 Fracción de masa de creatinina (w) determinada por double exact-matching isotope dilution (Ec. 1), porcentaje de recuperación tomando como referencia el valor certificado del MRC SRM 967 (“Rec.”), cálculo del sesgo, como la diferencia entre concentración certificada y fracción de masa calculada, área correspondiente a la señal de creatinina (“A <sub>creatinina</sub> ”), eficiencia de derivatización medida como la relación entre señales 329/256 y 332/2559 m/z (“R <sup>329/256 m/z</sup> ” y “R <sup>332/259 m/z</sup> ” respectivamente) y la relación de eficiencia de derivatización. ....	26
Tabla 4 Evaluación del efecto de los factores individuales y combinados tI, TD y td sobre las variables de respuesta área de creatinina (“A <sub>creatinina</sub> ”), sesgo, eficiencia de derivatización (“R <sup>329/256 m/z</sup> ” y “R <sup>332/259m/z</sup> ”) y relación de eficiencia de derivatización. ....	27
Tabla 5 Resumen de experimentos de condiciones optimizadas para las diferentes variables de respuesta y su sumatoria.....	28
Tabla 6 Nombre IUPAC y propiedades fisicoquímicas para el número CAS 20298-86-6 tomado de ChemicalBook (2017). ....	51
Tabla 7 Condiciones instrumentales del análisis de HPLC-DAD/FLD. ....	52
Tabla 8 Gradiente de fases móviles del análisis por HPLC-DAD/FLD.....	53
Tabla 9 Condiciones instrumentales del análisis de LC-MS/MS.....	54
Tabla 10 Gradiente de fases móviles del análisis por LC-MS/MS. ....	54
Tabla 11 Parámetros de operacionales para los experimentos MRM y SIR realizados en el análisis por LC-MS/MS de la muestra de estudio. *No buscado como m/z=1 porque ese valor de masa excede la calibración configurada del equipo. La identificación de las impurezas refiere a los compuestos definidos en la Sección 10.1.....	55
Tabla 12 Condiciones de análisis del método de titulación coulombimétrica Karl Fischer para sólidos. ....	56
Tabla 13 Condiciones operacionales de la digestión por microondas de la muestra de estudio de ficocianobilina.....	60
Tabla 14 Configuración y Condiciones operacionales del ICP-SFMS. ....	60
Tabla 15 Isótopos analizados y nivel de resolución en el análisis por ICP-SFMS de la muestra de estudio. Los isótopos marcados con un asterisco fueron los utilizados para realizar la cuantificación. ....	61
Tabla 16 Condiciones experimentales para obtención de espectros de <sup>1</sup> H-RMN para análisis cualitativo y cuantitativo. ....	63
Tabla 17 Resumen de potenciales impurezas, peso molecular e incertidumbre (según Sección 9.6) y la fuente de información. *Presencia potencial a partir de secuencia de aminoácidos de subunidades alfa y beta de ficocianina ( <i>CpcA</i> - <i>C-phycocyanin alpha chain—Arthrospira platensis—CpcA gene &amp; protein</i> , s. f.; <i>CpcB</i> - <i>C-phycocyanin beta chain—Arthrospira platensis—CpcB gene &amp; protein</i> , s. f.).....	73
Tabla 18 Compuestos registrados a partir del análisis de HPLC-DAD de la muestra de estudio. Compuesto N° 8 identificado como (3E)-PCB. *No registrado para este compuesto. ....	75

Tabla 19 Resultados de la búsqueda de las impurezas propuestas de la Sección 10.1 y evaluación de su presencia. ....	76
Tabla 20 Identificación propuesta para las señales obtenidas por el análisis de HPLC-DAD mediante correlación con las señales de LC-MS/MS. Los asteriscos son datos no registrados.....	80
Tabla 21 Cálculo de fracción molar y fracción de masa de los compuestos 1 a 15 con sus respectivas incertidumbres estándar (k=1).....	82
Tabla 22 Componentes de la incertidumbre de asociada al cálculo de fracción molar de PCB junto a su contribución relativa a la incertidumbre total. ....	83
Tabla 23 Componentes de la incertidumbre de asociada al cálculo de fracción de masa de PCB junto a su contribución relativa a la incertidumbre total. * La contribución de la incertidumbre de la fracción molar de PCB a esta incertidumbre es aproximadamente 100%.....	84
Tabla 24 Resultado de fracción de masa de agua de la muestra de estudio de PCB junto a su incertidumbre estándar (k=1). ....	85
Tabla 25 Resultado del análisis de impurezas inorgánicas por ICP-SFMS.....	86
Tabla 26 Asignación de señales propuesta para el espectro de <sup>1</sup> H del análisis cualitativo de la muestra de estudio.....	88
Tabla 27 Asignación de señales propuesta para las impurezas identificadas en el espectro de <sup>1</sup> H del análisis cualitativo de la muestra de estudio.....	89
Tabla 28 Cuantificación absoluta de PCB como fracción de masa porcentual en la muestra de estudio. ....	90
Tabla 29 Calculo de fracción de masa de PCB por método relativo, equivalente a una fracción de masa de PCB corregida por impurezas estructuralmente relacionadas (**). * Refiere a la fracción de masa de PCB y las impurezas estructuralmente relacionadas. ....	91
Tabla 30 Análisis elemental de la muestra de estudio de ficocianobilina. *El límite de cuantificación declarado para el análisis de azufre es de 0,01 %.....	92
Tabla 31 Resumen de cuantificación de impurezas por balance de masa expresados como fracción de masa porcentual. ....	93

## Capítulo 1. Introducción

La armonización de las mediciones a nivel global es crucial para el comercio, la salud y el avance tecnológico y científico. Para esto es esencial obtener la comparabilidad internacional de los resultados de medición, aumentando su confiabilidad y, por consiguiente, su aceptación de un país a otro, sin necesidad de repetirlo (Richter, 2000). La Metrología, es decir, la ciencia que estudia las mediciones y su aplicación, busca activamente este objetivo. Probablemente, la forma más económica de alcanzar la comparabilidad global de las mediciones es a través del desarrollo de un sistema jerárquico de medición basado en la trazabilidad, a través de estándares de calibración, a referencias internacionales adecuadas, como el Sistema Internacional de Unidades (Thompson & Ellison, 2005). Este sistema de medición depende críticamente de incertidumbres bajas entre los niveles, las cuales se alcanzan mediante mediciones de alta jerarquía metrológica. El vocabulario internacional de metrología (VIM) define la trazabilidad metrológica como la “propiedad de un resultado de medida por la cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida” (Centro Español de Metrología, 2012). Dos etapas se vuelven necesarias para la obtención de resultados confiables mediante la trazabilidad a patrones definidos: el reconocimiento internacional mutuo de los sistemas de trazabilidad basado en la demostración de equivalencia y el establecimiento de la trazabilidad a un nivel nacional (Richter, 2000).

En el campo de la Metrología química, el primer punto se consigue mediante la participación de comparaciones interlaboratoriales de alto nivel, conocidas como *comparaciones clave* en el ámbito de la Metrología, organizadas por el Comité Consultativo de Cantidad de Materia (CCQM, según su nombre en francés: *Comité Consultatif pour la Quantité de Matière*). La responsabilidad del CCQM es desarrollar, mejorar y documentar la equivalencia de los estándares de medición química y biológica, ya sea como patrones de medición o métodos de referencia. El CCQM es uno de los diez comités del Comité Internacional de Pesas y Medidas (*Comité International des Poids et Mesures*, CIPM), el cual integra junto a la Conferencia General de Pesas y Medidas, el Buró Internacional de Pesas y Medidas (*Bureau International des Poids et Mesures*, BIPM). Esta organización intergubernamental fue establecida por la Convención del Metro del año 1875 para llevar a cabo su misión de lograr la armonización en la definición de las unidades de medición y, por consiguiente, de las mediciones en sí. Los estados miembros del CIPM, entre los cuales se encuentra Uruguay, tienen la oportunidad de tener sus capacidades de medición y calibración nacionales (CMCs) reconocidas internacionalmente en el marco del Acuerdo de Reconocimiento Mutuo (CIPM MRA) de estándares de medición nacional y de los certificados de calibración y medición emitidos por los Institutos Metrológicos Nacionales (INMs) (*Bureau International des*

Poids et Mesures, 2018). La declaración de CMC se consigue tras la demostración de competencia técnica del INM con resultados satisfactorios en comparaciones claves y revisiones de pares, la aprobación de su sistema de gestión de calidad y un aval del grupo de trabajo pertinente del CCQM.

El segundo paso es cubierto dentro de cada país por los INMs, en los cuales recae la responsabilidad del mantenimiento, la custodia y la diseminación de los patrones de medición nacionales. Es evidente que desarrollar patrones químicos para todas las mediciones químicas imaginables es utópico; esto obliga a priorizar aquellas de mayor impacto, como son las asociadas a la salud, al ambiente y al comercio. Asimismo, el hecho de que un INM cuente con capacidades técnicas reconocidas para generar sus propios patrones químicos y métodos de referencia permite atender las necesidades específicas del país y la región, sin tener que depender de su desarrollo a nivel internacional.

El objetivo general de este trabajo de maestría busca atender esta necesidad mediante el desarrollo de herramientas para implementar la trazabilidad de mediciones analíticas en química orgánica a través de patrones químicos o métodos de referencia, con especial énfasis en el ámbito ambiente y salud. Esta tesis está organizada en dos partes dentro de las cuales se aborda el estudio de un caso. En la parte A se describe la optimización de un método primario, basado en un método de referencia disponible, para la determinación de creatinina en suero humano. Por otro lado, en la parte B se describe el desarrollo de una estrategia para determinar la pureza de muestras purificadas de compuestos orgánicos, para así generar patrones primarios. En particular, se estudia el caso de ficocianobilina, cuyo patrón presenta una potencial aplicación en la calibración de sensores para la determinación de cianobacterias en muestras acuáticas. Cada una de estas partes está compuesta por una introducción específica (capítulos 2 y 7), una sección de fundamentos teóricos (capítulos 3 y 8), una descripción de la metodología aplicada (capítulos 4 y 9), la presentación de resultados y su discusión (capítulos 5 y 10) y conclusiones parciales (capítulos 6 y 11). Como cierre de esta tesis se presentan las conclusiones globales en el capítulo 12 y las perspectivas futuras en el capítulo 13.

## **Objetivo general**

El objetivo de este trabajo de Maestría en Química fue la implementación de trazabilidad a mediciones químicas en el ámbito salud y el ambiente para el desarrollo de herramientas de aseguramiento de la calidad de las mediciones de los laboratorios que las realizan.

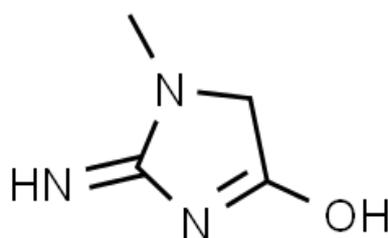
Específicamente, se planteó en primera instancia la optimización de un método primario para la determinación de creatinina en suero humano con el fin de ser aplicado a la asignación de valor de programas de evaluación externa de la calidad. La segunda instancia se centró en la evaluación de

estrategias para implementar trazabilidad en las mediciones de ficocianinas en cursos acuáticos y así poder desarrollar materiales de referencia certificados para el control de sensores *in situ* para su monitoreo a tiempo real.

## PARTE A: CREATININA

### Capítulo 2. Introducción específica

La concentración de creatinina (Figura 1) en suero es utilizada clínicamente para la estimación de la tasa de filtración glomerular, con el fin de diagnosticar la enfermedad renal crónica. Esta enfermedad se cree afecta entre 5 -10 % de la población mundial, con un aumento sostenido de la incidencia y prevalencia de la enfermedad renal en etapa terminal, la falla renal y los trasplantes de riñón a nivel mundial (Myers, 2006). De forma rutinaria, este análisis se realiza por métodos colorimétricos como el método de Jaffe, el cual se ve afectado por interferencias ya documentadas de otros grupos cromóforos provenientes de la bilirrubina, proteínas y cetonas (Fernández-Fernández et al., 2014). Si bien existen métodos enzimáticos desarrollados como alternativa al método de Jaffe, estos presentan solo una relativa mejora en cuanto a la influencia de interferencias (Myers, 2006).



**Figura 1** Estructura de creatinina (2-Imino-1-metil-2,5-dihidro-1H-imidazol-4-ol , N° CAS 60-27-5). Tomado de ChemSpider (2020c).

En el campo de la bioquímica clínica, el diagnóstico, evaluación de riesgo y monitoreo de un paciente dependen de forma crítica de los resultados emitidos por un laboratorio (Thienpont et al., 2002). La comparabilidad de estos resultados permite considerar intervalos de referencia comunes o estrategias de tratamiento a ser aplicadas (Thienpont et al., 2002). Esta comparabilidad de resultados se obtiene principalmente en el establecimiento de la trazabilidad de medición a los estándares internacionales más altos, mediante un sistema de mediciones de referencia exhaustivo (Thienpont et al., 2002). El Comité Conjunto para Trazabilidad en Medicina Laboratorial (JCTLM según sus siglas en inglés) lista los métodos de referencia existentes para la determinación de parámetros clínicos, muchos de los cuales emplean dilución isotópica (Kessler, 2016). La misión general de este comité, que forma parte del BIPM, es la mejora de la calidad en el ámbito de la salud, reduciendo los costos del gobierno y la industria del diagnóstico *in vitro*. Para esto, promueve sistemas de examinación de referencia que permitan alcanzar la trazabilidad de sus resultados y una mejorada comparabilidad.

Complementariamente a la implementación de la trazabilidad en los laboratorios clínicos, la participación en instancias de evaluación externa, así como la aplicación de herramientas de aseguramiento de calidad internas, son elementos claves y mandatorios. Los resultados de programas de ensayos de aptitud permiten evaluar el desempeño individual de cada laboratorio y la comparación de métodos analíticos comúnmente utilizados. La asignación de valor de las muestras distribuidas en estos estudios, usualmente muestras liofilizadas basadas en suero humano, se realiza mediante el empleo de un método de referencia o utilizando un material de referencia certificado. En el caso donde esto no sea posible, se puede instrumentar la asignación de valor por consenso, lo que presenta un inconveniente importante dado que no es posible contar con un valor trazable y, por lo tanto, obtener la comparación a nivel internacional. A esto se suma el hecho que no es posible determinar de forma certera los sesgos asociados a los diferentes métodos analíticos.

Esta situación se agrava para la mayoría de los programas de evaluación externa de la calidad: los laboratorios participantes aplican métodos de rutina a muestras de estudio que difieren de una muestra de un paciente real. El uso habitual de muestras simplificadas en estos programas, que minimizan los efectos de la matriz y genera problemas de conmutabilidad, implica que el desempeño analítico de los laboratorios puede no reflejar el verdadero estado del arte (Müller, 2005). La conmutabilidad de un material de referencia es su capacidad de mostrar propiedades intra-ensayo similares a una muestra humana (Franzini & Ceriotti, 1998). Estudios realizados muestran la diferencia de exactitud entre resultados obtenidos para programas de evaluación externa de la calidad para el parámetro creatinina a partir de muestras reales congeladas y muestras reales liofilizadas, sugiriendo que este proceso altera la matriz de la muestra e introduce un sesgo (Ferrero et al., 1995). Actualmente, los valores de referencia de los programas de evaluación externa de calidad ofrecidos en Uruguay son asignados por métodos de referencia secundarios en el exterior, lo cual resulta en un elevado costo de transporte. La implementación de métodos primarios de trazabilidad claramente establecida permitiría la asignación de valores trazables a estos programas para realizar una evaluación rigurosa de la exactitud de los métodos de rutina utilizados a nivel nacional. En este sentido, la primera parte de este trabajo de maestría se enfoca en la implementación de un método primario basado en dilución isotópica con espectrometría de masas asociado a cromatografía gaseosa para la determinación de creatinina en suero humano. Este trabajo introduce modificaciones a un método de referencia publicado en la base de datos del Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM) del BIPM (Siekman, 1985). Las modificaciones propuestas al método son el uso de un estándar interno deuterado (creatinina-d<sub>3</sub>) en sustitución del original (creatinina-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>) y la preparación gravimétrica de las muestras y calibrantes. El estándar interno presentado como alternativa se obtiene fácilmente de forma comercial a un precio relativamente reducido, a diferencia del original, que debe sintetizarse especialmente y requiere de equipamiento no siempre disponible en un laboratorio analítico.

Adicionalmente, la preparación gravimétrica de muestras y calibrantes le confiere al método mayor exactitud y menor incertidumbre, que al mismo tiempo elimina la necesidad de calibrar el equipamiento volumétrico. Dado que la elección de estándar interno utilizado puede incidir fuertemente en el desempeño de los métodos basados en dilución isotópica, fue necesaria la búsqueda de condiciones óptimas mediante un diseño multivariado (factorial). Mediante esta estrategia se estudió el efecto de factores relacionados con etapas críticas de preparación de muestra, como el equilibrado isotópico y la derivatización que fueron modificados. A partir de los resultados de este análisis de datos se encontraron las condiciones óptimas para estas etapas garantizando una adecuada veracidad para el propósito de desarrollar herramientas de aseguramiento de calidad. De esta forma se obtuvo un método más sencillo que el INM podrá implementar y al mismo tiempo se logró la optimización de recursos asociados a este análisis.

### **Objetivo específico de la parte A**

El objetivo específico para la primera parte del trabajo fue desarrollar y optimizar un método primario para la determinación de creatinina en suero humano basado en dilución isotópica con espectrometría de masas por cromatografía gaseosa. Adicionalmente, realizar la validación de este método primario optimizado.

## **Capítulo 3. Fundamentos teóricos**

### **3.1 Trazabilidad metrológica a partir de métodos primarios**

La trazabilidad metrológica a las unidades del sistema internacional se obtiene a partir de los métodos primarios, los cuales representan el mayor nivel metrológico, pudiendo ser descritos de forma completa, y para los cuales se puede establecer una incertidumbre expresada únicamente en unidades del sistema internacional (King, 2005). Estos métodos no requieren calibración intermediaria y no tienen correcciones significativas por factores empíricos (De Bièvre & Peiser, 1997). En el campo de la Metrología Química, la unidad aplicable es el mol y la trazabilidad al mismo se obtiene por métodos primarios como la gravimetría y la dilución isotópica con espectrometría de masas (IDMS) el cual cuenta con demostrada veracidad y baja incertidumbre. Estas características le confieren especial relevancia en la certificación de materiales de referencia y en la asignación de valores de referencia de ensayos de aptitud. Este método, de vasta aplicación en el ámbito de metrología química orgánica, consta en la adición de una cantidad conocida del analito de interés presentando una composición isotópica diferente y se describirá con mayor detalle en la próxima sección.

### **3.2 Dilución isotópica con espectrometría de masa**

#### **3.2.1 Principio**

A diferencia de las medidas espectrofotométricas, en espectrometría de masas la relación entre cantidad de sustancia y señal instrumental presenta una gran variación. Para contrarrestar esto y obtener cuantificaciones moderadamente exactas, es habitual el uso de estándares internos en muestras y calibrantes. La espectrometría de masas permite el uso de estándares internos que constan de análogos isotópicamente enriquecidos del analito de interés, dando lugar a la técnica conocida como dilución isotópica espectrometría de masas (IDMS según sus siglas en inglés) o estandarización interna con isótopos estables. Provisto que el análogo isotópico sea agregado a la muestra al inicio del proceso analítico y éste entre en equilibrio con el analito sin pérdidas ni fraccionamiento isotópico, esta técnica permite una compensación de los potenciales errores que puedan incurrirse en las diferentes etapas del análisis desde la preparación de muestra hasta la medición instrumental. La determinación de la cantidad de sustancia entonces recae en una ecuación, dependiendo de relaciones de abundancia isotópica, los cuales se pueden medir con alta exactitud mediante un espectrómetro de masas (Richter, 1997).

Para poder proponer que los errores y las pérdidas son realmente compensadas mediante esta técnica, es esencial que se alcance el equilibrio isotópico entre el estándar interno y el analito en la muestra inmediatamente después de su toma. Este paso debe ser optimizado y verificado en cuanto a su eficacia ya que en muestras sólidas o complejas el analito puede verse fuertemente adherido a componentes de la matriz (por ejemplo, formando aductos con proteínas) lo cual genera que el analito y el estándar interno no se encuentren en posiciones químicamente equivalentes en la muestra y, por lo tanto, que presentes comportamientos químicos diferentes (Alonso & Gonzalez, 2013, Capítulo 2).

En consecuencia, para que este método alcance su máximo potencial analítico, es fundamental que sean estudiados y optimizados exhaustivamente, tanto la preparación de la muestra como la selección del estándar interno.

### 3.2.2 Estrategias de cuantificación

La forma más directa de realizar la cuantificación de un analito mediante IDMS es utilizando una solución calibrante del análogo isotópico con valor de concentración certificado. La disponibilidad de estas soluciones calibrantes es muy limitada, en especial para la cuantificación de analitos orgánicos. Por esta razón, la dilución isotópica comúnmente se realiza mediante un experimento de IDMS reverso, donde se emplea un calibrante certificado del analito en su estado natural para calibrar la solución del análogo isotópico y este posteriormente se utiliza para cuantificar la muestra de estudio. Adicionalmente, es posible realizar ambas calibraciones de forma simultánea en un experimento de IDMS doble, de esta manera la información asociada del análogo isotópico (como grado de enriquecimiento y pureza química) ya no es necesaria y varios parámetros se simplifican en la ecuación asociada a esta estrategia de calibración (Alonso & Gonzalez, 2013, Capítulo 2).

El experimento de doble IDMS puede realizarse mediante una curva de calibración, calibración entre dos puntos (*bracketing*) o calibración en un punto con coincidencia exacta de concentraciones. Esta última forma de cuantificación es conocida como *exact-matching double isotope dilution mass spectrometry* y provee de resultados de altísima exactitud, pero presenta como un inconveniente práctico el hecho de que requiere preparar mezclas de calibrantes con isótopos ( $B_{ZY}$ ) de forma iterativa hasta alcanzar una relación entre analito e isótopo de alta proximidad a la muestra. Sin embargo, la calibración doble en un punto por coincidencia exacta presenta la ventaja de poder aplicarse aun cuando la curva de calibración se aparte de la linealidad, un problema usual asociado al solapamiento de masas descrito en la Sección 3.2.3. Para evaluar si es posible implementar alternativas a la cuantificación mediante el método *exact-matching* IDMS, es decir cuantificar mediante curva de calibración lineal o *bracketing*, es necesario previamente comprobar la linealidad

del modelo de cuantificación según establece la Norma ISO 11095:1996 (International Organization for Standardization, 1996).

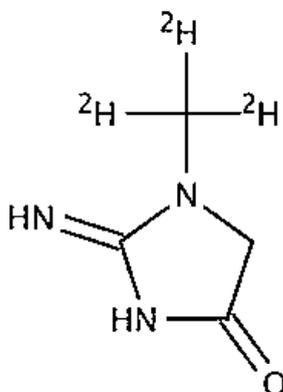
### **3.2.3 Elección del estándar interno para IDMS**

En la técnica de dilución isotópica con espectrometría de masas, los análogos isotópicamente marcados utilizados como estándar interno son empleados tanto para compensar las pérdidas de muestra durante la preparación de muestra, como los errores de dilución o la inestabilidad durante la medición. Por lo tanto, el compuesto marcado ideal debería comportarse exactamente igual al analito durante todo el procedimiento analítico. Para esto debe evaluarse si la presencia del marcado isotópico tiene un impacto en, por ejemplo, la recuperación durante el procesamiento de muestra, el comportamiento cromatográfico, propiedades fisicoquímicas como solubilidad, cinéticas de derivatización y  $pK_a$  o su fragmentación en MS. Adicionalmente, es relevante estudiar si el enriquecimiento isotópico aplicado es estable durante el proceso analítico o si se encuentra en una posición lábil a intercambio o pérdida durante la fragmentación. Estos fenómenos, conocidos como efectos isotópicos, son habituales en el análisis de compuestos orgánicos mediante IDMS (Alonso & Gonzalez, 2013, Capítulo 6). Otras consideraciones prácticas, como la disponibilidad de estos compuestos con un alto grado de enriquecimiento isotópico y pureza química a un precio razonable, también deben ser tenidos en cuenta a la hora de la selección del estándar interno.

En términos generales, se recomienda el uso de análogos isotópicos que presenten un bajo solapamiento en masa con el analito natural, es decir, que no presenten señales de  $m/z$  en común en el espectrómetro de masa. Esto no es un gran obstáculo si se tiene presente que los compuestos orgánicos habitualmente contienen oxígeno, nitrógeno, azufre o halógenos, además de carbono e hidrógeno, y estos elementos presentan isótopos de baja abundancia natural. Cuando el solapamiento isotópico entre analito natural y el estándar interno es mínimo, se favorece la linealidad de la curva de calibración asociada (Alonso & Gonzalez, 2013, Capítulo 6).

Realizando un estudio estadístico sobre la incertidumbre del resultado en función de la cantidad de elementos utilizados por molécula durante el enriquecimiento isotópico, es posible observar que para moléculas pequeñas no halogenadas (con menos de 20 carbonos por molécula) esto no tiene un impacto mayor. No obstante, usualmente se recomienda un mínimo de 3 isótopos enriquecidos por molécula para minimizar el solapamiento espectral. Por otro lado, los efectos isotópicos son usuales en la aplicación de IDMS a compuestos orgánicos, especialmente a medida que aumenta el número de isótopos enriquecidos por molécula y utilizando estándares internos deuterados (Alonso & Gonzalez, 2013, Capítulo 6).

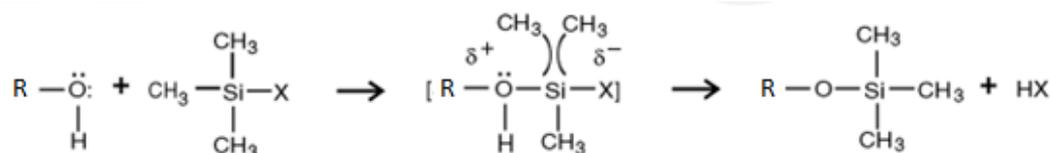
En la Figura 2 se presenta el estándar interno propuesto como alternativa al indicado en el método de referencia (creatinina- $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}_2$ ). Si bien este compuesto potencialmente presentaría más efectos isotópicos por ser deuterado, dado que está disponible comercialmente y a un bajo costo asociado amerita su evaluación.



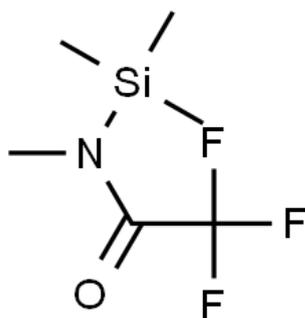
**Figura 2** Creatinina- $\text{d}_3$  propuesta como estándar interno (2-Amino-1,5-dihidro-1-(metil- $\text{d}_3$ )-4H-imidazol-4-ona, N° CAS 143827-20-7). Tomado de Santa Cruz Biotechnology (s. f.).

### 3.3 Derivatización e interferencias

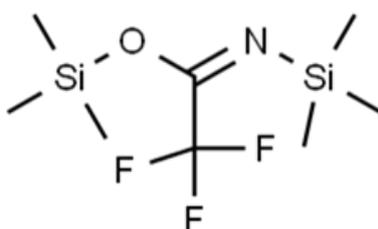
Los compuestos que contienen grupos funcionales amino o hidroxilo con hidrógenos activos presentan un problema para el análisis mediante cromatografía gaseosa ya que tienden a formar enlaces de hidrógeno intermoleculares que afectan la volatilidad inherente del compuesto, además de interactuar con el material de la columna cromatográfica y afectar su estabilidad térmica (Orata, 2012). Este es el caso de la creatinina (Figura 1), que requiere derivatización para favorecer su volatilización y así compatibilizar su análisis por cromatografía gaseosa como método separativo. La introducción de uno o varios grupos silil a la molécula en sustitución de los hidrógenos activos, proceso conocido como sililación, es un método de derivatización muy utilizado que facilita la volatilización del compuesto a analizar. La reacción de sililación, como se ejemplifica en la Figura 3, ocurre mediante el reemplazo a través de un ataque nucleofílico ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ) de un hidrógeno activo con un grupo trimetilsilil que proviene de un agente sililante como, por ejemplo, N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA, Figura 4) o N,O-Bistrifluoroacetamida (BSTFA, Figura 5).



**Figura 3** Reacción general de trimetilsililación de una molécula conteniendo un grupo hidroxilo. Adaptado de Orata (2012).



**Figura 4** Agente sililante N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) N° CAS 24589-78-4. Tomado de ChemSpider (2020d).



**Figura 5** Agente sililante N, O-Bistrifluoroacetamida (BSTFA) N° CAS 25561-30-2. Tomado de ChemSpider (2020a).

## Capítulo 4. Metodología

### 4.1 Reactivos y materiales

Para la cuantificación de las muestras de suero se utilizó un material de referencia certificado de creatinina pura código SRM 914a obtenida del INM de EE. UU. National Institute of Standards and Technology (NIST) (Maryland, EE. UU.) y un estándar de creatinina-d<sub>3</sub> código sc-217956 obtenido de Santa Cruz Biotechnology Inc<sup>®</sup>. (Texas, EE. UU.). El agua utilizada fue ASTM tipo I de resistividad 18,2 MΩ cm, de ahora en adelante denominada “agua ultrapura” o “agua UP”, la cual se produjo por un sistema de ultrapurificación DirectQ3-UV Millipore<sup>®</sup> Merck<sup>®</sup> KGaA (San Pablo, Brasil). Para el diseño experimental se utilizaron materiales de referencia certificados de creatinina en suero congelado obtenido del NIST, código SRM 967a (Maryland, EE. UU.). El filtrado de las muestras se realizó con filtros de nylon hidrofílico de 0,45 μm de porosidad marca Merck<sup>®</sup> KGaA (Darmstadt, Alemania). Se utilizó ácido acético glacial (Macron Fine Chemicals<sup>®</sup>) para preparar una solución de ácido acético al 1% v/v, denominada en adelante “SAc” (1 mL de ácido acético se llevó a 100 mL en un matraz aforado clase A) e hidróxido de amonio 30% v/v marca Carlo Erba<sup>®</sup> (Milán, Italia) para preparar una solución de hidróxido de amonio 2M, denominada en adelante “SB” (11,3 mL NH<sub>4</sub>OH se llevaron a 100 mL en matraz aforado clase A). Para la separación de creatina y creatinina se utilizó una resina de intercambio catiónico en forma hidrogénica, fuertemente ácida, 200 – 400 mesh DOWEX 50WX2 obtenida de Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Misuri, EE. UU.) en una columna de vidrio de 12,5 mm de diámetro interno y 15 cm de largo. El control de pH de las fracciones recolectadas se realizó con tiras de pH en el rango de 0 a 14 (código 109535) y de 2,5 a 4,5 (código 109541) de Merck<sup>®</sup> KGaA (Darmstadt, Alemania). Para el secado de las muestras se utilizó nitrógeno calidad 4.0. Durante la derivatización de las muestras se utilizó piridina (secada con tamiz molecular 0,3 nm código 105734 de Merck<sup>®</sup> KGaA, Darmstadt, Alemania), N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) de código 111805 y N,O-Bistrifluoroacetamida (BSTFA) con 1% Trimetilclorosilano (TMCS) de código 15238 de Fluka<sup>®</sup> (Seelze, Alemania).

### 4.2 Instrumentos

Las muestras y soluciones calibrantes se pesaron en una microbalanza (carga máxima 52 g, división 0,001 mg) Mettler Toledo<sup>®</sup> XPE56 (Zúrich, Suiza) calibrada utilizando los patrones de masa nacionales, lo cual aplica a todas las balanzas de aquí en adelante. Las muestras de suero humano se manipularon dentro de una cabina de bioseguridad BSC-1300 II A2-X Labotecgroup.com<sup>®</sup> (Montevideo, Uruguay) y se llevaron a sequedad con un evaporador de muestras de bloque seco

código 109A 28680-30 marca Cole-Parmer® (Chicago, EE. UU.). La derivatización se realizó en una estufa modelo FD 115 marca Binder® GmbH (Tuttlingen, Alemania). Las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de gases Agilent technologies® modelo 7890A acoplado a espectrómetro de masa modelo 5795C (Santa Clara, EE. UU.). El análisis fue realizado en las siguientes condiciones: columna de 5% fenilmetilpolisiloxano de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm código HP-5 MS de Agilent technologies® (Santa Clara, EE. UU.). Se utilizó helio como gas portador a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. La temperatura inicial de la columna fue 80 °C por 1 minuto, luego aumentando a 10°C min<sup>-1</sup> hasta 200 °C y 25 °C min<sup>-1</sup> hasta 250 °C por 5 minutos. La inyección de 0,5 µL se realizó en un modo *splitless* a 300 °C. La interfase y la fuente de iones del espectrómetro de masa fueron seteados 250 °C y 230 °C respectivamente. La cuantificación de creatinina se realizó en modo “Single Ion Monitoring”, monitoreando los iones 329 m/z y 332 m/z que corresponden a los productos de mayor rendimiento en la derivatización (tres unidades trimetilsilil por molécula). Para el análisis de eficiencia de derivatización se evaluó la relación entre la señal correspondiente al producto 100% derivatizado (329 m/z y 332 m/z) y la señal correspondiente a los productos de derivatización incompleta, con dos unidades trimetilsilil por molécula. Para esto adicionalmente se monitorearon los iones 256 m/z y 259 m/z. La determinación de humedad en piridina fue realizada utilizando un titulado coulombimétrico Karl – Fisher modelo C20 marca Mettler Toledo® (Zúrich, Suiza).

## **4.3 Preparación de muestra y determinaciones analíticas**

### **4.3.1 Procedimiento**

El procedimiento inicial a optimizar se basó en un método de referencia para la determinación de creatinina en suero humano por GC-IDMS publicado en la base de datos del JCTLM (Siekman, 1985). Las soluciones calibrantes fueron preparadas gravimétricamente pesando 3 mg material de referencia certificado de creatinina y adicionando 25 g de agua UP, preparándose dos soluciones independientes en cada instancia de cuantificación. Estas soluciones se diluyeron gravimétricamente para preparar soluciones de trabajo de 5, 7, 8,5, 9 y 11 mg kg<sup>-1</sup>. La solución de creatinina isotópicamente marcada (creatinina-d<sub>3</sub>, de ahora en adelante se llamará “solución de isótopo”) se preparó de forma equivalente a las soluciones calibrantes, pero partiendo de 1,5 mg del sólido. Se pesó una toma de 1 mL de suero humano previamente descongelado y homogeneizado o 1 mL de solución calibrante y se les agregó gravimétricamente una toma de solución de isótopo tal que igualara la masa de creatinina presente en las muestras analizadas y la masa de creatinina presente en la solución calibrante de 8,5 mg kg<sup>-1</sup>. Por simplicidad, en adelante las mezclas de solución calibrante y solución isótopo y las mezclas de suero y solución isótopo se

denominarán  $B_{ZY}$  y  $B_{XY}$  respectivamente. Para alcanzar el equilibrio isotópico, estas muestras fueron homogeneizadas por un tiempo variable entre 30 y 90 min (factor “tI”) en un agitador orbital a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Las soluciones calibrantes se reservaron para posterior secado mientras que las muestras de suero humano se trasvasaron a una jeringa sin aguja y se filtraron a  $0,45\ \mu\text{m}$  hacia un tubo pyrex de 50 mL. Se agregaron entre 20 a 25 gotas de SAc a cada muestra, hasta comprobar un  $\text{pH} = 4,5$ .

Para el intercambio iónico, se acondicionó una cucharada de resina en un matraz Erlenmeyer con 5 mL de SB, verificando  $\text{pH}$  básico. Se prepararon las columnas cromatográficas adicionando 2,5 mL de resina y realizando tres lavados de 10 mL de agua UP hasta comprobar  $\text{pH}$  neutro. Se sembraron las muestras en las columnas y se procedió a lavar la creatina con dos tomas de 10 mL de agua UP. Se recolectó la creatinina adicionando 10 mL de SB, descartando los primeros 2 mL y recolectando la fracción de creatinina en los próximos 8 mL. Las fracciones de creatinina y las soluciones calibrantes se secaron bajo nitrógeno en un bloque termostatzado a  $80^\circ\text{C}$ . Una vez que las muestras y soluciones calibrantes se encontraron completamente secas, se les adicionó  $200\ \mu\text{L}$  de piridina y  $50\ \mu\text{L}$  de MSTFA o BSTFA + 1% TMCS, según corresponda. Se homogeneizaron mediante vórtex por 10 segundos y se trasvasaron utilizando una pipeta pasteur de vidrio a un inserto de  $400\ \mu\text{L}$ , los cuales se colocaron en viales de automuestreador de 2 mL y se calentaron en estufa por un tiempo variable entre 20 y 70 minutos (factor “tD”) a una temperatura variable entre  $40$  y  $80^\circ\text{C}$  (factor “TD”). Luego de esta etapa las muestras se analizaron por GC-MS.

### **4.3.2 Impacto de la estrategia de secado de solvente y de agente derivatizante sobre la eficiencia de derivatización.**

Tres tomas de piridina fueron sometidas a diferentes condiciones de secado, en el primer caso se adicionó tamiz molecular 72 horas previo a su uso (“PIR 72h”), en el segundo caso 4 horas antes (“PIR 4h”) y en el tercer caso no se adicionó tamiz (“PIR ST”). En los casos donde se adicionó tamiz, este fue agregado en una proporción 1 mL de tamiz seco por cada 25 mL de solvente. Se prepararon 15 mL de una mezcla  $B_{ZY}$  de  $20\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$  de creatinina y creatinina- $\text{d}_3$  y se realizaron tomas de 1 mL en 12 viales de 4 mL ámbar. Las muestras se secaron según descrito en la sección anterior y se les agregó  $200\ \mu\text{L}$  de piridina (PIR 72h, PIR 4h o PIR ST, según el caso) y  $50\ \mu\text{L}$  de MSTFA o BSTFA + 1% TMCS según corresponda. Se prepararon tres réplicas de cada combinación de piridina con MSTFA y tres réplicas adicionales utilizando PIR 72h con BSTFA + 1% TMCS. Las muestras de piridina se analizaron posteriormente por quintuplicado mediante titulación coulombimétrica Karl-Fisher. Se registró la señal correspondiente al área del ion  $329\ \text{m/z}$  y se contrastó con el contenido de agua en cada muestra de piridina a través de un análisis de varianza de un factor (ANOVA, nivel de significancia = 5%) mientras que el efecto de la selección

de agente derivatizante en la señal creatinina se evaluó mediante una prueba t de Student (dos colas, nivel de significancia = 5%).

### **4.3.3 Separación cromatográfica por resina de intercambio iónico.**

Para verificar la correcta separación por intercambio catiónico entre creatinina y creatina se realizó un estudio de fracciones cromatográficas. Para este fin, se adicionó una muestra de 1 mL de suero humano, de una concentración estimada de creatinina de 10 mg L<sup>-1</sup>, con una toma de creatinina-d<sub>3</sub> tal que su concentración final fuera similar a la de creatinina. Análogamente, se realizó un estudio de fracciones con 0,5 mL de muestra de suero con el objetivo de evaluar el re-escalado del análisis con una menor toma de muestra. Esto permitiría economizar el uso de muestras de suero humano y solución isotópica, además de que potencialmente podría mejorar la resolución cromatográfica durante la separación por realizar una menor carga de muestra. Se sembraron estas mezclas en la columna cromatográfica de intercambio iónico previamente preparada y acondicionada tal cual se describe en la sección 4.3.1. Se recolectaron fracciones de 4,5 mL durante la etapa de lavado de creatina y elución de creatinina. Estas muestras fueron llevadas a sequedad y derivatizada siguiendo el mismo procedimiento, para su posterior análisis por GC-MS. Las señales correspondientes a los iones 329 m/z y 332 m/z fueron graficadas en función del volumen eluido para confirmar la separación cromatográfica de creatinina y creatina, y como siguiente paso, seleccionar la fracción de recolección óptima para garantizar la mayor recuperación de creatinina sin presencia de creatina.

### **4.3.4 Linealidad de curva de calibración e influencia del solapamiento isotópico.**

Para evaluar la linealidad el modelo de cuantificación por IDMS, se preparó una curva de calibración en el rango de 4,0 a 40,0 mg kg<sup>-1</sup> (rango fisiológicamente relevante) de creatinina con una adición de creatinina-d<sub>3</sub> de 20 mg kg<sup>-1</sup> a cada punto. Como siguiente paso, se evaluó el impacto del solapamiento isotópico entre analito y estándar interno sobre la linealidad de estas curvas de calibración. Para esto, se adicionaron alícuotas de creatinina-d<sub>3</sub> con creatinina natural, en proporciones de 0,5% (“CCB”) y 1,5% (“CCC”), para simular estándares internos de mayor solapamiento isotópico con el analito. Se prepararon 3 curvas de calibración en el rango de 5 a 20 mg kg<sup>-1</sup>, una con estándar interno sin adicionar (“CCA”) y las otras dos (CCB y CCC) con estándar interno adicionado en las proporciones ya mencionadas. Los análisis de regresión fueron realizados utilizando Minitab® 16.2.3.

### 4.3.5 Optimización de tiempo de equilibrado isotópico, tiempo y temperatura de derivatización.

La optimización de las variables tiempo de equilibrado isotópico ("tI"), tiempo y temperatura de derivatización ("td" y "TD" respectivamente) se realizó a través de un diseño factorial de tres factores a dos niveles (diseño 2<sup>3</sup>) donde los experimentos realizados se detallan en la Tabla 1.

Experimento	tI (min)	TD (° C)	td (min)
1	30 (-1)	40 (-1)	20 (-1)
2	90 (1)	40 (-1)	20 (-1)
3	30 (-1)	40 (-1)	70 (1)
4	90 (1)	40 (-1)	70 (1)
6	30 (-1)	80 (1)	20 (-1)
7	90 (1)	80 (1)	20 (-1)
8	30 (-1)	80 (1)	70 (1)
9	90 (1)	80 (1)	70 (1)

**Tabla 1** Diseño experimental y codificación para cada experimento (entre paréntesis). tI: tiempo de equilibrado isotópico (en minutos), td: tiempo de derivatización (en minutos) y TD: temperatura de derivatización (en °C).

Para llevar a cabo el diseño experimental se analizaron ocho tomas (realizadas en peso) de 1 mL del material de referencia certificado de creatinina en suero humano y se procesaron según el procedimiento detallado anteriormente, variando en cada caso los factores. Considerando que esta es una fase de optimización y atendiendo a la disponibilidad de materiales, cada experimento se analizó por una réplica única, esto se considera suficiente para evaluar tendencias y posteriormente se repetirá en condiciones óptimas con el n adecuado para la validación. Se utilizaron materiales de referencia certificado con el objetivo de detectar aquellos experimentos donde el sesgo del método fuese acorde al propósito. Las respuestas evaluadas fueron la señal relacionada a creatinina (área de ion 329 m/z), el sesgo determinado como la diferencia entre la fracción de masa certificada y la fracción de masa resultante, la eficiencia de derivatización y la relación de eficiencias de derivatización ("relación ED" definido como el cociente 329/256 m/z: 332/259 m/z). La fracción de masa de creatinina fue calculada por *double exact-matching isotope dilution*, según la Ecuación (1) (Burke y Mackay, 2008).

$$w_X = w_Z \times \frac{m_Y m_Z (R_Y - R_B)(R_{B,c} - R_Z) R_X}{m_X m_{Y,c} (R_B - R_X)(R_Y - R_{B,c}) R_Z} \quad (1)$$

En esta ecuación  $w_X$  es la fracción de masa de creatinina en la muestra de suero humano,  $w_Z$  es la fracción de masa de creatinina en la solución calibrante,  $m_Y$  es la masa de solución de creatinina-d<sub>3</sub>

adicionada a la mezcla de muestra ( $B_{XY}$ ),  $m_{Y,c}$  es la masa de solución de creatinina- $d_3$  adicionada a la mezcla de calibración ( $B_{ZY}$ ),  $m_Z$  es la masa de solución de calibrante adicionada a la mezcla de calibración ( $B_{ZY}$ ),  $m_X$  es la masa de suero tomada,  $R$  son los cocientes entre las señales de los iones 329 m/z y 332 m/z en  $B_{ZY}$  ( $R_B$ ), en  $B_{XY}$  ( $R_{B,c}$ ), en la solución calibrante ( $R_X$  y  $R_Z$ ) y la solución del isótopo ( $R_Y$ ).

La eficiencia de derivatización fue evaluada como la relación entre la señal del producto tri-derivatizado (tres unidades del grupo trimetilsilil por molécula de creatinina, “3-TMS-creatinina”) y el producto di-derivatizado, “2-TMS-creatinina”. Esto corresponde a las señales de los iones 329 m/z y 256 m/z, respectivamente. La eficiencia de derivatización también se estudió para el estándar interno, creatinina- $d_3$ , en este caso monitoreando los iones 332 m/z y 259 m/z. El análisis del efecto de los factores individuales y combinados se realizó según las Ecuaciones (2) y (3) según Costa Ferreira (2015).

$$\text{Efecto factor A} = \frac{\sum Y_{+A} - \sum Y_{-A}}{4} \quad (2)$$

$$\text{Efecto interacción AB} = \frac{\sum Y_{+A*B} - \sum Y_{-A*B}}{4} \quad (3)$$

En estas ecuaciones  $Y$  es la variable de respuesta obtenida, e  $Y_{+A}$  y  $Y_{-A}$  indican aquellas respuestas  $Y$  obtenidas cuando el factor  $A$  recibió una codificación positiva o negativa, respectivamente. El denominador indica los pares de respuestas  $Y_{+A}$ ,  $Y_{-A}$  presentes en este diseño de ocho experimentos. Para el estudio de la interacción entre los factores  $A$  y  $B$  se toman las respuestas  $Y_{+A*B}$ ,  $Y_{-A*B}$  obtenidas cuando el factor de la codificación de  $A$  y  $B$  fue positivo o negativo, respectivamente. Numéricamente, cuanto mayor sean estos resultados, mayor es el efecto del factor o interacción de los factores en el proceso estudiado. A su vez, cuando un efecto es positivo, la respuesta aumenta a medida que aumenta el factor y viceversa.

Para realizar la selección de condiciones óptimas se evaluó como los factores o combinación de factores generaban un impacto deseado en las variables de respuesta. Por ejemplo, si un incremento o descenso de un factor, o combinación de ellos, generaba un descenso en la variable sesgo o un aumento en la eficiencia de derivatización. De esa manera se elaboró un sistema de puntuación mediante el cual se asignaron puntos a cada experimento cuando este presentaba un factor o una combinación de factores que generaba un resultado deseado sobre cada variable de respuesta. En los casos en que dos condiciones favorables ocurrieran para un experimento, se le asignó el doble de puntaje. Finalmente se sumaron los puntos que recibió cada experimento en cada variable de respuesta y se evaluaron los experimentos de mayor puntaje.

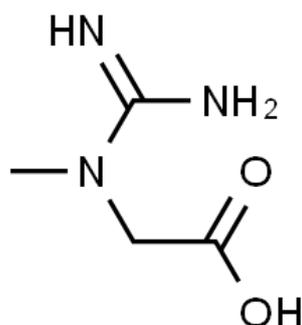
## **Capítulo 5. Presentación de resultados y discusión**

Dado el impacto directo sobre el desempeño de la técnica de IDMS para la determinación de creatinina en suero humano, ya desarrollado en las Secciones 3.2 y 3.3, este apartado presenta los resultados y la discusión de la evaluación de las siguientes variables: el equilibrado isotópico, la derivatización de analito y estándar interno, la remoción de la creatina como interferencia y la linealidad de la curva de calibración.

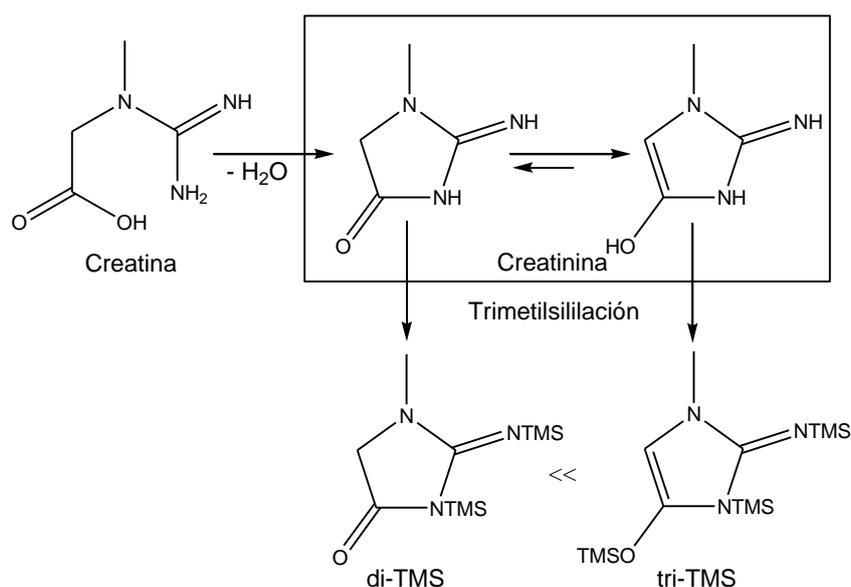
En las Secciones 5.1 y 5.4 se estudia el impacto del agente derivatizante seleccionado, las condiciones de secado del solvente y las condiciones de tiempo y temperatura sobre la eficiencia de derivatización. Por otro lado, en la Sección 5.2 se cubre el estudio de las condiciones de eliminación de la creatina como interferencia mediante de la separación cromatográfica por intercambio iónico. La Sección 5.3 presenta los resultados de la evaluación de linealidad de la curva de calibración y el efecto del solapamiento isotópico sobre esto. Por último, en la Sección 5.4 se realiza una evaluación global de la veracidad del método tomando las condiciones optimizadas según se informa en las Secciones 5.1, 5.2 y 5.3, al mismo tiempo que se observa el impacto de los factores tiempo de equilibrado isotópico y las condiciones de derivatización ya mencionadas. Como resultado de esta exhaustiva evaluación se propone un conjunto de condiciones operacionales que dan lugar a un método con la veracidad adecuada al propósito planteado.

### **5.1 Impacto de la estrategia de secado de solvente y de agente derivatizante sobre la eficiencia de derivatización.**

Para el caso particular de la determinación de creatinina en muestras biológicas, existe un inconveniente asociado a la derivatización: la creatina (Figura 6), presente naturalmente en este tipo de muestras, genera el mismo producto trimetilsililado que la creatinina ya que se encuentra en un equilibrio de interconversión con esta, como se ilustra en la Figura 7 (Fernández-Fernández et al., 2015; Tomita & Nishioka, 2005). Esto genera la necesidad de eliminar la creatina previo a la etapa de derivatización, usualmente mediante una separación cromatográfica por intercambio iónico, que adicionalmente elimina otras potenciales interferencias de la muestra como ser proteínas y lípidos (Siekman, 1985).



**Figura 6** Estructura de la creatina (N-carbamimidoyl-N-metilglicina, N° CAS 6020-87-7). Tomado de (ChemSpider, 2020b).



**Figura 7** Reacción de trimetilsililación de creatinina. Adaptado de (Tomita & Nishioka, 2005).

La derivatización planteada según se muestra en la Figura 7 ilustra la formación de los productos di y trimetilsililados, este último generándose en mayor grado que el primero. La relación del rendimiento de producción entre el derivatizado dimetilsililado y el trimetilsililado no es constante (Tomita & Nishioka, 2005). Es este uno de los varios motivos por los cuales se emplea un estándar interno de comportamiento químico similar al analito — un análogo isotópico de la creatinina — dado que se espera que el grado de derivatización, es decir la relación de rendimiento planteada, sea igual para ambos casos. En este trabajo adicionalmente se propone un cambio de estándar interno con comportamientos químicos que podrían diferir entre sí, generando una derivatización en diferentes grados. Es entonces evidente que el supuesto comportamiento químico equivalente entre analito y estándar interno debe ser confirmado ya que esto impactará en la validez del uso de la técnica de dilución isotópica y, por consiguiente, su veracidad.

La optimización de la etapa de derivatización impacta directamente en la mejora de la sensibilidad del método, dado que es posible obtener una mayor señal a partir de la misma cantidad de analito. Las condiciones óptimas fueron analizadas variando la cantidad de humedad presente en el solvente (piridina) y el agente derivatizante utilizado. La humedad es un parámetro crítico a optimizar dado que los productos de derivatización alquil-sililados son sensibles a la humedad y afectan directamente el rendimiento de la reacción (Cardinael et al., 2015). Los resultados del estudio de optimización se muestran en la Tabla 2.

<b>Muestra de piridina</b>	<b>PIR 72h</b>	<b>PIR 4h</b>	<b>PIR ST</b>	<b>PIR ST</b>
<b>Agente derivatizante</b>	MSTFA	MSTFA	MSTFA	BSTFA + 1% TMCS
<b>Humedad (%)</b>	0,0096	0,0262	0,0311	0,0311
<b>Promedio de señal de área ion 329 m/z (n=3)</b>	20665682	21340254	21694744	42932003
<b>Desviación estándar (n=3)</b>	8157537	1394249	1803771	1032117

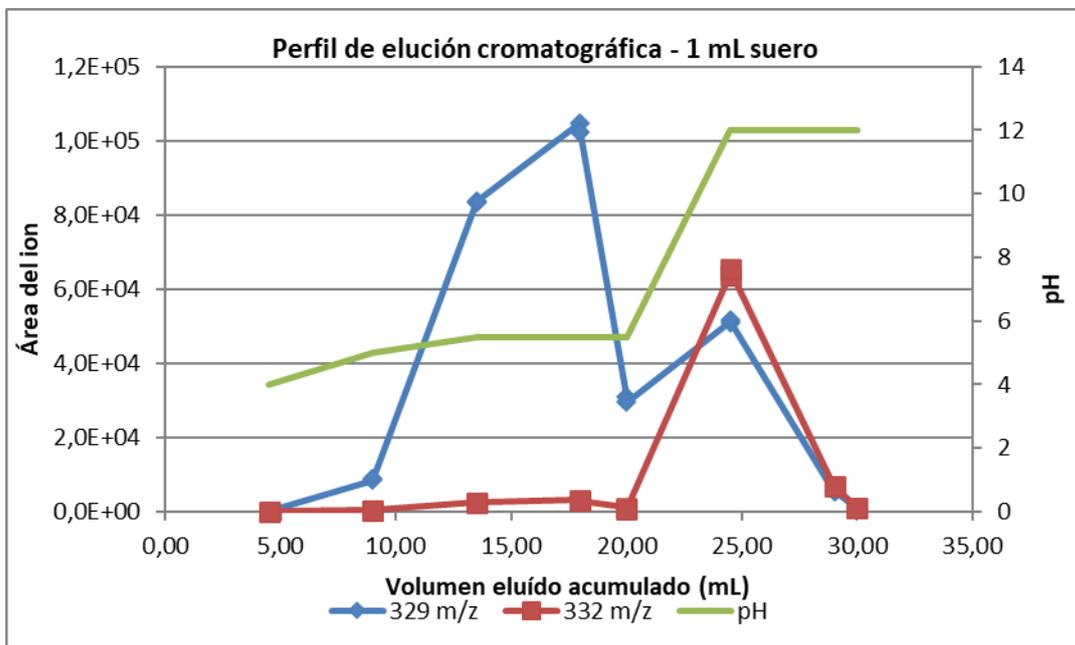
**Tabla 2** Resultados del estudio de optimización de la etapa de derivatización. PIR 72h, PIR 4h y PIR ST corresponde a los tratamientos de secado aplicado al solvente piridina, descritos en la sección Optimización de solvente y agente de derivatización dentro de Materiales y Métodos.

Los resultados de la prueba ANOVA indican que la variación de la señal correspondiente a creatinina no puede explicarse estadísticamente por la variación de la humedad del solvente ( $F < F$  crítico,  $\alpha = 5\%$ ), evaluado hasta una humedad del 0,04 %. Por otro lado, la señal de creatinina se duplicó al utilizar BSTFA + 1% TMCS en contraste con MSTFA, lo que evidencia el efecto de la selección del agente de derivatización sobre la señal de creatinina (ANOVA,  $F > F$  crítico,  $\alpha = 5\%$ ). Esto es esperable ya que el agente BSTFA presenta una reactividad mayor que el MSTFA como donador de grupo silil mientras que la adición de trimetilclorosilano (TMCS) en pequeñas proporciones acelera la reacción con grupos retadores como amidas, aminas secundarias y grupos hidroxilos presentando impedimento estérico (Poole, 2013).

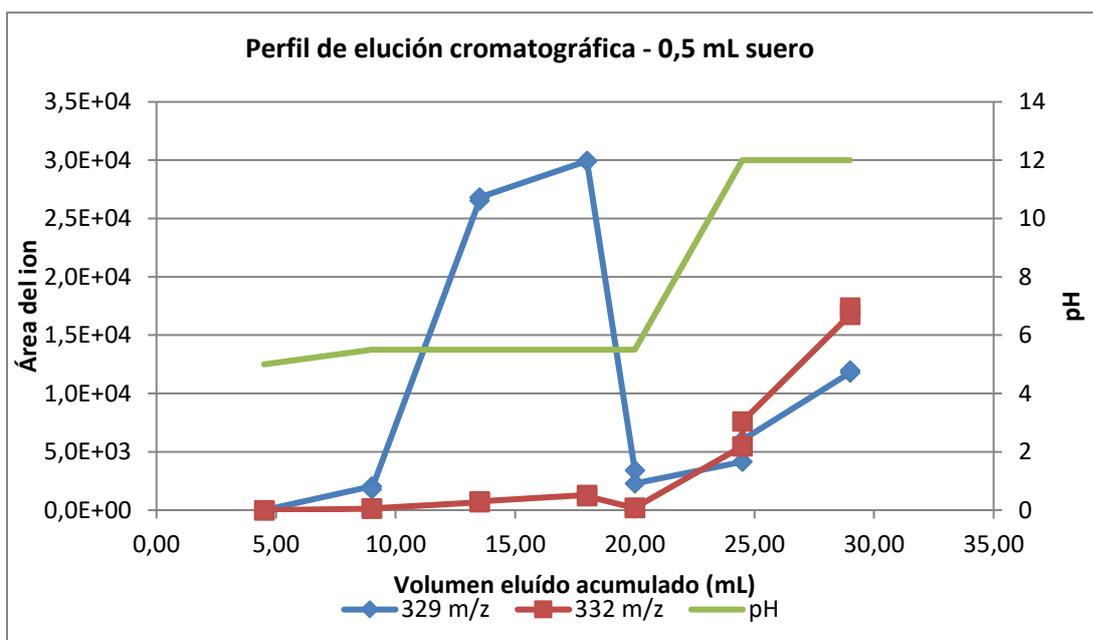
## **5.2 Separación cromatográfica por resina de intercambio iónico.**

Se obtuvieron siete fracciones cromatográficas de 4,5 mL para el estudio realizado con 0,5 mL de suero y ocho fracciones para el estudio con 1 mL de suero humano. Estas fracciones se analizaron por GC-MS por duplicado y la relación entre la señal de los iones estudiados y el volumen eluido se muestran en Gráfico 1 y Gráfico 2. La señal del ion 329 m/z corresponde a la creatinina y la creatina presente a la muestra, mientras que la señal 332 m/z se relaciona con la creatinina-d<sub>3</sub>. Es

posible observar que la señal del ion 329 m/z alcanzó dos máximos antes y después del aumento de pH, los cuales corresponden a la señal de creatina y creatinina respectivamente. Adicionalmente, la creatinina co-eluyó con la creatinina-d<sub>3</sub>, como se ve en la superposición de las señales 329 y 332 m/z. A partir de estas observaciones, es posible decir que la separación cromatográfica ocurrió con resolución incompleta. Por este motivo, se decide descartar la primera fracción de la etapa de recolección. En el Gráfico 1, es posible ver que las señales correspondientes a creatinina y creatinina-d<sub>3</sub> disminuyeron en la última fracción recolectada cuando se toma 1 mL de suero humano, lo cual no ocurrió con la muestra de 0,5 mL (Gráfico 2), indicando que la recolección de creatinina no fue completa. Por este motivo se decidió utilizar 1 mL de muestra como toma de análisis para las pruebas posteriores.



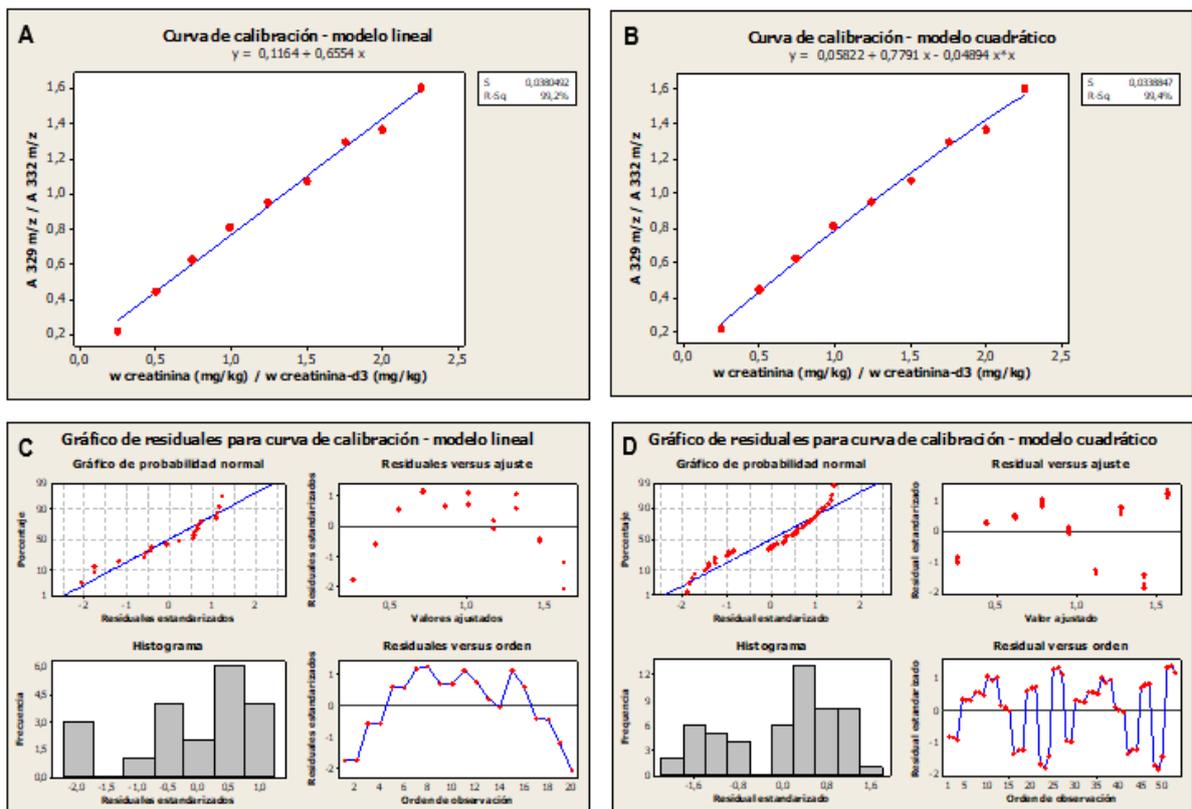
**Gráfico 1** Perfil de elución cromatográfica de creatinina y creatina para una muestra de 1 mL de suero. Las señales 329 m/z y 332 m/z corresponden a creatinina y creatinina natural en el primer caso, y a creatinina-d<sub>3</sub> en el segundo. El aumento de pH corresponde al cambio de la etapa de lavado de creatina a la recuperación de creatinina.



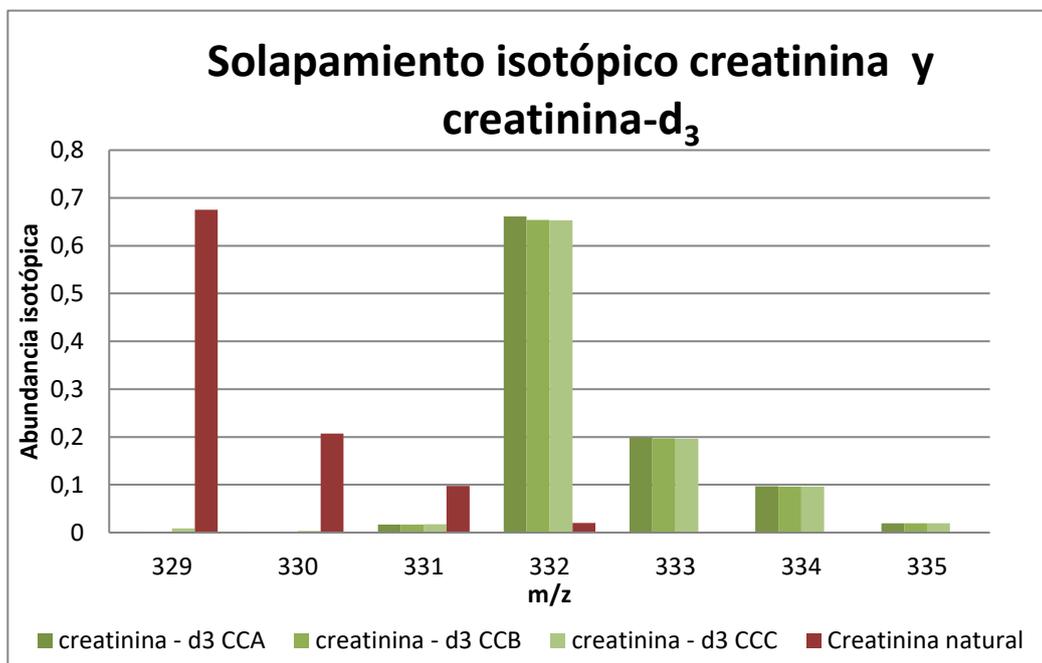
**Gráfico 2** Perfil de elución cromatográfica de creatinina y creatina para una muestra de 0,5 mL de suero. Las señales 329 m/z y 332 m/z corresponden a creatinina y creatinina natural en el primer caso, y a creatinina-d<sub>3</sub>. El aumento de pH corresponde al cambio de la etapa de lavado de creatina a la recuperación de creatinina.

### 5.3 Linealidad de curva de calibración e influencia del solapamiento isotópico.

El estudio de linealidad de la curva de calibración en el rango de 4 a 40 mg.kg<sup>-1</sup> de creatinina se muestra en el Gráfico 3. En los cuadros A y C, se muestra el modelo lineal para los datos correspondientes a la curva de calibración y el análisis de residuales respectivamente. Es posible observar un coeficiente de determinación de  $R^2 = 99,2\%$  y una distribución de los residuales claramente no aleatoria, con una tendencia hacia valores positivos. Sumado a esto, la prueba de falta de ajuste (*lack of fit-LOF*) para este modelo indica que la componente de varianza debido a falta de ajuste es estadísticamente mayor a la componente de varianza por error puro (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Por otro lado, en las figuras B y D se muestra el modelo cuadrático el cual muestra una leve mejora en la correlación ( $R^2 = 99,4\%$ ) y una distribución aleatoria en los gráficos de residuales. Si bien el coeficiente de correlación encontrado no es inusual para el análisis de muestras complejas, es considerado bajo para aplicaciones metrológicas en las que se busca una baja incertidumbre asociadas, donde generalmente se toma como aceptable un  $R^2$  mayor a 99,99%. A partir de estos resultados, se descarta la opción de cuantificar realizando una curva de calibración lineal o utilizando un *bracketing*. Con el fin de evaluar si el solapamiento de abundancias isotópicas entre creatinina y creatinina-d<sub>3</sub>, y por lo tanto la elección de estándar interno, inciden en la linealidad del modelo se prepararon mezclas B<sub>ZY</sub> tal que simularan soluciones de creatinina-d<sub>3</sub> con mayor solapamiento de abundancia isotópica con el analito, como se visualiza en el Gráfico 4.



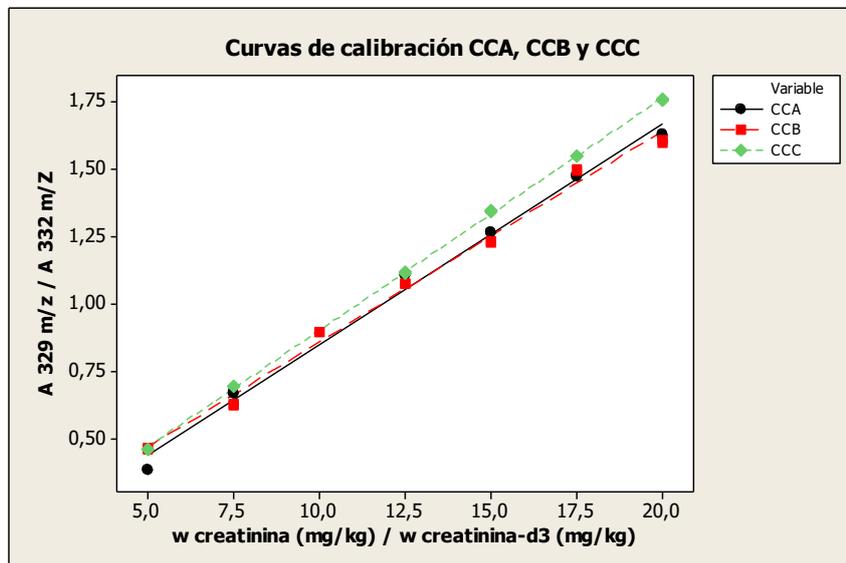
**Gráfico 3** Análisis de regresión de la curva de calibración utilizando un modelo lineal (A) y un modelo cuadrático (B). Evaluación de gráfico de residuos para estos modelos (C y D respectivamente).



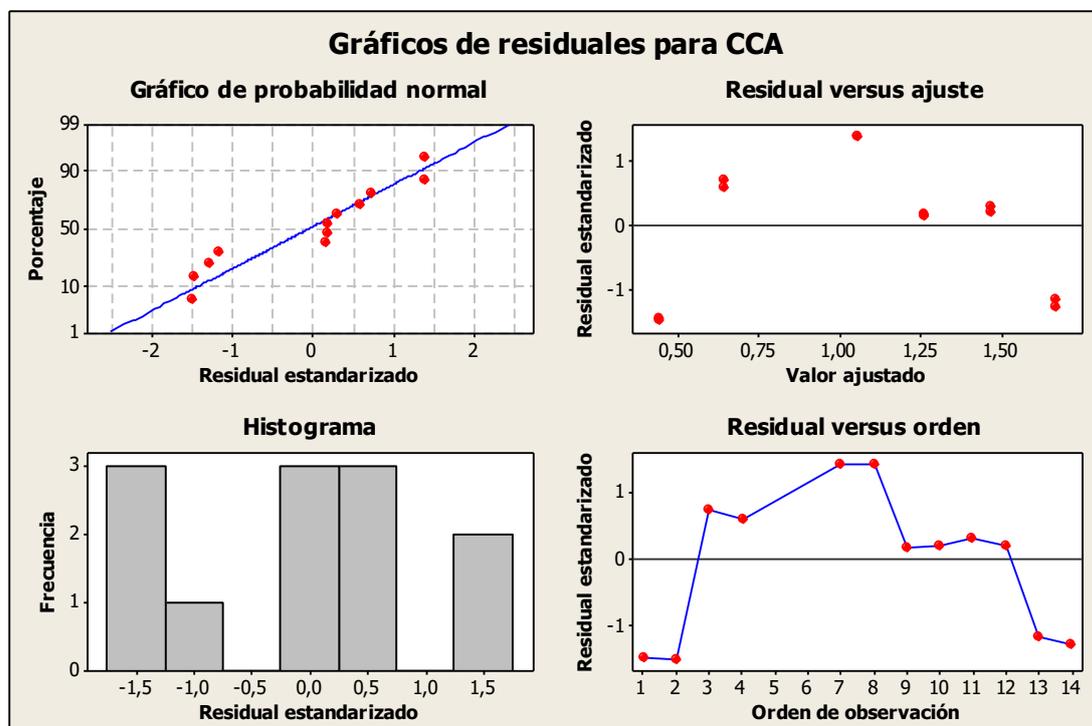
**Gráfico 4** Solapamiento de abundancias isotópicas entre el analito (creatinina) y las soluciones de estándar interno sin modificar (creatinina-d<sub>3</sub> CCA) y modificadas (creatinina-d<sub>3</sub> CCB y creatinina-d<sub>3</sub> CCC).

En el Gráfico 5 se muestran las tres curvas de calibración y en los Gráfico 6, 7 y 8 el análisis de residuales para las curvas de calibración CCA, CCB y CCC. En este caso, sólo el modelo lineal de

la curva de calibración CCA no pasó la prueba de falta de ajuste (ANOVA,  $p < 0,05$ ) mientras que los modelos lineales para CCB y CCC si lo hicieron. Esta mejora en la linealidad de estos dos últimos modelos también se visualiza en la distribución aleatoria de los residuos en las gráficas de residuales.



**Gráfico 5** Curvas de calibración CCA, CCB y CCC ajustadas a un modelo lineal.



**Gráfico 6** Gráficos de residuales para el modelo lineal CCA.

Si bien es posible proponer a partir de los resultados que el aumento de solapamiento isotópico entre analito y estándar interno podría mejorar la linealidad del modelo planteado, esto contradice las referencias que proponen lo contrario (Alonso & Gonzalez, 2013, Capítulo 2) Este contraste puede llegar a ser explicado por el leve grado de solapamiento generado en las curvas CCB y CCC, donde posiblemente un mayor grado de solapamiento generara curvaturas más significativas.

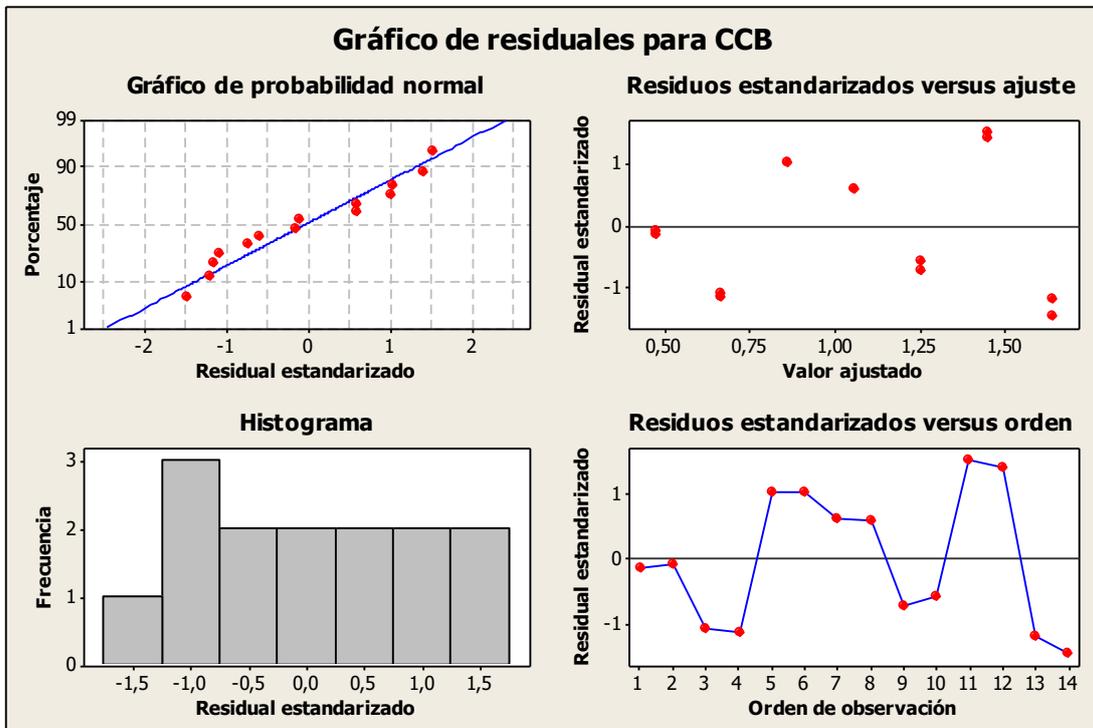


Gráfico 7 Gráficos de residuos para el modelo lineal CCB.

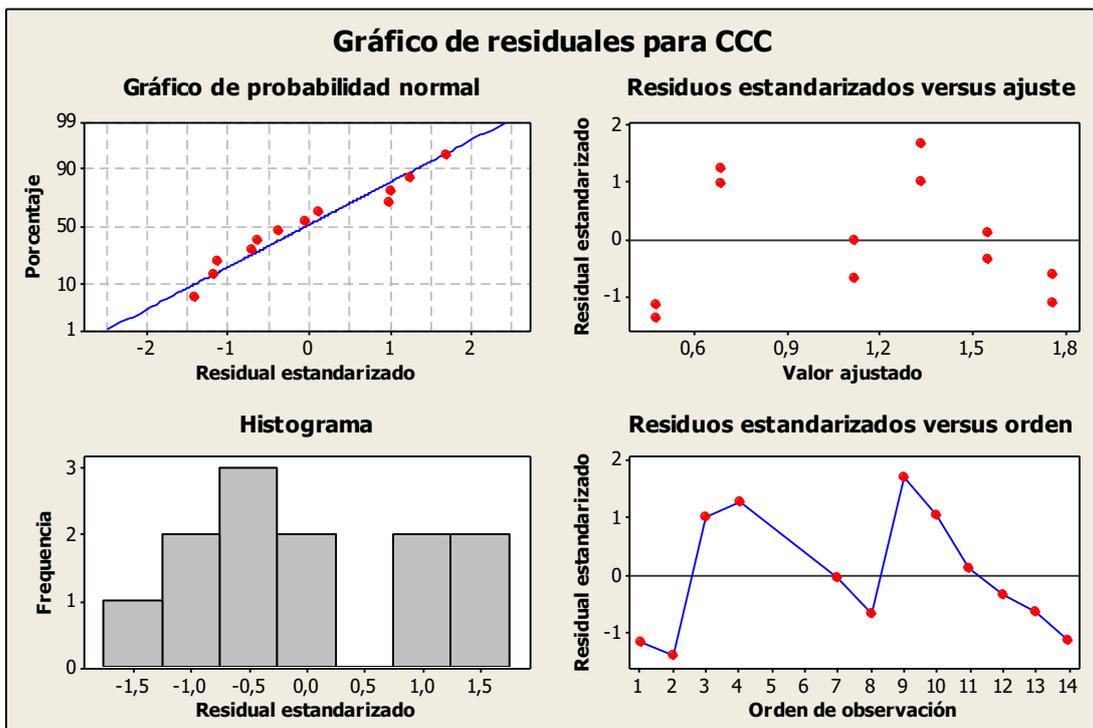


Gráfico 8 Gráficos de residuos para el modelo lineal CCC.

## 5.4 Optimización de tiempo de equilibrado isotópico, tiempo y temperatura de derivatización.

Para la optimización de las variables tiempo de equilibrado isotópico, tiempo y temperatura de derivatización se monitorearon múltiples variables respuesta; de esta forma fue posible evaluar de forma más exhaustiva el impacto de las variables de entrada. En este sentido, el área de creatinina y la eficiencia de derivatización fueron monitoreadas por estar íntimamente relacionadas con la sensibilidad del método. Por otro lado, la variable asociada al sesgo evalúa la veracidad del método, y su signo toma especial relevancia ya que la creatina, presente naturalmente en el suero humano, es una interferencia conocida del método por poseer el mismo producto de derivatización que la creatinina. Si bien en la sección 5.2 ya se discutió la adecuación de las condiciones de separación de creatinina y creatina durante la etapa de intercambio catiónico, esta propuesta es sujeta a confirmación mediante la evaluación del sesgo. Por otro lado, es importante identificar el conjunto de valores de los factores estudiados que permita verificar una relación de eficiencias de derivatización entre analito y estándar interno próximo a la unidad. El apartamiento de esta condición es un indicio de que el analito y el estándar interno no presentan comportamientos químicos equivalentes, requisito esencial para la correcta aplicación de la técnica de dilución isotópica. Los resultados obtenidos en el diseño factorial se detallan en la Tabla 3.

Exp.	W (mg kg <sup>-1</sup> )	Rec. (%)	Sesgo (mg kg <sup>-1</sup> )	A creatinina	R <sup>329/256 m/z</sup>	R <sup>332/259 m/z</sup>	Relación ED
1	8,38	101,2%	0,101	17633	0,3853	0,3190	1,208
2	8,70	105,1%	0,421	22704	0,3373	0,3104	1,087
3	9,29	112,2%	1,011	18185	0,3411	0,2741	1,245
4	8,38	101,2%	0,100	43281	0,6056	0,4686	1,292
6	8,40	101,5%	0,125	29619	1,0342	0,8661	1,194
7	9,29	112,2%	1,006	18422	0,7968	0,6754	1,180
8	10,45	126,2%	2,168	11353	0,8331	0,5698	1,462
9	9,34	112,9%	1,064	112915	0,4795	0,4188	1,145

**Tabla 3** Fracción de masa de creatinina (w) determinada por double exact-matching isotope dilution (Ec. 1), porcentaje de recuperación tomando como referencia el valor certificado del MRC SRM 967 (“Rec.”), cálculo del sesgo, como la diferencia entre concentración certificada y fracción de masa calculada, área correspondiente a la señal de creatinina (“A creatinina”), eficiencia de derivatización medida como la relación entre señales 329/256 y 332/259 m/z (“R<sup>329/256 m/z</sup>” y “R<sup>332/259 m/z</sup>” respectivamente) y la relación de eficiencia de derivatización.

El efecto de los factores tI, tD y TD, sobre las variables de respuesta área de creatinina, sesgo, eficiencia de derivatización y relación de ED, se calcularon según las Ecuaciones (2) y (3) mencionadas en la Sección 4.3.5 y se detallan en la Tabla 4.

Efecto factor	A <sub>creatinina</sub>	R (%)	R <sup>329/256</sup>	-R <sup>332/259</sup>	Sesgo (mg kg <sup>-1</sup> )	Relación ED
<b>tI</b>	30133	-0,025	-0,094	-0,039	-0,203	-0,101
<b>TD</b>	17626	0,082	0,369	0,290	0,683	0,037
<b>td</b>	24339	0,081	-0,074	-0,110	0,673	0,119
<b>tI x TD</b>	15050	0,011	-0,202	-0,132	0,092	-0,065
<b>tI x td</b>	33196	-0,097	0,049	0,061	-0,804	-0,034
<b>td x TD</b>	13774	0,046	-0,186	-0,167	0,378	-0,002

**Tabla 4** Evaluación del efecto de los factores individuales y combinados tI, TD y td sobre las variables de respuesta área de creatinina (“A<sub>creatinina</sub>”), sesgo, eficiencia de derivatización (“R<sup>329/256 m/z</sup>” y “R<sup>332/259m/z</sup>”) y relación de eficiencia de derivatización.

Los tres factores, tI, TD y td, tuvieron un efecto positivo sobre la señal de área de creatinina, tI en mayor medida que el resto (experimentos 2, 4, 7 y 9, "E2", "E4", "E7" y "E9"). No es posible saber a simple vista si ese aumento se debe a una mejora en la sensibilidad del método o a la presencia de una interferencia como podría ser el caso de E9, con una recuperación de 112%. Adicionalmente, el efecto combinado de tI y td tiene un mayor impacto en el área de creatinina. Los experimentos donde esto ocurre son E1, E4, E6 y E9. La incidencia de tiempo de derivatización en el aumento de la señal de creatinina puede explicarse por un aumento en la eficiencia de derivatización, produciendo una mayor proporción de 3-TMS-creatinina y aumentando su señal respectiva. Dado que en todos los casos se obtuvo un sesgo positivo y recuperaciones mayores a 100%, es importante evaluar qué factor genera este efecto en el sesgo y recuperación. Este es el caso de tI y el efecto combinado de tI y td en mayor medida, mientras que el aumento de td y TD afectó negativamente el sesgo. Los experimentos donde el tI presenta un nivel +1 y el producto de tI x td es positivo, son E1, E4 y E6. Como se expuso en la Sección 3.2.1, durante el equilibrado isotópico se busca que el analito y el estándar interno (creatinina-d<sub>3</sub>) alcancen la equivalencia química en cuanto a su disposición en la matriz. Si esto no es alcanzado, es posible que el estándar interno se encuentre disponible en menor o mayor grado que el analito, generando una extracción diferencial de los mismos y su sesgo asociado. Es por eso por lo que, en términos generales, un mayor tiempo de equilibrado puede generar resultados menos sesgados. En cuanto a los estudios de eficiencia de derivatización, se observó que para este sistema cromatográfico la señal del ion 256 m/z presentó un pico con *tailing* excesivo en comparación con el ion 329 m/z, coherente con la presencia de un grupo amino. La señal correspondiente al producto 1-TMS-creatinina no se detectó, posiblemente porque este producto no fuera lo suficientemente volátil para ingresar al sistema cromatográfico o porque no se generó en cantidades significativas. La eficiencia de derivatización también se estudió para el estándar interno, creatinina-d<sub>3</sub>, en este caso monitoreando los iones 332 m/z y 259 m/z. La mayor eficiencia de derivatización se alcanzó a mayores TD, en E6, E7, E8 y E9. Por otro lado, td parece no afectar significativamente la eficiencia de derivatización. Las eficiencias de

derivatización de creatinina y creatinina-d<sub>3</sub> no fueron iguales en todos los casos, encontrándose una eficiencia de derivatización entre 8 y 46 % mayor para la creatinina. Esto presenta un problema ya que la técnica de dilución isotópica mediante espectrometría de masas sostiene su alto desempeño analítico en que el comportamiento químico del analito (creatinina) y del estándar interno (creatinina-d<sub>3</sub>) es prácticamente equivalente. Se sospecha que la presencia de deuterio en el estándar interno desfavorece la reacción bajo algunas condiciones, por lo tanto, la eficiencia de derivatización disminuye. En vista que la eficiencia de derivatización para creatinina es mayor que creatinina-d<sub>3</sub>, se buscaron las condiciones de relación de ED donde esta sea menor, acercándose a la unidad. Esto sucede cuando t<sub>d</sub> disminuyó (E1, E2, E6 y E7) y en menor medida cuando t<sub>I</sub> aumentó (E2, E4, E7 y E9).

En la Tabla 5 se muestran los experimentos donde se optimizaron los factores para las diferentes variables de respuesta y la sumatoria de puntuación.

Experimento	Área <sub>creatinina</sub>	Sesgo	ED	Relación ED	Sumatoria
1	1	1		1	3
2	1			2	3
3					
4	2	1		1	4
6	1	1	1	1	4
7	1		1	2	4
8			1		1
9	2		1	1	4

**Tabla 5** Resumen de experimentos de condiciones optimizadas para las diferentes variables de respuesta y su sumatoria.

A partir de la tabla, es posible ver que los experimentos que sumaron mayor puntaje en cuanto a criterios cumplidos son E4, E6, E7 y E9. No obstante, ni E7 ni E9 cuentan con las condiciones necesarias para la disminución del sesgo, siendo este parámetro de mayor importancia por afectar directamente la exactitud del método, por lo tanto, se descartaron. El experimento E6 presentó como ventaja sobre E4, que la eficiencia de derivatización fue mayor en el primer caso y adicionalmente que el tiempo de análisis fue menor (E6: t<sub>I</sub> + t<sub>d</sub> = 50 min vs 160 min para E4). Por lo tanto, se considera que E6 presentó las mejores condiciones para este análisis.

## Capítulo 6. Conclusiones parciales

Se evaluó el efecto de variables asociadas a la etapa de equilibrado isotópico y derivatización sobre el método adaptado, pudiéndose encontrar condiciones óptimas tal que los resultados presenten un sesgo adecuado al propósito (recuperación = 101%). Adicionalmente, se evaluó la posibilidad de disminuir la toma de muestra y la posibilidad de cuantificar mediante curva de calibración, en ambos casos descartándose las alternativas propuestas. La validación preliminar de este método optimizado se realizó mediante la determinación de las cifras de mérito de veracidad, linealidad y robustez. El método adaptado presenta una mayor exactitud que el método de referencia en su diseño, al implicar preparaciones gravimétricas, y mayor simplicidad ya que permite el uso de un estándar interno disponible comercialmente, sin necesidad de sintetizarlo. Como ventaja adicional, este método propuesto redujo el tiempo de preparación de muestra en las etapas estudiadas a la mitad si se compara con el método de referencia (105 minutos versus 50 minutos). Este método optimizado y publicado (Silva et al., 2019) queda a disposición para el desarrollo de herramientas de aseguramiento de la calidad, como ser la asignación de valor en programas de evaluación externa de la calidad o en materiales de referencia certificados. Los beneficiarios finales del desarrollo de estas herramientas serán los laboratorios clínicos a nivel nacional que realizan estas mediciones de rutina, e indirectamente, la salud pública.

## PARTE B: FICOCIANOBILINA

### Capítulo 7. Introducción específica

La eutrofización es un término general en ciencias ambientales para describir un grupo de síntomas experimentados por ecosistemas acuáticos, cuyo origen es principalmente antropogénico a raíz de la sobre-fertilización de cultivos. La eutrofización genera de forma gradual un aumento de la productividad del ecosistema, resultando en un crecimiento excesivo de plantas acuáticas, una disminución del oxígeno disuelto y un deterioro generalizado de la calidad del agua.

En estas condiciones se favorece el crecimiento y la acumulación de biomasa de cianobacterias, generando el fenómeno conocido como floración (Bonilla et al., 2015). Las floraciones de estos organismos procariotas pueden crear condiciones tóxicas para los seres vivos debido a la producción de cianotoxinas, las cuales son particularmente peligrosas por su carácter letal en mamíferos a través de sus efectos carcinogénicos y teratogénicos tras extensos períodos de exposición de dosis bajas (Chorus & Bartram, 1999). Por este motivo, la presencia de cianobacterias en cuerpos de agua dulce utilizados para la obtención de agua potable y usos recreativos está recibiendo cada vez más atención por parte de salud pública (Brient et al., 2008).

Se ha registrado la presencia de estas floraciones en cuerpos de agua superficiales en Uruguay (Bonilla et al., 2015) con un aumento de la frecuencia en el transcurso de los años (Míguez, 2016). Son especialmente dignas de mención las floraciones excepcionales de cianobacterias tóxicas que se han registrado durante la época estival (Kruk et al., 2019) que han tenido su impacto en la economía por bajas en la actividad turística.

En virtud de esto, con frecuencia se implementan programas de monitoreo ambiental para evaluar la aparición de floraciones de cianobacterias en cuerpos de agua dulce. Esta herramienta permite a los entes reguladores tomar acciones de mitigación rápidamente en caso de que se superen los límites máximos recomendados internacionalmente.

Históricamente, se han utilizado sensores *in situ* como sistemas de alerta temprana basados en indicadores biológicos indirectos tales como clorofila A o indicadores directos como conteo de células de cianobacterias o mediciones de biovolumen realizadas en laboratorios (Bonilla et al., 2015). La medición de clorofila A en muestras acuáticas usualmente es realizada con sensores químicos, los cuales son definidos por la IUPAC (1991) como “dispositivos que transforman información química, desde la concentración de un componente específico de la muestra hasta la

composición analítica total, a una señal analíticamente útil”<sup>1</sup>. Estos sensores utilizan las propiedades espectroscópicas de pigmentos como clorofila A para generar una señal analítica que permita estimar la concentración de biomasa de cianobacterias presente en una muestra acuática. No obstante, estudios recientes han mostrado que otros pigmentos *in vivo*, como la ficocianina, tienen un mejor desempeño como indicadores a tiempo real dada su especificidad al crecimiento de cianobacterias (Bonilla et al., 2015).

Este pigmento es una ficobiliproteína que contiene tres unidades del cromóforo ficocianobilina y actúa como antena para la fotosíntesis (Squires & Moerner, 2017). Esta característica facilita el uso de sensores de fluorescencia selectivos para ficocianina para las mediciones indirectas de biomasa cianobacterial *in situ* (Brient et al., 2008).

En la actualidad, no se cuenta con estrategias confiables para evaluar el desempeño de estos sensores sumergibles, u otros fluorómetros de campo, dado que no existe disponibilidad de estándares comerciales de ficocianina con trazabilidad al sistema internacional de unidades (NSW Department of Primary Industries, 2012). Alternativamente, la preparación de un estándar de un organismo vivo, como sería un cultivo de cianobacterias, tampoco proveería un estándar trazable y estable.

En este sentido, el desarrollo de materiales de referencia certificados en pureza de ficocianobilina puede ser la base para la implementación de trazabilidad de las mediciones de estos sensores. Un posible camino para encontrar una relación entre la concentración de ficocianobilina con la de su proteína es a través de la normalización del espectro del cromóforo al desnaturalizarse, según propuso Glazer (1976). Como alternativa, se puede realizar la calibración de la sonda directamente a unidades de ficocianobilina y luego estudiar la correlación entre el cromóforo y la biomasa presente en la muestra. La ventaja de poder utilizar el cromóforo en lugar de la proteína como estándar de calibración de estas sondas radica en que es una molécula de tamaño relativamente menor, de mayor estabilidad y fácil obtención comercial. Adicionalmente, existen estrategias de determinación de su pureza para compuestos orgánicos que podrían ser aplicados a esta molécula para la generación de un patrón químico (Davies, Alamgir, et al., 2015; Davies, Jones, et al., 2015; Ishikawa et al., 2011; Westwood et al., 2013).

En función de lo expuesto, el objetivo de la segunda parte de la tesis fue el desarrollo de una estrategia de determinación de pureza de ficocianobilina para el desarrollo de patrones químicos

---

<sup>1</sup> Traducción propia. El texto original es “(A chemical sensor) is a device that transforms chemical information, ranging from the concentration of a specific sample component to total composition analysis, into an analytical useful signal” (IUPAC, 1991).

con potencial aplicación en la calibración de sensores de monitoreo de cianobacterias. Para este fin, se aplicó un balance de masa, en el cual se aplican técnicas como cromatografía líquida acoplada a detectores ultravioleta y visible y espectrometría de masas tándem, titulación coulombimétrica Karl Fischer, plasma acoplado inductivamente con espectrometría de masas de alta resolución y análisis termogravimétrico. Como complemento y confirmación al análisis de balance de masa, la muestra fue analizada por resonancia magnética nuclear, análisis elemental y calorimetría diferencial de barrido.

Como resultado de este trabajo se desarrolló una estrategia para la determinación de pureza de muestras purificadas de ficocianobilina. Sin embargo, esta táctica fue aplicada a una muestra de estudio con una numerosa y compleja presencia de impurezas lo cual impidió la obtención de un patrón adecuado al propósito. Mas allá de esto, las herramientas y capacidades desarrolladas en el INM uruguayo a partir de este trabajo, con el aporte de tecnología y conocimiento disponible desde la Facultad de Química de la Universidad de la Republica, podrán ser aplicados en la determinación de pureza de otras moléculas para el desarrollo de patrones químicos orgánicos necesarios y relevantes a nivel país.

Cabe destacar que este desarrollo se apoyó en conceptos adquiridos durante una pasantía de tres semanas realizada en el INM de Brasil, el *Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia* (INMETRO) en la División de Metrología Química y Térmica. Durante esta capacitación, cubierta con fondos del Banco Interamericano de Desarrollo, se cubrieron los aspectos principales de las estrategias de determinación de pureza de compuestos orgánicos por balance de masa y resonancia magnética nuclear.

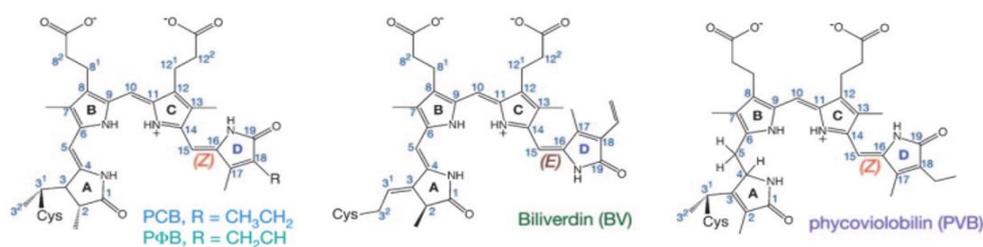
## **Objetivo específico de la parte B**

El objetivo de esta segunda parte fue evaluar el desarrollo de patrones de alta pureza de ficocianobilina como vía de implementación de la trazabilidad a las mediciones de ficocianina realizada con sensores acuáticos. Específicamente, se buscó desarrollar una estrategia para determinar la pureza de una muestra purificada de ficocianobilina. Posteriormente, se evaluaría la factibilidad de calibrar el contenido de ficocianina de una muestra utilizando el patrón de ficocianobilina previamente caracterizado.

## Capítulo 8. Fundamentos teóricos

### 8.1 Estructura y propiedades espectroscópicas de ficocianina y ficocianobilinas.

La ficocianina es una cromoproteína soluble en agua, perteneciente a los fitocromos y ficobiliproteínas, que presenta una respuesta fenotípica característica a la región roja del espectro de radiación visible. Presenta dos estados fotoconvertibles: Pr, que es el estado basal inactivo que absorbe luz en el rango de longitudes de onda de 600 a 700 nm, y Pfr, que absorbe luz en el rango de 705 a 740 nm y representa el estado biológicamente activo (Göller et al., 2001). Estas cromoproteínas están compuestas por la apoproteína y un cromóforo tetrapirrólico lineal unido covalentemente a esta mediante un enlace tioeter a un residuo de cisteína. Estos grupos prostéticos son los responsables de conferirle a la cromoproteína la propiedad de absorber radiación electromagnética en el rango visible y su fluorescencia (Nair et al., 2018). Las cromoproteínas presentan diferentes longitudes de onda máxima para los estados Pr y Pfr según sus cromóforos, los que se presentan diferencialmente entre plantas, bacteriofitocromos o cianobacteriocromos (Ulijasz & Vierstra, 2011). Los cromóforos más comunes son ficocromobilina (PΦB), ficoviolobilina (PVB), biliverdina (BV), ficoeritrobilina (PEB) y ficocianobilina (PCB), representados en la Figura 8. Este último grupo prostético se encuentra comúnmente en cianobacterias y será el objeto de este trabajo. Estudios recientes han mostrado que los cromóforos están profundamente inmersos en el dominio cGMP fosfodiesterasa/adenilciclase/FhIA (GAF) de las cromoproteínas, que en su forma inactiva presenta una configuración periplanar *ZZZ*ssa estabilizada por puentes de hidrógeno con otros residuos de aminoácidos cercanos (Hughes, 2010; Ulijasz et al., 2009).



**Figura 8** Estructura de cromóforos comunes en fitocromos: ficocromobilina (PΦB), ficocianobilina (PCB), ficoviolobilin (PVB) y biliverdina (BV). Imagen adaptada de (Rockwell & Lagarias, 2010).

Las ficobiliproteínas pueden constituir el 50% del total de proteínas celulares en cianobacterias, siendo la ficocianina la más abundante cuantitativamente, seguido de ficoeritrina y aloficocianina (Pagels et al., 2019). Las ficocianinas tienen peso molecular aparente de 110 kDa y están compuestas de dos subunidades diferentes que combinan la forma monomérica  $\alpha\beta$ , la cual se fusiona para formar trímeros  $(\alpha\beta)_3$  y hexámeros  $(\alpha\beta)_6$  (Nair et al., 2018). En cada subunidad  $\alpha$  se

encuentra una unidad de PCB, mientras que en cada subunidad  $\beta$  existen dos unidades de PCB (Glazer, 1988). Las secuencias de aminoácidos para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , numerados en forma creciente desde el extremo amino, y la posición donde ocurren las uniones covalentes con los cromóforos se muestran en las Figura 9 y Figura 10.

```

      10          20          30          40          50
MKTPLTEAVS IADSQGRFLS STEIQVAFGR FRQAKAGLEA AKALTSKADS
      60          70          80          90         100
LISGAAQAVY NKFPYTTQMQ GPNYAADQRG KDKCARDIGY YLRMVTYCLI
      110         120         130         140         150
AGGTGPMDEY LIAGIDEINR TFELSPSWYI EALKYIKANH GLSGDAATEA
      160
NSYLDYAINA LS

```

**Figura 9** Secuencia de aminoácidos de la cadena  $\alpha$  de c-ficocianina. En amarillo se resalta el aminoácido cisteína donde ocurre la unión covalente al cromóforo PCB. Tomado de (*cpcA* - *C-phyco cyanin alpha chain* - *Arthrospira platensis* - *cpcA gene & protein*, s. f.).

```

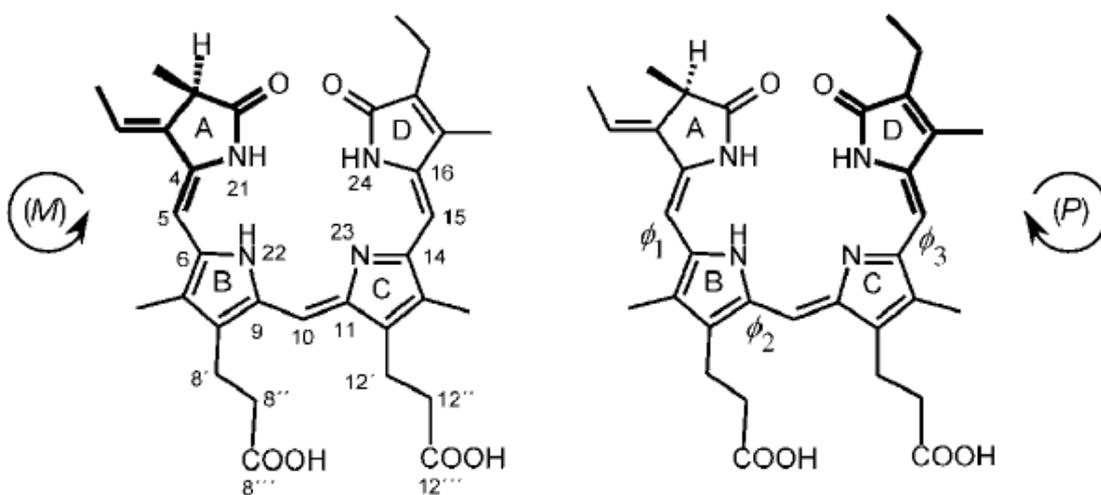
      10          20          30          40          50
MFDAPTKVVS QADTRGEMLS TAQIDALSQM VAESNKRLDA VNRITSNAST
      60          70          80          90         100
IVSNAARSLF AEQPQLIAPG GNAYTSRMA ACLRDMEIIL RYVTVAVFAG
      110         120         130         140         150
DASVLEDRCL NGLRETYLAL GTPGSSVAVG VGKMKEAALA IVNDPAGITP
      160         170
GDCSALASEI ASYFDRACAA VS

```

**Figura 10** Secuencia de aminoácidos de la cadena  $\beta$  de c-ficocianina. En amarillo se resaltan los aminoácidos cisteína donde ocurre la unión covalente al cromóforo PCB. Tomado de *CpcB* - *C-phyco cyanin beta chain—Arthrospira platensis—CpcB gene & protein* (s. f.).

La ficocianobilina (PCB, Figura 8) es un cromóforo tetrapirrólico de cadena abierta que puede ser encontrado en biliproteínas como aloficocianina y ficocianina. Otros tetrapirroles similares pueden ser encontrados en una extensa variedad de fotorreceptores de fitocromas y ficobiliproteínas. La función general de estos fotorreceptores es su reacción a la luz, con el objetivo de recolectar su energía o desatar procesos en sistemas biológicos mayores. Este proceso se inicia mediante la isomerización del cromóforo, el cual luego propaga la energía absorbida hacia el fotocentro o desencadena la respuesta a la excitación de la estructura del sistema. Si bien, como se planteó anteriormente, el cromóforo inmerso en la estructura de la proteína presenta una conformación restringida, el cromóforo aislado en solución puede adoptar configuraciones diversas (Watermann et al., 2014). Realizando una simulación metadinámica semiempírica, Watermann et al. (2014) muestrearon la hipersuperficie de energía libre del cromóforo para identificar las estructuras de equilibrio geométrico a temperatura ambiente en función del solvente. En particular, estas simulaciones mostraron un equilibrio delicado entre las conformaciones helicoidal y lineal que reacciona de forma muy sensible a las características del solvente, especialmente en cuanto a su

polaridad y capacidad de generar puentes de hidrógeno. Este concepto ya había sido propuesto por Falk et al. (1985) quienes estudiaron la conformación de pigmentos pirrólicos de esta clase y sus propiedades espectroscópicas en tetraclorometano (CCl<sub>4</sub>) y tris(dimetilamino)fosfina (HMPT). Ellos observaron que en el último caso la conformación preferencial era lineal dada la gran capacidad de este solvente para formar puentes de hidrógeno con los hidrógenos ácidos del PCB que estabilizan esta conformación. Un estudio semiempírico AM1 similar realizado por Göller et al. (2001) muestra que para el isómero ZZZ, la conformación más estable es la helicoidal cíclica sss, presentada en el Figura 11. Knip et al. (1998) arribaron a la misma conclusión mediante una confirmación por resonancia magnética nuclear. Adicionalmente, el centro quiral de la posición 2 en la molécula de ficocianobilina se encuentra predominantemente en la configuración (R) (Knipp et al., 1998).



**Figura 11** Conformaciones helicoidales cíclicas en sentido horario (P) y antihorario (M) del isómero ZZZ de PCB. Tomado de Göller et al. (2001).

Las propiedades espectroscópicas de los compuestos tetrapirrólicos se encuentran fuertemente influenciadas por su conformación y contexto dentro de las ficobiliproteínas nativas (Glazer, 1988). De esta manera, se distinguen ficobiliproteínas por sus propiedades absorptivas diferenciales en función de los cromóforos que contienen y su conformación: ficocianina ( $\lambda_{\text{max}}$  610 – 620 nm), ficoeritrina ( $\lambda_{\text{max}}$  540 – 570 nm), aloficocianina ( $\lambda_{\text{max}}$  652 nm) y ficoeritrocianina ( $\lambda_{\text{max}}$  575 nm), este último encontrándose infrecuentemente. Adicionalmente, las ficocianinas se clasifican en C-ficocianinas y R-ficocianinas de acuerdo con sus propiedades espectrales. Las C-ficocianinas, comunes en cianobacterias, tienen máximos de absorción a 620 nm y un máximo de emisión de fluorescencia a 640 nm. Las R-ficocianinas se encuentran en algas rojas con un máximo de absorción a 555 nm y 618 nm, emisión máxima a 636 nm, y se dividen posteriormente según sus características espectrales en tres grupos: R-ficocianinas I, II y III (Nair et al., 2018).

Hughes (2010) expone que el estado basal inactivo (Pr) en cianobacteriofitocromas presenta una longitud de onda máxima de absorción cercana a 660 nm, comportamiento que se asemeja al del cromóforo en condiciones ácidas. En función de esto, el autor propone que la ficocianobilina se encuentra en un “hueco ácido” con sus cuatro aminas protonadas, sospechando que un residuo de histidina próximo al cromóforo actúa como buffer. Adicionalmente, la fotoisomerización involucrada en el proceso de absorción de energía ocurre tanto para la molécula de PCB libre en solución o luego de desnaturalización de la proteína, en otras palabras, la apoproteína no es necesaria para el proceso de fotoisomerización (Rockwell & Lagarias, 2010). Esta información denota que el comportamiento espectroscópico del cromóforo libre o como parte de la proteína puede ser similar.

De acuerdo con los estudios realizados por Falk et al (1985) en tetrapirroles de cadena abierta, los cambios espectroscópicos son generados principalmente por torsión alrededor del enlace simple de los puentes metálicos exocíclicos, fijos tanto para el cromóforo en la proteína en estado basal como para el cromóforo en solución, y la influencia de la configuración es despreciable (Göller et al., 2001). En base a la evidencia que apoya el supuesto de que las propiedades espectroscópicas del cromóforo aislado y de la cromoproteína son similares, es posible proponer que el cromóforo pudiera ser utilizado para la calibración de los sensores de la cromoproteína.

## **8.2 Monitoreo de cianobacterias con sensores en tiempo real**

El monitoreo de la presencia de cianobacterias en cursos acuáticos se ha vuelto una necesidad con el transcurso de los años dado el nocivo impacto asociado a nivel de salud. Esta evaluación es habitualmente realizada por métodos de laboratorio convencionales, tales como análisis taxonómico, extracción de pigmentos fitoplanctónico o análisis de cianotoxinas en muestras de agua. Mas recientemente, y como alternativa a estos métodos costosos, tediosos y de respuesta tardía, se han empleado fluorómetros *in situ* para llevar a cabo una evaluación, prácticamente a tiempo real, del aumento de biovolumen de cianobacterias o cambios bruscos en la calidad del agua. Estos sensores en línea utilizan la fluorescencia *in vivo* generada por la ficocianina para monitorear la cantidad de cianobacterias presentes potencialmente tóxicas y representan un útil complemento a los métodos convencionales (Zamyadi et al., 2012). Si bien estos sensores presentan varias ventajas, como el monitoreo de alta frecuencia a tiempo real y su portabilidad, se han registrado interferencias y otros problemas que hacen cuestionar su confiabilidad (Bertone et al., 2019; Zamyadi et al., 2012). Estos sensores no hacen una determinación directa del conteo de células de cianobacterias o su biovolumen, sino que miden la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda específica en unidades relativas de fluorescencia, que luego se relaciona con un valor de contenido de pigmentos (Bertone et al., 2019); usualmente ficocianina, pero comúnmente también

clorofila. Esta correlación representa una calibración del sensor, para la cual no se cuentan con patrones estables y universales. La correlación entre el conteo de células de cultivos y la determinación de pigmentos extraídos es viable, pero presenta la desventaja de que la cantidad de pigmentos por célula varía en función de la especie y el régimen lumínico (Bertone et al., 2019) y no existen patrones para la determinación de pigmentos, lo cual impide que sea comparable espacio-temporalmente. Por otro lado, se podría sortear este inconveniente si se genera y emplea un patrón químico trazable del cromóforo presente en el pigmento, en este caso ficocianobilina. De esta forma se conseguirían mediciones trazables a un patrón armonizado y de relativa mayor estabilidad en comparación con la proteína (ficocianina) o un cultivo de células.

Más allá de la calibración de sensores, un estándar de ficocianobilina podría tener otros usos. Por ejemplo, la ficocianina y aloficocianina han sido asociadas a propiedades antioxidantes, inmunomoduladoras y citoprotectoras, muchas de las cuales se han vinculado con el grupo cromóforo (Llopiz et al., 2016). En este sentido, el uso de ficocianobilina como un producto farmacéutico requeriría de patrones químicos confiables y comparables para su caracterización.

### **8.3 Implementación de la trazabilidad a partir de patrones primarios**

La implementación de trazabilidad de las mediciones de sustancias orgánicas requiere el uso de Materiales de Referencia Primarios (“PRMs” de ahora en adelante). Estos pueden definirse como materiales de alta pureza, con un valor de fracción másica o molar del analito certificado, que constituyen una realización de la unidad del SI del mol para el analito de interés. La asignación de valor del PRM puede efectuarse directamente por un método de medición de referencia primario o indirectamente mediante la cuantificación de las impurezas presentes en el material por métodos analíticos primarios (adaptado de ISO 17511: cláusula 3.24) (Hasselbarth, 1996; International Organization for Standardization, 2003; Milton & Quinn, 2001). Para que la medición en cuestión sea trazable al SI, la pureza del material calibrante, es decir el PRM, debe establecerse de una manera que también sea trazable al SI, dentro de una incertidumbre establecida (Westwood et al., 2013). Este requisito, si bien es necesario, no es suficiente; la validación del método y la estimación de la incertidumbre del resultado son cruciales para este objetivo.

Una vez que se cuenta con el PRM, la forma más usual de diseminar la trazabilidad es a través de la preparación de calibrantes primarios de forma gravimétrica para la calibración de sistemas de medición.

## 8.4 Estrategias de determinación de pureza

La determinación de pureza es uno de los pasos cruciales para la producción de patrones químicos orgánicos (Yip et al., 2011). Para esto es necesario transformar un concepto abstracto y cualitativo – un estándar es o no es puro -, a uno cuantitativo. La pureza puede definirse de forma simplificada como la cantidad del compuesto principal (expresada en fracción de masa) en una muestra nominalmente pura (Westwood et al., 2013). Adicionalmente, no solo importa saber cuánto hay del componente principal, sino la cantidad y la identidad de las impurezas. Tomando las palabras de Staveley (1971): “una muestra es suficientemente pura cuando la cantidad de cada una de las impurezas que pueden interferir con el propósito específico para el cual se requiere la muestra es tan baja que su efecto combinado es despreciable dentro de los límites de exactitud deseados”<sup>2</sup>. A partir de esto, se introduce el concepto de adecuación de la pureza de un patrón químico a un uso específico. Es decir, qué tan impuro es y qué impurezas están presentes puede o no ser apropiado para un propósito dado.

Para la estimación de la fracción de masa del componente principal de una muestra, es decir, para estimar su pureza, usualmente se aplican una o varias de estas estrategias (Davies, Jones, et al., 2015; Duewer et al., 2004; Ishikawa et al., 2011; Nelson et al., 2015; Westwood et al., 2013):

- a. determinación de la fracción de masa de cada impureza independiente presente y restarlo al valor límite, también conocido como método de balance de masa;
- b. determinación de la fracción de masa del componente principal por ensayo directo ya sea por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) u otros métodos (titulación, coulombimetría, espectroscopía, etc.);
- c. combinación de las estrategias a y b.

La última estrategia (c) ofrece la mejor solución, ya que permite realizar la confirmación cruzada de los resultados obtenidos por a y b de forma efectiva (Yip et al., 2011). En la siguiente Sección (8.4.1), se profundizará sobre el método de balance de masa (a) y en la Sección 8.4.2 se expondrán estrategias para determinación del componente principal por ensayo directo (b).

---

<sup>2</sup> Traducción propia. El texto original es “A sample is sufficiently pure when the amount of each of the impurities which may interfere with the specific purpose for which the sample is required is so low that their combined effect is negligible within the desired limits of accuracy” (Staveley, 1971).

Cada uno de los posibles enfoques depende de la validez de las suposiciones fundamentales aplicables a cada método y son sujetas a sesgo significativo en caso de que las suposiciones no se cumplan (Westwood et al., 2013).

### 8.4.1 Balance de masa

El balance de masa se basa en la disponibilidad de un conjunto de técnicas ortogonales que permitan cuantificar cada clase de impureza, las cuales usualmente se dividen de la siguiente forma (Westwood et al., 2013):

- a. impurezas estructuralmente relacionadas ( $w_{ER}$ );
- b. agua ( $w_{H_2O}$ ) y solventes orgánicos residuales o compuestos orgánicos volátiles totales ( $w_{SR}$ );
- c. no volátiles ( $w_{NV}$ ).

Para la determinación de las impurezas estructuralmente relacionadas habitualmente se emplean técnicas cromatográficas, como cromatografía líquida o gaseosa, lo cual se desarrollará en la Sección 8.4.1.1. El análisis de humedad y solventes orgánicos residuales es llevado a cabo por una combinación de pérdida de masa a una temperatura específica, titulación de Karl Fischer, cromatografía gaseosa acoplada a detector de ionización por llama (FID) o espectrometría de masa (MS) y RMN, según se tratará en la Sección 8.4.1.2. Por último, en la Sección 8.4.1.3 se discutirán algunas de las técnicas frecuentemente utilizadas para la estimación de contenido de compuestos no volátiles, tanto como impurezas inorgánicas como orgánicas no volátiles, que incluyen plasma acoplado inductivamente con detector de espectrometría de masa (ICP-MS) o espectrometría de emisión óptica (ICP-OES), calcinación, cromatografía iónica o espectrometría de fluorescencia de rayos X (Yip et al., 2011).

Cuando la asignación de fracción de masa de las impurezas identificadas es independiente y ortogonal, y cubren la totalidad de las impurezas presentes en el material, la asignación de la fracción de masa del componente principal “A” en  $\text{mg g}^{-1}$  está dada por la Ecuación (4), donde la incertidumbre estándar combinada asociada con  $w_A$  es obtenida por la suma cuadrática de las incertidumbres asociadas con cada asignación de impureza contribuyente según la Ecuación (5) (Westwood et al., 2013).

$$w_A = 1000 - (w_{ER} + w_{H_2O} + w_{SR} + w_{NV}) \quad (4)$$

$$u(w_A) = \sqrt{u_{w_{ER}}^2 + u_{w_{H_2O}}^2 + u_{w_{SR}}^2 + u_{w_{NV}}^2} \quad (5)$$

La Ecuación (4) tiene una variante de uso común que involucra la estimación de impurezas estructuralmente relacionadas utilizando la respuesta relativa al componente principal  $w_{ER(rel)}$ , tal como se muestra en la Ecuación (6). Esta alternativa será discutida con mayor detalle en la sección 8.4.1.1.

$$w_A = (1000 - w_{ER(rel)}) \times \left( \frac{1000 - (w_{H_2O} + w_{SR} + w_{NV})}{1000} \right) \quad (6)$$

El correcto desempeño de esta estrategia para la determinación de pureza ha sido comprobada para un número limitado de compuestos orgánicos, si se tiene presente la vasta diversidad de compuestos orgánicos que existen, pero en principio es aplicable a un amplia variedad de compuestos orgánicos estables y no volátiles con incertidumbres estándar asociadas en el orden de 0,5 mg/g (para materiales de alta pureza o que contienen componentes minoritarios estables y bien caracterizados) a 2 mg/g (para materiales con un número y/o variedad significativa de impurezas). Este método puede ser sujeto a simplificaciones siempre y cuando sea acompañado por un aumento en la incertidumbre de medición para compensarlo (Westwood et al., 2013).

### 8.4.1.1 Impurezas estructuralmente relacionadas

Las técnicas comúnmente aplicadas para la identificación y cuantificación de impurezas estructuralmente relacionadas son la cromatografía gaseosa de alta resolución (GC) y la cromatografía líquida de alto o ultra desempeño (HPLC y UPLC respectivamente). Estos se acoplan a detectores universales y sensibles que permiten evaluar todas las impurezas presentes en esta categoría. La aplicación de una o ambas de estas técnicas está íntimamente relacionada con la naturaleza fisicoquímica del componente principal y las impurezas, es decir si son compatibles con cromatografía gaseosa o líquida. En el caso particular de ficocianobilina, se entiende que, por su comportamiento polar y peso molecular moderado a alto, la técnica más aplicable es la cromatografía líquida, la cual se desarrollara en la siguiente sección.

## Cromatografía líquida

La técnica de cromatografía líquida (LC) es un método separativo para compuestos orgánicos e inorgánicos en solución. Es ampliamente aplicable a compuestos polares, apolares, aromáticos, alifáticos e iónicos, con algunas restricciones. En esta técnica, las moléculas de la solución que atraviesan la columna cromatográfica se asocian de forma diferente con las fases móvil líquida y estacionaria de acuerdo con su naturaleza química, generando un retardo diferencial en la elución y, por lo tanto, una separación entre las mismas. El eluyente de la columna cromatográfica es analizado por un detector para generar una respuesta analítica; los detectores más comunes incluyen absorbancia ultravioleta/visible (UV/vis), fluorescencia (FLD), índice de refracción (IR), evaporativo de dispersión de luz (ELSD según sus siglas en inglés) y espectrometría de masas (MS). Estos detectores presentan diferentes alcances, desde altamente selectivos como un detector de fluorescencia o UV/vis, hasta universales como la espectrometría de masas. La combinación LC-MS o LC con espectrometría de masas tandem (LC-MS/MS) es una herramienta poderosa para el análisis de especies orgánicas y organometálicas en matrices complejas, permitiendo no solo identificarlos en una matriz compleja, sino también cuantificarlos a muy bajas concentraciones. En esta técnica, el efluente es sometido a procesos de desolvatación e ionización para luego ser introducido en un analizador de masa que separa los iones según su relación masa/carga por diferentes estrategias, siendo las más comunes las que emplean cuadrupolos, tiempos de vuelo y trampas de iones (Czichos et al., 2006).

En el campo de identificación y cuantificación de impurezas estructuralmente relacionadas, el uso de esta técnica cromatográfica es de extrema utilidad si se supone que las impurezas exhiben comportamientos cromatográficos y respuestas al detector similares al componente principal. Estas suposiciones deben confirmarse mediante la aplicación de técnicas adicionales independientes (como RMN o análisis elemental, entre otros). La cromatografía líquida presenta la ventaja de que puede aplicarse a una variedad más amplia de analitos orgánicos que la cromatografía gaseosa, por no estar restringida a compuestos volátiles, así como permitir el análisis de muestras a temperaturas más bajas.

Para la asignación de pureza, siempre que sea posible, se requiere una resolución cromatográfica completa entre el componente principal y todas las impurezas, y cuando esto no sea posible, la prioridad es verificar que esto se cumpla para el componente principal. Esto puede corroborarse mediante la inyección de estándares de las impurezas de forma individual, en caso de que se cuente con estos, o en su defecto evaluarse con el uso de herramientas de procesamiento de datos de pureza de picos. Una vez que se haya alcanzado la optimización de las condiciones cromatográficas, estas pueden utilizarse con detectores diferentes para conseguir información complementaria. En la

búsqueda de detectores universales, los más empleados son los detectores de aerosol cargado (CAD según sus siglas en inglés) y los ya mencionados ELSD, RI y MS. Si bien los detectores UV/vis en principio no pueden operar como detectores “universales” dado que las impurezas que no presentan cromóforos no serán detectables y que pueden presentar factores de respuesta sensiblemente diferentes entre sí de acuerdo con el cromóforo, estos son de amplia aplicación en el campo de asignación de pureza. Esto se debe a que, si puede demostrarse de forma independiente que el componente principal y las impurezas contienen grupos cromóforos en común, es una técnica robusta, sensible y de mayor precisión que otras técnicas, como ser LC-CAD. Si bien los detectores de arreglo de diodos (LC-DAD), que permiten la evaluación de la absorbancia en un rango definido de longitudes de onda, no siempre brindan información que permita identificar o discriminar las impurezas, pueden proveer evidencia para apoyar la suposición de que los cromóforos son similares en impurezas y el componente principal, mediante la comparación de sus espectros.

Para una evaluación completa de la pureza de un compuesto orgánico es necesario determinar la pureza enantiomérica del material puro. Esto es de especial importancia cuando se producen materiales de referencia primarios para análisis farmacéutico, dado que se ha reportado diferencias en las propiedades farmacológicas de enantiómeros. Las técnicas comúnmente empleadas para este fin incluyen cromatografía líquida con fases estacionarias quirales, electroforesis capilar con selectores quirales y <sup>1</sup>H RMN con reactivos específicos como agentes de solvatación quirales (Yip et al., 2011).

### **Asignación de impurezas: calibración directa y respuesta relativa**

Para la aplicación de la asignación por balance de masa detallada en la Ecuación (4) es preciso realizar una asignación directa absoluta de la fracción de masa de las impurezas estructuralmente relacionadas. Esto se alcanza mediante la calibración externa de cada impureza, lo cual requiere que, en primer lugar, la impureza haya sido correctamente identificada, y, en segundo lugar, que se cuente con un estándar puro de esta impureza.

El primer requisito puede abordarse utilizando técnicas que faciliten la identificación de la impureza como la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear. Esto es ampliamente facilitado por una revisión previa del proceso de obtención de la muestra de estudio, donde se intenten responder las siguientes interrogantes: ¿Cómo se obtuvo este material (síntesis, purificación de un extracto u otra estrategia)? ¿Qué reactivos fueron empleados en la síntesis/purificación? ¿Qué productos secundarios pudieron formarse en la síntesis/extracción/purificación? ¿Qué otros componentes podrían estar naturalmente presentes en estos extractos? Contar con esta información permite plantear una lista de potenciales impurezas,

junto con sus datos de propiedades fisicoquímicas y espectrales disponibles, que orientarán posteriormente la búsqueda e identificación de las impurezas de la muestra. Aún con esta información disponible, es posible que la identificación de impurezas no sea alcanzada en su totalidad.

El segundo requisito es igualmente desafiante: contar con un estándar de la impureza propuesta, el cual permitiría confirmar la identidad propuesta y realizar su cuantificación externa. Este estándar debe contar con una fracción de masa asignada certera, lo cual está cubierto en el caso de un material de referencia certificado (MRC) en cumplimiento de la norma ISO 17034:2016 (International Organization for Standardization, 2016), especialmente en cuanto a la asignación de valor trazable al SI. En caso de no encontrarse MRCs disponibles, se puede utilizar un material de referencia en cumplimiento de la norma ISO 17034:2016 (International Organization for Standardization, 2016), donde el proveedor incluya información sobre la caracterización de la sustancia, incluyendo un valor límite para su pureza. Alternativamente, si no se cuenta con ninguna de las opciones anteriores, es posible utilizar un material puro a caracterizar internamente utilizando estrategias de determinación de pureza que permitan obtener un resultado de pureza adecuado al propósito. En ocasiones, no se cuenta con un estándar de alguna o todas las impurezas, ya sea porque no se logró una identificación certera de la impureza o porque no se encuentra este material disponible comercialmente. En este caso, para el cual aplica la Ecuación (6), la cuantificación de las impurezas se realiza por respuesta relativa al componente principal, asumiendo que su factor de respuesta al detector es igual al componente principal. La incertidumbre asociada a esta cuantificación deberá ser incrementada adecuadamente para reflejar el uso de esta suposición. Como alternativa se utiliza un estándar de un compuesto con estructura estrechamente relacionada a la impureza que se desea cuantificar, en caso de que estén disponibles, especialmente en su grupo cromóforo, y estimar así el factor de respuesta para este compuesto.

La trazabilidad del valor de impurezas estructuralmente relacionadas será al MRC utilizado en la calibración externa, en el caso más prometedor, o al estándar caracterizado internamente para estimar el factor de respuesta de las impurezas, en el peor de los casos. Según publica el NIST (Dewey et al., 2004), existen ciertas condiciones donde la trazabilidad no se pierde aun cuando se emplea el método de normalización de áreas: una fracción de masa del componente principal muy alta, una separación cromatográfica completa de todas las impurezas con el compuesto principal, todos las impurezas eluyen y son detectadas y los factores de respuesta son similares entre el compuesto principal y las impurezas. En aquellos casos donde la trazabilidad del resultado se vuelve más cuestionable, es de gran importancia contar con valores de técnicas ortogonales con trazabilidad al SI claramente establecida, como RMN con uso de estándar interno, para realizar la validación cruzada de los resultados. Aunque la trazabilidad obtenida para el resultado del

contenido impurezas estructuralmente relacionadas estuviera inequívocamente establecida, un resultado de pureza absoluta e independiente permite confirmar que no existen otras impurezas orgánicas, no detectables por el sistema de detección empleado en el o los análisis cromatográficos, que no se hayan considerado.

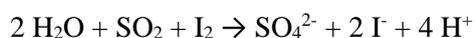
#### **8.4.1.2 Contenido de agua y compuestos orgánicos volátiles**

En vista de que la mayoría de los materiales de referencia certificados orgánicos contienen valores certificados en base seca, la fracción de masa del compuesto principal debe corregirse por su contenido de agua. Este contenido puede variar considerablemente de acuerdo con el carácter higroscópico del material y la humedad relativa del laboratorio que lo analiza (Yip et al., 2011) así como las condiciones de su conservación; esto lo vuelve un parámetro crítico al momento de estudiar la estabilidad del PRM y de declarar las condiciones de manipulación por parte del usuario final.

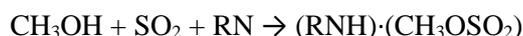
La cantidad de agua de una muestra usualmente es evaluada individualmente por titulación de Karl Fischer, técnica que se desarrolla en la siguiente sección. Alternativamente, la humedad de una muestra puede determinarse de forma conjunta con los solventes orgánicos residuales si se estudia la pérdida de masa por secado a una temperatura específica, ya sea mediante el empleo de una balanza y una estufa convencional, o mediante el uso de un equipo de análisis termogravimétrico como se desarrollará al final de esta sección. Esta estrategia permite la estimación del total de contenido de solventes orgánicos traza que usualmente provienen de los procesos de síntesis, aislamiento, extracción o limpieza del material. El análisis mediante RMN es útil para poder realizar un relevamiento e identificación de los diferentes solventes potencialmente presentes a partir de desplazamientos químicos típicos reportados (Gottlieb et al., 1997), que posteriormente pueden cuantificarse por esta técnica o un análisis por espacio de cabeza (*headspace*) en conjunto con GC-FID o GC-MS utilizando calibración externa (Yip et al., 2011).

#### **Karl Fischer**

El procedimiento de titulación Karl Fischer es un método de valoración para determinar cuantitativamente el contenido de agua en líquidos y sólidos. En la determinación del contenido de agua, el dióxido de azufre y el agua reaccionan con yodo según la siguiente reacción:



Al añadir alcohol (p. ej. metanol, etanol), el dióxido de azufre forma en una reacción previa un éster ácido, que es neutralizado por una base (p. ej. imidazol, denominado en lo que sigue “RN”):



En presencia de agua, el anión de sulfito alquilico es oxidado por el yodo transformándose en sulfato alquilico. El yodo amarillo oscuro es reducido entonces transformándose en ioduro incoloro:



La fórmula de la reacción total en la siguiente:



La reacción se desarrolla hasta que se ha consumido el agua en su totalidad, con lo cual se detecta yodo libre en la solución reactiva. Para la determinación del punto final se aplica la indicación coulombimétrica, es decir, el potencial desciende en el electrodo con clavija doble de platino polarizado por debajo de un valor determinado. Esta titulación puede realizarse tanto volumétrica como coulombimétricamente, aunque esta última alternativa permite la determinación confiable y reproducible de cantidades bajas de agua en líquidos y sólidos, alcanzando valores tan bajos como 10 a 20  $\mu\text{g}$  de agua (Yip et al., 2011) .

Para el análisis de humedad en muestras sólidas normalmente se aplican dos estrategias: la introducción por transferencia desde horno y la introducción directa. En el primer caso, la muestra pesada es introducida en un vial que se calienta a una temperatura seteada para lograr la evaporación y transferencia del vapor de agua al vaso de titulación por un gas de arrastre. Dentro de las variables optimizables para este método, la de mayor relevancia es la temperatura del horno ya que un valor bajo puede generar una subestimación de la cantidad de agua y un valor elevado puede generar degradación de la muestra (Yip et al., 2011). En el segundo caso, una masa exacta de la muestra es adicionada directamente al vaso de titulación. Ambas estrategias presentan sus problemas y ventajas: la transferencia desde horno es preferida en casos donde la muestra puede generar reacciones secundarias con el reactivo de titulación, o es insoluble en este, mientras que la introducción directa asegura una transferencia completa de la humedad de la muestra al vaso de titulación, pero la introducción de agua al vaso de titulación por al ingresar la muestra debe ser compensada en el cálculo final de consumo.

La titulación coulombimétrica de Karl Fischer puede realizarse como un potencial método primario, donde un valor coulombimétrico medido por el titulador es convertido en una cantidad

de agua equivalente. La validación de esta suposición, en conjunto con la trazabilidad del SI del valor medido de contenido de agua por el titulador, puede ser demostrada mediante la operación insesgada utilizando MRCs certificados en contenido de agua (Westwood et al., 2013).

## **Análisis termogravimétrico**

El análisis termogravimétrico (*thermogravimetric analysis* o TGA según su sigla en inglés) consta de un método de análisis térmico donde la masa de una muestra es medida como una función de la temperatura mientras esta es sometida a un programa de temperatura controlada (Czichos et al., 2006). Esta técnica se aplica en la determinación de pureza de compuestos orgánicos ya que permite estimar simultáneamente el contenido de compuestos volátiles totales y de impurezas inorgánicas.

Para el estudio de compuestos volátiles se estudia la pérdida de masa en el rango de temperatura de 0 a 120 °C y para el estudio de impurezas inorgánicas se estudia la pérdida de masa total a temperaturas superiores a 500 °C. Esta técnica presenta limitaciones en el caso de que la muestra sublime, presente un punto de fusión bajo o degrade a bajas temperaturas, generando resultados erróneos en la determinación de compuestos volátiles (Wollinger, 2018). Este problema puede detectarse acoplado el equipo de TGA a un detector de MS o de espectrometría infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) para la identificación de los compuestos perdidos durante la etapa de calentamiento, ya sea agua o solventes, al mismo tiempo que se monitorea la ausencia de CO<sub>2</sub> como producto de degradación o el componente principal a raíz de sublimación. La trazabilidad al SI de esta técnica proviene de la calibración de la balanza interna del equipo con pesas calibradas con los patrones de masa nacionales.

### **8.4.1.3 Impurezas no volátiles**

La determinación de impurezas no volátiles totales puede evaluarse por la combinación de información de varios métodos complementarios. Convencionalmente se utiliza la cromatografía iónica acoplada con detectores de conductividad, ultravioleta/visible o electroquímico para la determinación de aniones y cationes. Algunas rutas de síntesis pueden utilizar catalizadores metálicos que pueden permanecer en la muestra a niveles de traza. Para la identificación y cuantificación de estos y otros elementos más comunes, como Na, Mg, Al, Si, Fe, K y Ca, es posible utilizar ICP-MS o ICP-OES con calibración externa, usualmente como paso posterior a una etapa de digestión de muestra. (Yip et al., 2011)

Alternativamente, la calcinación o la combustión oxidativa a altas temperaturas de la muestra, por ejemplo, mediante TGA, también puede utilizarse para estimar el contenido de residuo inorgánico. El análisis por TGA es ventajoso sobre la calcinación ya que utiliza una cantidad significativamente menor de muestra, lo cual usualmente es una limitación en la determinación de pureza de compuestos orgánicos, pero por otro lado no permite identificar la naturaleza de las impurezas presentes. Los resultados de análisis elemental (C, H, N) también podrían dar evidencia de la presencia de una impureza de naturaleza inorgánica mediante una desviación significativa de la composición elemental experimental con respecto a la teórica.

## ICP-SFMS

El plasma acoplado inductivamente (ICP) de esta técnica es un plasma de argón a presión atmosférica producido en una antorcha conectada a un generador de radiofrecuencias, usualmente operando entre 1000 y 1500 W. La muestra acuosa es aspirada en forma líquida y transformada en un aerosol mediante un nebulizador. Las finas gotas producidas son separadas de acuerdo con su tamaño en una cámara de nebulización y este aerosol es introducido a través de un inyector hacia la antorcha donde la muestra es sometida a temperaturas del orden de 10000 K. En el plasma, la muestra atraviesa un proceso de desolvatación, vaporización, atomización e ionización. Los iones formados, preferentemente monovalentes, son transferidos desde el plasma que se encuentra a presión atmosférica a la zona de interfase, para ser introducidos a través de un sistema de lentes al espectrómetro de masa que se encuentra a alto vacío. Los iones son separados según su relación de masa/carga con resolución unitaria, como es el caso de los instrumentos de simple y triple cuadrupolo, o con mayor resolución, como el caso de los instrumentos equipados con separadores de tiempo de vuelo y sector magnéticos y eléctricos (ICP-SFMS) (Czichos et al., 2006; Prohaska et al., 2015). La trazabilidad de estas mediciones proviene de las soluciones calibrantes utilizadas en la cuantificación por curva de calibración externa, u otra estrategia de cuantificación.

### 8.4.2 Determinación por ensayo directo

Contrariamente a la estrategia de balance de masa donde se estima la pureza indirectamente midiendo todo lo que no es el componente principal, la determinación por ensayo directo se enfoca únicamente en este. Si bien esta estrategia es más directa, es también de compleja aplicación y si no se corrobora su desempeño contra los resultados obtenidos por balance de masa pueden existir errores significativos en los resultados. Entre los métodos utilizados para el ensayo directo se encuentra RMN cuantitativo, calorimetría diferencial de barrido, análisis elemental y cuantificación por técnicas cromatográficas. Si bien cada una de estas técnicas tiene sus limitaciones, el último

caso presenta un obstáculo importante: es necesario poder hacer la calibración externa del componente principal con un PRM. Los principios básicos de RMN cuantitativo, calorimetría diferencial de barrido y análisis elemental, así como su aplicación a la determinación de pureza, son abordados en las próximas secciones.

#### **8.4.2.1 Resonancia Magnética Nuclear**

Cuando un núcleo con un número de espín cuántico no nulo se ubica en un campo magnético externo homogéneo, el spin del núcleo genera un dipolo magnético que se alinea de maneras específicas en función del campo magnético externo. El número de spin nuclear ( $I$ ) define el número de orientaciones ( $2I+1$ ) y la diferencia energética entre ellos. En el caso del núcleo del  $^1\text{H}$ , el espín nuclear es  $\frac{1}{2}$  y por lo tanto existen dos estados netos con un ligero incremento de la población en el estado de menor energía, que sigue la distribución de Boltzmann. Es posible igualar la población de ambos estados aplicando un pulso de radiación de radiofrecuencia a una frecuencia de resonancia específica para ese núcleo, conocida como la frecuencia de Larmor. En esta situación, la magnetización neta, es decir la sumatoria de los momentos magnéticos individuales, se anula. Una vez que el pulso de radiofrecuencia deja de aplicarse, el sistema de espines nucleares se revierte progresivamente a su estado termodinámico usual a través de un proceso conocido como relajación espín-red. Durante la relación se genera una señal eléctrica conocida como decaimiento de inducción libre (FID según sus siglas en inglés) producto de la variación de la magnetización neta. A esta señal, en el dominio de tiempo, se le aplica una transformada de Fourier que la convierte al dominio de frecuencia, generándose así el espectro de RMN característico. El entorno magnético de los núcleos en sus moléculas es usualmente levemente diferente de acuerdo con su configuración electrónica y molecular y esto genera frecuencias de resonancia diferentes y da lugar a la escala de desplazamiento químico que permite la identificación de entornos estructurales de los átomos en la molécula. Adicionalmente, el ambiente magnético de un núcleo dado puede verse influenciado por el de sus núcleos próximos, generando un desdoblamiento adicional de los niveles de energía. El patrón de desdoblamiento, o acoplamiento, es utilizado para determinar el número y tipo de los núcleos vecinos en una molécula, así como su orientación.

Esta técnica espectroscópica puede aplicarse tanto cualitativamente como cuantitativamente, cuando su aplicación es cuantitativa se le refiere como qRMN. La cuantificación es posible debido a que el área debajo de las señales del RMN es directamente proporcional a la concentración del núcleo resonando a esa frecuencia, con una constante de proporcionalidad equivalente para todas las señales, si el experimento se realiza correctamente. Por lo tanto, la relación entre las señales de los diferentes componentes de una muestra provee la razón molar entre estos, una vez que la integral de las señales sea corregida por el número de núcleos equivalentes presentes en cada señal. Es

posible realizar la cuantificación relativa de cada componente o una cuantificación absoluta utilizando un estándar interno o externo con un valor asignado trazable al SI o mediante una referencia electrónica utilizando el método conocido como ERETIC (*Electronic Reference To Access In vivo Concentrations*) (Yip et al., 2011). La primera opción es preferida por su balance entre confiabilidad y practicidad. En este escenario, la determinación de la pureza del componente principal se obtiene según la Ecuación (7).

$$P_A = \frac{I_A}{I_{SI}} \times \frac{N_{SI}}{N_A} \times \frac{M_A}{M_{SI}} \times \frac{w_{SI}}{w_A} \times P_{SI} \quad (7)$$

Donde  $I_A$  y  $I_{SI}$  corresponden al área de las señales del analito y el estándar interno respectivamente,  $N$  corresponde a la cantidad de números relativos de la molécula que generan esa señal,  $M$  es el peso molecular de analito o estándar interno,  $w$  es la fracción de masa del analito o estándar interno y  $P_{SI}$  es la pureza del estándar interno (Czichos et al., 2006). Para seleccionar un estándar interno apropiado para el análisis mediante RMN se deben tener en cuenta los siguientes criterios: la resonancia del estándar interno no debe solaparse con las del analito, el estándar interno no debe ser higroscópico, debe tener baja volatilidad, ser estable y químicamente inerte, presentar una solubilidad en solventes relevantes similar a la muestra y, fundamentalmente, tener un valor de pureza certificado trazable y confiable. En este sentido, el BIPM e INMs como INMETRO y NIST han trabajado en la caracterización y producción de estándares internos que cumplan estos requisitos, así como en proveer orientación sobre condiciones de medición y procesamiento de datos para asegurar la confiabilidad de la medición (Nelson et al., 2018; Westwood et al., 2019; Wollinger, 2018).

#### 8.4.2.2 Calorimetría diferencial de barrido

La aplicación de la calorimetría diferencial de barrido en la determinación de pureza se basa en el hecho de que el rango de temperatura de fusión de un compuesto aumenta a medida que el nivel de impurezas es mayor. Esta técnica consiste en la fusión de la muestra de estudio al ser sometida a un programa de temperatura controlada mientras se registra el flujo de calor hacia la muestra como función de la temperatura. De esta forma es posible determinar la pureza de un compuesto a partir del descenso crioscópico, el cual se ha propuesto que cumple con los requisitos para considerarse un procedimiento de medición primario (Milton & Quinn, 2001).

Este método está basado en la Ecuación (8) de van't Hoff, donde  $T_s$  es la temperatura de la muestra en K,  $T_o$  es la temperatura de fusión del compuesto 100% puro en K,  $R$  es la constante de los gases,  $\chi$  es la fracción molar de la impureza,  $H$  es la entalpía de fusión y  $F$  es la fracción que sufrió fusión.

$$T_s = T_o - \frac{RT_o^2\chi}{HF} \quad (8)$$

Durante este análisis se obtiene un área a partir de la endoterma de fusión, que permite determinar H, y además permite determinar la fracción de fusión F. De esta manera, se puede plantear un modelo de regresión lineal  $y = mx + b$ , donde  $y = T_s$ ,  $x = 1/F$ ,  $m = -(RT_o^2\chi)/H$  y  $b = T_o$ , que permite determinar  $\chi$  y por lo tanto la pureza de la muestra de estudio. Para que esta técnica pueda ser aplicada confiablemente las impurezas deben estar únicamente en la fase líquida durante la fusión, el componente principal debe presentar una fracción molar mayor o igual a 98,5%, una endoterma de fusión única y bien definida y no ser sujeto a descomposición que interfiera con la endoterma de fusión (ASTM International, 2008). La calibración de los calorímetros diferenciales de barrido en cuanto a la temperatura y flujo de calor se realiza usualmente con el empleo de materiales de referencia certificados de metales o materiales orgánicos de alta pureza que informen en su certificado asociado la temperatura de fusión y la entalpía de fusión molar como referencia (Duewer et al., 2004; Yip et al., 2011).

### 8.4.2.3 Análisis elemental

Las sustancias orgánicas están normalmente compuestas en su mayoría por carbono, hidrógeno y nitrógeno, los cuales pueden determinarse por analizadores de CHNS o analizadores elementales. En esta técnica, las sustancias orgánicas son sometidas a descomposición oxidativa y consecuentemente los óxidos de nitrógeno y azufre son reducidos para dar como productos finales dióxido de carbono, agua, nitrógeno elemental y dióxido de azufre (Fadееva et al., 2008). Esta técnica, si bien no permite determinar certeramente la pureza del componente principal, provee información global sobre la muestra que puede orientar a la identidad de las impurezas.

## Capítulo 9. Metodología

### 9.1 Muestra de estudio

La muestra estudiada (de ahora en adelante “muestra de estudio”) de ficocianobilina fue adquirida de Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>, Inc. (Dallas, EE. UU.) de acuerdo con el número de catálogo sc-396921A, lote n° L0618. El material fue identificado por el proveedor con el número CAS 20298-86-6, el cual corresponde al isómero 3(E)-ficocianobilina. El proveedor declara en el certificado de análisis correspondiente a este material una pureza mayor a 95% de acuerdo con el análisis por HPLC y una fecha de vencimiento de 12/06/2023. La búsqueda del número CAS devuelve los resultados detallados en la Tabla 6.

<b>Nombre IUPAC</b>	ácido (2R,3E,4Z,10Z,15Z)-18-etil-3-etiliden-1,2,3,19,22,24-hexahidro-2,7,13,17-tetrametil-1,19-dioxo-21H-bilin-8,12-dipropanoico
<b>Punto de ebullición</b>	(892,1 ± 65,0) °C
<b>Densidad</b>	(1,31 ± 0,10) g cm <sup>-3</sup>
<b>pKa</b>	4,47 ± 0,10

**Tabla 6** Nombre IUPAC y propiedades fisicoquímicas para el número CAS 20298-86-6 tomado de ChemicalBook (2017).

### 9.2 HPLC-DAD/FLD

Los análisis de HPLC-DAD y FLD fueron realizados en las instalaciones y usando el equipamiento del laboratorio UNIFAM Laboratorio Analítico.

#### 9.2.1 Reactivos y materiales

Las fases móviles se prepararon a partir de acetonitrilo (ACN) calidad HPLC marca Carlo Erba<sup>®</sup> (Milán, Italia), ácido fórmico 99% (AF) calidad para análisis USP marca Carlo Erba<sup>®</sup> (Milán, Italia) y agua UP obtenida según la Sección 4.1. Se prepararon fases móviles de ACN y agua UP con 0,1% v/v AF empleando material volumétrico calibrado clase A, las cuales fueron filtradas utilizando un filtro de nylon hidrofílico de 0,45 µm de porosidad marca Merck<sup>®</sup> KGaA (Darmstadt, Alemania). Se preparó gravimétricamente una solución de 1 mg g<sup>-1</sup> de muestra de estudio de ficocianobilina (“solución de prueba”) utilizando como solvente una solución de metanol (MeOH) calidad HPLC marca Carlo Erba<sup>®</sup> (Milán, Italia) con 0,1% v/v AF.

Para el análisis cromatográfico se utilizó una columna cromatográfica para HPLC de fase estacionaria C18, porosidad 110Å, dimensiones 150 mm x 4,6 mm x 0,1 mm (largo, diámetro y tamaño de partícula respectivamente) Gemini Phenomenex® (Torrance, EE. UU.).

## 9.2.2 Instrumentos

Para la preparación gravimétrica de la solución de prueba se utilizó una microbalanza (carga máxima 52 g, división 0,001 mg) Mettler Toledo® XPE56 (Zúrich, Suiza). El análisis cromatográfico se realizó en un equipo de cromatografía líquida con sistema de bomba cuaternaria acoplada a detectores de arreglo de diodos y fluorescencia HPLC-DAD/FLD marca Shimadzu® Prominence (Kioto, Japón).

## 9.2.3 Preparación de muestra y determinaciones analíticas

La solución de prueba fue analizada por HPLC-DAD/FLD de acuerdo con las condiciones establecidas en la Tabla 7 con el gradiente de fase móvil detallado en la Tabla 8. Las muestras permanecieron refrigeradas en el automuestreador previo a su inyección.

Parámetro	Valor
Flujo	0,8 mL min <sup>-1</sup>
Temperatura de columna	35 °C
Volumen de inyección	1 - 10 µL
Loop	400 µL
Detector DAD	Lámpara de deuterio, rango espectral: 190 a 800 nm, ancho de rendija: 1,2 nm, temperatura de celda: 40 °C.
Detector FLD	Lámpara de xenón, longitud de onda de emisión: 650 nm, longitud de onda de excitación: 580 nm.

**Tabla 7** Condiciones instrumentales del análisis de HPLC-DAD/FLD.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>% Agua UP + 0,1% AF</b>	<b>% ACN + 0,1% AF</b>
0,01	90	10
18,00	45	55
20,00	0	100
22,00	0	100
22,01	60	40
22,50	60	40

**Tabla 8** Gradiente de fases móviles del análisis por HPLC-DAD/FLD.

Adicionalmente, se inyectó un blanco de solvente para evaluar la presencia de impureza provenientes del solvente u otros materiales. En caso de que se detectaran impurezas de este origen, no serían consideradas en la determinación de impurezas estructuralmente relacionadas.

## **9.3 LC-MS/MS**

### **9.3.1 Reactivos y materiales**

Las fases móviles para el análisis por LC-MSMS fueron preparadas siguiendo el mismo procedimiento descrito en 9.2.1 exceptuando de que fueron filtradas con un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  de porosidad de Merck® KGaA (Darmstadt, Alemania). En este caso, se utilizaron dos soluciones de prueba: una solución preparada por dilución de la solución de prueba utilizada para el análisis de HPLC-DAD/FLD y otra preparada a partir del sólido en el día del análisis, ambas a 10  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Para el análisis cromatográfico se utilizó una columna cromatográfica para UPLC de fase móvil C18, porosidad 130Å, dimensiones 50 mm x 2,1 mm x 1,7  $\mu\text{m}$  (largo, diámetro y porosidad respectivamente) Acquity® Waters® (Milford, EE. UU.).

### **9.3.2 Instrumentos**

El análisis cromatográfico se realizó en un equipo de cromatografía líquida con sistema de bomba cuaternaria acoplado a un detector de espectrometría de masas tándem de triple cuadrupolo (LC-MS/MS) marca Waters® Xevo TQD® (Milford, EE. UU.).

### **9.3.3 Preparación de muestra y determinaciones analíticas**

Las soluciones de prueba fueron analizadas mediante LC-MS/MS de acuerdo con las condiciones establecidas en la Tabla 9 con el gradiente de fase móvil detallado en la Tabla 10. Las muestras

permanecieron refrigeradas en el automuestreador a 10 °C previo a su inyección. La optimización de las condiciones de análisis mediante MS/MS fue realizada de forma automatizada utilizando la aplicación del software MassLynx® IntelliStart® mediante la infusión de la solución de prueba a 10 µL min<sup>-1</sup>. Se analizaron dos muestras de diferente antigüedad, una preparada un mes previo y otra preparada en el día del análisis, para evaluar cualitativamente la estabilidad de la muestra en solución.

<b>Flujo</b>	0,3 mL min <sup>-1</sup>
<b>Temperatura de columna</b>	35 °C
<b>Volumen de inyección</b>	20 µL
<b>Loop</b>	50 µL
<b>Sistema de detección</b>	Fuente de ionización tipo ESI (+)

**Tabla 9** Condiciones instrumentales del análisis de LC-MS/MS.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>% Agua UP + 0,1% AF</b>	<b>% ACN + 0,1% AF</b>
0,00	90	10
10,00	45	55
12,00	5	95
20,00	5	95
20,10	90	10
21,00	90	10

**Tabla 10** Gradiente de fases móviles del análisis por LC-MS/MS.

El analizador de masas de triple cuadrupolo se empleó para realizar experimentos del tipo monitoreo de múltiples reacciones (MRM, *multiple reaction monitoring*) y registro de ion singular (SIR, *single ion recording*). Las transiciones buscadas (MRM) e iones registrados (SIR) se detallan en la Tabla 11, así como el peso molecular de la impureza buscada (obtenida según 9.6.1), la carga de la molécula base de PCB, la carga mayoritariamente presente de la sección aminoacídica (cuando corresponda) a un pH de 4,1 (valor de pH medido del solvente con el que se prepara) y el balance de carga total. A partir de esos datos se calculó la m/z teórica de mayor abundancia y esta fue la masa introducida en la aplicación IntelliStart® del software MassLynx® para obtener las condiciones optimizadas de búsqueda de las transiciones. Cuando no fue posible obtener esta información optimizada, se realizó una búsqueda SIR.

Compuesto Buscado	Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	z PCB	z AA (pH=4,1)	z total	m/z teórico más abundante	Potencial de cono (V)	Energía de colisión (V)	Transición o ion buscado
<b>3E-PCB</b>	586,677	1	-	1	587,677	20	46	1) 587,0 > 464,4 2) 587,0 > 348,8 3) 587,0 > 299,2
<b>3Z-PCB</b>	586,677	1	-	1	587,677	20	46	1) 587,0 > 464,4 2) 587,0 > 348,8 3) 587,0 > 299,2
<b>PCB-OMe</b>	618,719	1	-	1	619,719	22	34	1) 619,3 > 587,3 2) 619,3 > 464,5 3) 619,3 > 299,2
<b>PCB-OEt</b>	632,745	1	-	1	633,745	68	30	1) 633,2 > 601,3 2) 633,2 > 299,2
<b>PCB-C</b>	707,837	1	0	1	708,837	1) 74 2) 58	1) 30 2) 44	1) 707,2 > 707,3 2) 705,5 > 705,7
<b>PCB-CA</b>	794,914	1	0	1	795,914	68	34	1) 797,2 > 797,4 2) 797,2 > 795,8
<b>PCB-CK</b>	852,009	1	1	2	426,005	54	24	1) 428,9 > 341,0 2) 428,9 > 207,0
<b>PCB-ACK</b>	939,087	1	1	2	469,544	65	3	SIR: 472
<b>PCB-CL</b>	836,995	1	0	1	837,995	94	76	1) 837,5 > 837,9
<b>PCB-DC</b>	838,924	1	-1	0	838,924	56	22	1) 841,3 > 841,4
<b>PCB-AC</b>	794,914	1	0	1	795,914	68	50	1) 797,5 > 798,2
<b>PCB-DCA</b>	926,002	1	-1	0	926,002	65	3	SIR: 930
<b>PCB-ACL</b>	924,072	1	0	1	925,072	65	3	SIR: 928
<b>2PCB</b>	1172,35	1 o 2	-	1	1173,35	66	64	1) 1173,5 > 1174,4 2) 1173,5 > 587,2 3) 1173,5 > 299,3
<b>3PCB</b>	1760,03	3	-	3	1763,03	NA	NA	*

**Tabla 11** Parámetros de operacionales para los experimentos MRM y SIR realizados en el análisis por LC-MS/MS de la muestra de estudio. \*No buscado como m/z=1 porque ese valor de masa excede la calibración configurada del equipo. La identificación de las impurezas refiere a los compuestos definidos en la Sección 10.1.

## 9.4 Karl Fischer

### 9.4.1 Reactivos y materiales

Para la titulación coulombimétrica de Karl Fischer se utilizó un reactivo único de Hydranal Coulomat AG® adquirido de Honeywell® Fluka® (Seelze, Alemania). Para la introducción de muestra se utiliza un bote de vidrio con dispensador, fabricado por el taller de vidrio de Facultad de Química especialmente para este fin.

### 9.4.2 Instrumentos

Para las determinaciones de humedad por Karl Fischer se utiliza un titulador coulombimétrico con un electrodo sin diafragma marca Mettler Toledo® C20 (Zúrich, Suiza) y una balanza analítica (carga máxima 220 g, división 0,01 mg) Sartorius® modelo MSE 225-100-DA (Goettingen, Alemania).

### 9.4.3 Preparación de muestra y determinación analítica

Esta medición fue realizada según el procedimiento interno del Departamento de Metrología Química del LATU, el cual se encuentra validado y su exactitud se controla periódicamente mediante el uso de MRC SRM 2890 del NIST (Maryland, EE. UU.). Se introdujo la muestra sólida directamente al vaso de titulación utilizando un bote de vidrio y verificando que la muestra no quedase adherida a las paredes internas del vaso y sin entrar en contacto con la solución. La muestra se analizó por triplicado, utilizando una masa aproximada de 2 mg por réplica. La masa de la

<b>Máxima deriva inicial</b>	20 $\mu\text{g min}^{-1}$
<b>Tiempo de mezcla</b>	15 s
<b>Sensor</b>	DM143-SC, tipo polarizado Ipol 5,0 $\mu\text{A}$ con indicación voltamétrica
<b>Velocidad de giro</b>	45%
<b>Punto final</b>	100,0 mV
<b>Terminación</b>	Detención de deriva relativa, 3,0 $\mu\text{g min}^{-1}$ deriva, tiempo mínimo 0 s, tiempo máximo 3600 s

**Tabla 12** Condiciones de análisis del método de titulación coulombimétrica Karl Fischer para sólidos.

muestra introducida fue determinada por diferencia y fue analizada utilizando las condiciones detalladas en la Tabla 12.

El porcentaje de humedad se calcula como el promedio de las tres réplicas, según las ecuaciones (9) y (10).

$$\bar{H}_{rel} = \frac{\sum_{i=1}^n H_{rel,i}}{n} \quad (9)$$

$$H_{rel,i} = \frac{m_{Ag,i} \times 10^{-6} \times 100}{p_{1,i} - p_{2,i}} \quad (10)$$

Dónde:

- $p_1$  es la masa del bote con la toma de muestra, en gramos,
- $p_2$  es la masa del bote después de dispensada la toma, en gramos,
- $m_{Ag}$  es la cantidad de agua indicada por el titulador Karl-Fischer, en microgramos,
- $n$  es el número de réplicas.

La lectura de cantidad de agua fue corregida por un blanco de titulación que refleja el ingreso de humedad ambiental al vaso de titulación durante la introducción de muestra sólida. Este valor se estimó como el promedio de cinco medidas de cantidad de agua luego de abrir el vaso de titulación y apromixar el bote sin muestra.

La incertidumbre del resultado del contenido de agua fue calculado como la suma cuadrática de las componentes tipo A y B correspondientes a los valores de influencia principales, de acuerdo a la Guía JCGM 100:2008 (Joint Committee for Guides in Metrology, 2008a) y validados utilizando el método Monte Carlo mediante la aplicación NIST Uncertainty Machine versión 1.4.1 (Lafarge & Possolo, 2018) según la Guía JCGM 101:2008 (Joint Committee for Guides in Metrology, 2008b). Los valores de influencia principales considerados fueron las masas  $p_1$  y  $p_2$ , la resolución de la lectura del equipo de Karl-Fischer, la repetibilidad y el blanco de lectura, para el cual se calcula la incertidumbre considerando los mismos parámetros.

## **9.5 Análisis de termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido**

Los análisis de termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido fueron realizados en el Laboratorio de Alta Complejidad del Centro Universitario Regional del Este (CURE), sede Rocha, de la Universidad de la República.

### **9.5.1 Instrumentos**

Para el análisis de termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido se utilizó un equipo NETZSCH® STA 449F5 (Waldkraiburg, Alemania). Para este análisis se dispusieron de aproximadamente 6 mg de la muestra de estudio, pesados en una microbalanza (carga máxima 52 g, división 0,001 mg) Mettler Toledo® XPE56 (Zúrich, Suiza).

### **9.5.2 Determinaciones analíticas**

La muestra fue sometida a una rampa de temperatura de 20 °C a 600 °C con un incremento de 0,5 K min<sup>-1</sup>. El purgado del horno se realizó con nitrógeno de alta pureza a un flujo de 50 mL min<sup>-1</sup>. Se realizó una corrección de blanco y se utilizó un crisol de aluminio.

## **9.6 Análisis elemental**

El análisis elemental de Azufre (S), Carbono (C), Hidrógeno (H), Nitrógeno (N) de la muestra problema de ficocianobilina fue realizado por el Departamento de Materiales y Productos Forestales del LATU.

### **9.6.1 Instrumentos**

Para el análisis elemental se utilizó una balanza de precisión Shimadzu® AEL-200 (Kioto, Japón) y un analizador elemental CHNS Thermo® Flash 2000 (Massachusetts, EE. UU.).

### **9.6.2 Preparación de muestra y determinaciones analíticas**

La determinación de contenido elemental fue realizada según un protocolo interno basado en las normas UNE-EN ISO 16948 – "Biocombustibles sólidos. Determinación del contenido total de

carbono, hidrógeno y nitrógeno.” y UNE-EN ISO 16994 –“Biocombustibles sólidos. Determinación del contenido total de azufre y cloro”. Se ensayaron dos réplicas de la muestra y se informó el valor promedio.

Para el cálculo de contenido elemental teórico para ficocianobilina se calculó el peso molecular a partir de la aplicación desarrollada por la Comisión sobre Abundancias Isotópicas y Pesos Moleculares (CIAAW según su sigla en inglés) (Meija, 2016)

## **9.7 ICP-SFMS**

La determinación de elementos fue realizada por el Área Inorgánica del Departamento de Metrología Química del LATU según protocolos internos.

### **9.7.1 Reactivos y materiales**

Para la digestión de la muestra se utilizó ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) 65% calidad ppa adquirido de Merck® KGaA (Darmstadt, Alemania) y previamente sometido a un proceso de doble subdestilación. El agua UP fue obtenida a partir de un equipo de purificación de agua Direct-Q 3 UV Millipore® Merck® KGaA (San Pablo, Brasil). Durante el análisis por ICP-SFMS se utilizó argón calidad 99,998% provisto por Linde (Montevideo, Uruguay).

### **9.7.2 Instrumentos**

La masa de la muestra de estudio de ficocianobilina fue pesada en una microbalanza (carga máxima 52 g, división 0,001 mg) Mettler Toledo® XPE56 (Zúrich, Suiza) y la masa final de la solución diluida fue determinada en una balanza analítica (carga máxima 520 g, división 0,1 mg) Sartorius® MSE 524S-100-DI (Goettingen, Alemania). Para la digestión de las muestras se utilizó un digestor de microondas Anton Paar® Multiwave PRO (Graz, Austria). El ácido nítrico de alta pureza fue obtenido a partir de un sistema de destilación a subebullición Milestone® s.r.l. duoPUR® (Bérgamo, Italia). El agregado de los reactivos y el tratamiento de la muestra fue realizado en una campana de extracción de flujo laminar NuAire (Plymouth, EE. UU.) Clase 5 según ISO 14644-1. Las muestras fueron analizadas por un ICP-SFMS Thermo Fisher Scientific® Element2 (Bremen, Alemania).

### 9.7.3 Preparación de muestra y determinaciones analíticas

Todos los materiales utilizados para la determinación fueron descontaminados siguiendo los protocolos de dicho departamento. Se pesaron exactamente 10 mg de la muestra de estudio de ficocianobilina en un tubo de 10 mL de polipropileno. Esta masa se transfirió cuantitativamente con agua UP a un tubo de digestión y se agregaron 5 mL de HNO<sub>3</sub>. Esta muestra se dejó por un día en una campana de extracción para su pre-digestión. Al día siguiente se realizó la digestión de la muestra mediante un tratamiento asistido por microondas utilizando las condiciones operacionales detalladas en la Tabla 13. El digesto fue llevado a una masa de 25 g con agua UP. Paralelamente a la muestra, se realizó el mismo procedimiento para un blanco de reactivos. La cuantificación de los elementos por ICP-SFMS se realizó según las condiciones detalladas en la Tabla 14 por calibración externa utilizando calibrantes preparados a partir de materiales de referencia certificados trazables al SI (NIST *monoelemental calibration solution Series 3000*). Los isótopos monitoreados, así como el nivel de resolución empleado en cada caso para separar las interferencias poliatómicas o doble cargadas, se presentan en la Tabla 15.

Paso	Potencia	Tiempo
Rampa de potencia	800 W	15 min
Potencia fija	800 W	10 min
Rampa de potencia	1500 W	10 min
Potencia fija	1500 W	30 min
Enfriamiento	0 W	Temperatura final < 40°C

**Tabla 13** Condiciones operacionales de la digestión por microondas de la muestra de estudio de ficocianobilina.

Nebulizador	Perfluoroalcóxido (PFA) 100 µl
Cámara de nebulización	Cuarzo, Dual Ciclónica/Scott
Inyector	Cuarzo, 1,75 mm de diámetro interno
Cono <i>sampler</i>	Níquel
Cono <i>skimmer</i>	Níquel
<i>Guard Electrode</i>	Encendido
Potencia de radiofrecuencia	1250 W
Flujo de gas del plasma	16 ml min <sup>-1</sup>
Flujo del gas auxiliar	0,86 ml min <sup>-1</sup>
Flujo del gas de muestra	1,06 ml min <sup>-1</sup>

**Tabla 14** Configuración y Condiciones operacionales del ICP-SFMS.

Isotopo	Resolución	Isotopo	Resolución	Isotopo	Resolución
<sup>6</sup> Li*	Media	<sup>51</sup> V*	Alta	<sup>82</sup> Se	Alta
<sup>7</sup> Li*	Media	<sup>52</sup> Cr*	Media	<sup>87</sup> Sr	Alta
<sup>9</sup> Be*	Media	<sup>53</sup> Cr	Media	<sup>89</sup> Y*	Media
<sup>10</sup> B*	Media	<sup>55</sup> Mn*	Media	<sup>95</sup> Mo*	Baja
<sup>11</sup> B*	Media	<sup>56</sup> Fe*	Media	<sup>110</sup> Cd	Baja
<sup>23</sup> Na*	Media	<sup>57</sup> Fe	Media	<sup>111</sup> Cd	Baja
<sup>24</sup> Mg	Media	<sup>59</sup> Co*	Media	<sup>112</sup> Cd	Baja
<sup>25</sup> Mg	Media	<sup>60</sup> Ni*	Media	<sup>113</sup> Cd	Baja
<sup>26</sup> Mg*	Media	<sup>61</sup> Ni	Media	<sup>114</sup> Cd*	Baja
<sup>27</sup> Al*	Media	<sup>62</sup> Ni	Media	<sup>115</sup> In*	Baja
<sup>28</sup> Si	Media	<sup>63</sup> Cu*	Media	<sup>121</sup> Sb*	Baja
<sup>29</sup> Si	Media	<sup>65</sup> Cu	Media	<sup>123</sup> Sb	Baja
<sup>30</sup> Si	Media	<sup>66</sup> Zn*	Media	<sup>133</sup> Cs*	Baja
<sup>31</sup> P*	Media	<sup>67</sup> Zn	Media	<sup>137</sup> Ba	Baja
<sup>32</sup> S*	Media	<sup>68</sup> Zn	Media	<sup>138</sup> Ba*	Baja
<sup>33</sup> S	Media	<sup>69</sup> Ga*	Alta	<sup>201</sup> Hg	Baja
<sup>39</sup> K*	Alta	<sup>71</sup> Ga	Alta	<sup>202</sup> Hg	Baja
<sup>41</sup> K	Alta	<sup>72</sup> Ge	Alta	<sup>204</sup> Pb*	Baja
<sup>42</sup> Ca	Alta	<sup>73</sup> Ge	Alta	<sup>206</sup> Pb*	Baja
<sup>42</sup> Ca*	Media	<sup>75</sup> As*	Alta	<sup>207</sup> Pb*	Baja
<sup>44</sup> Ca	Alta	<sup>77</sup> Se*	Alta	<sup>208</sup> Pb*	Baja
<sup>44</sup> Ca	Media	<sup>78</sup> Se	Alta	<sup>209</sup> Bi*	Baja
<sup>45</sup> Sc*	Media	<sup>85</sup> Rb*	Baja		
<sup>49</sup> Ti	Alta	<sup>86</sup> Sr*	Alta		

**Tabla 15** Isótopos analizados y nivel de resolución en el análisis por ICP-SFMS de la muestra de estudio. Los isótopos marcados con un asterisco fueron los utilizados para realizar la cuantificación.

## 9.8 Resonancia Magnética Nuclear

### 9.8.1 Reactivos y materiales

Durante el análisis por RMN se utilizó metanol deuterado (MeOH-d<sub>4</sub>, D=99,8%) DLM-24-0 de Cambridge Isotope Laboratories<sup>®</sup>, Inc. (Andover, EE. UU.). Se utilizaron tubos de RMN de 5 mm de diámetro para uso en RMN de 600 MHz marca Wilmad<sup>®</sup> Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Misuri, EE. UU.). Para la aplicación cuantitativa de RMN como estándar interno se utilizó un material de referencia certificado de ácido benzoico SRM 350b del NIST (Maryland, EE. UU.).

## 9.8.2 Instrumentos

Los análisis de RMN fueron realizados en un espectrómetro Bruker®, modelo Ascend 400® (Fällanden, Suiza) con consola Avance Neo® operando a 9,4 T con una sonda de 5 mm tipo *broadband observe* (BBO) y automuestreador en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear (LRMN) de la Facultad de Química, Universidad de la República. Las muestras y el estándar interno se pesaron en una microbalanza (carga máxima 52 g, división 0,001 mg) Mettler Toledo® XPE56 (Zúrich, Suiza).

## 9.8.3 Preparación de muestra y determinaciones analíticas

Para el análisis cualitativo de la muestra problema se pesaron 5 mg de muestra en un vial ámbar de 2 mL que luego fueron disueltos en 750  $\mu\text{L}$  de MeOH- $d_4$ . Para el análisis cuantitativo, se pesaron 5 mg de muestra problema más 1 mg de estándar interno, los cuales se disolvieron en 750  $\mu\text{L}$  de MeOH- $d_4$ . En ambos casos se promovió la disolución mediante el sonicado de la solución. Los datos fueron adquiridos con el programa TopSpin® de Bruker®. Previo a la adquisición de los datos se realizó la sintonización de frecuencia y la homogeneización del campo magnético de forma automática. Se utilizó un pulso de  $90^\circ$ , calibrado previamente. La muestra para análisis cuantitativo fue analizada por triplicado instrumental. Se obtuvieron espectros de  $^1\text{H}$  tanto para el análisis cuantitativo como para el cualitativo, este último adicionalmente incluyó espectros de  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC y HMBC. Dada la complejidad del espectro, y para facilitar la cuantificación, los espectros de  $^1\text{H}$  se obtuvieron con desacoplaje a carbono.

Los datos fueron procesados con el programa MestReNova® 6.0.2 de Mestrelab Research® SL (Santiago de Compostela, España). Los espectros obtenidos fueron apodizados a 0,3 Hz con una función exponencial, se realizó un ajuste manual de fase de orden cero y uno y se corrigió manualmente la línea de base con algoritmo por segmentos.

Para la cuantificación se buscó la integración de señales identificadas que no presentaran solapamiento con otras señales, que no correspondieran a protones intercambiables y que fueran específicas tanto al estándar interno como al componente principal de la muestra.

Las condiciones de obtención de los espectros de  $^1\text{H}$  para análisis cualitativo y cuantitativo se detallan en la Tabla 16.

	<b>Análisis cualitativo</b>	<b>Análisis cuantitativo</b>
<b>Parámetro</b>	Valor	Valor
<b>Temperatura</b>	298 K	298 K
<b>Rotación de muestra</b>	Sin rotación	Sin rotación
<b>Tiempo de adquisición</b>	4,00 s	5,08 s
<b>Duración del pulso</b>	14 $\mu$ s	14 $\mu$ s
<b>Tiempo de relajación</b>	1 s	40 s
<b>Ventana espectral</b>	20 ppm	40 ppm
<b>Offset</b>	6,175 ppm	6,500 ppm
<b>Ganancia del receptor</b>	101	101
<b>Número de escanes</b>	8	8
<b>Número de escanes “dummy”</b>	2	0
<b>Número de datos</b>	64k	160k

**Tabla 16** Condiciones experimentales para obtención de espectros de  $^1\text{H}$ -RMN para análisis cualitativo y cuantitativo.

## Capítulo 10. Presentación de resultados y discusión

### 10.1 Estudio de estructura molecular y detección de potenciales impurezas

Como se expuso en la Sección 8.4.1.1, la información asociada al origen de la muestra de estudio es de gran utilidad a la hora de identificar las potenciales impurezas presentes. Según se consultó al proveedor del producto, la muestra de estudio de ficocianobilina fue obtenida a partir de *Spirulina (Arthrospira platensis)*.

La purificación de ficocianobilina a partir de este tipo de cianobacterias implica, en primera instancia, la extracción de las ficobiliproteínas en las que está contenido ese grupo prostético. Posteriormente, el cromóforo es separado de la apoproteína generando una ruptura del enlace covalente mediante su reacción con ácido concentrado, un alcohol (usualmente metanol o etanol) o tratamiento enzimático (Llopiz et al., 2016; Roda-Serrat et al., 2018). A este paso le sigue una extracción con solventes orgánicos, como cloroformo o diclorometano, y un proceso de purificación por cromatografía, ya sea en placa o columna (Llopiz et al., 2016).

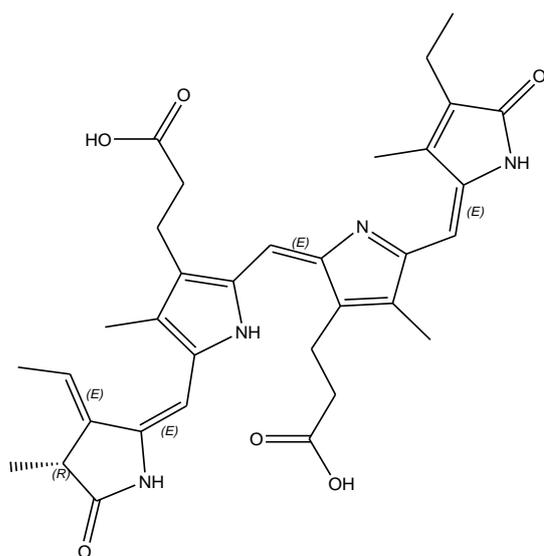
En un estudio llevado a cabo por Roda-Serrat et al. (2018), se evaluaron diferentes estrategias de ruptura del enlace tioéter, que une la ficocianobilina con su apoproteína, mediante solvólisis con metanol, etanol o soluciones alcohólicas acuosas. Estos autores reportaron la generación de impurezas durante este proceso, tales como aductos metanólicos o etanólicos de ficocianobilina (PCB-OMe y PCB-OEt según Figura 14 y Figura 15, respectivamente) así como una mezcla de isómeros (3E) y (3Z)-PCB interconvertibles (Figura 12 y Figura 13, respectivamente), aunque (3E)-PCB se presenta en mayor abundancia por ser termodinámicamente más estable. Si bien (3E)-PCB fue reportado como el precursor biosintético más probable que se encuentra en la proteína, la formación de cantidades menores de (3Z)-PCB ya había sido presentada por Beale y Cornejo (1991).

Otra potencial fuente de impurezas sería la agregación de unidades de ficocianobilina para formar dímeros o trímeros (2PCB y 3PCB, respectivamente). Tanto Göller et al. (2001) como Womick y Moran (2009) plantean la formación de dímeros de ficocianobilina en estado sólido, ya sea aisladamente o como parte de la ficobiliproteína. Mediante un estudio semiempírico AM1, Göller et al. (2001) además estudian la posibilidad de que esto ocurra en solución, proponiendo la unión de dos monómeros por enlaces de hidrógeno entre los anillos A. Si bien los autores de este último estudio llegan a la valoración de que la formación de dímeros en soluciones diluidas no debería

esperarse, dadas las referencias que proponen su presencia en el sólido amerita la búsqueda de dichas impurezas en este trabajo de maestría.

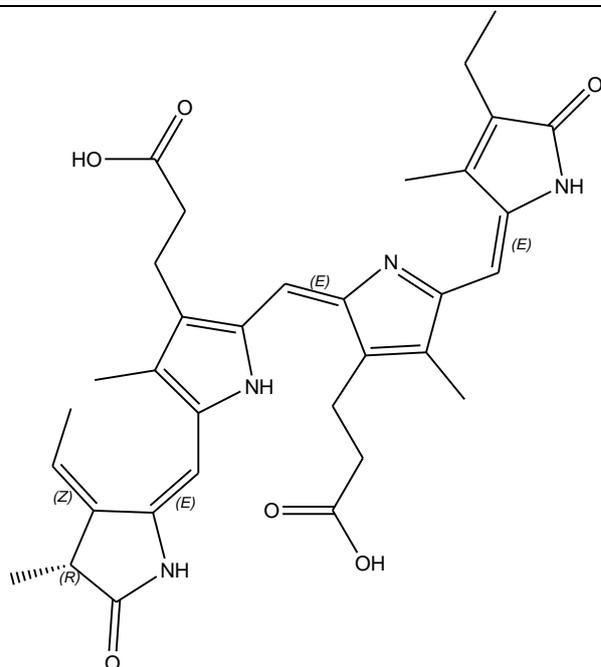
Por último, se propusieron como posibles interferencias unidades de cromóforo con el enlace tioéter intacto, es decir, moléculas de ficocianobilina unida a un aminoácido cisteína y este a otros aminoácidos anexos. La generación de estas impurezas pudo verse favorecida si se utilizó ácido en el proceso de extracción del cromóforo de la proteína, generando una hidrólisis ácida en los enlaces peptídicos más cercanos al cromóforo. Teniendo en cuenta la secuencia de aminoácidos para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  exploradas en la Sección 8.1, se propusieron las impurezas ilustradas de la Figura 16 a la Figura 24 conteniendo de una a tres unidades de aminoácidos unidas a la molécula de ficocianobilina.

Por simplicidad, se muestran los isómeros E,E,E para los dobles enlaces puentes entre los anillos.



$C_{33}H_{38}N_4O_6$   
 Exact Mass: 586,27913  
 Mol. Wt.: 586,67802  
 m/e: 586,27913 (100,0%), 587,28249 (35,7%), 588,28584 (6,2%), 587,27617 (1,5%), 588,28338 (1,2%)  
 C, 67.56; H, 6.53; N, 9.55; O, 16.36

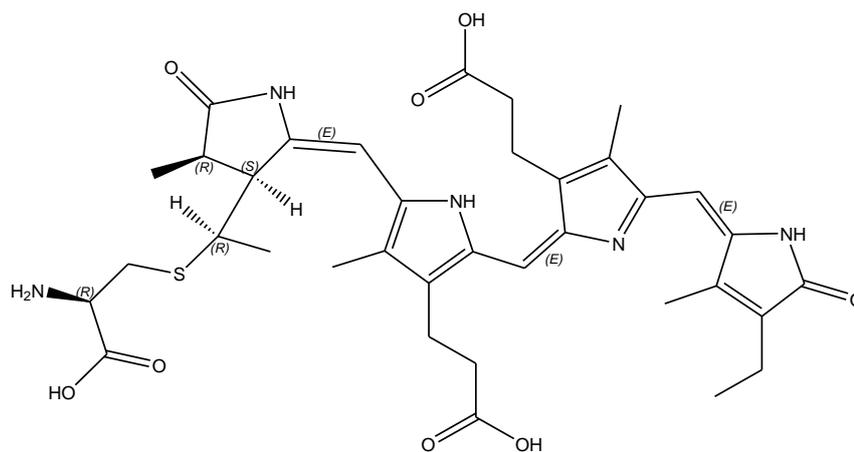
**Figura 12 (R,E,E,E,E)-PCB**



$C_{33}H_{38}N_4O_6$   
 Exact Mass: 586,27913  
 Mol. Wt.: 586,67802  
 m/e: 586,27913 (100,0%), 587,28249 (35,7%), 588,28584 (6,2%), 587,27617 (1,5%), 588,28338 (1,2%)  
 C, 67.56; H, 6.53; N, 9.55; O, 16.36

**Figura 13 (R,Z,E,E,E)-PCB**





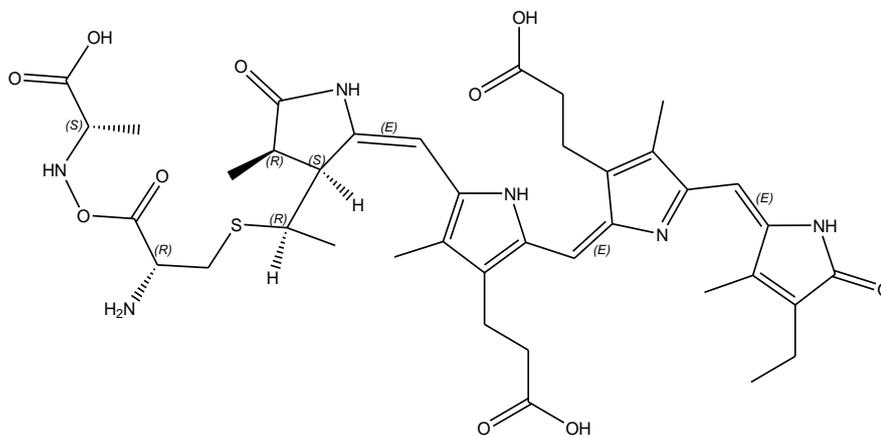
$C_{36}H_{45}N_5O_8S$

Exact Mass: 707,29888

Mol. Wt.: 707,8362

m/e: 707,29888 (100,0%), 708,30224 (38,9%), 709,30559 (7,4%), 709,29468 (4,5%), 708,29592 (1,8%),  
710,29804 (1,8%), 709,30313 (1,6%)  
C, 61.09; H, 6.41; N, 9.89; O, 18.08; S, 4.53

**Figura 16 (R,E,E,E,E)-PCB-C**



$C_{39}H_{50}N_6O_{10}S$

Exact Mass: 794,33091

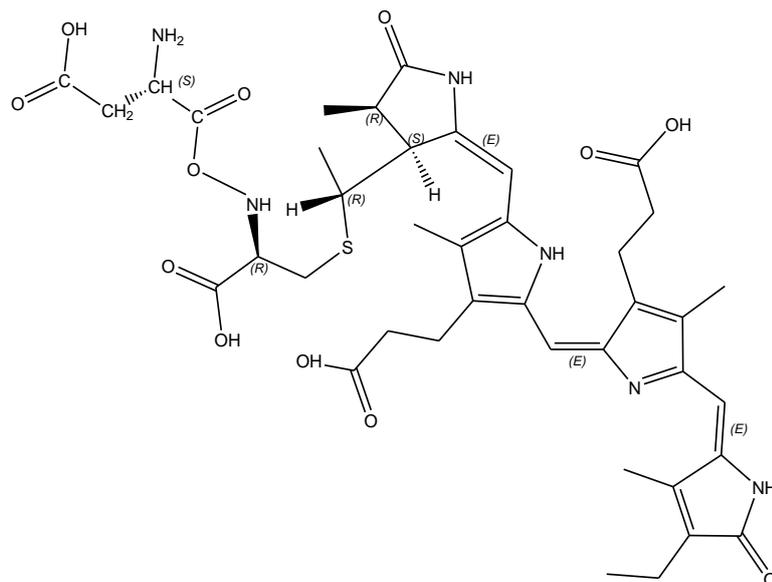
Mol. Wt.: 794,9135

m/e: 794,33091 (100,0%), 795,33427 (42,2%), 796,33762 (8,7%), 796,32671 (4,5%), 795,32795 (2,2%),  
796,33516 (2,1%), 797,33006 (1,9%), 797,34098 (1,2%)  
C, 58.93; H, 6.34; N, 10.57; O, 20.13; S, 4.03

**Figura 17 (R,E,E,E,E)-PCB-CA**

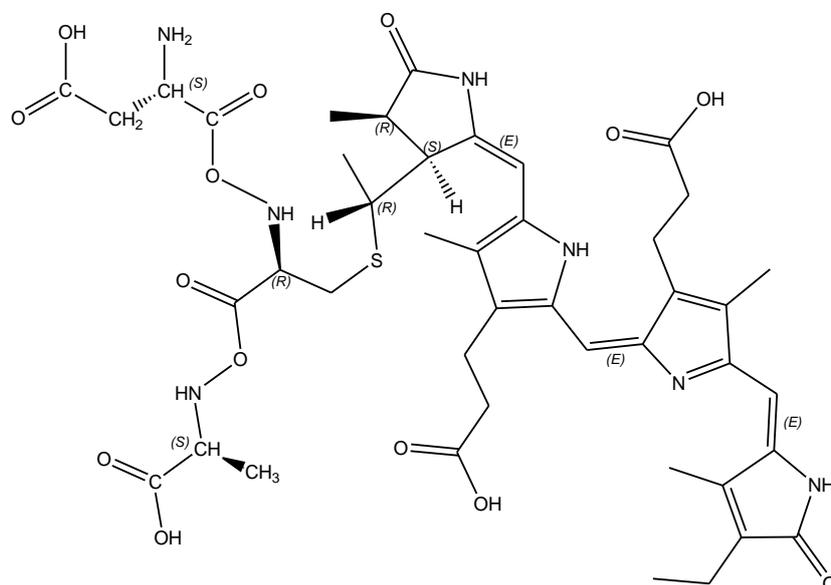






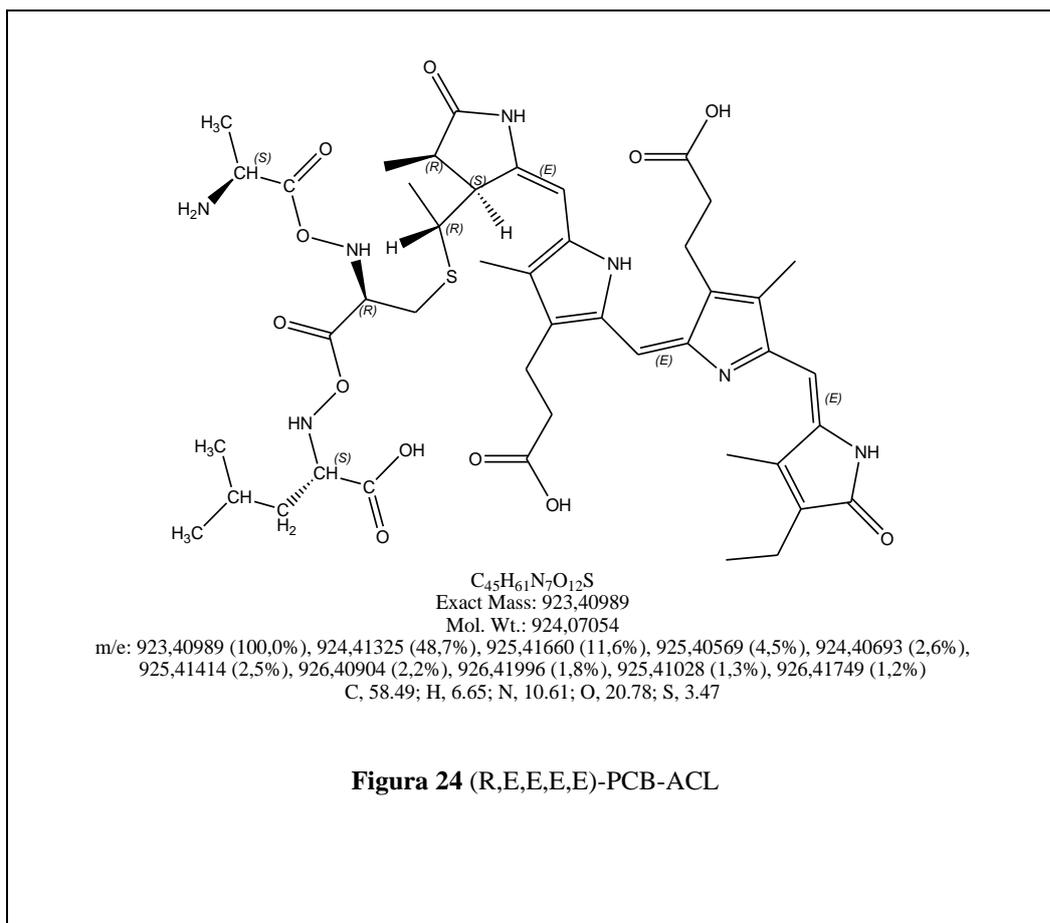
$C_{40}H_{50}N_6O_{12}S$   
 Exact Mass: 838,32074  
 Mol. Wt.: 838,923  
 m/e: 838,32074 (100,0%), 839,32410 (43,3%), 840,32745 (9,1%), 840,31654 (4,5%), 840,32499 (2,5%),  
 839,31778 (2,2%), 841,31989 (2,0%), 841,33081 (1,3%), 841,32834 (1,1%)  
 C, 57.27; H, 6.01; N, 10.02; O, 22.89; S, 3.82

**Figura 22 (R,E,E,E,E)- PCB-DC**



$C_{43}H_{55}N_7O_{14}S$   
 Exact Mass: 925,35277  
 Mol. Wt.: 926,0003  
 m/e: 925,35277 (100,0%), 926,35613 (46,5%), 927,35948 (10,6%), 927,34857 (4,5%), 927,35702  
 (2,9%), 926,34981 (2,6%), 928,35192 (2,1%), 928,36283 (1,6%), 928,36037 (1,3%), 927,35316  
 (1,2%)  
 C, 55.77; H, 5.99; N, 10.59; O, 24.19; S, 3.46

**Figura 23 (R,E,E,E,E)-PCB-DCA**



La Tabla 17 expone un resumen de las potenciales impurezas identificadas junto a su peso molecular e incertidumbre, calculado según se indica en la Sección 9.6, y la fuente de información que permitió proponer su presencia.

Compuesto	Naturaleza	Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Incertidumbre estándar del peso molecular (g mol <sup>-1</sup> , k=1)	Fuente de información
(3E)-PCB	Analito	586,677	0,020	(Beale & Cornejo, 1991; Roda-Serrat et al., 2018)
(3Z)-PCB	Impureza	586,677	0,020	(Beale & Cornejo, 1991; Roda-Serrat et al., 2018)
PCB-OMe	Impureza	618,719	0,020	(Roda-Serrat et al., 2018)
PCB-OEt	Impureza	632,745	0,021	(Roda-Serrat et al., 2018)
PCB-C	Impureza	707,837	0,022	Potencial presencia*
PCB-CA	Impureza	794,914	0,023	Potencial presencia*
PCB-CK	Impureza	852,009	0,025	Potencial presencia*
PCB-ACK	Impureza	939,087	0,028	Potencial presencia*
PCB-CL	Impureza	836,995	0,025	Potencial presencia*
PCB-DC	Impureza	838,924	0,024	Potencial presencia*
PCB-AC	Impureza	794,914	0,023	Potencial presencia*
PCB-DCA	Impureza	926,002	0,026	Potencial presencia*
PCB-ACL	Impureza	924,072	0,027	Potencial presencia*
2PCB	Impureza	1.172,350	0,040	(Beuhler et al., 1976; Göller et al., 2001; Womick & Moran, 2009)
3PCB	Impureza	1.760,030	0,060	Potencial presencia

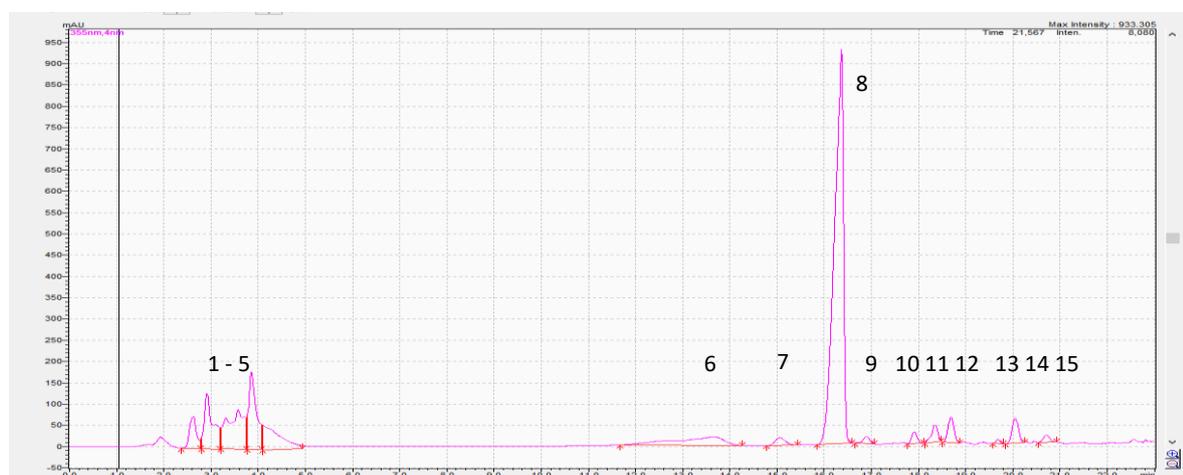
**Tabla 17** Resumen de potenciales impurezas, peso molecular e incertidumbre (según Sección 9.6) y la fuente de información. \*Presencia potencial a partir de secuencia de aminoácidos de subunidades alfa y beta de ficocianina (*cpcA* - *C-phycocyanin alpha chain* - *Arthrospira platensis* - *cpcA gene & protein*, s. f.; *cpcB* - *C-phycocyanin beta chain* - *Arthrospira platensis* - *cpcB gene & protein*, s. f.)

## 10.2 Balance de masa

### 10.2.1 Impurezas estructuralmente relacionadas

Existen dos pasos fundamentales para la determinación de la fracción de masa de impurezas relacionadas: la identificación de las impurezas presentes y la obtención de estándares para su calibración. Es posible, aunque no deseable, prescindir del segundo paso si estos estándares no se encuentran disponibles comercialmente o no es posible su síntesis o purificación, siendo este el caso del presente trabajo de investigación.

La muestra de estudio (Sección 9.1) fue analizada mediante HPLC-DAD y LC-MS/MS utilizando condiciones cromatográficas similares en ambas para favorecer la correlación entre los resultados. Durante el desarrollo del método cromatográfico se tomó como referencia un método ya reportado (Roda-Serrat et al., 2018) y se optimizaron las condiciones para el equipo de HPLC-DAD utilizado, buscando el mayor grado de resolución cromatográfica posible, así como una elución completa de las impurezas. Siguiendo estas condiciones optimizadas, detalladas en la Sección 9.2, se obtiene el cromatograma mostrado en la Figura 25, a partir del cual se numeran las señales correspondientes a los compuestos presentes en la Tabla 18. Los resultados obtenidos a partir del detector de arreglo de diodos permiten observar dos bandas de absorción, una cuya longitud de onda máxima se encuentra en el entorno de 360 nm y otra en el entorno de 660 nm (aquí denominadas bandas “baja” y “alta” respectivamente), las cuales son características de los cromóforos tetrapirrólicos (Crespi et al., 1968; Falk et al., 1985; hEocha, 1963). Se observó un espectro similar para todas las impurezas presentes, tanto en su forma, como en las longitudes de onda de absorción máxima ( $\lambda_{\text{máx.}}$ ) para las bandas alta y baja (ver Apéndice Figura A. 2). Esta observación apoya el supuesto de que las impurezas son estructuralmente relacionadas.



**Figura 25** Cromatograma del análisis por HPLC-DAD de la muestra de estudio a un volumen de inyección de 10  $\mu\text{L}$ .

Se identificó el compuesto N° 8 como el componente principal declarado en el certificado de análisis de la muestra de estudio ((3E)-PCB) por ser la señal de mayor área. Adicionalmente, la longitud de onda máxima para la banda alta coincide con aquella reportada para PCB en condiciones ácidas, de 660 nm (Roda-Serrat et al., 2018).

N° Comp.	tR (min)	λ máx. banda baja (nm)	λ máx. banda alta (nm)
1	2,625	350	661
2	2,917	366	667
3	3,574	351	667
4	3,852	355	667
5	4,101	358	667
6	13,64	347	661
7	15,059	361	661
<b>8</b>	<b>16,368</b>	<b>368</b>	<b>660</b>
9	16,896	364	663
10	17,908	365	661
11	18,348	361	661
12	18,687	364	661
13	19,68	363	661
14	20,051	368	661
15	20,706	*	*

**Tabla 18** Compuestos registrados a partir del análisis de HPLC-DAD de la muestra de estudio. Compuesto N° 8 identificado como (3E)-PCB. \*No registrado para este compuesto.

El análisis de la muestra de estudio por LC-MS/MS implicó una búsqueda específica de la relación masa/carga (m/z) correspondiente a las potenciales impurezas mencionadas en la Tabla 17. A partir de este estudio, los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 19. En primer lugar, se realizó la búsqueda del componente principal (3E)-PCB, el cual se identificó como una señal cuyo tiempo de retención fue 8,99 min. Si bien las transiciones evaluadas no permiten identificar si se trata del isómero (3E)-PCB o del (3Z)-PCB, se conoce que (3E)-PCB es el componente principal según el certificado de análisis y que también es termodinámicamente el más estable, por lo que su formación es preferencial (Roda-Serrat et al., 2018).

La presencia del isómero (3Z)-PCB fue evaluada mediante la búsqueda de la misma m/z que para (3E)-PCB, a partir de lo cual se encontró una señal a 9,47 min de menor intensidad en comparación con (3E)-PCB. La señal de (3Z)-PCB tiene un tiempo de retención mayor, lo cual coincide con lo reportado por Roda-Serrat et al. (2018) – método que se tomó como base para la optimización en este trabajo –. Es oportuno mencionar que, si se comparan los resultados de esta búsqueda para la muestra de ficocianobilina recién preparada y la muestra más antigua (ver Sección 9.3), la señal correspondiente a (3Z)-PCB disminuye con el tiempo (los cromatogramas se muestran en el Apéndice 1, Figuras A. 3 y A. 4). Esto es consistente con lo expuesto en la Sección 10.1 sobre la

interconversión entre ambos isómeros en solución, con una mayor prevalencia del isómero (3E)-PCB. De esta forma se explicaría porque una solución recién preparada a partir del sólido presentaba una mayor cantidad de (3Z)-PCB, que con el tiempo se convirtió casi completamente en (3E)-PCB. En vista de que la concentración relativa de los isómeros cambia en función del tiempo, se consideró que ambos formaban parte del componente principal al momento de declarar la pureza final.

Compuesto Buscado	Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	z total	m/z teórico	Transición o ion buscado	Intensidad del pico principal	Calidad de transición	Tiempo de retención (min)	¿Compuesto presente?
3E-PCB	586,677	1	587,677	1) 587,0 > 464,4 2) 587,0 > 348,8 3) 587,0 > 299,2	1) 1,87E+06 2) 1,31E+05 3) 6,04E+06	Buena	8,99	Si
3Z-PCB	586,677	1	587,677	1) 587,0 > 464,4 2) 587,0 > 348,8 3) 587,0 > 299,2	1) 1,87E+06 2) 1,31E+05 3) 6,04E+06	Buena	9,47	Si
PCB-OMe	618,719	1	619,719	1) 619,3 > 587,3 2) 619,3 > 464,5 3) 619,3 > 299,2	1) 3,11E+06 2) 2,24E+05 3) 3,75E+05	Buena	8,63	Si
PCB-OEt	632,745	1	633,745	1) 633,2 > 601,3 2) 633,2 > 299,2	1) 3,26E+05 2) 1,00E+04	Buena	9,62	Si
PCB-C	707,837	1	708,837	1) 707,2 > 707,3	1) 7,38E+06	Regular	16,78	Si
PCB-CA	794,914	1	795,914	1) 797,2 > 797,4 2) 797,2 > 795,8	1) 5,91E+05 2) 6,24E+04	Regular	15,9 / 19,4	Posible
PCB-AC	794,914	1	795,914	1) 797,2 > 797,4 2) 797,2 > 795,8	1) 5,91E+05 2) 6,24E+04	Regular	15,9 / 19,4	Posible
PCB-CK	852,009	2	427,005	1) 428,9 > 341,0 2) 428,9 > 207,0	-	Regular	-	No
PCB-ACK	939,087	2	470,544	SIR: 472	2,09E+06	Regular	13,88	Si
PCB-CL	836,995	1	837,995	1) 837,5 > 837,9	2,44E+07	Regular	15,16	Si
PCB-DC	838,924	0	839,924	1) 841,3 > 841,4	3,29E+05	Regular	-	No
PCB-DCA	926,002	0	927,002	SIR: 928	6,81E+06	Regular	15,09	Si
PCB-ACL	924,072	1	925,072	SIR: 928	6,81E+06	Mala	-	No
2PCB	1172,35	1	1173,35	1) 1173,5 > 1174,4 2) 1173,5 > 587,2 3) 1173,5 > 299,3	1) 2,58E+05 2) 2,24E+06 3) 6,53E+04	Buena	16,31	Si
3PCB	1760,03	3	1763,03	*	NA	NA	-	Desconocido

**Tabla 19** Resultados de la búsqueda de las impurezas propuestas de la Sección 10.1 y evaluación de su presencia.

Como siguiente paso, se evaluó la presencia de las impurezas propuestas en la Sección 10.1. Para esto se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: calidad de la transición buscada en función de la  $m/z$  teórica y la cantidad de transiciones encontradas por compuesto, aspecto de la señal e intensidad de la señal, tomando como criterio de aceptación una señal mayor a  $1 \times 10^4$  cuentas por segundo. La valoración final de presencia o ausencia de cada impureza, lo cual se detalla en la Tabla 19, fue una suposición fundamentada en la evidencia provista por el análisis de LC-MS/MS, que debería ser confirmada por otras técnicas más idóneas para este fin, como ser el uso de un espectrómetro de masas de alta resolución (HRMS).

Durante la búsqueda del dímero 2PCB, se encontraron señales cromatográficas de aspecto e intensidad adecuadas a 16,31 min y a 8,99 min, aunque esta última señal ya había sido identificada como PCB. Sería razonable pensar que este último caso pudo deberse a la generación del dímero 2PCB como artefacto a la salida de la columna cromatográfica, ya que, dado su volumen, el dímero no debería presentar el mismo tiempo de retención que la especie monomérica de PCB. Dada la prevalencia del isómero (3E)-PCB sobre (3Z)-PCB, sería esperable que el dímero 2PCB estuviera constituido por dos unidades del primer compuesto mencionado. Por otro lado, no fue posible evaluar la presencia del trímero 3PCB dado que la masa a buscar excedía el rango de masas de la calibración del espectrómetro de masas.

Para el caso de PCB-OMe y PCB-OEt, se observaron señales con un tiempo de retención menor y mayor (respectivamente) al correspondiente para PCB, lo cual es consistente con lo reportado por Roda-Serrat et al. (2018). La intensidad de las señales aparentó ser mayor para el caso de PCB-OMe, mientras que en el caso de PCB-OEt la segunda transición no registró una señal distinguible de ruido. En ambos casos se observaron señales múltiples (dobles o triples); una posible explicación de esto podría ser la presencia de estereoisómeros R y S formados a partir de la sustitución nucleofílica tipo  $SN_2$  mediante la cual se sustituye el grupo cisteína por una molécula del solvente utilizado en la extracción (MeOH o EtOH) (Roda-Serrat et al., 2018). Si bien se espera que la reacción sea estereoselectiva, dando un producto específico R o S, se puede partir de una mezcla de reactivos que contenga ambas configuraciones. En función de lo expuesto se entendió que se contaba con suficiente evidencia para indicar que estas impurezas efectivamente están presentes.

Dos de las impurezas potencialmente presentes, PCB-DCA y PCB-AC, son casi isobáricas y fueron buscadas con el mismo experimento de SIR, con un corrimiento de la relación  $m/z$  objetivo de hasta 3 unidades de masa arbitraria (uma). Se observó una única señal a 15,09 min, que adicionalmente presentaba una señal menor a  $m/z$  930 uma. Consideramos que era razonable proponer que el compuesto que generaría una señal a ambas relaciones  $m/z$  a partir de sus isótopos sería el de mayor peso molecular, es decir, la impureza PCB-DCA. Este grado de duda sobre la identidad de esta

impureza se podrá contemplar como una fuente de incertidumbre en el peso molecular para el cálculo de fracción de masa.

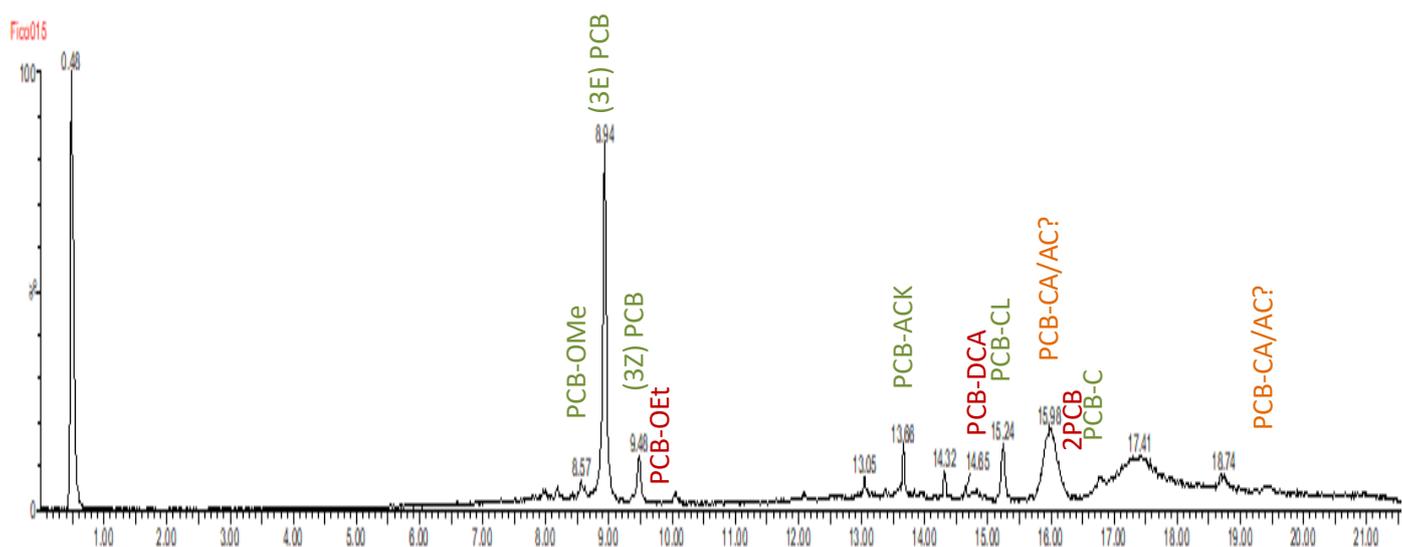
Una situación similar ocurre con las impurezas PCB-AC y PCB-CA, isobáricas, y con diferencias estructurales mínimas. La búsqueda de estos compuestos dio como resultado varias señales, principalmente a 15,9 y 19,4 min. Se puede proponer que ambas impurezas están presentes, aunque esto es cuestionable ya que parece poco probable que dos compuestos isobáricos y de estructura muy similar, tengan una diferencia de tiempo de retención de 4 minutos. Es posible que estas señales vistas sean debidas a contaminación, considerando que no se encuentran con una intensidad considerable. Lo mismo puede decirse de la búsqueda de PCB-DC, que produjo varias señales de baja intensidad, algunas ya asignadas y otras señales que se sospechan que son contaminación, así como la búsqueda de PCB-CK mediante el ion 428,9 m/z ( $z=2$ ), que no produjo una señal distinguible del ruido instrumental. Por otro lado, se observó una señal de intensidad elevada para PCB-CL a 15,16 min y para PCB-C a 16,78 min, mientras que para PCB-ACK una señal menos pronunciada fue visible a 13,88 min.

Tanto para el análisis por HPLC-DAD como para el análisis por LC-MS/MS se detectaron señales a tiempos de retención bajos: entre 2 y 4 minutos para HPLC-DAD y a 0,49 min para LC-MS/MS. A partir del análisis por HPLC-DAD, se observó que los espectros de absorción de estas señales presentan perfiles y  $\lambda$  máximos para las bandas altas y bajas similares al resto de las impurezas estudiadas. Adicionalmente, estas señales aparecen durante la búsqueda de las transiciones correspondientes a (3E)-PCB, PCB-OMe y algunas otras impurezas que se presentan como derivados aminoacídicos de PCB, pero no aparece en el blanco de solvente analizado. En función de lo expuesto, se entiende que estas señales también corresponden a impurezas estructuralmente relacionadas a PCB. No obstante, la diferencia en el tiempo de retención entre las impurezas a tiempo de retención bajo y PCB junto con el resto de las impurezas es inusual ya que da indicios de que estas presentan una interacción con las fases móviles y estacionarias muy diferentes. Una posible explicación sería que esta señal corresponde a PCB, y algunas otras impurezas de PCB, con una conformación tridimensional diferente. De acuerdo con lo expuesto por Falk et al. (1985), los compuestos tetrapirrólicos similares a PCB presentan equilibrios conformacionales donde prima una conformación lineal en presencia del solvente HMPT, mientras que en otros solventes, como tetracloruro de metano, la conformación más estable es la helicoidal. Estos autores propusieron como explicación, que la alta capacidad de formar puentes de hidrógeno del solvente HMPT con el tetrapirrol, contrarrestaría la pérdida de estabilización energética de la forma helicoidal. El solvente HMPT tiene un elevado carácter donador de electrones de orbitales no enlazantes (Reichardt & Welton, 2011), lo cual puede asemejarse al comportamiento del agua. En este sentido, al inicio de la corrida cromatográfica la fase móvil estuvo compuesta por 90% de agua, lo que puede

favorecer la forma lineal del PCB y sus impurezas. En este caso, la mayor interacción de la fase móvil con la molécula de PCB (o sus impurezas), que daría como resultado su forma lineal, significaría una menor interacción con la fase estacionaria, y por consecuencia, eluiría a un menor tiempo de retención. Esto podría confirmarse mediante el análisis de la muestra de estudio por HPLC-DAD utilizando una fase móvil isocrático con un porcentaje de solvente orgánico variable entre 30 a 40% (la elución de la primera impureza de la cual se supone una conformación helicoidal se da con una composición de 43% de solvente orgánico). De esta forma, se vería si estas señales desaparecen a medida que se analiza la muestra con un mayor porcentaje de solvente orgánico en la fase móvil, lo cual sería consistente con una prevalencia de la conformación helicoidal.

Adicionalmente, se realizó la búsqueda de los aminoácidos D, C, A, L y K de forma individual ya que podrían presentarse como una impureza. Los resultados del experimento permitieron descartar su presencia. Con el objetivo de evaluar la presencia de impurezas estructuralmente relacionadas hasta entonces no consideradas, se analizó la muestra de estudio mediante un experimento de masas SIR donde la  $m/z$  buscada fue 299 uma. El fundamento detrás de esta búsqueda es que este ion representa un fragmento de la base de PCB en común con las impurezas, lo cual mostraría de forma general los compuestos con estructura derivada de la PCB. Este fue un experimento meramente orientativo ya que depende de que ocurra una fragmentación a nivel de fuente de ionización. Estos resultados podrían corroborarse mediante un experimento de escaneo de iones productos, donde se realiza la búsqueda de las señales que al fragmentar produzcan estos iones.

La comparación visual del cromatograma de la Figura 26 (LC-MS/MS) y el cromatograma obtenido mediante el análisis de HPLC-DAD permitieron proponer la asignación de señales según se detallada en la Tabla 20. Las identificaciones propuestas en *itálica* son aquellas en las cuales existe un grado de duda razonable en la asignación. El compuesto 2PCB fue identificado dentro de las señales del análisis mediante HPLC-DAD en función de que presentaba las mismas  $\lambda$  máxima para las bandas alta y baja que PCB. En función de esto, se identificó el PCB-C como el compuesto inmediatamente después de la señal de 2PCB. Los compuestos 10 a 13 fueron identificados tentativamente según se detalla en la Tabla 20, aunque la información disponible no permitió concluir con certeza. Dado el grado de duda que existe en la identificación de estos compuestos, durante el cálculo de fracción de masa del compuesto principal (que se desarrolla mas adelante) se tomó un peso molecular con una incertidumbre aumentada de forma que cubriera el rango de pesos moleculares posibles. Una estrategia similar fue tomada para las señales previas a PCB-OMe que no pudieron ser identificadas con la información disponible. En este caso se les asignó el peso molecular de PCB, pero con una variación posible de peso molecular mayor, como se verá a continuación.



**Figura 26** Cromatograma del análisis de la muestra de estudio por LC-MS/MS con un experimento SIR de búsqueda de m/z 299. Las etiquetas verdes muestran compuestos identificados y con señal visible en el SIR, las etiquetas rojas, los que se identificaron como presentes, pero sin señal visible en el SIR y las etiquetas amarillas, los que están posiblemente presentes.

Nº Comp.	t <sub>R</sub> (min) HPLC-DAD	λ máx. bajo (nm)	λ máx. alto (nm)	t <sub>R</sub> (min) LC- MS/MS	ID
1	2,625	350	661	-	-
2	2,917	366	667	-	-
3	3,574	351	667	-	-
4	3,852	355	667	-	-
5	4,101	358	667	-	-
6	13,64	347	661	-	-
7	15,059	361	661	8,57	PCB-OMe
<b>8</b>	<b>16,368</b>	<b>368</b>	<b>660</b>	<b>8,94</b>	<b>(3E)-PCB</b>
9	16,896	364	663	9,47	(3Z)-PCB
10	17,908	365	661	13,88	PCB-ACK
11	18,348	361	661	15,09	PCB-DCA
12	18,687	364	661	15,16	PCB-CL
13	19,68	363	661	15,9	PCB-AC/CA
14	20,051	368	661	16,31	2 PCB
15	20,706	*	*	16,78	PCB-C

**Tabla 20** Identificación propuesta para las señales obtenidas por el análisis de HPLC-DAD mediante correlación con las señales de LC-MS/MS. Los asteriscos son datos no registrados.

Dado que no fue posible obtener estándares de las impurezas para realizar la cuantificación según la Ecuación (4), esta fue realizada por respuesta relativa. Esta estrategia se basa en el uso de la técnica de normalización de áreas para la estimación de la fracción molar que se explicará a continuación.

Sea  $n_A$  los moles del componente A de la muestra,  $A_A$  el área correspondiente a ese analito y  $FR_A$ , el factor de respuesta que los vincula (Ecuación (11)). La misma relación se puede plantear para los otros componentes de la mezcla: B, C, D, etc. A partir de esto, se puede llegar a una ecuación de cálculo de fracción molar de A en la mezcla de  $i$  componentes según las Ecuaciones (12) a (14).

$$A_A = n_A \times FR_A \quad (11)$$

$$\gamma_A = \frac{n_A}{\sum_{i=1}^i n_i} \quad (12)$$

$$\frac{A_A}{\sum_{i=1}^i A_i} = \frac{n_A \times FR_A}{\sum_{i=1}^i (n_i \times FR_i)} \quad (13)$$

$$\frac{A_A}{\sum_{i=1}^i A_i} = \frac{n_A \times FR_A}{FR_A \times \sum_{i=1}^i n_i} = \frac{n_A}{\sum_{i=1}^i n_i} = \gamma_A \quad (14)$$

Esta última ecuación se basa en la aproximación de que los factores de respuesta de las impurezas, por considerarse estructuralmente relacionadas a PCB, son similares al factor de respuesta del analito. Es evidente que esta aproximación debería verificarse experimentalmente mediante el uso de estándares de las impurezas, pero cuando esto no es posible, se puede introducir esta variabilidad en la incertidumbre del  $FR_i$  y así reflejar la falta de información disponible. Una vez que se cuenta con la fracción molar del componente principal y las impurezas, es necesario realizar la conversión a fracción de masa de forma de poder combinar los resultados durante el balance de masa. La relación entre la masa ( $m_A$ ) y los moles de A presentes en la muestra está dictada por la Ecuación (15), mediante el peso molecular de A ( $PM_A$ ). La relación entre la masa de A y la masa total de los componentes  $i$  da como producto la fracción de masa de A ( $w_A$ , Ecuación (16)), la cual puede relacionarse con la fracción molar de acuerdo a la Ecuación (17).

$$m_A = n_A \times PM_A \quad (15)$$

$$w_A = \frac{m_A}{\sum_{i=1}^i m_i} = \frac{n_A \times PM_A}{\sum_{i=1}^i (n_i \times PM_i)} = \frac{(n_A / \sum_{i=1}^i n_i) \times PM_A}{\sum_{i=1}^i (n_i \times PM_i) / \sum_{i=1}^i n_i} \quad (16)$$

$$w_A = \frac{\gamma_A \times PM_A}{\sum_{i=1}^i (\gamma_i \times PM_i)} \quad (17)$$

Una vez más, la falta de certeza en la identidad de las impurezas debe contemplarse en la incertidumbre asociada al peso molecular.

En la Tabla 21 se presentan los cálculos de fracción molar y fracción de masa para los compuestos 1 a 15 calculados según las Ecuaciones (14) y (17) respectivamente. Para el cálculo de incertidumbre de la fracción molar se consideró una desviación estándar porcentual para el área de

1% y se tomó una variación posible del factor de respuesta de 30% por encima o por debajo de la correspondiente a PCB, tomado como una variable de distribución rectangular. Para el cálculo de la incertidumbre de la fracción de masa se consideró que el peso molecular de los componentes 1 a 6 es el mismo que PCB, pero con una variación posible de 100 g mol<sup>-1</sup> del valor central. La incertidumbre estándar se calculó como la raíz cuadrada de la suma cuadrática de las incertidumbres estándares de cada componente, es decir el área de cada componente y su factor de respuesta, multiplicado por su respectivo coeficiente de sensibilidad, según la Guía JCGM 100:2008 (Joint Committee for Guides in Metrology, 2008a). Los cálculos de incertidumbre según esta Guía fueron validados utilizando el método de Monte Carlo mediante la aplicación NIST Uncertainty Machine versión 1.4.1 (Lafarge & Possolo, 2018) según la Guía JCGM 101:2008 (Joint Committee for Guides in Metrology, 2008b).

Nº Comp.	ID	Área (667 nm)	u Área	γ <sub>A</sub>	u γ <sub>A</sub>	PM	u <sub>PM</sub>	w <sub>A</sub>	u <sub>wA</sub>
1	PCB	737788	7378	1,74%	0,30%	587	58	1,70%	0,40%
2	PCB	1661802	16618	3,93%	0,68%	587	58	3,83%	0,90%
3	PCB	2259844	22598	5,34%	0,93%	587	58	5,2%	1,2%
4	PCB	1823297	18233	4,31%	0,75%	587	58	4,20%	0,99%
5	PCB	1510774	15108	3,57%	0,62%	587	58	3,48%	0,82%
6	PCB	1571579	15716	3,71%	0,65%	587	58	3,62%	0,85%
7	PCB-OMe	164750	1648	0,39%	0,07%	618,719	0,020	0,40%	0,09%
8	<b>(3E)-PCB</b>	<b>30766154</b>	<b>307662</b>	<b>73%</b>	<b>13%</b>	<b>586,677</b>	<b>0,020</b>	<b>71%</b>	<b>12%</b>
9	(3Z)-PCB	145180	1452	0,34%	0,06%	586,677	0,020	0,33%	0,07%
10	PCB-ACK	160375	1604	0,38%	0,07%	939	42	0,59%	0,13%
11	PCB-DCA	292095	2921	0,69%	0,12%	926	42	1,06%	0,23%
12	PCB-CL	510294	5103	1,21%	0,21%	837	42	1,68%	0,37%
13	PCB-CA	21019	210	0,05%	0,01%	795	42	0,07%	0,01%
14	2PCB	583371	5834	1,38%	0,24%	1172,350	0,040	2,69%	0,57%
15	PCB-C	101419	1014	0,24%	0,04%	707,837	0,022	0,28%	0,06%

**Tabla 21** Cálculo de fracción molar y fracción de masa de los compuestos 1 a 15 con sus respectivas incertidumbres estándar (k=1).

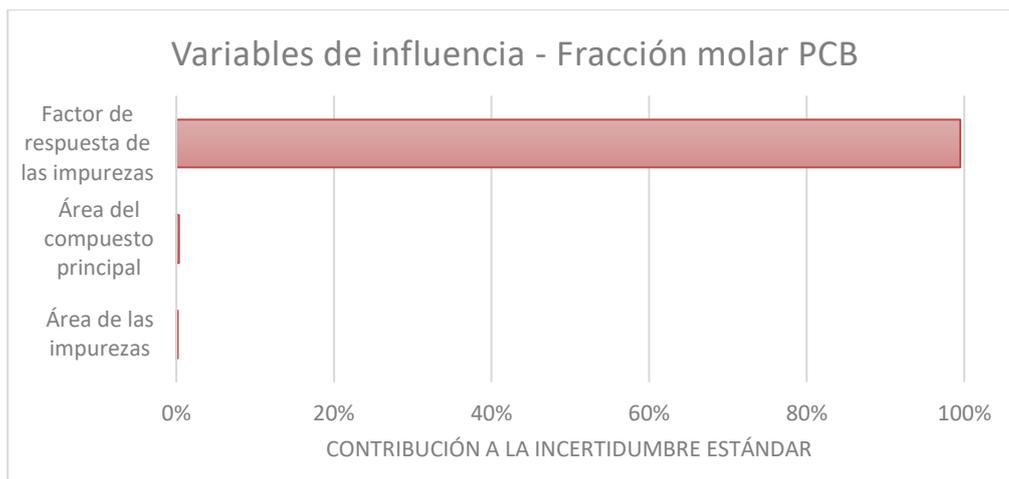
En las Tabla 22 y Tabla 23, acompañadas de las Figura 27 y Figura 28, se detallan las componentes consideradas en el cálculo de incertidumbre de fracción molar y fracción de masa de PCB respectivamente, con sus coeficientes de sensibilidad y su contribución a la incertidumbre global. Cabe mencionar que la fracción de masa del componente 8 se considera que corresponde al isómero (3E)-PCB en conformación helicoidal. Si bien es posible en esta instancia utilizar una definición

de analito más abarcativa y considerar (3Z)-PCB, no es posible asegurar lo mismo para (3E)-PCB de conformación lineal, sin antes confirmar su presencia. En estas condiciones se consideró que se podría estar subestimado la pureza de PCB, ya que ambas conformaciones lineal y helicoidal formarían parte del analito en la muestra sólida. No obstante, si el equilibrio conformacional ocurre de igual forma para las impurezas esta subestimación se vería compensada. El análisis de la muestra por una técnica ortogonal como resonancia magnética nuclear permitiría evaluar la validez de las suposiciones realizadas.

Fue posible determinar que la mayor contribución a la incertidumbre de la fracción de masa de PCB fue la incertidumbre asociada a la fracción molar del componente y esta, a su vez, está compuesta principalmente por el factor de respuesta supuesto para las impurezas. Este resultado reafirma la importancia de una correcta identificación de las impurezas y de contar con sus estándares para poder realizar su calibración externa, de esa forma se podría mejorar la calidad del resultado obtenido.

<b>Valor de influencia</b>	<b>Incertidumbre estándar</b>	<b>Coefficiente de sensibilidad</b>	<b>Contribución</b>
<b>Área del compuesto principal</b>	307662	2,3635E-08	0,33%
<b>Factor de respuesta de las impurezas</b>	0,173205081	-0,72716479	99,49%
<b>Área de las impurezas</b>	96381646319	-1,71867E-08	0,18%

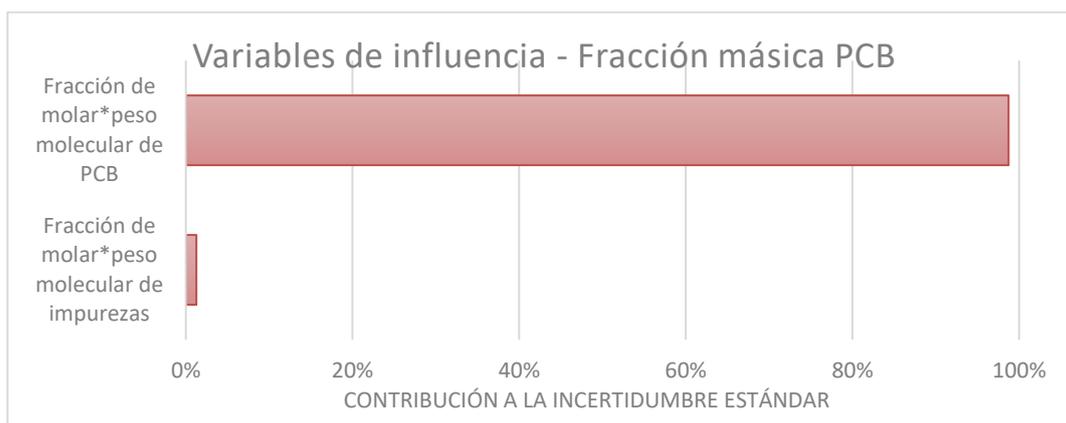
**Tabla 22** Componentes de la incertidumbre de asociada al cálculo de fracción molar de PCB junto a su contribución relativa a la incertidumbre total.



**Figura 27** Contribución a la incertidumbre estándar combinada de las variables de influencia al resultado final de fracción molar de PCB.

Valor de influencia	Incertidumbre estándar	Coefficiente de sensibilidad	Contribución
<b>Fracción de molar * peso molecular de PCB</b>	74*	0,001660781	98,74%
<b>Fracción de molar peso molecular de impurezas</b>	139,642	-0,001177	1,26%

**Tabla 23** Componentes de la incertidumbre de asociada al cálculo de fracción de masa de PCB junto a su contribución relativa a la incertidumbre total. \* La contribución de la incertidumbre de la fracción molar de PCB a esta incertidumbre es aproximadamente 100%.



**Figura 28** Contribución a la incertidumbre estándar combinada de las variables de influencia al resultado final de fracción de masa de PCB.

## 10.2.2 Contenido de agua y solventes orgánicos residuales

### 10.2.2.1 Karl Fischer

El resultado de fracción de masa de agua determinada según titulación coulombimétrica Karl Fischer se detalla en la Tabla 24.

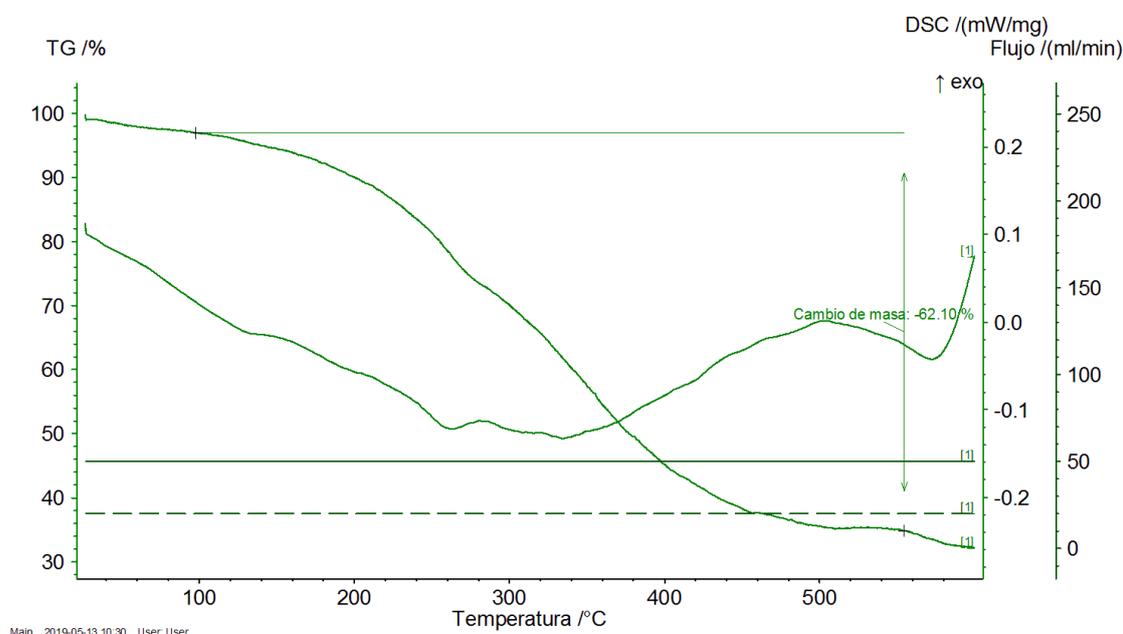
#### Contenido de agua de la muestra de estudio

Fracción de masa de agua (k=2)	(4,70 ± 1,40) %
--------------------------------	-----------------

**Tabla 24** Resultado de fracción de masa de agua de la muestra de estudio de PCB junto a su incertidumbre estándar (k=1).

### 10.2.2.2 Análisis termogravimétrico

El resultado del análisis termogravimétrico (Figura 29 ) mostró una pérdida de masa constante posterior a los 100 °C, sin presencia de mesetas, como producto de la degradación de la muestra. Esto impide la discriminación entre la pérdida de agua y otros compuestos volátiles, de la pérdida de la muestra de estudio por degradación, por lo que no fue posible realizar una determinación de la cantidad de componentes volátiles (agua y solventes orgánicos residuales) a través de este análisis.



**Figura 29** Termograma del análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido de la muestra problema de ficocianobilina.

No obstante, determinando la diferencia entre la pérdida total de masa desde temperatura ambiente, correspondiente a 66,51% (no mostrado en el gráfico) y desde una temperatura aproximada de

100 °C (62,10%), se obtiene una pérdida de masa de 4,41% de compuestos volátiles. Si bien este resultado no es definitivo, fue levemente inferior al valor de humedad obtenido por Karl Fischer ( $4,70 \pm 1,40$ ) % por lo cual es razonable proponer que la pérdida de masa de componentes volátiles se debió a principalmente al contenido de humedad y no de solventes orgánicos, los cuales no fueron estimados por otra técnica.

## 10.2.3 Impurezas inorgánicas

### 10.2.3.1 ICP-SFMS

En la Tabla 25 se presentan los resultados del análisis inorgánico de la muestra de estudio, todos los resultados tienen asociados una incertidumbre expandida relativa del 10%. Considerando la suma de todos los elementos cuantificados, se obtuvo un contenido de impurezas inorgánicas de 1,74% (fracción de masa porcentual), siendo los elementos presentes mayoritariamente fueron azufre, fósforo y sodio. La presencia de azufre en un nivel considerable apoya la hipótesis de la presencia de impurezas de PCB unidas con cisteína y potencialmente éste con otros aminoácidos. La presencia de fósforo y sodio puede explicarse por el uso de soluciones tampón (*buffer*) o reactivos con alto contenido de estos elementos durante la extracción de PCB a partir de Spirulina. Como valor de fracción de masa de impurezas inorgánicas se tomó el valor total (1,74% m/m) menos el contenido de azufre, el cual se entiende que ya se consideró dentro de las impurezas estructuralmente relacionadas.

Elemento	Fracción de masa porcentual	Elemento	Fracción de masa porcentual
Li	<0,00005%	Cu	0,0043%
Be	<0,00005%	Zn	0,0037%
B	<0,00020%	Ga	<0,00005%
Na	<b>0,242%</b>	As	<0,00005%
Mg	0,025%	Se	<0,00005%
Al	0,0020%	Rb	<0,00005%
P	<b>0,45%</b>	Sr	<0,00005%
S	<b>0,95%</b>	Y	<0,00005%
K	0,04%	Mo	<0,00005%
Ca	0,02%	Cd	<0,00005%
Sc	<0,00005%	In	<0,00005%
V	<0,00005%	Sb	<0,00005%
Cr	<0,00010%	Cs	<0,00005%
Mn	<0,00005%	Ba	<0,00005%
Fe	0,0024%	Pb	<0,00005%
Co	<0,00005%	Bi	<0,00005%
Ni	<0,00005%		

Tabla 25 Resultado del análisis de impurezas inorgánicas por ICP-SFMS.

### 10.2.3.2 Análisis termogravimétrico

Se cuantificó una pérdida de masa de 62,10%, que corresponde a la pérdida de masa de material orgánica sin presencia teórica de agua u otros compuestos volátiles. Considerando un contenido de agua cercano a 5% según los análisis de KF, este resultado indicó la presencia de residuos inorgánico cercano al 33% en masa, lo cual discrepa considerablemente del resultado de impurezas inorgánicas obtenidas mediante ICP-SFMS cercana al 2%. Se propone como explicación que las condiciones de análisis no permitieron una degradación completamente oxidativa, por lo que parte de este residuo que permanece sería orgánico en forma de carbono. Por lo tanto, esta estimación del contenido de residuo inorgánico no será considerado dentro del balance de masa.

## 10.3 Resonancia Magnética Nuclear

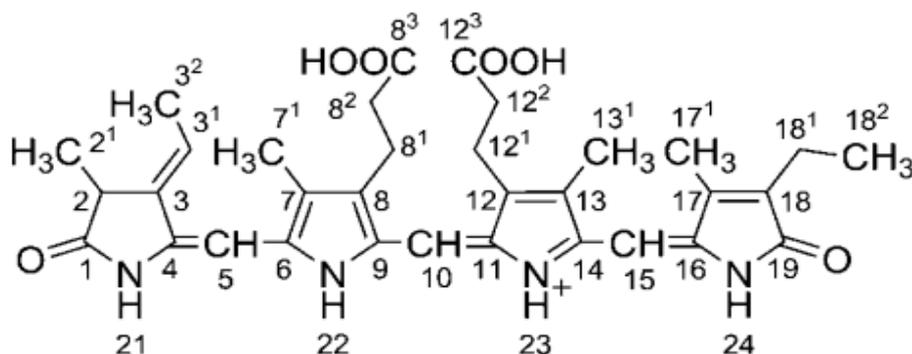
Previo a la cuantificación de pureza mediante resonancia magnética nuclear es de vital importancia el poder identificar las señales en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN que correspondan al compuesto principal y, en el mayor grado que sea posible, identificar las señales de las impurezas que potencialmente pudieran solaparse con esta. Para esto se debe recurrir a un análisis cualitativo completo de la muestra sin estándar interno.

A partir de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, COSY, HSQC y HMBC se propuso la asignación de señales del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN según se detalla en la Tabla 26, siguiendo la numeración establecida en la Figura 30. El análisis completo del espectro, junto con la justificación para la asignación, se encuentra en el apéndice (ver Apéndice A. 5 y A. 10). Esta asignación fue verificada contra la asignación propuesta por Röben & Schmieder (Röben & Schmieder, 2011) y Roda-Serrat *et al.* (Roda-Serrat *et al.*, 2018).

La conformación helicoidal de PCB en esta muestra en  $\text{MeOH-d}_4$  puede corroborarse por el hecho de que los protones del grupo metileno en la posición 18<sup>1</sup> se presentan como diasterotópicos. Según Knipp *et al.* (1998), esto es un producto de la cercanía en el espacio de los protones 18<sup>1</sup> con los protones del grupo metilo en la posición 2<sup>1</sup> debido a la forma de hélice que adopta la molécula, según comprobaron por experimentos *nuclear Overhauser effect* (NOE).

En la Tabla 27 se indica la asignación de señales propuesta para las impurezas potencialmente identificadas en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la muestra de estudio. Las señales marcadas con un asterisco denotan los correspondientes análogos de aquellas señales descritas en la Figura 30 pero para las impurezas. Se consideró que el mayor cambio de entorno químico que percibirían los núcleos de  $^1\text{H}$  de la molécula de PCB serían el generado por la pérdida del doble enlace entre el

carbono 3 y el carbono 3<sup>1</sup>. Por este motivo, se esperaba que la diferencia de desplazamiento químico entre las señales de PCB y sus análogos fuera similar para todas las impurezas, independiente de cuál de ellas fuera. Adicionalmente, la diferencia del entorno químico entre el PCB y sus impurezas sería percibida en mayor grado para los núcleos del anillo A y disminuiría a medida que se aleja de este.



**Figura 30** Estructura de ficocianobilina (PCB) y su numeración de acuerdo con nomenclatura IUPAC. Adaptado de Röben et al (2011). Los anillos se identifican como A (extremo izquierdo), B (centro izquierdo), C (centro derecho) y D (extremo derecho).

Señal	$\delta$ (ppm) <sup>1</sup> H	Integración	Naturaleza	Multiplicidad	Asignación
<b>A</b>	6,93	1	Principal	s	10
<b>D</b>	6,49	1	Principal	q	3 <sup>1</sup>
<b>G</b>	6,12	1	Principal	s	5
<b>H</b>	6,1	1	Principal	s	15
<b>Z</b>	3,18-3,10	1	Principal	m	2
<b>U1</b>	2,95	4	Principal	ddd	8 <sup>1</sup> y 12 <sup>1</sup>
<b>E1</b>	2,52	4	Principal	ddd	8 <sup>2</sup> y 12 <sup>2</sup>
<b>F1</b>	2,24	2	Principal	td	18 <sup>1</sup>
<b>H1</b>	2,16	1	Principal	s	7 <sup>1</sup>
<b>I1</b>	2,15	1	Principal	s	7 <sup>1</sup>
<b>D1</b>	2,13	1	Principal	s	17 <sup>1</sup>
<b>E1</b>	2,12	1	Principal	s	17 <sup>1</sup>
<b>A1</b>	2,06	2	Principal	s	13 <sup>1</sup> + imp.
<b>K1</b>	1,9	2	Principal	d	3 <sup>2</sup>
<b>O1</b>	1,29	5	Principal	s	2 <sup>1</sup> + imp.
<b>R1</b>	1,05	3	Principal	dd	18 <sup>2</sup>

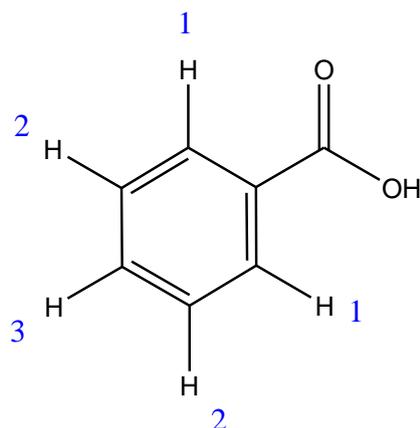
**Tabla 26** Asignación de señales propuesta para el espectro de <sup>1</sup>H del análisis cualitativo de la muestra de estudio.

Señal	$\delta$ (ppm) $^1\text{H}$	Naturaleza	Multiplicidad	Asignación
I	5,91	Principal	s	10*
J	5,67	Principal	s	5/15*
R	3,75	Impureza	dd	3 <sup>1*</sup> PCB-OEt
T	3,64	Principal	t	3 <sup>1*</sup> PCB-OMe
X	3,35	Principal	s	MeO-PCB
G	2,46	Impureza	s	3 <sup>1*</sup> PCB-C
P1	1,25	Impureza	d	3 <sup>2*</sup> PCB-OEt
Q	1,21	Impureza	d	3 <sup>2*</sup> PCB-C

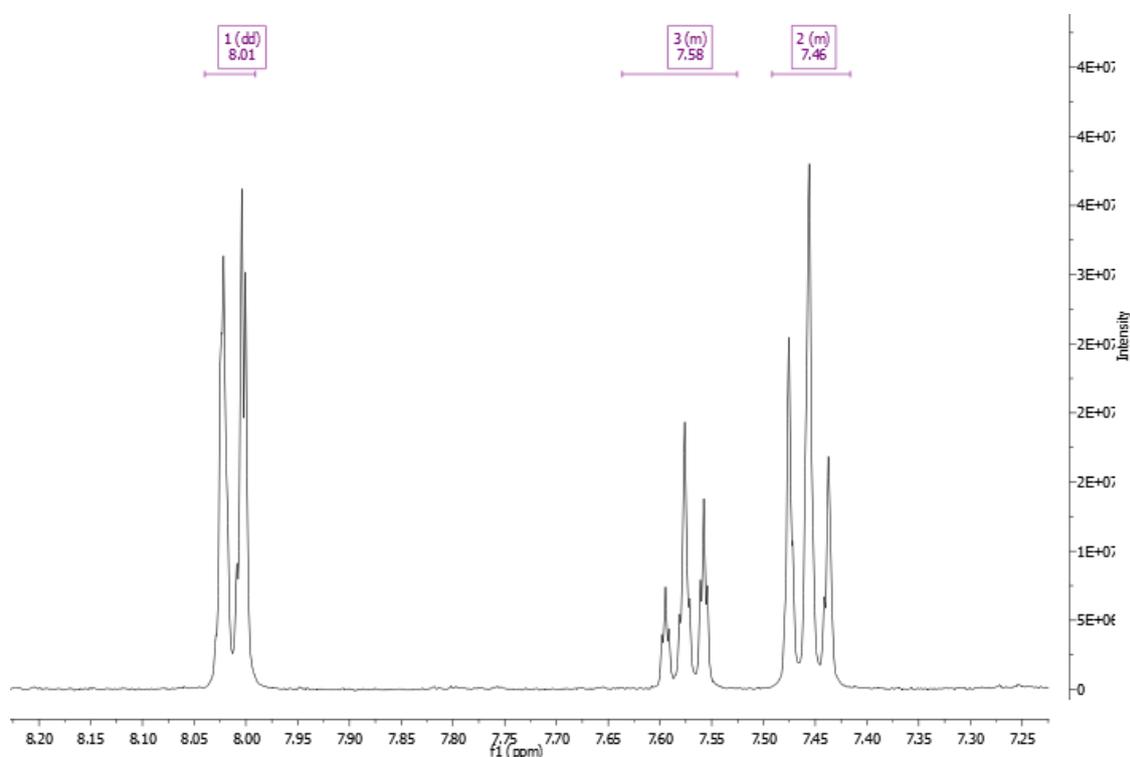
**Tabla 27** Asignación de señales propuesta para las impurezas identificadas en el espectro de  $^1\text{H}$  del análisis cualitativo de la muestra de estudio.

Según Beale y Cornejo (1991), los isómeros (3Z)-PCB y (3E)-PCB pueden diferenciarse fácilmente, ya que los desplazamientos químicos típicos para el protón vinílico de la posición 3<sup>1</sup> se encuentran cercanos a 5,9 ppm y 6,3 ppm respectivamente, más allá del solvente utilizado o si su grupos propiónicos se encuentran esterificados. Esta información permitió identificar en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN la señal del 3<sup>1</sup> en (3Z)-PCB, la cual presenta un desplazamiento químico de 5,96 ppm y un acoplamiento visible en el espectro de COSY a una señal a 2,06 ppm, que se espera sea el grupo metilo anexo 3<sup>2</sup>. Si bien no fue posible integrar la señal correspondiente a 3<sup>1</sup> para (3Z)-PCB dado que se solapa con la señal contigua a 5,91 ppm, fue posible determinar qué área era considerablemente baja.

Una vez realizada la identificación de las señales, se propuso como señal de cuantificación la señal D a 6,49 ppm correspondiente al hidrógeno vinílico en la posición 3<sup>1</sup>. Esta decisión se basó en que, de acuerdo con las impurezas potenciales buscadas, este hidrógeno estaría presente únicamente en el compuesto puro. Los resultados de pureza de PCB en la muestra de estudio en fracción de masa porcentual junto con su incertidumbre estándar se presentan en la Tabla 28. En esta tabla se detalla la señal de PCB utilizada para la cuantificación (ID) y el desplazamiento químico de los dos grupos de señales de SI utilizados para la cuantificación. La elección del estándar interno se justificó en que las señales correspondientes al ácido benzoico presentaban un mayor desplazamiento químico que todas las señales identificadas para PCB por ser parte de un sistema aromático o parte de un grupo carboxílico (no visible en el espectro). Esto se pudo corroborar al comparar el espectro  $^1\text{H}$ -RMN del análisis cualitativo, donde se analizó la muestra de estudio aislada, con el espectro  $^1\text{H}$ -RMN del análisis cuantitativo, para el cual se utilizó una mezcla de muestra de estudio y estándar interno. El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del ácido benzoico (Figura 32) contiene un grupo de señales entre 7 y 8 ppm que presenta un perfil característico de una molécula de benceno monosustituída, y se agrupa en tres señales distinguibles según se muestra en la Figura 31. En este caso, dado que las señales 2 y 3 se encontraban demasiado próximas se decidió integrar ambas señales como una sola.



**Figura 31** Ácido benzoico (N° CAS 65-85-0). La numeración se corresponde con los grupos de señales en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN.



**Figura 32** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de ácido benzoico. La identificación de las señales se corresponde con la numeración de la Figura 31.

ID	$\delta$ Señal PCB (ppm)	$\delta$ SI (ppm)	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
			P <sub>PCB</sub>	u P <sub>PCB</sub>	P <sub>PCB</sub>	u P <sub>PCB</sub>	P <sub>PCB</sub>	u P <sub>PCB</sub>
3 <sup>1</sup>	6.540 – 6.439	8.064 – 7.963	32,53%	0,29%	30,14%	0,27%	27,33%	0,24%
3 <sup>1</sup>	6.540 – 6.439	7.625 – 7.405	32,15%	0,29%	30,13%	0,27%	27,56%	0,25%

**Tabla 28** Cuantificación absoluta de PCB como fracción de masa porcentual en la muestra de estudio.

Se pudo observar según los resultados que éstos distan significativamente del valor de pureza obtenido por balance de masa. En función de que durante la preparación de muestra se observó un

residuo no disuelto en MeOH-d<sub>4</sub>, se propone como causa más probable de este corrimiento la disolución no proporcional de analito y el estándar interno. Si bien la cuantificación absoluta, y trazable al SI, no fue posible por los motivos anteriormente expuestos, la cuantificación relativa entre los componentes de la muestra de estudio de PCB aún se consideró válida bajo la suposición de que no ocurrió una discriminación en la disolución de las impurezas y PCB. En este sentido, se realizó una búsqueda de señales que pudieran representar la totalidad de la muestra de PCB, es decir que presentaran el mismo desplazamiento químico tanto en PCB como en las impurezas. Dentro de las posibles señales para este fin, se seleccionaron las correspondientes a 8<sup>1</sup>/12<sup>1</sup> y 18<sup>2</sup>, descartándose otras señales potencialmente útiles como 8<sup>2</sup>/12<sup>2</sup>, 13<sup>1</sup>, 17<sup>1</sup>, 7<sup>1</sup> y 18<sup>1</sup> por solapamiento de diferentes señales o problemas en la integración. De esta manera, se estimó la fracción de masa de PCB en la muestra sin corregir por contenido de agua ni impurezas inorgánicas, es decir la fracción de masa de PCB que únicamente considera las impurezas estructuralmente relacionadas. Evaluando los resultados presentados en la Tabla 29 fue posible observar un grado razonable de coherencia entre estos resultados y los presentados en la Tabla 21 (71%), aunque los primeros son levemente inferiores. Si bien esto parece indicar que el método utilizado para la determinación de impurezas estructuralmente relacionadas, HPLC-DAD, cubrió la mayoría de estas, este método pudo verse afectado por el grado de desconocimiento de las impurezas presentes. De todas formas, este valor está ampliamente contemplado en la incertidumbre estándar informada para el valor de fracción de masa de PCB. La diferencia entre los resultados obtenidos para las señales estudiadas (8<sup>1</sup>/12<sup>1</sup> y 18<sup>2</sup>) posiblemente se debió a problemas de integración, por tratarse de señales en un rango de alta población.

ID	$\delta$ Señal PCB (ppm)	$\delta$ SI (ppm)	Fracción de masa total*		Fracción de masa PCB*
			W total	U W total	W PCB
8 <sup>1</sup> /12 <sup>1</sup>	2.990 – 2.890	8.064 – 7.963	0,487	0,0043	66,8%
18 <sup>2</sup>	1.094 – 0.994	8.064 – 7.963	0,469	0,0042	69,4%

**Tabla 29** Calculo de fracción de masa de PCB por método relativo, equivalente a una fracción de masa de PCB corregida por impurezas estructuralmente relacionadas (\*\*). \* Refiere a la fracción de masa de PCB y las impurezas estructuralmente relacionadas.

## 10.4 Calorimetría diferencial de barrido

Es posible visualizar en el termograma de la Figura 29 que la muestra de ficocianobilina atraviesa dos procesos endotérmicos, el primero ocurre en el rango de temperaturas desde ambiental hasta 500 °C y el segundo desde 500°C hasta 600 °C. A partir de esto se entiende que el sólido no transcurrió un proceso de fusión, sino que probablemente sufrió degradación en dos etapas. Esto imposibilita la determinación de pureza del compuesto por esta técnica. Como potencial solución a

este problema se puede verificar que la cápsula donde se contiene la muestra se purgue y cierre bajo una atmósfera inerte, tal como se propone en la norma ASTM E928-08, pero se entendió que esto no generaría una diferencia significativa dada la alta inestabilidad de esta molécula. De todas formas, la pureza estimada de esta muestra es considerablemente inferior al valor límite indicado por dicha norma, por debajo del cual los resultados de pureza por DSC son mejor confiables.

## 10.5 Análisis elemental

Los resultados de análisis elemental de la muestra de estudio de ficocianobilina se presentan en la Tabla 30. Los resultados son expresados en base seca corrigiendo la masa por el valor de humedad obtenido en el análisis de KF de la sección 10.2.2.1. Tomando como base la composición elemental de la ficocianobilina y su peso molecular, se calcula el contenido elemental porcentual teórico. Los resultados muestran una discrepancia entre los valores experimentales y teóricos, especialmente inesperadas para nitrógeno y azufre. Esta evidencia proporciona sustento a la hipótesis de la presencia de impurezas de PCB derivadas del aminoácido cisteína, como ser PCB-C. Al mismo momento, el corrimiento con el contenido elemental teórico no es lo suficientemente grande como para sustentar la suposición de que había 33% de impurezas inorgánicas en la muestra de estudio.

Contenido elemental				
Elemento	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)
Experimental	62,7	6,7	10,5	0,3*
Teórico	67,6	6,5	9,5	0,0
Diferencia	-4,9	0,2	1,0	0,3
Composición elemental	$C_{33}H_{38}N_4O_6$			
Peso molecular	$(586,677 \pm 0,019) \text{ g mol}^{-1} (k=1)$			

**Tabla 30** Análisis elemental de la muestra de estudio de ficocianobilina. \*El límite de cuantificación declarado para el análisis de azufre es de 0,01 %.

## 10.6 Pureza global

En la Tabla 31 se exhibe la cuantificación de cada clase de impureza y el cálculo del balance total de impurezas.

Contribución	Valor	Incertidumbre estándar (k=1)	Técnica
Fracción de masa de (3E)-PCB (sin considerar impurezas estructuralmente relacionadas)	71%	12%	HPLC-DAD
Agua y solventes orgánicos residuales	4,70%	0,70%	Karl Fischer con confirmación por TGA
No volátiles (inorgánicas)	0,79%	0,11%	ICP-SFMS con confirmación por AE
<b>Balance</b>	<b>66,96%</b>	<b>12%</b>	<b>Balance de masa (Ec. 6)</b>
<b>Fracción de masa de (3E)-PCB</b>		<b>(67 ± 23) % m/m, k=2</b>	

**Tabla 31** Resumen de cuantificación de impurezas por balance de masa expresados como fracción de masa porcentual.

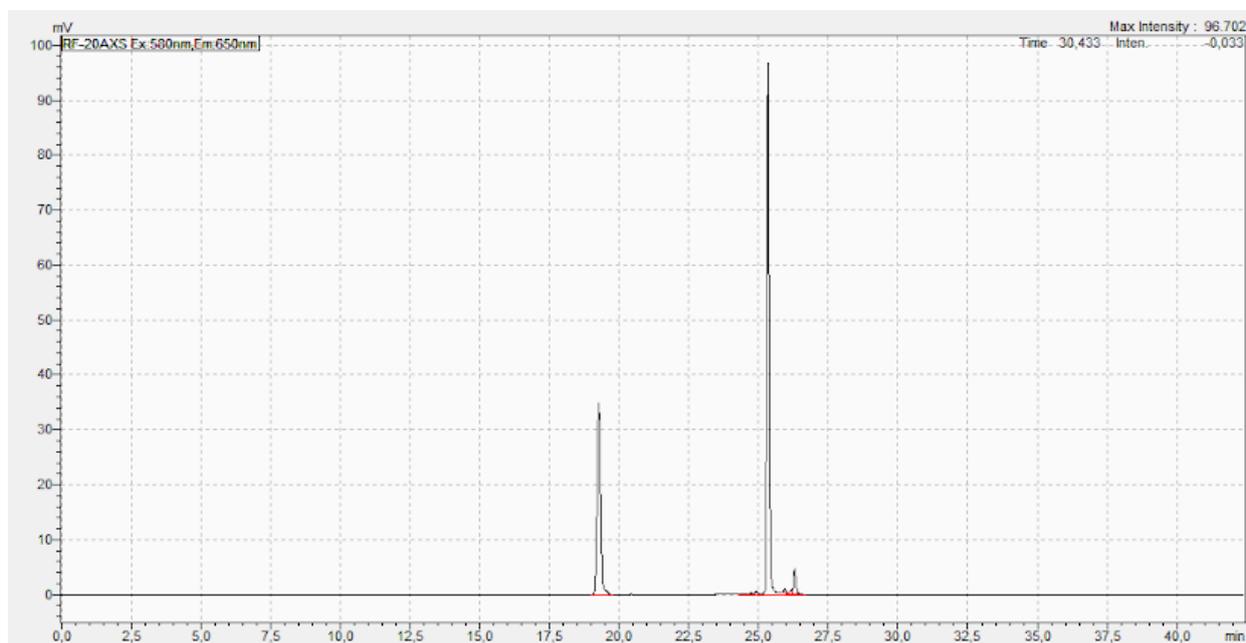
## 10.7 Aplicabilidad al uso del resultado de pureza

Es necesario hacer una evaluación de la aplicabilidad del material purificado para la elaboración del estándar y eso requiere prestar atención a dos parámetros: la identidad de las impurezas presentes y el grado de pureza del estándar. En lo que refiere a la naturaleza de las impurezas, es posible que estas sean estructuralmente relacionadas, que no lo sean o que se tenga una mezcla de ambos. El primer caso puede ser ventajoso si el uso que se le va a dar al estándar implica un análisis donde la respuesta instrumental es indistinta para el analito principal o las impurezas. En ese caso es posible agrupar las impurezas de este tipo y expresar la cantidad total del grupo como “cantidad equivalente al analito” como sería el caso de una mezcla de (3E)-PCB y (3Z)-PCB. Usualmente esta estrategia no es de utilidad para un análisis de alta exactitud. En el segundo caso, podemos tener impurezas que presentan una señal completamente discriminable o “silenciosa” para el sistema de detección, lo que facilita su omisión. Este es usualmente el caso para el contenido de humedad en la muestra. Existe un tercer escenario poco favorable donde las impurezas presentes, ya sean estructuralmente similares o no, interfieren con la detección del analito de interés. Este problema puede amortiguarse si la presencia de estas interferencias es de muy bajo contenido. En cualquier escenario, esto deberá contemplarse al declarar el uso previsto de este material.

Para realizar esta evaluación se analiza el resultado del análisis por HPLC-FLD de la muestra de estudio para evaluar la respuesta del analito a un sistema de detección análogo al detector utilizado en los sensores que se desea calibrar. Es posible ver en la Figura 33 que más allá de la extensa lista de impurezas detectadas en el análisis de HPLC-DAD, sólo dos señales exhiben comportamiento similar al componente principal en cuanto a su fluorescencia. Estos componentes presentarían una

señal detectable en el sensor a calibrar que serían potencialmente considerables como una interferencia. Como alternativa, con la correcta identificación de estos componentes, se podría cuantificar estas impurezas y agregar a la pureza total, considerándolas parte del componente principal. Dado el orden de elución de estas impurezas, se propone que la señal previa a la mayoritaria – (3E)-PCB – sea PCB-OMe y la señal posterior sea (3Z)-PCB.

Para confirmar la hipótesis de que este material pueda ser utilizado para calibrar el sensor sería preciso confirmar la identidad de estas impurezas, posiblemente mediante el análisis de la muestra de estudio por un equipo de cromatografía líquida acoplada con detectores de DAD, FLD y MS/MS o HRMS en línea, para realizar su identificación inequívoca. Otras alternativas podrían ser la obtención de un estándar de estas impurezas, no disponibles comercialmente pero potencialmente purificables a partir de la muestra con una posterior caracterización por RMN, con los cuales se podría confirmar la identidad de estas impurezas y realizar su cuantificación por calibración externa. Como otra alternativa, se podría buscar una purificación más profunda de esta muestra para eliminar la presencia de estas impurezas. De todas las alternativas propuestas, la primera parece ser la de menor costo y riesgo asociado, siempre y cuando se cuente con la disponibilidad de equipamiento para este análisis.



**Figura 33** Cromatograma obtenido tras el análisis de la muestra de estudio de PCB en un HPLC-FLD.

## Capítulo 11. Conclusiones parciales

Se cumplió con el objetivo de desarrollar una estrategia para la determinación de pureza de ficocianobilina de una muestra de estudio obtenida comercialmente, basado en un balance de masas y RMN. La principal fuente de impurezas fue aquellas estructuralmente relacionadas a PCB, las cuales sumaron cerca de 30% de la masa de la muestra. La estimación de la cantidad presente de estas impurezas fue realizada de acuerdo con su respuesta relativa, generándose una incertidumbre asociada considerablemente grande por la falta de estándares para estas impurezas. Mas allá de esto, este trabajo estudió la aplicación de la estrategia de balance de masa a una muestra de alta complejidad y cuáles fueron los principales obstáculos, lo cual no ha sido reportado hasta la fecha.

La pureza determinada de este extracto demostró no ser adecuada al propósito de calibración de sensores debido a que se presentan impurezas que interferirían en la detección. Adicionalmente, el grado de incertidumbre asociado al valor de pureza es demasiado elevado para ser considerado un patrón químico. Por este motivo, no se procedió con el estudio de factibilidad del uso de esta muestra como patrón de calibración de los sensores para la determinación de ficocianina en medios acuáticos. No obstante, la estrategia de trabajo desarrollada podrá utilizarse para estudiar otras muestras purificadas de ficocianobilina y evaluar la factibilidad de su uso en la calibración del sensor.

## Capítulo 12. Conclusiones globales

Se desarrollaron dos herramientas de alta relevancia para la implementación de la trazabilidad de las mediciones químicas en el ámbito de la química orgánica en nuestro país. En el primer caso, se implementó un método primario optimizado basado en dilución isotópica con un equipo de cromatografía gaseosa acoplada con espectrometría de masas aplicado a la asignación de valor de creatinina en muestras de suero humano, con potencial aplicación en ensayos de aptitud a nivel nacional. Por otro lado, se desarrolló una estrategia para la determinación de la pureza de una muestra de ficocianobilina que podría ser utilizada en la calibración de sensores de monitoreo cianobacterias en cursos acuáticos. Esta estrategia metodológica, que reúne métodos analíticos obtenidos en una red de laboratorios nacionales, podrá ser testeada a otros compuestos orgánicos con el objetivo de desarrollar otros patrones primarios para los cuales se necesite implementar la trazabilidad de las mediciones a nivel nacional.

## Capítulo 13. Perspectivas a futuro

En lo que concierne a la parte A, se propone como trabajo futuro el completar la validación del método optimizado, así como su comparación con otros métodos como LC-MS o CE-DAD, métodos para los cuales la separación con creatina y la derivatización no son necesarias.

En cuanto a la parte B, se propone la purificación adicional de la muestra de estudio para su reevaluación como potencial estándar. Esta muestra podría ser sometida a análisis adicionales para la caracterización de las impurezas a cuantificar, como sería el análisis por cromatografía líquida acoplada a detectores de espectrometría de masas tándem y arreglo de diodos en serie. En caso de que esta nueva muestra fuera caracterizable, se podría realizar una optimización más profunda y una evaluación de las cifras de mérito de cada método dentro del balance de masa, así como la determinación del RMN. Adicionalmente, esta estrategia validada podría ser aplicada a otras muestras purificadas, para las cuales se precise un patrón químico de relevancia nacional.

## Referencias bibliográficas

- Alonso, J., & Gonzalez, P. (2013). *Isotope Dilution Mass Spectrometry*. The Royal Society of Chemistry.
- ASTM International. (2008). *Standard Test Method for Determination of Purity by Differential Scanning Calorimetry* (Norma ASTM E928-08; E37 Committee). ASTM International. <https://doi.org/10.1520/E0928-08>
- Beale, S., & Cornejo, J. (1991). Biosynthesis of phycobilins. 3(Z)-phycoerythrobilin and 3(Z)-phycoyanobilin are intermediates in the formation of 3(E)-phycoyanobilin from biliverdin IX alpha. *Journal of Biological Chemistry*, 266(33), 22333-22340.
- Bertone, E., Chuang, A., Burford, M. A., & Hamilton, D. P. (2019). In-situ fluorescence monitoring of cyanobacteria: Laboratory-based quantification of species-specific measurement accuracy. *Harmful Algae*, 87, 101625. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101625>
- Beuhler, R. J., Pierce, R. C., Friedman, L., & Siegelman, H. W. (1976). Cleavage of phycocyanobilin from C-phycocyanin. Separation and mass spectral identification of the products. *Journal of Biological Chemistry*, 251(8), 2405-2411.
- Bonilla, S., Haakonsson, S., Somma, A., Gravier, A., Britos, A., Vidal, L., León, L. D., Brena, B., Pérez, M., Piccini, C., Escalera, G. M. de la, Chalar, G., González-Piana, M., Martigani, F., & Aubriot, L. (2015). Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. *INNOTEC*, 10 ene-dic, 9-22.
- Brient, L., Lengronne, M., Bertrand, E., Rolland, D., Sipel, A., Steinmann, D., Baudin, I., Legeas, M., Le Rouzic, B., & Bormans, M. (2008). A phycocyanin probe as a tool for monitoring cyanobacteria in freshwater bodies. *Journal of Environmental Monitoring*, 10(2), 248-255. <https://doi.org/10.1039/B714238B>
- Bureau International des Poids et Mesures. (2018). *Compendium of main rules and practices applicable to the BIPM* (p. 35). BIPM. <https://www.bipm.org/utils/common/documents/official/compendium.pdf>

- Cardinael, P., Casabianca, H., Peulon-Agasse, V., & Berthod, A. (2015). Sample Derivatization in Separation Science. En V. Pino, J. L. Anderson, A. Berthod, & A. M. Stalcup (Eds.), *Analytical Separation Science* (pp. 063-063). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527678129.assep063>
- Centro Español de Metrología. (2012). *Vocabulario Internacional de Metrología: Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados*. JCGM.
- ChemicalBook. (2017). *Phycocyanobilin* / 20298-86-6. [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB21380404.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB21380404.htm)
- ChemSpider. (2020a). *BSTFA* / *C8H18F3NOSi2* / ChemSpider. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4518443.html>
- ChemSpider. (2020b). *Creatine* / *C4H9N3O2* / ChemSpider. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.566.html>
- ChemSpider. (2020c). *Creatinine* / *C4H7N3O* / ChemSpider [Creatinine | *C4H7N3O* | ChemSpider]. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.568.html>
- ChemSpider. (2020d). *MSTFA* / *C6H12F3NOSi* / ChemSpider. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.30134.html>
- Chorus, I., & Bartram, J. (Eds.). (1999). *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring, and management*. E & FN Spon.
- Costa Ferreira, S. L. (2015). *Introdução às técnicas de planejamento de experimentos*. Vento Leste.
- CpcA - C-phycocyanin alpha chain—Arthrospira platensis—CpcA gene & protein*. (s. f.). Recuperado 16 de noviembre de 2019, de <https://www.uniprot.org/uniprot/P72509>
- CpcB - C-phycocyanin beta chain—Arthrospira platensis—CpcB gene & protein*. (s. f.). Recuperado 23 de febrero de 2020, de <https://www.uniprot.org/uniprot/P72508>
- Crespi, H. L., Smith, Ursula., & Katz, J. J. (1968). Phycocyanobilin. Structure and exchange studies by nuclear magnetic resonance and its mode of attachment in phycocyanin. A model for phytochrome. *Biochemistry*, 7(6), 2232-2242. <https://doi.org/10.1021/bi00846a028>

- Czichos, H., Saito, T., & Smith, L. R. (Eds.). (2006). *Springer handbook of materials measurement methods*. Springer.
- Davies, S. R., Alamgir, M., Chan, B. K. H., Dang, T., Jones, K., Krishnaswami, M., Luo, Y., Mitchell, P. S. R., Moawad, M., Swan, H., & Tarrant, G. J. (2015). The development of an efficient mass balance approach for the purity assignment of organic calibration standards. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(26), 7983-7993. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8971-0>
- Davies, S. R., Jones, K., Goldys, A., Alamgir, M., Chan, B. K. H., Elgindy, C., Mitchell, P. S. R., Tarrant, G. J., Krishnaswami, M. R., Luo, Y., Moawad, M., Lawes, D., & Hook, J. M. (2015). Purity assessment of organic calibration standards using a combination of quantitative NMR and mass balance. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(11), 3103-3113. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7893-6>
- De Bièvre, P., & Peiser, H. S. (1997). Basic equations and uncertainties in isotope-dilution mass spectrometry for traceability to SI of values obtained by this primary method. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 359(7-8), 523-525. <https://doi.org/10.1007/s002160050625>
- Duewer, D. L., Duewer, D. L., Parris, R. M., White, E. V., May, W. E., & Elbaum, H. (2004). *An approach to the metrologically sound traceable assessment of the chemical purity of organic reference materials* (NIST SP 1012; p. NIST SP 1012). National Institute of Standards and Technology. <https://doi.org/10.6028/NIST.SP.1012>
- Fadeeva, V. P., Tikhova, V. D., & Nikulicheva, O. N. (2008). Elemental analysis of organic compounds with the use of automated CHNS analyzers. *Journal of Analytical Chemistry*, 63(11), 1094-1106. <https://doi.org/10.1134/S1061934808110142>
- Falk, H., Müller, N., & Wansch, S. (1985). Zur Chemie der Pyrrolpigmente, 63. Mitt. *Monatshefte für Chemie*, 116, 1087-1097.

- Fernández-Fernández, M., González-Antuña, A., Rodríguez-González, P., Álvarez, M. E. A., Álvarez, F. V., & Ignacio García Alonso, J. (2014). Development of an isotope dilution GC–MS procedure for the routine determination of creatinine in complex serum samples. *Clinica Chimica Acta*, *431*, 96-102. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.01.011>
- Fernández-Fernández, M., Rodríguez-González, P., Añón Álvarez, M. E., Rodríguez, F., Menéndez, F. V. Á., & Alonso, J. I. G. (2015). Simultaneous Determination of Creatinine and Creatine in Human Serum by Double-Spike Isotope Dilution Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) and Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS). *Analytical Chemistry*, *87*(7), 3755-3763. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00769>
- Ferrero, C. A., Carobene, A., Ceriotti, F., Modenese, A., & Arcelloni, C. (1995). Behavior of frozen serum pools and lyophilized sera in an external quality-assessment scheme. *Clinical Chemistry*, *41*(4), 575-580. <https://doi.org/10.1093/clinchem/41.4.575>
- Franzini, C., & Ceriotti, F. (1998). Impact of reference materials on accuracy in clinical chemistry. *Clinical Biochemistry*, *31*(6), 449-457. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(98\)00054-X](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(98)00054-X)
- Glazer, A. N. (1976). Phycocyanins: Structure and Function. En K. C. Smith (Ed.), *Photochemical and Photobiological Reviews* (pp. 71-115). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2574-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2574-1_2)
- Glazer, A. N. (1988). [31] Phycobiliproteins. En *Methods in Enzymology* (Vol. 167, pp. 291-303). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)67034-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)67034-0)
- Göller, A. H., Strehlow, D., & Hermann, G. (2001). *Conformational Flexibility of Phycocyanobilin: An AM1 Semiempirical Study*. 7.
- Gottlieb, H. E., Kotlyar, V., & Nudelman, A. (1997). NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *The Journal of Organic Chemistry*, *62*(21), 7512-7515. <https://doi.org/10.1021/jo971176v>

- Hasselbarth, W. (1996). Primary reference materials for chemical composition analysis – Proposal for an operational definition. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 354(3), 263-265. <https://doi.org/10.1007/s0021663540263>
- hEocha, C. Ó. (1963). Spectral Properties of the Phycobilins. I. Phycocyanobilin \*. *Biochemistry*, 2(2), 375-382. <https://doi.org/10.1021/bi00902a034>
- Hughes, J. (2010). Phytochrome three-dimensional structures and functions. *Biochemical Society Transactions*, 38(2), 710-716. <https://doi.org/10.1042/BST0380710>
- International Organization for Standardization. (1996). *Linear calibration using reference materials* (N.º 11095). International Organization for Standardization.
- International Organization for Standardization. (2003). *In vitro diagnostic medical devices—Measurement of quantities in biological samples—Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials* (N.º 17511). International Organization for Standardization.
- International Organization for Standardization. (2016). *General requirements for the competence of reference material producers* (N.º 17034). International Organization for Standardization.
- Ishikawa, K., Hanari, N., Shimizu, Y., Ihara, T., Nomura, A., Numata, M., Yarita, T., Kato, K., & Chiba, K. (2011). Mass balance method for purity assay of phthalic acid esters: Development of primary reference materials as traceability sources in the Japan Calibration Service System. *Accreditation and Quality Assurance*, 16(6), 311-322. <https://doi.org/10.1007/s00769-011-0767-0>
- IUPAC. (1991). Chemical Sensors: Definitions and Classification. *Pure and Applied Chemistry*, 63(9), 1247-1250.
- Joint Committee for Guides in Metrology. (2008a). *Evaluation of measurement data—Guide to the expression of uncertainty in measurement*. International Bureau of Weights and Measures (BIPM). [www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html](http://www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html)

- Joint Committee for Guides in Metrology. (2008b). *Evaluation of measurement data—Supplement 1 to the “Guide to the expression of uncertainty in measurement”—Propagation of distributions using a Monte Carlo method*. [www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html](http://www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html)
- Kessler, A. (2016). Mass spectrometry – a key technique for traceability in clinical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *84*, 74-79. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.017>
- King, B. (2005). The practical realization of the traceability of chemical measurements standards. En Paul De Bièvre & H. Günzler (Eds.), *Traceability in Chemical Measurement* (pp. 85-92). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/3-540-27093-0\\_13](https://doi.org/10.1007/3-540-27093-0_13)
- Knipp, B., Müller, M., Metzler-Nolte, N., Balaban, T. S., Braslavsky, S. E., & Schaffner, K. (1998). NMR Verification of Helical Conformations of Phycocyanobilin in Organic Solvents. *Helvetica Chimica Acta*, *81*(5-8), 881-888. <https://doi.org/10.1002/hlca.19980810509>
- Kruk, C., Martínez, A., Escalera, G. M. de la, Trinchin, R., Manta, G., Segura, Á. M., Piccini, C., Brena, B., Fabiano, G., Pérez, M., Gabito, L., Alcántara, I., & Yannicelli, B. (2019). Floración excepcional de cianobacterias tóxicas en la costa de Uruguay, verano 2019. *INNOTEC*, *18 jul-dic*, 36-68. <https://doi.org/10.26461/18.06>
- Lafarge, T., & Possolo, A. (2018). *NIST Uncertainty Machine* (Versión 1.4.1) [Computer software]. NIST. <https://uncertainty.nist.gov/>
- Llopiz, A., Millán, A., & Díaz Domínguez, G. (2016). Purificación y caracterización de la ficocianobilina. *Bionatura*, *1*(4). <https://doi.org/10.21931/RB/2016.01.04.8>
- Meija, J. (2016). *IUPAC Molecular Weight Calculator* (Versión BETA release v.0.7, May 2019) [Computer software]. [www.ciaaw.shinyapps.io/calculator](http://www.ciaaw.shinyapps.io/calculator)
- Míguez, D. (2016). Tecnologías de control de floraciones de cianobacterias y algas nocivas en cuerpos de agua, con énfasis en el uso de irradiación por ultrasonido. *INNOTEC*, *12 ago-dic*, 54-61.

- Milton, M. J. T., & Quinn, T. J. (2001). Primary methods for the measurement of amount of substance. *Metrologia*, 38(4), 289-296. <https://doi.org/10.1088/0026-1394/38/4/1>
- Müller, M. M. (2005). Traceability in laboratory medicine. En Paul De Bièvre & H. Günzler (Eds.), *Traceability in Chemical Measurement* (pp. 128-133). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/3-540-27093-0\\_22](https://doi.org/10.1007/3-540-27093-0_22)
- Myers, G. L. (2006). Recommendations for Improving Serum Creatinine Measurement: A Report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. *Clinical Chemistry*, 52(1), 5-18. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.0525144>
- Nair, D., Krishna, J. G., Panikkar, M. V. N., Nair, B. G., Pai, J. G., & Nair, S. S. (2018). Identification, purification, biochemical and mass spectrometric characterization of novel phycobiliproteins from a marine red alga, *Centroceras clavulatum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 679-691. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.153>
- Nelson, M. A., Waters, J. F., Toman, B., Lang, B. E., Rück, A., Breitruck, K., Obkircher, M., Windust, A., & Lippa, K. A. (2018). A New Realization of SI for Organic Chemical Measurement: NIST PS1 Primary Standard for Quantitative NMR (Benzoic Acid). *Analytical Chemistry*, 90(17), 10510-10517. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02575>
- Nelson, Michael A., Bedner, M., Lang, B. E., Toman, B., & Lippa, K. A. (2015). Metrological approaches to organic chemical purity: Primary reference materials for vitamin D metabolites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(28), 8557-8569. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9013-7>
- NSW Department of Primary Industries. (2012). *Evaluation of a YSI fluorometer to determine cyanobacterial presence in the Murray and Lower Darling Rivers*. 73.

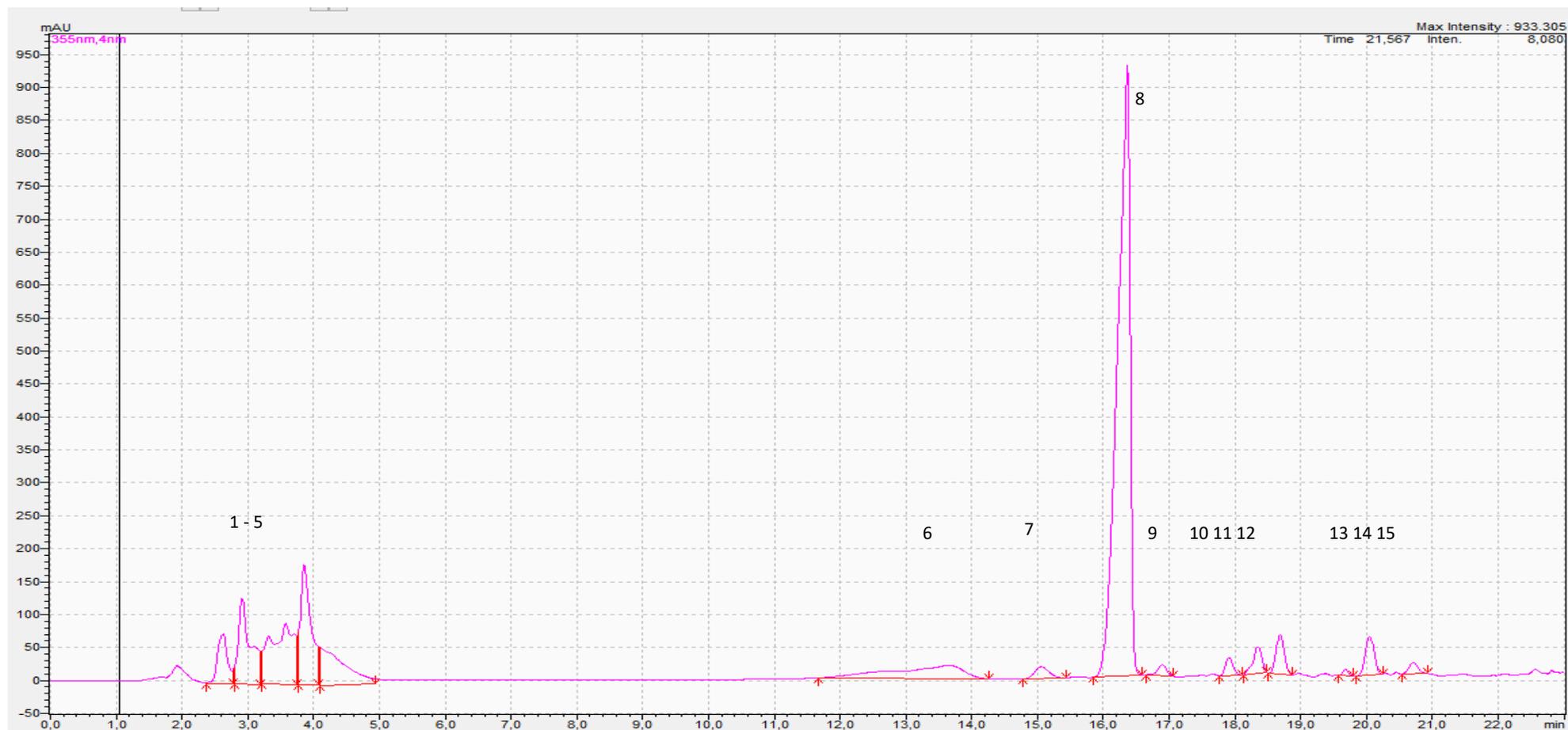
- Orata, F. (2012). Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. En M. Ali Mohd (Ed.), *Advanced Gas Chromatography—Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/33098>
- Pagels, F., Guedes, A. C., Amaro, H. M., Kijjoa, A., & Vasconcelos, V. (2019). Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 37(3), 422-443. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.010>
- Poole, C. F. (2013). Alkylsilyl derivatives for gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1296, 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.097>
- Prohaska, T., Irrgeher, J., Zitek, A., & Jakubowski, N. (2015). *Sector Field Mass Spectrometry for Elemental and Isotopic Analysis* (p. 615). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781849735407>
- Reichardt, C., & Welton, T. (2011). *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. John Wiley & Sons.
- Richter, W. (1997). Primary methods of measurement in chemical analysis. *Accreditation and Quality Assurance*, 2(8), 354-359. <https://doi.org/10.1007/s007690050165>
- Richter, W. (2000). How to achieve international comparability for chemical measurements. *Accreditation and Quality Assurance*, 5(10), 418-422. <https://doi.org/10.1007/PL00013508>
- Röben, M., & Schmieder, P. (2011). Assignment of phycocyanobilin in HMPT using triple resonance experiments. *Magnetic Resonance in Chemistry*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/mrc.2776>
- Rockwell, N. C., & Lagarias, J. C. (2010). A Brief History of Phytochromes. *ChemPhysChem*, 11(6), 1172-1180. <https://doi.org/10.1002/cphc.200900894>
- Roda-Serrat, M. C., Christensen, K. V., El-Houri, R. B., Fretté, X., & Christensen, L. P. (2018). Fast cleavage of phycocyanobilin from phycocyanin for use in food colouring. *Food Chemistry*, 240, 655-661. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.149>

- Santa Cruz Biotechnology. (s. f.). *Creatinine-d3* | CAS 143827-20-7 | SCBT - Santa Cruz Biotechnology. Recuperado 8 de abril de 2020, de <https://www.scbt.com/p/creatinine-d3-143827-20-7>
- Siekman, L. (1985). Determination of Creatinine in Human Serum by Isotope Dilution-Mass Spectrometry. Definitive Methods in Clinical Chemistry, IV. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 23(3). <https://doi.org/10.1515/cclm.1985.23.3.137>
- Silva, A. I., Almirón, F., Ferreira, E., & Pistón, M. (2019). Optimización de un método primario para la determinación de creatinina en suero humano mediante GC-IDMS. *INNOTECH*, 17 ene-jun, 102-116. <https://doi.org/10.26461/17.06>
- Squires, A. H., & Moerner, W. E. (2017). Direct single-molecule measurements of phycocyanobilin photophysics in monomeric C-phycocyanin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(37), 9779-9784. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705435114>
- Staveley, L. A. K. (1971). *The Characterization of Chemical Purity*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-11774-6>
- Thienpont, L. M., Van Uytendaele, K., & De Leenheer, A. P. (2002). Reference measurement systems in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 323(1-2), 73-87. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(02\)00188-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(02)00188-2)
- Thompson, M., & Ellison, S. L. R. (2005). A review of interference effects and their correction in chemical analysis with special reference to uncertainty. *Accreditation and Quality Assurance*, 10(3), 82-97. <https://doi.org/10.1007/s00769-004-0871-5>
- Tomita, M., & Nishioka, T. (Eds.). (2005). *Metabolomics: The Frontier of Systems Biology*. Springer Japan. <https://doi.org/10.1007/4-431-28055-3>
- Ulijasz, A. T., Cornilescu, G., von Stetten, D., Cornilescu, C., Velazquez Escobar, F., Zhang, J., Stankey, R. J., Rivera, M., Hildebrandt, P., & Vierstra, R. D. (2009). Cyanochromes Are Blue/Green Light Photoreversible Photoreceptors Defined by a Stable Double Cysteine

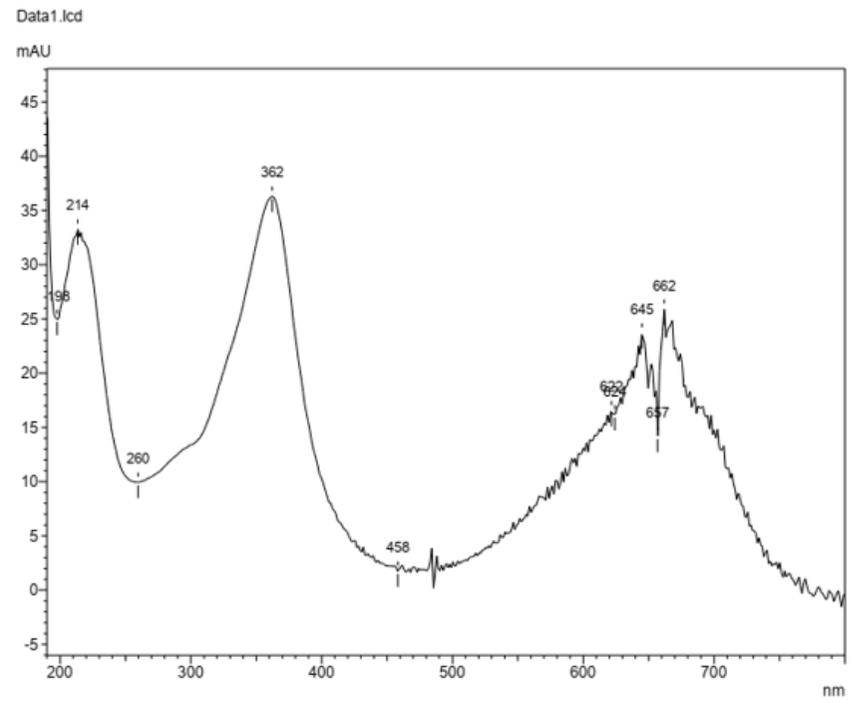
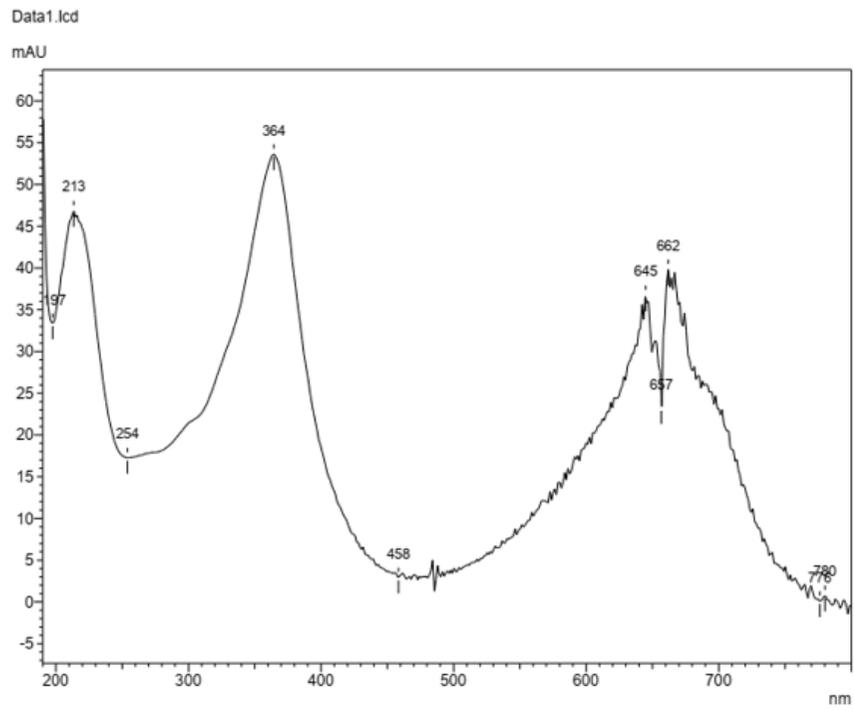
- Linkage to a Phycoviolobin-type Chromophore. *Journal of Biological Chemistry*, 284(43), 29757-29772. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.038513>
- Ulijasz, A. T., & Vierstra, R. D. (2011). Phytochrome structure and photochemistry: Recent advances toward a complete molecular picture. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(5), 498-506. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.06.002>
- Watermann, T., Elgabarty, H., & Sebastiani, D. (2014). Phycocyanobilin in solution – a solvent triggered molecular switch. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16(13), 6146-6152. <https://doi.org/10.1039/C3CP54307B>
- Westwood, S., Choteau, T., Daireaux, A., Josephs, R. D., & Wielgosz, R. I. (2013). Mass Balance Method for the SI Value Assignment of the Purity of Organic Compounds. *Analytical Chemistry*, 85(6), 3118-3126. <https://doi.org/10.1021/ac303329k>
- Westwood, S., Yamazaki, T., Huang, T., Garrido, B., Ün, I., Zhang, W., Martos, G., Stoppacher, N., Saito, T., & Wielgosz, R. (2019). Development and validation of a suite of standards for the purity assignment of organic compounds by quantitative NMR spectroscopy. *Metrologia*, 56(6), 064001. <https://doi.org/10.1088/1681-7575/ab45cb>
- Wollinger, W. (2018). *Desenvolvimento de métodos de espectroscopia de RMN e MRC aplicados à Metrologia Química* [Doctorado]. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Womick, J. M., & Moran, A. M. (2009). Exciton Coherence and Energy Transport in the Light-Harvesting Dimers of Allophycocyanin. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(48), 15747-15759. <https://doi.org/10.1021/jp907644h>
- Yip, Y., Wong, S., & Choi, S. (2011). Assessment of the chemical and enantiomeric purity of organic reference materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(4), 628-640. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.12.003>
- Zamyadi, A., McQuaid, N., Prévost, M., & Dorner, S. (2012). Monitoring of potentially toxic cyanobacteria using an online multi-probe in drinking water sources. *J. Environ. Monit.*, 14(2), 579-588. <https://doi.org/10.1039/C1EM10819K>

## Apéndices

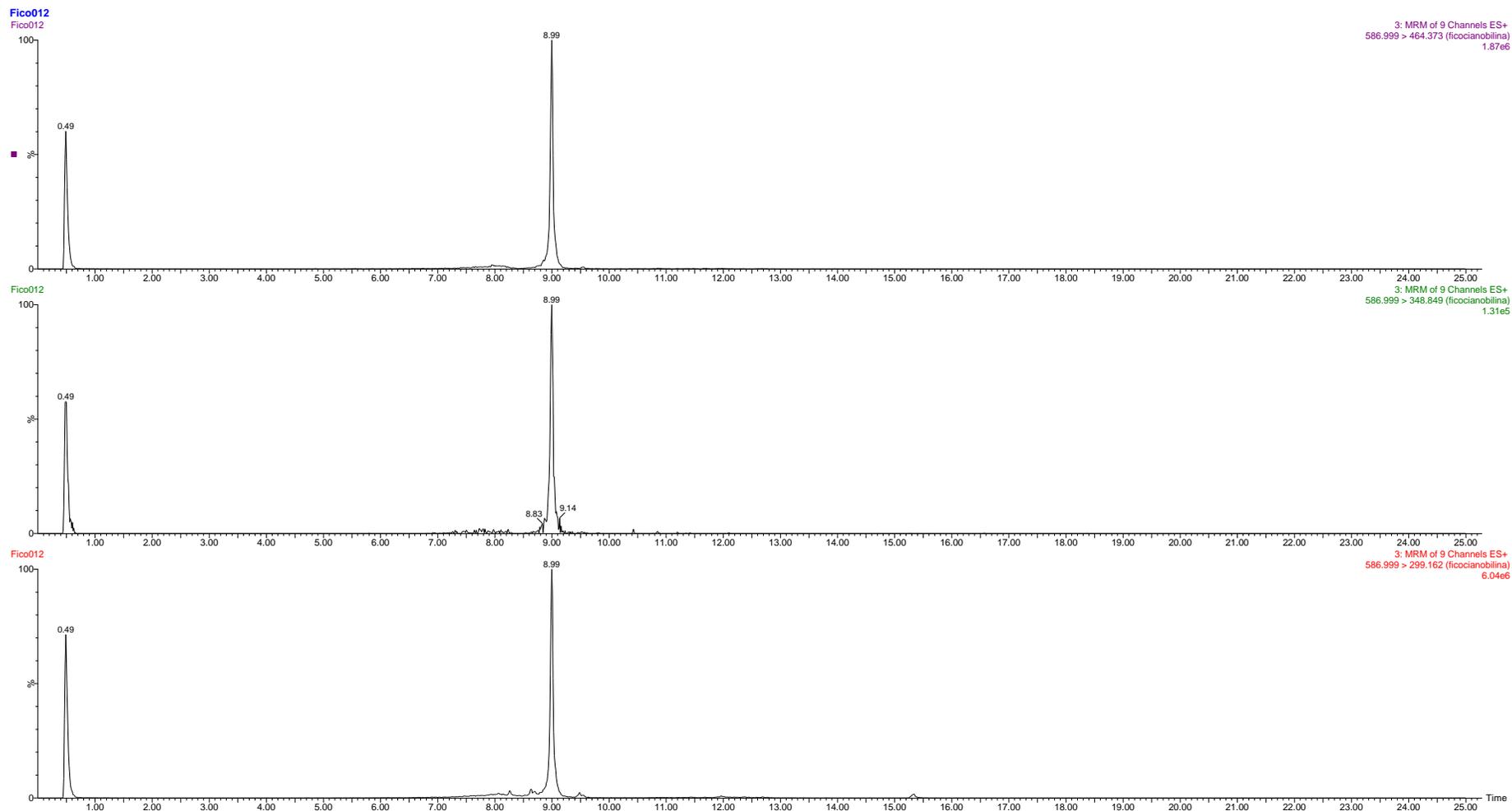
### Apéndice 1: Información complementaria del análisis por HPLC-DAD



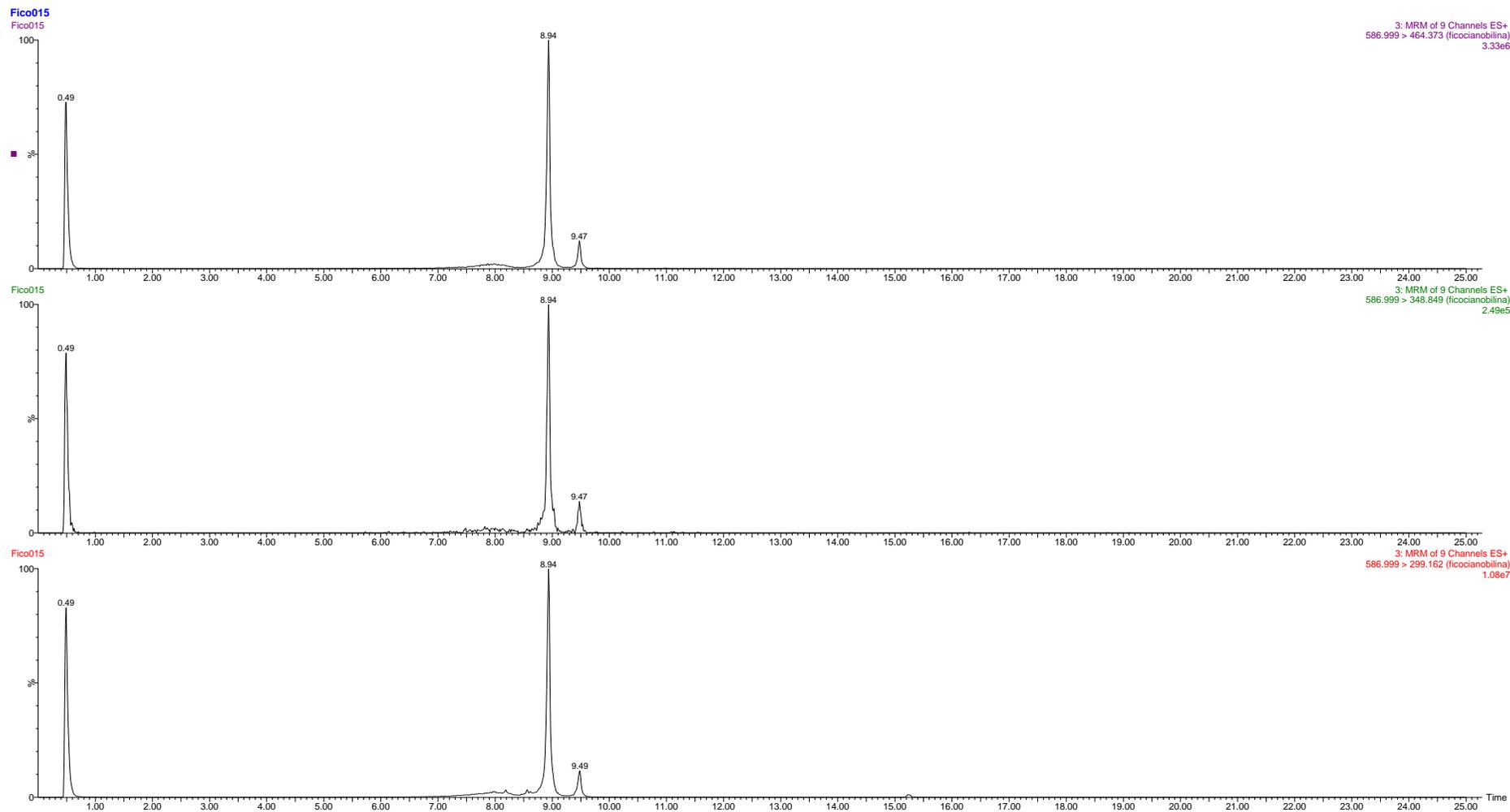
A. 1 Ampliación del cromatograma mostrado en la Figura 25.



A. 2 Comparación de espectros de obtenidos por HPLC-DAD para dos compuestos considerados impurezas estructuralmente relacionadas.

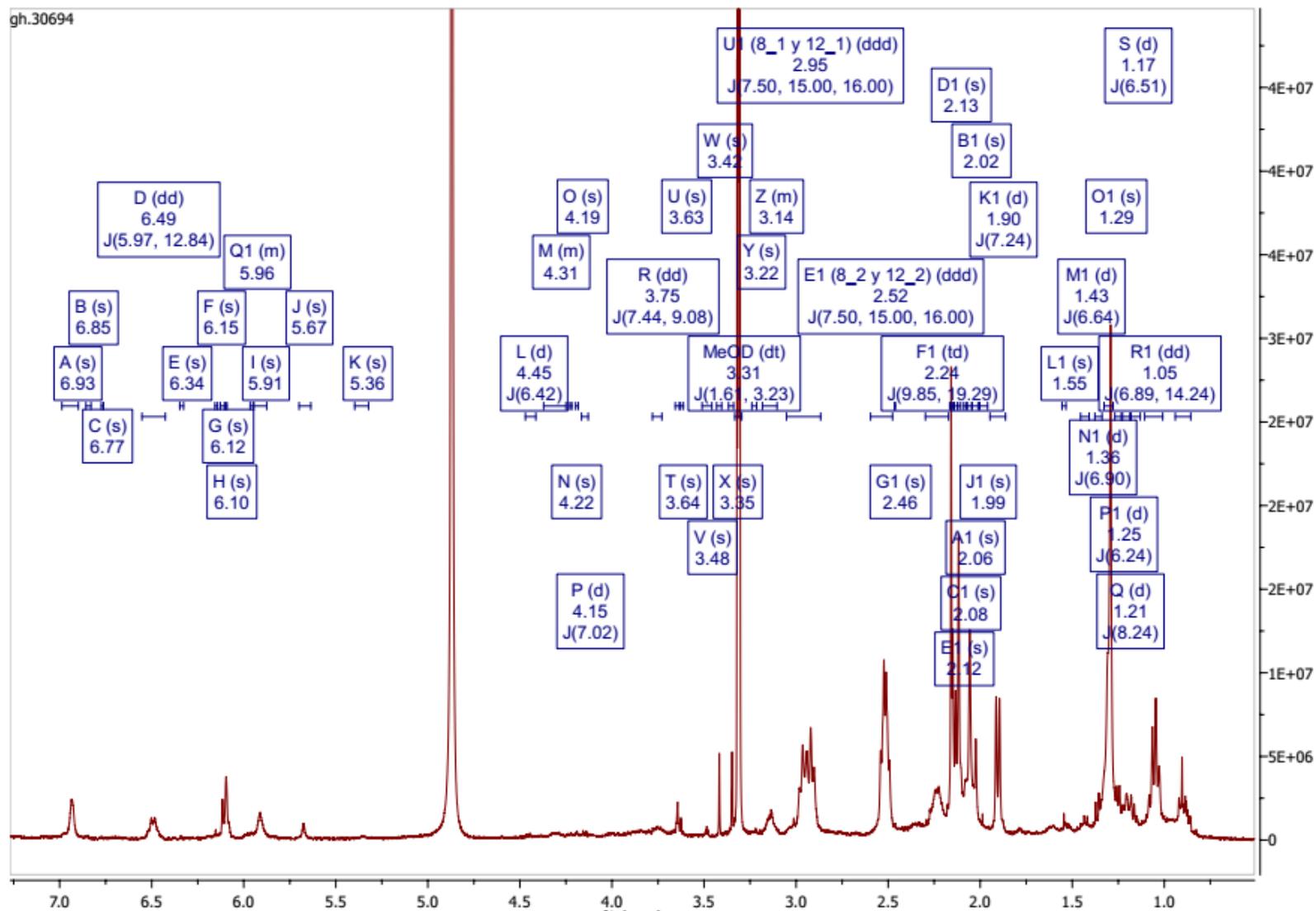


**A. 3** Transiciones de los experimentos MRM para la búsqueda de PCB del análisis de la muestra de estudio con 1 mes de preparación por LC-MS/MS.

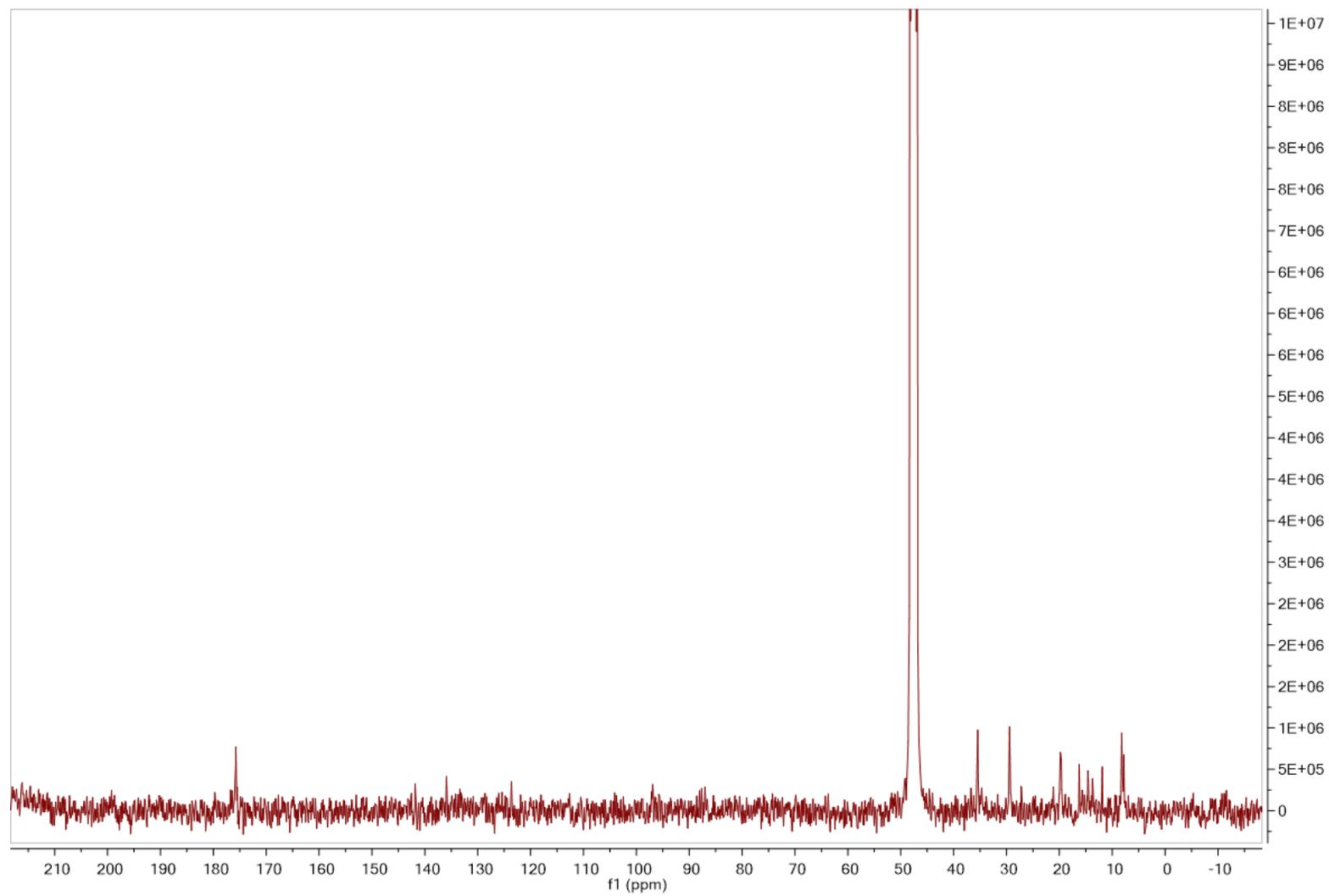


**A. 4** Transiciones de los experimentos MRM para la búsqueda de PCB del análisis de la muestra de estudio preparada en el día por LC-MS/MS.

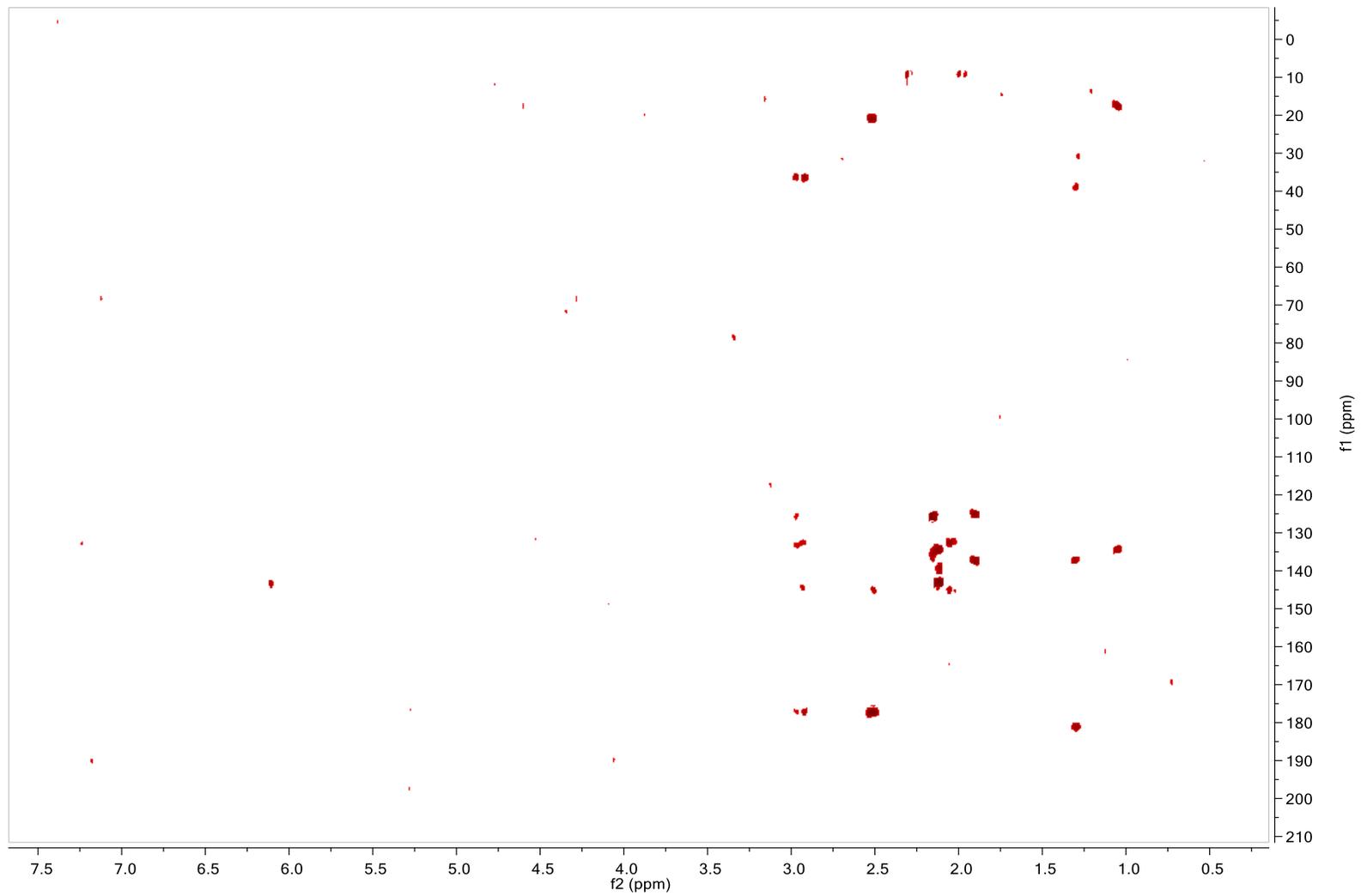
## Apéndice 2: Información complementaria del análisis por RMN



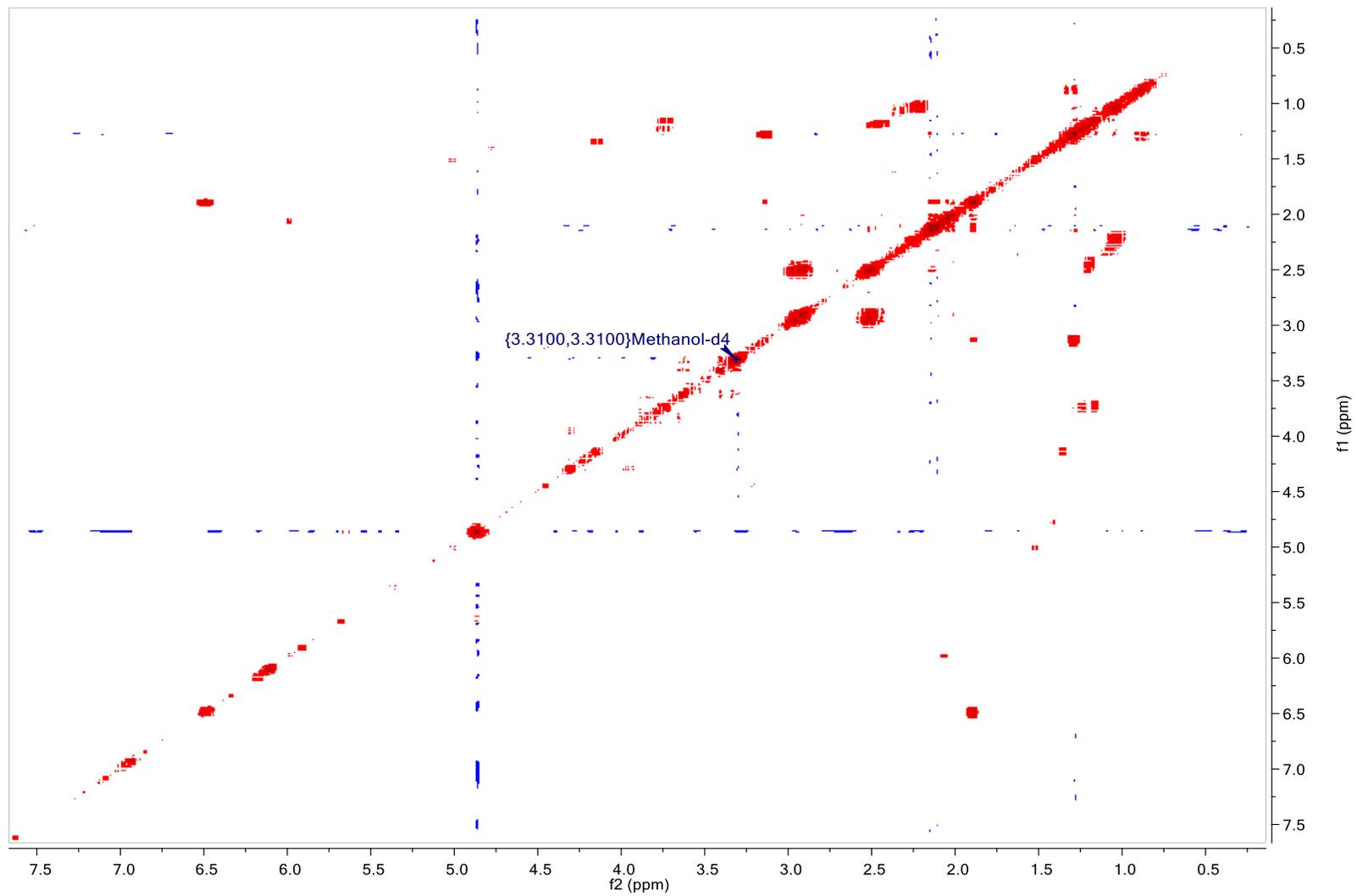
A. 5 Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del análisis cualitativo de la muestra de prueba con la identificación de señales.



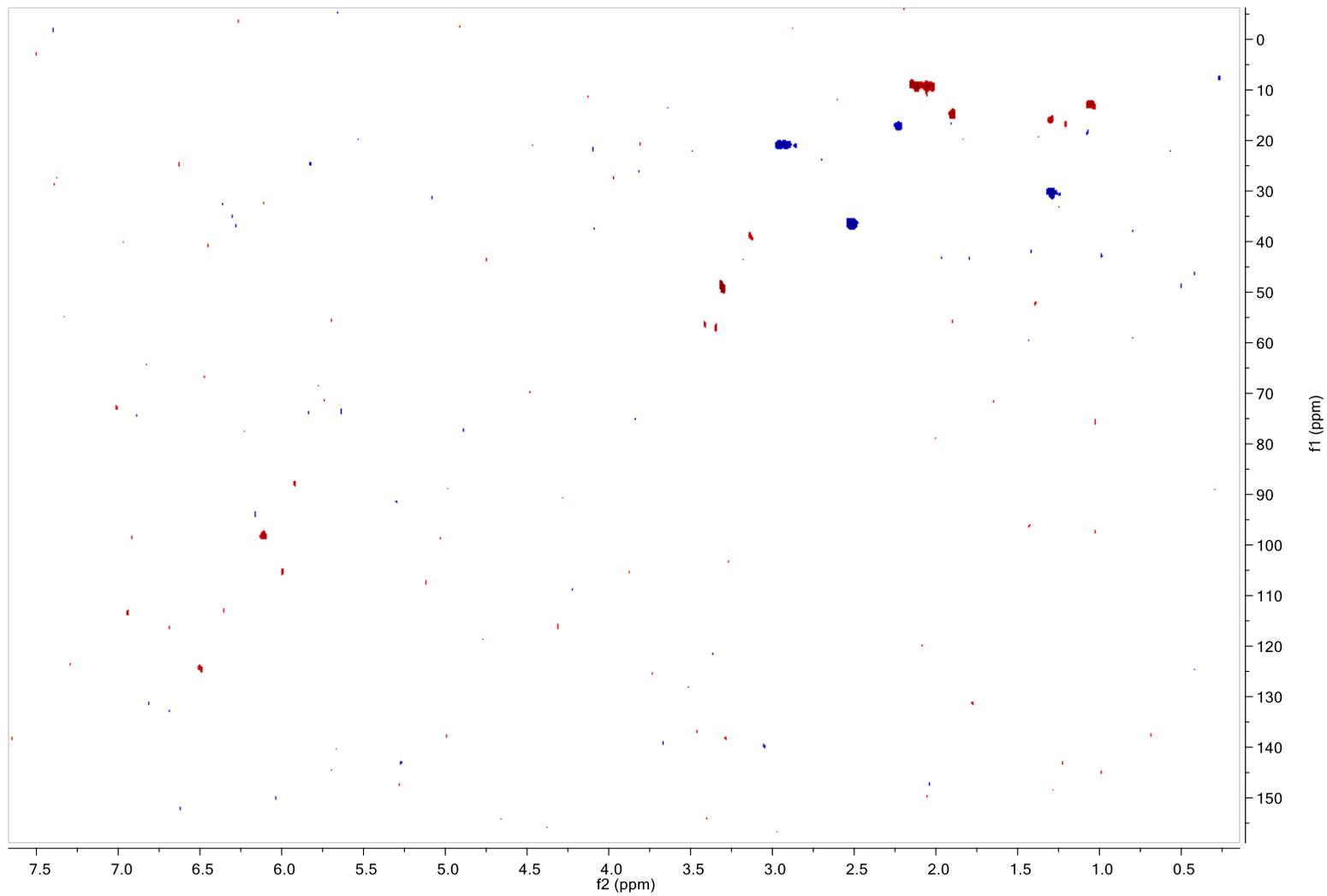
A. 6 Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de la muestra de prueba.



A. 7 Espectro correspondiente al experimento HMBC de la muestra de prueba.



A. 8 Espectro correspondiente al experimento COSY de la muestra de prueba.



A. 9 Espectro correspondiente al experimento HSQC de la muestra de prueba.

Señal	$\delta$ (ppm) <sup>1</sup> H-RMN	Integración	Naturaleza	Multiplicidad	Asignación	Justificación
A	6,93	1	Principal	s	10	Propuesto por Röben et al (2010). Por ser protones unidos a carbono sp <sup>2</sup> en un sistema aromático conjugado, se espera que su desplazamiento químico sea de los más elevados.
D	6,49	1	Principal	q	3 <sup>1</sup>	Acople con protones unido a carbono sp <sup>3</sup> a 1,90 ppm (K1) según COSY, el único H vinílico que se espera que presente acoples a corta distancia. Adicionalmente, propuesto por Röben et al (2010).
G	6,12	1	Principal	s	5	Propuesto por Röben et al (2010). Por ser protones unidos a carbono sp <sup>2</sup> en un sistema aromático conjugado, se espera que su desplazamiento químico sea de los más elevados.
H	6,10	1	Principal	s	15	Propuesto por Röben et al (2010). Por ser protones unidos a carbono sp <sup>2</sup> en un sistema aromático conjugado, se espera que su desplazamiento químico sea de los más elevados.
I	5,91	1	Principal	s	10*	Acople con 13 <sup>1</sup> en COSY. Consistente con Röben et al (2010), que menciona un corrimiento a $\delta$ menores para estas señales en proteínas, no necesariamente por unión a cisteína. Es posible que las impurezas con aminoácidos den estas señales.
J	5,67	1	Principal	s	5/15*	Röben et al (2010) menciona un corrimiento a deltas menores para estas señales en proteínas, no necesariamente por unión a cisteína. Es posible que las impurezas con aminoácidos den estas señales.
R	3,75	-	Impureza	dd	3 <sup>1</sup> * PCB-OEt	Acopla con una señal a 1,25 ppm (podría ser 3 <sup>2</sup> *) y con otra a 2,13 ppm (podría ser 3*) - quizá para PCB-OEt. Señal es mucho menor que para PCB-OMe en 3.64 ppm.
T	3,64	-	Impureza	t	3 <sup>1</sup> * PCB-OMe	Análogo a PCB-OEt.
X	3,35	-	Impureza	s	MeO-PCB	Desplazamiento químico casi coincidente con MeOH.
Z	3,18-3,10	1	Principal	m	2	Acople con O1 (2 <sup>1</sup> ), delta consistente con c sp <sup>3</sup> anexo a carbonilo + csp <sup>2</sup> . HMBC muestra relación con carbono terminal 2 <sup>1</sup> .
U1	2,95	4	Principal	ddd	8 <sup>1</sup> y 12 <sup>1</sup>	Protones tipo d, anexo a csp <sup>2</sup> , delta teórico cerca de 2,3 ppm. Acople con otra señal (E1) verificable por COSY, análisis de J cierra. Diasterotópicos.
E1	2,52	4	Principal	ddd	8 <sup>2</sup> y 12 <sup>2</sup>	Protones tipo e, anexo a COOH, delta teórico cerca de 2,2 ppm. Acople con otra señal (D1) verificable por COSY, análisis de J coherente. Diasterotópicos.
G	2,46	-	Impureza	s	3 <sup>1</sup> * PCB-C	Acopla con señal a 1,20ppm que se espera sea 3 <sup>2</sup> *PCB-C, presenta un $\delta$ razonable para un enlace CH-S. Además, acopla con otra señal a 2,14 ppm (debajo señal principal) que podría ser 3* PCB-C
F1	2,24	2	Principal	td	18 <sup>1</sup>	Diasterotópicos, acople con 18 <sup>2</sup> (R1) y entre sí. Se sospecha que es un ddd, pero no queda claro. Volviendo a integrar se obtiene un td con J9,85 y 19,29, este último podría ser un J OK para geminales. Que sean diasterotópicos sustenta la conformación helicodal según Knipp et al. (1998) ya que esto se genera por acople con el protón 2 <sup>1</sup> .
H1	2,16	1	Principal	s	7 <sup>1</sup>	Por HMBC. Quizá también incluya a 2,16 ppm.

<b>I1</b>	2,15	1	Principal	s	7 <sup>1</sup>	Por HMBC se observan acoples con carbono con $\delta = 145$ ppm, asignado como 8 o 12. Por COSY se observa acople con 3 <sup>2</sup> probablemente por tratarse de un sistema altamente conjugado. Quizá también incluya a 2,16 ppm.
<b>D1/E1</b>	2,13	1	Principal	s	17 <sup>1</sup>	Por HMBC se observa acople con C sp <sup>2</sup> asignado como 18.
<b>A1</b>	2,06	2	Principal	s	13 <sup>1</sup>	Por HMBC se observan acoples con carbono con $\delta = 145$ ppm, asignado como 8 o 12. Por descarte se asigna como 13 <sup>1</sup> . Aquí también está 3 <sup>2*</sup> de (3Z)-PCB
<b>K1</b>	1,90	2	Principal	d	3 <sup>2</sup>	Acople con H vinílico a 6,5 ppm (D). Integra menos que 3 porque probablemente al perder el DDEE presente un desplazamiento químico diferente.
<b>O1</b>	1,29	5	Principal	"s"	2 <sup>1</sup> + imp.	$\delta$ propio de C sp <sup>3</sup> , segundo más bajo después de 18 <sup>2</sup> que sería el que le corresponde el más bajo de todos. Acopla con Z (se propone que es 2)
<b>P1</b>	1,25	-	Impureza	d	3 <sup>2*</sup> PCB-OEt	Acopla con 3.75 ppm que tiene potencial de ser 3 <sup>1*</sup> PCB-OEt, desplazamiento y relación de áreas (0,20 H) acorde a la asignación.
<b>Q</b>	1,21	-	Impureza	d	3 <sup>2*</sup> PCB-C	Acopla con 2,47ppm que se espera que sea 3 <sup>1*</sup> PCB-C
<b>R1</b>	1,05	3	Principal	dd	18 <sup>2</sup>	Metilo terminal de menor desplazamiento, que acopla con señal que integra 2, dos veces, porque serían 2 protones terminales. Acople visible por COSY
<b>T1</b>	0,09	-	Impureza	dd	Comp. Sílice	Posiblemente sea una impureza de silicio del proceso de purificación.
<b>Q1</b>	5,96	-	Impureza	m	3 <sup>1*</sup> (3Z)-PCB	De Beale & Cornejo (1991), acopla con señal a 2,06 ppm según COSY la cual corresponde a 3 <sup>2*</sup> (3Z)-PCB

**A. 10** Evaluación de señales del análisis cualitativo por <sup>1</sup>H-RMN y justificación de la asignación.

## Apéndice 3: Estimación de incertidumbre para determinación de pureza por balance de masa

### Determinación de agua por Karl Fischer

La incertidumbre estándar combinada del mensurando se determina según la Ecuación 18, donde  $u_{toma}$  se calcula como la suma cuadrática de las incertidumbres asociadas a las tomas  $p_1$  y  $p_2$  ( $u_{p1}$  y  $u_{p2}$ ),  $u_{repetibilidad}$  calculada como la desviación estándar de los  $n$  resultados de humedad individuales dividida por la raíz cuadrática de  $n$  y  $u_{lect,KF}$  se calcula considerando la resolución del titulador coulombimétrico. La incertidumbre asociada la cantidad de agua introducida en el blanco se estima como la suma cuadrática de las contribuciones de repetibilidad y resolución del titulador de su determinación específica, de forma análoga a lo ya presentado. Las contribuciones individuales de las variables de influencia y sus respectivos coeficientes de sensibilidad se muestran en la Tabla 33.

$$u_{Hum.} = \sqrt{(u_{toma} * c_{toma})^2 + (u_{bco} * c_{bco})^2 + (u_{repetibilidad})^2 + (u_{lect,KF} * C_{lect,KF})^2} \quad (18)$$

Variable de influencia	Mejor estimación del valor asignado	Tipo de Distribución	Incertidumbre estándar( $u_i$ )	Coefficiente de sensibilidad( $c_i$ )	Grados de libertad (GL)
Masa toma	Diferencia de lectura de balanza	Normal	$\sqrt{u_{p1}^2 + u_{p2}^2}$ $u_{p1,2} = U_{cal}/k$	$-(m_{Ag} - m_{bco}) \cdot 10^4 / (p_1 - p_2)^2$	$\infty$
Cantidad de agua blanco	Promedio de lecturas KF	Normal	$\sqrt{u_{rep,bco}^2 + u_{lec}}$	$- \frac{1 \times 10^{-4}}{(p_1 - p_2)}$	$\infty$
Repetibilidad	Desviación estándar de réplicas de medición	t- Student	$\frac{S_{H,i}}{\sqrt{n}}$	1	$n-1$
Cantidad de agua muestra	Lectura KF	Rectangular	$\frac{resolución}{\sqrt{12}}$	$\frac{10^{-4}}{(p_1 - p_2)}$	$\infty$

**Tabla 32** Resumen de las fuentes de incertidumbre para el parámetro humedad en la muestra de estudio, junto con sus respectivos coeficientes de sensibilidad.

## Determinación de fracción de masa de ficocianobilina corregida por impurezas estructuralmente relacionadas

La incertidumbre estándar combinada de la fracción molar de ficocianobilina ( $\gamma_A$ ) se determina según la Ecuación 19, donde  $u_{Area_A}$  y  $u_{Area_i}$  son las incertidumbres asociadas al área de la señal cromatográfica correspondiente a ficocianobilina y las impurezas, respectivamente. La incertidumbre  $u_{C_i}$  es aquella asociada a la variabilidad de los factores de respuesta de las señales correspondientes a las impurezas ( $FR_i$ ) con respecto al factor de respuesta de la señal de ficocianobilina ( $FR_A$ ), como se muestra en la Ecuación 20. Las contribuciones individuales de las variables de influencia y sus respectivos coeficientes de sensibilidad se muestran en la Tabla 33.

$$u_{\gamma_A} = \sqrt{(u_{Area_A} * c_{Area_A})^2 + (u_{C_i} * c_{C_i})^2 + \sum (u_{Area_i} * c_{Area_i})^2} \quad (19)$$

$$FR_i = C_i * FR_A \quad (20)$$

Variable de influencia	Mejor estimación del valor asignado	Tipo de Distribución	Incertidumbre estándar( $u_i$ )	Coficiente de sensibilidad( $c_i$ )	Grados de libertad(GL)
Área de ficocianobilina	Integración de señal cromatográfica	t-Student	$\frac{s_{area}}{\sqrt{n}}$	$\frac{1}{\sum C_i Area_i}$	n-1
Área de impurezas	Integración de señal cromatográfica	t-Student	$\frac{s_{area}}{\sqrt{n}}$	$\frac{-Area_A}{C_i \sum Area_i^2}$	n-1
Variabilidad de factor de respuesta	Estimado	Rectangular	$\frac{0,3}{\sqrt{3}}$	$\frac{-Area_A}{C_i^2 \sum Area_i}$	$\infty$

**Tabla 33** Resumen de las fuentes de incertidumbre para el parámetro fracción molar, junto con sus respectivos coeficientes de sensibilidad.

La incertidumbre estándar combinada de la fracción de masas de ficocianobilina ( $w_A$ ) se determina según la Ecuación 21, donde  $u_a$  es la incertidumbre asociada al producto de la fracción molar y el peso molecular de ficocianobilina ("A"), calculada según la Ecuación 22 y  $u_j$  es la incertidumbre estándar correspondientes a las impurezas, calculada de forma análoga según la Ecuación 23. Para la estimación de la incertidumbre asociada al peso molecular de las impurezas sin identificación certera se tomaron rangos de peso molecular esperado según ya fue detallado en la Sección 10.2, considerandose una distribución rectangular. Las contribuciones individuales de las variables de influencia y sus respectivos coeficientes de sensibilidad se muestran en la Tabla 34.

$$u_{w_A} = \sqrt{(u_a * c_a)^2 + c_i^2 \left( \sum u_j^2 \right)} \quad (21)$$

$$u_a = \sqrt{(u_{\gamma_A} * c_{\gamma_A})^2 + (u_{PM_A} * c_{PM_A})^2} \quad (22)$$

$$u_j = \sqrt{(u_{\gamma_j} * c_{\gamma_j})^2 + (u_{PM_j} * c_{PM_j})^2} \quad (23)$$

Variable de influencia	Mejor estimación del valor asignado	Tipo de Distribución	Incertidumbre estándar(u <sub>i</sub> )	Coefficiente de sensibilidad(c <sub>i</sub> )	Grados de libertad (GL)
Producto fracción molar y peso molecular para ficocianobilina	Información de peso molecular (Meija, 2016)	Normal	Ec. 22	$\frac{1}{\sum \gamma_j * PM_j}$	$\infty$
Producto fracción molar y peso molecular para impurezas	Estimación de peso molecular (Meija, 2016)	Normal	Ec. 23	$\frac{-\gamma_A * PM_A}{(\gamma_A * PM_A + \sum \gamma_j * PM_j)^2}$	$\infty$

**Tabla 34** Resumen de las fuentes de incertidumbre para el parámetro fracción de masas en la muestra de estudio, junto con sus respectivos coeficientes de sensibilidad.

## **Anexos**

### **Anexo 1: Presentaciones en congresos y publicaciones**

Al momento de finalizar la escritura de esta tesis resultados se han divulgado en un Congreso Nacional del área de Química Analítica y en una revista nacional referada (indexada en Latindex) según se detalla a continuación:

“Optimización de un método primario para la determinación de creatinina en suero humano mediante GC-IDMS”. Presentación modalidad póster en el 5º Congreso Uruguayo de Química Analítica. Expositora: Ana Silva. Octubre 2018. Se obtuvo segundo premio en la modalidad póster.

"Optimización de un método primario para la determinación de creatinina en suero humano mediante GC-IDMS". Silva, A.; Almirón, F.; Ferreira, E.; Pistón, M. INNOTECH, [S.l.], n. 17 ene-jun, p. 102-116, dic. 2018. ISSN 1688-6593. Disponible en: <<http://ojs.latu.org.uy/index.php/INNOTECH/article/view/479>> DOI: <https://doi.org/10.26461/17.06>.



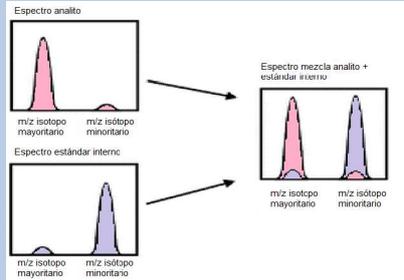
# Optimización de un método primario para la determinación de creatinina en suero humano mediante GC-IDMS.

Silva, Ana I.(1); Almirón, Florencia (1); Ferreira, Elizabeth(1); Pistón, Mariela (2)

(1) Departamento de Metrología Química, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, Montevideo. (2) Grupo de Análisis de Elementos Traza y Desarrollo de Estrategias Simples para Preparación de Muestras (GATPREM), Área Química Analítica, Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo. asilva@latu.org.uy

## Introducción

La concentración de creatinina en suero es utilizada clínicamente para la estimación de la tasa de filtración glomerular con el fin de diagnosticar la enfermedad renal crónica. En el campo de la bioquímica clínica, el diagnóstico, evaluación de riesgo y monitoreo de un paciente dependen de forma crítica de los resultados emitidos por un laboratorio.



## Dilución isotópica espectrometría de masas

Este método consta en la adición de una cantidad conocida de un análogo isotópicamente enriquecido del analito. Posteriormente se mide la relación de la abundancia isotópica del analito y el análogo isotópico con alta exactitud mediante un espectrómetro de masas. Para que este método alcance su altísimo potencial analítico, es fundamental que sean estudiados y optimizados exhaustivamente, tanto la preparación de la muestra como la selección del estándar interno.

## ANOVA

- Agente derivatizante (**MSTFA vs BSTFA + 1% TMCS**)
- Humedad de piridina (**tamiz molecular por 72 h, 4h o sin tamiz**)

## Diseño experimental (diseño 2<sup>3</sup>)

- Tiempo de equilibrado isotópico (**tl**)
- Temperatura de derivatización (**TD**)
- Tiempo de derivatización (**td**)

## Procedimiento

### Fortificación con isótopo

- 1 ml de suero + 1 ml de solución de creatinina-d3

### Equilibrado isotópico

- Agitación a T. ambiente por tl

### Intercambio iónico

- Separación de creatinina y creatina

### Secado

- Secado con N<sub>2</sub> en bloque de calor seco a 80°C.

### Derivatización

- Piridina + agente derivatizante por td a TD.

### GC-MS

- Análisis por GC-MS

## Diseño experimental y codificación

### Respuestas

- área creatinina
- eficiencia de derivatización (ED)
- relación de ED
- sesgo.

Exp.	tl (min)	TD (°C)	td (min)
1	30 (-1)	40 (-1)	20 (-1)
2	90 (1)	40 (-1)	20 (-1)
3	30 (-1)	40 (-1)	70 (1)
4	90 (1)	40 (-1)	70 (1)
6	30 (-1)	80 (1)	20 (-1)
7	90 (1)	80 (1)	20 (-1)
8	30 (-1)	80 (1)	70 (1)
9	90 (1)	80 (1)	70 (1)

## Evaluación de resultados y conclusión

### Agente derivatizante

BSTFA + 1% TMCS  
mayor rendimiento de derivatización

### Humedad del solvente

Sin efecto significativo hasta humedad 0,04%

### Área de creatinina

Aumenta con tl y su combinación con td

### Eficiencia de derivatización

Aumenta con TD

### Relación de ED

Relación unitaria a medida que aumenta tl y disminuye td

### Sesgo

Disminuye cuanto al aumentar tl y su combinación con td

Exp. 6 y 4 cumplen los criterios de optimización, pero Exp. 6 es toma 110 minutos menos, por lo tanto se opta esta opción.

## Referencias

- Richter, W., 1997. *Accred Qual Assur*, 2(8), pp. 354 - 359.  
 Siekmann, L., 1985. *J Clin Chem Clin Biochem*, 23(3), pp. 137 - 144.  
 Costa Ferreira, S. L., 2015. *Introdução às técnicas de planejamento de experimentos*. 1ª edición ed. Salvador: Vento Leste.

## Agradecimientos

Al Departamento de Metrología Química del LATU.

# Optimización de un método primario para la determinación de creatinina en suero humano mediante GC-IDMS

Optimization of a primary method for the determination of creatinine in human serum by GC-IDMS

RECIBIDO: 17/10/2018 → APROBADO: 29/11/2018 ✉ asilva@latu.org.uy

✉ SILVA, ANA I. (1); ALMIRÓN, FLORENCIA (1); FERREIRA, ELIZABETH (1); PISTÓN, MARIELA (2)

(1) DEPARTAMENTO DE METROLOGÍA QUÍMICA, LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY, MONTEVIDEO, URUGUAY.

(2) GRUPO DE ANÁLISIS DE ELEMENTOS TRAZA Y DESARROLLO DE ESTRATEGIAS SIMPLES PARA PREPARACIÓN DE MUESTRAS (GATPREM), ÁREA QUÍMICA ANALÍTICA, DEPARTAMENTO ESTRELLA CAMPOS, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, MONTEVIDEO, URUGUAY

## RESUMEN

Los métodos primarios constituyen el nivel jerárquico de medición más elevado debido a que permiten implementar la trazabilidad a las unidades del Sistema Internacional. El objetivo de este trabajo fue la optimización de un método primario para la determinación de creatinina en suero humano por dilución isotópica mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC – IDMS), adaptado de un método de referencia publicado en el Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM - BIPM). Se optimizaron factores vinculados a las etapas de equilibrado isotópico y derivatización. Para esto se realizó un diseño experimental de tres factores en dos niveles (diseño 2<sup>3</sup>) y un análisis de varianza de un factor (ANOVA). Las respuestas evaluadas en el diseño experimental fueron la señal correspondiente a la creatinina, la eficiencia de derivatización, la relación de eficiencia de derivatización y el sesgo. El método propuesto, optimizado para las etapas de equilibrado isotópico y derivatización, presenta mayor eficiencia y simplicidad comparado con el método original, y cuenta con un sesgo adecuado al propósito. Luego de su validación podrá ser implementado para el desarrollo de herramientas de aseguramiento de la calidad de los laboratorios clínicos que realizan estas mediciones rutinariamente.

**PALABRAS CLAVE:** metrología química, métodos primarios de medición, IDMS optimización.

## ABSTRACT

Primary methods represent the highest hierarchical measurement level as they allow the implementation of traceability to the International System of Units. The aim of this work was the optimization of a primary method for the determination of creatinine in human serum by isotope dilution gas chromatography mass spectrometry (GC-IDMS) which is an adaptation of a reference method published in the Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM - BIPM) database. The isotopic equilibration and derivatization steps were optimized through a 2<sup>3</sup> experimental design and a one-way analysis of variance (ANOVA). The monitored output variables were the creatinine peak signal, the derivatization efficiency, the relative derivatization efficiency and bias. The optimized method shows higher efficiency and simplicity compared to the original method as well as a bias that remains fit for purpose. Once validated is intended to be used for the development of quality assurance tools for routine analysis of clinical laboratories.

**KEYWORDS:** metrology, primary methods of measurement, IDMS, optimization.

## INTRODUCCIÓN

La armonización de las mediciones a nivel global es crucial para el comercio, la salud y el avance tecnológico y científico. La metrología, es decir, la ciencia que estudia las mediciones y su aplicación, trabaja activamente para alcanzar este objetivo. Probablemente, la forma más económica de alcanzar la comparabilidad global de las mediciones sea el desarrollo de un sistema jerárquico de medición basado en la trazabilidad mediante estándares de calibración a una referencia internacional adecuada, como el Sistema Internacional de Unidades (Thompson y Ellison, 2005). Este sistema de medición depende críticamente de incertidumbres bajas entre los niveles, las cuales se alcanzan mediante mediciones de alta jerarquía metrológica. El vocabulario internacional de metrología (VIM) define la trazabilidad metrológica como la “propiedad de un resultado de medida por la cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida” (JCGM, 2012). La trazabilidad metrológica a las unidades del sistema internacional se obtiene a partir de los métodos primarios, que representan el mayor nivel metrológico. Estos cuentan con ecuaciones e incertidumbres descritas completamente utilizando unidades del sistema internacional (King, 2005) y no tienen correcciones significativas por factores empíricos (De Bievre y Peiser, 1997). En el campo de la metrología química, la unidad aplicable es el mol y su trazabilidad se obtiene por métodos primarios como la gravimetría y la dilución isotópica con espectrometría de masas (IDMS), que cuenta con demostrada veracidad y baja incertidumbre. Estas características le confieren especial relevancia para la certificación de materiales de referencia y en la asignación de valores de referencia de ensayos de aptitud. Este método, de vasta aplicación en el ámbito de la metrología química orgánica, consiste

en adicionar a la muestra una cantidad conocida del analito de interés que presenta una composición isotópica diferente y que cumple la función de estándar interno. La determinación de la cantidad de sustancia se calcula a partir de una ecuación que depende de la relación entre la abundancia isotópica natural del analito y la abundancia isotópica del estándar interno enriquecido isotópicamente, y esta se pueden medir con alta exactitud mediante un espectrómetro de masas (Richter, 1997). Para que este método alcance su altísimo potencial analítico, es fundamental que parámetros como la preparación de la muestra o la selección del estándar interno sean estudiados y optimizados exhaustivamente.

Un ejemplo de aplicación para este tipo de método primario es la determinación de creatinina en suero por dilución isotópica con espectrometría de masas.

La importancia de la determinación de la concentración de creatinina en suero se debe a que es utilizada clínicamente para la estimación de la tasa de filtración glomerular con el fin de diagnosticar la enfermedad renal crónica. Se considera que esta enfermedad afecta a entre 5 -10 % de la población mundial, con un aumento sostenido de la incidencia y prevalencia de la enfermedad renal en etapa terminal, la falla renal y los trasplantes de riñón a nivel mundial (Myers, et al., 2006). De forma rutinaria, este análisis se realiza por métodos colorimétricos como el método de Jaffe, que se ve afectado por interferencias de otros grupos cromóforos provenientes de la bilirrubina, proteínas y cetonas (Fernández-Fernández, et al., 2014). Estas deficiencias se compensan parcialmente tras el desarrollo de métodos enzimáticos (Myers, et al., 2006).

En el campo de la bioquímica clínica, el diagnóstico, la evaluación de riesgo y el monitoreo de un paciente dependen de forma crítica de los resultados emitidos por un laboratorio (Thienpont, et al., 2002). La comparabilidad de estos resultados permite considerar intervalos de referencia comunes o posibles estrategias de tratamiento (Thienpont, et al., 2002). Esta comparabilidad de resultados se obtiene principalmente al establecer la cadena de trazabilidad de la medición a los estándares internacionales más altos, mediante un sistema de mediciones de referencia exhaustivo (Thienpont, et al., 2002).

El Comité Conjunto para Trazabilidad en Medicina Laboratorial (JCTLM según sus siglas en inglés) lista los métodos de referencia existentes para la determinación de parámetros clínicos, muchos de los cuales emplean dilución isotópica (Kessler, 2016). La misión general de este comité, que forma parte de la Oficina Internacional de Pesas y Medidas (BIPM, según sus siglas en francés) es la mejora de la calidad en el ámbito de la salud, reduciendo los costos del gobierno y la industria del diagnóstico *in vitro* por medio de la promoción de sistemas de examinación de referencia que permiten la trazabilidad de los resultados en los exámenes y la comparabilidad mejorada. Complementariamente a la implementación de la trazabilidad en los laboratorios clínicos, la participación en instancias de evaluación externa así como la aplicación de herramientas de aseguramiento de calidad internas son elementos clave y mandatorios para estos laboratorios.

Los resultados de programas de ensayos de aptitud permiten evaluar el desempeño individual de cada laboratorio y la comparación de métodos analíticos comúnmente

utilizados. La asignación de valor de las muestras distribuidas en estos estudios, usualmente muestras liofilizadas basadas en suero humano, se realiza mediante el empleo de un método de referencia o de un material de referencia certificado. En caso de que esto no sea posible, se puede instrumentar la asignación de valor por consenso, lo que presenta un inconveniente mayor dado que no es posible contar con un valor metrologicamente trazable, por lo tanto no presenta un punto de comparación a nivel internacional. Esto dificulta la determinación certera de los sesgos asociados a los diferentes métodos analíticos.

Actualmente, los valores de referencia de los programas de evaluación externa de calidad ofrecidos en Uruguay son asignados externamente por métodos de referencia secundarios, lo cual resulta en un elevado costo asociado al transporte. El desarrollo o implementación de métodos primarios de trazabilidad claramente establecida permitirá la asignación de valores trazables a estos programas para realizar una evaluación rigurosa de la exactitud de los métodos de rutina utilizados a nivel nacional.

Este trabajo introduce modificaciones a un método de referencia para la determinación de creatinina por suero humano mediante dilución isotópica con cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-IDMS) publicado en la base de datos del Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM) del BIPM (Siekmann, 1985). Las modificaciones propuestas al método son el uso de un estándar interno deuterado (creatinina- $d_3$ ) en sustitución del original (creatinina- $^{13}C,^{15}N_2$ ) y la preparación gravimétrica de las muestras y calibrantes.

El estándar interno presentado como alternativa se obtiene fácilmente de forma comercial, a diferencia del original, que debe sintetizarse especialmente y requiere de equipamiento no siempre disponible en un laboratorio analítico.

Adicionalmente, la preparación gravimétrica de muestras y calibrantes le confiere al método mayor exactitud y menor incertidumbre, al tiempo que elimina la necesidad de calibrar el equipamiento volumétrico. Dado que la elección de estándar interno utilizado puede incidir fuertemente en el desempeño de los métodos basados en dilución isotópica, es necesaria la búsqueda de condiciones óptimas para que su veracidad no se vea afectada.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de factores relacionados con etapas críticas de preparación de muestra, como el equilibrado isotópico y la derivatización, sobre este método optimizado con los cambios propuestos. A partir de esta información se busca encontrar las condiciones óptimas para estas etapas para que el método presente una veracidad adecuada al propósito de desarrollar herramientas de aseguramiento de calidad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos y materiales

Para la cuantificación de las muestras de suero se utilizó un material de referencia certificado de creatinina pura (SRM 914a, NIST, Maryland, USA), un estándar

de creatinina- $d_3$  (sc-217956, Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA), y agua ultrapura “agua MQ” producida por un sistema de ultrapurificación DirectQ3-UV Millipore (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Para el diseño experimental se utilizaron materiales de referencia certificados de creatinina en suero congelado (SRM 967a, NIST, Maryland, USA). El filtrado de las muestras se realizó con filtros de 0,45  $\mu\text{m}$ .

Se utilizó ácido acético glacial (Macron Fine Chemicals, Pensilvania, USA) para preparar una solución de ácido acético al 1% “SAC” (1 mL de ácido acético se llevó a 100 mL en un matraz aforado con agua MQ) e hidróxido de amonio 30% (Carlo Erba, Milán, Italia) para preparar una solución de hidróxido de amonio 2M “SB” (11,3 mL  $\text{NH}_4\text{OH}$  se llevaron a 100 mL en matraz aforado con agua MQ).

Para la separación de creatina y creatinina se utilizó una resina de intercambio catiónico en forma hidrógeno, fuertemente ácida, 200 – 400 mesh DOWEX 50WX2 (Sigma-Aldrich, Misuri, USA), en una columna de vidrio de 12,5 mm de diámetro interno y 15 cm de largo. El control de pH de las fracciones recolectadas se realizó con tiras de pH en el rango 0 a 14 (código 109535) y 2,5 a 4,5 (código 109541) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Para el secado de las muestras se utilizó nitrógeno calidad 4.0. Durante la derivatización de las muestras se utilizó piridina (secada con tamiz molecular 0,3 nm código 105734 Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA, código 111805, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) o N, O-Bistrifluoroacetamida (BSTFA) con 1% Trimetilclorosilano (TMCS) (código 15238 Fluka, Misuri, USA), según corresponda (ver sección “Optimización de solvente y agente de derivatización” en Resultados y discusión).

## Equipamiento

Las muestras y soluciones calibrantes se pesaron en una microbalanza Mettler Toledo XPE56 (Zúrich, Suiza). Las muestras de suero humano se manipularon dentro de una cabina de bioseguridad (BSC-1300 II A2-X, Labotecgroup.com) y se llevaron a sequedad con un evaporador de muestras de bloque seco (código 109A 28680-30, Cole-Parmer, USA). La derivatización se realizó en una estufa (modelo FD 115, Binder, Alemania). Las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de gases 7890A acoplado a espectrómetro de masa 5795C (Agilent technologies, USA). El análisis fue realizado en las siguientes condiciones: columna de 5% fenilmetilpolisiloxano de 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  (HP-5 MS, Agilent technologies, USA). Se utilizó helio como gas portador a un flujo de 1 mL/min. La temperatura inicial de la columna fue 80 °C por 1 minuto, luego aumentó a 10 °C/min hasta 200 °C y 25 °C/min hasta 250 °C por 5 minutos. La inyección de 0,5  $\mu\text{l}$  se realizó en un modo splitless a 300 °C. La temperatura de la interfase y la fuente de iones del espectrómetro de masa fueron 250 °C y 230 °C, respectivamente. La cuantificación de creatinina se realizó en modo “Single Ion Monitoring”, monitoreando los iones 329 m/z y 332 m/z. Para el análisis de eficiencia de derivatización, también se monitorearon los iones 256 m/z y 259 m/z. La determinación de humedad en piridina fue realizada utilizando un titulado coulombimétrico Karl – Fisher C20 (Mettler Toledo, Zúrich, Suiza).

## Procedimiento

Se prepararon gravimétricamente soluciones calibrantes a partir de 3 mg de material de referencia certificado de creatinina con 25 g de agua MQ, a razón de dos soluciones independientes por cada instancia de cuantificación. Estas soluciones se diluyeron gravimétricamente para preparar soluciones de trabajo de 5; 7; 8,5; 9 y 11 mg kg<sup>-1</sup>. La solución de creatinina isotópicamente marcada (creatinina-d3, de ahora en adelante se llamará solución de isótopo) se preparó de forma equivalente a las soluciones calibrantes pero partiendo de 1,5 mg del sólido. Se tomó 1 mL de suero humano previamente descongelado y homogeneizado o 1 mL de solución calibrante y se les agregó gravimétricamente solución de isótopo de manera que iguale la masa de creatinina presente en las muestras analizadas y la solución calibrante a 8,5 mg kg<sup>-1</sup>.

En adelante y para simplificar, las mezclas de solución calibrante y solución isótopo se denominarán B<sub>ZY</sub> y las mezclas de suero y solución calibrante B<sub>XY</sub>. Para alcanzar el equilibrio isotópico, estas muestras fueron homogeneizadas por un tiempo variable entre 30 y 90 min (factor “tI”) en un agitador orbital a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Las soluciones calibrantes se reservaron para posterior secado, mientras que las muestras de suero humano se trasvasaron a una jeringa sin aguja y se filtraron a 0,45 µm hacia un tubo pyrex de 50 mL. Se agregaron 20 a 25 gotas de SAc a cada muestra, hasta comprobar un pH ~ 4,5.

Para el intercambio iónico se acondicionó una cucharada de resina en un matraz Erlenmeyer con 5 mL de SB, verificando pH básico. Se prepararon las columnas cromatográficas adicionando 2,5 mL de resina y realizando tres lavados de 10 mL de agua MQ hasta comprobar pH neutro. Se sembraron las muestras y se procedió a lavar la creatina con dos tomas de 10 mL de agua MQ. Se recolectó la creatinina adicionando 10 mL de SB, descartando los primeros 2 mL y recolectando la fracción de creatinina en los próximos 8 mL. Las fracciones de creatinina y las soluciones calibrantes se secaron en evaporador bajo nitrógeno utilizando un bloque de calor seco a 80 °C. Una vez que las muestras y soluciones calibrantes se encontraron completamente secas, se les agregó 200 µL de piridina y 50 µL de MSTFA o BSTFA + 1% TMCS, según corresponda (ver sección “Optimización de solvente y agente de derivatización” en Resultados y discusión). Se homogeneizaron mediante vórtex por 10 segundos y se trasvasaron utilizando una pipeta Pasteur de vidrio a un inserto de 400 µL. Luego, estos se colocaron en viales de automuestreador de 2 mL y se calentaron en estufa por un tiempo variable de entre 20 y 70 minutos (factor “tD”) a una temperatura variable de entre 40 y 80 °C (factor “TD”). Posteriormente, las muestras se analizaron por GC-MS.

## Optimización de solvente y agente de derivatización

Tres tomas de piridina fueron sometidas a diferentes condiciones de secado. En el primer caso se adicionó tamiz molecular 72 horas antes de su uso (“PIR 72h”), en el segundo caso 4 horas antes (“PIR 4h”) y en el tercer caso no se adicionó tamiz

("PIR ST"). Cuando aplicó, se adicionó tamiz en una proporción 1 mL de tamiz seco por cada 25 mL de solvente. Se prepararon 15 mL de una mezcla B<sub>XY</sub> de 20 mg kg<sup>-1</sup> de creatinina y creatinina-d3 y se realizaron tomas de 1 mL en 12 viales de 4 mL ámbar, para analizar cada variación por triplicado.

Las muestras se secaron según lo descrito en la sección anterior y se les agregó 200 µL de piridina (PIR 72h, PIR 4h o PIR ST, según el caso) y 50 µL de MSTFA o BSTFA + 1% TMCS, según corresponda (ver sección "Optimización de solvente y agente de derivatización" en Resultados y discusión). De forma paralela, se determinó la humedad de las muestras de piridina que recibieron diferentes tratamientos de secado por titulación coulombimétrica Karl-Fisher por quintuplicado.

Se registró la señal correspondiente al área del ion 329 m/z y se contrastó con el contenido de agua en cada muestra de piridina a través de un análisis de varianza de un factor (ANOVA, nivel de significancia = 5%) mientras que el efecto de la selección de agente derivatizante en la señal creatinina se evaluó mediante un test t de Student (dos colas, nivel de significancia = 5%).

### Optimización de tiempo de equilibrado isotópico, tiempo y temperatura de derivatización

La optimización de las variables tiempo de equilibrado isotópico ("tI"), tiempo y temperatura de derivatización ("td" y "TD", respectivamente) se realizó a través de un diseño factorial de tres factores a dos niveles (diseño 2<sup>3</sup>). Los experimentos realizados se detallan en la Tabla 1.

**TABLA 1.** Diseño experimental y codificación para cada experimento (entre paréntesis). tI: tiempo de equilibrado isotópico, td: tiempo de derivatización (min) y TD: temperatura de derivatización (°C).

Experimento	tI (min)	TD (°C)	td (min)
1	30 (-1)	40 (-1)	20 (-1)
2	90 (1)	40 (-1)	20 (-1)
3	30 (-1)	40 (-1)	70 (1)
4	90 (1)	40 (-1)	70 (1)
6	30 (-1)	80 (1)	20 (-1)
7	90 (1)	80 (1)	20 (-1)
8	30 (-1)	80 (1)	70 (1)
9	90 (1)	80 (1)	70 (1)

Para llevar a cabo el diseño experimental se analizaron ocho tomas de 1 mL del material de referencia certificado de creatinina en suero humano y se procesaron según el procedimiento detallado anteriormente, variando en cada caso los factores.

Se utilizaron materiales de referencia certificados con el objetivo de detectar aquellos experimentos donde el sesgo del método fue acorde al propósito. Las respuestas evaluadas fueron la señal relacionada a creatinina (área de ion 329 m/z), el sesgo determinado como la diferencia entre la fracción de masa certificada y la fracción de masa resultante, la eficiencia de derivatización y la relación de eficiencias de derivatización (“relación ED” definido como el ratio 329/256 m/z: 332/259 m/z). La fracción de masa de creatinina fue calculada por *double exact-matching isotope dilution*, según la Ecuación 1 (Burke y Mackay, 2008).

$$w_x = w_z \frac{m_Y m_Z (R_Y - R_B) (R_{B,c} - R_Z) R_X}{m_X m_{Y,c} (R_B - R_X) (R_Y - R_{B,c}) R_Z} \quad [1]$$

donde  $w_x$  es la fracción de masa de creatinina en la muestra de suero humano,  $w_z$  es la fracción de masa de creatinina en la solución calibrante,  $m_Y$  es la masa de solución de creatinina- $d_3$  adicionada a la mezcla de muestra ( $B_{XY}$ ),  $m_{Y,c}$  es la masa de solución de creatinina- $d_3$  adicionada a la mezcla de calibración ( $B_{ZY}$ ),  $m_Z$  es la masa de solución de calibrante adicionada a la mezcla de calibración ( $B_{ZY}$ ),  $m_X$  es la masa de suero tomada,  $R$  son los ratios de los iones 329 m/z sobre 332 m/z en  $B_{ZY}$  ( $R_B$ ), en  $B_{XY}$  ( $R_{B,c}$ ), en la solución calibrante ( $R_X$  y  $R_Z$ ) y la solución del isótopo ( $R_Y$ ).

La eficiencia de derivatización fue evaluada como la relación entre la señal del producto tri-derivatizado (tres unidades del grupo trimetilsilil por molécula de creatinina, “3-TMS-creatinina”) y el producto di-derivatizado, “2-TMS-creatinina”. Esto corresponde a las señales de los iones 329 m/z y 256 m/z, respectivamente. La eficiencia de derivatización también se estudió para el estándar interno, creatinina- $d_3$ , en este caso monitoreando los iones 332 m/z y 259 m/z.

El análisis del efecto de los factores individuales y combinados se realizó según las Ecuaciones 2 y 3 (Costa Ferreira, 2015).

$$Efecto\ factor\ A = \frac{\Sigma Y_{+A} - \Sigma Y_{-A}}{4} \quad [Ec. 2]$$

$$Efecto\ interacción\ AB = \frac{\Sigma Y_{+A^*B} - \Sigma Y_{-A^*B}}{4} \quad [Ec. 3]$$

donde  $Y$  es la variable de respuesta obtenida, e  $Y_{+A}$  y  $Y_{-A}$  indican aquellas respuestas  $Y$  obtenidas cuando el factor  $A$  recibió una codificación positiva o negativa, respectivamente. El denominador indica los pares de respuestas  $Y_{+A}$ ,  $Y_{-A}$  presentes en este diseño de ocho experimentos. Para el estudio de la interacción entre los factores  $A$  y  $B$  se toman las respuestas  $Y_{+A^*B}$ ,  $Y_{-A^*B}$  obtenidas cuando el factor de la codificación de  $A$  y  $B$  fue positivo o negativo, respectivamente. Numéricamente, cuanto mayores sean estos resultados, mayor es el efecto del factor o interacción de los factores en el proceso estudiado. A su vez, cuando un efecto es positivo, la respuesta aumenta a medida que aumenta el factor y viceversa. La elección de las condiciones óptimas se realizó con un sistema de puntuación diseñado especialmente mediante el cual se asignó un punto por cada condición de optimización cumplida en el experimento,

estudiada para cada variable de respuesta. Luego estos puntos se sumaron. Las condiciones de optimización por variable de respuesta fueron seleccionadas como aquellos factores o combinación de factores que presentaron un efecto significativo sobre cada variable de respuesta.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Optimización de solvente y agente de derivatización

Con el objetivo de compatibilizar la determinación de creatinina con la cromatografía gaseosa como método separativo, fue necesario favorecer la volatilización de este analito mediante derivatización. La optimización de esta etapa impacta directamente en la sensibilidad del método, dado que es posible obtener una mayor señal a partir de la misma cantidad de analito. Las condiciones óptimas fueron analizadas variando la cantidad de humedad presente en el solvente (piridina) y el agente derivatizante utilizado. La humedad es un parámetro crítico a optimizar dado que los productos de derivatización alquil-sililados son sensibles a la humedad y afectan directamente el rendimiento de la reacción (Cardinael, et al., 2015).

Los resultados del estudio de optimización se muestran en la Tabla 2.

**TABLA 2.** Resultados del estudio de optimización de la etapa de derivatización. PIR 72h, PIR 4h y PIR ST corresponde a los tratamientos de secado aplicado al solvente piridina, descritos en la sección Optimización de solvente y agente de derivatización dentro de Materiales y Métodos.

Muestra de piridina	PIR 72h	PIR 4h	PIR ST	PIR ST
Agente derivatizante	MSTFA	MSTFA	MSTFA	BSTFA + 1% TMCS
Humedad (%)	0,0096	0,0262	0,0311	0,0311
Promedio de señal de área ion 329 m/z (n = 3)	20665682	21340254	21694744	42932003
Desviación estándar (n = 3)	8157537	1394249	1803771	1032117

El test de ANOVA indica que la variación de la señal correspondiente a creatinina no puede explicarse estadísticamente por la variación de la humedad del solvente ( $F < F$  crítico,  $\alpha = 5\%$ ) evaluado hasta una humedad del 0,04%. Por otro lado, la señal de creatinina se duplicó al utilizar BSTFA + 1% TMCS en contraste con MSTFA, lo que evidencia el efecto de la selección del agente de derivatización sobre la señal de creatinina (ANOVA,  $F > F$  crítico,  $\alpha = 5\%$ ). Esto es esperable ya que el agente BSTFA presenta una reactividad mayor que el MSTFA como donador de grupo silil, mientras que la adición de trimetilclorosilano (TMCS) en pequeñas proporciones acelera la reacción con grupos retadores como amidas, aminas secundarias y grupos hidroxilos presentando impedimento estérico (Poole, 2013).

## Optimización de tiempo de equilibrado isotópico, tiempo y temperatura de derivatización

Las variables de respuesta, área de creatinina y eficiencia de derivatización fueron seleccionadas dado que afectan directamente la sensibilidad del método. La variable sesgo evalúa la veracidad del método y su signo toma especial relevancia porque la creatina, presente naturalmente en el suero humano, representa una interferencia del método debido a que tiene el mismo producto de derivatización que la creatinina. La correcta separación entre creatinina y creatina durante la etapa de intercambio catiónico fue previamente estudiada. Adicionalmente, es importante optimizar los factores para buscar que la relación de eficiencias de derivatización entre analito y estándar interno se aproxime a la unidad. El apartamiento de esta condición es un indicio de que el analito y el estándar interno no presentan comportamientos químicos equivalentes, requisito de esencial importancia para la correcta aplicación de la técnica de dilución isotópica. Los resultados obtenidos en el diseño factorial se detallan en la Tabla 3.

**TABLA 3.** Fracción de masa de creatinina determinada por *double exact-matching isotope dilution* (Ecuación 1), porcentaje de recuperación que toma como referencia el valor certificado del MRC SRM 967a y cálculo del sesgo, la diferencia entre concentración certificada y fracción de masa calculada.

Exp.	$w$ (mg kg <sup>-1</sup> )	Rec. (%)	Sesgo (mg kg <sup>-1</sup> )	A creatinina	R <sub>329/256</sub> m/z	R <sub>332/259</sub> m/z	Relación ED
1	8,38	101,2%	0,101	17633	0,3853	0,3190	1,208
2	8,70	105,1%	0,421	22704	0,3373	0,3104	1,087
3	9,29	112,2%	1,011	18185	0,3411	0,2741	1,245
4	8,38	101,2%	0,100	43281	0,6056	0,4686	1,292
6	8,40	101,5%	0,125	29619	1,0342	0,8661	1,194
7	9,29	112,2%	1,006	18422	0,7968	0,6754	1,180
8	10,45	126,2%	2,168	11353	0,8331	0,5698	1,462
9	9,34	112,9%	1,064	112915	0,4795	0,4188	1,145

El efecto de los factores tI, tD y TD sobre las variables de respuesta área de creatinina, sesgo, eficiencia de derivatización y relación de ED se calcularon según las Ecuaciones 2 y 3 y se detallan en la Tabla 4.

**TABLA 4.** Evaluación del efecto de los factores individuales y combinados tI, TD y tD sobre las variables de respuesta área de creatinina, sesgo, eficiencia de derivatización y relación ED.

Efecto factor	A <sub>creatinina</sub>	R (%)	R <sub>329/256</sub>	R <sub>332/259</sub>	sesgo (mg/Kg)	Relación ED
tI	30133	-0,025	-0,094	-0,039	-0,203	-0,101
TD	17626	0,082	0,369	0,290	0,683	0,037
td	24339	0,081	-0,074	-0,110	0,673	0,119
tI x TD	15050	0,011	-0,202	-0,132	0,092	-0,065
tI x td	33196	-0,097	0,049	0,061	-0,804	-0,034
td x TD	13774	0,046	-0,186	-0,167	0,378	-0,002

Los tres factores, tI, TD y td, tuvieron un efecto positivo sobre la señal de área de creatinina, tI, en mayor medida que el resto (experimentos 2, 4, 7 y 9: “E2”, “E4”, “E7” y “E9”). Es posible que este aumento se deba a una mejora en la sensibilidad del método o a la presencia de una interferencia como podría ser el caso de E9, con una recuperación de 112%. Además, el efecto combinado de tI y td tiene un mayor impacto en el área de creatinina. Los experimentos donde esto ocurre son E1, E4, E6 y E9. La incidencia de tiempo de derivatización en el aumento de la señal de creatinina puede explicarse por un aumento en la eficiencia de derivatización, produciendo una mayor proporción de 3-TMS-creatinina y aumentando su respectiva señal.

Los resultados obtenidos presentaron sesgos variables, en algunos casos aceptables (recuperación = 101%, E1, E4 y E6) o en otros, sobrecuantificaciones mayores (recuperación = 126%, E8). Dado que en todos los casos se obtuvo un sesgo positivo y recuperaciones mayores a 100%, es importante evaluar qué factor genera un efecto negativo en sesgo y recuperación. Este es el caso de tI y el efecto combinado de tI y td en mayor medida, mientras que el aumento de td y TD afectó negativamente el sesgo. Los experimentos donde el tI presenta un nivel +1 y el producto de tI x td es positivo son E1, E4 y E6. Mediante el equilibrado isotópico se busca que el analito y el estándar interno (creatinina-d<sub>3</sub>) alcancen la equivalencia química en cuanto a su disposición en la matriz. Si esto no es alcanzado, es posible que el estándar interno se encuentre disponible en menor o mayor grado que el analito, generando una extracción diferencial de los mismos y un sesgo asociado a esto. Es por eso que, en términos generales, un mayor tiempo de equilibrado puede generar resultados menos sesgados.

En cuanto a los estudios de eficiencia de derivatización, se observó que la señal del ion 256 m/z presentó un pico con tailing excesivo en comparación con el ion 329 m/z, coherente con la presencia de un grupo amino. La señal correspondiente al producto 1-TMS-creatinina no se detectó, posiblemente porque este producto no es lo suficientemente volátil para ingresar al sistema cromatográfico.

La eficiencia de derivatización también se estudió para el estándar interno, creatinina-d<sub>3</sub>, en este caso monitoreando los iones 332 m/z y 259 m/z. La mayor eficiencia de derivatización se alcanzó a mayores TD, en E6, E7, E8 y E9. Por otro lado, td parece no afectar significativamente la eficiencia de derivatización.

Las eficiencias de derivatización de creatinina y creatinina-d<sub>3</sub> no fueron iguales en todos los casos; se encontró una eficiencia de derivatización entre 8 y 46% mayor para la creatinina. Esto presenta un problema, ya que la técnica de dilución isotópica por espectrometría de masas sostiene su alto desempeño analítico en que el comportamiento químico del analito (creatinina) y del estándar interno (creatinina-d<sub>3</sub>) es prácticamente igual. Se sospecha que la presencia de deuterio en el estándar interno desfavorece la reacción bajo algunas condiciones, por lo tanto, la eficiencia de derivatización disminuye. En vista de que la eficiencia de derivatización para creatinina es mayor que creatinina-d<sub>3</sub>, se buscaron las condiciones de relación de ED donde la relación fuera menor y se acercara a la unidad. Esto sucede cuando *t*<sub>d</sub> disminuyó (E1, E2, E6 y E7), y en menor medida cuando *t*<sub>I</sub> aumentó (E2, E4, E7 y E9). El efecto favorable de la disminución de *t*<sub>d</sub> en cuanto a la disminución de la relación ED y por ende del sesgo podría dar indicios de cinéticas de derivatización diferentes para creatinina y creatinina-d<sub>3</sub>. En este caso, es posible que la formación de 3-TMS-creatinina sea más rápida que la formación de 3-TMS-creatinina-d<sub>3</sub> y a mayor tiempo de derivatización, mayor fue la diferencia entre el rendimiento de estos productos, induciendo un sesgo positivo. No obstante, fue posible encontrar condiciones donde la relación de ED permite un sesgo aceptable (E1, E4 y E6).

En la Tabla 5 se muestran los experimentos donde se optimizaron los factores para las diferentes variables de respuesta y la sumatoria de puntuación. Para los experimentos E2, E4, E7 y E9 se cumplieron dos condiciones de optimización para alguna de las respuestas, es decir, dos factores o combinación de factores tuvieron un efecto deseado sobre esta respuesta. Por este motivo, reciben doble puntuación en las respuestas que aplican.

**TABLA 5.** Resumen de experimentos de condiciones optimizadas para las diferentes variables de respuesta y su sumatoria.

Experimento	Área <sub>creatinina</sub>	Sesgo	ED	Relación ED	Sumatoria
1	1	1		1	3
2	1			2	3
3					
4	2	1		1	4
6	1	1	1	1	4
7	1		1	2	4
8			1		1
9	2		1	1	4

A partir de la tabla se observa que los experimentos que sumaron mayor puntaje en cuanto a criterios cumplidos son E4, E6, E7 y E9. No obstante, E7 y E9 no cuentan con las condiciones necesarias para la disminución del sesgo, un parámetro de mayor importancia porque afecta directamente la veracidad del método. Por esta razón se descartaron. El experimento E6 presentó como ventaja sobre E4 que la eficiencia de derivatización fue mayor y, adicionalmente, que el tiempo de análisis fue menor (E6:  $t_I + t_d = 50$  min vs 160 min para E4). Por lo tanto, se consideró que E6 presentó las mejores condiciones para este análisis en cuanto a veracidad y tiempo de análisis.

## CONCLUSIONES

Se evaluó el efecto de factores asociados a la etapa de equilibrado isotópico y derivatización sobre el método adaptado y se pudo encontrar condiciones óptimas para que los resultados presenten un sesgo adecuado al propósito (recuperación = 101%). El método adaptado tiene una mayor exactitud al implicar la preparación gravimétrica y mayor simplicidad, ya que permite el uso de un estándar interno disponible comercialmente, sin necesidad de sintetizarlo. Como ventaja adicional, este método propuesto reduce el tiempo de preparación de muestra en las etapas estudiadas a la mitad comparándolo al método de referencia (105 minutos versus 50 minutos). Una vez validado, este método adaptado podrá utilizarse para la asignación de valores de referencia trazables al sistema internacional de unidades a programas de evaluación externa de calidad y a materiales de referencia certificados. Estas herramientas de aseguramiento de la calidad serán de utilidad para los laboratorios clínicos nacionales que realizan mediciones empleando métodos de rutina.

## RECONOCIMIENTOS

Al equipo del Departamento de Metrología Química del Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

## REFERENCIAS

- Burke, D. y Mackay, L., 2008. Complete equation for the measurement of organic molecules using stable isotope labeled internal standards, exact matching, and mass spectrometry. En: *Analytical Chemistry*, 80(13), pp.5071-5078.
- Cardinael, P., Casabianca, H., Peulon-Agasse, V. y Berthod, A., 2015. Sample derivatization in separation science. En: Anderson, J., Berthod, A., Pino, V. y Stalcup, A., eds. *Analytical separation science*. [s.l.]: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. pp. 1725-1756.
- Costa Ferreira, S.L., 2015. *Introdução às técnicas de planejamento de experimentos*. Salvador: Vento Leste. ISBN: 978-85-8140-067-9.

- De Bievre, P. y Peiser, H.S., 1997. Basic equations and uncertainties in isotope dilution-mass spectrometry for traceability to SI of values obtained by this primary method. En: *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 359(7-8), pp.523-525.
- Fernández-Fernández, M., González-Antuña, A., Rodríguez-González, P., Añón Álvarez, M.E., Álvarez, F.V. y García Alonso, J.I., 2014. Development of an isotope dilution GC-MS procedure for the routine determination of creatinine in complex serum samples. En: *Clinica Chimica Acta*, 431, pp.96-102.
- JCGM, 2012. *JCGM 200:2012. Vocabulario Internacional de Metrología Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM)*. [s.l.]: JCGM.
- Kessler, A., 2016. Mass spectrometry – a key technique for traceability in clinical chemistry. En: *Trends in Analytical Chemistry*, 84(B), pp.74-79.
- King, B., 2005. The practical realization of the traceability of chemical measurement standards. En: De Bièvre, P. y Günzler, H., eds. *Traceability in chemical measurements*. Berlin: Springer-Verlag. pp.85-92.
- Myers, G.L., Miller, W.G., Coresh, J., Fleming, J., Greenberg, N., Greene, T., Hostetter, T., Levey, A.S., Panteghini, M., Welch, M., Eckfeldt, J.H. y National Kidney Disease Education Program Laboratory Working Group, 2006. Recommendations for improving serum creatinine measurement: A report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. En: *Clinical Chemistry*, 52(1), pp.5-18.
- Poole, C., 2013. Alkylsilyl derivatives for gas chromatography. En: *Journal of Chromatography A*, 1296, pp.2-14.
- Richter, W., 1997. Primary methods of measurement in chemical analysis. En: *Accreditation and Quality Assurance*, 2(8), pp.354-359.
- Siekman, L., 1985. Determination of creatinine in human serum by isotope dilution-mass spectrometry. En: *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 23(3), pp.137-144.
- Thienpont, L., Van Uytendaele, K. y De Leenheer, A., 2002. Reference measurement systems in clinical chemistry. En: *Clinica Chimica Acta*, 323(1-2), pp.73-87.
- Thompson, M. y Ellison, S.L.R., 2005. A review of interference effects and their correction in chemical analysis with special reference to uncertainty. En: *Accreditation and Quality Assurance*, 10(3), pp.82-97.