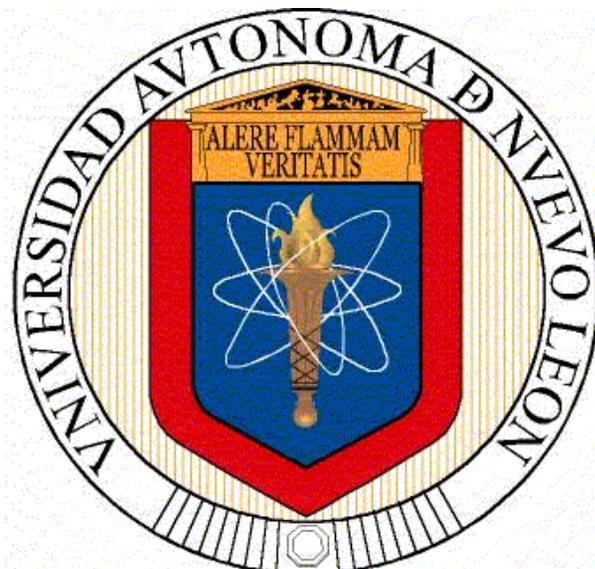


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS

**DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN FUENTES DE
ABASTECIMIENTO DE AGUA SUPERFICIAL DEL ÁREA
METROPOLITANA, POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE
ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN UV-F**

PRESENTA:

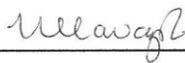
IDALIA FRANCISCA CARMONA ALVARADO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA
BIOMÉDICA**

MARZO 2015

**DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN FUENTES DE ABASTECIMIENTO
DE AGUA SUPERFICIAL DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY
POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN CON
DETECCIÓN UV-F**

Aprobación de la Tesis:



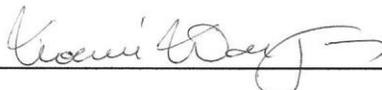
DRA. NORMA CECILIA CAVAZOS ROCHA
Directora de Tesis



DRA. MA. DE LA LUZ SALAZAR CAVAZOS
Co-Directora de Tesis



DRA. LIDIA RUNIA NACCHA TORRES
Comisión de Tesis



DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES
Comisión de Tesis



DRA. AURORA DE JESÚS GARZA JUÁREZ
Comisión de Tesis

DR.med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Postgrado

ÍNDICE

| Capítulo | Página |
|--|--------|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Contaminantes Emergentes | 1 |
| 1.2 Antibióticos como contaminantes emergentes | 2 |
| 1.3. Generalidades de los Antibióticos..... | 5 |
| 1.3.1 Clasificación de los Antibióticos. | 6 |
| 1.3.1.1 Según el efecto de su acción. | 6 |
| 1.3.1.2 Según su mecanismo de acción | 7 |
| 1.3.1.3 Por su estructura química. | 7 |
| 1.4. Propiedades de los antibióticos | 9 |
| 1.4.1. Quinolonas (Qs). | 9 |
| 1.4.1.1 Mecanismo de Acción de las Quinolonas | 10 |
| 1.4.2. Tetraciclinas (TCs) | 11 |
| 1.4.2.1. Mecanismo de Acción de las Tetraciclinas..... | 12 |
| 1.4.3. Sulfonamidas (SAs)..... | 12 |
| 1.4.3.1. Mecanismo de acción de las Sulfonamidas | 13 |
| 1.4.4. Macrólidos (MCs). | 14 |
| 1.4.4.1 Mecanismo de acción de los Macrólidos..... | 14 |
| 1.4.5. Trimetoprim (TMP) | 15 |
| 1.4.5.1 Mecanismo de acción del Trimetoprim..... | 15 |
| 1.5 Antecedentes..... | 16 |
| 1.5.1 Métodos Analíticos para la determinación de los Antibióticos | 16 |
| 1.5.2 Tratamiento de la muestra..... | 20 |
| 1.5.2.1. Microextracción por sorbente empacado (MEPS)..... | 21 |
| 1.6 Justificación | 24 |
| 1.7 Objetivos..... | 25 |
| 1.7.1 Objetivo General | 25 |
| 1.7.2 Objetivos específicos..... | 25 |
| II. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 27 |

| | |
|--|----|
| 2.1 Equipo, material y reactivos..... | 27 |
| 2.1.1 Equipo | 27 |
| 2.1.2 Materiales..... | 28 |
| 2.1.3 Reactivos..... | 29 |
| 2.2 Métodos..... | 31 |
| 2.2.1 Preparación de mezcla estándar de antibióticos | 31 |
| 2.2.1.1 Mezcla estándar 1 | 31 |
| 2.2.1.2 Mezcla estándar 2..... | 32 |
| 2.2.2 Sistema cromatográfico..... | 33 |
| 2.2.2.1 Selección de Fase Móvil. | 33 |
| 2.2.2.2 Selección de la Fase Estacionaria. | 34 |
| 2.2.3 Validación del sistema cromatográfico | 34 |
| 2.2.3.1 Linealidad..... | 35 |
| 2.2.3.3 Precisión Intradía e intermedia..... | 37 |
| 2.2.4 Extracción de antibióticos..... | 38 |
| 2.2.4.2 Establecimiento de las condiciones óptimas de la MEPS | 40 |
| 2.2.5 Validación del procedimiento de SPE..... | 41 |
| 2.2.5.1 Linealidad y límites de detección y cuantificación. | 42 |
| 2.2.5.2 Exactitud y Precisión. | 42 |
| 2.2.5.3 Validación del Método para la extracción de antibióticos | 43 |
| 2.2.5.4 Efecto de matriz. | 44 |
| 2.2.6 Análisis de Muestra Real..... | 44 |
| III. RESULTADOS..... | 46 |
| 3.1 Desarrollo del método cromatográfico. | 46 |
| 3.2 Selección de la fase estacionaria. | 49 |
| 3.3 Validación del sistema cromatográfico | 51 |
| 3.3.1 Linealidad | 51 |
| 3.3.2 Precisión..... | 52 |
| 3.3.3 Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC) | 53 |
| 3.4 Extracción en Fase Sólida. | 54 |
| 3.4.1 Validación del Proceso de extracción en fase sólida..... | 56 |

| | |
|---|----|
| 3.4.2 Validación del Método. | 58 |
| 3.4.3 Efecto de Matriz. | 60 |
| 3.5 Análisis de muestras..... | 64 |
| IV. DISCUSIÓN..... | 66 |
| 4.1 Condiciones cromatográficas | 66 |
| 4.1.1 Selección del gradiente y fase móvil | 66 |
| 4.2 Validación del sistema cromatográfico | 69 |
| 4.2.1 Linealidad | 70 |
| 4.2.2 Precisión..... | 70 |
| 4.3 Establecimiento de las condiciones óptimas de la SPE..... | 71 |
| 4.4 Evaluación del Proceso SPE | 74 |
| 4.4.1 Linealidad | 75 |
| 4.4.2 Precisión y Recuperación | 75 |
| 4.4.3 Límite de Detección (LD) y de Cuantificación (LC)..... | 76 |
| 4.5 Validación del método de SPE en agua de río | 77 |
| 4.5.1 Linealidad | 77 |
| 4.5.2 Precisión y Recuperación..... | 78 |
| 4.6 Efecto de Matriz..... | 78 |
| 4.7 Análisis de muestra real | 79 |
| V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS | 81 |
| 5.1 Conclusiones | 81 |
| 5.2 Perspectivas | 83 |
| BIBLIOGRAFÍA | 84 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|---|---------------|
| I. Clasificación de antibióticos según su acción sobre las bacterias | 6 |
| II. Clasificación de antibióticos de acuerdo a su estructura química | 8 |
| III. Características fisicoquímicas de las quinolonas | 10 |
| IV. Sistema de solventes considerados para la selección de la Fase Móvil. | 33 |
| V. Características de las columnas evaluadas | 34 |
| VI. Niveles de concentración para las | 35 |
| VII. Soluciones para la medida de la precisión | 37 |
| VIII. Factores y niveles investigados durante la prueba de Plackett-Burman. | 38 |
| IX. Número de experimentos realizados y la combinación de las variables. | 39 |
| X. Número de experimentos realizados y la combinación de las variables para MEPS | 40 |
| XI. Niveles de concentración para | 41 |
| XII. Tiempo de retención de los antibióticos y espectros de UV | 47 |
| XIII. Gradiente seleccionado para la | 48 |
| XIV. Parámetros cromatográficos | 49 |
| XV. Ecuación de la recta y coeficientes de determinación de los antibióticos durante la validación del sistema cromatográfico | 51 |
| XVI. Precisión Intradía e Intermedia | 53 |
| XVII. Límites de detección y cuantificación. | 53 |
| XVIII. Diseño de Plackett-Burman, variables y número de picos. | 54 |
| XIX. Condiciones seleccionadas de la SPE | 55 |
| XX. Resultados de linealidad del procedimiento de | 57 |

| | | |
|--------|--|----|
| XXI. | % Recuperación de los diferentes antibióticos..... | 58 |
| XXII. | Límite de detección y cuantificación del método de SPE..... | 58 |
| XXIII. | Resultados de linealidad del método. | 59 |
| XXIV. | % Recuperación de los diferentes antibióticos..... | 59 |
| XXV. | Recuperaciones obtenidas en agua bidestilada y en matriz. | 60 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|---|---------------|
| 1. Estructura de Fluoroquinolona | 9 |
| 2. Estructura general de tetraciclina..... | 11 |
| 3. Estructura básica de las sulfonamidas..... | 12 |
| 4. Estructura de la Tilosina..... | 14 |
| 5. Estructura del trimetoprim | 15 |
| 6. Cartucho MEPS | 22 |
| 7. Cromatograma de la mezcla estándar de trabajo. | 46 |
| 8. Cromatogramas de la mezcla estándar de trabajo. FE: columna a) C ₁₈ Atlantis T ₃ , b) Luna C ₁₈ y c) Synergi 4μ polar..... | 50 |
| 9. Curva de calibración | 52 |
| 10. Cromatograma obtenido de la SPE de la mezcla estándar de antibióticos..... | 56 |
| 11. Curvas de calibración en agua (azul) y en matriz (rojo) de los antibióticos. | 62 |
| 12. Curvas de calibración en agua (azul) y en matriz (rojo) de los antibióticos. | 63 |
| 13. Análisis de agua de Presa Rodrigo Gómez..... | 64 |
| 14. Análisis de agua de Río La Silla..... | 65 |
| 15. Análisis de agua de Río Pilon.. | 65 |

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

| | |
|-----------------|---|
| ACN | Acetonitrilo |
| AMOX | Amoxicilina |
| ATF | Ácido Trifluoroacético |
| CIPRO | Ciprofloxacina |
| CLAR | Cromatografía Líquida de Alta Resolución |
| DAD | Detector de Arreglo de Diodos |
| DER | Desviación estándar relativa |
| DLLME | Microextracción líquida-líquida dispersiva |
| DOX | Doxicilina |
| DVB | Divinilbenceno |
| ENRO | Enrofloxacin |
| Flu | Fluorescencia |
| FQs | Fluoroquinolonas |
| HF-LPME | Microextracción fase líquida-fibra hueca |
| HLB | Balance hidrofílico-lipofílico |
| LC-MS/MS | Cromatografía de líquidos espectrometría de masas en tandem |

| | |
|--------------|--|
| MCs | Macrólidos |
| MCX | Intercambio catiónico mixto |
| MEPS | Microextracción por sorbente empacado |
| mL | Mililitro |
| N.L. | Nuevo León |
| ng/L | Nanogramo por litro |
| NOR | Norfloxacin |
| °C | Grados Celsius |
| OXI | Oxitetraciclina |
| PABA | Ácido para amino benzoico |
| PPCPs | Fármacos y productos de cuidado personal |
| PTFE | Politetrafluoroetileno |
| QqLIT | Trampa iónica cuadrupolo lineal |
| Qs | Quinolonas |
| SAs | Sulfonamidas |
| SDX | Sulfadimetoxina |
| SMX | Sulfametoxazol |

| | |
|--------------|--|
| SNA | Sulfanilamida |
| SPE | Extracción en fase sólida |
| TCs | Tetraciclinas |
| TETRA | Tetraciclina |
| TMP | Trimetoprim |
| TMP | Trimetoprim |
| TYL | Tilosina |
| UHPLC | Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución |
| UV | Ultravioleta |
| µg/L | Microgramo por litro |
| µL | Microlitros |

CAPÍTULO 1

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminantes Emergentes

Durante los últimos años se ha generado un gran interés por los contaminantes denominados globalmente emergentes, los cuales son considerados potencialmente peligrosos. En la mayoría de los casos son sustancias sintéticas o naturales que entran, o son generados en el medio ambiente en cantidades apreciables, tienen un mínimo de persistencia y presentan efectos ecológicos adversos o en la salud humana. Estos contaminantes no están regulados (1), sin embargo, en un futuro podrían ser candidatos a regulación una vez que se evalúen el riesgo potencial para la salud y se documenten datos de monitoreo con respecto a su presencia en el medio ambiente (2).

La lista de contaminantes emergentes incluye una gran variedad de productos de uso diario con aplicaciones tanto industriales como domésticas. En esta lista se encuentran productos farmacéuticos, productos de cuidado personal, agentes tensoactivos, plastificantes y aditivos industriales, nuevos compuestos químicos y productos generados por uso y/o disposición de los productos químicos ya existentes. Existe poca información sobre el efecto que los contaminantes emergentes puedan causar en la salud humana y en la ecología (3; 4).

Con respecto al medio ambiente acuático, los contaminantes emergentes están presentes en el rango de ng/L a µg/L. La baja concentración y la gran diversidad complican los procedimientos para su detección y análisis (2; 5; 6; 7; 8).

1.2 Antibióticos como contaminantes emergentes

Los antibióticos se han considerado como contaminantes ambientales emergentes bajo la categoría de Fármacos y productos de cuidado personal (PPCPs) (5). Son compuestos sintéticos o naturales utilizados para mejorar la salud humana, de animales y plantas, previniendo y tratando infecciones causadas por bacterias patógenas. Además de estas aplicaciones y a pesar de ser ampliamente prohibidos como promotores del crecimiento en animales de granja aún se siguen utilizando como aditivos en piensos en la industria agrícola, la acuicultura y en la industria de aves de corral. El uso inadecuado

de antibióticos también deriva la prescripción excesiva y la selección inadecuada de tratamiento (tipo y dosis) por médicos y personal de las farmacias, así como la autoprescripción y falta de adherencia al tratamiento por parte de los consumidores. Como consecuencia de todo esto, se ha generado un gran aumento en el consumo de antibióticos (7; 9; 10).

La presencia de antibióticos se ha demostrado en el agua superficial, profunda, suelo y sedimento; en aguas residuales municipales e inclusive en el agua potable (5; 6; 11). Estos compuestos no necesitan estar constantemente en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que sus altas tasas de transformación/eliminación se pueden compensar por su continua entrada al medio ambiente, por lo que se les considera como contaminantes "pseudopersistentes" (12).

La presencia de los antibióticos en el medio ambiente acuático es preocupante, debido al hecho de que, aún a bajas concentraciones (ng/L o µg/L) pueden tener efectos agudos en plantas acuáticas y organismos vivos que no son su objetivo, como peces, algas, bacterias entre otros, e inducir al desarrollo de respuestas alérgicas en individuos susceptibles, y lo más preocupante es que están siendo relacionados con la aparición y distribución de cepas bacterianas resistentes a antibióticos (5; 6; 7).

Los antibióticos son liberados al medio ambiente acuático por diferentes vías: después de la administración, generalmente son parcialmente absorbidos

por el cuerpo humano y excretados sin cambio como compuesto principal, o transformados como metabolitos a través de la vía urinaria y heces. Estos residuos de antibióticos son posteriormente descargados dentro de plantas tratadoras de aguas residuales municipales. Cabe destacar que muchos investigadores han demostrado la eliminación incompleta de los fármacos durante el proceso de tratamiento en las plantas de agua residual, por lo que son consideradas como las principales vías de entrada de estos fármacos al ecosistema acuático (13; 14; 12). Los hospitales también contribuyen de manera importante a la contaminación del ambiente acuático por antibióticos (5; 6; 15). Otra forma de contribuir a la contaminación ambiental, además de la excreción metabólica, es la eliminación por el desagüe de medicamentos caducos o no utilizados. Por otro lado, los antibióticos administrados para tratar infecciones del tracto digestivo y urinario de animales son pobremente metabolizadas y permanecen en su forma activa durante su paso a través del intestino, en consecuencia, son excretadas al suelo vía heces y orina. Las evacuaciones son usadas como estiércol y aplicadas a los campos agrícolas como fertilizantes (2; 11; 16; 17). Los compuestos no metabolizados, o sus metabolitos biológicamente activos presentes en el estiércol, pueden moverse desde los campos hacia las aguas profundas y eventualmente entrar a las aguas superficiales, tales como ríos y lagos, y afectar a los organismos acuáticos (15).

Los fármacos pueden permanecer en matrices ambientales sólidas por un largo tiempo, la persistencia depende de su fotoestabilidad, capacidad de

unión y adsorción, velocidad de degradación y lixiviación en el agua. Los fármacos que se adsorben fuertemente tienden a acumularse en los suelos o sedimentos, tal es el caso de las tetraciclinas y las fluoroquinolonas, y por el contrario, aquellos que son altamente móviles, como las sulfonamidas, resisten a la degradación y tienden a filtrarse en las aguas subterráneas y pueden ser transportadas desde las aguas de drenaje al agua superficial (15).

1.3. Generalidades de los Antibióticos

Los antibióticos son compuestos químicos producidos por microorganismos que destruyen (bactericidas) o inhiben el crecimiento de otros microorganismos (bacteriostáticos); pueden ser de amplio espectro, activos contra una amplia gama de microorganismos, o tener efecto activo contra un grupo específico, siendo capaces de interferir con un proceso metabólico específico de esos microorganismos. Los primeros antibióticos fueron de origen natural, los cuales se obtienen de cultivos de bacterias (*Bacillus*, *Streptomyces*) u hongos (*Penicillium*, *Cephalosporium*), que resultan ser tóxicos para otros microorganismos. Actualmente son obtenidos mediante síntesis química (compuestos antimicrobianos sintéticos) o por modificación de algunas de las características químicas del núcleo básico de un antibiótico producido por un microorganismo (compuestos antimicrobianos semisintéticos) para mejorar sus propiedades farmacocinéticas, su espectro de actividad o para disminuir su toxicidad. Por lo tanto, se define como agente antimicrobiano la sustancia producida por microorganismos o sintetizada químicamente, que en bajas

concentraciones es capaz de inhibir e incluso destruir microorganismos sin producir efectos tóxicos en el huésped (18).

1.3.1 Clasificación de los Antibióticos.

1.3.1.1 Según el efecto de su acción.

Los antibióticos se clasifican de acuerdo al efecto de su acción (tabla I) en bacteriostáticos cuando bloquean el desarrollo y la multiplicación de las bacterias, pero no las lisan, por lo que al retirar el antimicrobiano se revierte su efecto, y bactericidas que provocan la muerte bacteriana haciendo el proceso irreversible. Cabe mencionar que esta clasificación varía según la existencia de algunos factores como el tipo de germen, el crecimiento celular, la concentración del antibiótico, el tiempo de contacto o las características del medio (19).

TABLA I. Clasificación de antibióticos según su acción sobre las bacterias

| Bacteriostáticos | Bactericidas |
|------------------|----------------------|
| Tetraciclinas | β - lactámicos |
| Sulfamidas | Aminoglucósidos |
| Macrólidos | Quinolonas |
| Lincosamidas | Rifampicina |
| Amfenicoles | Glicopéptidos |

1.3.1.2 Según su mecanismo de acción

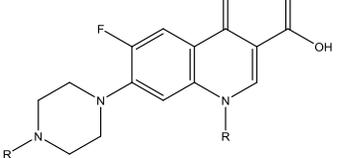
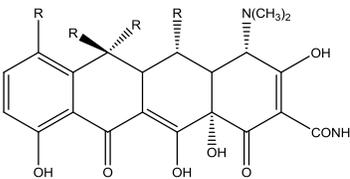
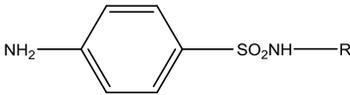
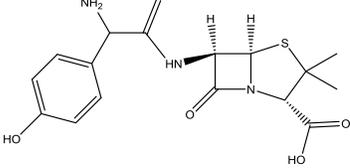
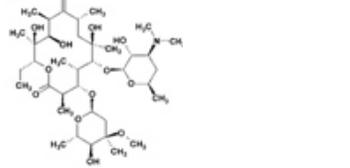
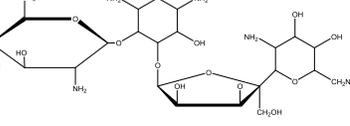
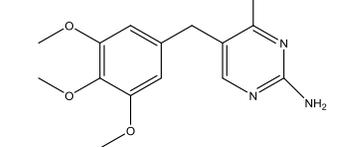
En general, los antibióticos actúan:

- a) Previniendo la síntesis de compuestos de la pared celular bacteriana (penicilinas)
- b) Dañando la membrana citoplasmática bacteriana.
- c) Interfiriendo con la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (20).

1.3.1.3 Por su estructura química.

Esta clasificación es la más utilizada en la literatura científica; los miembros de un mismo grupo tienen estructuras similares, actúan por mecanismos similares y tienen un comportamiento similar en el medio ambiente (15). De acuerdo a esta clasificación, existen más de 10 clases de antibióticos, seis de ellas son las más importantes tanto en medicina humana como en medicina veterinaria (tabla II) (7; 9).

TABLA II. Clasificación de antibióticos de acuerdo a su estructura química

| Clase Antibiótico | Estructura | Ejemplos |
|-------------------|--|--|
| Quinolonas |  | Norfloxacin Sarafloxacin Ciprofloxacin |
| Tetraciclinas |  | Doxilina Tetraciclina |
| Sulfonamidas |  | Sulfametoxazol Sulfadimetoxina |
| β lactámicos |  | Amoxicilina Ampicilina |
| Macrólidos |  | Azitromicina Claritromicina |
| Aminoglicósidos |  | Gentamicina Neomicina |
| Trimetoprim |  | |

1.4. Propiedades de los antibióticos

A continuación se mencionan algunas propiedades y mecanismo de acción de las familias de antibióticos incluidas en este trabajo.

1.4.1. Quinolonas (Qs).

La estructura de las moléculas de Qs contienen grupos carboxílicos los cuales confieren la característica ácida a estos compuestos; además, la segunda generación las Fluoroquinolonas (FQs) tienen un grupo amino en el anillo heterocíclico llamado piperacínico (Figura 1) (15).

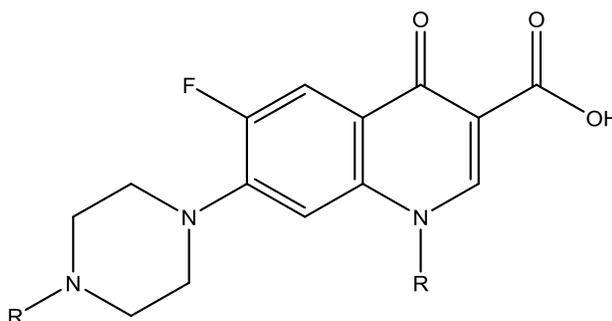


Figura 1. Estructura de Fluoroquinolona

Los valores referenciados de pKa para las quinolonas ácidas están entre 6.0-6.9, por lo que en condiciones ácidas están en su forma neutra. Mientras que en el caso de las quinolonas piperacínicas, los valores encontrados son entre 5.5-6.3 y 7.6-8.5 para pK_{a1} y pK_{a2} , respectivamente. Su forma intermedia es un zwitterión; a condiciones ácidas se encuentran en su forma catiónica, mientras que a condiciones básicas tanto las quinolonas ácidas como las

piperacínílicas se encuentran en forma aniónica (15). La tabla III muestra algunas características fisicoquímicas de las quinolonas. Forman quelatos insolubles con cationes di o trivalentes (21).

TABLA III. Características fisicoquímicas de las quinolonas

| Quinolonas | Peso molecular (g) | Punto de fusión (°C) | Solubilidad en agua (mg/mL) | LogP* (hidrofobicidad) |
|------------------|--------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------|
| Ácido nalidíxico | 232 | 229.5 | 2.30 | -1.9 |
| Ácido pipemídico | 303 | 254 | 0.32 | 0.85 |
| Norfloxacin | 319 | 227 | 1.01 | 0.46 |
| Ciprofloxacina | 331 | 256 | 1.35 | 0.14 |
| Levofloxacina | 361 | 218 | 1.44 | -0.68 |
| Fleroxacin | 369 | 270 | 1.7** | -0.66 |
| Gatifloxacina | 375 | 183.5 | 0.6 | 0.23 |
| Lomefloxacina | 351 | 240 | 0.1 | -0.01 |
| Moxifloxacina | 401 | 240 | 0.7 | -0.02 |

* Cuanto más positivo es el valor, más hidrofóbica es la quinolona

** Estimado

Tomado de Serra A. Quinolonas(2008).

1.4.1.1 Mecanismo de Acción de las Quinolonas.

Las quinolonas son antibióticos cuyo blanco primario son las ADN girasa en organismos gram negativos y la topoisomerasa IV en gram positivos. Ambas enzimas son esenciales para la replicación y transcripción del ADN donde la inhibición de estas funciones conduce a una muerte celular (22).

1.4.2.1. Mecanismo de Acción de las Tetraciclinas.

Las tetraciclinas ejercen su acción a nivel de ribosoma de las bacterias gram negativas, para esto se requiere que penetren a la célula del microorganismo por mecanismos de difusión pasiva a través de los canales hidrófilos (porinas) y por procesos de transporte activo dependiente de energía. Una vez dentro de la célula, las tetraciclinas se unen de manera reversible a los receptores en la subunidad 30s del ribosoma bacteriano y de esta manera bloquean la fijación del aminoacil-tRNA al sitio aceptor en el complejo mRNA-ribosoma, esto evita la incorporación de nuevos aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento, inhibiendo así la síntesis de proteínas. Es importante mencionar que la selectividad de las tetraciclinas para inhibir la síntesis de proteínas en las bacterias es debido a que las células de mamífero carecen del sistema de transporte activo de las bacterias y además, las características del ribosoma bacteriano son diferentes a las del ribosoma de mamíferos (23).

1.4.3. Sulfonamidas (SAs)

Las Sulfonamidas contienen un grupo amino básico ($-NH_2$) y un grupo sulfonamida ácido ($-SO_2NH-$) como se puede observar en la figura 3 (15).

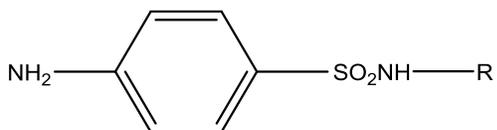


Figura 3. Estructura básica de las sulfonamidas.

Son anfolitos con características ácido-básico débiles debido a la presencia del grupo amino aromático básico, cuyo pK_{a1} es de 2-2.5 y el grupo sulfonamido, el cual contiene un átomo de hidrógeno lábil con propiedades ácidas con pK_{a2} de 5-8 (24). La característica débilmente básica, se presenta debido a que el nitrógeno del sustituyente de la anilina es capaz de ganar un protón, mientras que la característica ácida son debidas al enlace N-H del grupo sulfonamida, el cual es capaz de liberar un protón bajo condiciones de pH específicas. Las SAs se encuentran con carga positiva en condiciones ácidas a pH menor de 2, neutras a pH entre 3 y 5, y con carga negativa a pH igual o mayor de 5. Las SAs no forman complejos con cationes divalentes o polivalentes (15).

1.4.3.1. Mecanismo de acción de las Sulfonamidas.

La acción bacteriostática es debido a la similitud estructural entre la sulfonamida y el ácido p-aminobenzoico (PABA), el cual está involucrado en la biosíntesis del ácido fólico, del ácido dihidrofólico y otras sustancias utilizadas por los microorganismos. Las sulfonamidas actúan como análogos estructurales del PABA, inhibiendo competitivamente a la enzima dihidropteroato sintetasa evitando así la formación del ácido dihidrofólico, necesario para la producción de purinas y la síntesis de ácidos nucleicos, por lo que al bloquear la síntesis del ácido fólico se inhibe el crecimiento y reproducción de la bacteria. Esta característica de las SAs en su mecanismo de acción les confiere alta sensibilidad a los microorganismos que sintetizan su propio ácido dihidrofólico,

mientras que los microorganismos y células que utilizan el ácido dihidrofólico como producto terminado no son sensibles a las SAs (24).

1.4.4. Macrólidos (MCs).

Los macrólidos se clasifican como lactonas macrocíclicas, con miembros que contienen entre 12 y 20 átomos de carbono en el anillo lactona, a los cuales se unen varias combinaciones de desoxiazúcar mediante enlaces glucosídicos (25). La estructura de los macrólidos contiene un grupo dietilamino básico [$-N(CH_3)_2$], el cual es capaz de ganar un protón (Figura 4) (15; 26). Los macrólidos son compuestos básicos con valores de pK_a alrededor de 8, el pK_a de la tilosina es de 7.1 (15; 25).

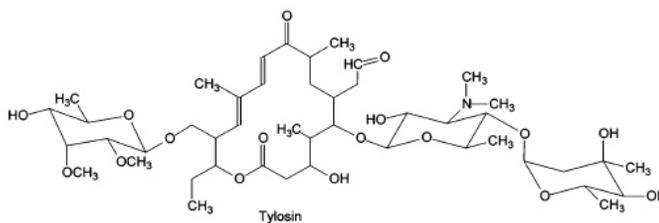


Figura 4. Estructura de la Tilosina. *Tomada de Wang (2006)*

1.4.4.1 Mecanismo de acción de los Macrólidos.

Los macrólidos actúan en la subunidad 50s ribosomal bloqueando y/o disminuyendo la capacidad de unión del RNAt, lo que impide la síntesis de nuevas proteínas en las células bacterianas (25).

1.4.5. Trimetoprim (TMP)

El trimetoprim (Figura 5) es un antibiótico bacteriostático derivado de la trimetoxibenzilpirimidina.

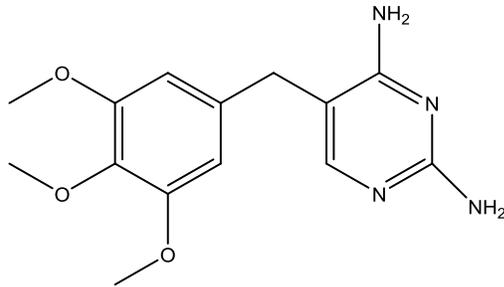


Figura 5. Estructura del trimetoprim

1.4.5.1 Mecanismo de acción del Trimetoprim.

El trimetoprim actúa sobre la ruta del tetrahidrofolato de la misma forma que las sulfonamidas. Las bacterias, los protozoos y *Pneumocystis jirovecii* son incapaces de obtener ácido fólico del entorno por lo que tienen que sintetizarlo. El TMP, al igual que las SAs, inhibe esta síntesis, lo cual interfiere en última instancia con la producción de nucleótidos, particularmente de timina. El TMP inhibe la enzima reductasa de dihidrofolato necesaria para la conversión del ácido dihidrofólico en ácido tetrahidrofólico (27).

1.5 Antecedentes

1.5.1 Métodos Analíticos para la determinación de los Antibióticos

El análisis de antibióticos en el medio ambiente representa una tarea difícil, debido a la alta complejidad de las matrices analizadas y a que se encuentran presentes en el agua a bajos niveles de concentración (desde ng/L hasta $\mu\text{g/L}$), por esta razón se hace necesario el desarrollo de métodos analíticos muy sensibles, adecuados para el monitoreo de estos analitos (15).

Muchos antibióticos de diferentes clases se han encontrado en el medio ambiente acuático, por lo que se prefieren métodos analíticos multiresiduos para la determinación y monitoreo de los diferentes grupos de antibióticos. Los métodos deben ser sensibles, selectivos, no consumir mucho tiempo, económicos y fácilmente aplicables al análisis de muestras ambientales (15). Entre la metodología analítica que se ha reportado para la determinación de múltiples residuos de antibióticos en muestras de agua se encuentra la cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tandem (LC- MS/MS), la cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UHPLC) acoplada a espectrometría de masas en tandem (UHPLC-MS/MS), y la cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tandem con trampa iónica y cuadrupolo lineal (UHPLC-QqLIT).

Yang Hu y colaboradores desarrollaron un método de LC-MS/MS en modo de ionización en electroespray positivo, para la determinación de 26

antibióticos ampliamente empleados en medicina veterinaria donde se incluían 6 macrólidos, 2 pleuromutilinas, 4 tetraciclinas, 2 lincomicinas, 6 fluoroquinolonas y 6 sulfonamidas. Los compuestos fueron separados en una columna Zorbax SB-Aq (150 x 2.1 mm, 3.5 μ m). Los límites de detección reportados fueron de 0.1 a 6.5 ng/Ly los límites de cuantificación de 0.3 a 19 ng/L. El método desarrollado fue aplicado para el análisis de estos antibióticos en muestras de agua de estanque de peces, agua subterránea y muestras de agua residuales (28).

Nageswara y colaboradores emplearon la cromatografía de líquidos con espectrometría de masas con electroespray (LC-ESI-MS), para la determinación de fluoroquinolonas (norfloxacin, ciprofloxacina, levofloxacina, lemofoxacin, gatifloxacina, moxifloxacina y sparfloxacina), sulfametoxazol, trimetoprim y cefalosporinas (cefaclor, cefadroxilo, cefdinir, cefprozil, ceftiofur y cefuroxima) en aguas del medioambiente acuático, empleando una columna Inertsil ODS-3V C₁₈ (250 x 4.6 mm, 5 μ m) alcanzando límites de detección de 0.6-8.1 μ g/L (29).

Por otro lado Madureira, y colaboradores emplearon la detección con espectrometría de masas en tandem con analizador de trampa iónica para la cuantificación de trimetoprim, propanolol, sulfametoxazol, fluoxetina, carbamacepina, diazepam y ácido fenofíbrico, en muestras de agua de estuarios. La separación de los analitos se realizó en una columna Shimadzu

C₁₈ (150 x 2.1 mm, 5 µm). Se reportaron límites de detección en el rango de 0.03-16.4 ng/L (30).

También se ha empleado la cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas con analizador cuadro polo-tiempo de vuelo (UHPLC-QTOF-MS) para la determinación de 42 antibióticos de 9 diferentes familias en muestras de agua residual y superficial. La separación se realizó en una columna analítica Acquity UPLC BEH C₁₈(50x 2.1 mm, 1.7 µm). Los límites de detección instrumental encontrados estuvieron en el rango de 0.05 a 1 µg/L (31).

El análisis simultáneo de 10 antibióticos que incluye a las tetraciclinas, sulfonamidas, macrólidos y quinolonas por cromatografía de líquidos espectroscopia de masas en tandem con ionización en electroespray (LC-MS/MS) fue realizado por Zhou y colaboradores. Se utilizó una columna Zorbax Bonus-RP y el método se aplicó para el análisis de antibióticos en muestras de agua de grifo, agua de río y efluentes de agua residual. Los límites de detección del método para los antibióticos estudiados en las diferentes muestras de agua fueron de 0.1 a 5 ng/L (32).

Gros y colaboradores realizaron la determinación simultánea de 53 antibióticos de diferentes familias (fluoroquinolonas, quinolonas, penicilinas, cefalosporinas, macrólidos, tetraciclinas, lincosamidas, sulfonamidas, inhibidores de la hidrofolato reductasa y nitromidazoles) y sus metabolitos, en

agua residual urbana, agua residual de hospitales y agua de río. Para el análisis se utilizó la cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UHPLC) acoplada a espectrometría de masas en tandem con trampa iónica y cuadrupolo lineal alcanzando límites de detección en el rango de 0.68-77.49 ng/L (33).

Por otro lado, se ha empleado la cromatografía de líquidos de alta resolución con detectores ultravioleta y/o fluorescencia, en donde se analizan solo una o dos familias de antibióticos.

Herrera y colaboradores emplearon la cromatografía de líquidos de ultra alta resolución con detector de arreglo de diodos para la determinación de 11 sulfonamidas (sulfanilamida, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina, sulfametoxipiridazina, sulfadoxina, sulfametoxazol, sulfisoxazol, sulfadimetoxina y sulfaquinoxalina) y 14 quinolonas (ácido pipemídico, morbofloxacin, fleroxacin, levofloxacin, pefloxacin, ciprofloxacin, lomefloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, sarafloxacin, difloxacin, moxifloxacin, ácido oxolínico y flumequina) en agua mineral y agua de lluvia . Se utilizó una columna Hypersil Gold C₁₈ (100 x 2.1 mm, 1.9 µm). Los límites de detección del método estuvieron en el rango de 0.35-10.5 µg/L (12).

Se ha publicado la determinación de 4 fluoroquinolonas (norfloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin y enrofloxacin) en agua de grifo, empleando la

cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorescencia, alcanzando límites de detección en el rango de 1 a 67 ng/L. (34).

Hasta el momento no se cuenta con reportes en donde se realice la determinación de más de tres familias de antibióticos por CLAR con detección UV o Flu.

1.5.2 Tratamiento de la muestra.

Debido a los bajos niveles de concentración de los antibióticos (ng/L o µg/L) presentes en el agua, es necesario el desarrollo de métodos de extracción que permitan purificar y pre-concentrar los analitos antes de su análisis. Se ha reportado el uso de diferentes técnicas para la extracción y pre-concentración de una o dos familias de antibióticos como son la microextracción líquida-líquida dispersiva (DLLME) para la determinación de 11 sulfonamidas y 14 quinolonas (12) y la microextracción fase líquida basado en fibra hueca (HF-LPME) para el análisis de fluoroquinolonas (35), sin embargo para la extracción y concentración de múltiples fármacos que incluyen antibióticos de diferentes familias, la extracción en fase sólida (SPE) es la técnica mayormente empleada.

Entre los tipos de adsorbentes para SPE que se han utilizado en estudios multiresiduos se mencionan ampliamente a los cartuchos Oasis HLB y los Strata X, aunque también se ha publicado el uso de los cartuchos Oasis MCX (intercambio catiónico mixto), los de speedisk DVB-phobic (divinilbenceno hidrofóbico) y cartuchos C2/ENV+. Sefrtrová y colaboradores realizaron un

estudio en donde comparan los resultados del uso de diferentes cartuchos durante la extracción de antibióticos. Las recuperaciones obtenidas para las diferentes clases fueron muy variadas debido a las diferentes polaridades de los compuestos. Los cartuchos Oasis HLB mostraron recuperaciones más confiables y mejor reproducibilidad para los compuestos polares y no polares. Además estos cartuchos presentan la ventaja de que se pueden trabajar en un amplio rango de pH (1-14). (15; 29).

Con el uso de cartuchos de extracción Oasis HLB se han obtenido recuperaciones desde 40.5-92.2% para diferentes clases de fármacos (trimetoprim, propalolol, sulfametoxazol, fluoxetina, carbamicepina, diazepam y ácido fenofíbrico) con valores de desviación estándar relativa (DER) menores del 15.9% y límites de detección de ng/L. (30; 34).

1.5.2.1. Microextracción por sorbente empacado (MEPS).

Una tendencia en la química analítica es la miniaturización en las técnicas de preparación de las muestras. La microextracción por sorbente empacado (MEPS) es un nuevo desarrollo en el campo de la preparación y manipulación de muestra. Es la miniaturización de la SPE convencional que trabaja con volúmenes de muestra tan pequeños de hasta 10 μ L. La técnica fue introducida por Abdel-Rehim en el 2004. MEPS está basado en los mismos principios que gobiernan la SPE, pero a una escala reducida, con la ventaja de

que presenta tiempos de análisis más cortos, menor o casi nulo consumo de solventes, por lo que se produce menor generación de residuos. Otra de las ventajas de esta técnica es que el cartucho puede ser reutilizado.

En MEPS, de 1 a 4 mg del adsorbente es empacado dentro de una jeringa (100-500 μL) en un pequeño contenedor o cartucho entre el barril y la aguja de la jeringa (Figura 6).

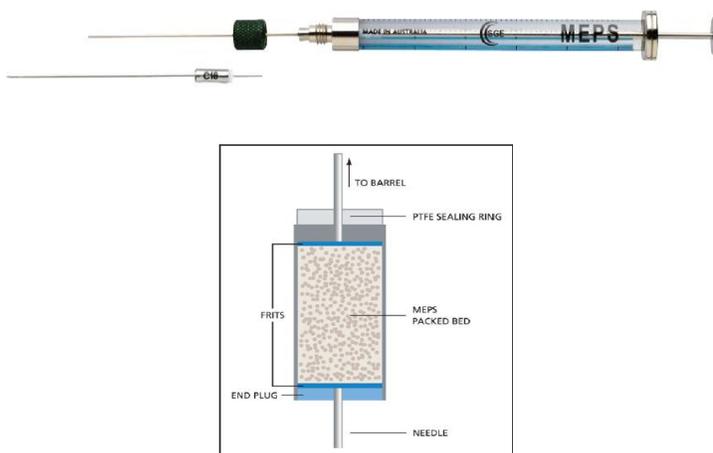


Figura 6. Cartucho MEPS *Tomada de SGE Analytical Science*

Los adsorbentes comercialmente disponibles hasta el momento son C_8 , C_{18} , C_2 , sílica y un cartucho mixto que contiene C_8 más un grupo para intercambio catiónico fuerte.

MEPS se ha empleado principalmente en aplicaciones bioanalíticas, para la extracción de fármacos en diferentes matrices biológicas, como orina humana, músculo y orina de cerdo (36; 37). Recientemente se ha propuesto su uso para el análisis ambiental (38; 39). Hasta el momento se cuenta con un

reporte de Prieto y colaboradores en donde aplicaron esta técnica para la determinación de FQs (ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina) en agua residual municipal, alcanzando recuperaciones de 93-115% y límites de detección de 0.5-3.8 ng/L (40) .

1.6 Justificación

Actualmente existe un gran interés en la detección de contaminantes emergentes en el medio ambiente, en particular de los antibióticos por el hecho de que están siendo relacionados con diferentes problemas de salud así como con la aparición de cepas bacterianas resistentes. La mayor parte de los métodos para el análisis de antibióticos son métodos cromatográficos que emplean la espectrometría de masas para su detección, y son pocos los que utilizan la detección ultravioleta visible y fluorescencia. Si bien, los métodos cromatográficos con detección por masas-masas son altamente sensibles y específicos, sus altos costos de adquisición y mantenimiento los hace poco accesibles a los laboratorios de rutina. En México son pocos los laboratorios que cuentan con el equipo y personal capacitado para este tipo de análisis.

Tomando en cuenta que en México no se tienen reportes de la determinación o monitoreo de estos analitos en agua, y los pocos métodos reportados solo incluyen el análisis de una o dos familias de antibióticos, se considera necesario el desarrollo de un método analítico eficiente, sensible y de bajo costo que permita el análisis multiresiduo de algunos de los antibióticos más empleados en nuestro país, por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección ultravioleta y fluorescencia (CLAR UV-Flu).

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo General

Desarrollar un método cromatográfico para la separación y determinación simultánea de antibióticos en agua por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detección Ultravioleta y Fluorescencia.

1.7.2 Objetivos específicos

1. Desarrollar y Optimizar el sistema cromatográfico para la separación y determinación simultánea de antibióticos por CLAR UV - Fluorescencia
2. Validar el sistema cromatográfico desarrollado
3. Desarrollar y Optimizar un procedimiento para la extracción simultánea de antibióticos en muestras de agua
4. Validar el método propuesto

5. Aplicar el método desarrollado y validado en muestras de agua de fuentes de abastecimiento del área metropolitana de la Ciudad de Monterrey, N.L.

CAPÍTULO 2

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Equipo, material y reactivos

2.1.1 Equipo

- a) Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Waters 2695, equipado con un sistema de bombeo cuaternario, automuestreador, horno para columna, detector UV de arreglo de diodos (Waters 2996) y un detector de fluorescencia (Waters 2427).
- b) Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución HP 1100, equipado con sistema de bombeo cuaternario, automuestreador, sistema de control de temperatura, detector de UV y fluorescencia.
- c) Balanza analítica, OHAUS 3510

- d) Baño de ultrasonido, Branson 3510
- e) Estación de vacío para SPE con 12 posiciones con tubo de teflón y adaptador cap, Phenomenex
- f) Bomba de vacío, GAST, modelo: 1 HA B-25-M1100X
- g) Sistema de filtración para solventes, Millipore
- h) Potenciómetro pH Meter, HANNA Instruments H12210
- i) VortexThermo Scientific

2.1.2 Materiales

- a) Columna Atlantis T₃ C₁₈, 2.1 x 150 mm, 3 μm, Waters.
- b) Columna Luna C₁₈, 4.6 x 250 mm, 5 μm, Phenomenex.
- c) Columna Synergi C₁₈, 2 x 150 mm, 4 μm, Phenomenex.
- d) Cartuchos de extracción en fase sólida Oasis HLB, Waters (6cc, 500 mg, polimérico)
- e) Cartuchos de extracción en fase sólida Strata X, Phenomenex (6cc, 500 mg, polimérico)
- f) Cartuchos de microextracción en adsorbente empacado, C₈ + SCX, SGE Analytical Science (diámetro de partícula 45 μm, superficie de 500 m²/g, 80% C₈ y 20% SCX)
- g) Jeringa para microextracción en adsorbente empacado de 500 μL
- h) Jeringa Analítica Automática eVol_{XR}. SGE Analytical Science

- i) Viales de vidrio ámbar de 2 mL con tapón de rosca y septum de teflón/silicón, Agilent Technologies
- j) Viales de vidrio ámbar de 8 y 10 mL.
- k) Pipetas Automáticas de 2 a 20 μL , de 10 a 100 μL y de 100 a 1000 μL , Transferpette Brand.
- l) Puntillas para pipeta automática.
- m) Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.
- n) Espátulas
- o) Vasos de precipitado de 10, 50, 100, 250, 1000 y 3000 mL.
- p) Probeta de vidrio de 250 mL.
- q) Membranas para filtración para solventes de Nylon 0.22 μm , Millipore
- r) Acrodiscos de membrana PTFE modificada para solventes orgánicos y acuosos 0.45 μm Millipore
- s) Cronómetro de cuatro canales modelo 5004
- t) Matraces volumétricos de 10, 25, 500 y de 1000 mL.
- u) Evaporador Glas Col Zip Vap de 20 posiciones

2.1.3 Reactivos

- a) Acetonitrilo, grado HPLC, J. T. Baker.
- b) Metanol, grado HPLC, J. T. Baker.
- c) Ácido Trifluoracético, $\geq 99.0\%$, Sigma Aldrich.
- d) Ácido fórmico, 99-100%, Merck Millipore.

- e) Acetato de sodio ACS J.T. Baker.
- f) Ácido Clorhídrico ACS J.T. Baker.
- g) Sulfametoxazol 98%, Sigma Aldrich.
- h) Sulfadimetoxina 98%, Sigma Aldrich.
- i) Enrofloxacinina $\geq 98\%$, MP Biomedicals Inc.
- j) Norfloxacinina $\geq 98\%$, Sigma Aldrich.
- k) Ciprofloxacinina $\geq 98\%$, Sigma Aldrich.
- l) Oxitetraciclina dihidratada 98%, MP Biomedicals.
- m) Tetraciclina 98%, Sigma Aldrich.
- n) Doxicilina $\geq 98\%$, Sigma Aldrich.
- o) Tilosina (sal de tartrato) 98%, MP Biomedicals.
- p) Amoxicilina 98%, MP Biomedicals.
- q) Trimetoprim 98%, Sigma Aldrich.

2.2 Métodos

Se seleccionaron antibióticos de cinco familias diferentes: Quinolonas (Enrofloxacina, Ciprofloxacina), Sulfonamidas (Sulfanilamida, Sulfametoxazol y Sulfadimetoxina), Tetraciclinas (Oxitetraciclina, Tetraciclina y Doxicilina), Macrólidos (Tilosina), Penicilinas (Amoxicilina) y además el Trimetoprim. La selección de estos antibióticos se hizo en base a la literatura, a su amplio uso en México, y a las recomendaciones de médicos veterinarios.

2.2.1 Preparación de mezcla estándar de antibióticos

2.2.1.1 Mezcla estándar 1

Se prepararon soluciones stock para cada uno de los antibióticos: Sulfanilamida (SNA), Sulfametoxazol (SMX), Sulfadimetoxina (SDX), Oxitetraciclina (OXI), Tetraciclina (TETRA), Doxicilina (DOXI), Tilosina (TYL), Trimetoprim (TMP) Enrofloxacina (ENRO) y Ciprofloxacina (CIPRO) a una concentración de 1000 µg/mL. Todas estas soluciones se prepararon en metanol grado cromatográfico, excepto la solución de Amoxicilina (AMOXI), la cual se preparó en agua bidestilada. Las soluciones fueron almacenadas en refrigeración y oscuridad a 4°C hasta su uso.

A partir de las soluciones stock individuales, se preparó una mezcla intermedia de 100 µg/mL, y a partir de ella se preparó una mezcla estándar de trabajo a una concentración de 5 µg/mL para todos los antibióticos. Esto se realizó mediante dilución apropiada en agua bidestilada. Esta mezcla se preparó diariamente, se filtró y se colocó en viales de vidrio ámbar antes del análisis por CLAR/UV-Flu.

2.2.1.2 Mezcla estándar 2

Se prepararon soluciones stock para cada uno de los antibióticos: Sulfanilamida (SNA), Sulfametoxazol (SMX), Sulfadimetoxina (SDX), Oxitetraciclina (OXI), Tetraciclina (TETRA), Doxicilina (DOX), Tilosina (TYL), Trimetoprim (TMP) a una concentración de 1000 µg/mL, Enrofloxacin (ENRO) y Ciprofloxacina (CIPRO) a 40 µg/mL. Todas estas soluciones se prepararon en metanol grado cromatográfico, excepto la solución de Amoxicilina (AMOXI) la cual se preparó en agua bidestilada. Las soluciones fueron almacenadas en refrigeración y oscuridad a 4°C hasta su uso.

A partir de las soluciones stock individuales, por diluciones apropiadas, se preparó una mezcla intermedia a concentraciones de 4 µg/mL para las fluoroquinolonas, de 25 µg/mL para TMP, OXI, TETRA, SMX y SNA y de 50 µg/mL para AMOXI, TYL, SDX y DOX. A partir de esta mezcla intermedia se prepararon diferentes estándares para la validación del método. Esta mezcla se

preparó diariamente, se filtró y colocó en viales de vidrio ámbar antes del análisis por CLAR/UV-Flu.

2.2.2 Sistema cromatográfico

2.2.2.1 Selección de Fase Móvil.

Para la selección de la fase móvil se prepararon los eluentes que se muestran en la tabla IV. Se utilizó una columna de fase inversa Atlantis T₃ (2.1 x 150 mm, 3 µm). El flujo fue de 0.2 mL/min. La detección fue por UV a λ 280 nm y por Fluorescencia a una λ_{ex} de 278 nm y λ_{em} de 450 nm (41). El volumen de inyección fue de 5 µL y se trabajó a una temperatura de 35°C.

Los criterios para seleccionar las condiciones óptimas fueron el factor de retención (k), el factor de separación (α) y la resolución (R).

TABLA IV. Sistema de solventes considerados para la selección de la Fase Móvil.

| Fase A | Fase B |
|---|---------------------------|
| Buffer de Acetato de Amonio 0.1 M, pH 4 | Metanol |
| Ácido Fórmico 0.1% en agua | Ácido Fórmico 0.1% en ACN |
| Ácido Fórmico 0.1% | Acetonitrilo (ACN) |
| Ácido Trifluoroacético (ATF) 0.05% | ACN |

Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

2.2.2.2 Selección de la Fase Estacionaria.

Una vez seleccionada la fase móvil, se evaluó el desempeño de las siguientes columnas: Atlantis T₃, Luna C₁₈ y Synergi 4 μ Polar, las cuales son de fase inversa, presentan diferentes características en cuanto a tamaño de poro y partícula, área superficial y selectividad. En la tabla V se muestran las características de las columnas.

TABLA V. Características de las columnas evaluadas

| Mecanismo de Separación | Columnas |
|-------------------------|---|
| Fase Inversa | Atlantis T ₃ 2.1 x 150 mm, 3.1 μ m, 100 A, carga de carbón 13%, Waters |
| | Luna C ₁₈ 2 x 150 mm, 4 μ m, 100 A, carga de carbón 18%, Phenomenex. Endcapped TMS |
| | Synergi4 μ Polar 2 x 150 mm, 4 μ m, 80 A, Phenomenex, Endcapped polar |

La selección de la columna se hizo tomando en cuenta el factor de retención (k), el factor de separación (α), los platos teóricos (N) y la resolución (R).

Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

2.2.3 Validación del sistema cromatográfico

La validación del sistema cromatográfico se realizó de acuerdo a los criterios establecidos por la ICH (42) y los parámetros que se evaluaron fueron

la linealidad, límite de detección (LD) y cuantificación (LC) y la precisión Intradía e Intermedia. Para evaluar estos parámetros se tomó en cuenta las áreas de los picos cromatográficos.

2.2.3.1 Linealidad

Para la linealidad se prepararon, por triplicado, mezclas estándares a 5 niveles de concentración en el rango de 0.08-3.0µg/mL (tablaVI).

TABLA VI. Niveles de concentración para las curvas de calibración de los antibióticos

| Antibiótico | Rango de concentración para la curva de calibración µg/mL |
|---------------------------|---|
| AMOXI, TYL, SDX, DOX | 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 |
| ENRO, NOR, CIPRO | 0.08, 0.12, 0.16, 0.2, 0.24 |
| TMP, OXI, TETRA, SMX, SNA | 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5 |

La linealidad se evaluó con los coeficientes de determinación obtenidos mediante el cálculo de la regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, empleando el programa *Microsoft Excel®*. Además se evaluó la desviación estándar relativa de los factores de respuesta (FR) con la siguiente ecuación:

$$FR = \frac{A}{C} \quad (\text{Ec } 1)$$

Donde:

FR = Factor Respuesta

A = Área de la señal del estándar

C = Concentración del Estándar

Una vez obtenidos los factores de respuesta para cada uno de los puntos de la curva, se calculó la desviación estándar relativa de los mismos con la ecuación 2.

$$\% \text{ DER} = \left(\frac{\text{DE}}{\bar{X}} \right) \times 100 \quad (\text{Ec 2})$$

Donde:

% DER = Desviación Estándar Relativa

DE= Desviación estándar de los factores de respuesta.

\bar{X} = promedio de los factores respuesta

2.2.3.2 Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC).

El LD y el LC se calcularon empleando las siguientes ecuaciones:

$$\text{LD} = \frac{(b+3 \text{ DE})}{m} \quad (\text{Ec 3})$$

$$\text{LC} = \frac{(b+10 \text{ DE})}{m} \quad (\text{Ec 4})$$

Donde:

b = Señal del blanco

DE = Desviación estándar de la señal

m =Pendiente de la curva de calibración.

2.2.3.3 Precisión Intradía e intermedia.

Para la precisión Intradía (repetibilidad) se preparó y analizó, por triplicado, la mezcla estándar a tres niveles de concentración (tabla VII). Para la precisión intermedia se preparó y analizó la mezcla, a los tres niveles de concentración, en tres días diferentes.

TABLA VII. Soluciones para la medida de la precisión

| Antibiótico | concentración (nivel bajo) µg/mL | concentración (nivel medio) µg/mL | Concentración (nivel alto) µg/mL |
|--------------------------|--|---|--|
| AMOXI, TYL, SDX y DOX | 1 | 2 | 3 |
| ENRO, CIPRO TMP, OXI, | 0.08 | 0.16 | 0.24 |
| TETRA y SMX | 0.5 | 1 | 1.5 |

Con los resultados obtenidos se calculó la precisión intradía e intermedia con la ecuación 2.

2.2.4 Extracción de antibióticos

Para la extracción de los antibióticos se trabajó con la extracción en fase sólida (SPE) y se probó la eficiencia de la microextracción con adsorbente empacado (MEPS).

2.2.4.1 Establecimiento de las condiciones óptimas de la SPE

Para establecer las condiciones óptimas de extracción en fase sólida se evaluaron los siguientes parámetros: pH, flujo de carga de la muestra, composición, volumen y flujo del eluyente, composición del solvente de lavado y tiempo de secado. Se utilizó un diseño de experimentos de Plackett-Burman, y los parámetros se establecieron a dos niveles: bajo (-) y alto (+). Esto se muestra en la tabla VIII. Se trabajó con una mezcla estándar que contenía una concentración de 0.16 µg/mL para las fluoroquinolonas y 5 µg/mL para el resto de los antibióticos.

TABLA VIII. Factores y niveles investigados durante la prueba de Plackett-Burman.

| Factor | Niveles | |
|---|------------------|-----------------------------|
| | bajo (-) | alto (+) |
| pH | 3 | 5 |
| Flujo carga de la muestra (mL/min) | 3 | 10 |
| Componente del solvente de elución | MeOH | ATF 0.05%: ACN 50:50 |
| Flujo de elución (mL/min) | 1 | 5 |
| Volumen de elución (mL) | 1 | 3 |
| Solvente del lavado | H ₂ O | H ₂ O:MeOH 90:10 |
| Tiempo de secado después del lavado (min) | 0.5 | 1 |

Se realizaron 8 experimentos bajo la combinación de las variables que se muestra en la tabla IX. Una vez obtenido el extracto, éste se evaporó bajo corriente de nitrógeno y se reconstituyó a 1 mL con agua bidestilada. Se filtró a través de acrodiscos y se analizó.

Para seleccionar el experimento que proporcione las condiciones óptimas de extracción se tomó en cuenta el número de señales obtenidas. Todos los experimentos se hicieron por duplicado tanto en cartuchos Oasis HLB como en los cartuchos Strata X.

TABLA IX. Número de experimentos realizados y la combinación de las variables.

| V/E | pH | Flujo de carga de muestra (mL/min) | Solvente de elución | Flujo de elución (mL/min) | Volumen de elución (mL) | Solvente de lavado | Tiempo de secado (min) |
|-----|----|------------------------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------------|------------------------|
| 1 | 5 | 10 | MeOH | 5 | 3 | H ₂ O:MeOH (90:10) | 1 |
| 2 | 5 | 10 | ATF 0.05%:ACN (50:50) | 5 | 1 | H ₂ O | 0.5 |

| | | | | | | | |
|---|---|----|--------------------------|---|---|----------------------------------|-----|
| 3 | 5 | 3 | MeOH | 1 | 3 | H ₂ O | 0.5 |
| 4 | 5 | 3 | ATF 0.05%:ACN (50:50) | 1 | 1 | H ₂ O:MeOH (90:10) | 1 |
| 5 | 3 | 10 | MeOH | 1 | 1 | H ₂ O:MeOH (90:10) | 0.5 |
| 6 | 3 | 10 | ATF 0.05%:ACN (50:50) | 1 | 3 | H ₂ O | 1 |
| 7 | 3 | 3 | MeOH | 5 | 1 | H ₂ O | 1 |
| 8 | 3 | 3 | ATF 0.05%:ACN (50:50) | 5 | 3 | H ₂ O:MeOH (90:10) | 0.5 |

V/E = Variable/Experimento

2.2.4.2 Establecimiento de las condiciones óptimas de la MEPS

Para establecer las condiciones óptimas de MEPS se utilizó un diseño de experimentos de Plackett y Burman, en donde la variable respuesta a evaluar fue el número de señales. Se evaluaron los siguientes parámetros, pH, volumen a extraer y ciclos de carga de la muestra, solvente de lavado, ciclos, solvente y volumen de elución (tabla X). Los cartuchos utilizados para MEPS fueron los M1, los cuales son de fase mixta C₈ e intercambio catiónico.

TABLA X. Número de experimentos realizados y la combinación de las variables para MEPS

| No. Ex | pH | Factor | | | | | |
|--------|-----|---------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|--------------------------|
| | | Volumen a extraer de la muestra (μL) | No de ciclos de carga de la muestra | Solvente de Lavado | Ciclos de elución | Solvente de elución | Volumen de elución (μL) |
| 1 | 3.5 | 250 | 40 | H ₂ O pH 4 | 1 | MeOH | 50 |
| 2 | 3.5 | 1000 | 20 | H ₂ O pH 7 | 1 | ACN | 50 |
| 3 | 3 | 1000 | 40 | H ₂ O pH 4 | 1 | ACN | 30 |

| | | | | | | | |
|---|-----|------|----|-----------------------|---|------|----|
| 4 | 3.5 | 250 | 40 | H ₂ O pH 7 | 2 | ACN | 30 |
| 5 | 3.5 | 1000 | 20 | H ₂ O pH 7 | 1 | MeOH | 30 |
| 6 | 3.5 | 1000 | 40 | H ₂ O pH 4 | 2 | ACN | 50 |
| 7 | 3 | 1000 | 40 | H ₂ O pH 7 | 2 | MeOH | 30 |
| 8 | 3 | 250 | 20 | H ₂ O pH 7 | 2 | ACN | 50 |

No. Ex = número de experimento

Se seleccionó la técnica de extracción que dio los mejores resultados para continuar con la validación.

2.2.5 Validación del procedimiento de SPE

Para la validación del proceso de extracción se trabajó bajo las condiciones previamente seleccionadas del diseño de Plackett-Burman. Los parámetros validados fueron: Linealidad, límite de detección y cuantificación, exactitud y precisión de acuerdo a la guía de la ICH (42).

Se tomaron 3 litros de agua bidestilada y se adicionaron con concentraciones conocidas de antibióticos a tres diferentes niveles. En la tabla XI se muestra la concentración final de cada uno de los antibióticos en la muestra.

TABLA XI. Niveles de concentración para cada uno de los antibióticos

| Antibiótico | (ng/mL) | | |
|-------------|------------|-------------|------------|
| | nivel bajo | nivel medio | nivel alto |

| | | | |
|---------------------------|------|------|------|
| AMOXI, TYL, SDX y DOX | 1 | 2 | 3 |
| ENRO,CIPRO | 0.08 | 0.16 | 0.24 |
| TMP, OXI,TETRA, SDX y SNA | 0.5 | 1 | 1.5 |

Además de las muestras anteriores al mismo tiempo se procesó un blanco de muestra de agua bidestilada para asegurar que estuviera libre de antibióticos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

2.2.5.1 Linealidad y límites de detección y cuantificación.

Se construyó una curva de calibración por triplicado. La Linealidad se evaluó con los coeficientes de determinación obtenidos mediante el cálculo de la regresión lineal por el método de mínimos cuadrados y tomando en cuenta la DER de los factores de respuesta.

Los límites de detección y cuantificación se evaluaron con las ecuaciones 3 y 4.

2.2.5.2 Exactitud y Precisión.

La concentración de los antibióticos fue obtenida con la ecuación de la recta de la gráfica de calibración externa preparada el mismo día de trabajo y tomando en cuenta el factor de concentración. La exactitud se evaluó como porcentaje de recuperación empleando la ecuación 5.

$$\% R = \frac{\left(\frac{C_o}{F_C}\right) \times 100}{C_R} \quad (\text{Ec } 5)$$

Donde:

% R = Porcentaje de Recuperación

C_O = Concentración obtenida

F_C = Factor de concentración

C_R = Concentración Real

A partir de los resultados de recuperación se evaluó la precisión con la ecuación 2.

2.2.5.3 Validación del Método para la extracción de antibióticos.

Se colectaron 10 litros de agua del Río la Silla. El agua se filtró a través de un sistema millipore con una membrana de 0.45 µm. Se tomaron 3 alícuotas de un litro y cada una fue fortificada a los niveles de concentración mostrados en la tabla XI. Las muestras fueron procesadas con el protocolo de SPE anteriormente descrito y analizadas por CLAR. Al mismo tiempo se analizó una muestra de río sin adicionar para asegurar que los analitos no estuvieran presentes. Todo lo anterior se realizó por triplicado.

Para la validación se evaluaron la linealidad, exactitud y precisión de la misma forma que en los apartados 2.2.5.1 y 2.2.5.1 solo que en lugar de agua bidestilada se empleó agua de río.

2.2.5.4 Efecto de matriz.

El efecto de matriz se evaluó mediante pruebas de recuperación, se fortificaron muestras de agua bidestilada y muestras de agua de río a los mismos niveles de concentración (tabla XI). Las concentraciones obtenidas del análisis de antibióticos se compararon mediante una prueba t de student, y mediante inspección visual de las curvas de calibración.

2.2.6 Análisis de Muestra Real.

Se recolectaron muestras de 4 litros de agua de cada uno de los siguientes lugares: Río Pilón, Río La Silla y de la Presa Rodrigo Gómez. Estas muestras fueron recolectadas en frascos de plástico, se transportaron en frío y en la oscuridad y se almacenaron en frío a 4 °C hasta su análisis. Las muestras fueron filtradas a través de un filtro Millipore de 0.45 µm. Se homogenizó la muestra, se tomó un litro, se ajustó a pH de 3 y se pasó a través de un cartucho Oasis HLB, previamente acondicionado, a un flujo de 10mL/min. Enseguida se hizo un lavado, y después se pasó una corriente de aire para el secado. La

elución se realizó con 3 mL de metanol. El extracto se llevó a sequedad y se reconstituyó con 1 mL de agua bidestilada. Se filtró a través de acrodiscos y el filtrado se recibió en un vial oscuro para su inyección en el Cromatógrafo.

III. RESULTADOS

Las pruebas de optimización del sistema cromatográfico se llevaron a cabo en un equipo Waters equipado con un DAD y detector de fluorescencia.

3.1 Desarrollo del método cromatográfico.

El cromatograma obtenido de la mezcla estándar de trabajo a una concentración de 5 µg/mL, se muestra en la figura 7. La duración de la corrida cromatográfica fue de 36 min.

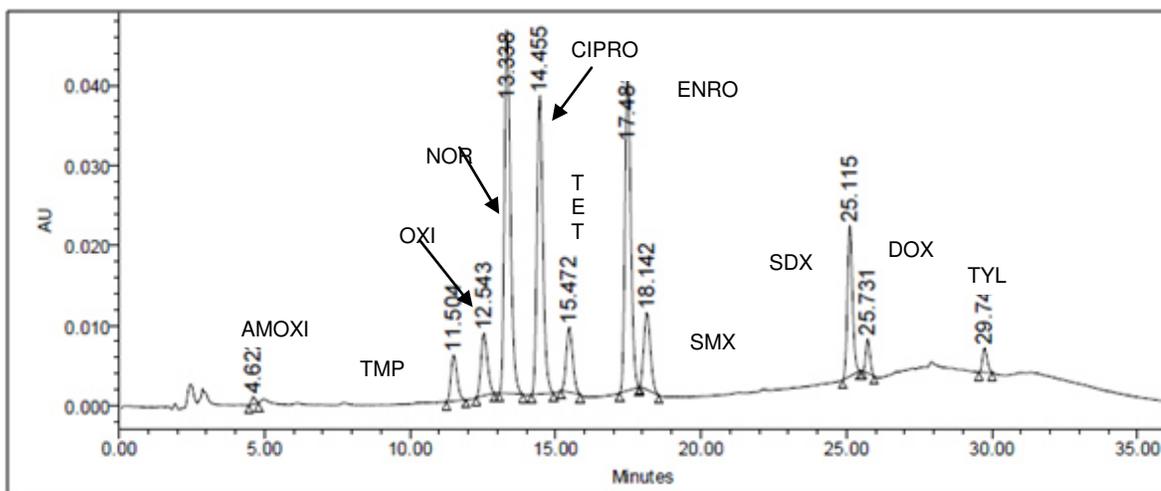


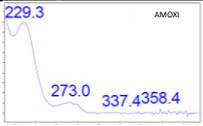
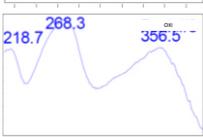
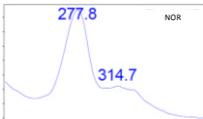
Figura 7. Cromatograma de la mezcla estándar de trabajo.

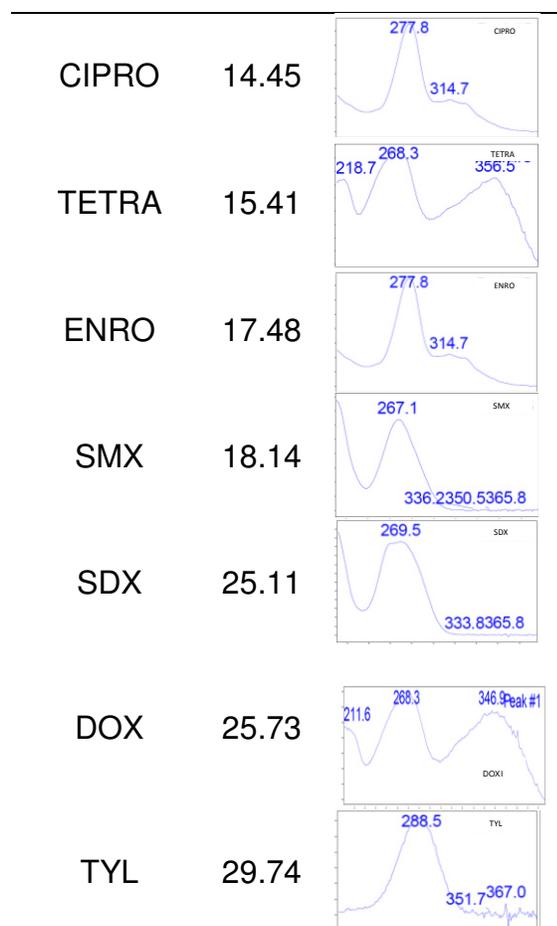
El cromatograma se obtuvo bajo las siguientes condiciones:

- Fase Estacionaria: Fase inversa en columna C₁₈ Atlantis T₃.
- Fase Móvil: A: ATF 0.05%. B: ACN. Elución en gradiente
- Flujo: 0.2 mL/min
- Temperatura de 35°C
- Longitud de onda de monitoreo 280nm.

Los tiempos de retención para cada uno de los antibióticos así como su espectro UV, se muestran en la tabla XII.

TABLA XII. Tiempo de retención de los antibióticos y espectros de UV

| Antibiótico | t _R (min) | Espectro UV |
|-------------|----------------------|--|
| AMOXI | 4.62 |  |
| TMP | 11.50 |  |
| OXI | 12.54 |  |
| NOR | 13.33 |  |



El programa de gradiente de elución seleccionado se muestra en la tabla

XIII.

TABLA XIII. Gradiente seleccionado para la separación de los antibióticos

| Tiempo (min) | Flujo (mL/min) | %B |
|--------------|----------------|----|
| 0 | 0.2 | 13 |
| 13 | 0.2 | 20 |
| 19 | 0.2 | 30 |
| 21 | 0.2 | 40 |
| 26 | 0.2 | 40 |
| 31 | 0.2 | 13 |
| 36 | 0.2 | 13 |

3.2 Selección de la fase estacionaria.

Los datos de los parámetros cromatográficos (α , R y N) obtenidos en la evaluación de las diferentes columnas se resumen en la tabla XIV.

TABLA XIV. Parámetros cromatográficos

| Atlantis T ₃ | | | | | Luna C ₁₈ | | | | | Synergi 4 μ m Polar | | | | |
|-------------------------|-------|----------|------|--------|----------------------|-------|----------|------|-------|-------------------------|-------|----------|-----|-------|
| | | α | R | N | | | α | R | N | | | α | R | N |
| 1 | AMOXI | 5.8 | 14.1 | 841 | 1 | AMOXI | 11.7 | 9.0 | 1447 | 1 | AMOXI | 3.7 | 8.5 | 2472 |
| 2 | TMP | 1.1 | 1.6 | 4260 | 2 | TMP | 1.2 | 1.3 | 2055 | 2 | TMP | 1.1 | 1.2 | 3202 |
| 3 | OXI | 1.1 | 1.1 | 4619 | 3 | OXI | 1.1 | 0.5 | 554 | 3 | OXI | 1.3 | 3.1 | 4078 |
| 4 | NOR | 1.1 | 1.4 | 3944 | 4 | CIPRO | 1.2 | 1.2 | 4650 | 4 | NOR | 1.1 | 0.9 | 3505 |
| 5 | CIPRO | 1.1 | 1.4 | 7539 | 5 | NOR | 1.1 | 1.2 | 1835 | 5 | TETRA | 1.1 | 1.4 | 10029 |
| 6 | TETRA | 1.2 | 3.0 | 4477 | 6 | TETRA | 1.2 | 1.8 | 4601 | 6 | CIPRO | 1.1 | 2.1 | 5731 |
| 7 | ENRO | 1.0 | 1.0 | 11463 | 7 | ENRO | 1.3 | 3.9 | 7205 | 7 | SMX | 1.1 | 1.7 | 7755 |
| 8 | SMX | 1.5 | 11.2 | 9530 | 8 | SMX | 1.5 | 13.1 | 8709 | 8 | ENRO | 1.3 | 6.0 | 6903 |
| 9 | SDX | 1.0 | 1.2 | 40552 | 9 | DOXI | 1.0 | 0.8 | 51087 | 9 | SDX | 1.0 | 0.6 | 9192 |
| 10 | DOXI | 1.2 | 9.4 | 129448 | 10 | SDX | 1.2 | 7.0 | 27090 | 10 | DOXI | 1.2 | 8.8 | 19271 |
| 11 | TYL | | | 42749 | 11 | TYL | | | 52097 | 11 | TYL | | | NC |

NC = No calculado

En la figura 8 se muestran los cromatogramas obtenidos de las columnas evaluadas.

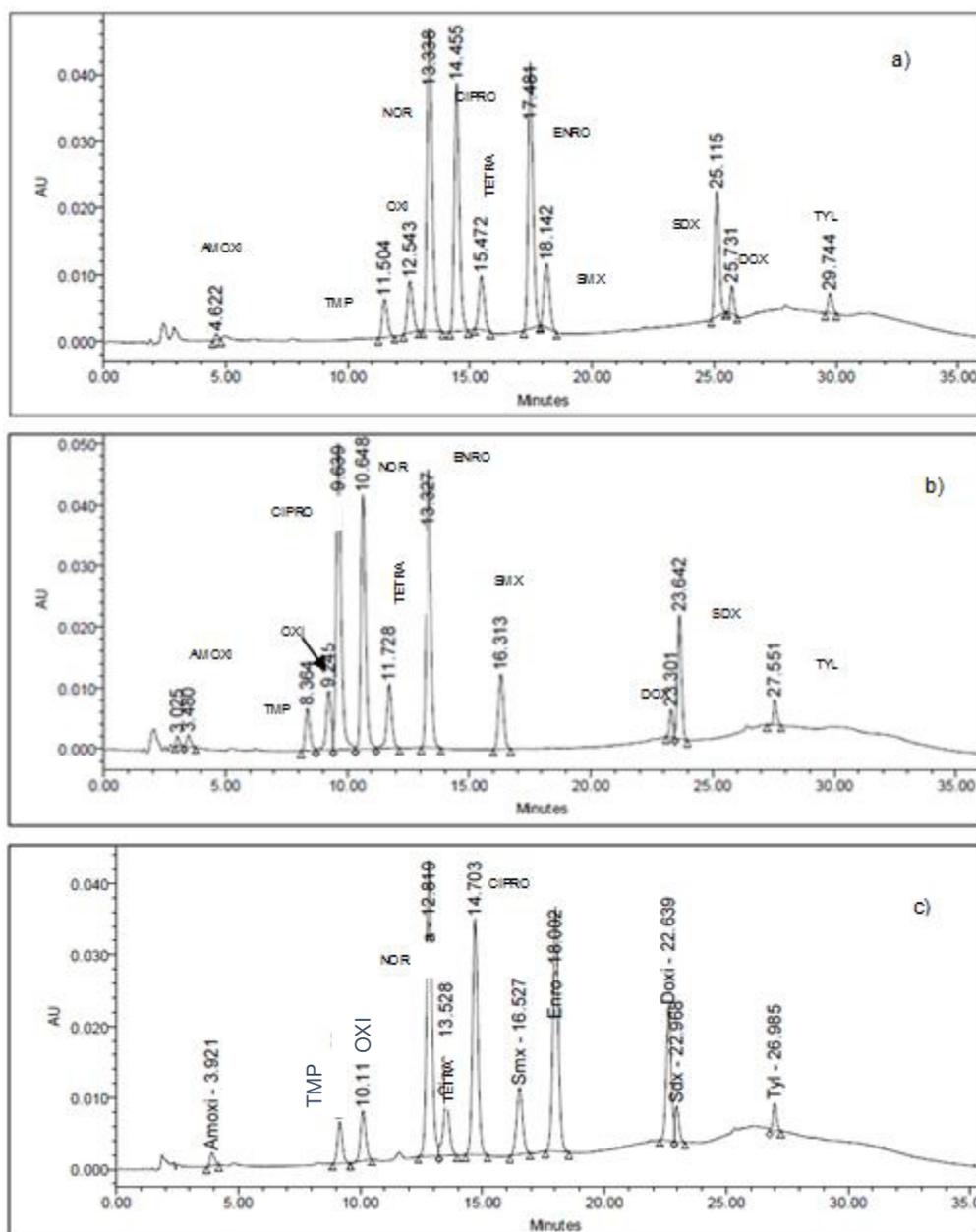


Figura 8. Cromatogramas de la mezcla estándar de trabajo. FE: columna a) C₁₈ Atlantis T₃, b) Luna C₁₈ y c) Synergi 4μ polar. FM: A: ATF 0.05%. B: ACN. Elución en gradiente. Flujo: 0.2 mL/min, temperatura de 35 °C. Detección UV 280nm.

La validación del sistema y del método, así como el análisis de muestras reales, fueron realizadas en el equipo HP1100

3.3 Validación del sistema cromatográfico

3.3.1 Linealidad

En la Figura 9 se muestran las curvas de calibración para cada uno de los antibióticos de la mezcla estándar. En la Tabla XV se muestran las ecuaciones de regresión obtenidos para cada antibiótico. Los coeficiente de determinación obtenidos fueron mayor de 0.990 y los %DER de los factores respuesta menores del 15% para todos los analitos.

TABLA XV. Ecuación de la recta y coeficientes de determinación de los antibióticos durante la validación del sistema cromatográfico.

| Antibiótico | Ecuación de la recta | Coefficiente de determinación R ² | % DER factores de respuesta |
|------------------------------|----------------------|--|-----------------------------|
| SNA | y=40.04x-4.270 | 0.997 | 5.3 |
| AMOXI | y=2.64x+0.467 | 0.990 | 5.3 |
| TMP | y=23.29x+0.642 | 0.997 | 2.2 |
| OXI | y=35.30x-1.799 | 0.990 | 4.8 |
| TETRA | y=27.38x-0.913 | 0.997 | 2.8 |
| SMX | y=67.11x+0.320 | 0.997 | 1.9 |
| SDX | y=69.03x+1.465 | 0.999 | 1.2 |
| DOX | y=11.50x-0.881 | 0.997 | 3.0 |
| TYL | y=22.25x+2.972 | 0.997 | 3.6 |
| CIPRO | y=90.95x-1.947 | 0.997 | 6.7 |
| ENRO | y=88.55x-0.752 | 0.990 | 5.0 |
| Criterio de aceptación (43). | | >0.98 | < 15% |

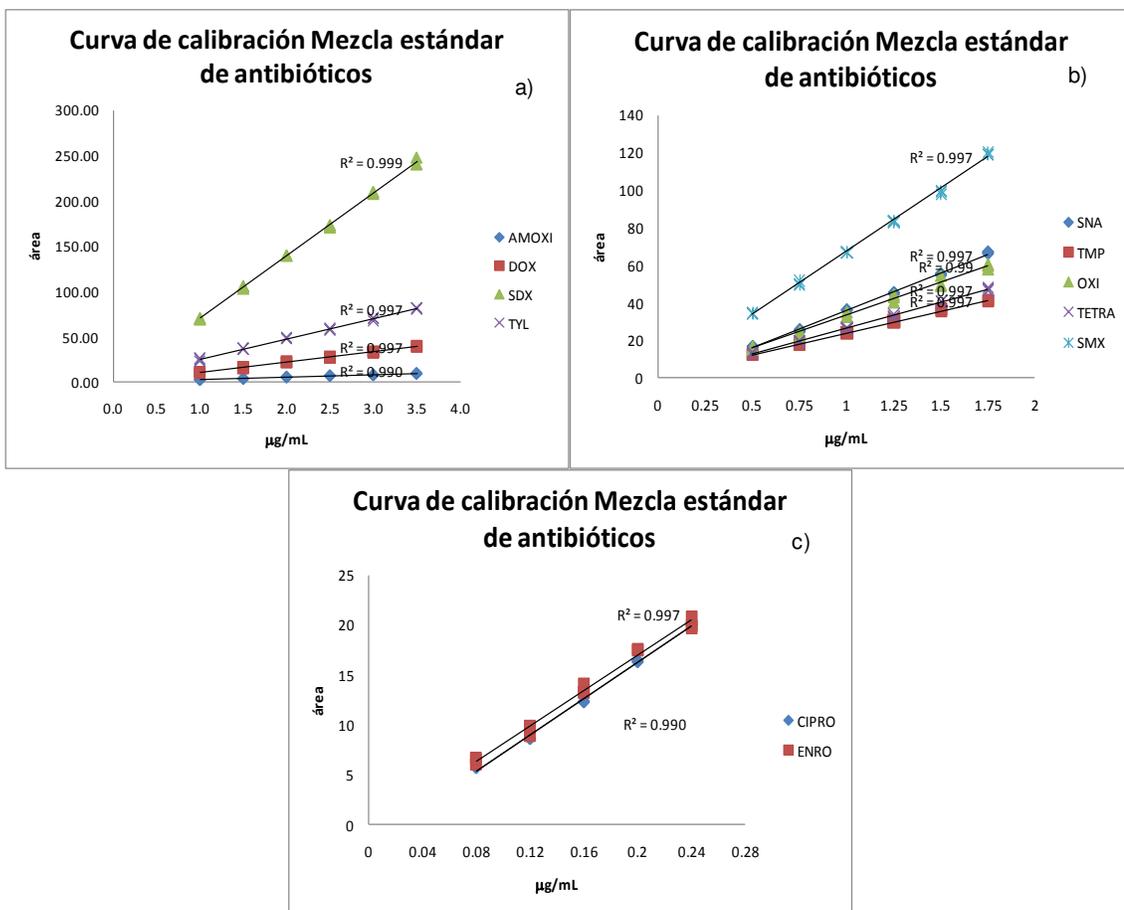


Figura 9. Curva de calibración para a) AMOXI, DOXI, SDX y TYL a niveles de concentración de 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 3.5 µg/mL., b) SNA, TMP, OXI, TETRA y SMX a niveles de concentración de 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 y 1.75 µg/mL., c) CIPRO y ENRO a niveles de concentración de 0.08, 0.12, 0.16, 0.2 y 0.24 µg/mL. Detección UV 280 nm

3.3.2 Precisión

Los resultados de la precisión intradía e intermedia del sistema cromatográfico a los tres niveles de concentración se observan en la tabla XVI. Las DER se encontraron en el rango de 0.4-5.7%, 0.2-4% y de 0.1-2.8% para la precisión intradía y de 0.9-14%, 0.5-11% y de 0.2-14% para la precisión intermedia para los niveles bajo, medio y alto respectivamente.

TABLA XVI. Precisión Intradía e Intermedia

| Antibiótico | *Precisión intradía %DER | | | *Precisión intermedia %DER | | |
|-------------|--------------------------|-------|------|----------------------------|-------|------|
| | bajo | medio | alto | bajo | medio | alto |
| SNA | 5.0 | 2.6 | 1.3 | 4.3 | 0.5 | 4.8 |
| AMOXI | 4.0 | 4.9 | 1.1 | 7.2 | 1.6 | 5.9 |
| TMP | 0.9 | 1.7 | 0.7 | 3.7 | 2.2 | 2.0 |
| OXI | 4.5 | 4.0 | 2.3 | 5.0 | 1.8 | 1.8 |
| TETRA | 4.7 | 2.3 | 1.6 | 0.9 | 1.9 | 0.2 |
| SMX | 0.5 | 0.4 | 0.6 | 8.7 | 3.3 | 2.8 |
| SDX | 1.2 | 0.2 | 1.8 | 5.5 | 2.3 | 1.0 |
| DOX | 5.0 | 2.6 | 1.3 | 8.0 | 1.0 | 1.0 |
| TYL | 5.7 | 1.1 | 0.3 | 4.8 | 4.5 | 1.8 |
| CIPRO | 0.4 | 0.3 | 0.1 | 14.0 | 11.0 | 14.0 |
| ENRO | 4.9 | 3.6 | 2.8 | 1.4 | 2.4 | 8.0 |

*Criterio de aceptación < 15%

3.3.3 Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC)

En la tabla XVII se muestran los LD y LC obtenidos para cada uno de los antibióticos en la mezcla estándar.

TABLA XVII. Límites de detección y cuantificación.

| Antibiótico | Límite de detección (µg/mL) LD | Límite de cuantificación (µg/mL) LC |
|--------------|-----------------------------------|--|
| SNA | 0.046 | 0.150 |
| AMOXI | 0.048 | 0.160 |
| TMP | 0.025 | 0.080 |
| OXI | 0.163 | 0.480 |
| TETRA | 0.012 | 0.040 |
| SMX | 0.006 | 0.020 |
| SDX | 0.151 | 0.500 |
| DOX | 0.225 | 0.750 |
| TYL | 0.145 | 0.480 |
| CIPRO | 0.014 | 0.047 |
| ENRO | 0.014 | 0.051 |

3.4 Extracción en Fase Sólida.

En la tabla XVIII se presentan las condiciones bajo las cuales se llevaron a cabo los experimentos según el diseño de Plackett-Burman y el número de picos obtenidos en cada uno de ellos. Los experimentos 6 y 8 resultaron con mayor número de señales.

TABLAXVIII. Diseño de Plackett-Burman, variables y número de picos.

| Experimento | pH | Flujo de carga de la muestra (mL/min) | variable | | | | | Tiempo de secado | Respuesta No. de picos |
|-------------|----|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------------|-----|------------------|------------------------|
| | | | Componente del solvente de elución | Flujo de elución (mL/min) | Volumen de elución (mL) | Solvente de lavado | | | |
| 1 | 5 | 10 | MeOH | 5 | 3 | H ₂ O:MeOH 90:10 | 1 | 7 | |
| 2 | 5 | 10 | ATF:ACN 50:50 | 5 | 1 | H ₂ O | 0.5 | 2 | |
| 3 | 5 | 3 | MeOH | 1 | 3 | H ₂ O | 0.5 | 7 | |
| 4 | 5 | 3 | ATF:ACN 50:50 | 1 | 1 | H ₂ O:MeOH 90:10 | 1 | 2 | |
| 5 | 3 | 10 | MeOH | 1 | 1 | H ₂ O:MeOH 90:10 | 0.5 | 5 | |
| 6 | 3 | 10 | ATF:ACN 50:50 | 1 | 3 | H ₂ O | 1 | 11 | |
| 7 | 3 | 3 | MeOH | 5 | 1 | H ₂ O | 1 | 4 | |
| 8 | 3 | 3 | ATF:ACN 50:50 | 5 | 3 | H ₂ O:MeOH 90:10 | 0.5 | 11 | |

En la tabla XIX se muestran las condiciones para la extracción:

TABLA XIX. Condiciones seleccionadas de la SPE

| Factor | valor |
|--|------------------------|
| pH | 3 |
| Flujo de carga de la muestra (mL/min) | 10 |
| Solvente de elución | ATF 0.05% : ACN(50:50) |
| Flujo de elución (mL/min) | 1 |
| Volumen de elución (mL) | 3 |
| Solvente de lavado | H ₂ O |
| Tiempo de secado (min) | 1 |

El protocolo desarrollado y optimizado para la SPE de los antibióticos que se empleó para la validación y tratamiento de muestras reales fue el siguiente:

- a) Ajuste de las muestras de agua a pH de 3
- b) Acondicionamiento del cartucho con 5 mL de MeOH y 5 mL de H₂O pH de 3
- c) Carga de la muestra: se pasaron 1000 mL de agua a un flujo de 10 mL/min
- d) Lavado con 5 mL de H₂O bidestilada
- e) Secado con vacío por un minuto
- f) Elución con 3 mL de MeOH
- g) Flujo de elución a 1 mL/min.

El extracto se recibió en tubos de ensayo de 13x100 mm, se evaporó a sequedad con corriente de nitrógeno y se reconstituyó con 1 mL de agua bidestilada, se filtró y se pasó a un vial oscuro para su análisis por CLAR.

La figura 10 muestra los cromatogramas obtenidos de la extracción de la mezcla estándar bajo las condiciones optimas de la SPE.

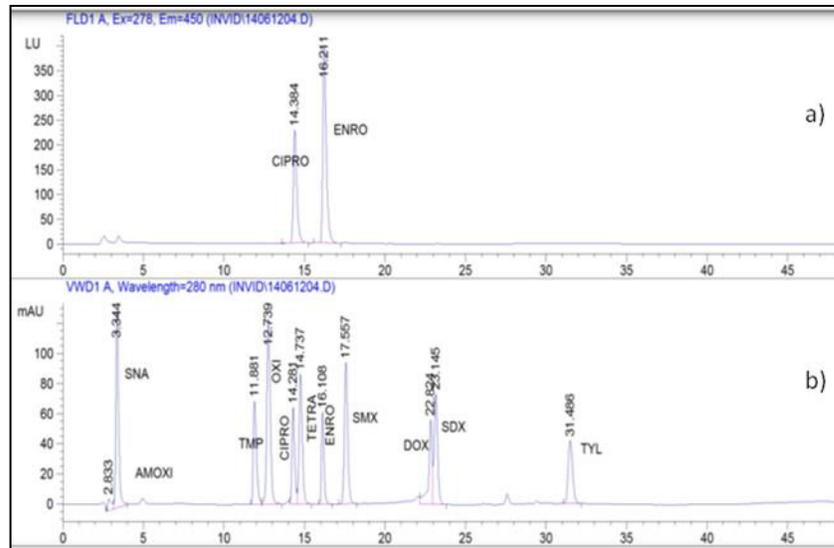


Figura 10. Cromatograma obtenido de la SPE de la mezcla estándar de antibióticos. Columna C₁₈ Atlantis T₃, FM: A: ATF 0.05%. B: ACN. Elución en gradiente. Flujo: 0.2 mL/min, temperatura de 35 °C. Detección: Fluorescencia λ_{ex} 278 nm, λ_{em} 450nm. y UV λ 280nm.

3.4.1 Validación del Proceso de extracción en fase sólida.

En la tabla XX se muestran los valores obtenidos de regresión para la evaluación del procedimiento de SPE en agua bidestilada adicionada con la mezcla estándar. Para la linealidad, los valores de los coeficientes de determinación fueron mayores de 0.92 y los % DER de los factores de respuesta menores del 25%.

TABLA XX. Resultados de linealidad del procedimiento de extracción en fase sólida.

| Antibiótico | Rango de concentración µg/mL | Ecuación de la recta | Coefficiente de determinación | % DER de los FR |
|--|---|-----------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| SNA | 0.5 -1.5 | 2132x + 1.427 | 0.947 | 25 |
| TMP | 0.5-1.5 | 27787x – 5.004 | 0.990 | 13 |
| OXI | 0.5-1.5 | 27003x – 0.371 | 0.989 | 5 |
| TETRA | 0.5-1.5 | 17773x – 3.743 | 0.929 | 17 |
| SMX | 0.5-1.5 | 48653x – 2.63 | 0.991 | 7 |
| SDX | 1-3 | 12963x – 5.576 | 0.982 | 24 |
| DOX | 1-3 | 57987x – 13.54 | 0.986 | 12 |
| TYL | 1-3 | 22062 – 4.986 | 0.993 | 11 |
| CIPRO | 0.08-0.24 | 24750x + 1.048 | 0.980 | 15 |
| ENRO | 0.08-0.24 | 73667x – 2.56 | 0.984 | 15 |
| Criterio de Aceptación (43) | | | ≥ 0.98 | ≤30% |
| %DER = Porcentaje de Desviación Estándar Relativa | | | | |
| FR = Factor de Respuesta | | | | |

En la tabla XXI se muestran las recuperaciones obtenidas para los niveles bajo, medio y alto respectivamente. El porcentaje más bajo fue para SNA (9%) y el más alto para CIPRO (130%). Las desviaciones estándar relativas de las recuperaciones estuvieron en un rango de 1 a 16%.

En la tabla XXII se muestran los valores obtenidos en los LD y LC. Los valores de LD y LC más bajos fueron para ENRO de 0.04 y 0.13 ng/mL respectivamente, mientras que los más altos fueron para la DOX, con valores de 1.30 y 4.32 ng/mL respectivamente.

TABLA XXI. % Recuperación de los diferentes antibióticos en la mezcla estándar

| Antibiótico | %R (% DER) | | |
|-------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | bajo | medio | alto |
| SNA | 11 ⁽³⁾ | 11 ⁽³⁾ | 9 ⁽¹⁾ |
| TMP | 80 ⁽⁹⁾ | 84 ⁽¹⁴⁾ | 106 ⁽¹⁾ |
| OXI | 83 ⁽⁶⁾ | 90 ⁽¹²⁾ | 85 ⁽¹⁵⁾ |
| TETRA | 61 ⁽⁸⁾ | 66 ⁽¹³⁾ | 68 ⁽³⁾ |
| SMX | 64 ⁽⁸⁾ | 66 ⁽¹³⁾ | 68 ⁽³⁾ |
| SDX | 44 ⁽¹⁶⁾ | 65 ⁽¹⁵⁾ | 65 ⁽¹²⁾ |
| DOX | 57 ⁽¹²⁾ | 68 ⁽¹⁶⁾ | 65 ⁽¹³⁾ |
| TYL | 60 ⁽⁴⁾ | 84 ⁽¹⁵⁾ | 91 ⁽⁶⁾ |
| CIPRO | 115 ^(8.) | 130 ⁽¹⁶⁾ | 126 ⁽¹²⁾ |
| ENRO | 70 ⁽¹⁵⁾ | 69 ⁽¹²⁾ | 71 ⁽⁴⁾ |

%R = Porcentaje de Recuperación

% DER = Porcentaje de Desviación Estándar Relativa

TABLAXXII. Límite de detección y cuantificación del método de SPE

| Antibiótico | Límite de detección (ng/mL) | Límite de cuantificación (ng/mL) |
|-----------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| SNA | 0.213 | 0.709 |
| TMP | 0.228 | 0.761 |
| OXI | 0.563 | 1.875 |
| TETRA | 0.104 | 0.348 |
| SMX | 0.323 | 1.078 |
| SDX | 0.455 | 1.517 |
| DOX | 1.297 | 4.325 |
| TYL | 0.449 | 1.497 |
| CIPRO _(UV) | 0.302 | 1.005 |
| CIPRO _(F) | 0.073 | 0.145 |
| ENRO _(UV) | 0.296 | 0.987 |
| ENRO _(F) | 0.039 | 0.130 |

3.4.2 Validación del Método.

En la tabla XXIII se muestran los valores obtenidos de linealidad. Los valores de los coeficientes de determinación fueron mayores de 0.97 y los % DER de los factores respuesta menores del 15%.

TABLAXXIII. Resultados de linealidad del método.

| Antibiótico | Rango de concentración ng/mL | Ecuación de la recta | Coefficiente de determinación (R ²) | % DER de los FR |
|-----------------------------|---------------------------------|----------------------|--|-----------------|
| TMP | 0.5-1.5 | 32069x -1.762 | 0.991 | 8 |
| OXI | 0.5-1.5 | 46188x - 8.811 | 0.989 | 15 |
| TETRA | 0.5-1.5 | 28873x + 8.06 | 0.970 | 10 |
| SMX | 0.5-1.5 | 61626x - 10.85 | 0.992 | 12 |
| SDX | 1-3 | 22898x - 2.847 | 0.990 | 6 |
| DOX | 1-3 | 56104x - 16.45 | 0.990 | 11 |
| TYL | 1-3 | 21441x - 1.001 | 0.993 | 6 |
| CIPRO | 0.08-0.24 | 15563x + 1.048 | 0.991 | 4 |
| ENRO | 0.08-0.24 | 42925x - 5.015 | 0.988 | 10 |
| Criterio de Aceptación (43) | | | ≥ 0.98 | ≤30% |

En la tabla XXIV se muestran las recuperaciones obtenidas para los niveles bajo, medio y alto respectivamente. El porcentaje más bajo fue para DOX (54%) y el más alto para CIPRO (196%). Las desviaciones estándar relativas de las recuperaciones estuvieron en un rango de 1 a 16%.

TABLAXXIV. % Recuperación de los diferentes antibióticos en agua de río

| Antibiótico | %R _(% DER) | | |
|-------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| | bajo | medio | alto |
| TMP | 91 ⁽⁹⁾ | 104 ⁽³⁾ | 90 ⁽⁵⁾ |

| | | | |
|-------|---------------------|--------------------|---------------------|
| OXI | 82 ⁽²⁾ | 90 ⁽⁷⁾ | 92 ⁽¹⁰⁾ |
| TETRA | 121 ⁽²⁾ | 110 ⁽¹⁾ | 87 ⁽¹¹⁾ |
| SMX | 63 ⁽⁶⁾ | 69 ⁽⁶⁾ | 73 ⁽⁴⁾ |
| SDX | 111 ⁽⁵⁾ | 116 ⁽¹⁾ | 109 ⁽¹⁴⁾ |
| DOX | 60 ⁽⁸⁾ | 54 ⁽¹²⁾ | 59 ⁽²⁾ |
| TYL | 87 ⁽⁹⁾ | 81 ⁽⁴⁾ | 75 ⁽¹⁵⁾ |
| CIPRO | 196 ⁽⁵⁾ | 180 ⁽¹⁾ | 158 ⁽⁸⁾ |
| ENRO | 139 ⁽¹²⁾ | 143 ⁽¹⁾ | 123 ⁽¹²⁾ |

%R = Porcentaje de Recuperación

% DER = porcentaje de desviación estándar relativa

3.4.3 Efecto de Matriz.

La tabla XXV muestra los resultados de recuperación en agua bidestilada y las recuperaciones obtenidas en matriz. Estos valores fueron comparados por medio de una prueba *t* de student, a un nivel de confianza de 95%, en donde si *t* de tablas es mayor que *t* calculado entonces no existe diferencia significativa. Se encontró que para 4 antibióticos (CIPRO; ENRO; TETRA y SDX) sí existe diferencia significativa en los resultados, por lo tanto, existe efecto de matriz.

TABLAXXV. Recuperaciones obtenidas en agua bidestilada y en matriz.

% Recuperación

| Antibiótico | nivel bajo | | nivel medio | | nivel alto | | t tablas | t calculada |
|-------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------|----------------|
| | H ₂ O bd | H ₂ O río | H ₂ O bd | H ₂ O río | H ₂ O bd | H ₂ O río | | |
| TMP | 80 | 91 | 84 | 104 | 106 | 90 | 2.12 | 1.77 |
| OXI | 83 | 82 | 90 | 90 | 85 | 92 | 2.12 | 1.29 |
| TETRA | 61 | 121 | 66 | 110 | 68 | 87 | 2.12 | 4.58 |
| SMX | 64 | 63 | 66 | 69 | 68 | 73 | 2.12 | 0.39 |
| SDX | 44 | 111 | 65 | 116 | 65 | 109 | 2.12 | 2.95 |
| DOX | 57 | 60 | 68 | 54 | 65 | 59 | 2.12 | 0.28 |
| TYL | 60 | 87 | 84 | 81 | 91 | 75 | 2.12 | -0.31 |
| CIPRO | 115 | 196 ₁ | 130 | 180 | 126 | 158 | 2.31 | 5.59 |
| ENRO | 70 | 139 | 69 | 143 | 71 | 123 | 2.31 | 5.38 |

$\alpha = 0.05$

bd = bidestilada

En las figuras 11 y 12 se muestran las curvas de calibración correspondientes.

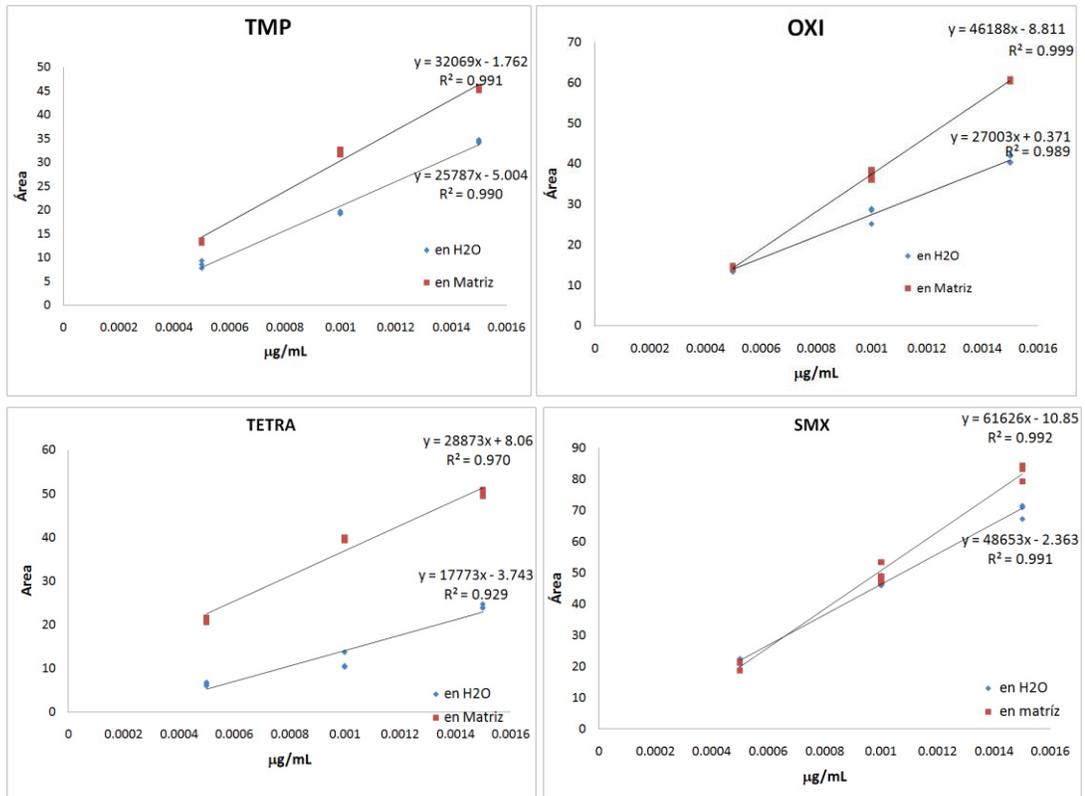


Figura 11. Curvas de calibración en agua (azul) y en matriz (rojo) de los antibióticos.

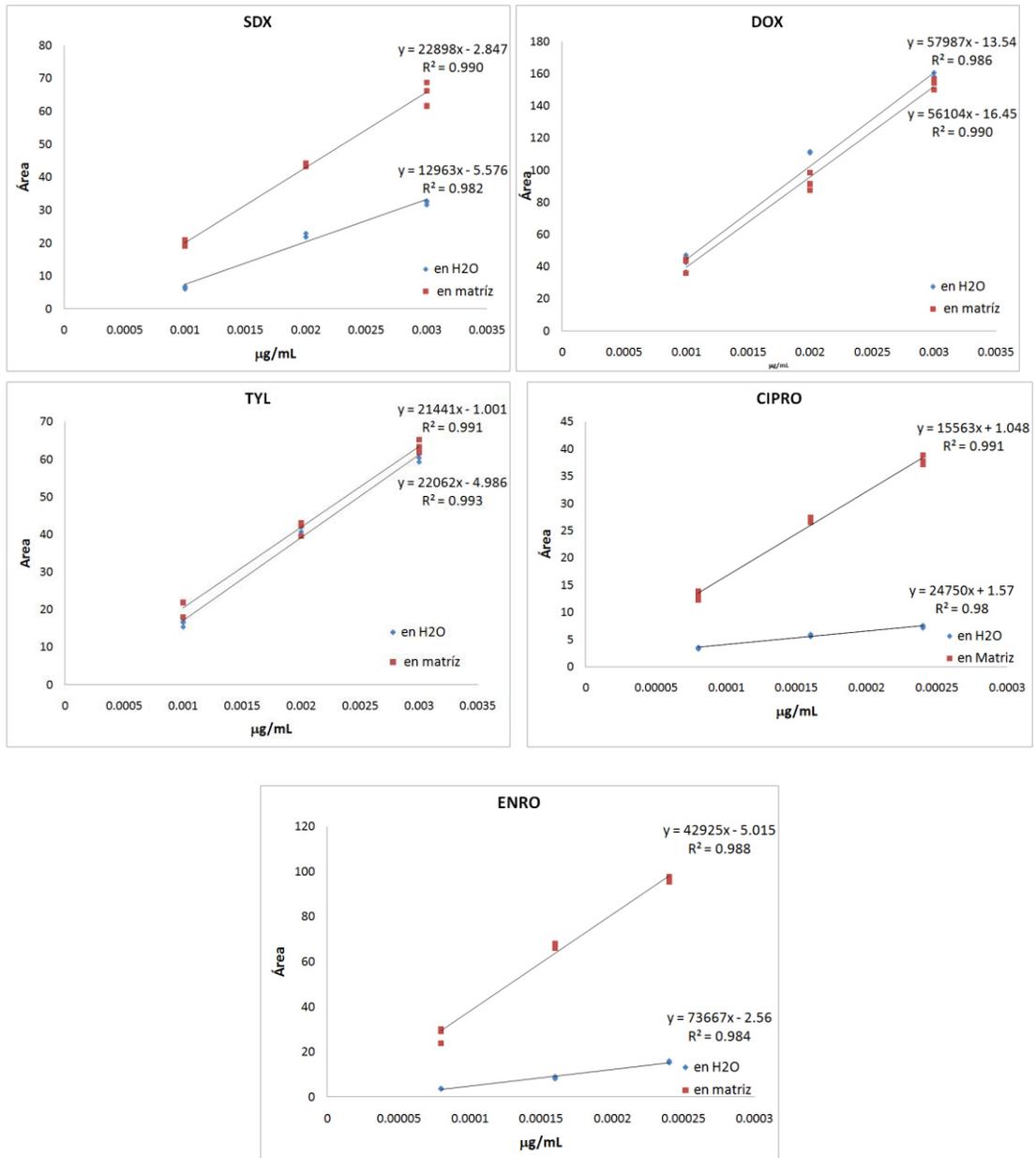


Figura 12. Curvas de calibración en agua (azul) y en matriz (rojo) de los antibióticos.

3.5 Análisis de muestras.

En la figura 13 se muestra el cromatograma obtenido del el análisis de la muestra de agua de la Presa de la Boca.

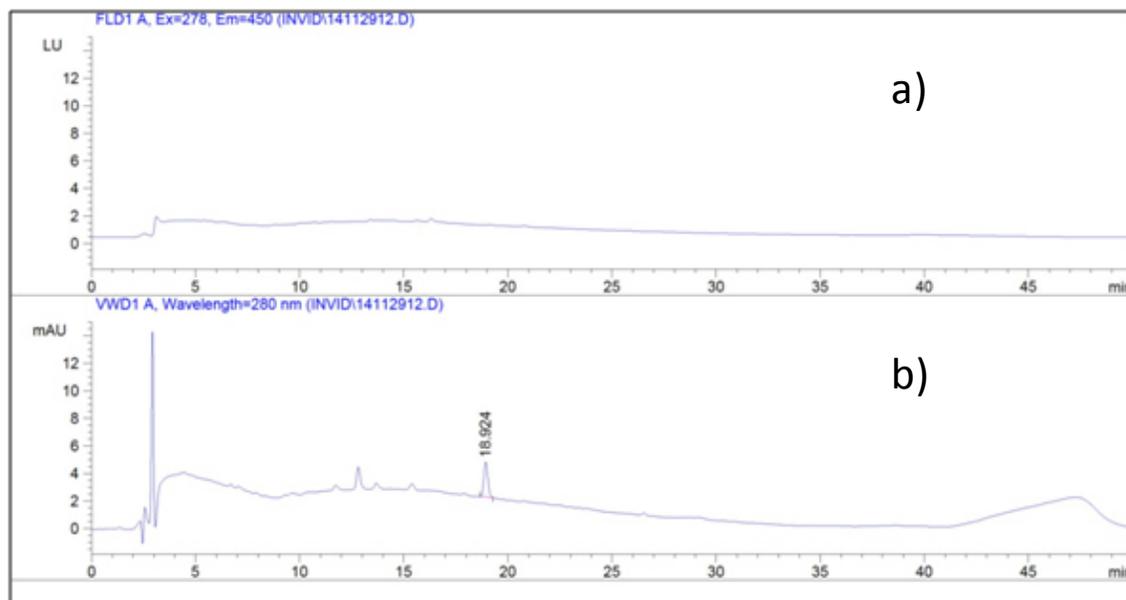


Figura 13. Análisis de agua de Presa Rodrigo Gómez. a) detección por fluorescencia a una λ_{ex} 278 nm y λ_{em} 450 nm b) detección por UV a 280 nm.

Si bien se observa una señal a tiempo de retención de 18.02 min, no corresponde con ninguno de los analitos incluidos en este estudio.

En la figura 14 y 15 se presentan los cromatogramas obtenidos para las muestras de agua de los ríos La Silla y Pilón respectivamente, en donde no se observa ninguna señal de los analitos incluidos en este estudio.

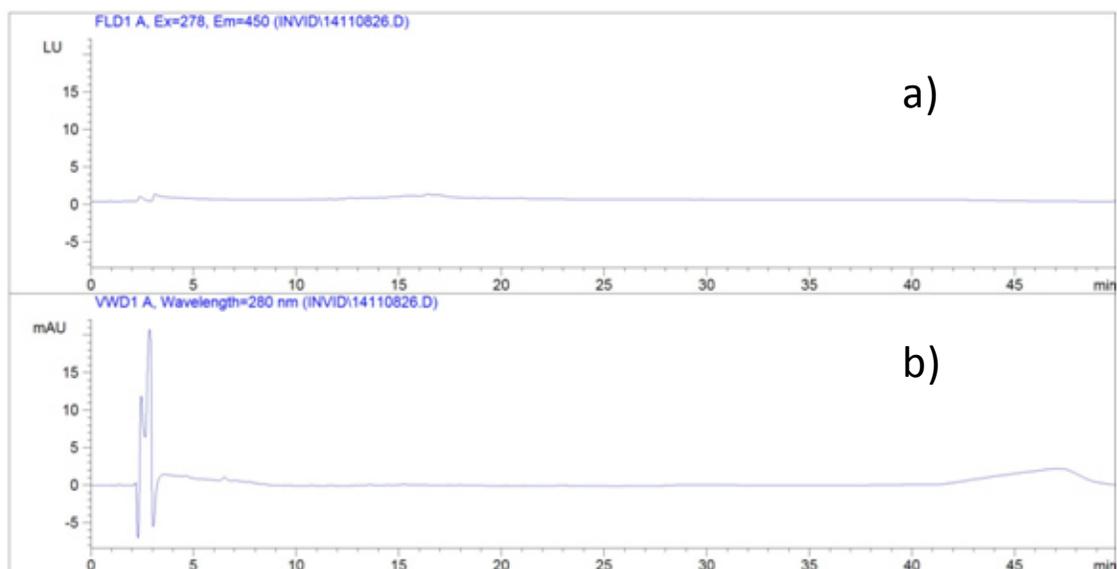


Figura 14. Análisis de agua de Río La Silla. a) detección por fluorescencia a una λ_{ex} 278 nm y λ_{em} 450 nm b) detección por UV a 280 nm.

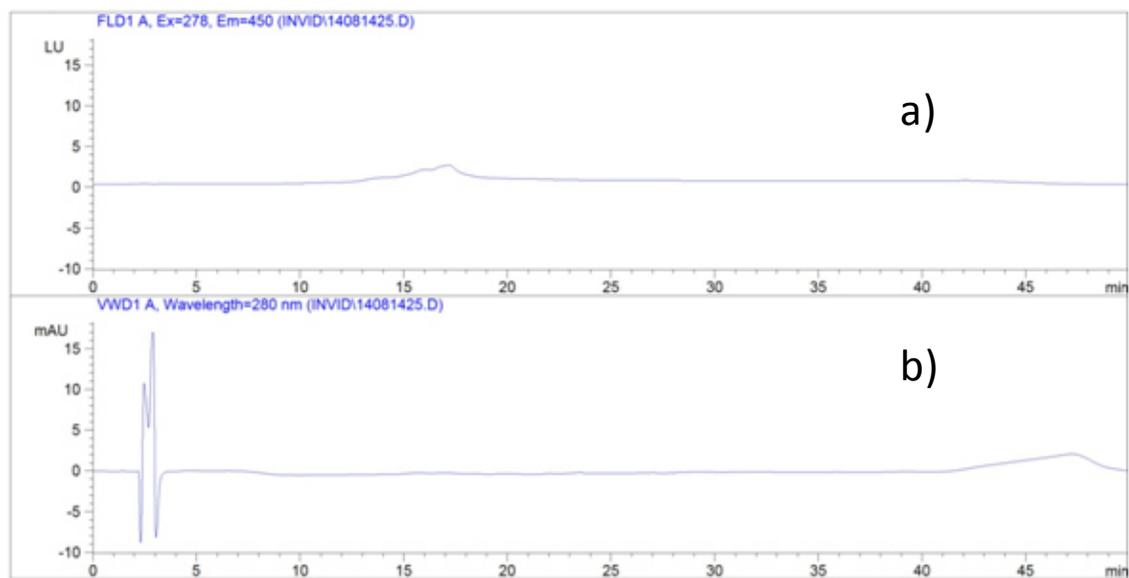


Figura 15. Análisis de agua de Río Pilon. a) detección por fluorescencia a una λ_{ex} 278 nm y λ_{em} 450 nm b) detección por UV a 280 nm.

CAPITULO 4

IV. DISCUSIÓN

4.1 Condiciones cromatográficas

4.1.1 Selección del gradiente y fase móvil

Durante el desarrollo del sistema cromatográfico se realizaron las pruebas de optimización en un equipo Waters Alliance 2695. Se probaron diferentes sistemas de solventes (ver tabla IV). La elución fue con un programa de gradiente y se inició con el establecido por Cavazos Rocha (41). Se utilizó una columna de fase inversa Atlantis T₃ (2.1 x 150 mm, 3 μm). El flujo fue de 0.2 mL/min. La detección fue por UV a λ 280 nm y por Fluorescencia a una λ_{ex} de 278 nm y λ_{em} de 450 nm (41). El volumen de inyección fue de 5 μL y se trabajó a una temperatura de 35°C.

Inicialmente se probó el sistema de solventes reportado por Hilton, quien empleó acetato de amonio 0.04M a pH 5 como fase acuosa, y como modificador orgánico metanol (44). No se observó resolución entre los analitos. Otro sistema que se probó durante la optimización de la fase móvil fue el ácido fórmico 0.1% en agua:ácido fórmico 0.1% en ACN (45; 46; 47). Al emplear este sistema de solventes la resolución entre los picos era menor de 1.5 para la mayoría de los antibióticos, razón por la cual se realizó un cambio de gradiente, sin embargo, aún así no se lograron separar las señales. Posteriormente se probó la separación de los antibióticos con el ácido fórmico 0.1%:ACN (48; 49; 50);sin embargo, con el empleo de este sistema de solventes tampoco se logró la resolución de los antibióticos involucrados en nuestro estudio.

Cuando se probó el sistema de solventes ATF 0.1%:ACN reportado por Nageswara (29), se observó la resolución para la mayoría de los analitos. Por esta razón, se decidió continuar con este sistema y modificar el programa de elución hasta lograr la separación de todos los antibióticos.

Una vez seleccionada la fase móvil y el programa de gradiente, se decidió probar el desempeño de otras columnas con la finalidad de mejorar la separación y resolución entre el par SDX y DOX ($R=1.2$). Las columnas que se probaron fueron de fase inversa con diferentes características en cuanto a tamaño de poro y partícula, un menor tamaño de poro y de partícula ofrece una mayor área superficial y por lo tanto una mejor separación. Además de que se presento menor resolución entre los picos SDX y DOX (con valores de R de 0.8

y 0.6 para la columna Luna y Synergi respectivamente) se observó pérdida de resolución entre los pares OXI- CIPRO ($R = 0.5$) en la columna Luna y entre el par NOR-TETRA ($R = 0.9$) en la columna Synergi, razón por la cual, la columna seleccionada fue la Atlantis T₃. Esta columna tiene menor tamaño de partícula y su tipo de recubrimiento (endcapping) le proporciona una mejor selectividad para compuestos polares (51), como se observó en los datos de los parámetros cromatográficos obtenidos durante la evaluación de las diferentes columnas (tabla XIV) y en los cromatogramas de la figura 8.

En los cromatogramas obtenidos (ver figura 7) por detección UV a 280 nm del análisis de la mezcla estándar de 5 µg/mL se observa que todos los analitos eluyeron en 35 minutos, tiempo suficiente para lograr la resolución de todos los picos; la señal más pequeña fue la de la AMOXI con factor de respuesta de 3, y las más grandes fueron para las fluoroquinolonas con factores de respuesta de 77 y 87 para CIPRO y ENRO respectivamente.

El uso del detector de arreglo de diodos del equipo Waters, permitió, junto con los tiempos de retención, identificar cada uno de los antibióticos en la mezcla y establecer el orden de elución. Debido a que se presentaron problemas con el desgasificador, la validación se realizó en un equipo HP 1100. El cromatógrafo de líquidos HP cuenta con detector de ultravioleta visible de longitud de onda fija, y detector de fluorescencia. En el detector ultravioleta se seleccionó la longitud de onda en la que se obtuviera la señal para todos los

analitos, aunque no fuera esta la óptima para cada uno de ellos. Además, en este equipo se tuvo que modificar el gradiente de elución, ya que se perdió la resolución para la mayoría de los analitos, debido a las diferentes dimensiones del equipo en cuanto a la longitud de la tubería. Una vez seleccionado el nuevo gradiente(ver Tabla XIII), se procedió a realizar la validación.

4.2 Validación del sistema cromatográfico

Cabe mencionar que dentro de los antibióticos seleccionados para este trabajo la NOR estaba incluida, pero cuando se trabajó en la validación se observó que los resultados de reproducibilidad eran muy variables para todas las quinolonas. Se realizaron varias pruebas tratando de encontrar la razón de la variación, en una de las pruebas no se incluyó a la NOR en la mezcla y se logró mejorar la precisión del resto de las quinolonas. Por esta razón se decidió continuar la validación sin incluir a la NOR. Hasta el momento no se tienen reportes ni información que nos ayuden a dar una explicación para este comportamiento.

4.2.1 Linealidad

Se obtuvieron las curvas de calibración mediante la gráfica de las áreas de los picos cromatográficos en función de la concentración de cada uno de los antibióticos. Si bien en un principio se trabajó a niveles de concentración de hasta 5 µg/mL, se decidió trabajar a niveles menores debido a que el rango de concentraciones en las que se encuentran los antibióticos en las aguas es muy bajo.

Los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos para todos los antibióticos se encontraron dentro de los criterios de aceptación (mayor de 0.98), además los % de DER de los factores de respuesta no fueron mayores del 15% lo cual también se considera aceptable (43). Esto indica que hay una respuesta lineal del área en función de la concentración.

4.2.2 Precisión

Los valores de %DER de las áreas de los picos de cada antibiótico en la mezcla estándar obtenidos, en un mismo día y en días diferentes, cumplieron los criterios de aceptación según la AOAC (52) ya que fueron menores del 15%, lo que indica que las condiciones del sistema cromatográfico son reproducibles.

4.3 Establecimiento de las condiciones óptimas de la SPE

Las condiciones de la extracción deben ser optimizadas para obtener la máxima eficiencia. Los factores que necesitan ser optimizados pueden ser numerosos; por lo que aumenta el número de experimentos aumentando el tiempo de operación y costos. Para evitar este problema, se aplicó un diseño experimental con el propósito de reducir el número de experimentos y mantener resultados confiables. El diseño factorial permite investigar el efecto de los factores en la respuesta (36).

Tomando en cuenta lo anterior, se seleccionaron los factores que se consideraron que afectan la eficiencia de la extracción, y se construyó una tabla de acuerdo al diseño de Plackett-Burman para conocer el número de experimentos que se deberían realizar. La selección de los factores se realizó tomando en cuenta lo siguiente:

- a) El pH influye en la ionización de los grupos funcionales. Debido a que los antibióticos seleccionados en este trabajo son compuestos ácidos básicos su retención en el adsorbente se ve afectada por este factor, por lo tanto dentro de las condiciones que se evaluaron se probó extraer la muestra a dos diferentes valores de pH de 3 y 5.
- b) El flujo de carga de la muestra también es importante, la velocidad deberá elegirse de manera que no sea muy rápida ya que no permitiría la interacción de los analitos con la fase estacionaria, pero tampoco debe ser muy lenta porque los tiempos de análisis serían muy largos. En la

mayor parte de los métodos de extracción en fase sólida se manejan velocidades entre 2 y 10 mL/min (32). En este trabajo se realizó la carga de la muestra a un flujo de 3 y 10 mL/min, dando mejores resultados cuando se realizó a una velocidad de 10 mL/min.

- c) Solvente de lavado. Después de la carga de la muestra, el adsorbente puede ser lavado con un solvente débil para eliminar los compuestos interferentes de la matriz pero sin desplazar al analito. En nuestro caso se probaron como solvente de lavado agua y una mezcla de agua:metanol (90:10). El agua fue seleccionada como solvente de lavado ya que fue con el que se obtuvieron los mejores resultados.
- d) El secado elimina la mayor cantidad del solvente de lavado y prepara al adsorbente para agregar el solvente de elución. Esta etapa es opcional y algunos métodos no la aplican, sin embargo, se decidió incluirla en el procedimiento de extracción de este trabajo para evaluar si tenía efecto en los resultados obtenidos.
- e) En la etapa de elución de analitos el solvente es importante, ya que se debe buscar un eluyente que rompa las interacciones entre el analito y el sorbente para lograr la máxima recuperación. El volumen debe ser el mínimo necesario para obtener la mayor concentración y el flujo debe ser tal que permita que se lleve a cabo el equilibrio de desorción (53).

Como se mencionó anteriormente, el diseño de Placket-Burman fue de gran utilidad, ya que permitió la combinación de 7 factores en 8 experimentos. Una vez realizados los experimentos, se seleccionó aquel en donde se obtuvo el

mejor resultado en función del número de señales que se observaron en el cromatograma. Además, a partir del cálculo que se realiza para el estudio de robustez se pudo concluir que los factores que tienen mayor influencia sobre la eficiencia de la extracción fueron el pH y el volumen de elución (54).

Los experimentos número 6 y 8 resultaron con mayor número de señales (11). Se compararon los resultados (área del pico cromatográfico) obtenidos de cada analito en cada uno de los experimentos aplicando la prueba *t* de student, y se observó que no había diferencia significativa entre ellos. Se decidió elegir el experimento 6, debido a que se emplea agua como solvente de lavado en lugar de utilizar una mezcla de agua-metanol. Al emplear solamente agua se disminuyen los costos por solventes y la generación de residuos. Posteriormente se realizó una modificación al experimento 6 cambiando el solvente de elución de ATF:ACN por metanol, sin modificar los otros parámetros, esto considerando que el metanol es un solvente más económico y de mayor volatilidad, por lo que al momento de evaporar el solvente se reducían los tiempos. Se realizaron extracciones a la mezcla estándar con el experimento 6 y el 6 modificado, los resultados obtenidos se compararon mediante una prueba *t* de student y no hubo diferencia significativa entre ellos, por lo que se decidió utilizar metanol como solvente de elución para el método de SPE.

Todos los experimentos del diseño de Plackett-Burman se realizaron por triplicado en los cartuchos Oasis HLB de Waters el cual es un adsorbente de fase inversa con balance hidrofílico – lipofílico y en los cartuchos Strata X que es

un adsorbente polimérico funcionalizado de fase reversa, estos cartuchos dan fuerte retención de compuestos neutros, ácidos o básicos. En los resultados obtenidos a partir del análisis de los cromatogramas se observó que en los cartuchos de Strata X se obtenía menor reproducibilidad, por lo que fueron descartados.

Por otro lado, después de aplicar el método MEPS se observaron señales cromatográficas solo para las sulfonamidas y las fluoroquinolonas; el resto de los antibióticos no se recuperaron. Si bien, las recuperaciones para las sulfonamidas se encontraron en el rango de 80-85%, para las quinolonas fue menor del 30%. Estos resultados hicieron que se continuara el resto del trabajo experimental usando la técnica de SPE para la validación del método y análisis de la muestra.

4.4 Evaluación del Proceso de SPE

El método desarrollado presenta la ventaja de ser multiresiduo, que permite la determinación simultánea de diferentes clases de antibióticos (55); hasta el momento los métodos que se han encontrado en la literatura se enfocan solo al análisis de dos o tres familias; por lo que hay que tomar en cuenta que las condiciones de SPE se han optimizado para la extracción de una o dos familias. En nuestro caso, al ser una extracción multiresiduo existe un compromiso entre la cantidad y el número de analitos recuperados. Se encontró una combinación de factores en donde, si bien las recuperaciones no son muy

altas para todos los antibióticos, los resultados son reproducibles y se recupera la totalidad de los analitos a niveles de ng/mL.

4.4.1 Linealidad

Se obtuvieron los coeficientes de determinación (R^2) (ver tabla XX) mayores de 0.98 para la mayoría de los antibióticos. Para residuos y contaminantes en alimentos la secretaría de salud a través de la COFEPRIS establece que se debe de obtener un coeficiente de correlación lineal (r) mayor que 0.98 y de un coeficiente de determinación (r^2) mayor de 0.95 (43), por lo que se consideran aceptables los resultados obtenidos.

4.4.2 Precisión y Recuperación

Los porcentajes de recuperación (ver tabla XXI) se encontraron en el rango de 60-130%, excepto para la SNA que tuvo una recuperación del 11%. Los porcentajes de recuperación de la mayoría de los antibióticos y de DER estuvieron dentro del valor considerado aceptable de acuerdo criterios para la validación de métodos fisicoquímicos de la COFEPRIS, considerando que se trabajó a niveles de concentración de ng/mL (43)

Estos porcentajes de recuperación fueron semejantes a los reportados por Zhou y colaboradores donde alcanzan recuperaciones entre 51-95% utilizando cartuchos de Oasis HLB para todos los compuestos de las familias de

tetraciclinas, sulfonamidas, macrólidos y quinolonas (32). En esta etapa se pudo observar la importancia del ajuste del pH de la muestra para estos analitos antes de la SPE. Generalmente, en la mayoría de los métodos multiresiduos publicados (32) el pH de la muestra es entre 2.5 y 3 empleando cartuchos poliméricos como el Oasis HLB. En nuestro caso, el pH de la muestra fue ajustado a 3, que fue con el que se obtuvieron las recuperaciones de todos los antibióticos.

4.4.3 Límite de Detección (LD) y de Cuantificación (LC)

Los LD y LC se obtuvieron de acuerdo a la ecuación 3 y 4 respectivamente. Los LD se encontraron en el rango de 0.04 a 1.30 ng/mL para ENRO y DOXI respectivamente. Los LC en el rango de 0.13 a 4.32 ng/mL para ENRO y DOX respectivamente.

En comparación con los límites de detección y cuantificación del sistema, se logró la disminución a niveles de concentración en el rango de ng/mL. Estos límites (ver tabla XXII) fueron más bajos que los alcanzados por Pavlovic (56) para OXI (LD = 10 y LC = 25 ng/mL), TMP (LD = 15 y LC = 25 ng/mL) y ENRO (LD = 0.5 y LC = 1 ng/mL) empleando la cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos para la determinación de fármacos en agua.

En cuanto a la técnica de MEPS, si bien no se logró la recuperación de todos los antibióticos empleando los cartuchos mixtos (C₁₈ con SCX), demostró ser útil para la extracción de sulfonamidas ya que se alcanzaron factores de concentración y recuperaciones precisas ($DER \leq 15\%$).

4.5 Validación del método de SPE en agua de río

Una vez que se obtuvieron los parámetros de validación de la técnica de extracción aplicada a muestras de agua bidestilada fortificada, se trabajó en evaluar los mismos parámetros en agua de río. Esto nos sirvió para evaluar el efecto de matriz.

4.5.1 Linealidad

Se realizaron las curvas de calibración y se obtuvieron los coeficientes de determinación (R^2) mayores de 0.97 para la mayoría de los antibióticos. Los porcentajes de desviación estándar relativa de los factores de respuesta fueron menores del 15%. Estos resultados fueron aceptables considerando los criterios que establecen las guías de COFEPRIS y de la AOAC para cuantificación de residuos.

4.5.2 Precisión y Recuperación

Los porcentajes de recuperación se encontraron en el rango de 54-196%, con desviación estándar relativa aceptables, según lo establecido por la AOAC (52). Si bien la AMOX fue recuperada cuando se trabajó a concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ durante el diseño de experimentos de SPE, al disminuir la concentración de este antibiótico en los experimentos para evaluar los porcentajes de recuperación la señal no fue detectada.

4.6 Efecto de Matriz.

El efecto matriz se evaluó comparando los porcentajes de recuperación obtenidos en agua bidestilada y en matriz, por medio de una prueba t de student. Los resultados del efecto de matriz mostraron que para TMP, OXI, SMX, DOX y TYL, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre la matriz de agua de río y agua bidestilada; sin embargo, para CIPRO; ENRO; TETRA y SDX sí existe diferencia significativa en los resultados, por lo tanto, es probable que los componentes de la matriz del agua de río afecten las recuperaciones de los antibióticos del grupo de las fluoroquinolonas, así como a TETRA y SDX. Para la cuantificación precisa y exacta de estos antibióticos se requiere del método de adición de estándar.

4.7 Análisis de muestra real

Para demostrar la aplicabilidad del método analítico multiresiduo desarrollado se analizaron muestras de agua del Río Pílon, del Río la Silla y agua de la Presa de la Boca.

En los cromatogramas obtenidos con detección por Fluorescencia y UV, de las muestras de agua del Río La Silla, así como del Río Pílon, no se observaron señales. Con respecto al análisis de la muestra de La Presa de la Boca sólo se observó por detección UV dos señales con tiempos de retención diferentes a los analitos estudiados, Sin embargo, esto no quiere decir que los antibióticos no estuvieran presentes en las muestras, sino que se pueden encontrar por debajo de los límites de detección de nuestro método.

La presencia de los antibióticos en agua puede estar influenciada por varios factores, como son: estaciones del año, sitio, origen y/o la presencia de hospitales o granjas en las cercanías del lugar de muestreo. En nuestro caso solo se tomaron muestras puntuales ya que se quería mostrar la aplicabilidad del método. Existen numerosos reportes del análisis de agua (de río, de mar, de beber, de influentes y efluentes de plantas de tratamiento de agua) en otros países. Se analizan diversos antibióticos y se reportan niveles tan bajos como de 0.05 ng/mL hasta 4.6 ng/mL en influentes de plantas tratadoras de agua residual (57; 58; 59). Aunque los límites de detección alcanzados por nuestro método fueron más altos que los alcanzados por métodos que utilizan el

acoplamiento a masas, la información anterior nos permite pensar que es posible que existan estos contaminantes en aguas de diferentes procedencias en nuestro país y que, por lo tanto, el método desarrollado podría aplicarse como un método de rastreo para determinar la presencia de los antibióticos estudiados en este trabajo.

CAPITULO 5

V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones

Se optimizó un sistema multiresiduo para la separación y determinación de 11 antibióticos de 5 diferentes familias: amoxicilina, trimetoprim, oxitetraciclina, tetraciclina, doxicilina, ciprofloxacina, enrofloxacina, sulfametoxazol, sulfanilamida, sulfadimetoxina y tetraciclina, por CLAR con detección UV y Fluorescencia.

Se desarrolló y validó un método analítico por CLAR con detección UV y Fluorescencia para el análisis simultáneo de 9 antibióticos de 4 diferentes familias en agua: trimetoprim, oxitetraciclina, ciprofloxacina, tetraciclina, enrofloxacina, sulfametoxazol, sulfadimetoxina, doxicilina y tilosina

El método involucró una etapa de concentración de la muestra empleando la técnica de extracción en fase sólida, lo cual permitió alcanzar límites de detección y cuantificación de ng/mL (ppb).

El pH y el volumen de elución son los factores que más afectan durante el proceso de extracción.

5.2 Perspectivas

Aplicar el método analítico de CLAR-UV-F, para la determinación de estos analitos en efluentes de aguas residuales urbanas y aguas residuales de hospitales.

Evaluar el desempeño de otro tipo de adsorbentes empleados en la técnica MEPS para la extracción y concentración de los analitos implicados en este estudio.

Aplicar el sistema cromatográfico para la determinación de estos antibióticos en otras matrices.

BIBLIOGRAFÍA

1. De la Cruz, N, J. Giménez, y S Esplugas. Degradation of 32 emergent contaminants by UV and neutra photo-fenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge. *Water Research* 46 (2012): 1947-1957.
2. Gil Garzón, Miriam Janet, Adriana María Soto, y Jorge Iván Usama Gutierrez. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Dialnet*, 2012: 52-73.
3. De la Cruz, N, L. Esquius, y D Grandejean. Degradation of emergent contaminants by UV, UV/H₂O₂ and neutral photo-Fenton at pilot scale in a domestic wastewater treatment plant. *Water Research* 47 (2013): 5836-5845.
4. Gila, Miriam Janet, Adriana María Soto, Jorge Iván Usma, y Omar Darío Gutiérrez. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia* 7, nº 2 (2012): 52-73.
5. Zhang, Hanimin, Pengxiao Liu, Yujie Feng, y Fenglin Yang. Fate of antibiotics during wastewater treatment and antibiotic distribution in the effluent-receiving waters of the Yellow Sea, northern China. *Marine Pollution Bulletin* 73 (2013): 282-290.
6. Patrolecco, Luisa, Nicoletta Ademollo, Paola Grenni, y Antonella Tolomei. Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection. *Microchemical Journal* 107 (2013): 165-171.
7. Bouki, Chryssa, Danae Venieri, y Evan Diamodopoulos. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 91 (2013): 1-9.
8. Luo, Yunglong; Guo, Wenshan; Ngo, Huu Hao y Zhang, Jian. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment* 473-474 (2014): 619-641.

9. Vasough, Morayam, y Hadi Mashhadiabbas Esfahani. Fast HPLC-DAD quantification procedure for selected sulfonamids, metronidazole and chloramphenicol in wastewaters using second-order calibration based on MCR-ALS. *Talanta* 113 (2013): 68-75.
10. Dreser, Anahí, Veronika J Wirtz, Kitty K Corbett, y Gabriela Echániz. Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud Pública de México* 50, nº 4 (2008).
11. Ferguson, Patrick J, Melody J Bernot, Jason C Doll, y Thomas E Lauer. Detection of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in near-shore habitats of southern Lake Michigan. *Science of the Total Environment* 458-460 (2013): 187-196.
12. Herrera-Herrera, Antonio V, Borges Javier Hernández, y Teresa M Borges-Miquel. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of 25 sulfonamide and quinolone antibiotics in water samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 75 (2013): 130-137.
13. M.D, Hernando, M Mezcuca, A R Fernández-Alba, y D. Barceló. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. 69 (2006): 334-342.
14. Skrasková, Karolina, Lúcia Santos, Dalibor Satínský, y Angelina Pena. Fast and sensitive UHPLC methods with fluorescence and tandem mass spectrometry detection for the determination of tetracycline antibiotics in surface waters. *Journal of Chromatography B* 927 (2013): 201-208.
15. Seifrtová, Marcela, Lucie Nováková, Celeste Lino, Angelina Pena, y Petr Solich. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Analytica Chimica Acta* 649 (2009): 158-179.
16. Cavenati, Simone, Pedro N Carvalho, y C. Marisa R Almeida. Simultaneous determination of several veterinary pharmaceuticals in effluents from urban, livestock and slaughterhouse wastewater treatment plants using a simple chromatographic method. *Water Science and Technology* (IWA Publishing) 66.3 (2012).
17. Kyselkova, Martina, y otros. Cow excrements enhance the occurrence of tetracycline resistance genes in soil regardless of their oxytetracycline content. *Chemosphere* 93 (2013): 2413-2418.

18. Lorenzo, P., A Moreno, I Lizasoain, J.C. Leza, M.A Moro, y A Portolés. Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica*. 18. Buenos Aires: Médica Panamericana. S. A., 2008.
19. Benito Peña, María Elena. TESIS. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS BASADOS EN NUEVOS ELEMENTOS DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN MUESTRAS DE INTERÉS AGROALIMENTARIO Y MEDIOAMBIENTAL. UNIVERSIDAD COMPUTENSE DE MADRID. FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA. 2006.
20. Evaggelopoulou, Evaggelia N, y Victoria F Samanidou. Development and validation of an HPLC method for the determination of six penicillin and three amphenicol antibiotics in gilthead seabream (*Sparus Aurata*) tissue according to the European Union Decision 2002/657/EC. *Food Chemistry* 136 (2013): 1322-1329.
21. Serra, Dr Héctor Alejandro. Quinolonas. *Separata* 16, nº 3 (2008).
22. Leyva, Socorro, y Elisa Leyva. Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Bol. Soc. Quim. Méx.* 2, nº 1 (2008): 1-13.
23. Mendoza Patiño, Nicandro, y Alonso Efraín Campos Sepúlveda. Actualidades Farmacológicas. Tetraciclinas. *Rev Fac Med UANL* 51, nº 1 (Enero-Febrero 2008).
24. Demitrienko, Stanislava G, Elena V. Kochuk, Vladimir V. Apyari, Veronika V. Tolmacheva, y Yury A. Zolotov. Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection – A review. *Analytica Chimica Acta* 850 (2014): 6-25.
25. Mejia Rangel, Luz Stella. Tesis. Validación de la Técnica para la cuantificación de Tilosina en un Producto Sólido. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. 2008.
26. Wang, Jian, Daniel Leung, y Steven P Lenz. Determination of Five Macrolide Antibiotic Residues in Raw Milk Using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006): 2873-2880.
27. Martínez, J.A, y F Sánchez. Mecanismo de acción de los antibióticos. *JANO*, nº 1660 (2007).

28. Yang Hu, Feng, Li-Min He, y Jian-Wen Yang. Determination of 26 veterinary antibiotics residues in water matrices by lyophilization in combination with LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B* 949-950 (2014): 79-86.
29. Nageswara Rao, R., N. Venkateswarlu, y R. Narsimha. Determination of antibiotics in aquatic environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1187 (2008): 151-164.
30. Madureira, Tania Vieira, Juliana Cristina Barreiro, y Maria Joao Rocha. Pharmaceutical trace analysis in aqueous environmental matrices by liquid chromatography–ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009): 7033-7042.
31. Ibañez, María, Carlos Guerrero, y Juan V. Sancho. Screening of antibiotics in surface and wastewater samples by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009): 2529-2539.
32. Zhou, John L., Khalid Masakaoui, y Adeleye Lufadeju. Optimization of antibiotic analysis in water by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 731 (2012): 32-39.
33. Gros, Meritxell, Sara Rodríguez-Mozaz, y Damiá Barceló. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1292 (2013): 173-188.
34. Yiruhan, Qiao-Jun Wang, Ce-Hui Mo, y Yan-Wen Li. Determination of four fluoroquinolone antibiotics in tap water in Guangzhou and Macao. *Environmental Pollution* 158 (2010): 2350-2358.
35. Ramos Payán, María, Miguel Ángel Bello López, y Rut Fernández Torres. Hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) as a new approach for the HPLC determination of fluoroquinolones in biological and environmental matrices. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55 (2011): 332-341.
36. Magiera, Sylwia, Sefika Gülmez, Aleksandra Michalik, y Irena Baranowska. Application of statistical experimental design to the optimisation of microextraction by packed sorbent for the analysis of

- nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human urine by ultra-high pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1304 (2013): 1-9.
37. Du, Wei, Gang Zhao, Qiang Fu, Min Sun, Huiyan Zhou, y Chun Chang. Combined microextraction by packed sorbent and high-performance liquid chromatography–ultraviolet detection for rapid analysis of ractopamine in porcine muscle and urine samples. *Food Chemistry* 145 (2014): 789-795.
38. Pena-Pereira, Francisco, Regina M.B.O. Duarte, y Armando C. Duarte. Considerations on the application of miniaturized sample preparation approaches for the analysis of organic compounds in environmental matrices. *Central European Journal of Chemistry* 10, n° 3 (2012): 433-449.
39. Abdel-Rehim, Mohamed. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010): 2569-2580.
40. Prieto, A., S. Schrader, C. Bauer, y M. Möder. Synthesis of a molecularly imprinted polymer and its application for microextraction by packed sorbent for the determination of fluoroquinolone related compounds in water. *Analytica Chimica Acta* 685 (2011): 146-152.
41. Cavazos Rocha, Norma C. TESIS. DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ANTIMICROBIANOS PROPUESTOS EN EL TRATAMIENTO DE ACTINOMICETOMA. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN. FACULTAD DE MEDICINA. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA. 2006.
42. ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 1996.
43. COFEPRIS www.cofepris.gob.mx.
www.cofepris.gob.mx/TyS/Documents/.../cvfq032011.pdf. (último acceso: 25 de febrero de 2015).
44. Hilton, MJ, y KV Thomas. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1015 (2003): 129-41.

45. Lindber, R, PA Jarnheimer, B Oslen, M Johansson, y M Tysklind. Determination of antibiotics substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chromosphere*. 57, nº 10 (2004): 1479-88.
46. Kim, SC, y K. Carson. Quantification of human and veterinary antibiotics in water and sediment using SPE/LC/MS/MS. *Anal. Bioanal Chem*. 387, nº 4 (2007): 1301-15.
47. Spongberg, AL, y JD. Witter. Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northeast Ohio. *Total Environ* 397, nº 1-3 (2008): 148-57.
48. Ye, Z, H. S. Weinberg, y M. T. Mayer. Trace Analysis of Trimethoprim and Sulfonamide, Macrolide, Quinolone, and Tetracycline Antibiotics in Chlorinated Drinking Water Using Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem* 79, nº 3 (2007): 1135-1144.
49. Gómez, M J, M Petrovic, A R Fernández Alba, y D Barceló. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *J Chromatogr A* 1114, nº 2 (2006): 224-33.
50. Ye, S, Z Yao, G Na, J Wang, y D Ma. Rapid simultaneous determination of 14 sulfonamides in wastewater by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*. 30, nº 15 (2007): 2360-9.
51. Waters. www.waters.com. www.waters.com/.../en.../Atlantis-Columns/nav.htm?. (último acceso: 9 de Marzo de 2001).
52. AOAC International Guidance for Standard Method Performance Requiriminets. 2012
53. Poole, Colin F, Ajith D Guanatilleka, y Revathy Sethuraman. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* 885 (2000): 17-39.
54. Quattrocchi, Oscar Alberto, Sara Abelaira de Andrizzi, y Raúl Felipe Laba. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro S.A., 1992.

55. Senta, Ivan, Senka Terzic, y Marijan Ahel. Simultaneous Determination of Sulfonamides, Fluoroquinolones, Macrolides and Trimethoprim in Wastewater and River Water by LC-Tandem-MS. *Chromatographia* 68 (2008): 747-758.
56. Mutavdzic´Pavlovic´, Dragana, Sandra Babic´, y Davor Dolar. Development and optimization of the SPE procedure for determination of pharmaceuticals in water samples by HPLC diode array detection. *J. Sep. Sci* 33 (2010): 258-267.
57. Yang, Shinwoo, Jongmun Cha, y Kenneth Carlson. Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1097 (2005): 40-
58. Senta, Ivan, Senka Terzic´, y Marijan Ahel. Simultaneous Determination of Sulfonamides, Fluoroquinolones, Macrolides and Trimethoprim in Wastewater and River Water by LC-Tandem-MS. *Chromatographia* 68 (2008): 747-758.
59. He, Ke, y Lee Blaney. Systematic optimization of an SPE with HPLC-FLD method for fluoroquinolone detection in wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 282 (2015): 96-105.