



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA POR EFS-CLAR/UV PARA LA
DETERMINACIÓN DE SULFAS A NIVELES TRAZA EN AGUAS AMBIENTALES.**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. RAÚL ALFONSO BAHAMONDE SORIA



TUTOR:
DRA. LUZ ELENA VERA ÁVILA

AÑO:2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. MARTHA PATRICIA GARCIA CAMACHO

VOCAL: DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO

VOCAL: DRA. ALMA LUISA REVILLA VÁZQUEZ

VOCAL: DR. JOEL REZA GONZÁLEZ

SECRETARIO: DR. MIQUEL GIMENO SECO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 115, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

RESULTADOS PRELIMINARES DERIVADOS DE ESTE TRABAJO FUERON PRESENTADOS EN EL 45° CONGRESO MEXICANO DE QUÍMICA ORGANIZADO POR SOCIEDAD QUÍMICA DE MÉXICO, CELEBRADO EN RIVIERA MAYA - QUINTANA ROO, DEL 18 AL 22 DE SEPTIEMBRE DEL 2010

ASESOR DEL TEMA:

Dra. LUZ ELENA VERA ÁVILA

SUSTENTANTE:

Q. RAÚL ALFONSO BAHAMONDE SORIA

Dedicada a mis padres

*Por creer, y confiar siempre en mí, porque gracias a ustedes
he cumplido una meta más en mi vida*

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por acogerme en sus brazos y darme una educación de excelencia y gratuita.

A La Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) Ecuador por la beca otorgada con la cual fue posible el desarrollo del presente proyecto de investigación así como mis estudios de Maestría en Ciencias Químicas.

A la Dra. Luz Elena Vera Ávila, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. Por el apoyo, comprensión, confianza, ayuda y transmisión del conocimiento, lo cual fue fundamental para la realización del presente proyecto de maestría.

A mi supervisora técnica M. en C. Rosario Covarrubias Herrera, por el tiempo, paciencia y guía a lo largo de mi realización el presente trabajo, y lo más importante por cada consejo, ayuda y por la amistad brindada.

A los miembros del jurado, por sus valiosas aportaciones a la presente tesis

A Verito por ser la persona que eres, por cada gesto, palabra y lo más importante comprensión mostrada a lo largo de nuestra convivencia, también por cada consejo muy acertado y por ser el apoyo que Dios pudo en mi camino para cumplir este objetivo.

A Paty porque a lo largo de esta estancia me hizo sentir más cerca de casa con cada locura, palabra de apoyo y confianza muchas gracias amiga mía.

A Blanquita Saldaña por cada momento y sonrisa que hicieron una estancia más amena en el laboratorio mil gracias.

A mis compañeros de laboratorio Denny, Marce, Olivia y David, por cada consejo y ayuda brindada.

A mis amigos Flavio, Marce, Diego, por hacer que la lejanía de casa no sea tan dura.

A Gloria García y Antonio Valderrama por ser unas de las pocas personas que sin conocerme me dio confianza, ayuda incondicional y por hacerme sentirme como en casa al abrirme las puertas de su hogar, nunca terminare de agradecerles.

A mi hermana Karmyta por ser un ejemplo de auto superación para mí, también por hacerme sentir tranquilo porque mis padres estaban en buenas manos.

A lili, Arturín, Saskita y el Nachín por ser el ejemplo a seguir cuando deba formar una familia, mil gracias por el apoyo, ayuda y comprensión.

A mis padres Raúl y Olguita porque me demostraron que a pesar de la adversidad siempre existe un camino para ser feliz y salir adelante, gracias por confiar ciegamente en mí y por ser uno de los motivos más grandes para salir siempre adelante pese a todo.

*A mi prometida y si Dios quiere mi futura esposa **BiAnX** por ser Tan t !!! Por cada momento vivido, porque a pesar de lo que sea siempre me ayudas!! a salir adelante, por ser esa otra parte que esperaba y que llego a mi vida a complementarla, por ser el apoyo con el que quiero contar toda una eternidad, porque a pesar de la distancia teníamos que estar juntos... al fin te encontr !!!*

*.....Puedo ver en tus ojos, que en mi pasado y mi presente es t s T U  !!!!!.....
.....Perdido sin t !.....*

Y a Dios, que más podría decir, si no hubiese tenido su bendición nada de esto podría haber realizado....

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	5
II. 1. Generalidades.....	6
II. 1.1. Contaminación química.....	6
II. 1.2. Fármacos y otros productos de cuidado personal (PPCPs)....	7
II. 2. Fármacos.....	9
II. 2.1 Fármacos en el medio ambiente.....	9
II. 2.2 Fuentes y orígenes.....	11
II. 2.3 Clases de fármacos más comunes.....	13
II. 3. Sulfonamidas.....	16
II. 3.1. Propiedades físicas y químicas de las sulfonamidas.....	17
II. 3.2 Métodos de análisis.....	26
II. 4. Métodos de Preparación de Muestra.....	27
II. 4.1. Extracción líquido-líquido (ELL)	29
II. 4.2 Extracción en fase solida (EFS).....	30
II. 4.2.1 Generalidades.....	30
II. 4.2.2 Procedimiento de la EFS fuera de línea.....	34
II. 4.2.3 Extracción en fase sólida en línea.....	36
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
III. 1. Hipótesis.....	40
III. 2. Objetivos.....	40
IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL	41
IV. 1. Equipo y materiales.....	42
IV. 2. Reactivos y Disolventes.....	43
IV. 3. Preparación de soluciones estándar de sulfas.....	44
IV. 4. Condiciones Cromatográficas.....	44
IV. 5. Pre-tratamiento de la muestra.....	45
IV. 6. Preconcentración de la muestra y análisis en línea.....	46
IV. 7. Evaluación del método.....	51
IV. 7.1. Estudios de recobro.....	51

IV. 7.2. Linealidad y precisión del método.....	51
IV. 7.3. Límites de detección y cuantificación del método.....	52
IV.8. Aplicación del método.....	52
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
V.1. Desarrollo del método analítico.....	55
V. 1.1. Condiciones cromatográficas.....	55
V. 1.1.1. Condiciones para la detección UV de las sulfas.....	55
V. 1.1.2 Optimización de la separación de las sulfas.....	56
V. 1.2. Preparación de la muestra.....	60
V. 1.2.1. Pre-tratamiento de la muestra.....	60
V. 1.2.2. EFS- en línea.....	62
V. 1.2.2.1. Estudio del pH óptimo para la carga de la muestra en la precolumna.....	63
V. 1.2.2.2. Volumen de carga.....	64
V. 1.2.2.3. Velocidad de flujo durante la carga.....	65
V. 1.2.2.4. Lavado de la precolumna una vez preconcentrados los analitos.....	66
V. 2. Evaluación del método.....	66
V. 2.1 Estabilidad de las sulfas.....	67
V. 2.2. Linealidad del sistema CLAR-UV.....	68
V. 2.3. Linealidad del método.....	69
V. 2.4. Precisión y recobro promedio en análisis replicados.....	73
V. 2.5. Límites de detección del método.....	76
V. 2.6. Límites de cuantificación.....	78
V. 3. Aplicación del método analítico en muestras reales de aguas superficiales.....	79
V. 3.1. Muestra Fuentes Brotantes.....	81
V. 3.2. Muestra Chalma.....	86
V. 3.3. Análisis de muestra Peña Pobre.....	90
VI. CONCLUSIONES.....	97
ANEXOS.....	99
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

INDICE DE TABLAS

Tabla II.1. Estructura y propiedades ácido-base de las sulfonamidas	18
Tabla II.2. Propiedades fisicoquímicas de la sulfadiazina	20
Tabla II.3. Propiedades fisicoquímicas del sulfatiazol	21
Tabla II.4. Propiedades fisicoquímicas de la sulfamerazina	21
Tabla II.5. Propiedades fisicoquímicas de la sulfametazina	22
Tabla II.6. Propiedades fisicoquímicas del sulfametoxazol	23
Tabla II.7. Propiedades fisicoquímicas del sulfisoxazol.	24
Tabla II.8. Propiedades fisicoquímicas de la sulfadimetoxina	25
Tabla II.9. Algunos métodos publicados para la determinación de sulfonamidas en muestras acuosas y tejidos	27
Tabla IV.1. Concentración de las sulfas en la solución Stock	44
Tabla IV.2. Programa de gradiente utilizado para la separación de las 7 sulfas	45
Tabla IV.3. Condiciones de EFS	50
Tabla V.1. Estudio de la respuesta de las sulfas en función de la λ . de detección	55
Tabla V.2. Tiempos de retención de las siete sulfas en modo de elución isocrático	57
Tabla V.3. Tiempos de retención de las 7 sulfas en gradiente de elución n=3	60
Tabla V.4. Comparación de áreas de pico obtenidas en el análisis de disoluciones acuosas de las siete sulfas (~2.1 $\mu\text{g/mL}$) después de una extracción con hexano, n=3.	61
Tabla V.5. Efecto del pH de carga en el recobro de las sulfas, n=3.	63
Tabla V.6. Influencia del volumen de carga sobre la recuperación de los Solutos, n=3.	64
Tabla V.7. Estudio de recuperación de las sulfas en función de la velocidad	65

de flujo, n=3.

Tabla V.8. Linealidad del sistema CLAR-UV	68
Tabla V.9. Coeficientes de determinación y ecuaciones de las rectas de regresión obtenidas en el estudio de linealidad del método	70
Tabla V.10. Resultados de la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen de la recta de regresión; nivel de confianza $\alpha = 0.05$, n = 7	71
Tabla V.11. Resultados de la prueba de hipótesis sobre la pendiente de la recta de regresión; nivel de confianza $\alpha = 0.05$, n = 7	72
Tabla V.12. Intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada al origen de las rectas de regresión (<i>Cantidad Recuperada Vs Cantidad Adicionada</i>), calculados con base en una distribución t con $\alpha = 0.05$ y 19 grados de libertad	73
Tabla V.13. Estudio de precisión (repetibilidad) del método. Análisis de muestras de agua grado reactivo dopadas a ~3 ng/mL de cada sulfá; n = 9, $\alpha = 0.05$. $t_{\alpha, n-1} = 2.31$	75
Tabla V.14. Comparación del Recobro obtenido en dos diferentes estudios	76
Tabla V.15. Límites de detección del método (LDM), estimados a partir de la desviación estándar (D.E.) obtenida en el análisis de una muestra fortificada; n=9	77
Tabla V.16. Límites de cuantificación del método (LCM), evaluados por dos diferentes criterios	79
Tabla V.17. pH de las tres muestras colectadas en diferentes sitios	80
Tabla V.18. Áreas de pico a dos longitudes de onda y su cociente para sulfatiazol (STZ) y sulfametazina (SMT) en el estándar y para los picos de igual tiempo de retención en la muestra blanco de Fuentes Brotantes (F.B.)	83
Tabla V.19. Cocientes de áreas de pico a dos longitudes de onda para sulfatiazol (STZ), sulfametazina (SMT) y sulfisoxazol (SFX) en el estándar y para los picos con igual tiempo de retención en la muestra blanco proveniente de Chalma	89
Tabla V.20. Cocientes de áreas de pico a dos longitudes de onda para el sulfisoxazol (SFX) en el estándar y para el pico con igual tiempo de retención en la muestra blanco proveniente de Peña Pobre	93

Tabla V.21. Recuperación de las sulfas en la muestra de agua superficial proveniente del parque Fuentes Brotantes, dopada a ~1.6 ng/mL de cada una, y su comparación con el recobro promedio obtenido en muestras sintéticas.	94
Tabla V.22. Recuperación de las sulfas en la muestra de agua superficial proveniente de Chalma, dopada a ~0.668 ng/mL de cada una, y su comparación con el recobro promedio obtenido en muestras sintéticas.	94
Tabla V.23. Recuperación de las sulfas en la muestra de agua superficial proveniente del parque Loreto y Peña Pobre, dopada a 0.448 ng/mL de cada una, y su comparación con el recobro promedio obtenido en muestras sintéticas	95
Tabla A.2.1 Recuperación de sulfadiazina en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas a diferentes niveles de concentración	105
Tabla A.2.2 Recuperación de sulfatiazol en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con sulfas a diferentes niveles de concentración	106
Tabla A.2.3. Recuperación de sulfamerazina en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con sulfas a diferentes niveles de concentración	107
Tabla A.2.4. Recuperación de sulfametazina en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con sulfas a diferentes niveles de concentración	108
Tabla A.2.5. Recuperación de sulfametoxazol en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con sulfas a diferentes niveles de concentración	109
Tabla A.2.6. Recuperación de sulfisoxazol en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con sulfas a diferentes niveles de concentración	110
Tabla A.2.7. Recuperación de sulfadimetoxina en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con sulfas a diferentes niveles de concentración	111

INDICE DE FIGURAS

Figura II.1. Zonas de predominio de las formas ácido-base de las sulfonamidas	19
Figura II.2. Estructura de la sulfadiazina	19
Figura II.3. Estructura del sulfatiazol	20
Figura II.4. Estructura de la sulfamerazina	21
Figura II.5. Estructura de la sulfametazina	22
Figura II.6. Estructura del sulfametoxazol	23
Figura II.7. Estructura del sulfisoxazo	24
Figura II.8. Estructura de la sulfadimetoxina	25
Figura II.9. Estructura base de un cartucho de EFS	31
Figura II.10. Estructuras tipo de fases estacionarias para EFS basadas en sílice: A) sílice virgen, B) sílice modificada con grupos polares (fase normal) o apolares (fase reversa)	31
Figura II.11. Proceso de lavado cuando el analito interacciona con la fase estacionaria más fuertemente que las impurezas provenientes de la muestra	35
Figura II.12. Proceso de lavado cuando el analito interacciona con la fase estacionaria más débilmente que las impurezas provenientes de la muestra.	36
Figura IV.1. Esquema del montaje utilizado	47
Figura IV. 2. Esquema general de las etapas que conforman el proceso de EFS	48
Figura IV.3. Esquema del sistema utilizado para realizar en forma independiente las operaciones de acondicionamiento, carga, lavado y regeneración de las precolumnas	50
Figura V.1. Estados de protonación de sulfonamidas, [Boreen, 2004]	56
Figura V.2. Separación de las 7 sulfas en condiciones isocráticas. Inyección directa de 26 µL de una mezcla estándar (~20 µg/mL) en el sistema acoplado precolumna (PLRP-S) + columna analítica (Hypersil	57

ODS). Solutos: 1) SDZ 2) SFZ, 3) SMR, 4) SMT, 5) SMX, 6) SFX, 7) SDX

Figura V.3. Sulfadimetoxina (26 μ L, 20 μ g/mL) inyectada directamente en el sistema cromatográfico y eluída en modo isocrático 58

Figura V.4. Separación de las 7 sulfas por gradiente de elución. Inyección directa de 26 μ L de una mezcla estándar (~2.1 μ g/mL) en el sistema cromatográfico. Precolumna (20 x 2 mm, d.i.) PLRP-s de 10-15 μ m, columna analítica (150 x 4.6 mm, d.i.) Hypersil ODS de 5 μ m, flujo de 1mL/min, detección UV a 270 nm. 59

Figura V.5. Estabilidad de las sulfas en disolución acuosa 67

Figura V.6. Linealidad del sistema CLAR-UV para cada sulfa 69

Figura V.7. Cromatograma obtenido del análisis de una muestra sintética de agua grado reactivo dopada con las sulfas a ~3 ng/mL 74

Figura V.8. Cromatograma obtenido del análisis de una muestra sintética de agua grado reactivo dopada con las siete sulfas a ~0.22 ppb; nivel cercano al LDM estimado. 78

Figura V.9. Azul: Cromatograma obtenido del análisis de la muestra blanco de Fuentes Brotantes. **Rojo** Cromatograma de un estándar de sulfas (~2.1 μ g/mL). Detección a 270 nm en ambos casos 81

Figura V.10. Cromatograma de un estándar de sulfas (~2.1 μ g/mL) corrido a 254 nm (**rojo**) y a 270 nm (**azul**). 82

Figura V.11. Cromatograma de muestra blanco corrida a 254 nm (**rojo**) y 270 nm (**azul**), mostrando posibles picos de sulfatiazol y sulfametazina 83

Figura V.12. Ampliación de la zona donde eluye el sulfatiazol para los cromatogramas obtenidos del análisis de la muestra blanco de Fuentes Brotantes (**azul**) y la misma muestra dopada con el analito a concentración de 0.224 ng/mL (**rojo**) y 0.448 ng/mL (**negro**). Detección a 270 nm 84

Figura V.13. Cromatograma obtenido del análisis de la muestra blanco proveniente de Chalma. Detección a 270 nm 86

Figura V.14. Cromatogramas obtenidos del análisis de la muestra blanco de Chalma (**azul**) y de un estándar inyectado (1.12 μ g/mL). Las flechas indican la posible presencia de sulfas en la muestra 87

Figura V.15. Cromatogramas obtenidos del análisis de la muestra blanco de Chalma (**azul**) y la misma muestra dopada a ~0.448 ng/mL de cada sulfa 88

(rojo). Solutos 1) sulfadiazina, 2) sulfatiazol, 3) sulfamerazina, 4) sulfametazina, 5) sulfametoxazol, 6) sulfisoxazol, 7) sulfadimetoxina

Figura V.16. Cromatogramas obtenidos del análisis de la muestra blanco de Peña Pobre (**azul**) y de un estándar inyectado (1.12 µg/mL) (**rojo**). La flecha indica la posible presencia de una sulfa en la muestra. Sulfas: 1) Sulfadiazina 2) Sulfatiazol, 3) Sulfametazina, 4) Sulfamerazina, 5) sulfametoxazol, 6) Sulfisoxazol, 7) Sulfadimetoxina 90

Figura V.17. Cromatogramas obtenidos del análisis de la muestra de agua de Peña Pobre: a) muestra blanco, b) muestra dopada a 0.224 ng/mL (LDM), c) muestra dopada a 0.448 ng/mL (LCM). 92

Figura. A1.1 Cinturón de confianza 102

Figura. A1.2 Límites de predicción de la regresión lineal 102

Figura A.2.1. Linealidad del método para la sulfadiazina. Cantidad de sulfadiazina recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna 105

Figura A.2.2. Linealidad del método para el sulfatiazol. Cantidad de sulfatiazol recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna 106

Figura A.2.3. Linealidad del método para la sulfamerazina. Cantidad de sulfamerazina recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna. 107

Figura A.2.4. Linealidad del método para la sulfametazina. Cantidad de sulfametazina recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna 108

Figura A.2.5. Linealidad del método para el sulfametoxazol. Cantidad de sulfametoxazol recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna 109

Figura A.2.6. Linealidad del método para el sulfisoxazol. Cantidad de sulfisoxazol recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna 110

Figura A.2.7. Linealidad del método para la sulfadimetoxina. Cantidad de sulfadimetoxina recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna 111

ABREVIATURAS

PPCPs	Del inglés: pharmaceuticals and personal care products
g	gramos
mg	miligramos
ng	nanogramos
µg	microgramos
nm	nanómetros
L	litro
mL	mililitros
ppm	partes por millón (mg/L)
ppb	partes por billón (µg/L)
ppt	partes por trillón (ng/L)
ADN	ácido de desoxirribonucleico
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
C18	octadecilsilil
EM	Espectrometría de masas
SDZ	Sulfadiazina
STZ	Sulfatiazol
SMR	Sulfamerazina
SMT	Sulfametazina
SMX	Sulfametoxazol
SFX	Sulfisoxazol
SDX	Sulfadimetoxina
UV	Ultravioleta
UV λ_{\max}	Longitud de onda de máxima absorbancia de luz ultravioleta
ESI	por sus siglas en inglés: ionización por electrospray
APCI	por sus siglas en inglés: ionización química a presión atmosférica
EFS	Extracción en fase sólida
MEFS	Microextracción en fase sólida
LDM	Límite de detección del método
LCM	Límite de cuantificación del método
MeOH	Metanol
AcCN	Acetonitrilo
PLRP-S	fase reversa polimérica
US-EPA	Agencia para la protección al ambiente de Estados Unidos
D.E.	Desviación estándar
CV	Coeficiente de variación

Resumen

Los residuos de medicamentos y otros productos de cuidado personal (PPCPs, siglas del nombre en inglés: pharmaceuticals and personal care products) se han convertido actualmente en una de las fuentes potenciales de contaminación del agua más importantes, debido a su alto consumo y a la falta de normas que regulen su presencia en el ambiente. Entre estos “contaminantes emergentes” se incluye un grupo de antibióticos conocidos como sulfas o sulfonamidas, los cuales son ampliamente utilizados, en la agricultura como herbicidas, en medicina veterinaria para la prevención o el tratamiento de enfermedades de los animales domésticos y el ganado, y en medicina humana para el tratamiento de enfermedades respiratorias e infecciones del tracto urinario. Se estima que la principal fuente de contaminación de aguas superficiales y suelos por PPCPs son las aguas residuales urbanas no tratadas y los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales.

Las metodologías reportadas para la determinación de trazas de fármacos y otros PPCPs en aguas ambientales se basan en el uso de instrumentación costosa y sofisticada como la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas tándem (CLAR-EM/EM). En México y otros países en vías de desarrollo, son pocos los laboratorios que cuentan con el equipo y personal calificado para llevar a cabo este tipo de análisis. Por ello, en este trabajo se propone una alternativa eficaz y sensible, que sólo requiere de instrumentación convencional (CLAR-UV), para la determinación de 7 sulfas (sulfadiazina SDZ, sulfatiazol STZ, sulfamerazina SMR, sulfametazina SMT, sulfametoxazol SMX, sulfisoxazol SFX y sulfadimetoxina SDM) en matrices acuosas.

El método desarrollado consta de tres etapas principales:

- 1) Pre-purificación de la muestra por extracción líquido-líquido para remover impurezas de baja y mediana polaridad, dejando los analitos hidrofílicos en la fase acuosa
- 2) Concentración de las sulfas por extracción en fase sólida (EFS) en una precolumna de fase reversa polimérica

3) Acoplamiento de la precolumna de EFS a la columna analítica para la elución de los solutos concentrados y su análisis en línea por CLAR-UV a 270 nm.

La validación del método se llevó a cabo con muestras sintéticas de agua grado reactivo fortificadas con las sulfas a concentraciones ≤ 10 ppb. Los recobros promedio obtenidos en el intervalo de concentraciones de 0.5-10 ppb fueron: SDZ-73.2 \pm 4.5%, STZ-78.6 \pm 2.2%, SMR-95.1 \pm 1.2%, SMT-94.3 \pm 1.3%, SMX-91.6 \pm 1.9%, SFX-92.5 \pm 0.8% y SDM-90.8 \pm 1.3%. El tratamiento estadístico de los resultados demostró la linealidad del método en el intervalo de concentraciones estudiado ($r^2 > 0.99$) y su excelente precisión a estos bajos niveles de concentración ($CV < 3\%$). Los límites de detección y cuantificación del método estuvieron comprendidos en los intervalos de 0.13-0.20 ppb y 0.44-0.61 ppb, respectivamente, dependiendo de la sulfa.

El método fue aplicado en muestras de aguas superficiales provenientes de: Parque Nacional Fuentes Brotantes, Parque Ecológico Loreto y Peña Pobre, y poblado de Chalma. Las señales de matriz observadas fueron relativamente pequeñas y utilizando las capacidades del detector UV con arreglo de diodos (espectros de absorción y cocientes de respuesta a dos longitudes de onda) se comprobó que ninguna de ellas era debida a las sulfas. El análisis de las mismas muestras fortificadas con las 7 sulfas a concentraciones cercanas a la ppb o menores demostró que los recobros eran similares a los obtenidos con muestras sintéticas (compuestas de agua tipo I y fortificadas), avalando así la eficacia del método para la determinación de estas sulfas en aguas ambientales.

Abstract

The residues of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) are actually becoming one of the most important potential sources of water contamination, because of their high use and the lack of regulations concerning their presence in the environment. Among these "emerging contaminants" is included a group of antibiotics known as sulfas or sulfonamides, which are widely used, as herbicides in the agricultural area, for the prevention or treatment of domestic animals and cattle diseases in veterinary medicine, and for the treatment of respiratory illness or urinary tract infections in human medicine. It is estimated that the main source of surface water and soil contamination by PPCPs are the non-treated residual urban waters and the effluents of residual water treatment plants.

Reported methodologies for the trace level determination of drugs and other PPCPs in environmental waters are based on the use of costly and sophisticated instrumentation, such as liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). In Mexico and other developing countries there are few laboratories having the equipment and qualified personnel to perform this type of analysis. Therefore, the aim of this work was to propose a sensitive and reliable alternative, only requiring conventional instrumentation (HPLC-UV), for the determination of 7 sulfa drugs (sulfadiazine SDZ, sulfathiazole STZ, sulfamerazine SMR, sulfamethazine SMT, sulfamethoxazole SMX, sulfisoxazole SFX and sulfadimethoxine SDM) in aqueous matrices.

The developed methodology consists of three main parts:

- 1) Pre-purification of the sample by liquid-liquid extraction to remove impurities of low and medium polarity, leaving the hydrophilic analytes in the aqueous phase.
- 2) Concentration of sulfa drugs by solid phase extraction (SPE) in a polymeric reversed phase precolumn.
- 3) Coupling of the SPE precolumn to the analytical column for the on-line elution and analysis of the concentrated compounds by HPLC-UV at 270 nm.

Method validation was carried out with synthetic reagent water samples fortified with sulfonamides at concentrations ≤ 10 ppb. The obtained mean recoveries in the concentration range of 0.5-10 ppb were: SDZ-73.2 \pm 4.5%, STZ-78.6 \pm 2.2%, SMR-95.1 \pm 1.2%, SMT-94.3 \pm 1.3%, SMX-91.6 \pm 1.9%, SFX-92.5 \pm 0.8% y SDM-90.8 \pm 1.3%. Statistical treatment of results demonstrated the linearity of the method in the range of studied concentrations ($r^2 > 0.99$), and an excellent precision at these low concentration levels (RSD $<$ 3%). The limits of detection and quantification of the proposed method were comprised in the ranges 0.13-0.20 ppb and 0.44-0.61 ppb, respectively, depending on the particular sulfonamide.

The method was applied to the analysis of real surface water samples collected at Parque Nacional Fuentes Brotantes, Parque Ecológico Loreto y Peña Pobre, and the Chalma village. The observed matrix signals were relatively small and using the capacities of the diode array UV detector (absorption spectra and response relations at two wavelengths), it could be proved that none of them was due to the target sulfas. The same samples were then re-analyzed after spiking with the 7 sulfas at concentrations near one ppb or less. Measured recoveries were similar to those obtained with synthetic samples, demonstrating the efficacy of the method for the determination of these sulfonamides in environmental waters.

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas tres décadas, los estudios sobre la importancia e impacto de la contaminación química se han centrado casi exclusivamente en los contaminantes convencionales, especialmente los de alta toxicidad y persistencia en el ambiente como los plaguicidas. Este espectro de productos químicos, es sólo una pieza del rompecabezas más grande en el universo de los contaminantes.

De hecho, en la actualidad existe ya un creciente interés entre los científicos y los ecologistas por el impacto que puedan tener las sustancias químicas bioactivas como potenciales contaminantes del medio ambiente. Entre estas sustancias destacan los productos farmacéuticos y los ingredientes activos de los productos de cuidado personal (PPCPs, por sus siglas en inglés: pharmaceuticals and personal care products), tanto de uso humano como veterinario, incluyendo no sólo los medicamentos y productos biológicos, sino también agentes de diagnóstico, nutracéuticos, fragancias y muchos otros más. Esto puede parecer sorprendente ya que este tipo de productos han sido usados por el hombre en todos los tiempos y por lo tanto han estado siempre en el ambiente. Sin embargo, debido a su creciente consumo y a las propiedades químicas y biológicas de sus ingredientes activos, los PPCPs se han convertido en una de las fuentes potenciales de contaminación del agua más importantes, generando una creciente preocupación a nivel mundial, lo que ha llevado a clasificarlos como contaminantes emergentes.

Los PPCPs poseen, en general, una baja volatilidad; Esto significa que su migración y distribución en el ambiente se producirá principalmente mediante el transporte acuoso. Estos compuestos y sus metabolitos bioactivos son introducidos continuamente en el medio acuático en forma de mezclas complejas a través de una serie de rutas. Una de las rutas más evidentes es el agua utilizada por el ser humano para lavarse y eliminar sus excreciones, o las de animales domésticos; esta agua de desecho, contaminada con residuos de PPCPs, es vertida hacia el sistema de drenaje público o directamente a

fuentes naturales de agua. En el mejor de los casos, el agua de desecho es tratada pero finalmente siempre acaba en algún cuerpo de aguas naturales.

El tratamiento de aguas residuales es sin duda la mejor alternativa para contrarrestar la contaminación del agua, pero en el caso de los PPCPs los procesos de tratamiento actuales no son suficientemente eficaces para eliminarlos. Por ello, se estima que la principal fuente de contaminación de aguas superficiales y suelos por PPCPs son las aguas residuales urbanas no tratadas y los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, atendiendo a que éstas no fueron diseñadas para eliminar ese tipo de compuestos. En México, una notable fracción del agua residual no es tratada, siendo entonces el drenaje la principal ruta de entrada de residuos de PPCPs al ambiente. Hasta ahora, son todavía poco conocidos los procesos de biotransformación y fototransformación de los PPCPs en aguas ambientales y los potenciales efectos, tanto de los compuestos padres como de sus metabolitos, sobre la vida acuática y en última instancia sobre el propio ser humano.

Los residuos de productos farmacéuticos, en particular, representan un serio peligro para los seres vivos, ya que los ingredientes activos de algunos de estos productos están diseñados para modular el sistema endocrino e inmunológico y, por lo tanto, tienen un evidente potencial como disruptores endocrinos. Además, para algunos fármacos, existen formulaciones llamadas “conjugadas” que poseen un reservorio del fármaco original; estas dosis encapsuladas, al ser excretadas, pueden continuar liberando lentamente al fármaco en el medio ambiente. Es importante notar que la naturaleza polar y no volátil de la mayoría de los medicamentos les impide escapar de la esfera acuática, por lo que sus concentraciones pueden llegar a ser relativamente importantes.

Gracias a las crecientes investigaciones en el campo de la ecología y el medio ambiente, muchos de los efectos adversos de los fármacos han salido a la luz. El primer estudio que detectó fármacos en aguas residuales se llevó a cabo en 1976 en la planta de tratamiento de aguas del río Big Blue en Kansas City. Mucho tiempo después, una serie de hallazgos relacionados con el aumento de niveles de algunos fármacos y

productos de cuidado personal en cuerpos de agua considerados como no contaminados, dio lugar a una acción inmediata de organismos tales como la FDA (Food and Drug Administration de E.U.) y la Unión Europea para estudiar y determinar sus posibles efectos adversos sobre la fauna y la flora. Sin embargo, aún hoy en día, se carece de regulaciones y de protocolos oficialmente aprobados para determinar las concentraciones de PPCPs en aguas naturales o en otros compartimientos ambientales.

De hecho, el número de agentes biológicos aprobados por la FDA, así como los productos farmacéuticos e ingredientes activos en productos de cuidado personal está creciendo; su distribución geográfica en el medio ambiente y los posibles efectos adversos de éstos sobre distintas especies son aún desconocidos. Hasta la fecha (y a muy grandes rasgos), existen estudios y datos publicados sobre la presencia de sólo alrededor de 50 medicamentos (de los miles en uso hoy en día), pero muchos otros pueden estar presentes en el medio acuático.

Actualmente la tendencia en la producción de productos farmacéuticos es hacia potencializar sus efectos, reduciendo las dosis pero haciendo más específicas las reacciones de síntesis (fármacos enantioméricamente puros). Esto podría servir para disminuir la carga de fármacos arrojados al medio ambiente, pero implica un reto adicional a los esfuerzos analíticos necesarios para caracterizar muestras ambientales, debido a que los niveles de detección requeridos se verían reducidos aún más (ppb, ppt). Por lo tanto se genera una especial atención a las técnicas de preconcentración de muestra en los métodos analíticos.

El nivel de concentraciones de los fármacos en aguas superficiales puede ser muy variable ya que depende de muy diversos parámetros como: la cantidad manufacturada, la cantidad ingerida o utilizada, la eficiencia de asimilación del fármaco, las transformaciones metabólicas sufridas, la eficacia del tratamiento de aguas residuales, la propensión de estas sustancias a adsorberse en los sólidos suspendidos del agua residual, la proximidad a las plantas de tratamiento, las condiciones meteorológicas (principalmente las precipitaciones) y la posición geográfica.

Entre los fármacos más utilizados, y considerados como posibles contaminantes emergentes, se puede mencionar al grupo de los antibióticos constituido por diversas familias entre las que se encuentran las sulfas o sulfonamidas. Estas sustancias son drogas bacteriostáticas utilizadas para el tratamiento y prevención de infecciones bacterianas en seres humanos así como también en aplicaciones veterinarias.

En la literatura se encuentran reportados varios estudios sobre la presencia de PPCPs en aguas naturales. Las técnicas más utilizadas para la detección y determinación de estos compuestos han sido la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM, CG-EM/EM) y la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (CLAR-EM, CLAR-EM/EM), ya sea con ionización por electrospray o con ionización química a presión atmosférica. Esta última técnica es la mejor opción en el caso de los fármacos y sus metabolitos, ya que son compuestos generalmente muy polares o iónicos y termodegradables. Desafortunadamente, esta poderosa herramienta analítica es sumamente costosa y requiere de personal altamente especializado para su operación. Es posiblemente por esta razón que son pocos los países en donde se han establecido programas de monitoreo de contaminantes emergentes, aunque éstos se han limitado en general al agua potable y a algunos cuerpos de agua utilizados como fuente de abastecimiento de las plantas potabilizadoras.

Por lo anterior, se considera de interés desarrollar metodologías alternativas más simples y accesibles, adaptadas a la instrumentación con la que cuentan la mayoría de los laboratorios dedicados a análisis ambientales en México. Con base en estas consideraciones, el presente proyecto se enfocó al desarrollo de un método analítico rápido, simple y sensible, para detectar y cuantificar 7 sulfas (sulfadiazina, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfisoxazol y sulfadimetoxina) a niveles de concentración del orden de trazas en matrices acuosas. El método se basó en el uso de la Extracción en Fase Sólida acoplada en línea a la Cromatografía Líquida de Alta resolución con detección UV (EFS-CLAR/UV).

Antecedentes

II. ANTECEDENTES

II. 1. Generalidades.

A lo largo de los años, las actividades humanas primarias han producido un gran cambio en los ecosistemas terrestres. Según estudios, estos cambios se han llevado a cabo mediante tres rutas; la primera, por la fragmentación del habitat, la segunda por la alteración de la estructura de la comunidad (vía introducción de especies) y la final por la contaminación química [Daughton, 1999].

II. 1.1. Contaminación química.

En las últimas tres décadas, los estudios sobre la importancia e impacto de la contaminación química se han centrado casi exclusivamente en los contaminantes convencionales, especialmente los de alta toxicidad (carcinogénicos) y persistencia en el ambiente, como los plaguicidas, hidrocarburos poliaromáticos, dioxinas, bifenilos policlorados, etc. Este espectro de productos químicos, sin embargo, es sólo una pequeña pieza de un rompecabezas más grande en el universo de los contaminantes.

Los riesgos asociados a la contaminación ambiental por otros productos químicos de uso común, en la actualidad son insospechados y por ende no anticipados. Es por ello que, en años recientes, los científicos dedicados al estudio del medio ambiente tienen como una de sus preocupaciones y objetivos inmediatos la identificación y evaluación de las posibles alteraciones que pudiesen generar al entorno estos contaminantes químicos, llamados también contaminantes emergentes. A la par, esta preocupación ha permeado hasta los organismos gubernamentales responsables del cuidado del ambiente, a tal punto que el estudio de contaminantes emergentes fue considerado como uno de los cinco principales objetivos del plan estratégico 2008 de la USEPA (US-Environmental Protection Agency).

En particular, durante la última década se empezó a generar un creciente interés entre los científicos y ecologistas por el impacto que podrían tener los residuos provenientes

de medicamentos y otros productos de cuidado personal (PPCPs, por sus siglas en inglés: pharmaceuticals and personal care products), específicamente sus ingredientes activos, sobre el medio ambiente [Halling-Sorenson, 1998].

II.1.2. Fármacos y otros productos de cuidado personal (PPCPs).

El término PPCP comprende, en general, a cualquier producto utilizado por las personas para mejorar su salud o su aspecto físico, también aquellos productos utilizados en la agroindustria para promover el crecimiento y proteger la salud del ganado, así como los que se utilizan en la industria de cosméticos y fragancias [US-EPA, 2010]. Estos compuestos se pueden clasificar en las siguientes categorías [EPA, 2010].

- Medicamentos terapéuticos
- Medicamentos veterinarios
- Fragancias
- Cosméticos
- Productos de protección solar
- Agentes de diagnóstico
- Productos nutracéuticos (por ejemplo, vitaminas)

Los medicamentos, en particular, se distinguen por ser ampliamente utilizados y demandados en todo el mundo, lo que ha llevado al incremento exponencial de su producción y la constante introducción de nuevos fármacos al mercado. A esto se suma la gran cantidad de clases de productos químicos comprendidos dentro de esta categoría, cada uno con distintos modos de acción bioquímica, en ocasiones no bien conocida.

En contraste con los productos agroquímicos, la mayoría de los PPCPs se comercializan libremente y son descargados de forma continua hacia el medio ambiente, particularmente al medio acuático, a través de diversas rutas.

Una de las más importantes es el drenaje doméstico, desde donde los residuos de productos de cuidado personal y los fármacos excretados o desechados (medicamentos caducos) pasan al sistema de alcantarillado y llegan a los grandes cuerpos colectores de aguas residuales urbanas. Durante este trayecto, los productos originales, o sus metabolitos, pueden sufrir diversas reacciones y transformaciones generando nuevas sustancias que podrían continuar siendo bioactivas.

En muchos países en vías de desarrollo existe todavía un porcentaje significativo de hogares que no cuentan con sistemas de alcantarillado, por lo que la descarga de aguas usadas va directamente hacia arroyos o a pozos sépticos. Estas aguas, pueden infiltrarse a través del suelo y llegar hasta las aguas subterráneas contaminándolas [Daughton, 1999]. De hecho, lo mismo puede suceder con las aguas residuales transportadas por el sistema de alcantarillado, pues no es raro que ocurran fugas en dicho sistema.

Por otra parte, aunque se cuente con instalaciones dedicadas al tratamiento de aguas residuales, no es una garantía suficiente para la eliminación de los PPCPs, debido a que los procesos de tratamiento actualmente utilizados no fueron diseñados para eliminar esta clase de contaminantes. Así, los efluentes de las plantas de tratamiento, vertidos en ríos y lagos, se convierten en una importante fuente de contaminación de las aguas superficiales.

En las regiones agrícolas es frecuente utilizar aguas residuales de las fincas o el excremento del ganado (que pudo haber sido tratado con medicamentos y productos promotores de crecimiento) como fertilizante en los campos. Los residuos farmacéuticos y otros PPCPs ahí depositados son fácilmente lixiviados por la lluvia, debido a su generalmente alta solubilidad en agua, y terminan en los cuerpos de aguas naturales circundantes o en las aguas subterráneas.

Por estas y muchas otras vías, los fármacos (veterinarios y humanos), los ingredientes de los cosméticos, complementos alimenticios y otros productos de cuidado personal, junto con sus respectivos metabolitos y productos de transformación, son continuamente introducidos en el medio ambiente.

Algunos trabajos reportados en la literatura han mostrado que muchos de estos compuestos pueden sobrevivir en el medio ambiente, es decir que su biodegradación es muy lenta. A esto se suma la introducción continua, que rápidamente compensa la transformación y remoción de los PPCPs menos persistentes. Por ello, estos compuestos y sus metabolitos pueden estar en todas partes, hasta en la red de agua potable [Rogers, 1996].

II.2. Fármacos.

Los fármacos son productos químicos utilizados para el diagnóstico, tratamiento (curación o mitigación), alteración o prevención de enfermedades, con el objeto de mejorar las condiciones de salud, la estructura o el funcionamiento del cuerpo humano. Esta definición se extiende también a los productos farmacéuticos veterinarios en el caso de los animales, así como a las drogas ilícitas [Halling-Sorensen, 1998].

II.2.1 Fármacos en el medio ambiente.

Aunque la acción bioquímica de la mayoría de los fármacos en los seres humanos ha sido ampliamente investigada y reportada, es bien sabido que la administración de un medicamento no siempre resulta eficaz para los efectos fisiológicos pretendidos. Hay ocasiones en que las vías de acción conocidas pudiesen no tener el efecto que se desea, por ello se suele decir que el mecanismo real de acción de los fármacos no es totalmente conocido. Estas limitaciones en la total comprensión de la bioquímica de los fármacos se manifiestan cuando se pretende diseñar fármacos que actúen sólo a través de rutas específicas. Aún si la actividad de estas sustancias puede limitarse a un solo tipo de receptor para hacerla específica, la distribución del receptor en los tejidos no es

conocida. Es por esta razón que la distribución de los fármacos en el organismo, así como su porcentaje de excreción son inciertos.

Desde el punto de vista ambiental, resulta de la mayor importancia evaluar la contribución de esta vía de introducción de sustancias bioactivas al medio acuático. Entre la comunidad científica se piensa que tan sólo en las últimas dos décadas se han acumulado cantidades preocupantes de residuos derivados de los fármacos, tanto en aguas superficiales como en aguas subterráneas, por causa de efluentes provenientes de aguas residuales. La gran incógnita es si las concentraciones de estos residuos, aun siendo bajas, podrían tener un impacto ecológico significativo. Hasta el momento no se conocen los efectos inmediatos, ni las consecuencias acumulativas que a largo plazo puedan tener estos compuestos.

Por otra parte, una cuestión que preocupa a los gobiernos de muchos países desarrollados es la posibilidad de que los residuos de productos farmacéuticos pudieran alcanzar las redes de distribución del agua potable de uso doméstico, lo que plantearía riesgos a largo plazo para la salud humana. Dado que el agua potable es consumida varias veces al día, la ingestión de estos compuestos posiblemente presentes aunque en muy bajas dosis, sería continua. Si bien la concentración individual de un medicamento en el medio acuático puede ser extremadamente baja (ya que son considerados como microcontaminantes), la presencia simultánea de varios de ellos podría generar un modo de acción conjunto con efectos impredecibles.

Teniendo en cuenta que, a diferencia de los plaguicidas, los fármacos (y en general los PPCPs) no han sido sometidos a una vigilancia estricta, no se conocen aún los posibles efectos ambientales adversos que pueden generar. Es por esta razón que este tipo de compuestos ha disfrutado de varias décadas de descarga libre al medio ambiente. Esto resulta un tanto perturbante ya que algunos medicamentos están destinados para actuar sobre el sistema endocrino e inmunológico; al ser introducidos al medio ambiente acuático, pueden actuar como disruptores endocrinos generando graves perturbaciones en los seres vivos [Daughton, 1999; Vanderford, 2003]

La exposición a residuos farmacéuticos en el medio ambiente, es diferente a la de los plaguicidas y otros productos químicos industriales, ya que puede tener un carácter más crónico debido a que son introducidos directa y continuamente en el entorno en donde viven o que visitan los humanos, mientras que la contaminación por plaguicidas es esporádica y en lugares específicos.

Como se ha mencionado, existe poca información sobre el riesgo que representan los fármacos para el ser humano, pero más alarmante y más desconocido es el efecto que pueden tener sobre la biota acuática, permanentemente expuesta a estos productos. Por lo poco que se conoce, estos efectos pueden ser sutiles pero dramáticos para la vida acuática. La preocupación principal no es necesariamente por los efectos agudos, sino más bien por los efectos quizás imperceptibles que pueden irse acumulando con el tiempo para producir cambios realmente profundos [Daughton, 1999].

II.2.2 Fuentes y orígenes.

La posibilidad de que productos farmacéuticos puedan entrar al ambiente a partir de una serie de rutas diferentes y posiblemente causar efectos adversos en la biota, se ha discutido en la literatura científica desde hace varias décadas, pero su significado ha pasado casi desapercibido. Esto puede ser explicado considerando que las regulaciones internacionales para los fármacos han sido establecidas, en su gran mayoría, por los organismos encargados de la salud humana, que por lo general tienen poca experiencia en las cuestiones ambientales. Es por ello que los fármacos raramente fueron vistos como potenciales contaminantes del medio ambiente, ya que pocas veces existió alguna consideración en cuanto a su destino final una vez excretadas por los usuarios [Rogers, 1996].

Por otra parte, hasta la década de 1990, los esfuerzos para buscar fármacos en el medio acuático tuvieron un éxito limitado, debido a que las herramientas de análisis químico empleadas no tenían la sensibilidad y selectividad suficientes para detectar inequívocamente estos compuestos a concentraciones del orden de las partes por billón o menores (ng/mL o pg/mL) [Snyder, 2001]. Adicionalmente, la mayoría de los fármacos

son muy solubles en agua y esto genera problemas en cuanto a la aplicación de los métodos comunes para la preconcentración y purificación de la muestra. Así mismo, la alta hidrofiliidad de estas sustancias dificulta su separación mediante técnicas cromatográficas, las cuales se han empleado tradicionalmente para la determinación de contaminantes "convencionales" que tienden a ser menos polares y más volátiles [Daughton, 1999; Vanderford, 2003]. Otro obstáculo, que aún persiste en gran medida, es que los estándares de muchos metabolitos de productos farmacéuticos e ingredientes cosméticos no están disponibles comercialmente o son difíciles de adquirir y bastante costosos.

Es importante considerar que la cantidad real de cada uno de los numerosos medicamentos comerciales que se ingieren o se desechan es una verdadera incógnita, lo que impide hacer cualquier predicción sobre su posible presencia, distribución y concentración en las aguas naturales. Estas variables dependen de diversos parámetros como: cantidad de fármaco fabricado, frecuencia y cantidad de dosificación, eficiencia con la que son excretados (orina y heces), entre muchos otros [Santos, 2005]. Los productos farmacéuticos con aplicación veterinaria, una vez excretados son a menudo dispersados en el campo, desde donde puede entrar en el medio acuático por efecto de las lluvias, ya sea por escurrimientos que se vierten en los cuerpos de aguas superficiales o por lixiviación e infiltración a través del suelo hacia las aguas subterráneas. Los productos farmacéuticos de uso humano, en general son excretados o desechados (medicamentos caducos) por el drenaje doméstico y conducidos a través del sistema de alcantarillado hacia los colectores de aguas residuales, las cuales en el mejor de los casos son enviadas a las plantas de tratamiento antes de ser vertidas en los cuerpos receptores [Kasprzyk-Hordern, 2008]. Sin embargo, como ya se ha comentado, los efluentes de depuradoras de aguas residuales son actualmente considerados como una de las más importantes fuentes de contaminación del medio ambiente por productos farmacéuticos. Por otra parte, los cuerpos receptores de aguas tratadas pueden a su vez ser fuente de alimentación de plantas potabilizadoras, lo que explica el hecho de que algunos productos farmacéuticos y de cuidado personal hayan sido encontrados en el agua potable [Fent, 2006].

Entre los productos farmacéuticos que más frecuentemente pudiesen estar presentes en los influentes y efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales se encuentran los antibióticos, antiinflamatorios, reguladores de lípidos, fármacos antiepilépticos y los medios de contraste radiológico. Debido a que los procesos convencionales de tratamiento de aguas residuales no están diseñados para eliminar productos de alta polaridad e hidrofiliidad, su capacidad para remover productos farmacéuticos es muy limitada [Daughton, 1999; Carballa, 2004]. En efecto, la eliminación de sustancias químicas en las plantas de tratamiento depende de la capacidad de estas sustancias para fijarse en partículas sólidas durante los procesos de clarificación y filtración por adsorbentes, o bien, de su capacidad para biodegradarse durante el tratamiento con lodos activados. Las partículas lipofílicas, en general, son removidas fácilmente en la etapa de tratamiento físico-químico, pero las sustancias con gran afinidad hacia la fase acuosa (como muchos de los PPCPs) atraviesan esta etapa sin ser removidas [Santos, 2005; Larsen 2004]. Los posteriores tratamientos biológicos actuales (cuando los hay), tampoco garantizan la eliminación de este tipo de sustancias.

II.2.3 Clases de fármacos más comunes.

Dentro de la amplia variedad de productos farmacéuticos disponibles en el mercado, las clases más conocidas son:

a) Hormonas

Son consideradas como disruptores endocrinos. Entre los compuestos más representativos de esta clase se encuentran los esteroides, que fueron de los primeros compuestos que se detectaron en aguas naturales, por lo cual fueron también los primeros productos farmacéuticos en captar la atención de los científicos dedicados al estudio del medio ambiente [Aherne, 1989]. Los fármacos estrogénicos, y principalmente los xenoestrógenos sintéticos, son utilizados ampliamente en la terapia de reemplazo de estrógenos naturales para mujeres con menopausia y como anticonceptivos orales. En la medicina veterinaria son usados para promover el

crecimiento de los animales y en medicina del deporte se emplean para mejorar el rendimiento de los atletas [Rogers, 1996].

b) Analgésicos no esteroideos y antiinflamatorios

Estos son compuestos destinados a reducir síntomas como inflamación, dolor y fiebre [Clive, 1998]; por esta razón son de los medicamentos más utilizados por los humanos. Algunos de ellos también tienen un uso veterinario. Los primeros analgésicos en ser identificados en aguas residuales y agua de río fueron el diclofenaco, el ibuprofeno, el ácido acetilsalicílico o su metabolito el ácido salicílico, y el naproxeno [Halling-Sorensen, 1998].

c) Reguladores de lípidos en la sangre

Como su nombre lo indica son fármacos destinados a equilibrar la cantidad de lípidos en la sangre. Entre ellos, el ácido clofíbrico fue de los primeros en ser detectado en aguas superficiales y sigue siendo uno de los PPCPs que se encuentra con mayor frecuencia durante los programas de monitoreo [Stan, 1997]. En los informes acerca de este medicamento, se ha reportado su presencia en el agua potable de Berlín a concentraciones de hasta 270 ng/L [Heberer, 1997]; así mismo, se ha demostrado su presencia en aguas subterráneas [Halling-Sorensen, 1998].

d) Fármacos psiquiátricos (antidepresivos y reguladores obsesivo-compulsivos).

Estos compuestos son utilizados para modificar el carácter de los pacientes. Los más conocidos y recetados son los antidepresivos como: prozac, zoloft, luvox y paxil, los cuales actúan como inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina. Por su amplio uso y su tipo de acción bioquímica, estos compuestos pueden provocar efectos dramáticos en el medio acuático. En estudios recientes sobre la acción fisiológica de la serotonina en una amplia variedad de criaturas acuáticas, se demostró que aún en concentraciones por debajo de la ppb, los efectos de estos productos farmacéuticos pueden ser muy significativos, sobre todo en ciertas especies de invertebrados [Aga, 2008; Fong, 1998].

e) Antiepilépticos

Estos compuestos son conocidos como ubicuos (presentes en la mayoría de lugares) debido a su baja asimilación y limitado metabolismo en los individuos, lo que se traduce en un alto nivel de eliminación del fármaco en su forma original [Wordreference 2010], La carbamazepina fue la droga detectada con mayor frecuencia y en mayores concentraciones en un estudio realizado en Alemania [Ternes, 1998].

f) Tranquilizantes

Poco se sabe sobre la posible presencia de estos fármacos en el medio acuático. Según algunos estudios, las concentraciones reportadas en agua tratada para uno de los tranquilizantes más utilizados, el diazepam, son sumamente bajas (<0.04 ppt). Esto significa que su detección en aguas superficiales es poco probable [Ternes, 1998].

g) Antibióticos

Existe una gran cantidad de reportes en la literatura sobre los antibióticos en el medio ambiente. Estos compuestos son muy utilizados en medicina humana y veterinaria, y también son empleados en la acuicultura; por ello, desempeñan un papel muy importante cuando se habla de la introducción de fármacos en el medio ambiente. En estudios realizados a efluentes hospitalarios, se demostró que las fluoroquinolonas eran las de mayor presencia y que estos químicos eran los principales responsables de la toxicidad al ADN. Otros estudios han mostrado el peligro que representan estos fármacos para el medio ambiente, debido a que generan resistencia en patógenos, pero la principal amenaza proviene de su carácter genotóxico (producen daño al ADN) y por ende de su capacidad para producir mutaciones [Hartmann, 1998]. Se ha reportado la presencia de 18 antibióticos en aguas superficiales, siendo los más comunes las sulfonamidas, las penicilinas y las tetraciclinas; algunos de éstos fueron detectados en concentraciones hasta del orden de los microgramos por litro (ppb). Estas altas concentraciones se atribuyen a una escalada indiscriminada en el uso de antibióticos junto con su posterior liberación al medio ambiente. Estos niveles de concentración podrían tener efectos graves sobre las bacterias, generando resistencia en algunas de

ellas o exterminado a otras. Tales exposiciones pueden conducir fácilmente a cambios en la estructura de la comunidad microbiana en la naturaleza y por lo tanto afectar a la cadena alimenticia. Por otra parte, el uso de antibióticos en la acuicultura genera una posible vía de entrada hacia los consumidores humanos.

Estudios realizados demostraron la persistencia de algunos de estos compuestos en el medio acuático y a su vez la resistencia que ciertas bacterias nativas tienen a una amplia gama de antibióticos. Todos estos informes podrían simplemente indicar que la presencia recurrente de estos compuestos genera una resistencia mucho mayor de lo esperado en las poblaciones nativas de bacterias, lo que se debe tener muy en cuenta para poner un freno a la liberación incontrolada de antibióticos en el medio ambiente [Daughton, 1999].

Por lo expresado anteriormente, el presente trabajo se enfocó en el grupo de los antibióticos, centrándose particularmente en la familia de las sulfonamidas.

II.3. Sulfonamidas

Son compuestos bioactivos de particular interés debido a sus posibles efectos secundarios no deseados sobre los seres humanos y los organismos acuáticos.

Las sulfonamidas son una clase muy importante de agentes antibacterianos ampliamente utilizados en la acuicultura [Ternes, 1998], como herbicidas agrícolas [Hirsch 1999, Battaglin 2000] y con fines veterinarios [Holm, 1995]. En medicina humana se utilizan para el tratamiento de infecciones del tracto urinario [Jones, 2001; Suganya, 2004], bronquitis crónica y otras varias infecciones bacterianas. También se usan como diuréticos y como agentes hipoglucemiantes (reguladores de glucosa en plasma sanguíneo). En cuanto a su uso veterinario, las sulfonamidas son comúnmente incorporadas en los productos de alimentación animal con fines profilácticos (prevención de enfermedades) y terapéuticos [Rao, 2000]

Aunque el uso de estos antibióticos ha disminuido en los últimos años, las sulfonamidas (más conocidas popularmente como sulfas) siempre han ocupado un lugar importante como recurso terapéutico de los médicos [Martínez, 2001].

Las sulfonamidas son de especial relevancia ambiental debido a su alta tasa de excreción [Sacher, 2001] y su persistencia tanto en los cuerpos de agua como durante el proceso de tratamiento de aguas residuales [Gobel, 2005]. Esta clase de antibióticos se incorpora al ambiente por diversas rutas. Se propagan hacia la tierra de los campos agrícolas debido a que éstos son a menudo fertilizados con el estiércol de animales tratados con sulfas [Haller, 2002]. Una vez en la tierra, son fácilmente lixiviadas por el agua de lluvia y conducidas a los cuerpos de agua circundantes. La alta movilidad de estos compuestos está relacionada con su gran solubilidad en agua (de mg/L a g/L) ya que, al pH de las aguas naturales (6-8), la mayoría de las sulfas se encuentran en forma ionizada [Stoob, 2005].

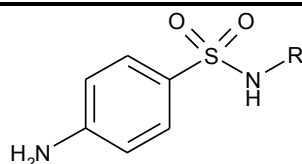
La presencia de sulfonamidas en el medio acuático conlleva tres riesgos primordiales: 1) son potencialmente tóxicas para los organismos acuáticos y para los seres humanos, 2) generan resistencia (hacia ellas) en las bacterias que causan diversas enfermedades [Lin, 2008], 3) tienen un efecto mutagénico ya que pueden modificar la estructura del ADN. Por estas razones es necesario monitorear su presencia y concentración (aún a niveles traza) en las aguas naturales superficiales y profundas y en los efluentes de aguas residuales y tratadas [Hirsch 1999].

II.3.1. Propiedades físicas y químicas de las sulfonamidas.

La estructura general de las sulfonamidas se muestra en la **Tabla II.1**. Cada una toma un nombre particular dependiendo del sustituyente (R) unido al nitrógeno del grupo amida. Estos compuestos presentan propiedades ácido-base asociadas al grupo amino en el anillo aromático (base) y al hidrógeno ácido del grupo amida. Los valores de pKa para las sulfonamidas estudiadas en este trabajo se muestran también en la tabla.

Tabla II.1. Estructura y propiedades ácido-base de las sulfonamidas.

ESTRUCTURA GENERAL



SULFA	R	pKa 1	pKa 2	Referencia
SULFADIAZINA (SDZ)		2.0	6.4	[Stoob, 2005]
SULFATIAZOL (STZ)		2.2	7.2	[Annel, 2004]
SULFAMERAZINA (SMR)		2.1	6.7	[Sanli, 2009]
SULFAMETAZINA (SMT)		2.4	7.4	[Stoob, 2005]
SULFAMETOXAZOL (SMX)		1.8	6.0	[Lin, 1997]
SULFISOXAZOL (SFX)		1.5	5.0	[Annel, 2004]
SULFADIMETOXINA (SDX)		1.9	6.1	[Lin, 1997]

En la tabla anterior, el pK_{a1} se refiere al par ácido-base NH_3^+/NH_2 , mientras que el pK_{a2} denota al par NH/N^- . Por lo tanto, dependiendo del valor de pH del medio, se generan tres formas de la molécula: SH_2^+ que representa de manera general la forma catiónica, SH la forma neutra y S^- la forma aniónica. Para las sulfonamidas en estudio, los valores de pK_a están comprendidos en el intervalo: $pK_{a1} = 1.95 \pm 0.45$ y $pK_{a2} = 6.2 \pm 1.2$ [Annel, 2004; Sanli, 2009]. Como lo muestran estos valores, la basicidad del grupo amino es muy débil y está poco afectada por la estructura del sustituyente R, mientras que la acidez del hidrógeno en el grupo amida no es tan débil (semejante a la de los ácidos carboxílicos) y está bastante influida por el sustituyente. Las zonas de predominio de las tres formas ácido-base de las sulfas se muestran en la **Figura II.1** (considerando los valores medios de los dos pK_a) [Annel, 2004].

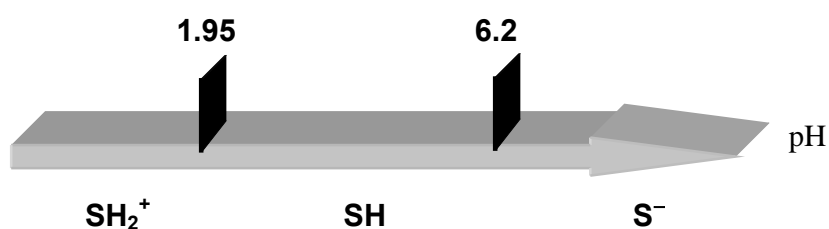


Figura II.1. Zonas de predominio de las formas ácido-base de las sulfonamidas.

A continuación se presentan otras propiedades físicoquímicas relevantes de las sulfas en estudio, así como algunos de sus usos.

A. SULFADIAZINA (SDZ).

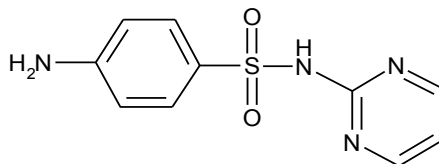


Figura II.2. Estructura de la sulfadiazina.

Nombre químico: N¹-(pirimidin-2-il)-sulfanilamina

Tabla II.2. Propiedades fisicoquímicas de la sulfadiazina.

Fórmula mínima	Peso molecular (g/mol)	Forma	Detección UV λ_{\max}^1	Solubilidad [Ghosh, 1992]
C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	250.3	polvo cristalino amarillo	254 nm	Agua 20°C - 0.013 g/L

Usos

Esta sulfonamida de corta duración es utilizada en combinación con pirimetamina para tratar la toxoplasmosis (enfermedad infecciosa ocasionada por un protozoo llamado *Toxoplasma gondii*) [Dubey, 1998] en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida y en recién nacidos con infecciones congénitas [Biblioteca de salud virtual 2010]. Su absorción en vías gastrointestinales es rápida. Generalmente se excreta con facilidad y es detectada en orina al término de 30 min después de su ingesta. Su administración es por vía oral, como jarabe (100 mg/mL) o en tabletas (500mg) [Annel, 2004].

B. SULFATIAZOL (STZ).

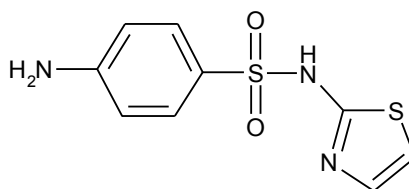


Figura II.3. Estructura del sulfatiazol

Nombre químico: N¹-(tiazol-2-il)-sulfanilamina

Tabla II.3. Propiedades fisicoquímicas del sulfatiazol.

Fórmula mínima	Peso molecular (g/mol)	Forma	Detección UV λ_{\max} [Ghosh, 1992]	Solubilidad 26°C (mg/100mL) [O'Neil, 2001]
C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	255.3	polvo cristalino blanco	254 nm	Agua - 60 (pH=6.03) Alcohol - 525

Usos

Es utilizado como bacteriostático, impide el desarrollo de gérmenes del tipo del *gonococo*, *meningococo*, *neumococo*, etc. [Font, 1962]. El sulfatiazol es muy utilizado principalmente como adyuvante (ayuda a la formación de anticuerpos) en cirugías de apéndice [Robert, 1942].

C. SULFAMERAZINA (SMR).

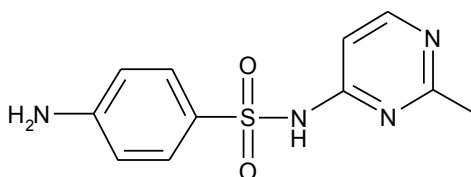


Figura II.4. Estructura de la sulfamerazina.

Nombre químico: N¹-(4-metilpirimidin-2-il)-sulfanilamina

Tabla II.4. Propiedades fisicoquímicas de la sulfamerazina.

Fórmula mínima	Peso molecular (g/mol)	Forma	Detección λ_{\max}	Solubilidad 37°C (mg/100ml)
C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	264.3	polvo blanco	UV 255 nm	Agua – 35 pH 5.5 170 pH 7.5

Usos

Es empleado en infecciones neumocócicas, estreptocócicas, meningocócicas y gonocócicas. Es administrada por vía oral junto con sulfadiazina en dosis iguales. Se absorbe con mayor rapidez que la sulfadiazina y es excretada con mayor lentitud, por esta razón se debe administrar en menor cantidad pero en intervalos de tiempo más prolongados [Font, 1962].

D. SULFAMETAZINA (SMT).

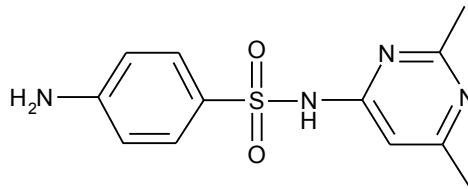


Figura II.5. Estructura de la sulfametazina.

Nombre químico: N¹-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-sulfanilamina

Tabla II.5. Propiedades fisicoquímicas de la sulfametazina.

Fórmula mínima	Peso molecular (g/mol)	Forma	Detección λ_{\max}	Solubilidad 29°C (mg/100mL)
C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	278.3	polvo blanco	258 nm	Agua - 150 pH 7.0

Usos

Es una sulfamida de amplio espectro contra gérmenes Gram positivos y negativos como: *Pasteurella*, *Salmonella*, *E. Coli*, *Fusobacterium*, *Shigella*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*, *Campylobacter*, *Corynebacterium* y *Coccidia*. Para el tratamiento de infecciones respiratorias, digestivas, genitourinarias, del sistema nervioso central y locomotor de todos los animales domésticos [Vecol, 2010].

E. SULFAMETOXAZOL (SMX).

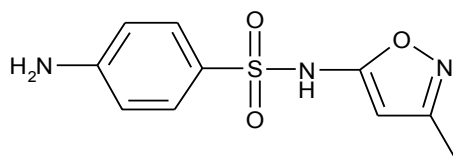


Figura II.6. Estructura del sulfametoxazol.

Nombre químico: N¹- (5-metil-3-isoxazolil)-sulfanilamina

Tabla II.6. Propiedades fisicoquímicas del sulfametoxazol.

Formula mínima	Peso molecular (g/mol)	Forma	Detección λ_{\max}	Solubilidad
C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253.3	polvo blanco	256 nm	Agua – 3mg en 100mL Alcohol – 1mg en 50mL Acetona – 1mg en 3mL

Usos

El sulfametoxazol es el antibacteriano más utilizado en el tratamiento de infecciones en seres humanos y se usa también en veterinaria. Junto con el trimetoprim (TMP) cumplen la función de inhibir la síntesis bacteriana del ácido fólico [Morales, 1999]. La mezcla TMP-SMX es sinérgica frente a un gran número de bacterias. Generalmente muestra actividad contra los microorganismos *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *S. viridans*, así como frente a numerosas enterobacteriaceas entre las que se cuentan: *Salmonella*, *Shigella*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pneumocystis carinii*, *Listeria monocytogenes* y muchas especies de nocardia como la *Yersinia enterocolitica* y la *Legionella pneumophila* [Henderson, 2009]. Los enterococos *Neisseria gonorrhoeae* y *Pseudomonas aeruginosa* y los microorganismos anaerobios suelen ser resistentes o son menos susceptibles.

La mezcla TMP-SMX es absorbida rápidamente por el tracto gastrointestinal. Después de una dosis única de 160 mg TMP y 800 mg SMX, se distribuye en concentraciones plasmáticas máximas de 1-2 ng/mL y de 40-60 ng/mL en 1 y 4 horas, respectivamente. Ambos fármacos se eliminan preferentemente por vía renal después de haber experimentado cierto grado de metabolismo en el hígado. Hasta el 80% del trimetoprim y el 20% del sulfametoxazol son eliminados en la orina sin alteración. La excreción en la leche materna es del 50% y 70% para el trimetoprim y sulfametoxazol, respectivamente. La vida media de eliminación del sulfametoxazol oscila entre las 6 y 12 horas en los pacientes con función renal normal y entre las 20 y 50 horas en los pacientes con insuficiencia renal.

El SMX se ha detectado en concentraciones del orden de 70 a 150 ng/L en aguas superficiales y de 200 a 2000 ng/L en efluentes de aguas residuales [Vademecum, 2009].

F. SULFISOXAZOL (SFX).

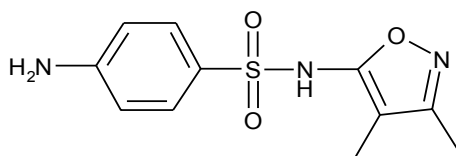


Figura II.7. Estructura del sulfisoxazol

Nombre químico: 4-amino-N-(3,4-dimetil-1,2-oxazol-5-il) bencensulfonamida

Tabla II.7. Propiedades fisicoquímicas del sulfisoxazol.

Fórmula mínima	Peso molecular (g/mol)	Forma	Detección UV λ_{max}	Solubilidad 25°C (mg/ml)
C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	267.3	Polvo blanco	254 nm	Agua – 0.13

Usos

Es una sulfonamida de acción corta, utilizada por su efectiva capacidad para inhibir organismos en el aparato urinario e infecciones de oído en niños. Generalmente es administrado por vía oral en tabletas de 500 mg o en suspensiones de 100 mg/ml. Se excreta 95% de la dosis por la orina en 24 h a partir de su ingesta [Lille, 2000].

G. SULFADIMETOXINA (SDX)

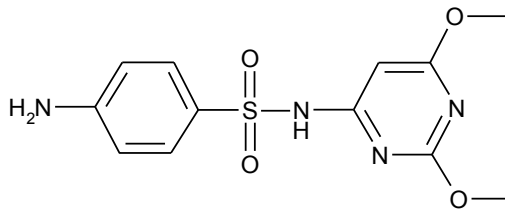


Figura II.8. Estructura de la sulfadimetoxina.

Nombre químico: 4-amino-*N*-(2,6-dimetoxi-4-pirimidinil) bencensulfonamida

Tabla II.8. Propiedades fisicoquímicas de la sulfadimetoxina.

Fórmula mínima	Peso molecular (g/mol)	Forma	Detección UV λ_{\max}	Solubilidad 37°C (mg/100ml)
C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	310.3	polvo blanco	260 nm	Agua – 4.6 pH 4.10 29.5 pH 6.7

Usos

Es utilizada para el tratamiento de infecciones bacterianas en vías respiratorias y del tracto genitourinario en perros y gatos. En el perro la sulfadimetoxina no es acetilada, como en la mayoría de otros animales, y se excreta principalmente sin cambios, como sulfadimetoxina intacta [Stowe, 1975; Bridges, 1968].

II.3.2 Métodos de análisis

La determinación de las sulfas en el ambiente, al igual que cualquier otro microcontaminante, requiere de métodos analíticos altamente sensibles, capaces de detectar y cuantificar concentraciones del orden de $\mu\text{g/L}$ o menores. Así mismo, dada la complejidad de las matrices ambientales, se requiere de una gran selectividad para evitar la interferencia de los componentes de la matriz. En la actualidad, la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas tándem (CLAR-EM/EM), se ha convertido en el método de elección ya que, a diferencia de la cromatografía de gases, no hay necesidad de derivatizar a estos analitos polares. Las fuentes de ionización generalmente empleadas para la detección de las sulfas por espectrometría de masas son la ionización por electrospray (ESI, por sus siglas en inglés) y la ionización química a presión atmosférica (APCI, por sus siglas en inglés) [Vanderford, 2003].

Sin embargo, a pesar de la alta selectividad y sensibilidad de la espectrometría de masas, las muestras de agua por lo general deben ser purificadas y preconcentradas antes de su análisis, los que se suele hacer por extracción en fase sólida (EFS), ya sea fuera de línea o en línea.

La bibliografía referente a los métodos de determinación de sulfonamidas es extensa, por ello, nos limitaremos a mencionar algunas características de los métodos analíticos reportados en los últimos 10 años. En la **Tabla II.9** se muestra esta información, representando a los analitos de interés por un número de acuerdo con lo siguiente: 1. Sulfadiazina, 2. Sulfatiazol, 3. Sulfamerazina, 4. Sulfametazina, 5. Sulfametoxazol, 6. Sulfisoxazol y 7. Sulfadimetoxina.

Tabla II.9. Algunos métodos publicados para la determinación de sulfonamidas en muestras acuosas y tejidos.

Compuesto	Muestra	Técnica (método)	LDM (ng/L)	Recobro (%)	Referencia
2,3,4,5	Agua superficial	EFS CLAR-EM	50	84-98	[Lindsey, 2001]
1,2,4,5,7	Agua superficial	EFS CLAR-EM/EM (ESI)*	1	85-90	[Stoob, 2005]
1,2,4,5	Agua de río	EFS CLAR-EM (ESI)	1000	34-67	[Pedrouzo, 2008]
1,3,4,5,7	Agua residual	ELISA** y CLAR-EM/EM (APCI)***	>40	45-88	[Shelver, 2008]
1,2,3,4,5	Aguas residuales, (porcinas)	CLAR-UV	>4000	82-97	[Jen-Fon, 1998]
1,2,3,4,5,6,7	Carne	CLAR-EM/EM (ESI) y UPLC**** -EM/EM	0.04-0.10 (µg/Kg)	88-96	[Zengxuan, 2008]

* Ionización por electroespray

** Inmunoensayo con detección por enzima ligada.

*** Ionización química a presión atmosférica.

**** Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución.

II.4. Métodos de Preparación de Muestra

Generalmente, la preparación de muestra es la etapa más crítica y decisiva en los métodos analíticos debido a que presenta los mayores riesgos de pérdida de compuestos o contaminación de la muestra y, también, porque de esta etapa dependen en gran medida las potencialidades finales del método. Se puede decir que, entre más pequeña es la concentración de los compuestos de interés y más compleja es la matriz donde se encuentran, mayores son las exigencias que debe cumplir el método de preparación de muestra. Esto es tanto más cierto cuanto menos poderosa es la instrumentación analítica con que se cuenta. Así, para alcanzar límites de detección del

orden de las partes por billón para contaminantes emergentes en una matriz ambiental como agua de río, es necesario desarrollar métodos de preconcentración y purificación de la muestra sumamente eficaces si el análisis se lleva a cabo por CLAR-UV. Por el contrario, bastaría tal vez sólo una ligera limpieza de la muestra para alcanzar los mismos límites si se utiliza un sistema acoplado CLAR-EM/EM para el análisis. Desafortunadamente, estos sistemas son muy costosos y requieren de personal altamente especializado para su correcta operación y manejo. Por ello, hasta ahora son pocos los países donde este tipo de aparatos se utiliza de forma rutinaria para el monitoreo ambiental.

La selección del método y condiciones para la preparación de la muestra depende de varios factores, como los que se mencionan a continuación [Snyder, 1989].

A.- Propiedades físicas y químicas del analito

El conocimiento de algunas características fisicoquímicas del analito como la estructura química, el peso molecular, la solubilidad, las propiedades ácido-base (pKa) y la respuesta frente al detector seleccionado es de gran ayuda para el diseño de una preparación de muestra apropiada.

B.-Concentración de analito en la muestra

Este factor es muy importante, ya que para analitos que se encuentran en la muestra a altas concentraciones, generalmente sólo se requiere de operaciones sencillas para la preparación de muestra como solubilización y filtración. Por el contrario, para analitos que se encuentran en bajas concentraciones se requiere de procesos más elaborados como extracción líquido – líquido, extracción con fluidos supercríticos, extracción en fase sólida, etc., de modo a lograr que su concentración alcance un nivel detectable y/o cuantificable.

C.- Naturaleza de la matriz de la muestra.

La remoción de algunos componentes de la matriz puede ser un paso indispensable en la preparación de muestra cuando el analito se detecta con dificultad o no se detecta

debido a impurezas que interfieren con la señal que genera (p.ej. pico cromatográfico), o bien, cuando algunas sustancias presentes pudieran dañar los instrumentos analíticos o alguno de sus componentes.

D.- Forma en que se presenta el analito en la muestra.

Se refiere a si el analito está simplemente disuelto o disperso en la matriz o si presenta alguna interacción o afinidad particular por la matriz o sus componentes, como ocurre a menudo en el caso de muestras biológicas.

II.4.1. Extracción líquido-líquido (ELL).

La extracción con disolventes o líquido-líquido es un método habitual para purificar y/o concentrar moléculas orgánicas. Puede emplearse para separar cuantitativamente compuestos orgánicos de compuestos inorgánicos (particularmente sales). Su uso y popularidad como método de separación aún se mantiene, quizá porque es un proceso relativamente sencillo, reproducible y versátil. Puede ser aplicado a trazas o a grandes cantidades y suele dar separaciones que resultan limpias y completas [Téllez, 2002; Frank 1982]

Este método de separación se basa en la diferente distribución de los componentes de la muestra entre dos fases inmiscibles, una de las cuales puede ser la propia muestra. El proceso está regido por la ley de distribución de Nernst, la cual establece que un soluto se distribuye entre dos fases líquidas inmiscibles de manera que, en el equilibrio, el cociente de concentraciones del soluto en las dos fases es una constante a una temperatura dada. La ecuación correspondiente para un soluto S que se distribuye entre dos disolventes 1 y 2 es (ecuación **E-II.1**):

$$K_D = \frac{[S_2]}{[S_1]} \quad (\text{E - II. 1})$$

Donde, K_D es la constante de distribución a una temperatura determinada, independiente de la concentración inicial del soluto en cualquiera de las fases [Frank, 1982].

De forma práctica la extracción líquido-líquido consiste en añadir a una muestra que contenga los compuestos de interés, un volumen dado de un disolvente inmiscible, agitar o tratar con ultrasonido y separar las fases. Al terminar el proceso, los compuestos de interés se encontrarán en mayor proporción en la fase por la que tengan mayor afinidad [Huetos, 2004].

II.4.2 Extracción en fase sólida (EFS).

II.4.2.1 Generalidades

Esta técnica fue introducida a finales de los años 70's, como un método rápido de preparación de muestra por medio del cual se concentran y purifican los compuestos deseados antes de proceder a su análisis.

La extracción en fase sólida es en esencia una cromatografía en columna a microescala y, por lo tanto, el principio de separación está basado en el mismo tipo de interacciones débiles (Van der Waals, iónicas, hidrofóbicas, etc.) entre los constituyentes de una fase líquida en la cual se encuentra disuelta la muestra y una fase estacionaria [Berrueta, 1998].

La extracción en fase sólida se puede llevar a cabo con diversos dispositivos empacados o recubiertos con un adsorbente, tales como: discos o filtros (discos Empore), cartuchos de plástico o de vidrio (EFS fuera de línea), pequeñas precolumnas de acero inoxidable (EFS en línea), jeringas con una aguja cuya punta está recubierta por una fibra (microextracción en fase sólida, MEFS) y barras magnéticas recubiertas con una fibra.

Los cartuchos son actualmente los dispositivos más populares y ampliamente comercializados. Generalmente están empacados con cantidades de adsorbente que

van de los 100 o 200 mg hasta 1 gramo. Su estructura se muestra en la siguiente figura (Fig. II.9).

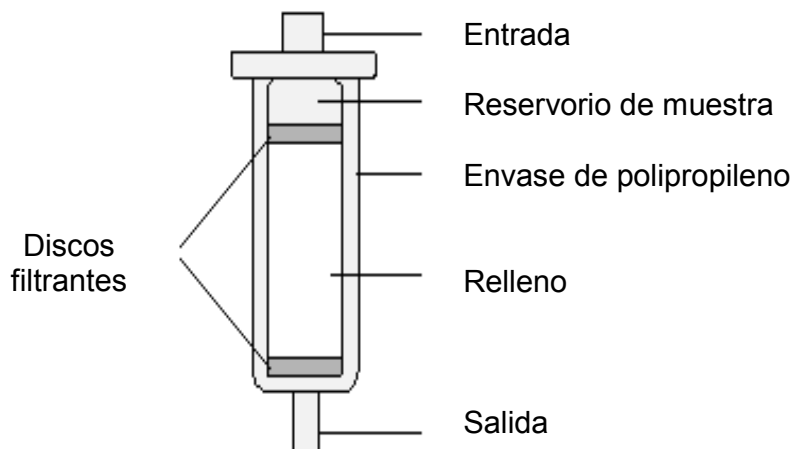


Figura II.9. Estructura base de un cartucho de EFS.

Los adsorbentes más utilizados en los discos, cartuchos y precolumnas son los basados en sílice, debido principalmente a que son rígidos, no excesivamente caros, reproducibles, estables y no presentan problemas de encogimiento o hinchamiento en presencia de solventes acuosos u orgánicos. Los adsorbentes de sílice químicamente modificada contienen grupos funcionales unidos covalentemente a la superficie mediante enlaces silano (**Figura II.10**). Generalmente, la superficie de la sílice es modificada para cambiar su selectividad o modular su fuerza de interacción [Huetos, 2004].

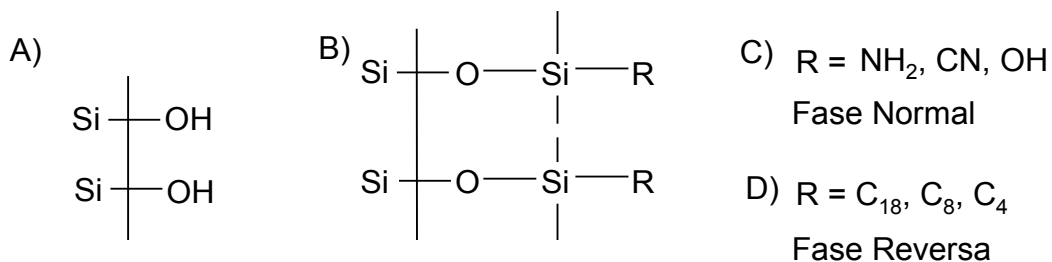


Figura II.10. Estructuras tipo de fases estacionarias para EFS basadas en sílice: A) sílice virgen, B) sílice modificada con grupos polares (fase normal) o apolares (fase reversa).

Los analitos son retenidos en la fase estacionaria del dispositivo de EFS por diferentes tipos de interacción, dependiendo de la naturaleza de los grupos funcionales que se encuentran en la superficie del adsorbente y de las propias características de los analitos, así como de la naturaleza de la matriz en que están disueltos.

Entre las fases estacionarias más comúnmente utilizadas en EFS están las siguientes:

- **Fase normal (polar).** Incluye a la sílice no modificada, la alúmina y la sílice químicamente unida a pequeñas cadenas alifáticas (generalmente propilo) con un grupo polar terminal. En estas fases, los analitos polares o medianamente polares son retenidos principalmente por interacciones dipolo-dipolo y/o interacciones donador-aceptor de protones (ácido-base). Se aplica para la extracción de analitos que poseen grupos funcionales polares a partir de matrices no acuosas, preferentemente poco polares.
- **Fase reversa (no polar).** Incluye a la sílice modificada con cadenas hidrocarbonadas de diferentes tamaños y a los adsorbentes poliméricos o resinas no modificadas (principalmente copolímeros estireno-divinilbenceno). Se aplica para la extracción de analitos de polaridad media o baja a partir de matrices acuosas. El mecanismo de retención de los compuestos está basado en el “efecto hidrofóbico”, es decir en la repulsión hacia el agua que experimenta la parte hidrocarbonada de los solutos y las cadenas hidrocarbonadas o la estructura hidrocarbonada del adsorbente, lo cual conduce a la unión de ambos para reducir el área de contacto con la fase acuosa. Por lo tanto, los adsorbentes con mayor área hidrocarbonada tendrán mayor poder de retención y los solutos más retenidos serán aquellos que tengan una parte hidrocarbonada más grande y grupos funcionales menos polares.
- **Intercambiadores de iones.** Incluye a las resinas de intercambio iónico y a las sílices modificadas con grupos intercambiadores de iones. Se aplica para la extracción de solutos iónicos a partir de matrices acuosas. Como su nombre lo indica, la retención se basa en un equilibrio de intercambio

iónico, por lo que factores como la fuerza iónica y el pH de la fase acuosa son determinantes. Los solutos más retenidos son los de mayor carga pero, en el caso de iones orgánicos, también influye hasta cierto punto la hidrofobicidad.

- **Fases mixtas.** Son adsorbentes con características mixtas, hidrofílicas-hidrofóbicas, como las sílices modificadas con cadenas hidrocarbonadas y cadenas que contienen grupos polares o las resinas injertadas con grupos polares. En ocasiones, los grupos polares tienen propiedades ácido-base por lo que, bajo ciertas condiciones de pH, pueden coexistir interacciones de tipo hidrofóbico con interacciones de tipo intercambio iónico. Se aplican para la extracción de compuestos orgánicos con grupos funcionales muy polares, o bien, para la extracción de mezclas de compuestos con características químicas diferentes, tanto polares como no polares (extracción multiresiduos).

Además de las mencionadas, existen fases estacionarias que se distinguen por su alta selectividad, denominadas genéricamente **Fases de afinidad**. Se basan en interacciones altamente específicas como las que existen en los sistemas biológicos (enzima-sustrato, receptor-hormona, antígeno-anticuerpo). Por ello se utilizan para la extracción de un solo compuesto o de una familia de compuestos de estructura muy semejante. Muchos de estos adsorbentes sólo se han utilizado en laboratorios de investigación o se encuentran en una fase incipiente de comercialización. En esta categoría están comprendidos los siguientes grupos:

- **Inmunoadsorbentes.** Consisten de un soporte sólido en el que se encuentra inmovilizado (física o químicamente) un anticuerpo desarrollado contra la sustancia de interés. En la literatura se ha reportado el desarrollo de inmunoadsorbentes para diversos pesticidas, agentes explosivos, e hidrocarburos poliaromáticos. [Delaunay, 2000; Cichna, 1997]. Por su naturaleza, este tipo de adsorbentes sólo puede ser utilizado para la extracción de compuestos en muestras acuosas [Vera-Avila, 2005; Cichna-Markl, 2006].

- **Polímeros molecularmente impresos.** Se les ha llamado también “anticuerpos plásticos”; están constituidos por una matriz polimérica en la que se ha generado una memoria específica hacia un compuesto particular. Se preparan haciendo polimerizar una mezcla que contiene un monómero funcional, un agente de entrecruzamiento, el analito de interés usado como plantilla y un iniciador de polimerización, disueltos en un solvente determinado. Una vez obtenido el sólido, la plantilla se remueve dejando sitios que se conforman a su estructura, tamaño y disposición de grupos funcionales, por lo que pueden volver a enlazar a este compuesto (o a uno muy parecido) cuando se encuentra presente en una muestra que se pone en contacto con el polímero. A diferencia de los inmunoabsorbentes, los polímeros molecularmente impresos pueden ser utilizados tanto con muestras acuosas como orgánicas [Lanza, 2001; Pichon, 2007].

II.4.2.2 Procedimiento de la EFS fuera de línea

El procedimiento abajo descrito está enfocado al caso particular de la EFS de solutos neutros a partir de matrices acuosas, utilizando como dispositivo un cartucho empacado con un adsorbente de fase reversa [Chirstian, 2009; Snyder, 1997]

Acondicionamiento (activación del cartucho). Las partículas de sílice modificada con cadenas hidrofóbicas (C_8 o C_{18}) o las resinas poliméricas no funcionalizadas son impermeables al agua, por lo que antes de ponerlas en contacto con una muestra acuosa deben ser activadas. El acondicionamiento se lleva a cabo pasando un disolvente orgánico, miscible con agua, a través del lecho de adsorbente. El disolvente (comúnmente metanol o acetonitrilo) solvata a las cadenas enlazadas o a la superficie del polímero, formando una capa estacionaria. Posteriormente, se realiza un lavado con agua o una solución buffer para desalojar al disolvente orgánico del volumen intersticial, pero la capa estacionaria permanece firmemente unida a la superficie del adsorbente permitiendo que, en la siguiente etapa, los analitos puedan difundir a través de ella e interactuar con las cadenas hidrocarbonadas o la superficie del polímero.

Aplicación de la muestra. En este paso la muestra es percolada a través del cartucho a una velocidad de flujo adecuada (dependiendo de la cinética de adsorción). Los analitos y algunos otros compuestos presentes en la muestra son retenidos en la fase estacionaria, mientras que los compuestos con poca afinidad por el adsorbente son eliminados en el efluente del cartucho (generalmente sales inorgánicas y solutos orgánicos iónicos o muy polares).

Lavado. Se emplea una disolución acuosa a pH apropiado o mezclas agua-disolvente orgánico en proporciones adecuadas. En general el objetivo del lavado es separar la mayor cantidad posible de impurezas provenientes de la muestra del o los analitos de interés.

Dependiendo de la fuerza de interacción de los analitos y las impurezas con la fase estacionaria, se pueden tener dos tipos de lavado:

1. Los compuestos de interés interactúan con la fase estacionaria más fuertemente que las impurezas. En este caso, el disolvente de lavado debe ser suficientemente fuerte para desorber la mayor cantidad posible de interferentes pero no debe afectar la interacción de los analitos con el adsorbente (**Figura II.11**).

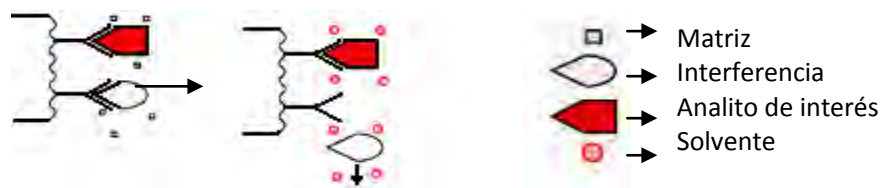


Figura II.11. Proceso de lavado cuando el analito interactúa con la fase estacionaria más fuertemente que las impurezas provenientes de la muestra.

2. Las impurezas interactúan con la fase estacionaria más fuertemente que los analitos. En este caso, el lavado tiene como propósito recuperar al analito purificado por lo que el disolvente utilizado debe ser suficientemente débil para no desorber las impurezas pero debe alcanzar a disociar cuantitativamente la interacción de los analitos con el adsorbente (**Figura II.12**).



Figura II.12. Proceso de lavado cuando el analito interactúa con la fase estacionaria más débilmente que las impurezas provenientes de la muestra.

Cabe mencionar que cuando el objetivo principal de la EFS es preconcentrar los analitos lo más posible, las condiciones deben adecuarse al tipo de lavado 1, mostrado en la **Figura II.11**.

Elución. La desorción o elución se efectúa mediante el paso de un disolvente relativamente fuerte a través del cartucho, de modo a recuperar cuantitativamente a los analitos en el menor volumen posible de disolvente de elución, es decir, lo más concentrados que se pueda. No obstante, durante esta etapa también pueden eliminarse algunas interferencias fuertemente retenidas si la fuerza del disolvente de elución se modula, de tal forma que los analitos sean desorbidos pero no las interferencias.

II.4.2.3 Extracción en fase sólida en línea

El principio de la extracción en fase sólida en línea es el mismo que el de fuera de línea. Operativamente hay sin embargo algunos cambios. Se utiliza una cantidad menor de

adsorbente (≤ 50 mg), el cual debe tener un diámetro de partícula pequeño (≤ 15 μm) y se empaca en una precolumna de acero inoxidable de pequeñas dimensiones. Estas condiciones tienen por objeto evitar una pérdida importante de eficiencia ya que, en la etapa de elución, la precolumna y la columna analítica están acopladas y constituyen una entidad única donde los solutos migran por el paso de la fase móvil, separándose y ensanchándose según lo predice la teoría cromatográfica. El acoplamiento se realiza intercalando una válvula de conmutación (o más) entre el inyector y la columna analítica de un cromatógrafo de líquidos. En los arreglos más simples, se utiliza una válvula de conmutación de 6 puertos; la precolumna se inserta entre dos puertos opuestos, mientras que las conexiones al cromatógrafo (inyector y columna) se hacen por dos puertos contiguos. Las primeras etapas de la EFS, hasta el paso de lavado, se llevan a cabo de manera similar al proceso fuera de línea, excepto por el hecho de que los diversos disolventes y la muestra son enviados a la precolumna mediante una bomba auxiliar, la cual está conectada a otro puerto de la válvula de conmutación. Los efluentes de estas etapas se recogen en una salida de desechos adaptada al último puerto de la válvula, contiguo a aquél en que se conecta la bomba. En la etapa de elución, la válvula se rota de modo que la fase móvil enviada por la bomba del cromatógrafo pasa a través de la precolumna, desorbiendo los compuestos retenidos y transfiriéndolos a la columna analítica para su separación y detección [Subra, 1988].

Todo el sistema y operaciones descritas para la EFS en línea pueden ser automatizados, empleando el equipo, válvulas y software adecuados que están disponibles comercialmente.

La extracción en fase sólida en línea presenta varias ventajas con respecto a la extracción en fase sólida fuera de línea [Subra, 1988].

- Los tiempos de análisis son más cortos, debido a que todo el proceso es continuo.

- Disminuye la manipulación de la muestra, con lo cual los riesgos de contaminación o pérdida de analitos también se ven disminuidos, mejorándose así la precisión y exactitud del análisis.
- El sistema es automatizable, lo que genera un proceso más apropiado para el procesamiento secuencial en análisis de muestras rutinarias.
- Toda la muestra concentrada en la precolumna es directamente analizada por el cromatógrafo lo que permite alcanzar límites de detección y cuantificación más bajos, generando así métodos analíticos más sensibles.

Hipótesis y Objetivos

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

III. 1. Hipótesis

Mediante el acoplamiento en línea de la extracción en fase sólida y la cromatografía de líquidos de alta resolución con detección UV, es posible desarrollar una metodología analítica relativamente simple y altamente sensible que pueda ser aplicada para el monitoreo de residuos de sulfonamidas en aguas superficiales.

III.2. Objetivos

Objetivo general

Diseñar y desarrollar un método analítico simple y sensible para detectar y cuantificar siete sulfas (sulfadiazina, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfisoxazol y sulfadimetoxina) a niveles de concentración del orden de trazas ($\mu\text{g/L}$ o ng/L) en matrices acuosas, utilizando la extracción en fase sólida acoplada en línea a la cromatografía líquida de alta resolución con detección UV (EFS-CLAR/UV).

Objetivos particulares

- Optimizar las condiciones cromatográficas para lograr una buena resolución y una máxima sensibilidad de detección de las siete sulfas.
- Establecer condiciones para el pretratamiento de la muestra y su posterior carga, lavado y elución en una precolumna de fase reversa, que permitan alcanzar altos factores de preconcentración y purificación de las sulfas en estudio.
- Realizar un estudio estadístico del método analítico desarrollado, encaminado a la determinación de su linealidad, precisión, % de recuperación y límites de detección y cuantificación de las siete sulfas.
- Aplicar el método desarrollado para la determinación de las sulfas en muestras reales de aguas superficiales, a niveles de concentración del orden de las partes por billón o menores.

Desarrollo Experimental

IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

IV.1. Equipo y materiales.

- La mayor parte de este trabajo se llevó a cabo con un sistema para cromatografía de líquidos constituido por:
 - Bomba cuaternaria modelo LC-1150 de Polymer Laboratories.
 - Inyector Rheodyne 7125 con bucle de 26 μL (calibrado en laboratorio).
 - Detector UV de longitud de onda variable, Spectromonitor 3200 de Thermo Separation Products.
 - Sistema de adquisición y tratamiento de datos conformado por: computadora Dell Intel Pentium 4, software Eurochrom for Windows Basic Edition V3.05 e interface Knauer modelo 76019.
- Algunos experimentos terminales se realizaron con un sistema para cromatografía de líquidos de la marca Knauer, constituido por:
 - 2 Bombas modelo 1000, conectadas a un mezclador.
 - Válvula de inyección de 6 puertos con bucle de 20 μL .
 - Detector UV con arreglo de diodos y capacidad de salida para 4 cromatogramas simultáneos a diferentes longitudes de onda, modelo 2600.
 - Sistema de adquisición y tratamiento de datos conformado por: computadora Acer Intel Pentium 4, software Eurochrom for Windows Basic Edition V3.05.
- Bomba isocrática auxiliar, Beckman modelo 110B.
- Bombas isocráticas auxiliares, Eldex Laboratories, modelos CC-100-S y CC-30-S.
- Sistema generador de agua purificada y desionizada NANOpure, Barnstead Thermolyne modelo 04747.
- Potenciómetro Corning modelo 220 con electrodo combinado de vidrio-calomel Cole-Parmer modelo 60648.

- Válvula de conmutación de 6 puertos, Rheodyne 7000.
- Columna analítica Hypersil ODS (150 x 4.6 mm, d.i.) de 5 µm, Thermo Scientific.
- Precolumnas (20 x 2 mm, d.i.) empacadas en el laboratorio con fase reversa polimérica PLRP-S de 10-15 µm (Polymer Laboratories).
- Jeringa de 100 µL para cromatografía de líquidos, Hamilton, Microlitrer 710.
- Sistema de filtración de vidrio Millipore, modelo OM027, con membranas de filtración de nylon 66, marca Lida, de 47 mm de diámetro y 0.45 µm de diámetro de poro.

IV.2. Reactivos y Disolventes.

- Sal de Sulfadiazina de sodio, Sigma Aldrich.
- Sal de Sulfatiazol de sodio 99.0%, Sigma Aldrich.
- Sulfamerazina 99.0%, Sigma Aldrich.
- Sal de Sulfametazina de sodio 99.0%, Sigma Aldrich.
- Sulfametoxazol, Sigma Aldrich.
- Sulfisoxazol 99.0%, Sigma Aldrich.
- Sal de Sulfadimetoxina de sodio, Sigma Aldrich.
- Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), 99.0%, Sigma Aldrich.
- Acido Fórmico 88%, J.T.Baker.
- Hidróxido de sodio, perlas 98.0%, J.T.Baker.
- Metanol (MeOH) grado HPLC, Tecsiquim.
- Acetonitrilo (AcCN) grado HPLC, Tecsiquim.
- Agua grado reactivo, Tipo I. Obtenida del sistema purificador NANOpure.

IV.3. Preparación de soluciones estándar de sulfas.

Se prepararon soluciones stocks individuales (~1000 µg/mL) de cada una de las 7 sulfas. En la **Tabla IV.1** se describe su composición. Estas soluciones fueron guardadas en el congelador (- 20°C) cuando no estaban en uso.

Tabla IV.1. Concentración de las sulfas en la solución stock.

N°	Sulfas	Masa (g)	**%MeOH	%agua	Concentración (µg/mL)
1	Sulfadiazina (SDZ)	0.0101	100	0	1010
2	Sulfatiazol (STZ)	0.0100	50	50	1000
3	Sulfamerazina (SMZ)	0.0100	100	0	1000
4	Sulfametazina (SMT)	0.0100	50	50	1000
5	Sulfametoxazol (STX)	0.0101	50	50	1010
6	Sulfisoxazol (SFZ)	0.0101	100	0	1010
7	Sulfadimetoxina (SDX)	0.0100	100	0	1000

* Para el cálculo de las concentraciones no se tomaron en cuenta los porcentajes de pureza.

** % (v/v).

A partir de las soluciones stock se prepararon disoluciones estándar de diferentes concentraciones con la mezcla de las 7 sulfas, aforando al volumen deseado con agua tipo I. Las disoluciones estándar se guardaron en refrigeración (4°C) cuando no estaban en uso y se renovaron periódicamente (cada 3 semanas).

IV.4. Condiciones Cromatográficas

Las condiciones cromatográficas fueron optimizadas a partir de la inyección de una mezcla estándar de las siete sulfas (20 µg/mL) en el sistema en línea (precolumna de fase reversa PLRP-S más columna analítica de fase reversa C-18). Inicialmente se probaron diferentes composiciones y pH de la fase móvil en modo de elución isocrático.

La composición de la fase móvil que permitió obtener picos simétricos y con resoluciones óptimas entre ellos fue una mezcla MeOH-AcCN-buffer formiato (0.01 M, pH 3.5) 10:10:80 (v/v). En estas condiciones se trabajó a una velocidad de flujo de 1 mL/min.

Con el objeto de disminuir el tiempo de la corrida cromatográfica y obtener picos más esbeltos y simétricos para todos los compuestos de interés, se puso a punto una separación por gradiente de elución. La composición de las fases móviles débil y fuerte, así como el programa de gradiente finalmente establecido se presentan en la **Tabla IV.2**.

Tabla IV.2. Programa de gradiente utilizado para la separación de las 7 sulfas.*

t (min)	% Fase B
0	4
10	20
20	50
30	70

* Fase débil (Fase A) Acetonitrilo-buffer formiato (0.01 M, pH 3.5) 4:96 (v/v)
Fase fuerte (Fase B) Acetonitrilo-buffer formiato (0.01 M, pH 3.5) 60:40 (v/v)

Para optimizar la señal de respuesta del detector, se realizó un estudio a nueve diferentes longitudes de onda en la región UV. Esta exploración se llevó a cabo con las 4 sulfas menos retenidas, las cuales fueron separadas en modo isocrático. La máxima respuesta para estos compuestos se obtuvo a una longitud de onda de 270 nm. Posteriormente se separaron las 7 sulfas por gradiente de elución, confirmándose la longitud de onda antes establecida.

IV.5. Pre-tratamiento de la muestra

Debido a que las muestras de aguas naturales generalmente contienen sólidos suspendidos, éstas no pueden ser cargadas directamente en la precolumna de preconcentración ya que taparían los filtros de acero que se encuentran a la entrada y

salida de ésta. Por esta razón, las muestras fueron previamente filtradas al vacío a través de una membrana de Nylon 66 (poro 0.45 μm) con la ayuda de un sistema Millipore.

Con la finalidad de pre-purificar la muestra, eliminando la mayor cantidad posible de compuestos interferentes de baja polaridad, se realizó una extracción líquido-líquido con hexano en una relación muestra:hexano 10:1 (v/v). Previamente, el pH de la muestra se ajustó a un valor de 3.5 mediante una solución buffer de formiatos (0.02 M) y se añadió sulfato de sodio (Na_2SO_4) hasta concentración 0.1 M para facilitar la separación de fases.

IV.6. Preconcentración de la muestra y análisis en línea.

Las concentraciones de fármacos que se espera encontrar en las aguas superficiales y subterráneas contaminadas con residuos de estos compuestos son muy bajas; por eso, el paso de preconcentración de la muestra es crucial para obtener límites de detección y cuantificación adecuados. En este trabajo se optó por utilizar la extracción en fase sólida acoplada en línea a la cromatografía de líquidos como método de preconcentración y análisis.

El esquema del montaje utilizado para el acoplamiento en línea de la precoluma de preconcentración con el cromatógrafo de líquidos se muestra en la **Figura IV.1**. El componente principal para el acoplamiento es una válvula de conmutación de 6 puertos que se inserta entre el inyector y la columna analítica del cromatógrafo de líquidos, a los cuales se conecta mediante los puertos 2 y 3, respectivamente. La precoluma se coloca entre los puertos 4 y 1. El puerto 6 está conectado a una bomba isocrática auxiliar, mientras que el puerto 5 está destinado para la salida de desechos.

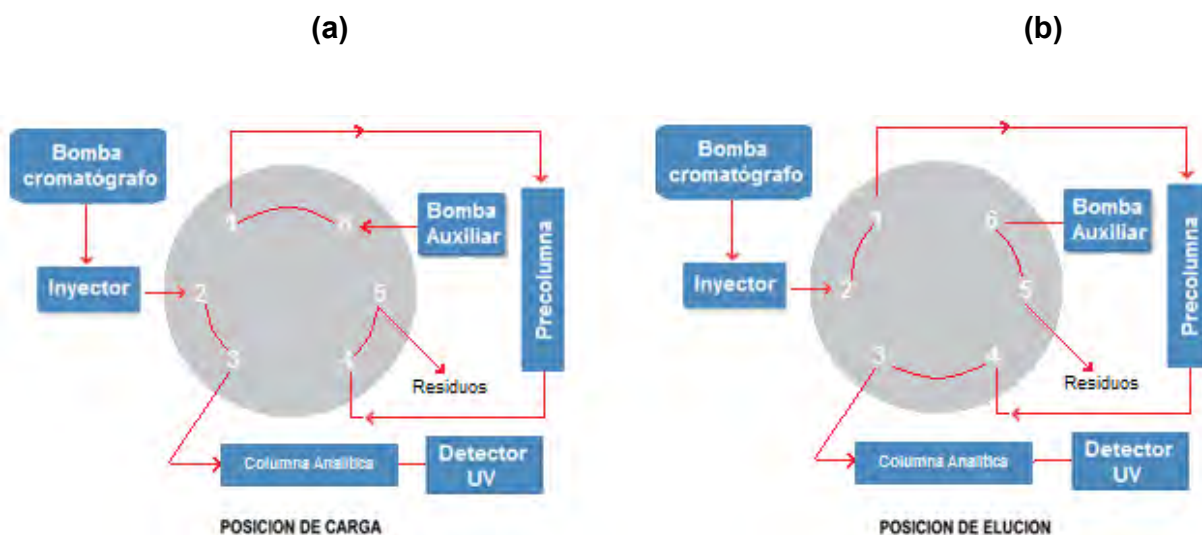


Figura IV.1. Esquema del montaje utilizado

La extracción en fase sólida cuenta con varias etapas que son: acondicionamiento, carga, lavado, elución y regeneración, las cuales están representadas en la **Figura IV. 2**. Las etapas de acondicionamiento, carga, lavado y regeneración se llevan a cabo manteniendo la válvula de conmutación en la posición de carga (**Fig. IV.1a**) y utilizando la bomba isocrática auxiliar para enviar las diferentes disoluciones o disolventes a la precolumna; los efluentes de la precolumna son desalojados por la salida de desechos. Para la etapa de elución, la válvula se rota de modo que la fase móvil proveniente de la bomba del cromatógrafo es dirigida hacia la precolumna (**Fig. IV.1b**), lo que ocasiona la desorción de los analitos y su transferencia en línea hacia la columna analítica.

El acondicionamiento de la columna analítica con la fase móvil inicial del programa de gradiente (96% fase A, 4% fase B; **Tabla IV.2**) se realiza simultáneamente a las etapas de acondicionamiento, carga y lavado de la precolumna. Como se observa en la **Fig. IV.1a**, en la posición de carga de la válvula de conmutación coexisten dos circuitos de flujo independientes que pueden ser trabajados simultáneamente, uno es alimentado por la bomba auxiliar y el otro es alimentado por la bomba del cromatógrafo. Cuando la válvula se rota a la posición de elución (**Fig. IV.1b**), sólo queda activo un circuito de flujo alimentado por la bomba del cromatógrafo; en este punto, la bomba auxiliar se para.

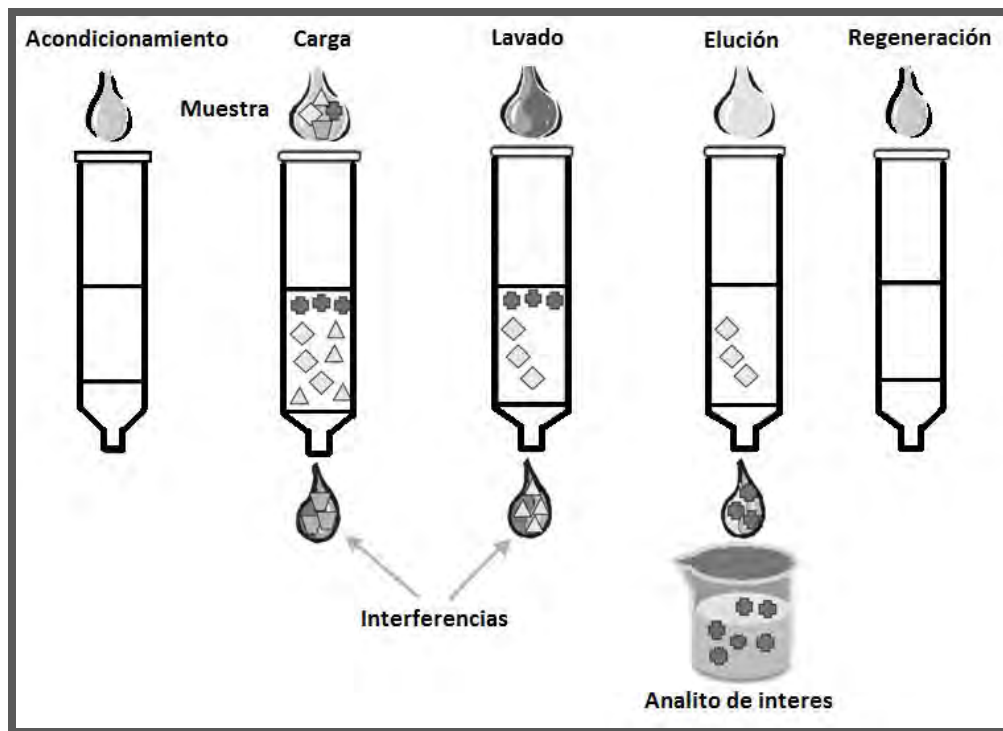


Figura IV. 2. Esquema general de las etapas que conforman el proceso de EFS.

Para optimizar las condiciones de las etapas del proceso de EFS se realizaron un gran número de ensayos. En éstos se buscó concentrar un volumen de muestra lo más grande posible, manteniendo una recuperación aceptable para las 7 sulfas. A continuación se describen las condiciones resultantes del compromiso entre estas dos variables.

Acondicionamiento

El acondicionamiento de la precolumna consistió en la activación de la fase estacionaria polimérica PLRP-S con un disolvente orgánico (acetonitrilo) seguido de un lavado con agua para desalojar al disolvente orgánico; posterior a esto se hizo pasar una disolución acuosa de buffer formiato 0.02 M a pH 3.5 para acondicionar la fase reversa al pH de extracción (tabla IV.3).

Carga

Las muestras una vez pre-tratadas como se describe en la sección **IV.5**, fueron directamente cargadas en la precolumna de fase reversa polimérica PLRP-S a una velocidad de flujo de 0.8 mL/min.

Lavado

En este trabajo la etapa de lavado fue diseñada para eliminar los residuos de Na_2SO_4 que quedan en el volumen intersticial de la precolumna después de la carga de la muestra, así como algunos compuestos muy hidrofílicos que pudieran estar presentes en ella. El lavado se llevó a cabo a una velocidad de flujo muy reducida y con un volumen pequeño del buffer formiato a pH 3.5.

Elución

Este paso de la EFS fue realizado directamente hacia la columna analítica, bajo las condiciones establecidas previamente para la separación cromatográfica. La EFS en línea permite aumentar la sensibilidad del método (con respecto a la EFS fuera de línea), pues el total del extracto es transferido hacia el sistema cromatográfico y analizado.

Regeneración

La regeneración se efectuó mediante la aplicación de 10 mL de acetonitrilo a la precolumna.

A continuación en la **Tabla IV.3** se resumen las condiciones finales del proceso de EFS.

Tabla IV.3. Condiciones de EFS

Acondicionamiento	5 mL de acetonitrilo	Flujo 1 ml/min
	10 mL de agua grado reactivo	
	5 mL de buffer formiato (0.02 M, pH 3.5).	
Carga	40 mL de muestra pre-purificada y ajustada a pH 3.5	0.8 ml/min
Lavado	2 mL del buffer formiato	0.5 ml/min
Elución	En el mismo sentido de flujo que la carga. Transferencia directa a la columna analítica.	1 ml/min
Regeneración	10 mL acetonitrilo	1 ml/min

Con el fin de optimizar el tiempo de uso del cromatógrafo de líquidos, en algunos casos las etapas de acondicionamiento, carga, lavado y regeneración de la precolumna se realizaron de manera independiente, con la ayuda de bombas auxiliares (**Figura IV.3**). Esto permitió cargar simultáneamente varias precolumnas mientras en el sistema en línea se realizaba la elución y análisis de una precolumna ya cargada, o bien, el análisis de un estándar inyectado. Cabe mencionar que todos los estándares de calibración se inyectaron en el sistema en línea precolumna + columna analítica.

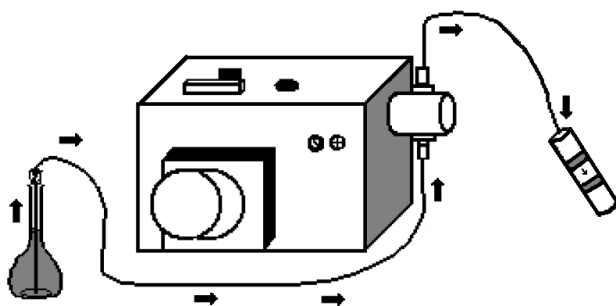


Figura IV.3. Esquema del sistema utilizado para realizar en forma independiente las operaciones de acondicionamiento, carga, lavado y regeneración de las precolumnas.

IV. 7. Evaluación del método

IV.7.1. Estudios de recobro

En todos los experimentos realizados, el estándar que se utilizó para fortificar una muestra dada fue el mismo que se inyectó como referencia para la cuantificación de los analitos en dicha muestra por el método de estandarización externa. De esta manera se aseguró que los resultados obtenidos para el recobro de las sulfas fueran independientes de cualquier pequeña variación en la composición de los estándares. Las ecuaciones empleadas para los cálculos requeridos en los estudios de recobro fueron las siguientes (**E-IV.1** a **E-IV-3**):

$$\text{Cantidad Adicionada} = C_{St} \times V_{Ad} \quad (\mathbf{E - IV. 1})$$

$$\text{Cantidad Recuperada} = \frac{A_M \times V_i \times C_{St}}{A_{St}} \quad (\mathbf{E - IV. 2})$$

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Cantidad Recuperada}}{\text{Cantidad Adicionada}} \times 100 \quad (\mathbf{E - IV. 3})$$

Donde: C_{St} (ng/ μ L) es la concentración del analito en el estándar, V_{Ad} (μ L) es el volumen de estándar añadido para fortificar un cierto volumen de la muestra (es decir, el volumen de muestra que se carga en la precolumna), A_M es el área del pico del analito en el cromatograma de la muestra analizada, A_{St} es el área del pico de este compuesto en el cromatograma del estándar inyectado y V_i (μ L) es el volumen de estándar inyectado.

IV.7.2. Linealidad y precisión del método

Se analizaron por triplicado muestras de agua grado reactivo fortificadas con las sulfas a 7 niveles de concentración en el intervalo de 0.5-10 ng/mL. A partir de las áreas de pico se calculó la cantidad de cada sulfa presente en las muestras analizadas (Ecuación **E-IV.2**) y se trazaron gráficas de *Cantidad recuperada Vs Cantidad*

adicionada. Los datos experimentales fueron tratados estadísticamente para comprobar la linealidad del método en el intervalo de concentraciones estudiado y obtener las ecuaciones de regresión lineal correspondientes.

La precisión del método (como repetibilidad) se estimó a partir del coeficiente de variación de la concentración determinada en el análisis de 9 muestras independientes de agua grado reactivo, fortificadas con las 7 sulfas a ~3 ng/mL cada una.

IV.7.3. Límites de detección y cuantificación del método

El límite de detección del método (LDM) fue evaluado según el criterio establecido por la EPA para muestras ambientales (US-EPA, 1984). De acuerdo con este criterio, el LDM se calcula mediante la siguiente ecuación (**E – IV.4**):

$$LDM = t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)} * S \quad (\mathbf{E - IV.4})$$

Donde, $t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)}$ es el valor de la “t” de Student para un nivel de confianza del 99%, con n-1 grados de libertad (prueba de una cola), S es la desviación estándar (en unidades de concentración) obtenida al analizar un mínimo de 7 muestras fortificadas con el analito a una concentración no mayor a 10 veces el LDM esperado.

En el caso presente, el LDM se estimó a partir de la desviación estándar obtenida en el análisis de las 9 muestras independientes de agua grado reactivo fortificadas a 3 ppb de cada analito. Para la determinación del límite de cuantificación se decidió tomar el valor correspondiente a 10 veces la desviación estándar antes mencionada (en unidades de concentración).

IV.8. Aplicación del método

El método desarrollado en el presente trabajo se empleó para el análisis de 3 diferentes muestras de aguas naturales. Dos de ellas fueron recolectadas en el Distrito Federal (Parque Nacional Fuentes Brotantes y Parque Ecológico Loreto y Peña Pobre) y la

tercera muestra fue recolectada en las inmediaciones del poblado de Chalma, municipio de Malinalco, Estado de México, a 95 Km de la Ciudad de México.

Las muestras fueron colectadas a nivel superficial en frascos de vidrio ámbar de 750 mL de capacidad, los cuales fueron llenados hasta el inicio de la rosca. Cabe mencionar que también podrían utilizarse frascos de plástico para la colección de las muestras, ya que los solutos no habrían sufrido pérdidas por adsorción en las paredes del recipiente gracias a su carácter hidrofílico. Al llegar al laboratorio, las muestras fueron inmediatamente filtradas y se mantuvieron en refrigeración (4°C) hasta su análisis. Se analizaron las muestras originales (muestras blanco) y las mismas muestras dopadas con sulfas para comprobar o descartar su posible presencia en estas aguas. Con el mismo fin, se llevaron a cabo análisis de las muestras blanco a diferentes longitudes de onda de detección.

Resultados

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1. Desarrollo del método analítico.

V.1.1. Condiciones cromatográficas.

V.1.1.1. Condiciones para la detección UV de las sulfas.

La longitud de onda para una detección óptima del conjunto de sulfas en estudio fue determinada mediante la exploración de algunas longitudes de onda alrededor de las citadas en la bibliografía [Horwitz, 2005; Sanli, 2009; Stowe, 1965; Annel, 2004; Bridge, 1968; Gosh, 1992]. En los primeros ensayos se inyectó una mezcla estándar de cuatro sulfas, las cuales fueron separadas en modo isocrático con una fase móvil acetonitrilo-metanol-buffer formiato (0.01M, pH 3.5) 10:10:80 (v/v). En la **Tabla V.1** se reporta el área del pico para cada sulfa en función de la longitud de onda de detección.

Tabla V.1. Estudio de la respuesta de las sulfas en función de la λ de detección.

Sulfas λ (nm)	215	230	250	254	255	256	259	265	270
Área de pico cromatográfico									
Sulfadiazina	14.638	7.661	9.897	12.117	12.329	13.178	14.521	15.735	14.977
Sulfatiazol	8.936	4.335	12.135	13.965	13.799	14.490	14.736	13.829	14.479
Sulfamerazina	15.919	12.300	14.571	17.428	17.087	18.409	20.234	20.461	19.278
sulfametazina	10.679	10.705	12.874	14.228	14.211	15.457	16.214	16.348	14.698

En la tabla anterior se muestra en sombreado la respuesta para la longitud de onda de 270 nm, que junto con las de 259 y 265 nm fueron las que dieron un área promedio de pico mayor que las demás. Se decidió escoger 270 nm como la longitud óptima debido a que, mientras mayor sea ésta, los posibles interferentes presentes en muestras de aguas naturales generalmente dan una respuesta menor.

V.1.1.2 Optimización de la separación de las sulfas.

Debido a la polaridad de las sulfas y a que el estudio realizado fue enfocado para la determinación de estos fármacos en matrices acuosas, se decidió que la cromatografía de líquidos en fase reversa sería la más apropiada para llevar a cabo el desarrollo de la metodología, puesto que las características de solubilidad de los analitos son compatibles con las fases móviles empleadas en esta técnica (generalmente mezclas metanol-agua o acetonitrilo-agua).

Dado que la retención de las sulfas en un sistema cromatográfico de fase reversa depende del pH de la fase móvil, debido a las propiedades ácido-base de estos compuestos (ver pKa(s) en **Tabla II.1**, Antecedentes y zonas de predominio de formas ácido-base en **Figura II.1**), la molécula se encuentra en su forma neutra siendo esta zona la más favorable para la retención de las sulfas en una columna de fase reversa. Los estados de protonación de las sulfonamidas se presentan en la **Figura V.1**

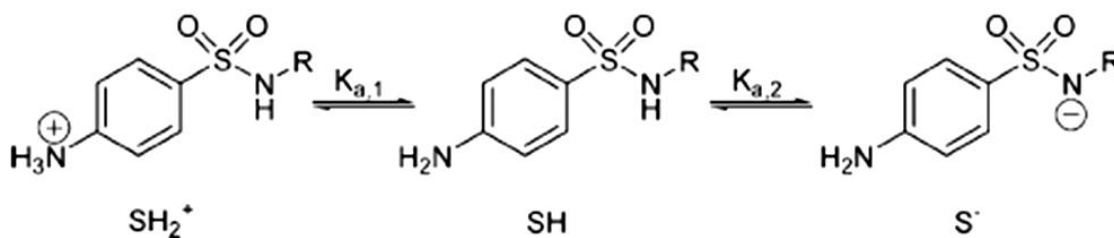


Figura V.1. Estados de protonación de sulfonamidas [Boreen, 2004].

Para encontrar una fase móvil adecuada para la separación de los 7 compuestos se ensayaron diversas mezclas de agua-disolvente orgánico. El pH de la fracción acuosa se ajustó a valores comprendidos en el intervalo anteriormente señalado, asegurando así la predominancia de la forma neutra **SH**.

En estos ensayos preliminares se observó una mejor resolución de los analitos y una mayor sensibilidad de detección al utilizar como fase móvil mezclas ternarias

acetonitrilo-metanol-buffer formiato (0.01 M, pH 3.5). Finalmente, ajustando la proporción de los disolventes en una relación 10:10:80 (v/v), respectivamente, se logró una buena separación de las siete sulfas (**Figura V.2**). En la **Tabla V.2** se presentan los tiempos de retención de los compuestos eluidos en modo isocrático.

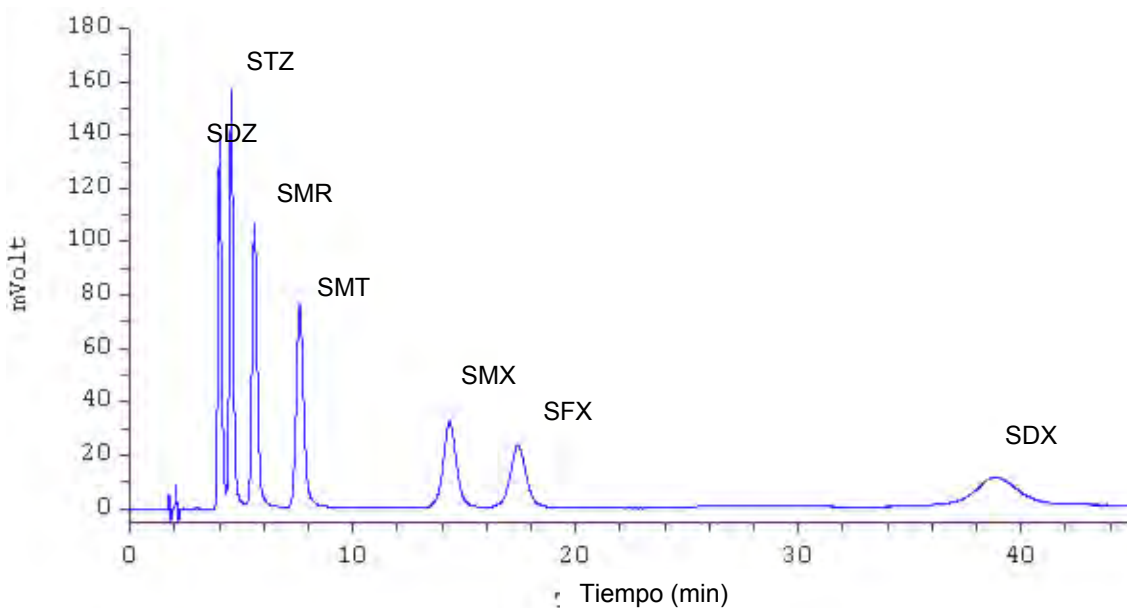


Figura V.2. Separación de las 7 sulfas en condiciones isocráticas. Inyección directa de 26 μL de una mezcla estándar ($\sim 20 \mu\text{g/mL}$) en el sistema acoplado precolumna (PLRP-S) + columna analítica (Hypersil ODS). Detección UV a 270 nm. Fase móvil AcCN-MeOH-buffer formiato (0.01 M, pH 3.5), 10:10:80 (v/v). Solutos: sulfadiazina (SDZ), sulfatiazol (STZ), sulfamerazina (SMR), sulfametazina (SMT), sulfametoxazol (SMX), sulfisoxazol (SFX) y sulfadimetoxina (SDM).

Tabla V.2. Tiempos de retención de las siete sulfas en modo de elución isocrático.

Sulfas	Tiempo de retención (min)
Sulfadiazina (SDZ)	4.0
Sulfatiazol (STZ)	4.5
Sulfamerazina (SMR)	5.6
Sulfametazina (SMT)	7.6
Sulfametoxazol (SMX)	14.3
Sulfisoxazol (SFX)	17.4
Sulfadimetoxina (SDX)	38.9

Como se puede observar en la **Fig. V.2**, la sulfadimetoxina es considerablemente más retenida que las otras sulfas, lo que conlleva a una corrida cromatográfica muy larga. Su tiempo de retención, cercano a 39 min, es más del doble que el del analito que eluye antes de ella (**Tabla V.2**). En consecuencia, bajo las condiciones isocráticas empleadas, esta sulfa genera un pico pequeño y demasiado ancho (**Figura V.3**), lo que representa un obstáculo para alcanzar los límites de detección requeridos en análisis ambientales de contaminantes a niveles traza.

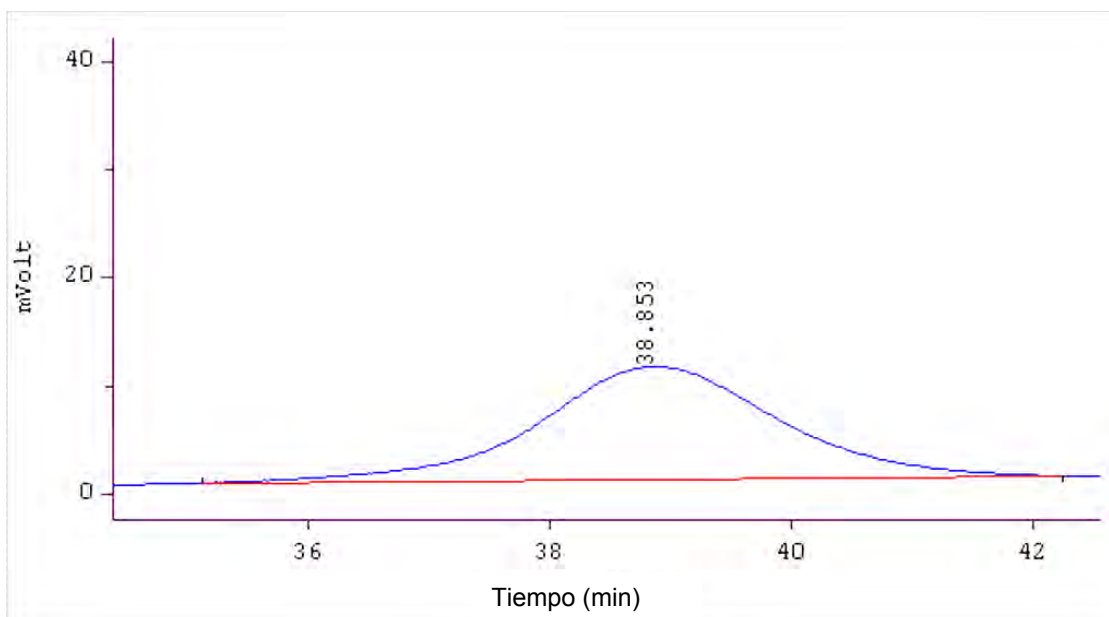


Figura V.3. Sulfadimetoxina (26 μ L, 20 μ g/mL) inyectada directamente en el sistema cromatográfico y eluida en modo isocrático. Sistema acoplado precolumna (PLRP-S) + columna analítica (Hypersil ODS). Detección UV a 270 nm. Fase móvil AcCN-MeOH-buffer formiato (0.01 M, pH 3.5), 10:10:80 (v/v).

Por otra parte, en el cromatograma de la **Fig. V.2** se observa que los primeros picos eluyen muy cerca del volumen muerto, lo que también podría representar un problema en las siguientes etapas de desarrollo del método. En efecto, cuando una precolumna de EFS es cargada con una muestra y eluida en línea con la columna analítica, generalmente se producen perturbaciones importantes al inicio de los cromatogramas. Estas perturbaciones pueden provocar una distorsión de los picos de los solutos poco retenidos, o bien, generar señales que se traslapan con ellos.

Por todas las razones expuestas se decidió abandonar la elución isocrática y diseñar una separación por gradiente de elución. Como fases móviles débil y fuerte se utilizaron mezclas binarias acetonitrilo-buffer formiato (0.01 M, pH 3.5) en proporciones 4:96 y 60:40 (v/v), respectivamente. Se ensayaron diversos programas de gradiente buscando que los primeros picos estuvieran bien separados y eluyeran después de los 5 min (a flujo de 1 mL/min) y que el pico de la sulfadimetoxina se acercara a los de las otras sulfas. Con el programa de gradiente finalmente adoptado (ver **Tabla IV.2**), se obtuvo la separación mostrada en la **Figura V.4**. En este caso se inyectó una mezcla estándar de sulfas a concentración de $\sim 2.1 \mu\text{g/mL}$ cada una. Como puede observarse, todos los picos tienen aproximadamente la misma anchura y su altura es semejante, lo que implica una importante ganancia en sensibilidad, principalmente para las tres sulfas más retenidas. En la **Tabla V.3** se reportan los tiempos de retención de cada compuesto. Como puede constatarse, el tiempo de corrida cromatográfica se redujo casi a la mitad en comparación con la corrida isocrática.

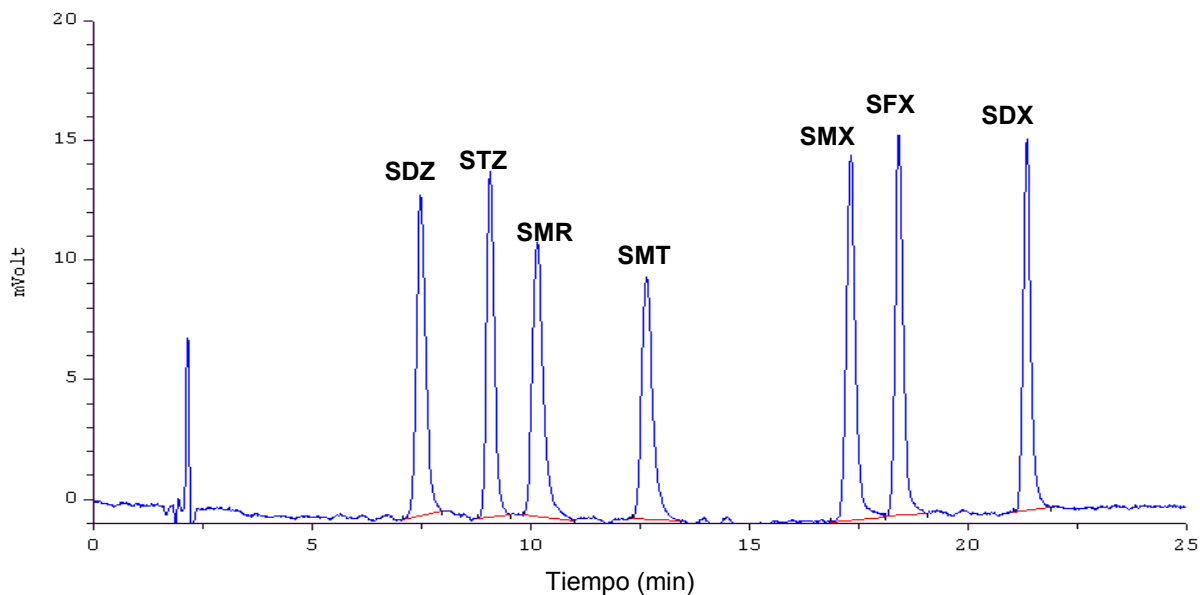


Figura V.4. Separación de las 7 sulfas por gradiente de elución. Inyección directa de 26 μL de una mezcla estándar ($\sim 2.1 \mu\text{g/mL}$) en el sistema cromatográfico. Precolumna (20 x 2 mm, d.i.) PLRP-S de 10-15 μm , columna analítica (150 x 4.6 mm, d.i.) Hypersil ODS de 5 μm . Fase móvil, fase A: AcCN-buffer formiato (0.01 M, pH 3.5), 4:96 (v/v), fase B: AcCN-buffer formiato (0.01 M, pH 3.5), 60:40 (v/v), flujo: 1 mL/min. Detección UV a 270 nm. Solutos: sulfadiazina (SDZ), sulfatiazol (STZ), sulfamerazina (SMR), sulfametazina (SMT), sulfametoxazol (SMX), sulfisoxazol (SFX) y sulfadimetoxina (SDM).

Tabla V.3. Tiempos de retención de las 7 sulfas en gradiente de elución, n=3.

Sulfas	tr (min)
Sulfadiazina (SDZ)	7.5 ± 0.2
Sulfatiazol (STZ)	8.9 ± 0.4
Sulfamerazina (SMR)	10.0 ± 0.4
Sulfametazina (SMT)	12.5 ± 0.2
Sulfametoxazol (SMX)	17.0 ± 0.2
Sulfioxazol (SFX)	18.1 ± 0.3
Sulfadimetoxina (SDX)	21.1 ± 0.3

V.1.2. Preparación de la muestra

V.1.2.1. Pre-tratamiento de la muestra

Debido a que las muestras de aguas naturales contienen una gran cantidad de compuestos, algunos de ellos miles de veces más concentrados que los analitos de interés, es necesario diseñar métodos de tratamiento de la muestra que permitan no sólo preconcentrar a los analitos sino eliminar la mayor cantidad posible de compuestos interferentes.

El primer paso es obviamente la eliminación de tierra, arena, partículas de material vegetal y de residuos urbanos, y en general toda clase de sólidos suspendidos, por filtración de la muestra acuosa a través de una membrana de poro muy fino. En el caso presente se utilizaron membranas de Nylon 66 con poro de 0.45 µm.

El aislamiento y recuperación de fármacos que se encuentran a niveles traza en matrices acuosas es un verdadero reto por la generalmente alta polaridad e hidrofobicidad de estos compuestos. Dada la naturaleza de la matriz, las alternativas de aislamiento lógicas son la extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos o la extracción en fase sólida con adsorbentes de fase reversa. Sin embargo, en ambos casos, los analitos polares como las sulfas son más difícilmente extraídos de la matriz acuosa que muchas sustancias interferentes de baja polaridad (aceites, grasas, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, ftalatos, etc.).

Es por esto que, como segundo paso, se decidió llevar a cabo una extracción líquido-líquido, pero no para extraer a los analitos sino a los interferentes poco polares. Este paso requería un diseño cuidadoso para asegurar que los compuestos de interés permanecieran cuantitativamente en la fase acuosa. Por ensayos preliminares, se optó por elegir al hexano como disolvente orgánico, llevar a cabo un solo paso de extracción y utilizar una relación muestra-hexano 10:1 (v/v). Aunque se ensayaron otros disolventes menos apolares, éstos fueron descartados porque había pérdida de analitos (probablemente por extracción de una pequeña fracción de ellos), o bien, porque su mayor miscibilidad en la fase acuosa afectaba los siguientes pasos del método. Los primeros ensayos se llevaron a cabo con fases acuosas ligeramente alcalinas, condición en la cual las sulfas se encuentran en su forma aniónica.

Una vez seleccionado el disolvente orgánico, se decidió explorar otras condiciones de pH en la fase acuosa. Se prepararon muestras sintéticas de agua grado reactivo ajustando su pH a 3.5 o a 9.8 y se doparon con las 7 sulfas a $\sim 2.1 \mu\text{g/mL}$. Después de llevar a cabo la extracción con hexano, se separó la fase acuosa y se inyectó directamente en el cromatógrafo. En la **Tabla V.4** se muestran las áreas de los picos obtenidos en estos ensayos.

Tabla V.4. Comparación de áreas de pico obtenidas en el análisis de disoluciones acuosas de las siete sulfas ($\sim 2.1 \mu\text{g/mL}$) después de una extracción con hexano, $n=3$.

Sulfas	AREA DE PICO [mVolt]	
	pH ~ 3.5	pH \geq 9
SDZ	3.3 \pm 0.1	3.3 \pm 0.2
STZ	3.0 \pm 0.3	3.0 \pm 0.1
SMR	3.3 \pm 0.2	3.2 \pm 0.2
SMT	3.1 \pm 0.1	3.0 \pm 0.2
SMX	3.5 \pm 0.4	3.6 \pm 0.3
SFX	3.3 \pm 0.1	3.3 \pm 0.1
SDX	3.0 \pm 0.3	3.0 \pm 0.1

Los resultados de la **Tabla V.4** muestran que, en el caso de estas sulfas, no hay efecto significativo del pH de la muestra sobre el reparto de los compuestos entre la fase acuosa y el hexano. Aparentemente, aún bajo su forma neutra, las sulfas son muy insolubles en hexano y por ello permanecen en la fase acuosa. Como la condición óptima para la retención de las sulfas en los adsorbentes de fase reversa es cuando éstas se encuentran en su forma neutra, se decidió elegir el pH de 3.5 para el proceso de purificación de la muestra por extracción líquido-líquido. Esto permite continuar con el siguiente paso del método (la EFS) sin necesidad de reajustar el pH de la muestra.

Por otra parte, para acelerar la separación de fases durante la extracción líquido-líquido y disminuir, aún más, la solubilidad del hexano en la fase acuosa, se tomó la decisión de adicionar a la muestra una sal inorgánica, eligiendo al sulfato de sodio. La concentración de Na_2SO_4 con la cual se obtuvo una separación rápida y eficaz entre la solución acuosa y el hexano fue de 0.1 F. Se verificó que esta modificación no ocasionara pérdida de analitos promoviendo su paso al hexano. Los resultados de los ensayos realizados mostraron que, aún en presencia de esta alta concentración de sal, las sulfas permanecían cuantitativamente en la fase acuosa.

V.1.2.2. EFS- en línea

La extracción en fase sólida fue realizada con la ayuda de bombas isocráticas auxiliares y precolumnas empacadas en el laboratorio con una fase reversa polimérica de tipo estireno-divinilbenceno (fase PLRP-S). Esta fase fue elegida por su mayor poder de retención de las sulfas en comparación con las fases C18, lo cual proviene de su mayor área hidrocarbonada (mayor hidrofobicidad) y de la presencia de anillos aromáticos que establecen interacciones π - π con los grupos aromáticos de los analitos.

Antes de iniciar la carga de la muestra, el adsorbente fue tratado con 5 mL de acetonitrilo para activarlo y asegurar la eliminación de cualquier impureza remanente, luego se lavó con 10 mL de agua para desalojar completamente al acetonitrilo del volumen intersticial de la precolumna y finalmente se acondicionó con 5 mL de un buffer

acuoso de pH idéntico al de la solución de carga. Estas operaciones fueron realizadas a flujo de 1 mL/min.

V.1.2.2.1. Estudio del pH óptimo para la carga de la muestra en la precolumna.

Para la determinación del pH óptimo de retención de las sulfas en la fase polimérica PLRP-S, se trabajó con las cuatro sulfas más hidrofílicas (sulfadiazina, sulfatiazol, sulfamerazina y sulfametazina). La precolumna se acondicionó y se cargó con muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con los analitos a ~1.25 ng/mL y ajustadas a distintos valores de pH. El volumen de carga fue de 25 mL, por lo que la cantidad cargada de cada sulfa fue de ~31 ng. Después de la carga, la precolumna se acopló en línea con la columna analítica y se realizó la elución y separación de las sulfas en modo gradiente.

El recobro de cada compuesto, definido como la relación porcentual entre la cantidad determinada y la cantidad adicionada, se calculó aplicando las **ecuaciones IV.1-IV.3**. En la **Tabla V.5** se reportan los recobros obtenidos para los diferentes valores de pH de la solución de carga.

Tabla V.5. Efecto del pH de carga en el recobro de las sulfas, n=2.

pH \ Sulfas	Recobros promedio de las sulfas (%)			
	Sulfadiazina	Sulfatiazol	Sulfamerazina	Sulfametazina
~ 2.0	24.9	23.4	66.4	99.5
~ 3.0	86.7	95.5	94.2	91.1
~ 3.5	93.9	101.0	101.1	95.8
~ 4.0	92.9	93.4	96.2	92.4
~ 4.5	70.2	98.2	80.1	86.5
~ 7.0	35.5	54.1	91.4	94.8

Como se puede observar en la tabla anterior, el mejor porcentaje de recobro de las cuatro sulfas se obtuvo para a un pH de 3.5 en la solución de carga, el cual de hecho

coincide con el pH de la fase móvil. Por lo tanto, se estableció este valor de pH para el acondicionamiento y carga de la precolumna en todos los siguientes ensayos.

V.1.2.2.2. Volumen de carga.

Con la finalidad de aumentar la sensibilidad del método, se investigó el volumen de muestra que podía ser cargado en la precolumna sin que se produjera una fuga excesiva de los analitos durante esta etapa. El estudio se realizó cargando la precolumna acondicionada con volúmenes crecientes de muestras sintéticas de agua grado reactivo, ajustadas a pH 3.5 y dopadas con una cantidad fija de las cuatro sulfas (~31 ng de cada una). Lo anterior significa que la concentración de las sulfas en las muestras cargadas fue menor a medida que se aumentó el volumen de carga, pero la cantidad cargada fue la misma en todos los ensayos. En la **Tabla V.6** se muestran los porcentajes de recuperación determinados para cada analito en los experimentos realizados.

Tabla V.6. Influencia del volumen de carga sobre la recuperación de los solutos, n=2.

Sulfas V. C.*(mL)	Recobros promedio de las sulfas (%)			
	Sulfadiazina	Sulfatiazol	Sulfamerazina	Sulfametazina
25	93.9	101.0	101.1	95.8
40	73.1	80.7	89.0	94.3
50	64.4	67.9	86.7	92.4
75	51.1	52.5	82.3	91.5

* **V.C.** volumen de carga

En los resultados anteriores se observa que el porcentaje de recobro de las dos primeras sulfas (sulfadiazina y sulfatiazol) disminuye notablemente al aumentar el volumen de carga de 25 a 40 mL. Esto significa que su volumen de fuga de la precolumna es bastante menor que 40 mL y probablemente cercano a 25 mL. En el caso de la sulfamerazina, también hay disminución de recobro al pasar de 25 a 40 mL de muestra cargada, pero en menor grado; esto hace suponer que su volumen de fuga

es más cercano a los 40 mL. Por su parte, el recobro de la sulfametazina permanece prácticamente constante hasta los 75 mL, indicando que su fuga comienza a volúmenes más grandes. Este comportamiento es acorde con el orden que siguen sus tiempos de retención en la columna C18 (**Tablas V.2 y V.3**), corroborando que la retención de estos compuestos en los dos adsorbentes de fase reversa está determinada por el grado de hidrofobicidad de su molécula.

Con base en los resultados anteriores, se decidió establecer como volumen de carga 40 mL. En esta condición la pérdida de las tres primeras sulfas no es excesiva y se gana mucho en cuanto a la sensibilidad del método analítico, con respecto a limitar el volumen de carga a, por ejemplo, 25 mL.

V.1.2.2.3. Velocidad de flujo durante la carga

Debido a que los porcentajes de recobro anteriores fueron obtenidos en ensayos realizados a un flujo de 1 mL/min, se decidió llevar a cabo una exploración del efecto de la velocidad de flujo sobre el recobro de las sulfas, manteniendo constante el volumen de carga a 40 mL y el pH de la muestra en 3.5. En la **Tabla V.7** se muestran los porcentajes de recobro obtenidos al cargar muestras dopadas con las 4 sulfas a 3 ng/mL.

Tabla V.7. Estudio de recuperación de las sulfas en función de la velocidad de flujo, n=2.

Sulfas V. F.*(mL/min)	Recobros promedio de las sulfas (%)			
	Sulfadiazina	Sulfataizol	Sulfamerazina	Sulfametazina
0.5	78.8	78.9	97.2	96.8
0.8	76.1	81.8	95.1	94.3
1	73.1	80.7	89.0	94.3

* V.F. Velocidad de flujo durante la carga.

De acuerdo con los resultados de la **Tabla V.7**, el efecto del flujo no es muy significativo, aunque parece haber una ligera tendencia a aumentar el porcentaje de recobro de los analitos a medida que el flujo disminuye, particularmente para las sulfas más retenidas (sulfamerazina y sulfametazina). Este efecto es atribuido a un menor ensanchamiento del frente de migración de los solutos en la precolumna a medida que la velocidad de flujo disminuye, como lo predice la teoría cromatográfica. Dado que la diferencia entre los porcentajes de recobro a 0.5 y 0.8 mL/min es muy pequeña, se decidió escoger el flujo más alto (0.8 mL/min) con el fin de disminuir el tiempo requerido para la preparación de muestra.

V.1.2.2.4. Lavado de la precolumna una vez preconcentrados los analitos.

Considerando que en las condiciones seleccionadas anteriormente hay una pérdida de las primeras sulfas por fuga de la precolumna durante la carga, se decidió hacer un lavado mínimo de ésta, con sólo 2 mL de buffer formiato (0.02 M, pH 3.5) a flujo de 0.5 mL/min. Este lavado sólo permite desalojar o eliminar compuestos muy hidrofílicos, como las sales inorgánicas que contenga la muestra (p. ej. el Na_2SO_4 añadido durante la etapa de pre-tratamiento).

Las condiciones finales del proceso completo de EFS de la muestra en la precolumna PLRP-S se describieron en la **Tabla IV.3** (sección experimental).

V.2. Evaluación del método

Una vez definidas todas las condiciones del método analítico, desde el paso inicial de pre-tratamiento de la muestra hasta la separación y análisis cromatográfico de las sulfas, se procedió a su evaluación estadística. Los experimentos de esta sección fueron realizados con muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con las siete sulfas a concentraciones ≤ 10 ppb y adicionadas con los reactivos establecidos en el método desarrollado.

V.2.1 Estabilidad de las sulfas

La estabilidad de las sulfas en los estándares utilizados para fortificar las muestras y para la cuantificación de los analitos por estandarización externa, se comprobó analizando un estándar de ~6 µg/mL de cada sulfas por inyección directa durante varios días. Esta disolución se preparó a partir de las soluciones patrón individuales (**Tabla IV.1**) y aforando al volumen requerido con agua grado reactivo; por lo tanto, su contenido de metanol era < 5% (v/v). Durante el periodo de prueba (10 días) el estándar fue almacenado en refrigeración (4°C) cuando no estaba en uso. La **Figura V.5** muestra las áreas de pico determinadas para cada sulfas durante la prueba.

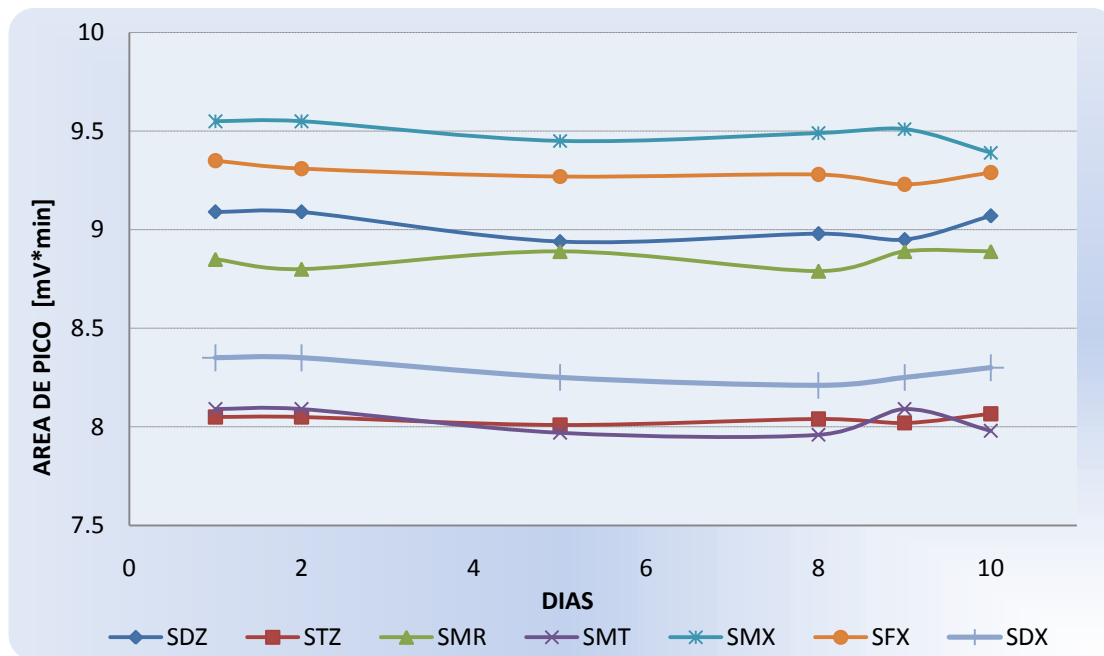


Figura V.5. Estabilidad de las sulfas en disolución acuosa.

Como se puede observar en la **Figura V.5**, el área de pico de todas las sulfas se mantuvo prácticamente constante en el periodo estudiado, por lo que se concluye que los analitos son estables al menos durante 10 días en disoluciones acuosas que contengan un pequeño porcentaje de metanol. Además, esto muestra que los estándares preparados pueden ser utilizados con confianza durante este tiempo.

V.2.2. Linealidad del sistema CLAR-UV.

En la **Tabla V.8** se reportan las ecuaciones de las rectas de regresión *Área Vs Concentración* y los coeficientes de determinación (r^2) obtenidos en el análisis por triplicado (inyección directa) de mezclas estándar de las 7 sulfas a 5 niveles de concentración en el intervalo de 1–14 $\mu\text{g/mL}$. Las correspondientes gráficas se muestran en la **Figura V.6**.

Tabla V.8. Linealidad del sistema CLAR-UV*.

Sulfas	Ordenada al origen (b)	Pendiente de la recta (m)	Coefficiente de correlación (r^2)
Sulfadiazina (SDZ)	0.15 ± 1.14	1.48 ± 0.14	0.9974
Sulfatiazol (STZ)	0.15 ± 1.01	1.33 ± 0.12	0.9974
Sulfamerazina (SMR)	$- 0.13 \pm 0.50$	1.55 ± 0.06	0.9995
Sulfametazina (SMT)	$- 0.09 \pm 0.43$	1.37 ± 0.05	0.9996
Sulfametoxazol (SMX)	$- 0.09 \pm 0.92$	1.62 ± 0.11	0.9986
Sulfioxazol (SFX)	$- 0.09 \pm 0.58$	1.54 ± 0.07	0.9994
Sulfadimetozina (SDX)	$- 0.02 \pm 0.89$	1.41 ± 0.11	0.9982

* 5 niveles de concentración en el intervalo 1-14 ppm, con 3 réplicas por cada nivel

El valor de los coeficientes de determinación, $r^2 > 0.997$, indica que existe una relación lineal entre áreas de pico y concentración de las sulfas en las disoluciones analizadas, por lo cual se deduce que la respuesta del detector es lineal en el intervalo estudiado.

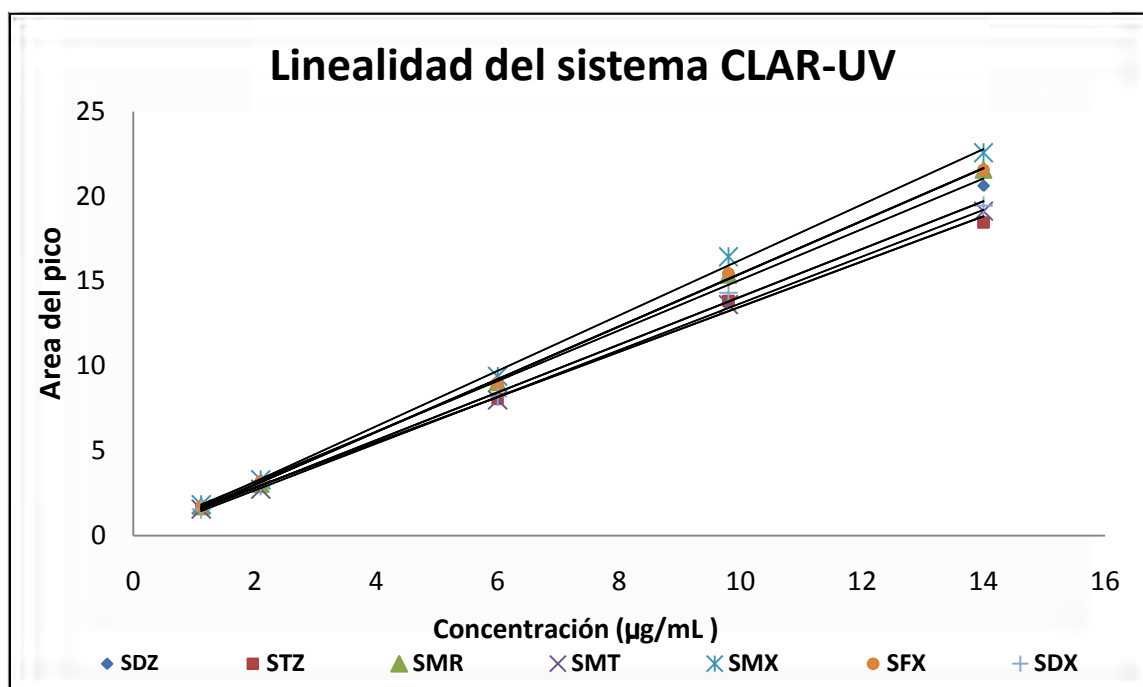


Figura V.6. Linealidad del sistema CLAR-UV para cada sulfato

V.2.3. Linealidad del método.

La linealidad del método fue determinada mediante el análisis de muestras sintéticas de agua grado reactivo fortificadas con las sulfas a siete niveles de concentración en el intervalo de 0.5–10 ng/mL (ppb). Para cada nivel, se prepararon y analizaron tres réplicas independientes. Todas las muestras fueron preparadas según el procedimiento optimizado (especificado en la parte experimental, secciones IV.5 y IV.6) y, posteriormente, fueron eluidas en línea de la precolumna a la columna analítica para su separación, detección y cuantificación.

Los resultados promedio de las determinaciones experimentales para cada nivel de concentración se presentan en las tablas y figuras del Anexo 2, como una relación entre *Cantidad Adicionada* y *Cantidad Recuperada*. En todos estos ensayos, el volumen de muestra analizada fue de 40 mL y el volumen de estándar inyectado como referencia para la cuantificación fue de 26 µL. Los estándares se inyectaron antes y después del

análisis de cada muestra para tomar en cuenta cualquier variabilidad en la respuesta del detector UV.

En la **Tabla V.9** se resumen los resultados del estudio de linealidad, expresados por las ecuaciones de regresión lineal de los datos de *Cantidad Recuperada Vs Cantidad Adicionada* y sus correspondientes coeficientes de determinación (r^2). De acuerdo con los valores de estos últimos, se puede decir que el método es lineal para todas las sulfas en el intervalo de concentraciones de 0.5-10 ng/mL en la muestra acuosa.

Tabla V.9. Coeficientes de determinación y ecuaciones de las rectas de regresión obtenidas en el estudio de linealidad del método.

SULFA	Coeficiente de determinación (r^2)	Ecuación $y = m x + b$
Sulfadiazina SDZ	0.9978	$y = 0.732 x + 3.06$
Sulfatiazol STZ	0.9987	$y = 0.786 x + 3.56$
Sulfamerazina SMR	0.9998	$y = 0.951 x - 0.346$
Sulfametazina SMT	0.9997	$y = 0.943 x - 0.502$
Sulfametoxazol SMX	0.9997	$y = 0.916 x + 0.055$
Sulfisoxazol SFZ	0.9999	$y = 0.925 x + 0.414$
Sulfadimetoxina SDX	0.9996	$y = 0.908 x + 1.46$

Las ecuaciones de las rectas de regresión aportan información valiosa sobre las características del método en el intervalo estudiado. Si la ordenada al origen es estadísticamente igual a cero significa que el método no presenta errores sistemáticos. Por otra parte, la pendiente multiplicada por 100 representa el porcentaje de recobro promedio del analito en el intervalo de concentraciones estudiado. En este caso, los recobros se ubicaron entre 73.3% y 95.1%.

Las ecuaciones mostradas en la **Tabla V.9** son de la forma general:

$$y = m x + b$$

Donde “**m**” es el estimador de la pendiente y “**b**” el estimador de la ordenada al origen.

Las pruebas de hipótesis realizadas sobre estos estimadores fueron:

a) Ordenada al origen

Hipótesis nula **H₀: b = 0**

Hipótesis alterna **H₁: b ≠ 0**

Para evaluar estas hipótesis se aplicaron los tratamientos estadísticos convencionales a los estimadores de la ordenada al origen de las ecuaciones de regresión lineal para cada sulfa, empleando un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (**Anexo 1**). En la **Tabla V.10** se muestran los resultados obtenidos. Estos resultados indican que las ordenadas al origen son estadísticamente iguales a cero para todas las sulfas, por lo que el método no presenta errores sistemáticos en la determinación de ninguna de ellas.

Tabla V.10. Resultados de la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen de la recta de regresión; nivel de confianza $\alpha = 0.05$, $n = 7$.

Sulfa	t (calculada)	t (tablas)	Decisión
Sulfadiazina (SDZ)	0.85	2.57	Aceptar H ₀
Sulfatiazol (STZ)	0.97	2.57	Aceptar H ₀
Sulfamerazina (SMR)	-0.27	2.57	Aceptar H ₀
Sulfametazina (SMT)	-0.36	2.57	Aceptar H ₀
Sulfametoxazol (SMX)	0.04	2.57	Aceptar H ₀
Sulfisoxazol (SFZ)	0.59	2.57	Aceptar H ₀
Sulfadimetoxina (SDX)	0.86	2.57	Aceptar H ₀

b) Tratamiento estadístico para la pendiente

Hipótesis nula **H₀: m = 1**

Hipótesis alterna **H₁: m ≠ 1**

De forma similar al caso anterior, se aplicaron los tratamientos estadísticos convencionales a los estimadores de la pendiente de las ecuaciones de regresión lineal para cada sulfa, con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. La **Tabla V.11** muestra los resultados obtenidos. En este caso se rechazó la hipótesis nula para todas las sulfas, por lo que el recobro no es estadísticamente igual al 100% para ninguna de ellas. No obstante, como lo muestran las ecuaciones de regresión (**Tabla V.9**), los recobros promedio de 5 sulfas son superiores a 90%, lo que puede considerarse bastante satisfactorio en el análisis de trazas. Sólo las dos sulfas más hidrofílicas tienen recobros promedio menores, entre 70 y 80%, pero aún así estos valores son aceptables. Eventualmente, para la aplicación del método en muestras reales podría aplicarse un factor correctivo por recobro en la determinación de estas dos sulfas, siempre y cuando se demuestre que el método es preciso.

Tabla V.11. Resultados de la prueba de hipótesis sobre la pendiente de la recta de regresión; nivel de confianza $\alpha = 0.05$, $n = 7$.

Sulfa	t (calculada)	t (tablas)	Decisión
Sulfadiazina (SDZ)	-15.46	2.57	Rechazar H_0
Sulfatiazol (STZ)	-12.18	2.57	Rechazar H_0
Sulfamerazina (SMR)	-7.88	2.57	Rechazar H_0
Sulfametazina (SMT)	-8.63	2.57	Rechazar H_0
Sulfametoxazol (SMX)	-11.43	2.57	Rechazar H_0
Sulfisoxazol (SFZ)	-22.07	2.57	Rechazar H_0
Sulfadimetoxina (SDX)	-11.29	2.57	Rechazar H_0

En la **Tabla V.12** se reportan los intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada al origen de las rectas de regresión. Estos intervalos fueron calculados tomando en cuenta los 21 datos experimentales obtenidos para cada analito (7 niveles de concentración con 3 réplicas por nivel). Como puede observarse, la variabilidad de la pendiente, que representa la fracción de analito recuperada, es pequeña, lo que da una

indicación de la buena precisión del método en el intervalo de concentraciones estudiado.

Tabla V.12. Intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada al origen de las rectas de regresión (*Cantidad Recuperada Vs Cantidad Adicionada*), calculados con base en una distribución t con $\alpha = 0.05$ y 19 grados de libertad.

SULFA	Pendiente de la recta (m) (fracción recuperada)	Ordenada al origen (b)
Sulfadiazina	0.733 ± 0.045	3.1 ± 4.4
Sulfatiazol	0.786 ± 0.022	3.6 ± 4.6
Sulfamerazina	0.951 ± 0.012	- 0.3 ± 2.4
Sulfametazina	0.943 ± 0.013	- 0.5 ± 2.8
Sulfametoxazol	0.916 ± 0.019	0.1 ± 3.9
Sulfisoxazol	0.925 ± 0.008	0.4 ± 1.8
Sulfadimetoxina	0.908 ± 0.013	1.5 ± 2.8

V.2.4. Precisión y recobro promedio en análisis replicados.

La precisión del método está relacionada con la dispersión que tienen las medidas alrededor del valor promedio y está expresada mediante la desviación estándar (D.E) y el coeficiente de variación (%CV). Estos parámetros permiten evaluar la incertidumbre de los resultados debida a errores aleatorios que se manifiestan en la dispersión de los datos alrededor de la media (**Apéndice 1**).

Para hacer un estudio más detallado de la precisión del método medida como repetibilidad, se analizaron nueve muestras independientes dopadas con la mezcla de las siete sulfas a 3 ng/mL. En la **Figura V.7** se presenta, como ilustración, uno de los cromatogramas obtenidos en estos ensayos.

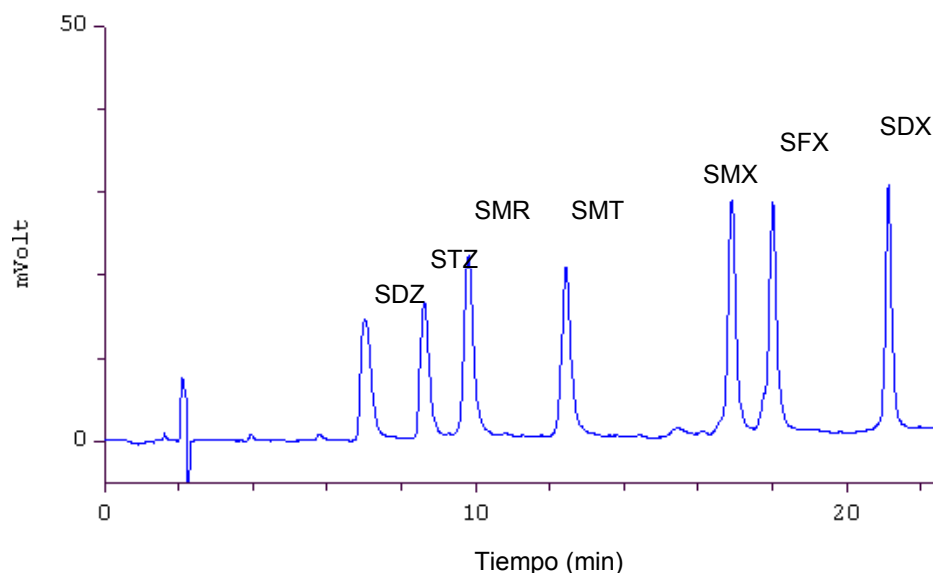


Figura V.7. Cromatograma obtenido del análisis de una muestra sintética de agua grado reactivo dopada con las sulfas a ~ 3 ng/mL. Condiciones cromatográficas como en la **Fig. V.4**. Solutos: sulfadiazina (SDZ), sulfatiazol (STZ), sulfamerazina (SMR), sulfametazina (SMT), sulfametoxazol (SMX), sulfisoxazol (SFX) y sulfadimetoxina (SDM).

La concentración de los analitos determinada en cada réplica se reporta en la **Tabla V.13**. En esta tabla se incluyen también los resultados del análisis estadístico de los datos. Los intervalos de confianza para la concentración promedio determinada y para el % de recobro fueron calculados con un nivel de significancia del 5%.

Como se puede observar en esta tabla, los coeficientes de variación obtenidos fueron inferiores al 3%, corroborando la buena precisión del método para la determinación de sulfas en matrices acuosas a niveles de concentración del orden de las partes por billón. Cabe destacar que las 9 réplicas fueron analizadas en diferentes días y que los resultados reportados en la tabla están presentados en orden cronológico, según fueron realizadas las determinaciones. Se puede notar que no existe ninguna tendencia en los valores de concentración obtenidos, lo que indica que el método no presenta problemas de contaminación cruzada.

Tabla V.13. Estudio de precisión (repetibilidad) del método. Análisis de muestras de agua grado reactivo dopadas a ~3 ng/mL de cada sulfa; n = 9, $\alpha = 0.05$, $t_{\alpha, n-1} = 2.31$.

Muestras (réplicas)	Concentración determinada (ng/mL)						
	SDZ	STZ	SMR	SMT	SMX	SFX	SDX
1	2.366	2.493	2.828	2.784	2.715	2.780	2.758
2	2.338	2.497	2.895	2.788	2.826	2.763	2.740
3	2.278	2.365	2.795	2.868	2.816	2.751	2.703
4	2.329	2.408	2.847	2.770	2.715	2.829	2.755
5	2.342	2.448	2.891	2.834	2.715	2.761	2.741
6	2.331	2.464	2.781	2.865	2.725	2.756	2.686
7	2.346	2.457	2.844	2.736	2.836	2.813	2.829
8	2.207	2.455	2.836	2.779	2.826	2.887	2.834
9	2.202	2.506	2.967	2.768	2.816	2.748	2.813
Media	2.304	2.455	2.854	2.799	2.776	2.788	2.762
Incertid. \pm	0.047	0.034	0.044	0.035	0.043	0.036	0.041
D.E.	0.061	0.044	0.057	0.046	0.057	0.047	0.053
C.V. (%)	2.661	1.792	1.989	1.641	2.036	1.679	1.923
R (%)	76.115	81.828	95.123	93.303	91.704	92.075	92.076
Incertid. \pm	1.557	1.153	1.454	1.177	1.435	1.188	1.361

D.E.: desviación estándar (ng/mL), **C.V.:** coeficiente de variación, **R:** Recuperación.

A modo de comparación, en la **Tabla V.14** se presenta el recobro promedio obtenido en el estudio de repetibilidad y el recobro promedio obtenido a partir de la pendiente de las rectas de regresión en el estudio de linealidad, ambos con sus respectivos intervalos de confianza. Se puede constatar que los resultados de los dos estudios son estadísticamente equivalentes, lo que avala la confiabilidad del método desarrollado.

Cabe mencionar que, para el caso del análisis de contaminantes en muestras ambientales, la NPS (National Pesticide Survey) y la EPA (Environmental Protection Agency; agencia de protección ambiental de los Estados Unidos) establecen como valores aceptables para muestras fortificadas a niveles de concentración del orden de las ppb (ng/mL), una recuperación de los analitos entre 70 y 130 % [Lacorte, 1995,

USEPA, 1984]. Los resultados de la **Tabla V.14** muestran que la recuperación del método desarrollado en este trabajo se sitúa dentro de dicho intervalo, por lo que cumple con los criterios establecidos. Además, es importante resaltar que el coeficiente de variación para una concentración de tan solo 3 ppb es inferior al 3%, lo que puede considerarse excelente.

Tabla V.14. Comparación del Recobro obtenido en dos diferentes estudios

SULFA	% Recobro promedio estudio de linealidad (0.5 – 10 ng/mL)	% Recobro promedio estudio de repetibilidad (3 ng/mL)
Sulfadiazina	73.2 ± 4.5	76.1 ± 1.6
Sulfatiazol	78.6 ± 2.2	81.8 ± 1.2
Sulfamerazina	95.1 ± 1.2	95.1 ± 1.5
Sulfametazina	94.3 ± 1.3	93.3 ± 1.2
Sulfametoxazol	91.6 ± 1.9	91.7 ± 1.4
Sulfisoxazol	92.5 ± 0.8	92.1 ± 1.2
Sulfadimetoxina	90.8 ± 1.3	92.1 ± 1.4

V.2.5. Límites de detección del método.

El límite de detección se puede definir como la menor cantidad de analito que puede detectarse, más no cuantificarse con la precisión y exactitud requeridas. En este trabajo se utilizó el criterio recomendado por la EPA para determinar el límite de detección del método (LDM) desarrollado (ecuación **E-IV.4**).

Para la estimación del LDM de las sulfas se utilizó la desviación estándar obtenida en el estudio de repetibilidad del método (**Tabla V.13**). Los valores de LDM calculados se muestran en la **Tabla V.15**.

Tabla V.15. Límites de detección del método (LDM), estimados a partir de la desviación estándar (D.E.) obtenida en el análisis de una muestra fortificada; n=9.

SULFAS	$t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)}$	D.E. (ng/mL)	LDM (ng/mL)
SDZ	3.35	0.061	0.21
STZ		0.044	0.15
SMR		0.057	0.19
SMT		0.046	0.15
SMX		0.056	0.19
SFX		0.046	0.16
SDX		0.053	0.18

Como muestra la **Tabla V.15**, los límites de detección del método para las siete sulfas estuvieron comprendidos en el intervalo de 0.15-0.20 ng/mL. Aunque estos resultados fueron obtenidos con muestras acuosas que prácticamente no presentan interferencias (agua grado reactivo fortificada), se considera que la posibilidad de detectar todas las sulfas a niveles de concentración aproximadamente cinco veces menores a la ppb es un gran logro, dada la alta hidrofiliidad de algunas de ellas. Además, se debe tomar en cuenta que para el método propuesto sólo se utilizó instrumentación convencional (CLAR-UV y bombas isocráticas), con la que cuentan la gran mayoría de los laboratorios dedicados a la determinación de contaminantes ambientales. El cromatograma de la **Figura V.8** demuestra que efectivamente es posible detectar con facilidad las sulfas en estudio a estos niveles de concentración.

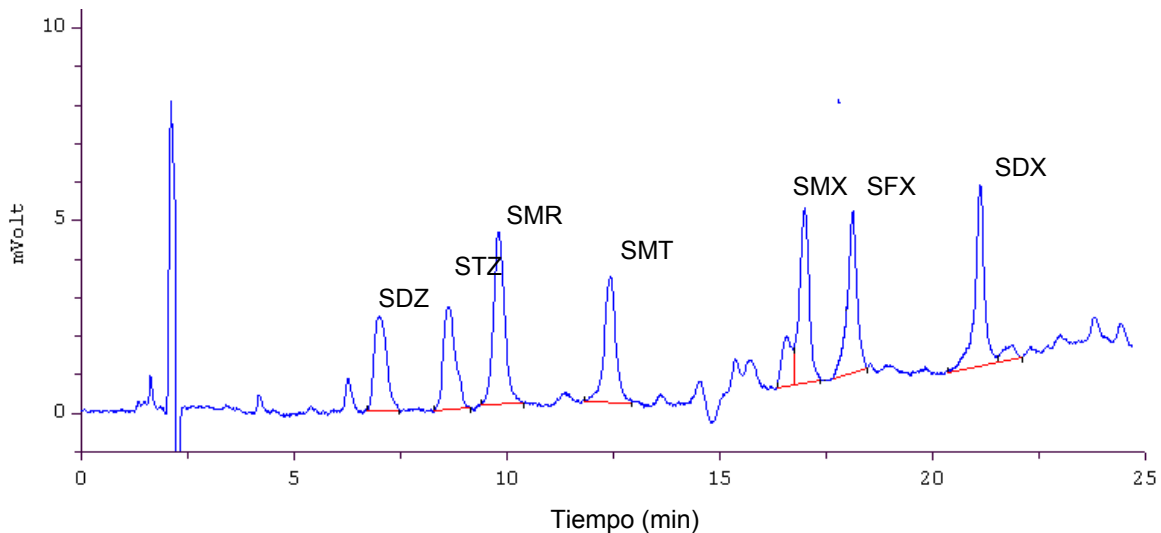


Figura V.8. Cromatograma obtenido del análisis de una muestra sintética de agua grado reactivo dopada con las siete sulfas a ~ 0.22 ppb; nivel cercano al LDM estimado. Condiciones cromatográficas como en la **Fig. V.4**. Solutos: sulfadiazina (SDZ), sulfatiazol (STZ), sulfamerazina (SMR), sulfametazina (SMT), sulfametoxazol (SMX), sulfisoxazol (SFX) y sulfadimetoxina (SDM).

En la figura anterior se observa que, además de los picos de las siete sulfas, hay algunas otras señales pequeñas que probablemente provienen de impurezas contenidas en alguno(s) de los reactivos utilizados. Estas impurezas, no eliminadas durante el pre-tratamiento de la muestra, se preconcentraron al igual que los analitos en el paso de EFS y fueron transferidas a la columna analítica. A pesar de ello los picos de las impurezas fueron suficientemente pequeños y no interfirieron en la detección de las sulfas.

V.2.6. Límites de cuantificación.

El término límite de cuantificación corresponde a la menor concentración del analito que puede ser determinada con una precisión y exactitud establecidas. En este trabajo se decidió considerar como límite de cuantificación del método (LCM) la concentración equivalente a 10 veces la desviación estándar obtenida en el estudio de repetibilidad. Por otra parte, la IUPAC recomienda tomar como límite de cuantificación el valor obtenido al multiplicar el límite de detección por 3.104 (Currie, 1995). En la **Tabla V.16**

se muestran los límites de cuantificación del método calculados según los dos criterios mencionados, utilizando los resultados reportados en la sección anterior (**Tabla V.15**). Como se observa, los valores obtenidos son bastante semejantes por lo que puede considerarse que los dos criterios son más o menos equivalentes. De acuerdo con estos resultados, las siete sulfas pueden ser cuantificadas confiablemente a niveles de concentración alrededor de las 500 partes por trillón.

Tabla V.16. Límites de cuantificación del método (LCM), evaluados por dos diferentes criterios

	SDZ	STZ	SMR	SMT	SMX	SFX	SDX
LCM (ng/mL) IUPAC*	0.63	0.46	0.59	0.48	0.58	0.48	0.55
LCM (ng/mL) S×10**	0.61	0.44	0.57	0.46	0.56	0.46	0.53

* LCM calculados según recomendación de la IUPAC: $LDM \times 3.104$.

** LCM calculados como: $10 \times$ desviación estándar (del estudio de repetitividad).

En resumen, se puede decir que el método desarrollado cumple con los criterios de calidad estipulados por organismos internacionales para el análisis de contaminantes en matrices acuosas. Estos criterios han sido establecidos para sustancias de toxicidad comprobada (pesticidas, hidrocarburos poliaromáticos, bencidinas, etc.), generalmente clasificadas como contaminantes prioritarios. Los criterios para contaminantes emergentes, como las sulfonamidas, aún no han sido definidos.

V.3. Aplicación del método analítico en muestras reales de aguas superficiales.

Se analizaron 3 diferentes muestras de aguas superficiales, dos de ellas colectadas en sitios urbanos y una colectada en las inmediaciones de una población rural. A continuación se describen estos sitios.

Parque Nacional Fuentes Brotantes, ubicado en la delegación Tlalpan en el Distrito Federal. En este lugar se encuentra un riachuelo proveniente de un pequeño lago que

es alimentado por manantiales que brotan de las faldas de la sierra del Ajusco. El riachuelo pasa por algunas zonas en las cuales los habitantes de la localidad desechan sus aguas residuales hacia éste. Es por esta razón que se le consideró como un buen punto de muestreo.

Parque Ecológico Loreto y Peña Pobre, ubicado entre las avenidas Insurgentes Sur y San Fernando a un costado de plaza Cuicuilco en la delgación Tlalpan, en México, D.F. La muestra fue colectada de una fuente alimentada por aguas provenientes del Ajusco. En principio se esperaba un agua muy limpia, sin embargo, no se sabe si en algún punto de su trayectoria queda expuesta a fuentes de contaminación.

La tercera muestra fue recolectada en las inmediaciones del poblado de Chalma, municipio de Malinalco, Edo. De México, a 95 kilómetros de la Ciudad de México. Este lugar es muy famoso entre los creyentes, ya que una de las principales atracciones es un ahuehuete de aproximadamente 800 años de edad, debajo del cual brota un río de agua dulce; de acuerdo con la tradición, los que visitan por primera vez el santuario de El Señor de Chalma deben meterse en las aguas del manantial que nace en las raíces del gran ahuehuete. A las aguas de origen subterráneo que dan lugar al río, se suma posteriormente el vertido de aguas residuales de las casas y fincas adyacentes. Por tal motivo, se le consideró como un buen sitio de muestreo, con probabilidad de encontrar residuos de sulfas utilizadas por las personas o para el cuidado de los animales.

Antes de iniciar el pre-tratamiento de las muestras se midió su pH (**Tabla V.17**), el cual resultó ser ligeramente más alcalino que el del agua grado reactivo utilizada para preparar las muestras sintéticas con las que se desarrolló el método (pH ~ 6.8).

Tabla V.17. pH de las tres muestras colectadas en diferentes sitios.

Muestra	pH
Fuentes Brotantes	7.7
Peña Pobre	7.4
Chalma	8.1

El pH de las muestras se ajustó al valor establecido en el método (pH 3.5) por adición de buffer formiato (2 mL de buffer 1 M por cada 100 mL de muestra). En el caso del agua de Chalma, fue necesario adicionar 25 μ L más de ácido fórmico para disminuir su pH hasta 3.5. Una vez ajustado el pH, las muestras se procesaron y analizaron según lo descrito en la parte experimental.

En los tres casos se analizaron alícuotas (40 mL) de la muestra original (muestra blanco) y la misma muestra fortificada con las sulfas a concentración conocida.

V.3.1. Muestra de Fuentes Brotantes

En la **Figura V.9** se presenta un cromatograma de la muestra blanco, junto con el cromatograma de un estándar inyectado como referencia.

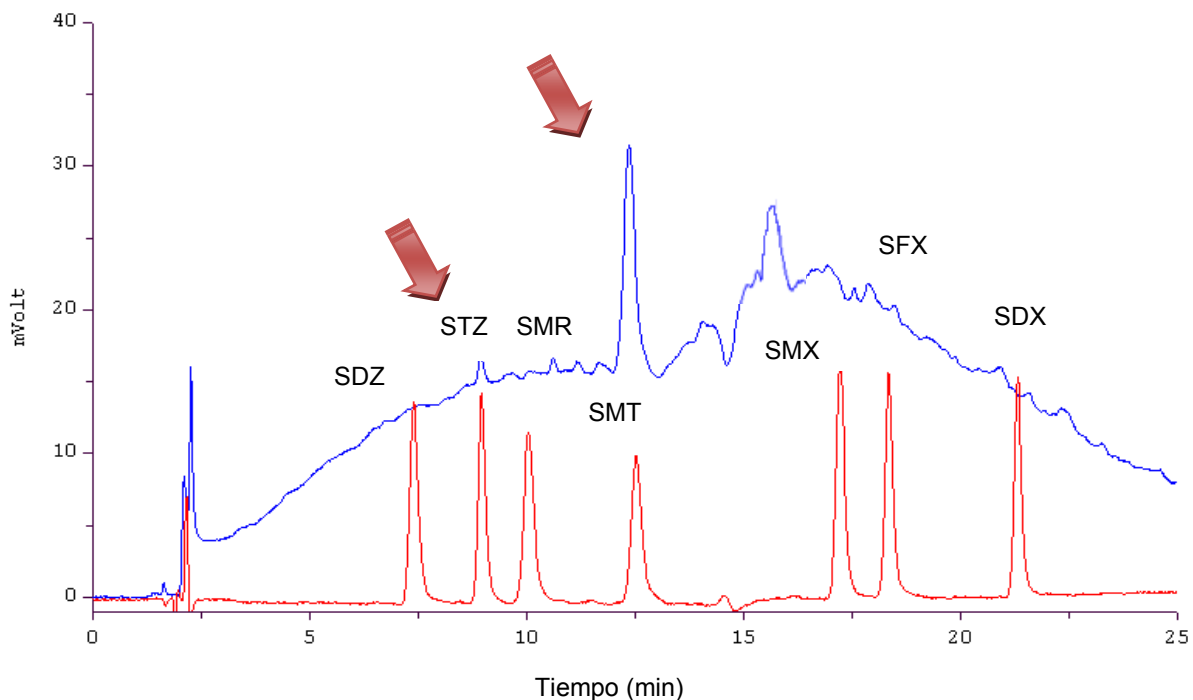


Figura V.9. **Azul:** Cromatograma obtenido del análisis de la muestra blanco de Fuentes Brotantes. **Rojo** Cromatograma de un estándar de sulfas ($\sim 2.1 \mu\text{g/mL}$). Detección a 270 nm en ambos casos. Otras condiciones cromatográficas como en la **Fig. V.4**. Solutos: sulfadiazina (SDZ), sulfatiazol (STZ), sulfamerazina (SMR), sulfametazina (SMT), sulfametoxazol (SMX), sulfisoxazol (SFX) y sulfadimetoxina (SDM).

Como se denota con flechas en la **Figura V.9**, el cromatograma de la muestra blanco presentó dos picos con tiempos de retención similares al del sulfatiazol (STZ) y la sulfametazina (SMT). Debido a que no se utilizó un espectrómetro de masas como detector, fue necesario buscar otras alternativas para poder corroborar o descartar la presencia de estas sulfas en la muestra.

La alternativa más fácil y práctica consiste en comparar el cociente del área de pico medida a dos longitudes de onda para un estándar puro y para la señal de interés observada en la muestra. Este método se basa en el principio de que el cociente de las absorbancias medidas a dos longitudes de onda distintas para un compuesto en una solución dada (en este caso la fase móvil), tiene un valor constante independientemente de la concentración del compuesto.

En las **Figuras V.10** y **V.11** se muestran los cromatogramas obtenidos a 254 nm y 270 nm para el estándar y la muestra blanco, respectivamente.

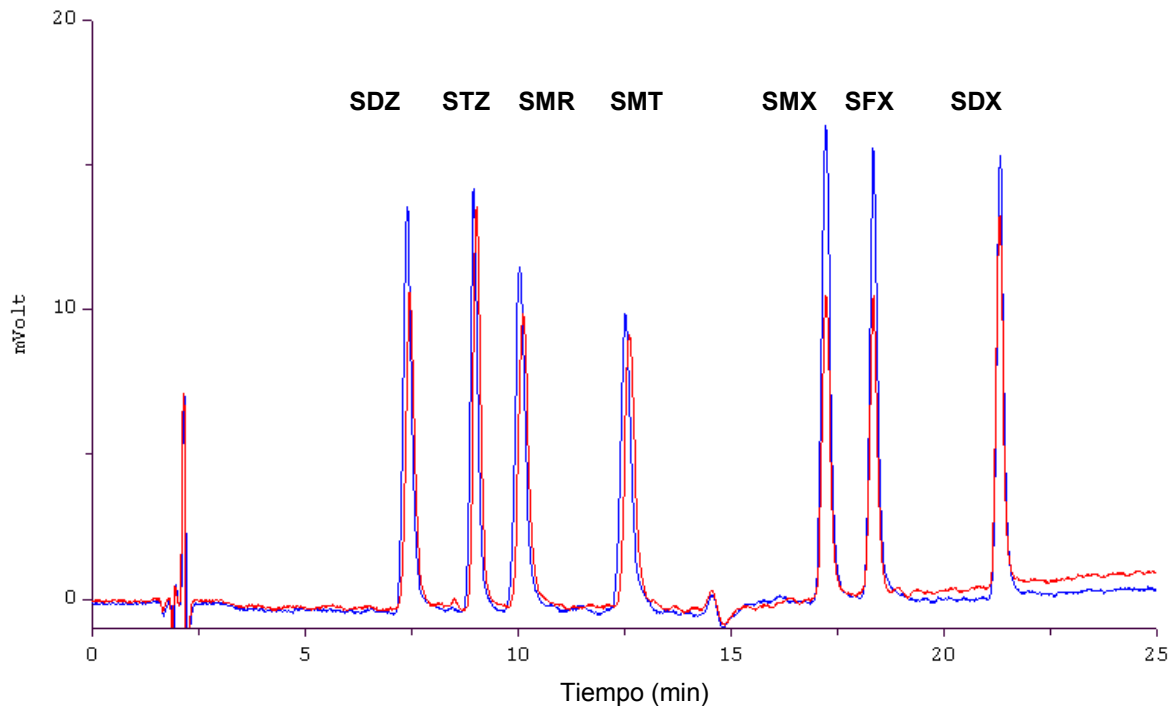


Figura V.10. Cromatograma de un estándar de sulfas ($\sim 2.1 \mu\text{g/mL}$) corrido a 254 nm (**rojo**) y a 270 nm (**azul**). Otras condiciones cromatográficas como en la **Fig. V.4**. Solutos: sulfadiazina (SDZ), sulfatiazol (STZ), sulfamerazina (SMR), sulfametazina (SMT), sulfametoxazol (SMX), sulfisoxazol (SFX) y sulfadimetoxina (SDM).

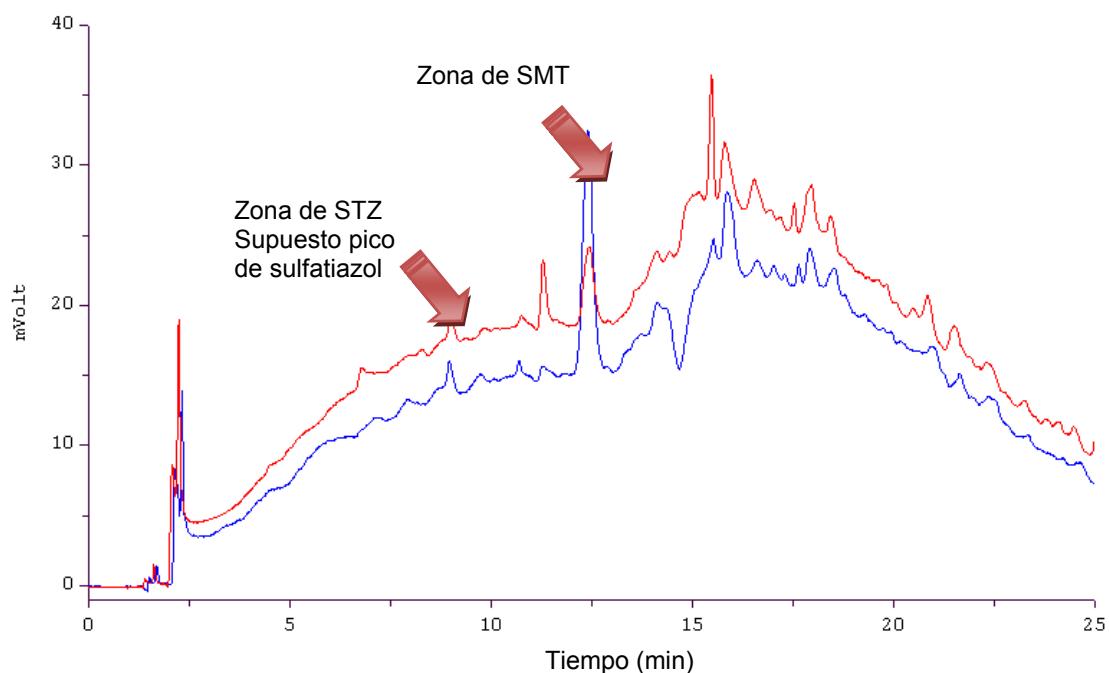


Figura V.11. Cromatograma de muestra blanco corrida a 254 nm (rojo) y 270 nm (azul), mostrando posibles picos de sulfatiazol y sulfametazina. Condiciones cromatográficas como en la Fig. V.4.

En la **Tabla V.18** se reportan las áreas de pico medidas a las dos longitudes de onda para sulfatiazol y sulfametazina en el estándar y para los picos que eluyen al mismo tiempo de retención en la muestra blanco. También se presentan los valores de los correspondientes cocientes de áreas para cada soluto.

Tabla V.18. Áreas de pico a dos longitudes de onda y su cociente para sulfatiazol (STZ) y sulfametazina (SMT) en el estándar y para los picos de igual tiempo de retención en la muestra blanco de Fuentes Brotantes (F.B.).

	Área de pico (mV*min) estándar		Área de pico (mV*min) muestra blanco F.B.		$Cociente = \frac{A_{270}}{A_{254}}$	
	$\lambda = 270\text{nm}$	$\lambda = 254\text{nm}$	$\lambda = 270\text{nm}$	$\lambda = 254\text{nm}$	Estándar	Muestra Blanco
STZ	1.612	1.702	0.297	0.263	0.947	1.129
SMT	1.694	1.827	4.958	1.564	0.927	3.170

Análisis cualitativo para sulfatiazol (STZ).

El cociente de áreas de pico para este analito en el estándar tuvo un valor cercano al cociente de áreas pico de la señal que eluye al mismo tiempo de retención en la muestra blanco, lo que deja cierta incertidumbre respecto a la identidad de esta señal. Por ello, se decidió hacer una prueba adicional por adiciones estándar.

La muestra blanco de Fuentes Brotantes se fortificó con un estándar a concentraciones de sulfatiazol cercanas al límite de detección y al límite de cuantificación del método. En la (Figura V.12) se comparan los cromatogramas obtenidos del análisis de la muestra blanco y la misma muestra fortificada a 0.224 y 0.448 ng/mL.

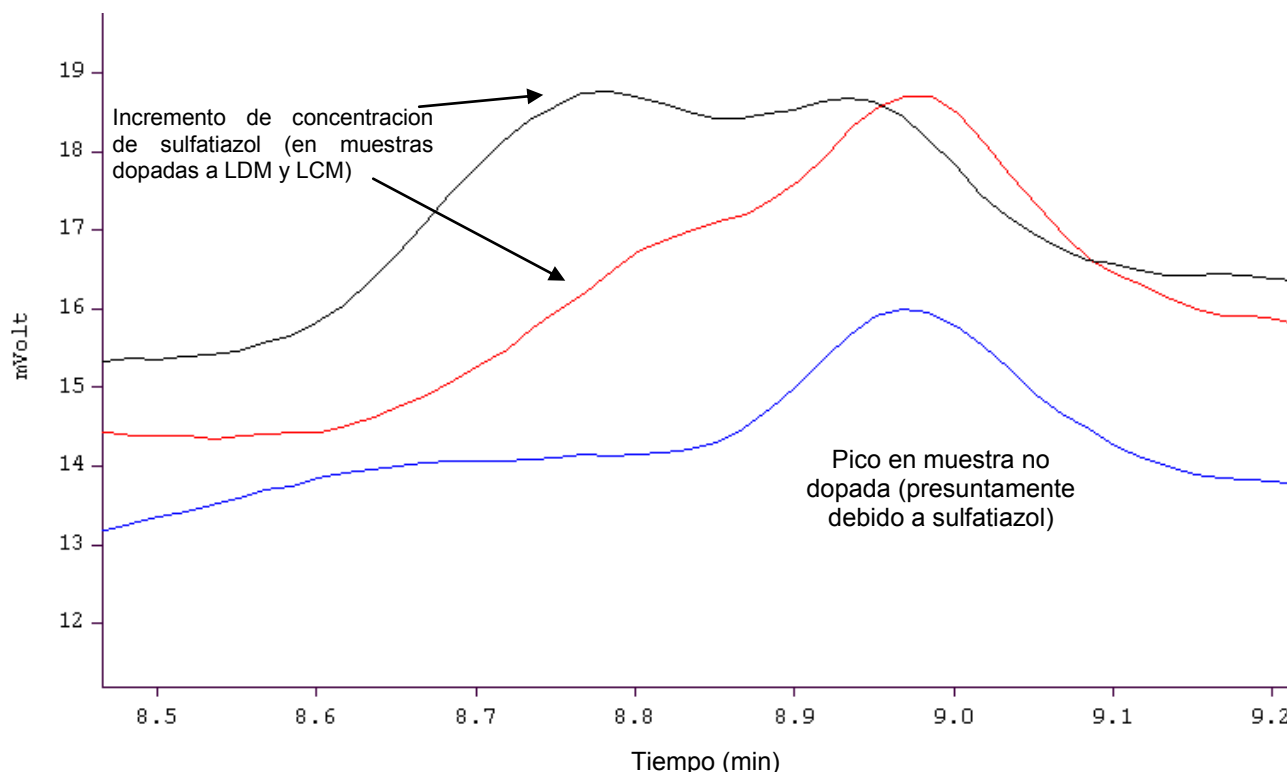


Figura V.12. Ampliación de la zona donde eluye el sulfatiazol para los cromatogramas obtenidos del análisis de la muestra blanco de Fuentes Brotantes (azul) y la misma muestra dopada con el analito a concentración de 0.224 ng/mL (rojo) y 0.448 ng/mL (negro). Condiciones cromatográficas como en la Fig. V.4.

La **Figura V.12** muestra claramente la aparición de un segundo pico, adicional al presunto pico de sulfatiazol, en los cromatogramas de la muestra dopada. Esta señal se incrementa al aumentar la concentración de sulfatiazol añadido a la muestra original. Por lo tanto, se puede afirmar que la señal observada en la muestra blanco no corresponde a sulfatiazol.

Análisis cualitativo para sulfametazina (SMT).

Los resultados registrados en la **Tabla V.18** muestran que el cociente de áreas de pico a dos longitudes de onda para sulfametazina en el estándar y para la señal que eluye al mismo tiempo de retención en la muestra blanco son muy diferentes (0.927 y 3.170, respectivamente). De ello se deduce que esta última señal no es debida a la sulfametazina sino a otro compuesto diferente. Esto se puede observar muy claramente al comparar los cromatogramas de las **Figuras V.10 y V.11**. En el primero (estándar), la sulfametazina tiene un tamaño similar a las dos longitudes de onda, mientras que en el segundo (muestra blanco), el pico que eluye al mismo tiempo de retención que la SMT disminuye notablemente de tamaño al cambiar la longitud de onda de detección de 270 a 254 nm.

Como conclusión respecto a la muestra de Fuentes Brotantes se puede decir que, a los límites de detección del método, no se detectó la presencia de SDZ, SMR, SMX, SFX o SDX. Aplicando otras estrategias como la detección a dos longitudes de onda y las adiciones estándar se comprobó que tampoco estaban presentes el STZ o la SMT.

Los ensayos descritos pusieron en evidencia la importancia de la información que aportan los datos de área de pico registrados a diferentes longitudes de onda. Debido a que el detector del equipo con el que se estuvo trabajando a lo largo de este proyecto no contaba con la capacidad para generar cromatogramas simultáneos a diferentes longitudes de onda, se tuvieron que hacer dos corridas del estándar y dos análisis de la muestra dopada para obtener los cromatogramas a 254 y 270 nm.

El análisis de las siguientes dos muestras (Chalma y Peña Pobre) se realizó en un sistema cromatográfico diferente (descrito en la parte experimental), el cual está

equipado con un detector con tecnología de diodos que tiene capacidad de salida de hasta cuatro señales diferentes simultáneas. En este equipo se utilizaron las mismas precolumnas y columna analítica que habían sido usadas en el equipo anterior, así como las condiciones cromatográficas establecidas para el método.

V.3.2. Muestra Chalma

En la **Figura V.14** se presenta el cromatograma obtenido del análisis de la muestra blanco de Chalma corrida a 270 nm. Como puede observarse, la absorbancia de fondo de la matriz de la muestra es mucho menor que la del agua de Fuentes Brotantes (**Fig. V.9**) y los picos que destacan de la línea base, aunque más numerosos, son también relativamente pequeños. Esto podría ser un indicio de que el agua de Chalma está menos contaminada que el agua de Fuentes Brotantes.

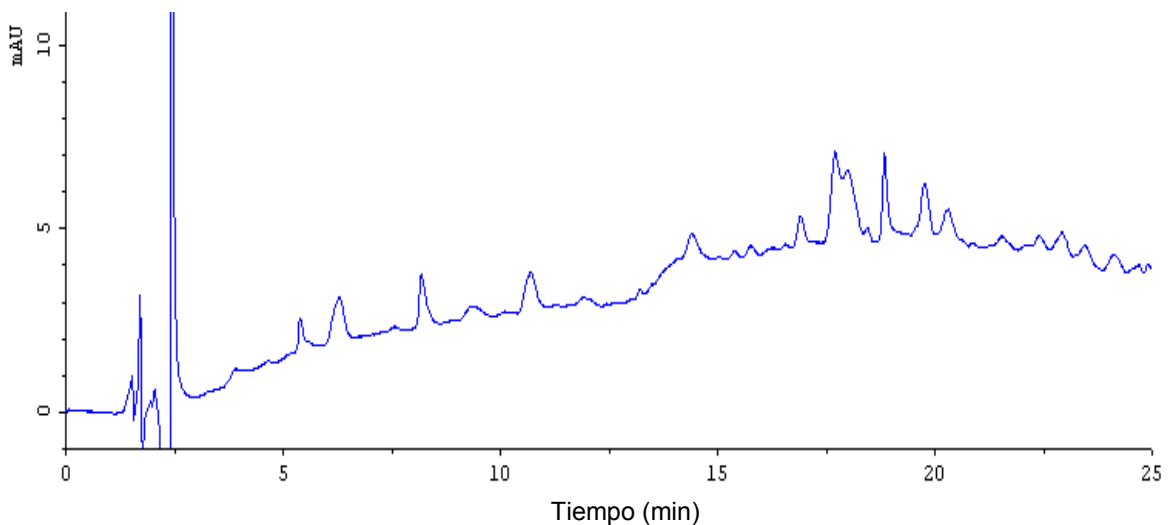


Figura V.13. Cromatograma obtenido del análisis de la muestra blanco proveniente de Chalma. Condiciones cromatográficas como en la **Fig. V.4**.

Por lo antes comentado, en este caso se inyectó un estándar de menor concentración (1.12 $\mu\text{g/mL}$) como referencia para determinar la posible presencia de algunas sulfas en la muestra estudiada. En la **Figura V.14** se comparan los cromatogramas de la muestra blanco y del estándar inyectado, señalando con una flecha roja los 3 picos de la

muestra que destacan más del ruido de fondo y que tienen tiempos de retención muy semejantes a los de alguna sulfa.

Adicionalmente, en la **Figura V.15** se compara el cromatograma de la muestra blanco con el de la misma muestra dopada con las siete sulfas a ~ 0.448 ng/mL de cada una, es decir, a una concentración que corresponde aproximadamente al límite de cuantificación del método (en muestras sintéticas). Como puede notarse, los presuntos picos de sulfatiazol, sulfametazina y sulfisoxazol crecen en la muestra dopada, sin que aparezca un hombro o señal adicional. No obstante, es obvio que en caso de estar presentes estos compuestos en el agua de Chalma, su concentración sería cercana al límite de detección del método.

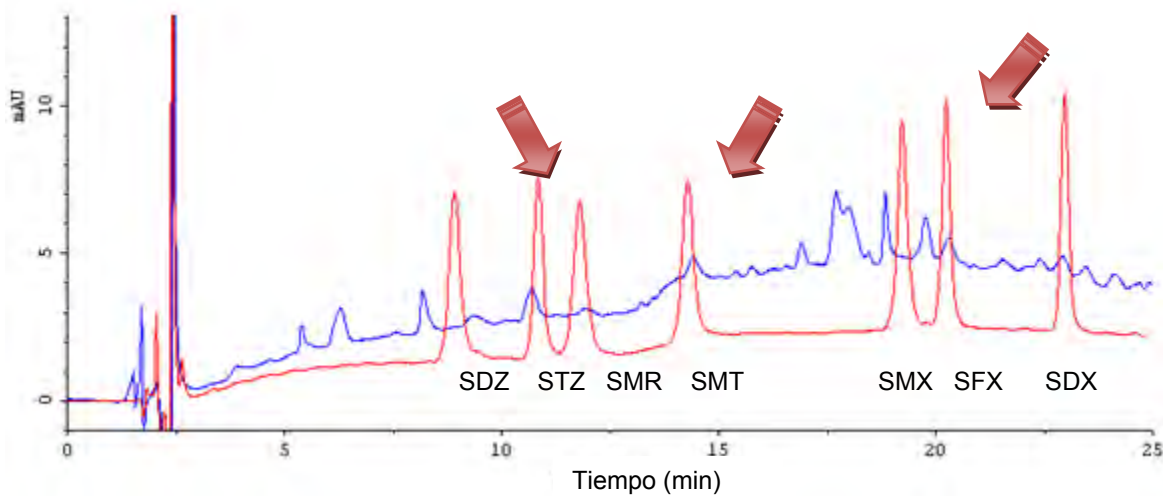


Figura V.14. Cromatogramas obtenidos del análisis de la muestra blanco de Chalma (azul) y de un estándar inyectado ($1.12 \mu\text{g/mL}$). Las flechas indican la posible presencia de sulfas en la muestra. Detección a 270 nm en ambos casos. Otras condiciones cromatográficas como en la **Fig. V.4**. Solutos: sulfadiazina (SDZ), sulfatiazol (STZ), sulfamerazina (SMR), sulfametazina (SMT), sulfametoxazol (SMX), sulfisoxazol (SFX) y sulfadimetoxina (SDM).

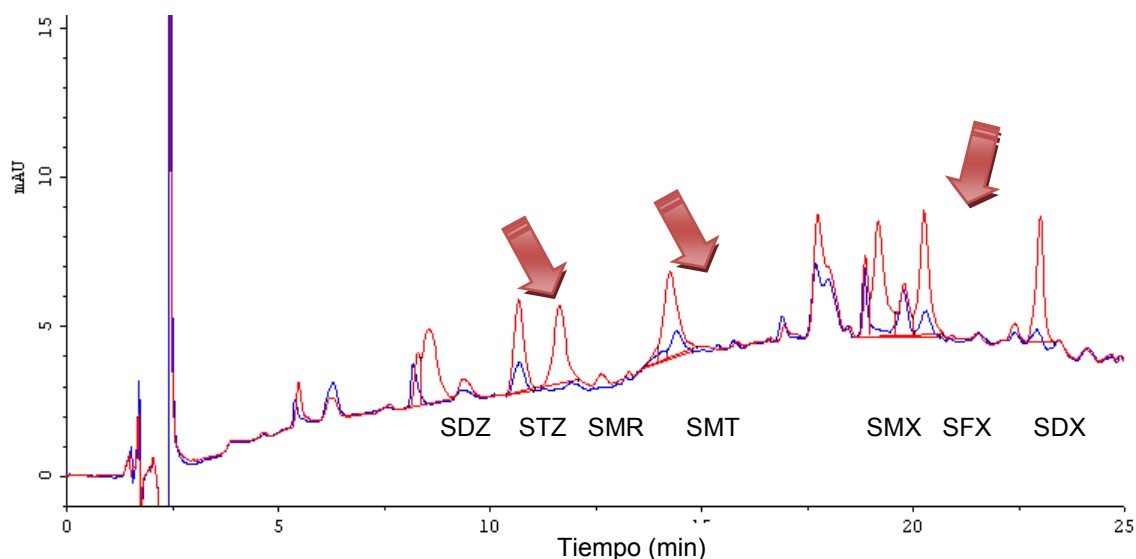


Figura V.15. Cromatogramas obtenidos del análisis de la muestra blanco de Chalma (azul) y la misma muestra dopada a ~ 0.448 ng/mL de cada sulfa (rojo). Detección a 270 nm en ambos casos. Otras condiciones cromatográficas como en la Fig. V.4. Solutos: sulfadiazina (SDZ), sulfatiazol (STZ), sulfamerazina (SMR), sulfametazina (SMT), sulfametoxazol (SMX), sulfisoxazol (SFX) y sulfadimetoxina (SDM).

Aunque la prueba de adiciones patrón confirmó la posible presencia de tres sulfas en la muestra, no es suficientemente confiable. Por ello se procedió a realizar la comparación de los cocientes de áreas de pico a dos longitudes de onda entre el estándar y la muestra blanco. En este caso la prueba fue más robusta porque los cromatogramas obtenidos a diferentes longitudes de onda provenían de la misma corrida cromatográfica. Aunado a esto, se aprovecharon las capacidades del equipo utilizado en esta parte del estudio y se obtuvieron cromatogramas a longitudes de onda de 254 y 280 nm, además de los cromatogramas a 270 nm. Tomando como base estos últimos, se calcularon y compararon dos cocientes de área de pico ($270/280$ y $270/254$) por cada analito presuntamente presente en la muestra. En la **Tabla V.19** se reportan las áreas de pico y los correspondientes cocientes de área para los tres compuestos en el estándar y la muestra blanco.

Tabla V.19. Cocientes de áreas de pico a dos longitudes de onda para sulfatiazol (STZ), sulfametazina (SMT) y sulfisoxazol (SFX) en el estándar y para los picos con igual tiempo de retención en la muestra blanco proveniente de Chalma.

	λ (nm)	ÁREAS DE PICO [mAU*min]		
		STZ	SMT	SFX
Estándar	254	1.702	1.827	2.056
	270	1.612	1.694	1.464
	280	2.038	1.344	1.584
Muestra blanco Chalma	254	0.345	ND *	0.862
	270	0.286	0.284	0.245
	280	0.205	0.325	0.148
$Cociente = \frac{A_{270}}{A_{254}}$	Estándar	0.947	0.927	0.712
	Muestra	0.829	--	0.284
$Cociente = \frac{A_{270}}{A_{280}}$	Estándar	0.791	1.260	0.924
	Muestra	1.396	0.875	1.653

*ND: no detectado

De acuerdo con los datos presentados en la **Tabla V.19**, el cociente de áreas de pico a 270 y 254 nm es similar para el sulfatiazol en el estándar y la muestra (resaltado en rojo en la tabla). Sin embargo, cuando se analiza el cociente de áreas para este mismo soluto a 270 y 280 nm, se observa una gran diferencia entre el estándar y la muestra (zona sombreada en la tabla). Por lo tanto se puede afirmar que el sulfatiazol no está presente en la muestra de agua proveniente de Chalma. En lo que respecta a la sulfametazina y el sulfisoxazol, los dos cocientes de área (270/280 y 270/254) son muy diferentes entre el estándar y la muestra, por lo que la presencia de estos solutos en el agua de Chalma también fue descartada.

En conclusión, se afirma que, a los límites de detección del método, no se encontraron residuos de ninguna de las sulfas estudiadas en la muestra de agua colectada en Chalma.

Además se confirma que la comparación de cocientes de áreas de pico es una estrategia indispensable para evitar el reporte de falsos positivos en una muestra cuando se utiliza la detección UV. De hecho, lo más recomendable es obtener cromatogramas a tres longitudes de onda para poder generar y comparar hasta tres cocientes de área para el mismo pico; con ello, la posibilidad de identificación errónea se descarta casi totalmente. Los detectores UV con tecnología de arreglo de diodos son la mejor opción para la aplicación del método propuesto, pues permiten obtener en una sola corrida de muestra y estándar todos los datos necesarios para hacer estas comparaciones.

V.3.3. Muestra de Loreto y Peña Pobre.

El análisis de esta muestra se realizó mediante un procedimiento similar al de las anteriores muestras. En la **Figura V.16** se presenta el cromatograma de la muestra blanco, comparándolo con el de un estándar de sulfas a concentración de $\sim 1.12 \mu\text{g/mL}$ cada una.

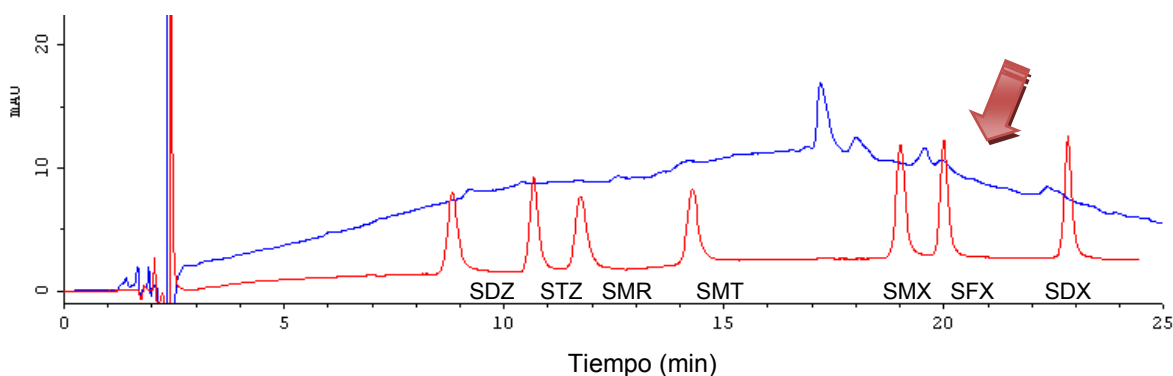


Figura V.16. Cromatogramas obtenidos del análisis de la muestra blanco de Peña Pobre (azul) y de un estándar inyectado ($1.12 \mu\text{g/mL}$) (rojo). La flecha indica la posible presencia de una sulfa en la muestra. Detección a 270 nm en ambos casos. Otras condiciones cromatográficas como en la **Fig. V.4**. Solutos: sulfadiazina (SDZ), sulfatiazol (STZ), sulfamerazina (SMR), sulfametazina (SMT), sulfametoxazol (SMX), sulfisoxazol (SFX) y sulfadimetoxina (SDM).

Como se observa en la figura anterior, el agua de Peña Pobre presentó una línea base muy limpia, donde sobresalían pocas señales. La comparación de cromatogramas indica que sólo una de estas señales podría corresponder a una sulfa (el sulfisoxazol), aunque su tamaño es muy pequeño. Por tal razón, la muestra se re-analizó dopándola con las sulfas a ~ 0.224 y ~ 0.448 ng/mL de cada una; estas concentraciones corresponden aproximadamente a los límites de detección y cuantificación del método, respectivamente.

Los cromatogramas de la muestra original y la muestra fortificada se presentan en la **Figura V.17**, en donde se observa que el pico que eluye al mismo tiempo de retención que el sulfisoxazol en la muestra blanco (marcado con rojo), incrementa su tamaño conforme aumenta la concentración añadida en la muestra dopada. Sin embargo, es evidente que, en caso de estar presente dicha sulfa en la muestra original, su concentración sería notablemente menor al límite de detección teórico del método. A pesar de ello, se decidió hacer el análisis de cocientes de área de pico para descartar o confirmar su identidad. Los resultados correspondientes se reportan en la **Tabla V.20**.

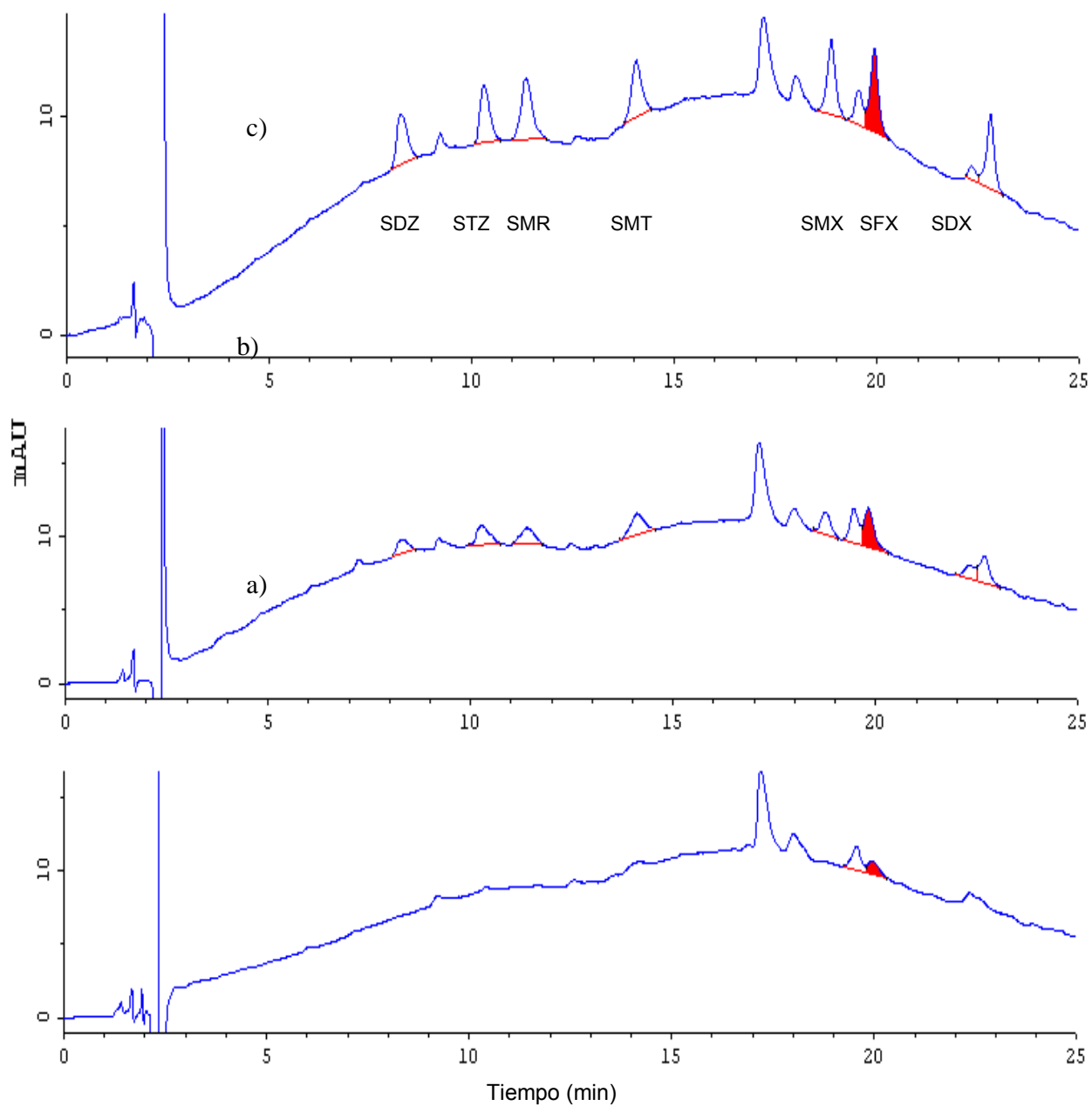


Figura V.17. Cromatogramas obtenidos del análisis de la muestra de agua de Peña Pobre: a) muestra blanco, b) muestra dopada a 0.224 ng/mL (LDM), c) muestra dopada a 0.448 ng/mL (LCM). Otras condiciones cromatográficas como en la **Fig. V.4**. Solutos: sulfadiazina (SDZ), sulfatiazol (STZ), sulfamerazina (SMR), sulfametazina (SMT), sulfametoxazol (SMX), sulfisoxazol (SFX) y sulfadimetoxina (SDM).

Tabla V.20. Cocientes de áreas de pico a dos longitudes de onda para el sulfisoxazol (SFX) en el estándar y para el pico con igual tiempo de retención en la muestra blanco proveniente de Peña Pobre.

	ÁREAS SULFAS [mAU*min]	
	λ (nm)	SFX
Estándar	254	1.758
	270	1.202
	280	1.412
Muestra blanco Peña Pobre	254	1.144
	270	0.294
	280	0.190
Cociente = $\frac{A_{270}}{A_{254}}$	Estándar	0.683
	Muestra	0.257
Cociente = $\frac{A_{270}}{A_{280}}$	Estándar	0.851
	Muestra	1.551

Como se observa en la tabla anterior, los cocientes de área de pico 270/254 y 270/280 son marcadamente diferentes entre el estándar y la muestra blanco. Por esta razón se puede concluir que ninguna de las siete sulfas en estudio está presente en el agua de Peña Pobre.

De las tres muestras analizadas en este trabajo, la que presentó mayor absorbancia de fondo fue el agua colectada en Fuentes Brotantes. A pesar de ello, sólo se observó un pico de tamaño importante que interferiría con la detección y determinación de sulfametazina si ésta estuviera presente; las demás señales en el cromatograma fueron de tamaño inferior al de los picos que generan los analitos cuando se encuentran a concentración equivalente al límite de detección del método. Esto último puede también decirse de las señales observadas en los cromatogramas de las muestras provenientes de Chalma y de Peña Pobre. Por lo tanto, los errores que podrían inducir en el análisis cuantitativo de las sulfas, si estuvieran presentes, no serían demasiado importantes.

Para demostrarlo, se determinó el recobro de las sulfas en las tres muestras reales, dopadas a concentraciones cercanas o menores a la ppb. Los resultados se reportan en las **Tablas V.21 a V.23**, comparándolos con el recobro promedio obtenido en el estudio de linealidad del método con muestras sintéticas.

Tabla V.21. Recuperación de las sulfas en la muestra de agua superficial proveniente del parque Fuentes Brotantes, dopada a ~1.6 ng/mL de cada una, y su comparación con el recobro promedio obtenido en muestras sintéticas (n=3).

Sulfas	% Recobro promedio MUESTRA SINTÉTICA	% Recobro MUESTRA REAL
Sulfadiazina	73.2 ± 4.5	72.5 ± 2.5
Sulfatiazol	78.6 ± 2.2	80.0 ± 3.5
Sulfamerazina	95.1 ± 1.2	94.6 ± 4.1
Sulfametazina	94.3 ± 1.3	--*
Sulfametoxazol	91.6 ± 1.9	99.2 ± 1.9
Sulfisoxazol	92.5 ± 0.8	87.6 ± 2.1
Sulfadimetoxina	90.8 ± 1.3	83.2 ± 4.3

* Recobro no calculado por interferencia en la muestra real.

Tabla V.22. Recuperación de las sulfas en la muestra de agua superficial proveniente de Chalma, dopada a ~0.668 ng/mL de cada una, y su comparación con el recobro promedio obtenido en muestras sintéticas (n=3).

Sulfas	% Recobro promedio MUESTRA SINTÉTICA	% Recobro MUESTRA REAL
Sulfadiazina	73.2 ± 4.5	75.5 ± 2.1
Sulfatiazol	78.6 ± 2.2	83.2 ± 2.7
Sulfamerazina	95.1 ± 1.2	94.6 ± 3.1
Sulfametazina	94.3 ± 1.3	97.3 ± 3.5
Sulfametoxazol	91.6 ± 1.9	99.2 ± 4.1
Sulfisoxazol	92.5 ± 0.8	97.6 ± 2.1
Sulfadimetoxina	90.8 ± 1.3	93.2 ± 1.9

Tabla V.23. Recuperación de las sulfas en la muestra de agua superficial proveniente del parque Loreto y Peña Pobre, dopada a 0.448 ng/mL de cada una, y su comparación con el recobro promedio obtenido en muestras sintéticas (n=3).

Sulfas	% Recobro promedio MUESTRA SINTÉTICA	% Recobro* MUESTRA REAL
Sulfadiazina	73.2 ± 4.5	64.1 ± 4.1
Sulfatiazol	78.6 ± 2.2	67.6 ± 1.8
Sulfamerazina	95.1 ± 1.2	69.7 ± 2.0
Sulfametazina	94.3 ± 1.3	79.5 ± 2.4
Sulfametoxazol	91.6 ± 1.9	77.2 ± 2.1
Sulfisoxazol	92.5 ± 0.8	72.1 ± 3.2
Sulfadimetoxina	90.8 ± 1.3	63.3 ± 4.1

* Dopaje a concentraciones equivalentes al límite de cuantificación del método

Con excepción de la sulfametazina que no pudo determinarse en la muestra de Fuentes Brotantes por la interferencia antes comentada, se observa que las recuperaciones en las muestras reales no son muy diferentes de las recuperaciones promedio en las muestras sintéticas. La mayor diferencia, en el caso de la muestra de Peña Pobre es debida a que ésta se dopó a niveles de concentración de las sulfas aproximadamente iguales a su límite de cuantificación. Es evidente que los errores inducidos por efecto de la matriz son tanto más importantes cuanto menor es la concentración de los analitos.

Por otra parte, en la **Figura V.18** se demuestra que con las muestras de agua superficial más limpias, como la de Peña Pobre, se alcanzan a detectar concentraciones de las sulfas iguales al límite de detección del método en muestras sintéticas (0.224 ng/mL).

Estos ensayos permiten concluir que el método desarrollado puede ser aplicado como método de rutina para un monitoreo primario de las 7 sulfas en muestras de aguas superficiales.

Conclusiones

VI. CONCLUSIONES:

- Se desarrolló un método relativamente sencillo y de alta sensibilidad para la determinación de 7 sulfas (sulfadiazina, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfisoxazol y sulfadimetoxina) a niveles de concentración del orden de trazas en muestras acuosas.
- Dado el carácter hidrofílico de las sulfas, fue posible diseñar un procedimiento efectivo para la remoción de impurezas de baja polaridad presentes en las muestras acuosas mediante una extracción líquido-líquido con hexano. En este proceso, los analitos de interés permanecieron cuantitativamente en la fase acuosa.
- La posterior extracción y concentración de las sulfas a partir de la matriz acuosa fue el punto más crítico en el desarrollo del método debido a la fuerte hidrofiliidad de algunas de ellas. El uso de la extracción en fase sólida acoplada en línea a la cromatografía de líquidos de alta resolución con detector UV (EFS-CLAR/UV), permitió alcanzar una alta precisión y sensibilidad en los análisis, a pesar de que sólo pudo concentrarse un volumen relativamente pequeño de muestra (40 mL). Aunque en estas condiciones una fracción de la sulfadiazina y el sulfatiazol se fuga de la precolumna durante la carga de muestra, el porcentaje de recobro de estos solutos fue constante e independiente de la concentración.
- El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos al analizar muestras sintéticas fortificadas con las sulfas en el intervalo de concentraciones de 0.5-10 ppb, demostró la linealidad del método para todos los analitos ($r^2 > 0.99$) y su excelente precisión a estos niveles de concentración ($CV < 3\%$). Los límites de detección y cuantificación de las sulfas en estas muestras estuvieron

comprendidos en los intervalos de 0.13-0.20 ppb y de 0.44-0.61 ppb, respectivamente.

- La recuperación promedio para sulfadiazina y sulfatiazol fue de ~ 73 y 79%, respectivamente, para las demás sulfas la recuperación fue >90%. Estos valores cumplen con los criterios de aceptación establecidos por la US-EPA para la recuperación de contaminantes orgánicos en muestras acuosas fortificadas al nivel de las ppb (70-130%).
- La aplicación del método en el análisis de muestras de agua superficial colectadas en tres diferentes sitios mostró que: 1) el uso de un detector UV con arreglo de diodos es un complemento indispensable en el método ya que proporciona información espectral que ayuda a descartar los falsos positivos, 2) en general, es posible detectar y cuantificar las sulfas estudiadas en agua de río, con buena precisión y exactitud, cuando su concentración es mayor a 1 ppb y 3) en aguas naturales poco contaminadas los límites de detección y cuantificación del método son similares a los obtenidos con muestras sintéticas de agua grado reactivo.
- A los límites de detección del método desarrollado, no se detectó la presencia de ninguna de las siete sulfas estudiadas en las muestras de agua colectadas en Parque Nacional Fuentes Brotantes, Parque Ecológico Loreto y Peña Pobre y poblado de Chalma, esto a pesar de que existen habitantes que desechan directamente sus aguas residuales a estos puntos de muestreo.
- La metodología analítica desarrollada puede ser una eficaz herramienta en programas de monitoreo de antibióticos en aguas ambientales, con la ventaja de que sólo requiere de instrumentación convencional (CLAR-UV), con la que cuenta la gran mayoría de los laboratorios dedicados a la determinación de contaminantes ambientales.

Anexos

Anexo 1

Ecuaciones Estadísticas [Miller, 1992; Miller, 2002].

Media aritmética

Éste es el estimador más comúnmente utilizado en la estadística clásica, se calcula con la ecuación:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$
 Donde x_i representa cada una de las medidas y n es el número de datos, \bar{x} es el estimador de la media poblacional.

Desviación estándar poblacional

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$
 Donde s es el estimador de la desviación estándar poblacional (σ) obtenido a partir de una muestra.

Coefficiente de variación porcentual (CV%), o desviación estándar relativa (RSD%)

$$RSD\% = CV\% = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

Distribuciones muestrales

Distribución muestral de la media

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{t_{\alpha/2}^{n-1} * s}{\sqrt{n}}$$

Donde n es el número de datos experimentales, \bar{x} y s son la media y desviación estándar estimadas y $t_{\alpha/2}^{n-1}$ es la variable de la distribución t de Student con un riesgo α y $n-1$ grados de libertad.

Linealidad, determinada por el método de mínimos cuadrados. Se supone una relación lineal entre la cantidad de materia cargada y la materia recuperada la cual está dada por la ecuación.

$$y = m x + b$$

Donde m = pendiente de la recta y b = ordenada al origen.

Éstas son calculadas mediante las ecuaciones:

$$m = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i [(x_i - \bar{x})^2]}$$

$$b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Intervalo de confianza sobre la ordenada al origen y pendiente.

Intervalo de confianza sobre la ordenada $\beta = b \pm t_{\alpha/2} * Se \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{xx}}}$

Intervalo de confianza sobre la pendiente $\gamma = m \pm t_{\alpha/2} * Se \frac{1}{\sqrt{S_{xx}}}$

Donde $t_{\alpha/2}$ es el valor de la función t de Student, con un riesgo α y $n-2$ grados de libertad. n es el número de parejas de datos experimentales y Se y S_{xx} , se calculan según:

$$S_{xx} = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

$$Se^2 = \frac{S_{yy} - (S_{xy})^2 / S_{xx}}{n - 2}$$

$$S_{yy} = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$$

$$S_{xy} = \sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n}$$

Cinturón de confianza de los valores de calibración. Se usa para saber si un punto de calibración (x_{stdr} , y_{stdr}) está fuera de la recta y se le puede rechazar como valor aberrante. Se calcula con la ecuación:

$$y_{stdr} = (m \cdot x_{stdr} + b) \pm t_{\alpha/2} \cdot Se \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x_{stdr} - \bar{x})^2}{S_{xx}}}$$

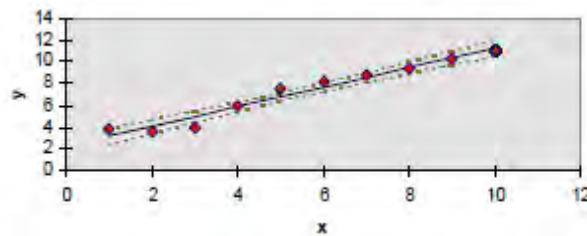


Figura. A1.1 Cinturón de confianza.

Límites de predicción de la regresión lineal

Cuando se usa posteriormente la curva de calibración para medir muestras problema (sólo conocemos x_{mtra} y estimaremos y_{mtra} con la recta), el intervalo de predicción es mayor al cinturón de confianza de los valores de calibración, se le llama cinturón de predicción (cinturón más alejado de la recta en la **Fig. A1.2**) y está dado por la ecuación:

$$y_{mtra} = (m \cdot x_{mtra} + b) \pm t_{\alpha/2} \cdot Se \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_{mtra} - \bar{x})^2}{S_{xx}}}$$

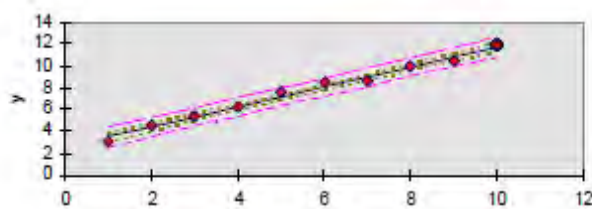


Figura. A1.2 Límites de predicción de la regresión lineal.

Pruebas de hipótesis sobre las estimaciones de una recta

Estas pruebas pueden ser realizadas sobre la ordenada, la pendiente, un valor de calibración o una muestra problema. En el presente trabajo se realizó esta prueba de hipótesis sobre la ordenada y la pendiente, donde la H_0 (hipótesis nula) es que la ordenada es igual a 0 o que la pendiente es igual a 1 y la H_1 (hipótesis alterna) es que éstas sean diferentes a 0 y a 1, respectivamente. Por lo anterior el estadístico de prueba es:

$$t_{exp} = \frac{(b-B)}{S_e \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{xx}}}}$$

El criterio de decisión depende de la hipótesis alterna:

Hipótesis alterna	Rechazamos la hipótesis nula si:
Variable menor a la referencia	$t_{exp} < -t_{\alpha}$
Variable mayor a la referencia	$t_{exp} > t_{\alpha}$
Variable diferente a la referencia	$t_{exp} < -t_{\alpha/2}$ ó $t_{exp} > t_{\alpha/2}$

Anexo 2

Resultados del estudio de linealidad del método

En las **Tablas A.2.1. a A.2.7** se reportan los resultados de recuperación promedio para cada sulfa en los 7 niveles de concentración estudiados. Las gráficas de *Cantidad Recuperada Vs Cantidad Adicionada* se presentan en las **Figuras A.2.1 a A.2.7**, en donde los puntos representan los datos experimentales y las líneas continuas son las rectas de regresión correspondientes calculadas por el método de mínimos cuadrados. En cada figura se muestra también el cinturón de confianza de los puntos de calibración y el intervalo de predicción de la regresión lineal, así como la ecuación de regresión y su correspondiente coeficiente de determinación.

Tabla A.2.1 Recuperación de sulfadiazina en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas a diferentes niveles de concentración.

Concentración (ng/mL)	Cantidad adicionada (ng)	Cantidad recuperada (ng)
0.45	18.1	13.9
1.13	45.2	34.3
1.70	67.6	50.8
3.03	121.1	93.7
5.66	226.8	180.1
7.07	276.8	203.7
9.90	395.6	287.9

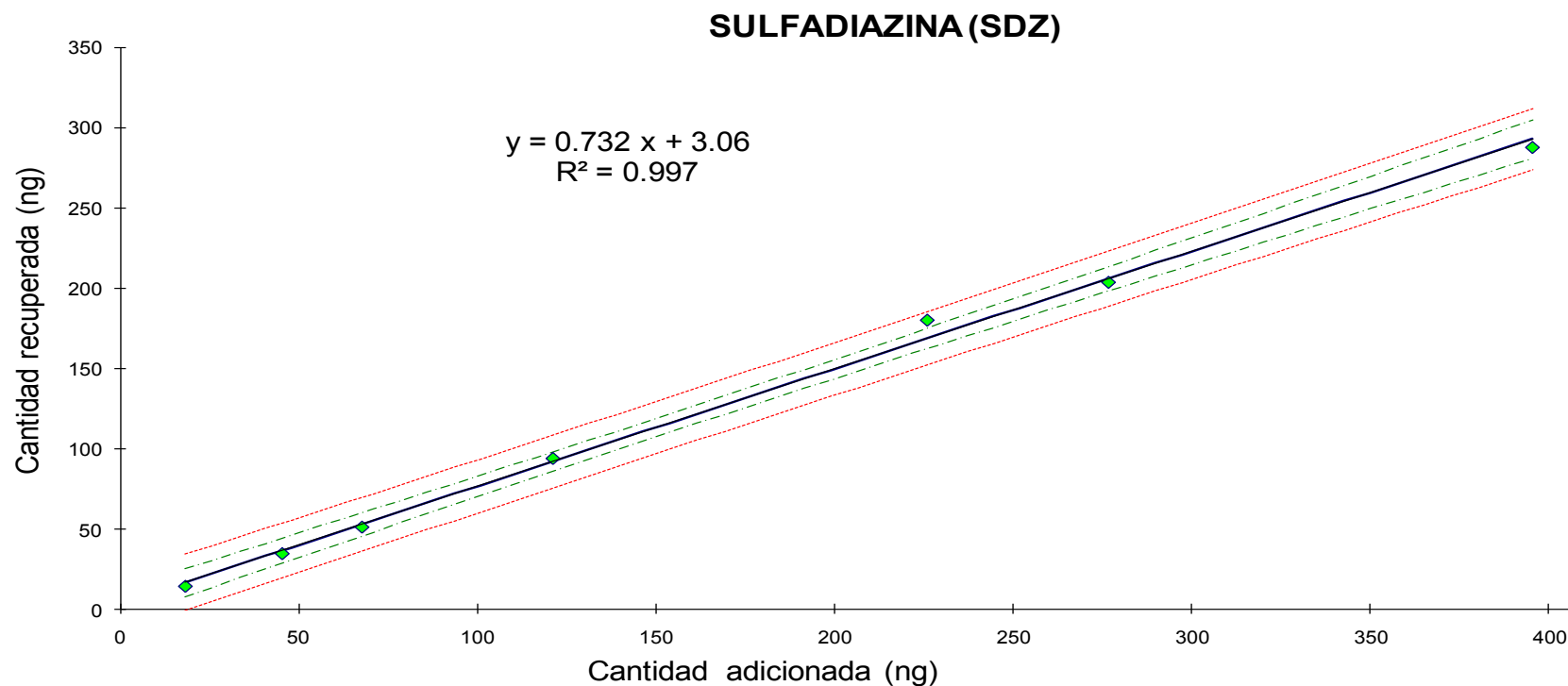


Figura A.2.1. Linealidad del método para la sulfadiazina. Cantidad de sulfadiazina recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna.

Tabla A.2.2 Recuperación de sulfatiazol en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con sulfas a diferentes niveles de concentración.

Concentración (ng/mL)	Cantidad adicionada (ng)	Cantidad recuperada (ng)
0.448	17.9	15.7
1.12	44.8	35.9
1.68	67.2	54.5
3.00	120	98.9
5.60	224	189
7.00	280	227
9.80	392	304

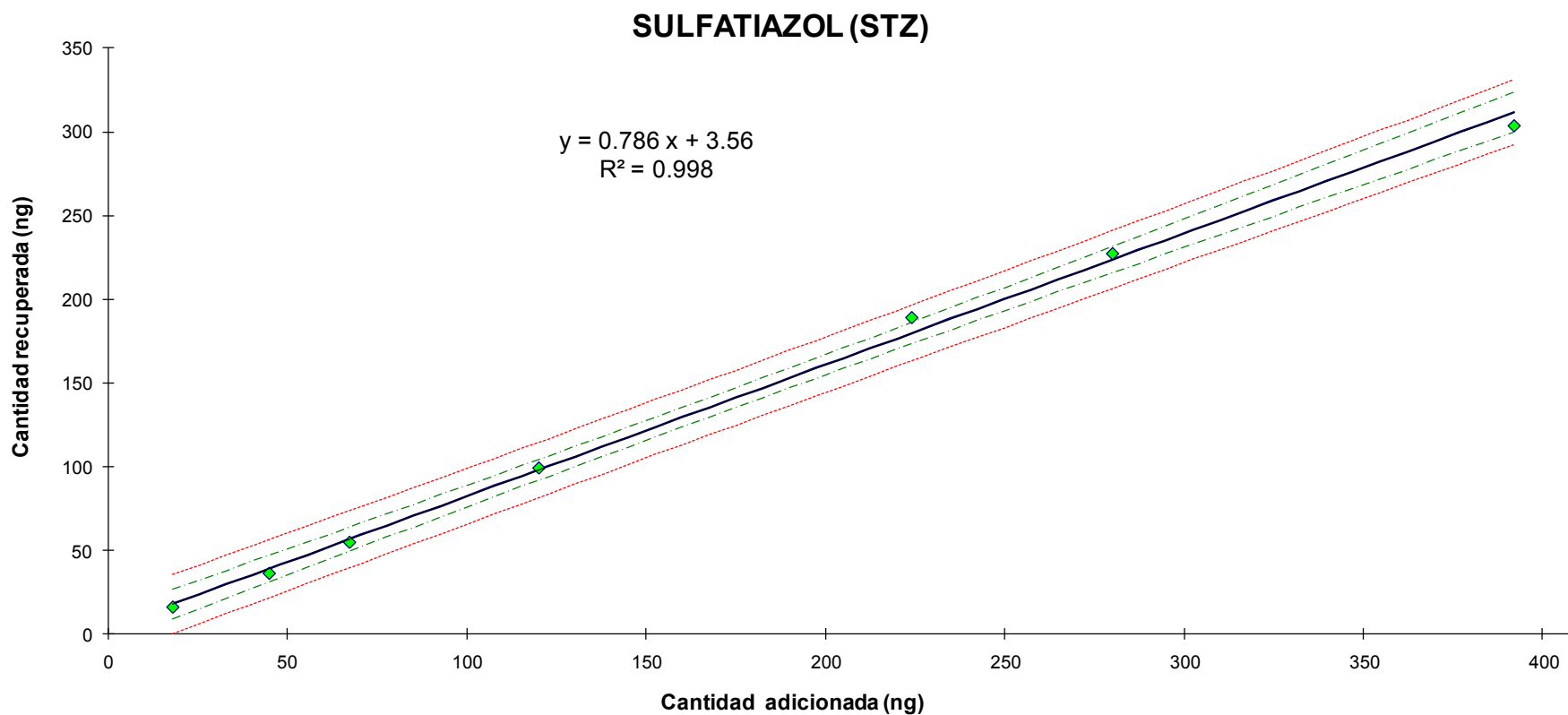


Figura A.2.2. Linealidad del método para el sulfatiazol. Cantidad de sulfatiazol recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna.

Tabla A.2.3. Recuperación de sulfamerazina en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con sulfas a diferentes niveles de concentración.

Concentración (ng/mL)	Cantidad adicionada (ng)	Cantidad recuperada (ng)
0.448	17.9	17.9
1.12	44.8	43.6
1.68	67.2	64.5
3.00	120	111
5.60	224	211
7.00	280	265
9.80	392	375

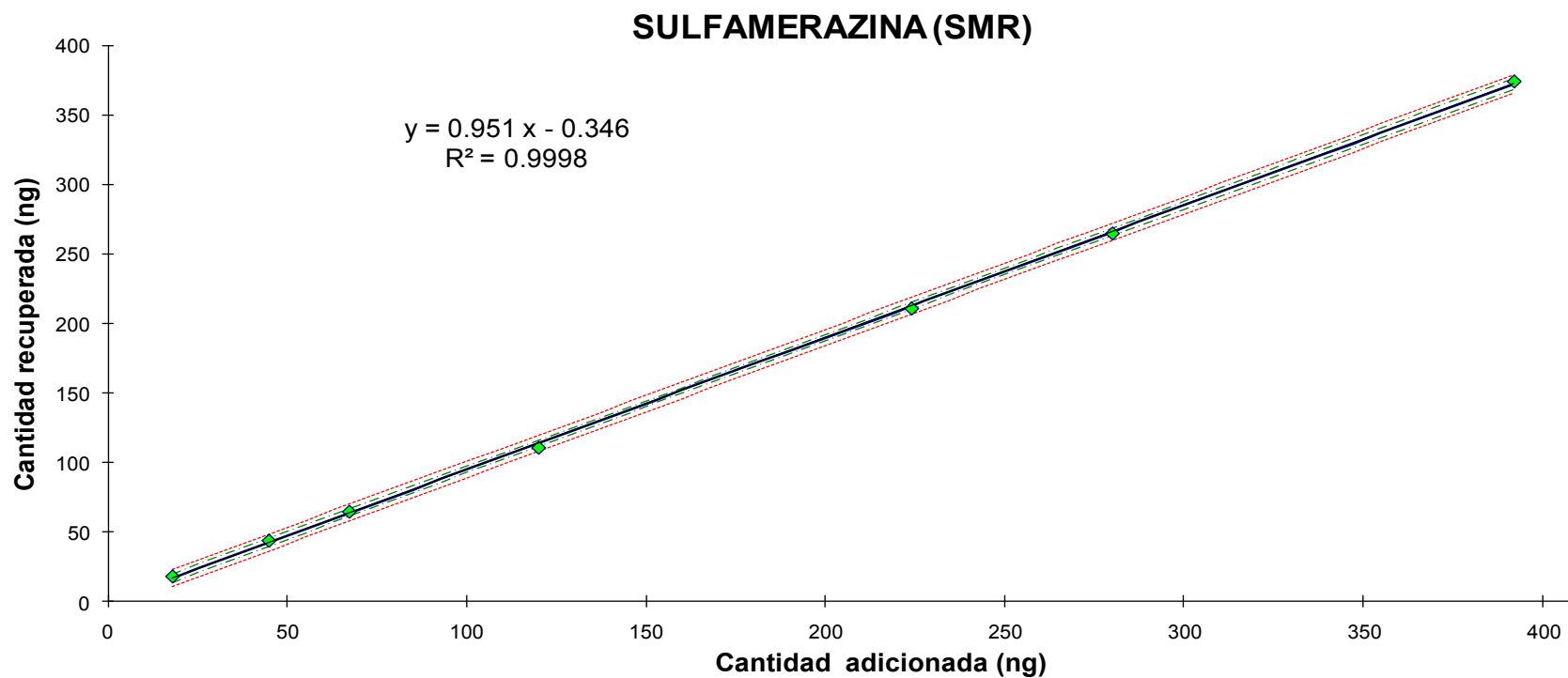


Figura A.2.3. Linealidad del método para la sulfamerazina. Cantidad de sulfamerazina recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna.

Tabla A.2.4. Recuperación de sulfametazina en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con sulfas a diferentes niveles de concentración.

Concentración (ng/mL)	Cantidad adicionada (ng)	Cantidad recuperada (ng)
0.448	17.9	18.4
1.12	44.8	42.1
1.68	67.2	61.6
3.00	120	113
5.60	224	210
7.00	280	260
9.80	392	372

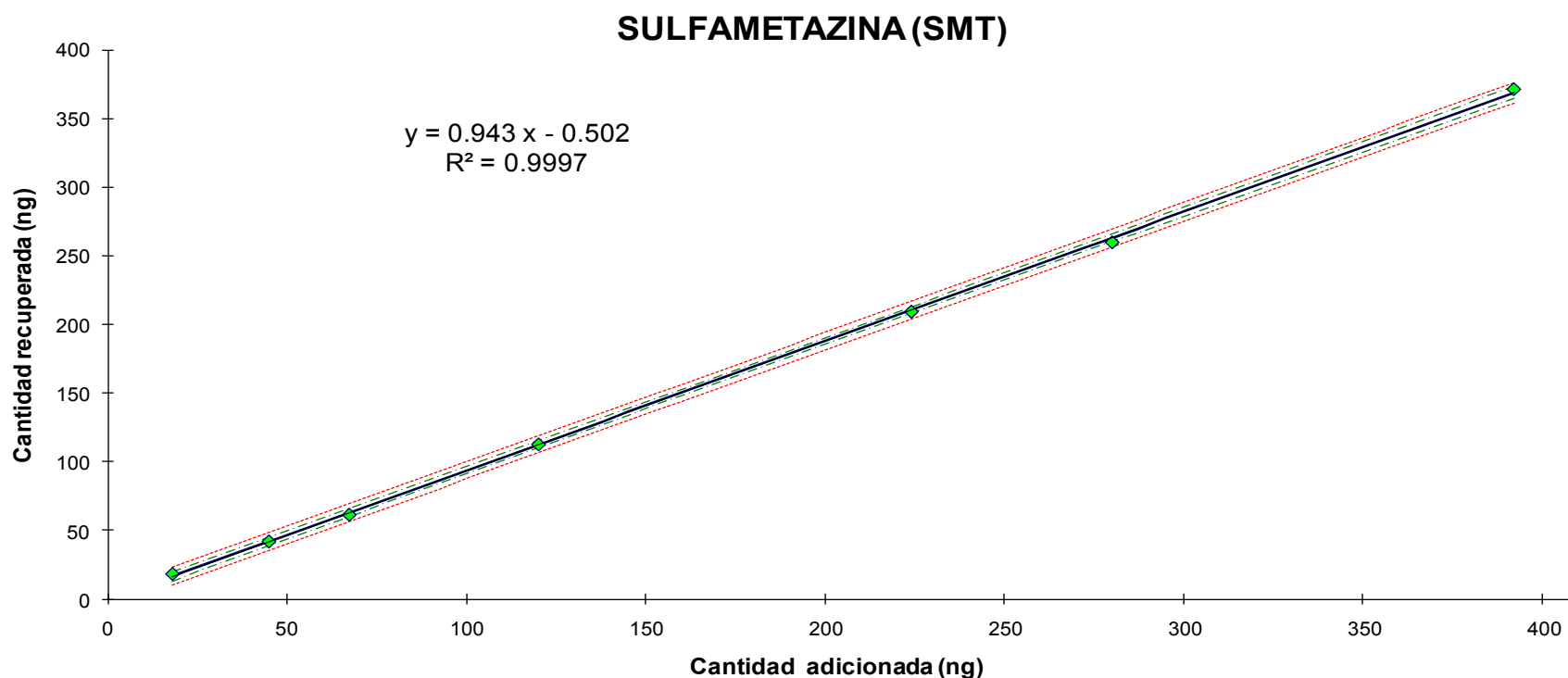


Figura A.2.4. Linealidad del método para la sulfametazina. Cantidad de sulfametazina recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna.

Tabla A.2.5. Recuperación de sulfametoxazol en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con sulfas a diferentes niveles de concentración.

Concentración (ng/mL)	Cantidad adicionada (ng)	Cantidad recuperada (ng)
0.452	18.1	18.2
1.13	45.2	42.3
1.70	67.6	62.7
3.03	121.1	109
5.66	226.8	203
7.07	276.8	254
9.90	395.6	364

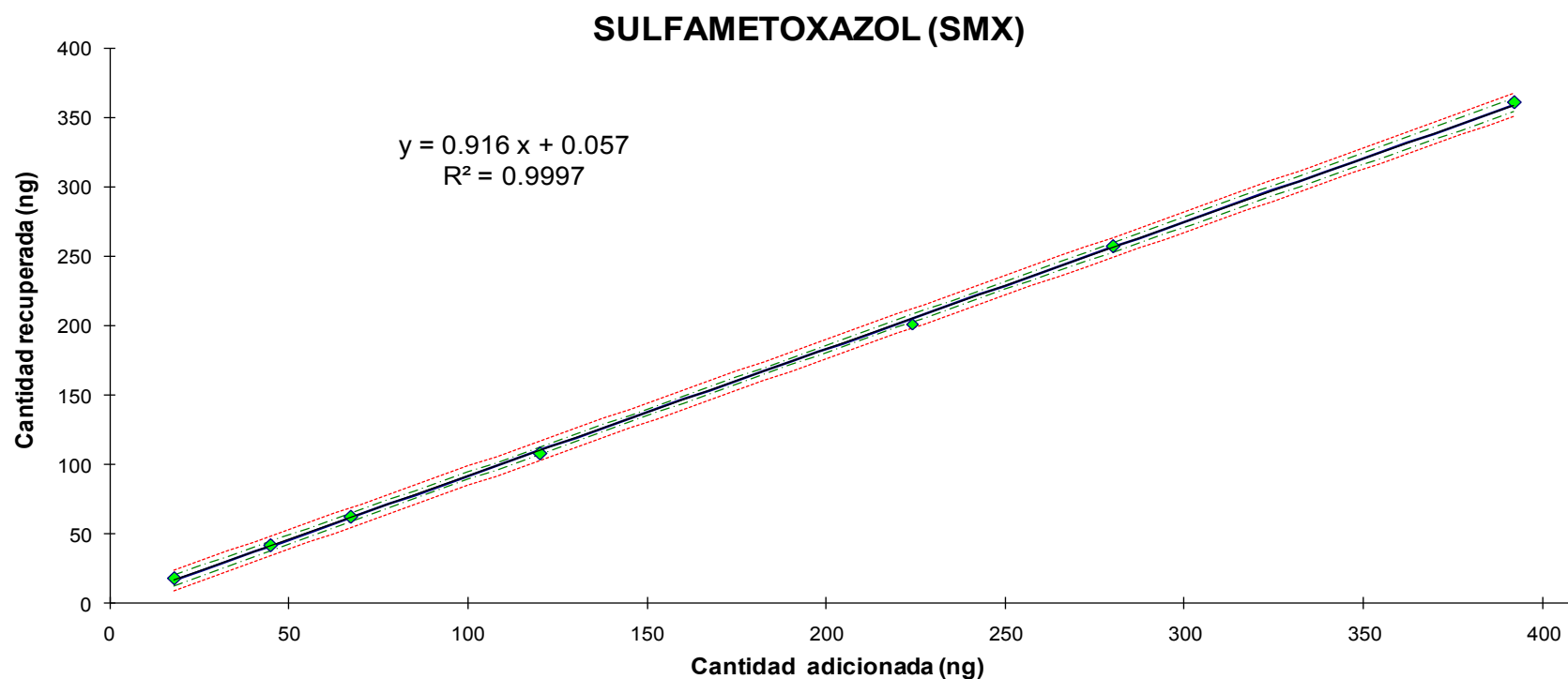


Figura A.2.5. Linealidad del método para el sulfametoxazol. Cantidad de sulfametoxazol recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna.

Tabla A.2.6. Recuperación de sulfisoxazol en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con sulfas a diferentes niveles de concentración.

Concentración (ng/mL)	Cantidad adicionada (ng)	Cantidad recuperada (ng)
0.452	18.1	17.3
1.13	45.2	40.6
1.70	67.6	62.9
3.03	121.1	113.8
5.66	226.8	210.9
7.07	276.8	256.2
9.90	395.6	365.9

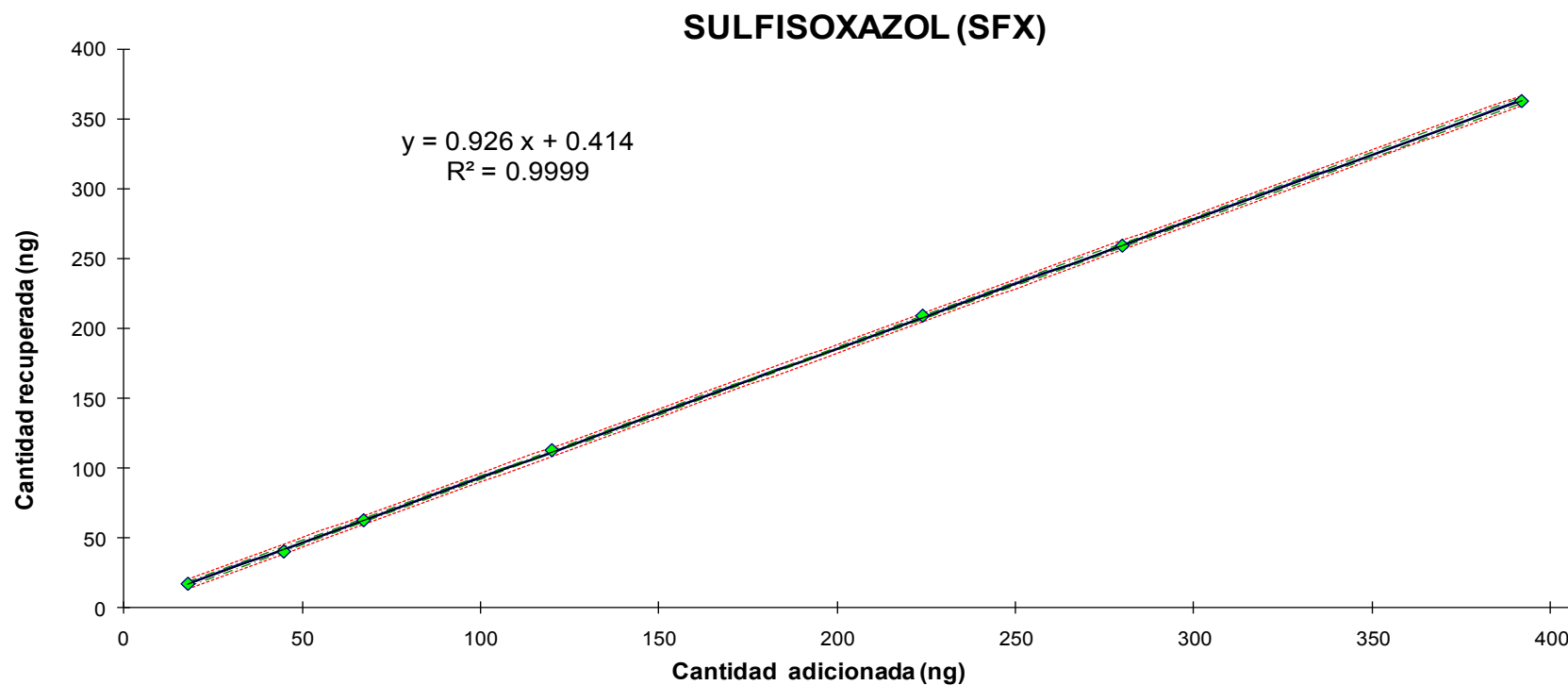


Figura A.2.6. Linealidad del método para el sulfisoxazol. Cantidad de sulfisoxazol recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna.

Tabla A.2.7. Recuperación de sulfadimetoxina en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con sulfas a diferentes niveles de concentración.

Concentración (ng/mL)	Cantidad adicionada (ng)	Cantidad recuperada (ng)
0.448	17.9	18.5
1.12	44.8	39.9
1.68	67.2	63.2
3.00	120	114
5.60	224	201
7.00	280	256
9.80	392	359

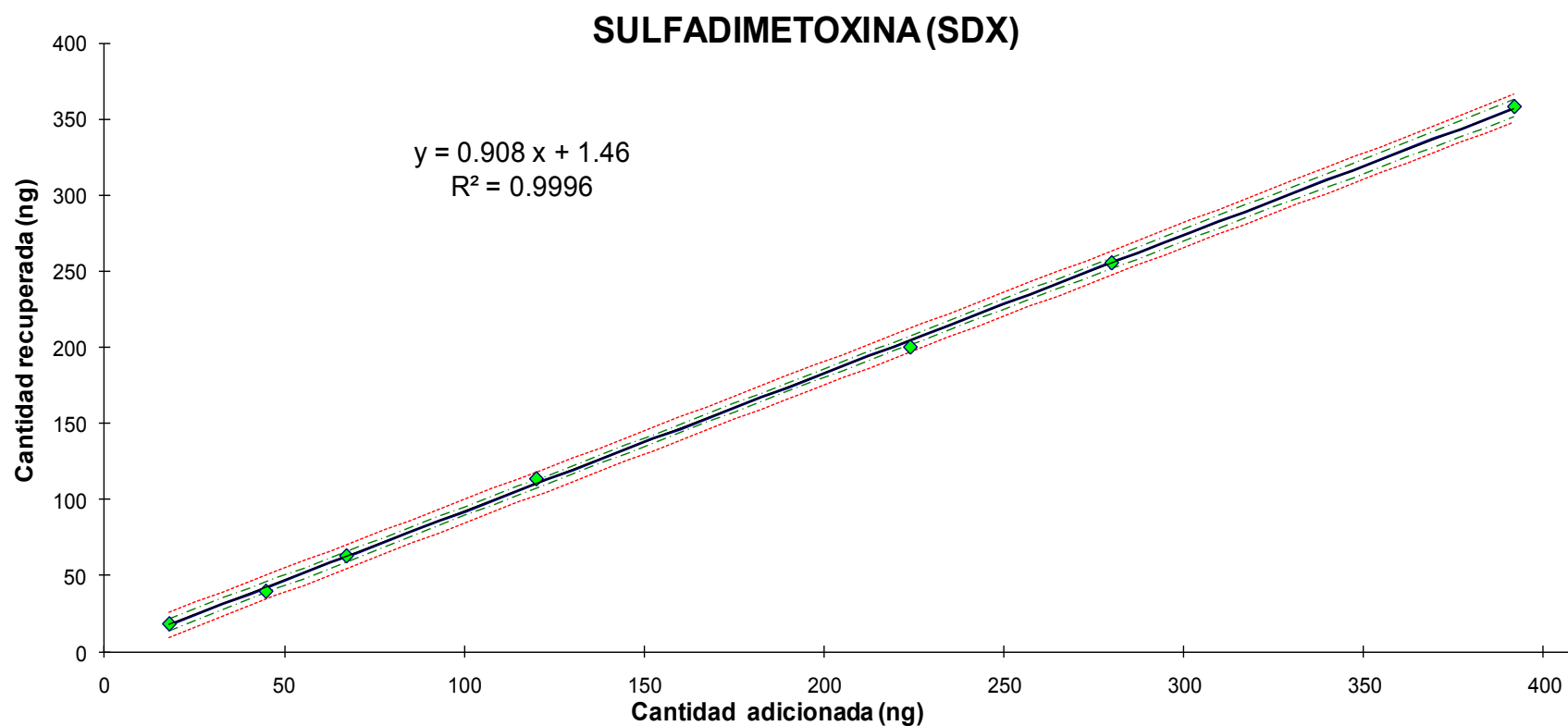


Figura A.2.7. Linealidad del método para la sulfadimetoxina. Cantidad de sulfadimetoxina recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna.

Referencias Bibliográficas

A

Aga D.S. *Fate of pharmaceuticals in the environment and water treatment systems*. United States of America. Aquatic Macrophyte. 2008.

Aherne G.W., Briggs R.; 1989. The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment. *J. Pharm. Pharmacol.* **41**: 735-736.

Annel B., Williams A., McNeill K.; 2004. Photochemical fate of sulfa drugs in the aquatic environment: Sulfa drugs containing five-membered heterocyclic groups. *Environ. Sci. Technol.* **38**: 3933-3940.

B

Battaglin W.A., Furlong E. T., Burkhardt M.R., Peter C.; 2000. Occurrence of sulfonylurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States. *J. Sci Total Environ.* **248**: 123-133.

Berrueta L.A.; 1998. A review of solid-phase extraction: Basic principles and new developments. *Chromatographia* **40** (7): 474-483.

Biblioteca de salud virtual. 2010.

http://www.bvsops.org.uy/php/decsws.php?lang=es&tree_id=D02.065.884.725.755&page=info
(último acceso: 13 de noviembre de 2010).

Bridges J.W., Kirby M.R., Walker S.R.; 1968. Species differences in the metabolism of sulfadimethoxine. *J. Biochem.* **109**: 851-856.

C

Carballa M., Omil F., Lema J.M, Llompарт M., García-Jares C., Rodríguez I., Gómez M., Ternes T.A.; 2004. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res.* **38**: 2918–2926.

Lin C.-Y., Huang S.-D.; 2008. Application of liquid–liquid–liquid microextraction and high-performance liquid-chromatography for the determination of sulfonamides in water. *Anal. Chim. Acta* **612**: 37-43.

Christian G.D. *Química Analítica*, sexta ed. McGraw Hill, México, 2009.

Cichna M., Knopp D., Niesser R.; 1997. Immunoaffinity chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons in columns prepared by the sol-gel method. *Anal. Chim. Acta* **339**: 241-250.

Cichna-Markl M.; 2006. Selective sample preparation with bioaffinity columns prepared by the sol-gel method. *J. Chromatogr. A* **1124**: 167-180.

Clive P., Page M.J, Curtis J., Sutter M., Walker M., Hoffman B. *Farmacología Integrada*. New York: ISBN 84-8174-340-2, 1998.

Currie L.A.; 1995. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations). *Anal. Chim. Acta* **391** (2): 105-126.

D

Daughton C.G., Ternes T.A.; 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change. *Environmental Health* **107**: 907-938.

Dubey J.P., Lindsay D.S., Speer C.A.; 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites, and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 267-299.

E

EPA. *United States - Environmental Protection Agency*. 2010.
<http://www.epa.gov/ppcp/basic2.html> (último acceso: 12 de noviembre de 2010).

F

Fent K., Weston A.A., Caminada D.; 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* **76**: 122–159.

Fong P.P.; 1998. Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin reuptake inhibitors. *Biol. Bull.* **194**: 143-149.

Font P. *Medicamenta Guía teórico práctica para farmacéuticos y médicos*, Vol 3. Quer, España, 1962.

Frank C., Pietrzyk D. *Química Analítica*. Interamericana, México, 1982.

G

Ghosh M.K. *HPLC Methods on drug analysis*, Ed Springer-Verlag, Heidelberg, 1992.

Gobel A., Thomsen A., McArdell C.S., Joss A., Giger W; 2005. Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment. *Environ. Sci. Technol.* **39**: 3981-3989.

Greenfacts.org. <http://www.greenfacts.org/es/glosario/ghi/genotoxico-genotoxicidad.htm> (último acceso: 10 de noviembre de 2010).

H

Haller M.Y., Muller S.R., McArdell C.S., Alder A.C., Suter M.J.; 2002. *J. Chromatogr. A* **952**: 111-120.

Halling-Sorensen B., Nielsen S., Lanzky P.F., Ingerslev F, Holten Lutzhoft H.C., Jorgensen S.E.; 1998 Occurrence fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review. *Chemosphere* **36** (2): 357-393.

Hartmann A., Alder A.C., Koller T., Widmer R.M.; 1998. Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environ. Toxicol. Chem.* **17** (3): 377-382.

Heberer T., Stan H.J.; 1997. Determination of clofibric acid and N- (phenylsulfonyl)-sarcosine in sewage river and drinking water. *J. Environ. Anal. Chem.* **67**: 113-124.

Henderson H., Long W.J., John W. *Agilent Technologies*. 2009.
<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5989-5436EN.pdf> (último acceso: 15 de marzo de 2009).

Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K.L. 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* **225**: 109-118.

Holm J.V., Ruegge K., Bjerg P., Christensen T. H.; 1995. Occurrence and distribution of pharmaceutical organic compounds in the groundwater downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Environ. Sci. Technol.* **29**: 1415-1420.

Horwitz W. *AOAC Official Methods of Analysis*, Vol. 19. AOAC, USA, 2005.
<http://www.vecol.com.co/sitio/index.php?tipoDoc=FinalProducto&idProducto=66&categoria=15> (último acceso: 1 de Diciembre de 2010).

Huetos O. Estudio comparativo y evaluación de diferentes técnicas cromatográficas en el análisis de residuos de corticosteroides en muestras biológicas. *Tesis Universidad Complutense de Madrid*. Madrid, 2004.

J

Jen-Fon J., Hong-Lin L., Bing-Nan L. 1998. Simultaneous determination of seven sulfonamide residues in swine wastewater by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **793**: 378–382.

Jones O.A., Voulvoulis N., Lester J. N.; 2001. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: A review. *J. N. Environ. Technol.* **22**: 1383-1394.

K

Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R. M., Guwy A.J.; 2008. The effect of signal suppression and mobile phase composition on the simultaneous analysis of multiple classes of acidic/neutral. *Talanta* **74**: 1299-1312.

L

Lacorte S., Ehresman N., Barceló D.; 1995. Stability of organophosphorus pesticides on disposable solid-phase extraction precolumns. *Environ. Sci. Technol.* **29**: 2834-2841.

Lanza F., Sellergen B. *Molecularly imprinted extraction materials for highly selective sample cleanup and analyte enrichment. Advances in chromatography*, Vol. 41. Marcel Dekker, New York, 2001.

Larsen T.A., Lienert J., Joss A., Siegrist H.; 2004. *J. Biotechnol.* **113**: 295–304.

Lille L.L., Aucke R.S. *Farmacocinetica en enfermería*, segunda ed. Harcourt, Barcelona, 1996, p. 523.

Lin C.E., Chang C.C., Lin W.C.; 1997. Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis III. Citrate buffer as a background electrolyte. *J. Chromatogr. A* **768**: 105-112.

Lindsey M. E., Meyer M., Thurman E. M.; 2001. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* **73** (19): 4640–4646.

M

Martínez F., Gómez A.; 2001. Thermodynamic study of the solubility of some sulfonamides in octanol, water, and the mutually saturated solvents. *J. Sol. Chem.* **30** (10): 909-923

Miller I., Freund J.E., Johnson R. *Probabilidad y Estadística para Ingenieros*, cuarta ed. Prentice-Hall Hispanoamericana, México, 1992.

Miller J.C., Miller J.N. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, cuarta ed. Prentice-Hall, Madrid, 2002.

Morales E. L., Rojas J. H.; 1999. Validación de un método cromatográfico para la determinación de sulfametoxazol y trimetoprim en tabletas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, **29**: 13-18

N

Delaunay N., Pichon V., Hennion M.-C.; 2000. Immunoaffinity solid-phase extraction for the trace analysis of low-molecular-mass analytes in complex sample matrices. *J. Chromatogr. B* **745**: 15-37.

O

O'Neil M.J., Smith A. *The Merck Index*. 2001.

P

Pedrouzo M., Borrull F.; 2008. Simultaneous determination of macrolides, sulfonamides, and other pharmaceuticals in water samples by solid-phase extraction and LC-(ESI) MS. *J. Sep. Sci.* **31**: 2182-2188.

Pichon V.; 2007. Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. *J. Chromatogr. A* **1152**: 41-53.

R

Rao N., Sarada B.V., Tryk D.A, Fujishima A.; 2000. Electroanalytical study of sulfa drugs at diamond electrodes and their determination by HPLC with amperometric detection. *J. Electroanal. Chem.* **491**: 175–181.

Robert K., Anderson M.D.; 1942. Sulfathiazole as an adjunct to surgery in advanced acute appendicitis. *Am. Med. Assoc.* **118** (11): 892-895.

Rogers H.R.; 1996. Sources behavior and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges. *Sci. Total Environ* **185**: 3-26.

S

Sacher F., Lange F.T., Brauch H.J., Blankenhorn I.; 2001. Pharmaceuticals in groundwaters analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *J. Chromatogr. A* **938**: 199-210.

Sanli S., Altun Y., Sanli N., Alsancak G., Beltran J. L. ; 2009. Solvent Effects on pKa values of some substituted sulfonamides in acetonitrile-water binary mixtures by the UV-spectroscopy method. *J. Chem. Eng. Data* **54**: 3014–302.

Santos J.L., Aparicio I., Alonso E., Calle M.; 2005. Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors. *Anal. Chim. Acta* **550**: 116-122.

Shelver W.I., Shappell N.W., Franek M., Rubio F.R.; 2008. ELISA for sulfonamides and its application for screening in water contamination. *J. Agric. Food Chem.* **56**: 6609–6615.

Snyder L.R., Glajch J.L. *Practical HPLC Method Development*. Wiley Intterscience, N.Y., 1997.

Snyder L.R., Kirkland J.J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, segunda ed. John Wiley & Sons, N.Y., 1989.

Snyder S.A., Elly K.L., Grange A.H., Sovocool G.W., Snyder E.M., Giesy J.; 2001. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Scientific and regulatory issue. *Amer. Chem. Soc.* **791**: 116-140.

Snyder S.A., Villeneuve D., Snyder E.M., Giesy J.; 2001. Identification and quantitation of estrogen receptor agonists in wastewater effluents. *J. Environ. Sci. Technol.* **35**: 3620-3625.

Stan H.J., Heberer T.; 1997. Pharmaceuticals in the aquatic environment. *Analysis Mag.* **25**: 20-23.

Stoob K., Singer H.P., Goetz C.W., Ruff M., Mueller S. R.; 2005. Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography–tandem mass spectrometry quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters. *J. Chromatogr. A* **1097**: 138–147.

Stowe C.M. *The sulfonamides Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Jones LM, Iowa, 1975.

Subra P., Hennion M-C., Rosset R., Frei R.W.; 1998. Recovery of organic compounds from large-volume aqueous samples using on-Line liquid chromatographic preconcentration techniques. *J. Chromatogr.* **456**: 121-141.

Suganya K., Kabilan S.; 2004. Substituent and solvent effects on electronic absorption spectra of some N-(substituted phenyl)benzene sulphonamides. *Spectrochim. Acta A* **60**: 1225–1228.

T

Téllez J.M. Separación de familias de compuestos del aceite crudo utilizando extracción en fase sólida. *Tesis UNAM*, 2002.

Ternes T.A.; 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* **32** (11): 3245-3260.

U

US-EPA. Code of Federal Regulation. *Appendix B to part 136. Definition and procedure for the determination of the method detection limit*. 1.11. Vol. 49. USA, 1984.

US-EPA. *US-Environmental Protection Agency*. 2010. <http://www.epa.gov/ppcp/> (último acceso: 12 de noviembre de 2010).

V

Vademecum. 2009. <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/t074.htm#> (último acceso: 16 de marzo de 2009).

Vanderford B.J., Pearson R.A., D.J. Rexing, Snyder S.A.; 2003. Analysis of Endocrine Disruptors. *Anal. Chem.* **75**: 6265-6274.

Vecol. 2010.

<http://www.vecol.com.co/sitio/index.php?tipoDoc=FinalProducto&idProducto=66&categoria=15>
(ultimo acceso 1 de Diciembre del 2010)

Vera-Avila L.E., Vázquez-Lira J.C.,. García de Llasera M.P, Covarrubias R.; 2005. Sol-gel immunosorbents doped with polyclonal antibodies for the selective extraction of malathion and triazines from aqueous samples. *Environ. Sci. Technol.* **39**: 5421-542.

W

Wordreference. 2010. <http://www.wordreference.com/definicion/ubicuo> (último acceso: 10 de noviembre de 2010).