



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**VALIDACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE
MUESTRAS AMBIENTALES PARA LA DETERMINACIÓN DE
SULFAMETOXAZOL, ATRAZINA Y SUS METABOLITOS, POR MEDIO DE LA
TÉCNICA DE HPLC**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. MARIO RICARDO ISRAEL RODRÍGUEZ VARELA

DRA. BLANCA LUCÍA PRADO PANO
INSTITUTO DE GEOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. Junio 2017



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 está 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 por el Comité Académico para la evaluación del trabajo de tesis de maestría.

Presidente	Dr. José Luz González Chávez
Vocal	Dra. Josefina de Gyves Marciniak
Vocal	Dra. María del Pilar Cañizares Macías
Vocal	Dr. Juan Carlos Durán Álvarez
Secretario	Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero

Esta tesis se realizó en el Instituto de Geología de la UNAM bajo la supervisión de la Dra. Blanca Lucía Prado Pano.

Los resultados de este trabajo fueron presentados en:

- XXX Congreso Nacional de Química Analítica/ AMQA-2017, León, Guanajuato, 20 al 24 de junio del 2017.

Agradecimientos

- A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Posgrado en Ciencias Químicas y al Instituto de Geología de la UNAM por permitirme seguir adelante con mi desarrollo profesional.
- A los miembros del jurado por su tiempo y valiosos comentarios.
- Al CONACYT por el apoyo brindado a través de la beca de maestría otorgada; número de becario: 576720.
- Al apoyo financiero a través del proyecto DGAPA-PAPIIT IN 105715 y al proyecto CONACYT 220489.
- A la Dra. Blanca Lucía Prado Pano por todo el apoyo, experiencia y su valiosa enseñanza.
- Al Dr. Juan Carlos Durán Álvarez por el gran apoyo, esfuerzo y trabajo a lo largo del desarrollo experimental.
- A la Dra. Olivia Zamora Martínez por la determinación de atrazina, 2-hidroxiatrazina y desetilatrazina por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución en muestras de agua de pozo, agua subterránea, agua de manantial y agua residual, así como en el diseño de los experimentos de extracción en fase sólida y las metodologías analíticas desarrolladas.
- Al Laboratorio de Cromatografía del Departamento de Edafología del Instituto de Geología y al Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía-LANGEM de la UNAM, por el uso de sus instalaciones, equipos y materiales para llevar a cabo el desarrollo de la parte experimental del presente trabajo de tesis.
- Al Laboratorio Universitario Nacional (LUNA) y al Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico, UNAM. Por facilitarme el uso de sus instalaciones y del equipo HPLC-MS/QqQ.
- A la Dra. Lucy Mora Palomino, Responsable del Laboratorio de Edafología Experimental.
- A la familia Cornejo-Oviedo del Rancho “Las Palmas” por permitirme el estudio en sus campos.

Índice General	
Índice de tablas	6
Índice de figuras	10
Índice de compuestos	12
Acrónimos	13
Resumen	14
Introducción	16
Hipótesis	17
Objetivos	19
Capítulo I. Antecedentes	21
1.1 Contaminantes ambientales.	22
1.2 Contaminantes emergentes	23
1.3 Tipos de contaminación ambiental	23
1.4 Contaminación del agua	24
1.5 Aguas residuales	25
1.6 Plaguicidas	27
1.7 Productos farmacéuticos	35
1.8 Cromatografía	39
1.9 Técnicas de preparación de muestra	58
1.10 Validación de métodos analíticos	65
Capítulo II. Desarrollo experimental	
2.1 Material y equipo	73
2.2 Validación de método para determinar sulfametoxazol SMX	75
2.2.1 Optimización del espectrómetro de masas	75

2.2.2 Determinación de las condiciones cromatográficas para la determinación de sulfametoxazol	77
2.2.3 Validación del método cromatográfico	79
2.3 Optimización de la extracción en fase sólida (EFS/SPE) para el sulfametoxazol	82
2.4 Optimización de la extracción en fase sólida (EFS/SPE) para la atrazina y sus principales productos de degradación 2-hidroxiatrazina y desetilatrazina	85
2.5 Implementación del protocolo de extracción en fase sólida (EFS/SPE) en matrices reales	91
2.6 Toma de muestras ambientales de SMX, 2-HA, DEA y ATZ	96
2.7 Tratamiento de la muestra previo a la extracción en fase sólida	97
2.8 Evaluación del protocolo de extracción en fase sólida en muestras ambientales	98
2.9 Determinación de la concentración de los analitos de interés en los sitios de estudio A y B en el Valle del Mezquital, Hidalgo	101
 Capítulo III. Resultados y discusión	
3.1 Desarrollo y validación del método para la determinación de sulfametoxazol	104
3.2 Optimización del método de extracción en fase sólida (EFS/SPE) para sulfametoxazol, 2-hidroxiatrazina, desetilatrazina y atrazina	123
3.3 Evaluación del protocolo de extracción para sulfametoxazol en matrices reales	131
3.4 Evaluación del protocolo de extracción para 2-hidroxiatrazina, desetilatrazina y atrazina en matrices reales	136
3.5 Determinación de sulfametoxazol en los sitios de estudio A y B	149
3.6 Determinación de atrazina, 2-hidroxiatrazina y desetilatrazina en el sitio de estudio A	152
Capítulo IV. Conclusiones	153

Capítulo V. Referencias

156

Anexos

169

Índice de tablas

Tabla 1.1 Algunos tipos de contaminantes en el agua	24
Tabla 1.2 Riegos tóxicos y ecológicos de diversos fármacos	26
Tabla 1.3 Pesticidas reportados en aguas naturales y residuales	27
Tabla 1.4 Clasificación de plaguicidas	29
Tabla 1.5 Clasificación de herbicidas	30
Tabla 1.6 Propiedades físicas y químicas de la ATZ, 2-HA, DEA	33
Tabla 1.7 Algunos productos farmacéuticos encontrados en agua	35
Tabla 1.8 Propiedades físicas y químicas del sulfametoxazol	38
Tabla 1.9 Diversas técnicas para la determinación de SMX	38
Tabla 1.10 Clasificación de métodos cromatográficos en columna	41
Tabla 1.11 Algunos métodos de ionización	54
Tabla 2.1 Fragmentos seleccionados para experimentos SIM de SMX y SMR	76
Tabla 2.2. Parámetros optimizados del espectrómetro de masas para SMX y SMR	77
Tabla 2.3 Condiciones cromatográficas para la determinación de SMX	78
Tabla 2.4 Programa de gradiente empleado para la separación de SMX	78
Tabla 2.5 Experimentos de volumen de inyección	79

Tabla 2.6 Variación porcentual de AcCN como disolvente de lavado	83
Tabla 2.7 Condiciones de variación del volumen en la etapa de carga del SMX	84
Tabla 2.8 Condiciones cromatográficas para la determinación de 2-HA, DEA y ATZ	85
Tabla 2.9 Experimentos en la etapa de acondicionamiento y lavado de los cartuchos SPE	86
Tabla 2.10 Determinación del volumen de elución de 2-HA, DEA, ATZ	87
Tabla 2.11 Variación del volumen de disolución de carga de HA, DEA, ATZ	88
Tabla 2.12 Variación de la velocidad de flujo en el cartucho SPE	89
Tabla 2.13 Matrices seleccionadas para ser sometidas al protocolo SPE dependiendo del analito de interés	98
Tabla 2.14 Niveles de concentración utilizados para los analitos de interés en los experimentos de recobros.	99
Tabla 3.1 Áreas determinadas para cada fragmento de SMX	106
Tabla 3.2. Áreas determinadas para cada fragmento de SMR	106
Tabla 3.3. Establecimiento de los iones parentales y de los iones seguidos por MRM	107
Tabla 3.4. Optimización de parámetros del espectrofotómetro de masas	108
Tabla 3.5. Tiempos de retención obtenidos para SMX y SMR al evaluar dos composiciones de fase móvil	109

Tabla 3.6. Tiempos de retención obtenidos para SMX y SMR al evaluar dos gradientes de elución de la fase móvil	110
Tabla 3.7. Evaluación de los volúmenes de inyección de la muestra	111
Tabla 3.8. Condiciones cromatográficas del método desarrollado	112
Tabla 3.9 Parámetros cromatográficos del método desarrollado	113
Tabla 3.10 Análisis de regresión lineal para SMX con n=14	116
Tabla 3.11 Evaluación de los residuales para tres niveles de concentración (n=15)	117
Tabla 3.12 Prueba de hipótesis sobre la pendiente (nivel de confianza $\alpha=0.05$)	118
Tabla 3.13 Prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen (nivel de confianza $\alpha=0.05$)	119
Tabla 3.14. Evaluación de la precisión para tres niveles de concentración (n= 15)	120
Tabla 3.15. Determinación de los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para el análisis de SMX (n=7)	122
Tabla 3.16. Porcentaje de SMX recuperado para MeOH y AcCN	123
Tabla 3.17. Porcentaje de recuperación de SMX utilizando AcCN en 3 concentraciones diferentes	124
Tabla 3.18 Determinación del volumen de ruptura	125

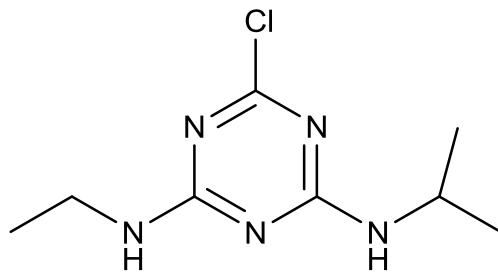
Tabla 3.19 Protocolo de extracción en fase sólida (SPE) para SMX	126
Tabla 3.20 Porcentajes de recuperación de los analitos en las etapas de acondicionamiento y lavado	127
Tabla 3.21. Porcentaje de recuperación para MeOH y AcCN en la etapa de elución	127
Tabla 3.22. Variación del volumen de MeOH para la etapa de elución	128
Tabla 3.23. Determinación del volumen de ruptura	129
Tabla 3.24 Efecto de la velocidad de flujo en la percolación de analitos	130
Tabla 3.25 Recobros individuales para SMX en cada nivel de concentración en las matrices ambientales	134
Tabla 3.26. Valores de los límites de detección y cuantificación instrumentales, así como los adquiridos con la pre concentración con cartucho SPE para SMX	135
Tabla 3.27. Recobros individuales de 2-HA para cada nivel de concentración en las matrices ambientales	139
Tabla 3.28 Recobros individuales de la DEA para cada nivel de concentración en las matrices ambientales	143
Tabla 3.29 Recobros individuales de la ATZ para cada nivel de concentración en las matrices ambientales	147
Tabla 3.30. Valores de los límites de detección y cuantificación instrumentales y los adquiridos con la pre concentración con cartucho SPE para 2-HA. DEA y ATZ	148
Tabla 3.31. Monitoreo de SMX en el sitio A	149
Tabla 3.32 Monitoreo de SMX en el sitio B	151
Tabla 3.33 Monitoreo de 2-HA, DEA y ATZ en el sitio de estudio A	152

Índice de Figuras

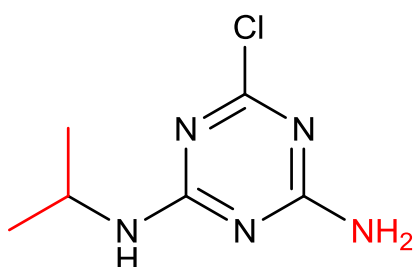
Figura 1.1 Tipos de contaminación con mayor representatividad.	24
Figura 1.2 Estructuras químicas de la atrazina y sus metabolitos de degradación principales.	32
Figura 1.3 Estructura química del sulfametoxazol y algunos de sus metabolitos de degradación	37
Figura 1.4 Representación de algunos parámetros cromatográficos	43
Figura 1.5 Diferentes valores de resolución y su efecto en los picos cromatográficos	45
Figura 1.6 Componentes de un equipo HPLC del Laboratorio Universitario de Nanotecnología Ambiental (LUNA), UNAM	47
Figura 1.7 Instrumentación del detector de arreglo de diodos	51
Figura 1.8 Espectro de masas de la molécula de metanol	52
Figura 1.9 Instrumentación de un espectrómetro de masas	53
Figura 1.10 Proceso de operación de un analizador de masas QqQ en modo MRM	55
Figura 1.11 Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia acoplado a espectrómetro de masas, del laboratorio LUNA, CCADET, UNAM	57
Figura 1.12 Pasos típicos de una técnica de preparación de muestra	59
Figura 1.13 Etapas fundamentales de operación de un cartucho SPE	63
Figura 2.1 Corte lateral del pie de monte	91
Figura 2.2 Localización de los sitios de monitoreo de agua subterránea	92

Figura 2.3 Concentración de carbamazepina en agua residual, a diferentes niveles del acuífero y en el agua de manantial	93
Figura 2.4 Determinación de área total de la parcela A. Coordenadas UTM, B. GPS utilizando Google earth, C. Área utilizando un Teodolito	95
Figura 3.1 Espectro de masas correspondiente al SMX	104
Figura 3.2 Espectro de masas correspondiente a la SMR	105
Figura 3.3 Cromatograma obtenido con las condiciones óptimas de trabajo para una concentración de 1 mg/L de SMX empleando SMR como estándar interno	112
Figura 3.4 Curva de calibración de estándar interno correspondiente al SMX utilizando SMR como estándar interno	114
Figura 3.5 Gráficas para la determinación del factor de concentración experimental para SMX	132
Figura 3.6 Gráficas para la determinación del factor de concentración experimental por ajuste de mínimos cuadrados para 2-HA	138
Figura 3.7 Gráficas para la determinación del factor de concentración por ajuste de mínimos cuadrados para DEA	141
Figura 3.8 Gráficas para la determinación del factor de concentración por ajuste de mínimos cuadrados para ATZ	145
Figura 3.9 Concentración de SMX en diferentes niveles de altitud del piedemonte	150

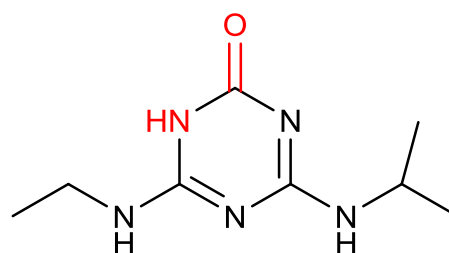
Índice de Compuestos



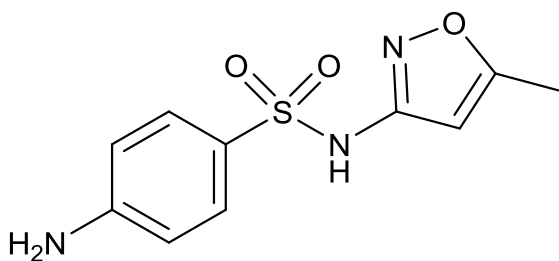
Atrazina
(ATZ)



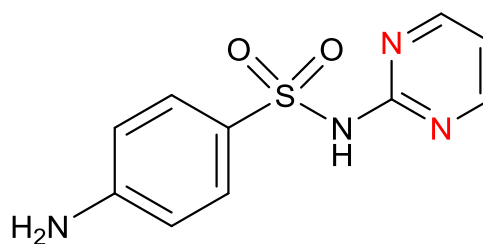
Desetilatrazina
(DEA)



2-Hidroxiatrazina
(2-HA)



Sulfametoxazol
(SMX)



Sulfamerazina
(SMZ)

Acrónimos

SMX	Sulfametoxazol	LDD	Límite de detección
SMR	Sulfamerazina	LDC	Límite de cuantificación
ATZ	Atrazina	% CV	Coeficiente de variabilidad
2-HA	2-hidroxiatrazina	R²	Coeficiente de correlación
DEA	Desetilatrazina	r	Coeficiente de determinación
MeOH	Metanol	H₀	Hipótesis nula
AcCN	Acetonitrilo	H₁	Hipótesis alterna
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia		
DAD	Detector de arreglo de diodos		
MS	Espectrometría de masas		
QqQ	Triple cuadrupolo		
ESI	Ionización por electrospray		
SIM	Monitorio de ion simple		
MRM	Monitoreo de reacción múltiple		
K'	Factor de capacidad		
α	Coeficiente de selectividad		
Rs	Resolución		
SPE	Extracción en fase sólida		

Resumen

Hoy en día, el desarrollo de la calidad de vida de los seres humanos requiere del uso de agentes químicos en áreas primordiales como la agricultura y la medicina a gran escala. Estos agentes son puestos en el ambiente, donde se van acumulando con el potencial de generar daños a la salud. La detección y cuantificación de dichos compuestos en las matrices agua y suelo es el primer paso para diagnosticar el problema y aspirar a prevenir dichos efectos adversos en los seres humanos. Sin embargo, las concentraciones a las cuales dichos compuestos son encontrados en el ambiente, requieren en muchos casos, del uso de técnicas analíticas y de preparación de muestras especializadas.

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue establecer y validar una metodología analítica que permita el monitoreo de un herbicida y un compuesto farmacológico en una zona de producción agrícola ubicada en el pueblo de Tlahuelilpan, dentro de la zona conocida como el Valle del Mezquital, Hidalgo. Considerando que en esta zona la producción agrícola utiliza como base de riego el agua residual proveniente del canal de aguas residuales Tlamaco-Juandhó.

Para ello se implementó un método por la técnica instrumental de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC por sus siglas en inglés) acoplada a un espectrómetro de masas (MS por sus siglas en inglés) y a un detector de arreglo de diodos (DAD por sus siglas en inglés) para la determinación de sulfametoxazol y atrazina con dos de sus principales metabolitos: 2-hidroxiatrazina y desetilatrazina.

Con el fin de purificar, preconcentrar y disminuir los efectos generados por la matriz en las determinaciones de los analitos de interés, se optimizó un método de extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés) como metodología de preparación de muestra.

Con el trabajo realizado se alcanzaron límites de detección del orden ng/L para sulfametoxazol y de µg/L para la atrazina y sus productos de degradación.

A la par del trabajo analítico, se llevó a cabo un muestreo mensual durante un año del canal de riego Tlamaco-Juandhó, agua subterránea y norias en un piedemonte localizado en Tlahuelilpan, Hidalgo. El análisis de las muestras colectadas mediante las técnicas analíticas desarrolladas, hicieron posible la determinación de los compuestos y con ello proponer un patrón de movilidad, del mismo modo es posible sugerir la capacidad de retención que el suelo ejerce sobre el contaminante.

Introducción

Hoy en día, el mundo se encuentra en una condición nunca antes vista, con la gran explosión demográfica generada por la industrialización, particularmente en las grandes ciudades, ha aumentado enormemente la necesidad de potenciar los servicios básicos para la manutención de la calidad de vida de los seres humanos, dentro de los cuales, la alimentación y la salud son indudablemente preponderantes.

Para alcanzar esa capacidad alimentaria tan deseada, se ha recurrido al uso de agentes químicos como los herbicidas en las actividades agrícolas, ya que el uso de este tipo de sustancias permite controlar las malezas, mejorar la producción y por lo tanto, aumentar la cantidad de productos agrícolas. Además, así como se ha incrementado la investigación y producción de alimentos, del mismo modo se ha invertido mucho tiempo de estudio, análisis y producción a una vasta cantidad de productos.

Pese a las grandes ventajas que ofrece estimular estos dos sectores, también es necesario considerar la otra cara de la moneda, toda potencialización de sectores de producción, implica la generación de contaminantes que pueden ser nocivos para la salud.

Existe una gran cantidad de técnicas analíticas que permiten la determinación de estos contaminantes en concentraciones de hasta ng/L, sin embargo, deben aplicarse técnicas de preparación de muestra que permitan disminuir los efectos generados por la matriz sobre dichas determinaciones analíticas, así como ofrecer ventajas de purificación y preconcentración de analitos, esto con el objetivo de brindar una mejor calidad en las cuantificaciones de dichas entidades.

HIPÓTESIS

- Será posible montar y validar la técnica analítica SPE-HPLC-MS/QqQ para la determinación de sulfametoxazol con un nivel de concentración de ng/L en agua residual, agua subterránea y agua de manantial.
- El uso de cartuchos de extracción en fase sólida permitirá disminuir el efecto matriz y preconcentrar el sulfametoxazol, la atrazina, así como los subproductos 2-hidroxiatrazina y desetilatrazina en muestras acuosas provenientes del Valle del Mezquital.
- Con la validación del método SPE-HPLC-MS/QqQ para sulfametoxazol y la optimización de la extracción en fase sólida para atrazina y los subproductos de degradación, será posible monitorear la presencia de los analitos de interés en la zona de producción agrícola del Valle del Mezquital.

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer y validar dos metodologías analíticas por medio de la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) para la determinación de sulfametoxazol (SMX), atrazina (ATZ) y sus principales metabolitos de degradación 2-hidroxiatrazina (2-HA) y desetilatrazina (DEA) en diferentes tipos de agua, con el fin de establecer un monitoreo en la zona del Valle del Mezquital, Hidalgo.

Objetivos particulares

Establecer, optimizar y validar los parámetros del espectrofotómetro de masas, así como la técnica (HPLC) para la determinación de SMX.

Establecer y optimizar un método de extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) para la purificación y pre concentración de SMX, 2-HA, DEA y ATZ que permita disminuir los límites de detección y cuantificación de los analitos, así como minimizar el efecto de la matriz.

Monitorear la presencia de SMX en agua residual, subterránea y de manantial a lo largo del piedemonte ubicado en el pueblo de Tlahuelilpan, Hidalgo en el Valle del Mezquital.

Determinar el SMX presente en una parcela de producción agrícola, la cual es sometida a riego con agua de canal (residual).

Monitorear la presencia de ATZ, 2-HA, DEA en agua subterránea, noria y manantial a lo largo del pie de monte ubicado en el pueblo de Tlahuelilpan, Hidalgo en el Valle del Mezquital.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1. Contaminantes ambientales

A través del desarrollo de la humanidad el hombre se ha adaptado a las diversas condiciones geográficas, climáticas, políticas y sociales con el fin de obtener los mayores beneficios para una vida plena.

Con el descubrimiento de la agricultura aproximadamente en el año 7000 a.C., el hombre comenzó su etapa de sedentarismo y con esto el incipiente desarrollo de las ciudades propiamente establecidas, hasta gradualmente conformar las grandes megalópolis de nuestra era.

Empero, el crecimiento de estas grandes ciudades exhibió su mayor auge hasta la mitad del siglo XVIII con la segunda revolución industrial. En dicha época se inició un gran crecimiento tecnológico, económico y social, que desencadenó en una explosión demográfica nunca antes vista.

La explosión demográfica sin precedentes provocó un aumento en diferentes sectores industriales, siendo la agricultura y el sector salud dos de los aspectos que más se vieron potenciados, aunado a otros como vivienda, transportes y textiles, por mencionar algunos. Esto ha provocado que las cantidades de residuos en el medio ambiente hayan aumentado significativamente; derivando en un problema de interés mundial que es conocido como contaminación ambiental.

1.1 Definición

A principios del siglo XX la contaminación ambiental comenzó a preocupar a la comunidad internacional; pero no fue hasta los años 60's que se iniciaron los acuerdos para establecer regulaciones y leyes internacionales que llevaran a la protección ambiental. El primer acuerdo alcanzado se conoce como el acuerdo de Estocolmo [1,2] en donde se establece como contaminación a "toda aquella sustancia tóxica o no tóxica, así como a la liberación de calor, en cantidad y concentración tales que excedan la capacidad del medio ambiente para hacerlos inocuos" [3].

Dos décadas después, en 1992 se realizó la "Conferencia sobre el medio ambiente y desarrollo" por medio de las Naciones Unidas, en Río de Janeiro, en la

cual se mantuvieron los puntos denominados en la Conferencia de Estocolmo y se enfocó en la necesidad de realizar un desarrollo sustentable [4].

A partir de entonces se ha sucedido una vasta cantidad de definiciones para la contaminación; sin embargo, se ha tomado la definición de Rusell, V.S. como la más válida. Esta definición señala “La contaminación es una actividad del hombre por medio de la adición al agua, aire o suelo, de algún tipo de materia o energía, que directa o indirectamente, tiene un efecto perjudicial sobre organismos o estructuras vivas que se desean preservar o bien que reduce la calidad del agua, aire y suelo para un uso posterior” [5].

1.2 Contaminantes emergentes

Con base en lo mencionado anteriormente, los Estados se han encargado de promulgar leyes, así como establecer normatividades con el fin de clasificar y regular los diversos tipos de contaminantes. Sin embargo, esta labor parece no tener fin, ya que muchos contaminantes aún no cuentan con regulación.

Los contaminantes emergentes son compuestos que no están cubiertos por reglamentos de calidad, ya que no se han estudiado antes o bien no se han podido determinar debido a las bajas concentraciones que exhiben en el medio ambiente; aunado a esto se consideran como amenazantes para los ecosistemas y para el ser humano [6,7].

El grupo de los contaminantes emergentes comprenden un gran número de compuestos como son: fármacos, drogas de abuso, productos de cuidado personal, surfactantes, agentes y aditivos industriales [6].

1.3 Tipos de contaminación

Se han definido muchos tipos de contaminación, algunos con bases científicamente comprobadas y algunos otros siguen en discusión sin embargo, los más representativos se encuentran representados en la figura 1.1



Figura 1.1 Tipos de contaminación con mayor representatividad.

1.4 Contaminación del agua

La calidad del agua ha sido un factor sumamente importante en el bienestar de la humanidad, inclusive en nuestros días la contaminación de fuentes naturales de agua potable sigue ocasionando estragos importantes sobre la población, particularmente en los países en vía de desarrollo. Empero la mayor preocupación sobre la seguridad y calidad del agua es ahora la presencia potencial de contaminantes químicos, dichos contaminantes pueden incluir productos orgánicos, inorgánicos y metales pesados; los cuales pueden ocasionar daños severos a los seres vivos (tabla 1.1) y que son procedentes de fuentes industriales, agrícolas y urbanas [8-11].

Tabla 1.1 Algunos tipos de contaminantes en el agua [6,8]

Contaminantes	Impacto
Elementos traza	Salud, biota acuática, tóxicos
Metales pesados	Salud, biota acuática, tóxicos
Contaminantes inorgánicos	Biota acuática, tóxicos
Fármacos	Calidad del agua, vida acuática
Plaguicidas	Biota acuática, tóxicos, fauna
Bifenilos policlorados	Posibles efectos biológicos

Los compuestos orgánicos han sido detectados en aguas superficiales, subterráneas, potables y aguas residuales durante décadas [12, 13]. Ellos ocupan un papel preponderante en la contaminación del agua ya que han sido encontrados a nivel de trazas, ng/L o µg/L.

1.5 Aguas residuales

Las aguas residuales provienen de la mezcla de diversas fuentes, como agua de uso doméstico, comercial, de procesamiento industrial y alimenticio, agrícola, ganadero, entre muchas otras. Estas aguas contienen una amplia gama de contaminantes orgánicos emergentes, así como metabolitos de transformación [14-17].

Aunado a esto, se han encontrado muchos productos farmacológicos presentes en agua, los cuales son considerados contaminantes emergentes. Estos contaminantes se han encontrado en diversos tipos de agua y son ocasionados por actividades humanas como: residuos de hospitales, crianza de animales, acuicultura, desechos domésticos, entre otros [21].

Los fármacos más comunes y con mayor posibilidad de ser tóxicos o bien de presentar un elevado riesgo ecológico se muestran a en la tabla 1.2.

Tabla 1.2 Riesgos tóxicos y ecológicos de diversos fármacos [22-28].

Fármaco	Tipo de riesgo involucrado
Diclofenaco, ibuprofeno	Afecta a los tejidos de branquias y riñones en peces
Etinilestradiol, zearanolol, 17β-trambolona	Los peces de agua dulce experimentan diferentes niveles de expresión génica
Cloranfenicol, florfenicol, tianfenicol (uso veterinario y acuicultura)	Inhibe el crecimiento de algas
Benzafibrato, carbamacepina, ciprofloxacino, hidroxoclorotiazina, lincomicina, ranitidina, salbutamol y sulfametoxazol.	Inhibe el crecimiento de células embrionicas en seres humanos, así como diversas actividades tóxicas.

1.6 Plaguicidas

Debido a la gran explosión demográfica a nivel mundial durante los últimos 70 años, la agricultura intensiva ha tomado un papel preponderante para alcanzar la producción alimentaria del día a día. Es por ello que los agroquímicos son de vital importancia para potenciar el rendimiento de la superficie, es decir, obtener la mayor producción por hectárea [29].

En México, durante el año 2014 la producción de agroquímicos y fertilizantes aumentó 1 713 746 toneladas, así mismo, el consumo nacional aparente aumentó a 4 403 188 toneladas por año [30].

Dentro de los productos de uso agrícola se han detectado una diversa cantidad de herbicidas, fungicidas e insecticidas (Tabla 1.3), los cuales se encuentran regulados por entidades nacionales e internacionales como la EPA en Estados Unidos y la SEMARNAT en México [14-17].

Tabla 1.3 Pesticidas reportados en aguas naturales y residuales [18-20]

Grupo	Compuesto	Uso común
Carbamatos	Benomil	Fungicida
Cloro acetanilidas	Acetoclor, Alaclor	Herbicida
Ácidos clorofenólicos	2.4-D, bentazona	Herbicida
Organoclorados	Aldin, DDT	Insecticida
Organofosfatos	Metil paratión, diazinona	Insecticida
Piretroides	Malatión, bifentrin	Insecticida
Triazinas	Atrazina, Simazina	Herbicida

1.6.1 Definición de plaguicidas

La SEMARNAT define a los plaguicidas como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destinan a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal, por ejemplo, las que causan daño durante el almacenamiento o transporte de los alimentos u otros bienes materiales, así como las que interfieran con el bienestar del hombre y de los animales. Se incluyen en esta definición las sustancias defoliantes, las desecantes y los coadyuvantes” [31].

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés) define como plaguicida a “cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir a cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales o que pueda ser administrada a los animales para combatir ectoparásitos”. Este término no incluye a fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal y tampoco aditivos alimentarios [33].

1.6.2 Clasificación de plaguicidas

La clasificación de plaguicidas se puede hacer con base en diferentes criterios, es decir, por su naturaleza, estructura química, toxicidad, entre otras características. La SEMARNAT propone la siguiente clasificación (Tabla 1.4) [33].

Tabla 1.4 Clasificación de plaguicidas.

Clasificación de plaguicidas	
Por su naturaleza	Naturales o sintéticos
Organismos que combaten	Herbicida, insecticida, fungicida, ovicida, acaricida, rodenticida, nematocida, molusquicida, defoliantes, bactericidas
Presentación comercial	Polvo, líquido, gas y comprimidos
Persistencia en el ambiente	No persistentes. 0-12 semanas Moderadamente persistentes. 1-18 meses Persistentes. Menos de 20 años Permanentes. Más de 20 años
Toxicidad	Corto plazo. Toxicidad aguda Mediano plazo Largo plazo. Toxicidad crónica
Estructura química	Carbamatos, organoclorados, piretroides, organofosforados, organosulfurados, triazinas, dinitrofenoles, clorofenóxidos, etc.

1.6.3 Herbicidas

Dentro de la clasificación de plaguicidas con base en los organismos que atacan, los herbicidas son de principal interés para el desarrollo del presente trabajo. Los herbicidas son sustancias químicas que se utilizan para eliminar plantas indeseables dentro de un cultivo.

Éstos destruyen las malezas interfiriendo los procesos bioquímicos, como la fotosíntesis, que tiene lugar en el simplasto o sistema vivo de la planta. Para que la acción del herbicida tenga lugar deberá haber suficiente cantidad de ingrediente activo del compuesto para que éste entre en la maleza y sea transportado hasta el lugar de acción adecuado [34].

1.6.4 Clasificación de herbicidas

Al igual que los plaguicidas, los herbicidas también tienen una clasificación que depende del criterio con el cual sean catalogados, esto es por su forma o época de aplicación, superficie tratada, selectividad, entre otros criterios mencionados a continuación (Tabla 1.5) [28, 35].

Tabla 1.5 Clasificación de herbicidas

Clasificación de Herbicidas	
Selectividad	Selectivos y no selectivos
Forma de aplicación	Aplicados por vía foliar o aplicados al suelo
Modo de acción	Por contacto o traslocación y acción bioquímica
Época de aplicación	Pre siembra, pre emergencia y post emergencia
Superficie tratada	Aplicaciones totales, en bandas y dirigidas
Estructura química	Carbamatos, triazinas, etc.

1.6.5 Atrazina

La atrazina es un herbicida selectivo sistémico, del tipo clorotriazina, utilizado como control pre y pos emergente de malezas de hoja ancha y pastos en general, actúa por vía radical como un inhibidor de transporte de electrones en la fotosíntesis de las plantas [33,34].

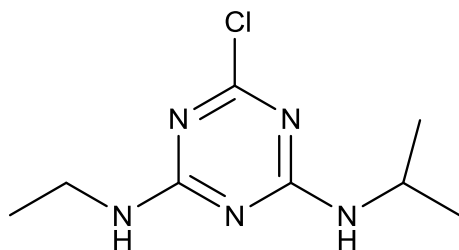
La atrazina (ATZ) y sus metabolitos de degradación que son: desetilatrazina (DEA), deisopropilatrazina (DIA), 2-hidroxiatrazina (2-HA), diaminocloroatrazina (DACT) (Figura 1.2), han sido encontrados en aguas superficiales, aguas subterráneas y aguas residuales, la hidroxiatrazina se encuentra con mayor frecuencia en suelos; generalmente el orden de concentraciones relativo en pozos rurales en Estados Unidos es el siguiente: ATZ = DEA = DACT > DIA > 2-HA. [34].

Es uno de los herbicidas más utilizados a nivel mundial [35]. Este fue introducido en 1958 pero su uso se ha incrementado en los últimos 50 años, principalmente en los cultivos de maíz, sorgo y caña de azúcar [36, 37]. Únicamente en los Estados Unidos se utilizan 1 millón de libras de atrazina aproximadamente, y el 30 % es utilizado para cultivos de maíz [38]. El uso de atrazina incrementa los rendimientos agrícolas, empero esto implica que también puede ocasionar severos daños ambientales, así como de salud en el ser humano [39], es por esto que en octubre del 2003 la Unión Europea prohibió su uso [40].

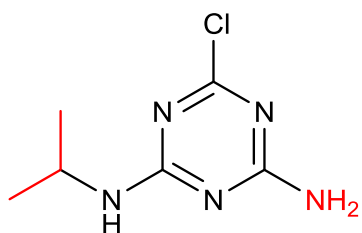
La atrazina y sus principales metabolitos se pueden encontrar distribuidos en el ambiente en el suelo, agua y aire, debido a propiedades como su baja volatilidad, baja afinidad por los componentes del suelo, su relativa alta solubilidad y su elevada persistencia en el medio ambiente que puede ser desde los 10 hasta por más de 10 años, según lo señala Abdelhafid et al., 1997.

Existe evidencia que demuestra que la exposición a la atrazina puede ocasionar daños a la salud tanto en animales como en seres humanos, se ha asociado con cáncer en pulmón, vejiga, colon, ovario, leucemia, en los seres humanos [48, 49] se ha asociado también a problemas reproductivos en roedores machos y

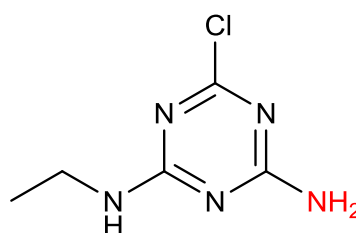
hembras, así como a una mala calidad en el esperma, tanto en roedores como para seres humanos [50, 51].



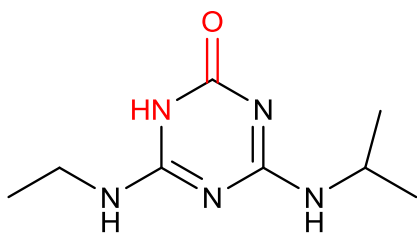
Atrazina



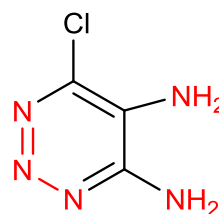
Desetilatrizona



Desisopropilatrizona



2-Hidroxiatrizona



Diaminocloroatrizona

Figura 1.2 Estructuras químicas de la atrazina y sus metabolitos de degradación principales.

En la tabla 1.6 se presentan las propiedades físicas y químicas de la atrazina, así como las propiedades de sus principales metabolitos de degradación, las cuales determinan el destino de la atrazina en el medio ambiente.

Tabla 1.6 Propiedades físicas y químicas de la ATZ, 2-HA, DEA [43].

Propiedades	ATZ	2-HA	DEA
Masa molar (g/mol)	215.8	197.2	187.6
Punto de fusión (°C)	173-177	>310	132-134
Solubilidad (mg/L) en H ₂ O a 20 °C	*35	5.9	2700
Presión de vapor (Pa)	3.8X10 ⁻⁵	1.13X10 ⁻³	1.24X10 ⁻²
Log K _{OW}	2.7	2.09	1.51
pKa	1.62	5.15	1.65

* Este valor fue determinado a 25 °C

1.6.6 Marco legal y uso de la atrazina en México

Como se mostró en los párrafos anteriores, la atrazina se usa a nivel mundial a partir de los años 60's, sin embargo, en México se ha utilizado a partir de 1975 (SAGARPA 2011) y existen diversos productores comerciales del herbicida.

En el año de 1995 la Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes (AMIPFAC) indicó que el 12.8 % de los herbicidas utilizados en México contienen atrazina como ingrediente activo, esto equivale a 2012 toneladas aproximadamente. A través del tiempo se ha importado una mayor cantidad del herbicida, y se considera que en el 2012 se importaron alrededor de 287.8 toneladas del producto provenientes de diversas partes del mundo; aunado a ello se ha estimado que en el año 2003 en México se aplicaron aproximadamente 1 078 t [36, 37].

Pese a su amplia aplicación en zonas de cultivo de varios estados del país, el uso de este herbicida no está regulado y su aplicación está permitida sin restricción alguna, tampoco existen guías que establezcan límites para su uso.

En México se han realizado algunos estudios sobre el uso de este plaguicida en numerosos campos de cultivo en diferentes estados de la república, además se ha monitoreado su presencia en cuerpos de agua superficial y subterránea [36, 37]. En estudios más recientes se han realizado estudios sobre el destino, la movilidad, los fenómenos de sorción y degradación de atrazina en arcillas, particularmente en suelos agrícolas [35-39].

Es también conocido que la cantidad de atrazina detectada está directamente relacionada con las prácticas agrícolas convencionales como muchos otros plaguicidas utilizados y especies que se encuentran de forma natural en el medio ambiente [52]. Es por esto que el gran reto para mejorar su determinación tiene como base la implementación de un método de preparación de muestra, que permita purificar las muestras, aislando así a la atrazina y algunos subproductos de degradación, del mismo modo será importante preconcentrar los analitos de interés con el fin de brindar un resultado cuantitativo de mucha mejor calidad.

1.7 Productos farmacéuticos

Dentro de los productos concebidos como contaminantes emergentes, los productos farmacéuticos son uno de los grupos que mayor interés han despertado, dichos productos proceden de diferentes fuentes, ya que son utilizados de forma extensiva en la medicina humana y veterinaria, esto incrementó el interés en la cuantificación de dichos productos en ambientes acuáticos naturales, aguas subterráneas, ríos, lagos, aguas residuales y en plantas de tratamiento [53, 54, 57]. Sin embargo, la presencia de dichos productos se observa predominantemente en las aguas residuales, ya que puede proceder de procesos de manufactura, zonas residenciales, desechos de hospitales, entre otras [55-57]. Algunos de los fármacos que han sido encontrados en medios acuáticos se muestran en la Tabla 1.7.

Tabla 1.7 Algunos productos farmacéuticos encontrados en agua [58-59]

Productos farmacéuticos	Sustancias
Bloqueadores β	Propranolol
Disruptores endócrinos	Etinil estradiol
Antimicrobianos	Eritromicina, Sulfametacina, Ciprofloxacino
Analgésicos	Ibuprofeno, Naproxeno

Los fármacos pueden presentar un alto impacto biológico en el medio ambiente, ya que la presencia permanente de antibióticos en pequeñas cantidades produce el desarrollo de genes con resistencia natural a dichos productos, lo cual complica el tratamiento de enfermedades normalmente curadas con el antibiótico en cuestión en humanos y animales [58, 59].

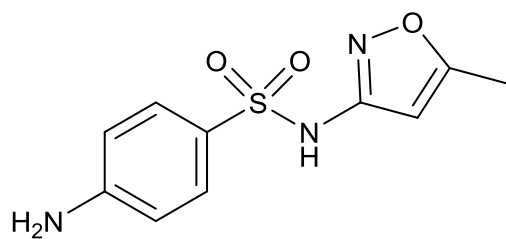
1.7.1 Sulfametoxazol

Dentro de los productos farmacéuticos desarrollados, aquéllos que presentan una actividad antimicrobiana, comúnmente llamados antibióticos, forman un amplio grupo de compuestos que son usados diariamente para el abatimiento de enfermedades causadas por bacterias y protozoarios; en seres humanos y en animales. En la Unión Europea para el año de 1999 se determinó que la cantidad total de antibióticos utilizados fue de 12 752 toneladas, donde 7 659 fueron empleadas en consumo humano y 5 093 de uso veterinario [57-62].

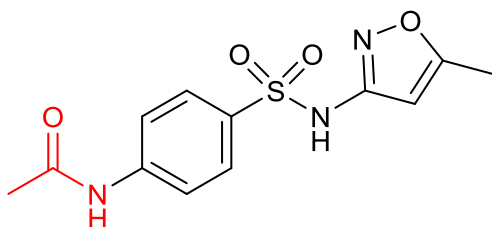
El sulfametoxazol (SMX) es un antibiótico sintético del tipo sulfonamida que se utiliza para la eliminación de bacterias de diversas enfermedades como: infecciones en vías urinarias, otitis media y junto con el ciprofloxacino se utiliza como tratamiento para combatir la *Pneumocystis carinii* en las personas portadoras del virus del VIH [57, 58]. En países en vía de desarrollo se emplea, junto con trimetoprima, para el tratamiento de infecciones por helmintos. El SMX actúa como inhibidor competitivo del ácido p-amino benzoico para prevenir la síntesis de ácido fólico en bacterias [59,60].

Aproximadamente del 45-70 % de las dosis de SMX son excretadas vía urinaria en 24 horas, empero solamente el 15-25 % mantiene su estructura química, el 43 % se encuentra como N4-acetil sulfametoxazol, del 9-15 % como N1-glucorinida sulfametoxazol y del 4-10 % en otros tres metabolitos, de los cuales el mayoritario es el N4-hidroxi sulfametoxazol (Figura 1.3) [60, 61]. Muchos de éstos son hidrolizados en la misma red de agua residual y retorna a su forma original como sulfametoxazol.

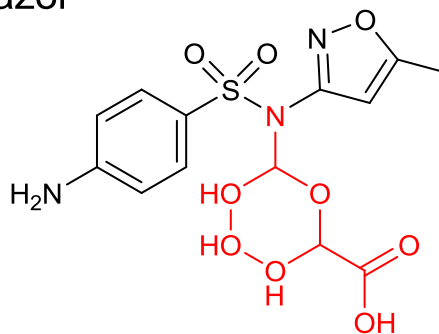
Es por ello que se han optimizado métodos cromatográficos de identificación y cuantificación de sulfametoxazol en diversas matrices acuáticas naturales. Empleando varias técnicas de preparación de muestra como se muestra en la Tabla 1.9.



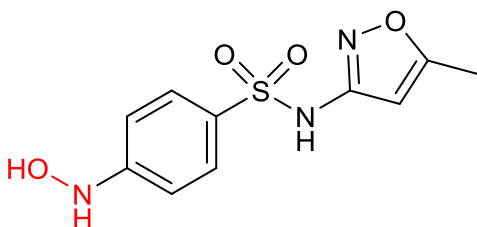
Sulfametoxazol



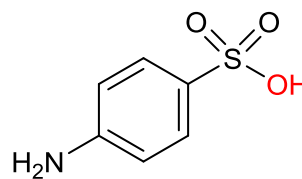
N4-acetil sulfametoxazol



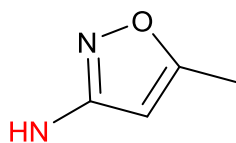
N1-glucorinida sulfametoxazol



N4-hidroxi sulfametoxazol



Ácido sulfanílico



3-amino-5metil isoxazol

Figura 1.3 Estructura química del sulfametoxazol y algunos de sus metabolitos de degradación.

En la Tabla 1.8 se muestran las propiedades químicas y físicas del sulfametoxazol.

Tabla 1.8 Propiedades físicas y químicas del sulfametoxazol [67].

Propiedades	SMX
Masa molar (g/mol)	253.27
Punto de fusión (°C)	167
Solubilidad (mg/L) en H ₂ O a 37 °C	610
Presión de vapor (Pa)	6.24X10 ⁻⁶
Log K _{ow}	0.89
pKa's	1.6, 5.7

Tabla 1.9. Diversas técnicas de para la determinación de SMX

Matriz	T. de muestra	Análisis	LDD (ng/L)	Ref
P.T.A.R.	SPE (OASIS HLB)	CG-MS	0.5	116
Agua residual	Derivatización MTBSTFA	CG-MS	55	117
Agua residual	SPME (CW/DVB)	CL-MS	9000	114
Agua residual y manantial	SPE (Strata-X)	CL-MS	10 y 50	113
P.T.A.R. y hospital	SPE (Waters HLB)	CL-ESI+-MS/MS	5	118
Agua residual	SPE (pH=4)	CL-ESI+-MS/MS	55	119
P.T.A.R. manantial y Mili-Q	SPE (OASIS HLB)	CL-MS/MS	4.9 y 5.1	120
P.T.A.R.	SPE (OASIS HLB, Strata-X, Supelco c8-c18)	CL-MS/MS	241-553	121

P.T.A.R. Planta de tratamiento de agua residual

1.8 Cromatografía [70-77]

Del gran arsenal de técnicas analíticas que se utilizan para realizar el análisis de una muestra, los químicos han desarrollado metodologías con el fin de incrementar la capacidad de analizar concentraciones cada vez más bajas y en matrices más complejas. Sin embargo, las técnicas analíticas instrumentales generalmente sufren de una baja selectividad, por esta razón, muchos de los procedimientos necesitan lograr una separación entre el analito de interés y las posibles sustancias que actúan como interferentes; algunos de estos métodos son: enmascaramiento, precipitación química o electrolítica, destilación, extracción con disolventes, intercambio iónico, electroforesis y cromatografía [74].

1.8.1 Definición y principio de funcionamiento

La International Union of Pure and Applied Chemistry, (IUPAC, por sus siglas en inglés) define a la cromatografía como “método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales permanece en reposo (fase estacionaria), mientras que la otra se mueve en una dirección definida (fase móvil)”.

La cromatografía es un proceso en el cual los componentes de una mezcla son separados para su identificación y cuantificación en estado líquido o gaseoso. El principio básico de la cromatografía es el equilibrio de reparto de concentraciones entre dos fases inmiscibles entre sí.

La separación de las sustancias puede explicarse de la siguiente manera: Considerando que las moléculas de interés son acarreadas por la fase móvil, tanto las moléculas como la fase móvil tienen la misma velocidad media hasta que las moléculas entran en contacto con la fase estacionaria, esto provoca un decremento en la velocidad media de las moléculas, separándolas así de la fase móvil. El cambio en las velocidades es provocado por las diferentes afinidades de

un analito por alguna de las dos fases por lo cual, para los componentes de una mezcla la velocidad media será diferentes dentro del sistema [75-77].

1.8.2 Clasificación de métodos cromatográficos.

Las técnicas cromatográficas tienen dos clasificaciones fundamentales.

- *Cromatografía en columna*, en este tipo de cromatografía la fase estacionaria se mantiene dentro de un tubo angosto y la fase móvil se hace pasar a través de él por gravedad o con presión.
- *Cromatografía plana*, en ella la fase estacionaria está sujeta por una placa plana o en los poros de un papel; en este caso la fase móvil pasa a través de la fase estacionaria por gravedad o bien por efecto de capilaridad.

Dentro de los métodos cromatográficos en columna, se tiene una clasificación que considera la naturaleza física de las dos fases involucradas como se muestra en la Tabla 1.10.

Tabla 1.10 Clasificación de métodos cromatográficos en columna

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de gases (GC)	a. Gas-Líquido (GLC)	Líquido adsorbido/unido a una fase sólida	Partición entre gas y líquido
	b. Gas-Sólido (GSC)	Sólido	Adsorción
Cromatografía de líquidos (LC)	a. Líquido-Líquido (partición) (LLC)	Líquido adsorbido/unido a una fase sólida	Partición entre líquidos inmiscibles
	b. Líquido-Sólido (adsorción) (LSC)	Sólido	Adsorción
	c. Intercambio iónico (IC)	Resinas intercambiadoras	Intercambio Iónico
	d. Exclusión molecular (SEC)	Líquido en intersticios de un sólido polimérico	Partición/tamizado
	e. Afinidad	Líquido con un grupo específico unido a una superficie sólida	Partición entre superficie líquida y líquido móvil.
Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC)		Especies orgánicas unidas a una superficie sólida	Partición entre fluido supercrítico y superficie unida

1.8.3 Definiciones y parámetros cromatográficos

Dado que la naturaleza de los cromatogramas depende de una gran variedad de aspectos como pueden ser: la inyección de la muestra, el tipo de columna, o bien su interacción con el analito, la fase móvil, el detector, entre otras, es necesario comprender algunas definiciones y parámetros que hacen posible el desarrollo óptimo de las técnicas cromatográficas.

Tiempo de retención (t_r). Es el tiempo que pasa el analito en la columna, es decir, es el tiempo transcurrido desde que el analito es inyectado hasta la detección del máximo del pico; su magnitud suele ser utilizada para la identificación de compuestos. Suelen ser utilizados para generar perfiles de identidad, empleando sustancias de referencia; empero no son valores únicos, por lo cual no es posible establecer su identidad con toda certeza.

Tiempo muerto (t_0). Es el tiempo transcurrido para un analito que no se retiene en la fase estacionaria.

Tiempo de retención corregido (t_r'). Mide el tiempo que el analito permanece en la fase estacionaria, se determina con la siguiente ecuación.

$$t_r' = t_r - t_0 \quad (3)$$

Ancho de la base (w_b). Es la porción de la línea base intersectada por las tangentes de mayor pendiente de la curva; para un pico de distribución gaussiana se define como cuatro veces la desviación estándar 4σ , este valor es empleado para medir la eficiencia del sistema.

Ancho a la mitad de la altura de la base ($w_{1/2}$ o $w_{0.5}$). Es el ancho del pico medida a la mitad de la altura del pico, es una medida más reproducible para evaluar la eficiencia del sistema de forma manual.

En la Figura 1.4 se puede observar la representación de los parámetros cromatográficos mencionados en los párrafos anteriores.

Existen además otros conceptos que permiten la comprensión de la cromatografía en términos de su eficiencia, ya que ésta es sumamente necesaria para establecer la funcionalidad de la técnica cuando se tienen 2 o más compuestos de interés.

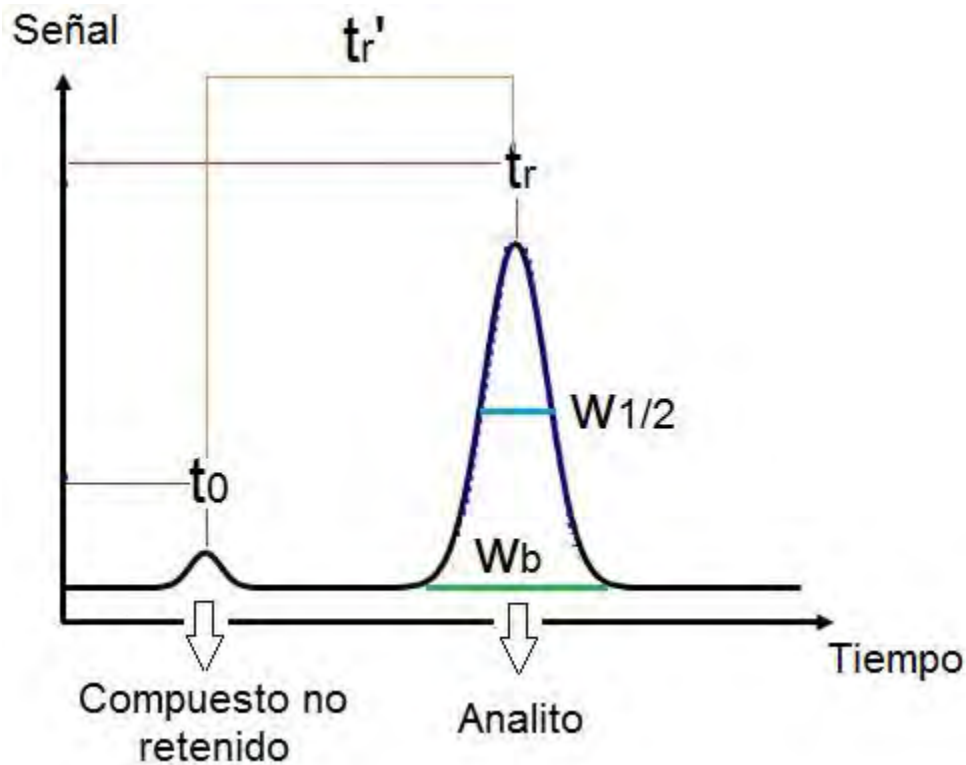


Figura 1.4 Representación de algunos parámetros cromatográficos

Número de platos teóricos (N). El plato teórico representa un equilibrio teórico de distribución del analito entre las fases, mientras mayor es el número de platos teóricos mayor será el poder de separación de una columna, es posible determinarlos mediante la siguiente ecuación.

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{W_b} \right)^2 = 5.545 \left(\frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (4)$$

Altura equivalente a un plato teórico (H, HETP). Se denomina altura de un plato teórico a la distancia que se mueve un analito para alcanzar un equilibrio, por ende, mientras menor sea la altura de un plato teórico, mayor será la cantidad de equilibrios que un analito puede alcanzar, dando lugar a un pico mejor definido y una mayor eficiencia.

$$H = \frac{L}{N} \quad (5)$$

Factor de retención o de capacidad (k'). Se define como la razón de la cantidad de analito en la fase estacionaria entre la cantidad de analito en fase móvil al equilibrio, es una relación de la cantidad de analito entre fases, en otras palabras es una medida de la retención del analito por la columna.

$$k' = \frac{t'_r}{t_0} = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (6)$$

Factor de selectividad (α). Es la diferencia en los equilibrios de distribución entre dos analitos, esto quiere decir que mide las diferencias relativas de las interacciones de ambos analitos con la fase estacionaria, es decir, mide la habilidad de una columna para separar dos componentes

$$\alpha = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}} = \frac{t_{r2} - t_0}{t_{r1} - t_0} \quad (7)$$

Cuanto mayor es el factor de selectividad, mayor es la separación entre ambos componentes, esto indica que el valor de $\alpha > 1$, para garantizar una buena separación.

Resolución (Rs). Está definida como el grado de separación entre dos picos adyacentes. Es la distancia entre los centros de los picos, dividida entre el ancho

promedio de los picos. Esto quiere decir que es la medida cuantitativa del grado de separación entre dos analitos.

$$R_s = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (8)$$

Donde la resolución mínima aceptable para mezclas relativamente sencillas es mayor o igual a 1 y se tiene el 95.44 % de separación, una resolución de 1.5 se puede considerar como una separación a nivel de línea base (Figura 1.5).

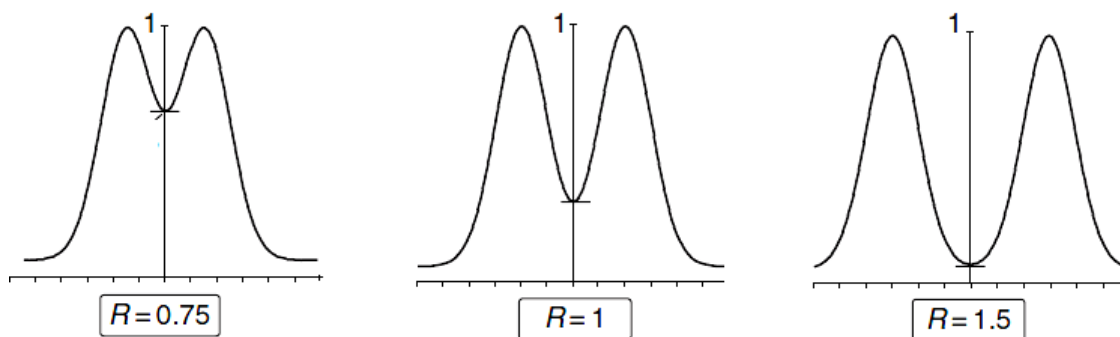


Figura 1.5 Diferentes valores de resolución y su efecto en los picos cromatográficos [81].

La resolución depende íntimamente de tres parámetros: el número de platos teóricos (**N**), es decir, la eficiencia, el factor de retención (**k'**) y el factor de selectividad (**α**). La optimización de estos tres parámetros incrementa la eficiencia de una columna cromatográfica y está descrita por la siguiente ecuación.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{1 + k'} \right) \quad (9)$$

De la ecuación anterior se pueden inferir tres conclusiones:

- Cuando existe una mayor retención del analito por la fase estacionaria, es decir k' aumenta, la resolución aumenta, un factor de capacidad $k' > 2$ genera una mejor separación.
- Cuando una columna tiene una buena capacidad de separar dos analitos, es decir, el factor de selectividad (α) aumenta, la resolución cromatográfica aumenta notablemente, se requieren valores de $\alpha = 1$ o $\alpha > 1$ para mejorar sensiblemente la separación cromatográfica.
- Se desea que exista un mayor número de equilibrios de distribución posibles para mejorar una separación cromatográfica, esto se logra aumentando el número de platos teóricos (**N**).

1.8.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR/HPLC) [81]

La cromatografía de líquidos HPLC, es una de las técnicas cromatográficas que tiene un amplio campo de aplicación, ya que realiza purificaciones y separaciones eficientes, las cuales permiten detectar y cuantificar una vasta cantidad de muestras del tipo: orgánicas, inorgánicas y biológicas; en matrices que pueden tener un alto grado de complejidad.

Es una técnica particularmente utilizada con analitos termolábiles, con gran polaridad o bien de elevado masa molar. Aunado a esto, requiere el uso de presiones elevadas para forzar el paso de disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, lo cual produce separaciones con gran resolución.

1.8.4.1 Instrumentación general

Los equipos HPLC tienen diversos componentes integrados en una sola unidad con funciones específicas (Figura 1.6).

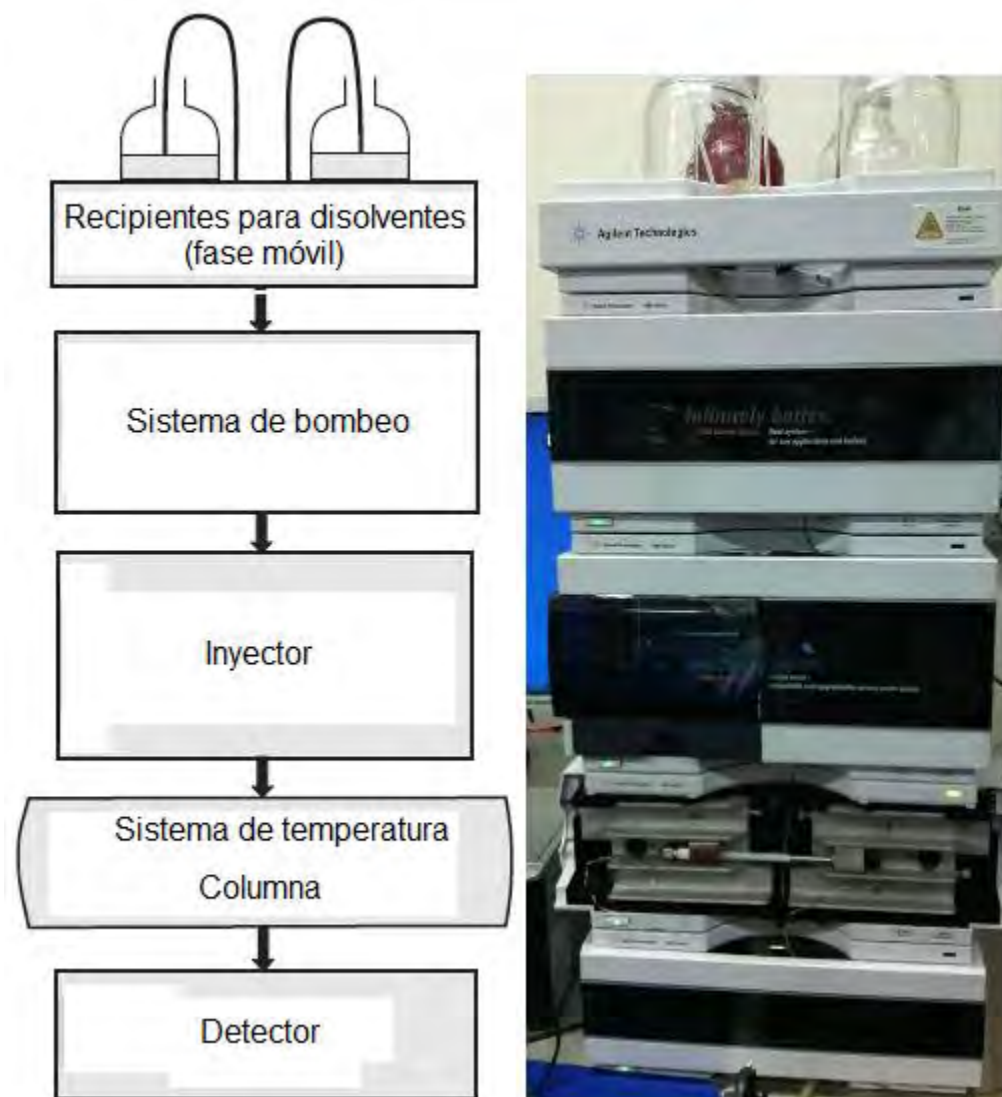


Figura 1.6 Componentes de un equipo HPLC del Laboratorio Universitario de Nanotecnología Ambiental (LUNA), UNAM.

Los componentes fundamentales de un equipo HPLC son los siguientes:

Recipientes para la fase móvil. Son recipientes de material inerte a la fase móvil generalmente de vidrio; equipados con mangueras para introducir los disolventes al cromatógrafo. Éstos tienen instalados unos filtros para evitar el paso de partículas en el sistema cromatográfico.

Sistema de bombeo. El sistema de bombeo se encarga de la regulación del caudal y presión de la fase móvil, para conocer la calidad de una bomba HPLC es necesario saber si el flujo es constante, reproducible y controlado, lo cual

determina el grado de estabilidad. Se utilizan bombas de alta presión diseñadas para mantener el caudal sin pulsos, estas bombas pueden estar conformadas por uno o dos pistones que funcionan en oposición para evitar las interrupciones del caudal.

La elución de la muestra puede ser de dos tipos:

Isocrática. Cuando la composición de la fase móvil no se modifica durante la elución.

Gradiente de elución. Cuando la composición de la fase móvil varía durante la elución, en general se utilizan dos o más disolventes con diferentes polaridades programados con cambios en su composición.

Sistema de inyección. Es el dispositivo que permite introducir la muestra en el sistema cromatográfico. La inyección de un volumen preciso de muestra en el inicio de la columna debe ser realizada lo más rápido posible, con el fin de disminuir la perturbación causada por la corriente de circulación de la fase móvil, esto se realiza con una válvula de alta presión, dicha válvula funciona en dos posiciones; la primera está entre la bomba y la columna en la posición de carga, donde se llena el bucle que contiene la muestra a presión atmosférica y la segunda es en la posición de inyección, en la cual se coloca el bucle que contiene la muestra dentro del flujo de la fase móvil.

Columna cromatográfica. Las columnas son la parte esencial de la cromatografía, ya que es ahí donde ocurre la separación. Para HPLC las columnas son tubos rectos de acero inoxidable que miden entre 3 y 15 cm de longitud y generalmente están recubiertas en el interior por un material inerte (vidrio), el diámetro interno de la columna suele estar estandarizado en 4.6 mm y finalmente está recubierta por una fase estacionaria de estructura química variable.

Para seleccionar una columna cromatográfica se deben tomar en cuenta los siguientes aspectos: el empaquetamiento de la columna debe tener la estructura química adecuada para realizar la separación y las propiedades físicas de la columna, es decir, el tamaño de la partícula, longitud y diámetro de la columna.

Horno o controlador de temperatura. Aunque es poco usual emplear el horno en un equipo HPLC ya que suele trabajarse a temperatura ambiente, es posible disminuir los tiempos de retención y mejorar la resolución de los analitos al aumentar la temperatura, empero esto reduce el tiempo de vida de la columna.

Sistema de detección. Es el dispositivo que mide y transforma una propiedad de la fase móvil en una señal eléctrica, dicha propiedad se altera por la presencia de los analitos en la fase móvil.

El detector debe cumplir las siguientes características básicas: debe tener una alta sensibilidad y de ser posible una gran selectividad, la señal de medición es proporcional a la concentración del analito; preferentemente debe determinar una cantidad mínima detectable, estable con respecto al ruido y con un intervalo lineal grande, finalmente debe tener una baja sensibilidad a variaciones de flujo, presión, temperatura y corriente eléctrica.

Existe una amplia variedad de detectores, los cuales son utilizados dependiendo de las propiedades químicas que los analitos poseen. Los detectores más utilizados en cromatografía de líquidos son: Captura de electrones (EC), índice de refracción (RI), ultravioleta-visible (UV-Vis) y acoplando la técnica de espectrometría de masas MS.

Sistema integrador. Es un sistema para el tratamiento y la amplificación de la señal, cambia la señal analógica en una digital.

1.8.4.2 Detectores de UV-Vis [82]

Dentro de los detectores utilizados en cromatografía de líquidos, los detectores espectrofotométricos de UV-Vis son de los más utilizados. El principio básico está fundamentado en la interacción que existe entre la materia y la radiación electromagnética de alta energía. Donde las moléculas cromóforas y/o que contienen conjugación de enlaces pueden presentar transiciones electrónicas entre los orbitales atómicos o moleculares, a partir de los cuales se puede obtener espectros que son proporcionales a la concentración del analito de interés. Existen detectores de longitud de onda fija, de longitud de onda variable y de barrido de longitud de onda.

El uso cuantitativo está fundamentado en la ley de Lambert-Beer, la cual establece que la absorbancia de una disolución es directamente proporcional a la concentración del analito presente en dicha disolución.

$$A = \epsilon l C \quad (11)$$

Donde A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de absorptividad molar que es característico para cada sustancia, l es la longitud del camino óptico y finalmente C es la concentración de la sustancia absorbente.

Los detectores de barrido de longitud de onda emplean un arreglo de diodos, este arreglo permite la determinación de un intervalo amplio de longitudes de onda.

1.8.4.2.1 Instrumentación del detector por arreglo de diodos (DAD)

La fuente de radiación electromagnética es enfocada y pasa a través del obturador, instrumento que regula el paso de luz, después éste incide sobre la muestra y es reenfocada al policromador, el cual dispersa la luz hacia el arreglo de diodos, el cual determina el intervalo de longitudes de onda. La instrumentación del detector de arreglo de diodos se muestra en la Figura 1.7.



Figura 1.7 Instrumentación del detector de arreglo de diodos [83]

1.9 Espectrometría de masas [81-84]

La espectrometría de masas (**MS**) es una técnica analítica de caracterización de materia, está basada en la determinación de la masa molecular o atómica de las especies individuales presentes en una muestra. El continuo desarrollo de la espectrometría de masas la ha transformado en una de las técnicas más versátiles, siendo la técnica más sensible y por ende con mayor demanda en prácticamente todas las ramas de la química y otras ciencias.

1.9.1 Principio de funcionamiento

La muestra es transformada en fase gaseosa o en una forma adecuada, posteriormente es ionizada para obtener especies cargadas, las cuales son sometidas a la acción de un campo eléctrico y/o magnético en una cámara de alto vacío. El estudio de las fuerzas ejercidas sobre los iones permite la determinación de su relación masa/carga y eventualmente de su naturaleza estructural al promover la fragmentación específica de una molécula.

Finalmente se obtiene como resultado un gráfico denominado espectro de masas y presenta la forma de abundancia de los iones formados en función del orden creciente de su relación masa/carga (Figura 1.8).

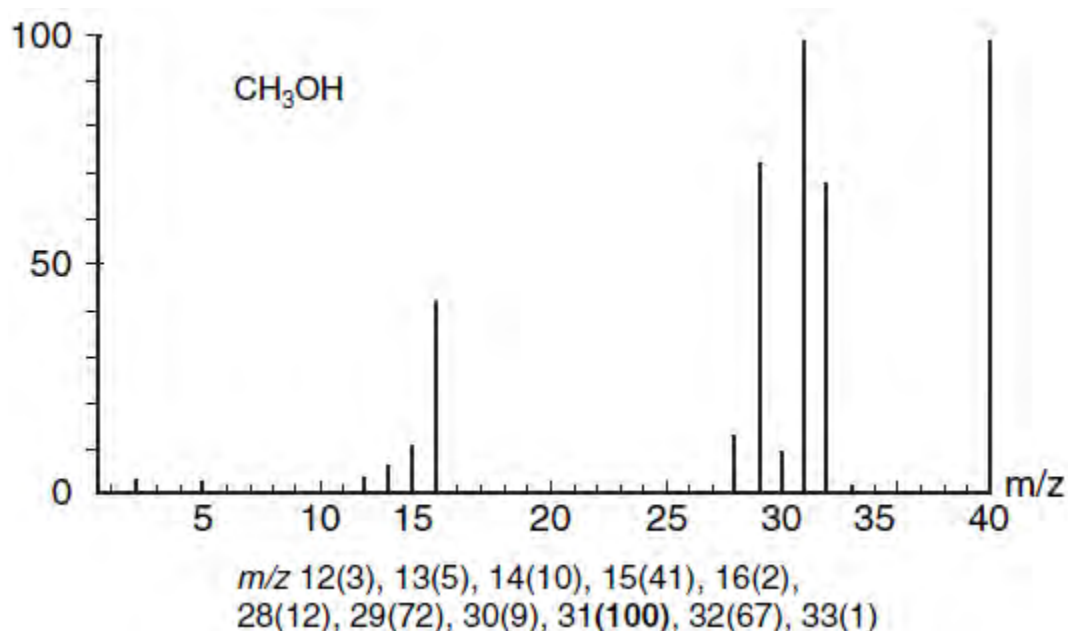


Figura 1.8 Espectro de masas de la molécula de metanol [81]

Es un método destructivo de análisis, empero tiene una gran sensibilidad y requiere una mínima cantidad de muestra.

La abundancia de iones puede obtener de dos formas diferentes, la primera es aquella que permite obtener un espectro de fragmentación que contiene a todos los iones formados, agrupados por su masa nominal, la segunda forma permite obtener un espectro de masas correspondiente a un intervalo definido.

1.9.2 Instrumentación de un espectrómetro de masas [85]

El espectrómetro de masas está conformado por cuatro partes fundamentales, las cuales se muestran en la figura 1.9

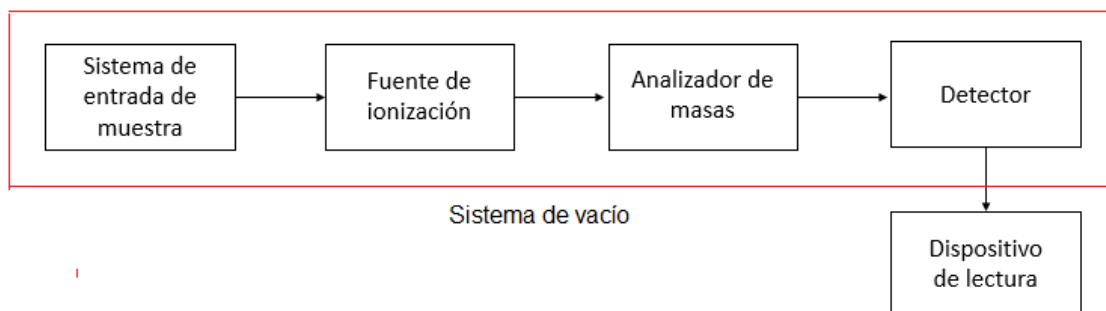


Figura 1.9 Instrumentación de un espectrómetro de masas

Sistema de entrada de muestra. El objetivo de este sistema es permitir la entrada de una muestra en la fuente de ionización. Hoy en día existen de forma general tres tipos de sistemas de entrada que son: sistemas indirectos, en ellos la muestra se volatiliza externamente y se introduce en la región de ionización a bajas presiones, sistemas por sonda directa en los cuales los líquidos y sólidos no volátiles se introducen a través de una sonda al sistema de ionización y sistemas acoplados a cromatografía y electroforesis capilar.

Sistema de ionización. La cámara de ionización es la encargada de transformar los componentes de una muestra en iones, donde se obtiene un haz de iones positivos o negativos que posteriormente son acelerados. Existe una amplia variedad de fuentes de ionización tanto para gases-masas como para líquidos-masas (Tabla 1.11), dicha fuente depende del tipo de muestra que se desea analizar y de forma general se clasifican en dos tipos:

Fuentes duras de ionización. Es cuando se utiliza una energía elevada de bombardeo, por lo cual los iones formados tienen niveles vibracionales y rotacionales muy elevados. La relajación de estos iones produce una gran cantidad de fragmentación y espectros de masas de gran complejidad, los cuales permiten la identificación inequívoca de un compuesto.

Fuentes blandas de ionización. Se usan energías bajas sobre las especies por lo cual la excitación de los iones es menor, lo que se traduce en poca fragmentación

y espectros de masa sencillos, sin embargo, esto permite la determinación exacta de la masa molecular de un compuesto.

Tabla 1.11 Algunos métodos de ionización [81]

Método de ionización	Introducción de la muestra	Características del método
Impacto electrónico (EI)	GC o sonda líquido-sólido	Método duro, versátil para analitos pequeños, volátiles
Ionización química (CI)	GC o sonda líquido-sólido	Método suave y pico de ión molecular $[M+H]^+$
Electrospray (ESI)	LC o jeringa	Método suave. Iones tienen cargas múltiples, analitos no volátiles.
Desorción de matriz asistida por láser (MALDI)	Muestra mezclada en matriz sólida	Método suave y masas muy altas como proteínas y péptidos

Analizador de masas. La función principal del analizador de masas es separar los iones producidos en función de la relación masa/carga, idealmente deben ser capaces de cumplir dos funciones básicas. La primera es permitir el paso del suficiente número de iones para dar lugar a corrientes de iones fácilmente medibles y la segunda es distinguir entre diferencias muy pequeñas de masa.

La capacidad que tiene el espectrómetro para diferenciar a dos masas es denominada poder de resolución y se considera que están separados si la altura del valle entre ellos no es más que un porcentaje de su altura, usualmente 10 %.

Los espectrómetros son clasificados según el principio de operación del analizador de masas y éstos pueden ser: analizadores de sector magnético, geometrías

especiales, tiempo de vuelo (TOF), analizadores de trampa de iones, de transformada de Fourier (FT), cuadrupolo y triple cuadrupolo.

1.9.2.1 Espectrometría de masas multidimensional MS-MS. Triple cuadrupolo (QqQ)

Los sistemas de espectrometría de masas multidimensionales o *tándem* son usados cuando se analiza una muestra de elevada complejidad como son: muestras biológicas, alimentos, aguas residuales, entre otras. La gran ventaja de este tipo de sistemas es el incremento de la relación señal/ruido, esto se traduce como un aumento en la especificidad del sistema, lo que permite realizar un análisis cuantitativo de un analito objetivo a nivel de trazas.

El analizador QqQ permite la filtración específica del ion seleccionado del analito en el primer cuadrupolo (Q1) el cual, al pasar a través de un segundo cuadrupolo (q2) incrementa de su energía interna provocando su disociación y la formación de iones-fragmento y son filtrados al tercer cuadrupolo, donde sufren un proceso de selección específico, siendo el/los analitos seleccionados los únicos capaces de ser detectados, dicho proceso se muestra en la Figura 1.10.

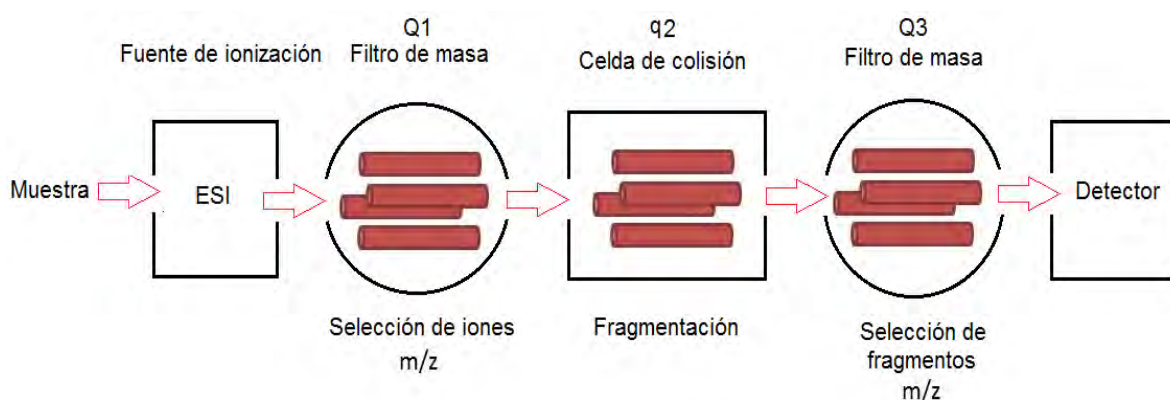


Figura 1.10 Proceso de operación de un analizador de masas QqQ en modo MRM.

La configuración del triple cuadrupolo proporciona diferentes modos de adquisición, que son capaces de brindar información estructural, así como un análisis cuantitativo. Dentro de las diversas configuraciones, existen tres que son preponderantes en el análisis cuantitativo a nivel de trazas, éstas son las siguientes:

- Barrido completo (*full scan*). Esta configuración permite hacer un barrido completo de los analitos, arrojando como resultado un espectro de masas que presenta el ion molecular y sus diferentes iones-fragmento.
- Barrido de ion seleccionados (*SIM*). Este modo de adquisición es sumamente utilizado para el análisis de analitos objetivo, ya que solamente permite el paso de uno o más iones de forma específica.
- Monitoreo de reacción múltiple (*MRM*). La adquisición mediante este tipo de experimentos es muy importante, ya que al usarla correctamente permite incrementar la selectividad, selectividad y especificidad. A diferencia del modo SIM, el modo de adquisición MRM es capaz de registrar transiciones entre pares de iones, donde uno de ellos es un ion precursor y el otro un ion producto; siempre y cuando estos iones sean estables y abundantes en el espectro de masas del analito.

Detectores. El detector convierte el haz de iones generado en una señal eléctrica que puede ser procesada y almacenada. Al recibir el impacto de las partículas cargadas en un cátodo emisor, éste a su vez emite electrones que son acelerados a un dínodo para producir varios electrones más por cada impacto, lo cual se traduce en una corriente amplificada y se lleva a un sistema de registro.

1.10 Acoplamiento de técnicas cromatográficas y espectrometría de masas [81, 86, 87]

Si bien la espectrometría de masas ha brindado grandes resultados en la elucidación e identificación de compuestos puros, los espectros obtenidos de

mezclas son sumamente complejos. Debido a esto para analizar muestras complejas es necesario el acoplamiento de esta técnica con otras que poseen un mayor poder de separación como la cromatografía.

En este tipo de acoplamientos el espectrómetro de masas cumple con la función de un detector que potencia la sensibilidad, selectividad y especificidad de las técnicas cromatográficas (Figura 1.11).



Figura 1.11 Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia acoplado a espectrómetro de masas, del laboratorio LUNA, CCADET, UNAM

Este tipo de acoplamientos con cromatografía de gases y líquidos es una de las herramientas más poderosas y ampliamente utilizadas por los químicos para el análisis cuantitativo de uno o más componentes en sistemas complejos, tal como los que se utilizan en la industria del petróleo, farmacéutica y en gran medida para estudios ambientales.

1.11 Técnicas de preparación de muestra

Actualmente los métodos de separación pueden brindar grandes resultados en las determinaciones de una vasta cantidad de analitos, altas resoluciones para mezclas complejas para diversas matrices, así como límites de detección de femtogramos o menores, cuando se acopla el detector correcto [87]. Sin embargo, todo el avance en instrumentación analítica puede resultar inútil si no se cuenta con un método de preparación de muestra, que sea utilizado antes de la inyección del analito al cromatógrafo.

Las técnicas de preparación de muestra cobran una mayor importancia cuando se determinan contaminantes, residuos o analitos en general a nivel de trazas [88], ya que un mal o pobre tratamiento de la muestra puede afectar la validez de un resultado instrumental.

La importancia de desarrollar de forma eficiente las técnicas de preparación de muestra ha ido en aumento, ya que se determinó que la preparación de muestra toma alrededor de dos tercios del trabajo a realizar por un químico analítico, lo que equivale al 61 % del trabajo realizado, aunado a esto se estableció que el 92 % de los resultados obtenidos experimentalmente dependen considerablemente de la técnica de preparación de muestra utilizada [87].

Un método de preparación de muestra tiene por objeto: convertir una matriz real en una muestra más simple, de modo que pueda ajustarse en mayor medida a un análisis por cualquier técnica instrumental [87].

La preparación de la muestra es generalmente dependiente del tipo de matriz y analito de interés, por ello la optimización de las técnicas de preparación de muestra es sumamente necesaria para reducir tiempos de operación, así como reducir las fuentes de error asociadas a cada uno de los pasos a realizar durante la determinación, ya que reduce la variabilidad e incrementa la reproducibilidad de un método analítico [89].

Los pasos típicos que deben optimizarse y estandarizarse en la preparación de muestra se describen en la Figura 1.12.

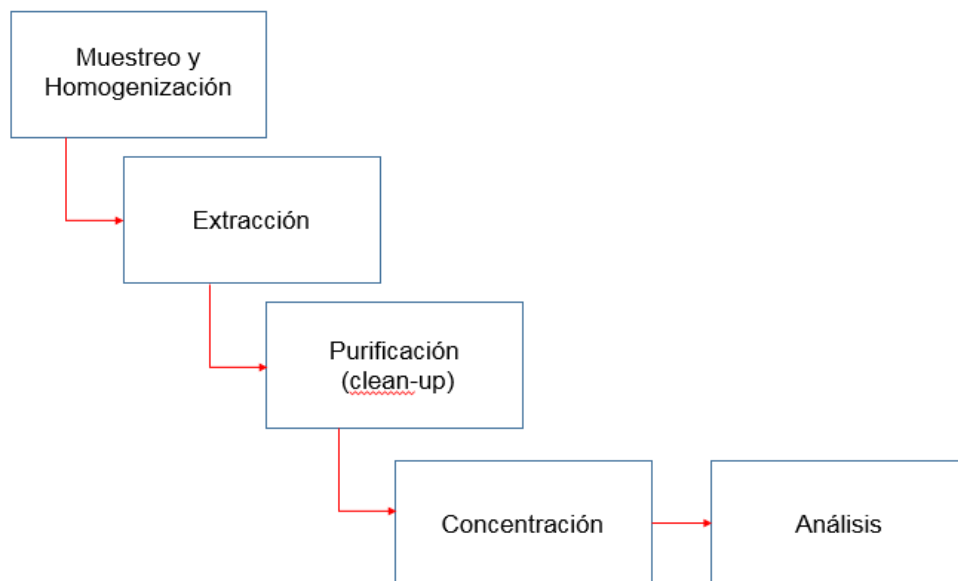


Figura 1.12 Pasos típicos de una técnica de preparación de muestra

Las ventajas que la preparación de muestra puede aportar a un análisis son vastas, y puede mejorar los siguientes aspectos: [87]

- Remoción de interferentes potenciales, por lo cual existe un incremento en la selectividad del método.
- Incrementa la concentración del analito, esto genera un aumento en la sensibilidad de la experimentación.
- Convierte a un analito que se encuentra en una matriz compleja en uno más sencillo, que sea más adecuado para la separación o detección usualmente mediante una reacción química.
- Produce un método robusto y reproducible que sea independiente a las variaciones de la matriz de la muestra.
- Utilizar una menor cantidad de muestra, inclusive para análisis a nivel de trazas.
- Permite la automatización de los procesos, reduciendo la operación manual y por ello las fuentes de error.

1.11.1 Técnicas de extracción

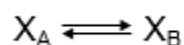
Existe una amplia gama de técnicas de preparación de muestras, una de las más importantes son las técnicas de extracción. La extracción de compuestos semi volátiles, particularmente orgánicos de líquidos, implica tres técnicas principales: extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE) y micro extracción en fase sólida (SPME) [81].

En el presente capítulo se realizará un enfoque en la extracción en fase sólida (SPE), para ello es necesario comprender los principios básicos que gobiernan los procesos de extracción.

La extracción de un analito X que se encuentra en un líquido (denominado fase A) se lleva a cabo cuando el analito entra en contacto con una segunda fase (denominada fase B), la cual puede ser: líquida, sólida, gaseosa o un fluido supercrítico, empero, deben ser inmiscibles entre sí para que ocurra una distribución del analito entre ellas. Una vez que se ha extraído el analito X, éste únicamente debe ser liberado de la segunda fase para su posterior análisis.

La teoría química del equilibrio de distribución de un analito, está descrita por la ecuación.

Equilibrio del analito X entre las fases A y B



Expresión de la constante de equilibrio de distribución.

$$K_D = \frac{[X_B]}{[X_A]} \quad (12)$$

La función del químico analítico es lograr desplazar el equilibrio de distribución hacia la fase B, esto provoca el aumento en la magnitud de K_D , quiere esto decir que exista una mayor afinidad del analito X por la fase B.

1.11.1.1 Extracción en fase sólida (SPE o EFS) [87, 90-92]

Dentro de los métodos de extracción uno muy utilizado es el de atrapar analitos. El proceso general de estos métodos es extraer el analito de interés, atrapándolo en una fase inmóvil, posteriormente se realiza un lavado para quitar impurezas y finalmente el analito es eluido con el menor volumen de disolvente o bien térmicamente.

La extracción en fase sólida hace referencia a una técnica de no equilibrio, es la eliminación exhaustiva de los componentes químicos en una muestra líquida a través de la retención de los mismos en un sorbente sólido y la posterior recuperación de los componentes seleccionados por la elución del sorbente [86]. Para las técnicas SPE un valor elevado de K_D hace referencia a una fuerte afinidad del analito por el sorbente.

La extracción en fase sólida cumple dos roles: el primero es el de retener los componentes no deseados de una muestra y permitir la purificación del analito de interés o bien retener en el sorbente el analito de interés y eluir los componentes no deseados.

Existe una gran cantidad de cartuchos comerciales en tres modalidades: Cartuchos con forma de jeringa, discos y placas. Además de una amplia gama de sorbentes, con diferentes mecanismos de sorción aprovechando las diferentes interacciones existentes tales como: puentes de hidrógeno, interacciones polares y no polares, intercambio catiónico y aniónico, algunos son selectivos para compuestos específicos [87, 88].

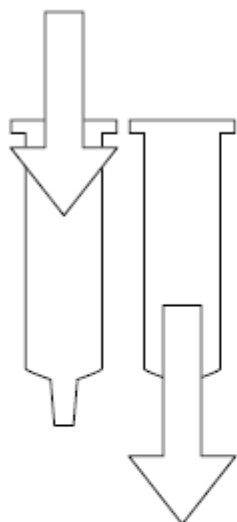
El correcto uso de los cartuchos SPE es trascendental y significativo en las condiciones de funcionamiento eficiente. Es por ello que se requiere optimizar todos los parámetros que pueden afectar la extracción del analito de interés [93].

El proceso de extracción consta de cuatro pasos fundamentales, acondicionamiento de la columna, carga de la muestra, lavado de la columna y elución de la muestra figura 1.13.

1.11.1.2 Optimización de parámetros SPE

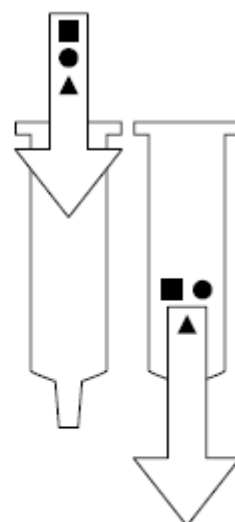
Cada uno de los pasos del proceso deben ser optimizados tomando en cuenta las propiedades del analito de interés como son: el nivel de concentración requerido, las interacciones entre el analito, el sorbente y la naturaleza de la matriz, el tipo de cromatografía y método de detección; por ello es necesario determinar varios parámetros asociados a la extracción como son: el tipo y la cantidad de sorbente a utilizar, la determinación del volumen de muestra que puede ser aplicado sin pérdidas del analito, la composición y el volumen de la disolución de lavado que se aplicará para purificar el analito sin pérdidas del mismo y finalmente la composición y el volumen de disolvente a utilizar para realizar la elución del analito del cartucho [90, 94].

Aunado a esto es posible considerar otros factores importantes como: pH de las disoluciones de acondicionamiento, carga, lavado y elución, así como la velocidad de flujo de los disolventes [91, 94].



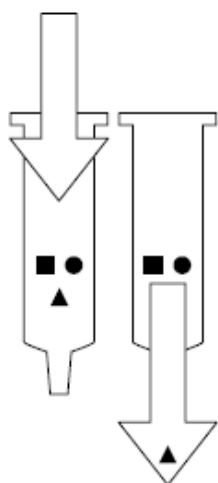
Acondicionamiento

El acondicionamiento del sorbente antes de aplicar la carga de la muestra asegura la retención reproducible del analito de interés.



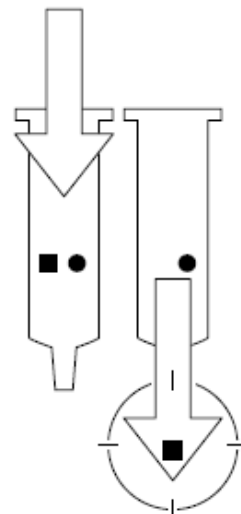
Retención

- Analito adsorbido
- Componentes no deseados
- ▲ de la matriz



Lavado

El lavado es utilizado para remover los compuestos no deseados de la matriz



Elución

- Compuestos no deseados remanentes en el cartucho
- Analito purificado, aislado y listo para el análisis

Figura 1.13 Etapas fundamentales de operación de un cartucho SPE [94]

La técnica de extracción en fase sólida introduce muchas ventajas en el panorama de las preparaciones de muestras por ejemplo: [93-97]

- Reduce el tiempo de extracción, es posible adaptarlo a un proceso automatizado por lo cual disminuye la manipulación de la muestra y permite incrementar la productividad ya que es posible acoplar múltiples extracciones
- Reducción en el consumo de disolventes orgánicos, esto reduce la exposición del compuesto a los disolventes, así como la formación de emulsiones
- Por la naturaleza del cartucho, los factores de concentración (K_D) son elevados, esto favorece la extracción del analito dentro del cartucho
- Es una técnica que brinda la posibilidad de tener una gran selectividad con respecto al analito de interés
- Es una técnica que puede ser acoplada a otra técnica de preparación de muestra o bien a un sistema cromatográfico tanto de gases como de líquidos [98]
- A pesar de que los cartuchos son producidos para un solo uso, y tienen un costo no despreciable, el costo de consumo considerando la cantidad de disolvente utilizado y la mano de obra en una extracción tradicional, lo hace un producto sumamente rentable.

La principal aplicación de los cartuchos SPE ha sido la extracción de fármacos y sus metabolitos en fluidos corporales, empero una aplicación que ha incrementado exponencialmente su uso, es la extracción de analitos en muestras ambientales; ampliando el horizonte de aplicación en agua de ríos, lagos e inclusive aguas residuales en las cuales se ocupan largos volúmenes de disoluciones diluidas por extraer [98]. Particularmente para la extracción de antibióticos en aguas provenientes de hospitales, plantas de tratamiento, y aguas residuales con uso ganadero [99].

1.12 Validación de métodos analíticos [105, 107, 108]

En la práctica del análisis químico existen innumerables razones para realizar pruebas, mediciones y exámenes en laboratorios a nivel mundial, por ejemplo, controlar la calidad del agua potable, de riego y en alimentos, análisis médicos, productos de alto valor agregado entre muchas otras más, las cuales requieren una gran confiabilidad ya que las decisiones importantes dependen de los resultados que estas mediciones produzcan.

Es por ello necesario que los procedimientos de análisis, así como los resultados analíticos sean sometidos a algún criterio de aceptación que les permita documentar su calidad y verificar que los procedimientos experimentales cumplan con los criterios de calidad solicitados por el cliente y sean adecuados al uso específico por el cual fueron desarrollados.

Ese procedimiento es conocido como “validación de método” y es aplicado por un innumerable grupo de laboratorios alrededor del mundo y ampliamente recomendado por diversos organismos como la EPA (Environmental Protection Agency), FDA (Food and Drug Administration), EURACHEM (Analytical Chemistry in Europe), ISO (International Organization for Standardization), así como la EMA (Entidad Mexicana de Acreditación) y el CENAM (Centro Nacional de Metrología) en México.

1.12.1 Definición de validación

La validación es definida por la ISO como “la confirmación, a través de la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para un uso o aplicación específico previsto” [100].

También es definida por la ISO/IEC 17025 como “la confirmación, a través del examen y aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto” [101].

“Es una adaptación específica de una técnica analítica, para un propósito de medición seleccionado, es un procedimiento para establecer por medio de estudios de laboratorios, una base de datos que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas” [102]. En otras palabras “El proceso de establecer las características de desempeño y las limitaciones de un método y la identificación de las influencias que pueden cambiar esas características, y en qué medida” [103, 104].

Un método debe ser validado cuando sea necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para un uso previsto. Es decir cuando: [105]

Existen métodos no normalizados;

- Si se pretende una acreditación (EMA, ISO/IEC 17025) o una certificación (ISO 9000);
- Métodos diseñados/desarrollados por el laboratorio;
- Métodos normalizados utilizados fuera de su ámbito de aplicación o bien se tienen diferentes analistas o instrumentos;
- Ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados;
- Cuando el control de calidad indica que un método está cambiando con respecto al tiempo;
- Para demostrar la equivalencia entre dos métodos, por ejemplo, entre un método nuevo y uno de referencia.

El alcance de la validación depende de la aplicación, su naturaleza y las circunstancias en las que se utilizará [106], debe ser tan amplio como sea necesario para cumplir los requisitos en relación con su aplicación [105].

1.12.2 Parámetros de desempeño a validar en un método de análisis

Para establecer el alcance de la validación, es necesario establecer el grado apropiado de parámetros de desempeño que deben aplicarse en función de las necesidades del método.

El laboratorio será el encargado de decidir las características de desempeño que deben ser investigadas para validar el método, así mismo debe tomar en cuenta las limitaciones impuestas, requisitos legales y de clientes, así como experiencias y herramientas disponibles [105].

Las definiciones de los términos utilizados en las validaciones se enuncian a continuación [105, 107].

Linealidad. Medida de la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo dado.

Intervalo lineal. Se define como el intervalo de concentraciones del analito sobre el cual el método proporciona resultados de pruebas proporcionales a la concentración del analito.

Intervalo de trabajo. Intervalo comprendido entre las concentraciones superior e inferior (incluyendo a las mismas), para las que se ha demostrado que el analito es cuantificado con un nivel satisfactorio de repetibilidad, recuperación y linealidad.

Límite de detección (LDD). Es la concentración más baja a la cual puede detectarse el analito pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones experimentales establecidas. La ISO lo define como “el valor mínimo detectable de la variable de estado definida”.

De forma general se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente a la señal del blanco o el ruido de fondo [108].

Matemáticamente está definida como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la del blanco (X_B) más tres veces la desviación estándar del blanco (S_B).

$$LDD = \frac{X_B + 3S_B}{m_B} \quad (13)$$

Donde: m_B es la pendiente de la curva de calibración

Límite de cuantificación (LDC). Está definido como la concentración más baja de analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión, repetibilidad y veracidad. Éstos son característicos del desempeño que marcan la habilidad de un proceso de medición con el fin de cuantificar adecuadamente un analito [108]. Esto se traduce matemáticamente como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la del blanco (X_B) más diez veces la desviación estándar del blanco (S_B).

$$LDC = \frac{X_B + 10S_B}{m_B} \quad (14)$$

Donde: m_B es la pendiente de la curva de calibración

Veracidad. La veracidad es la proximidad de concordancia entre el valor promedio obtenido de una serie grande de resultados de prueba y un valor de referencia aceptado. La medida de la veracidad se expresa por lo general en términos de sesgo.

Se puede evaluar de 3 formas:

- Uso de materiales de referencia.
- Uso de métodos de referencia.
- Realización de experimentos de recobro.

Precisión. ISO la define como “la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas”. Las medidas más comunes de este parámetro son la repetibilidad y la reproducibilidad [109]. Este parámetro está evaluado por el cálculo del porcentaje del coeficiente de variabilidad (%CV).

$$\% CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100 \quad (16)$$

Donde: la S es la desviación estándar y X es la media

Recobro. Es la fracción de analito adicionada a una muestra de prueba (muestra fortificada) previa al análisis, que es determinada efectivamente por el método y permite evaluar la eficiencia de la extracción. El porcentaje de recuperación se determina por medio de la siguiente ecuación.

$$\% R = \left[\frac{(C_F - C_U)}{C_A} \right] * 100 \quad (17)$$

Donde: C_F es la concentración de analito medida en la muestra fortificada, C_U es la concentración de analito medida en la muestra sin fortificar, C_A es la concentración de analito adicionado en la muestra fortificada.

Muestra fortificada. Porción representativa del material a evaluar a la que se le adicionan cantidades conocidas del analito de interés.

Repetibilidad. Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el proceso se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea, por un solo analista utilizando los mismos instrumentos y método en intervalos cortos de tiempo.

Reproducibilidad. Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el proceso se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea, por dos analistas o instrumentos diferentes, utilizando el mismo método en diferentes días.

Sensibilidad. Es el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración de analito, matemáticamente está representado por la pendiente del intervalo de trabajo de tal forma que, cuanto mayor sea la pendiente mayor será la sensibilidad del método.

Selectividad. Es la capacidad de un método para determinar exacta y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes en una matriz de muestra, bajo las condiciones de prueba establecidas.

Matriz. Muestra que contiene todos los componentes de un producto.

Efecto matriz. Este efecto es ocasionado por la forma química que presenta el analito en la muestra, así como su entorno fisicoquímico (presencia de componentes en la muestra que interaccionan con el analito). Puede tener efectos selectivos sobre el analito o bien efectos generales. Dicho efecto se ve reflejado en el cambio de la pendiente en una curva de calibrado, es decir es un cambio en la sensibilidad del método producida por la matriz [109].

Blancos. El uso de diversos tipos de blancos permite evaluar qué tanto de la señal medida es atribuible al analito y qué tanto se debe a otras causas.

Blancos reactivos. Son todos aquellos reactivos usados durante el proceso analítico (incluyendo los disolventes usados para la extracción y disolución), se analizan por separado con el fin de evaluar su contribución a la señal de medición. Si éstos contribuyen a la señal, ésta puede ser corregida de forma adecuada.

Blancos de muestra. Son básicamente matrices sin analito, son difíciles de obtener pero brindan la oportunidad de estimar de forma realista las interferencias que pueden encontrarse en el análisis de muestras de prueba.

Material de referencia. Es la sustancia de la cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y bien definidos. Cuando éste va acompañado de un certificado es denominado material de referencia certificado (MRC), en él uno o más valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual se expresan los valores de la propiedad; va acompañado de una incertidumbre con un nivel de confianza determinado.

CAPÍTULO II. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2 Métodos

2.1 Material y Equipo

Sistema cromatográfico para SMX

Cromatógrafo de líquidos marca Agilent Technologies en todos sus componentes modelo 1260 Infinity, constituido por un sistema de bombas cuaternarias.

Columna analítica ZORBAX SB-C18 (4.6 C X 150 mm) de 5 µm de tamaño de partícula, Agilent Technologies.

Espectrómetro de masas triple cuadrupolo marca Agilent Technologies Serie 6400, modelo Agilent 6420.

Como sistema de adquisición de datos se empleó el software MassHunter Optimizer.

Sistema cromatográfico para 2-HA, DEA, ATZ

Cromatógrafo de líquidos marca Waters en todos sus componentes. Constituido por un sistema de bombas binarias de alta presión modelo 1525, un automuestreador modelo 717 plus y un detector UV-DAD modelo 2998.

Columna analítica Spherisorb ODS2 (250 x 4.0 mm,di) de 5 µm de tamaño de partícula, Waters, Mildford, MA, USA.

Como sistema de adquisición de datos se utilizó el software Empower 2 build 2154 de Waters Corporation.

Cartuchos utilizados en la preparación de la muestra para SMX

Cartuchos marca Waters OASIS[®] HLB (polimérica, fase reversa) con un volumen de jeringa de 6 cc, 30 µm de tamaño de partícula, 80 Å de tamaño de poro y finalmente 200 mg de masa de sorbente.

Cartuchos utilizados en la preparación de la muestra para 2-HA, DEA, ATZ
Cartuchos marca Waters Sep-Pak[®] Vac (fase reversa) con un volumen de jeringa de 6 cc, 55-105 µm de tamaño de partícula, 125 Å de tamaño de poro y finalmente 500 mg de masa de sorbente.

Otros equipos y material

Balanza analítica marca Ohaus, modelo Explorer, con capacidad de 210 g y precisión de 1 mg.

Purificador y desionizador de agua, Mili-Q Modelo 185 de Millipore.

Bomba de vacío marca BOECO Germany, modelo R-300

Bomba isocrática marca Scientific, Systems.

Configuración (Manifold), con 12 tomas de muestra s/marca

Bailer de PVC sin marca, con 1.2 m de longitud y 0.1 m de diámetro.

Bailer de acero inoxidable

Disolventes y reactivos

Atrazina (ATZ), pureza 98.8 %, Chem Service.

Desetilatrizina (DEA), pureza 99.5 %, Chem Service.

2-hidroxiatrizina (HA), pureza 99.5 %, Chem Service.

Sulfametoxazol (SMX), pureza 99.5 %, Aldrich

Sulfamerazina (SMR), pureza 99.5 %, Aldrich

Metanol (MeOH) grado HPLC, Honeywell

Acetonitrilo (AcCN) grado HPLC, Honeywell

Agua grado HPLC, Sigma-Aldrich

Agua ultra pura, resistividad 18.2 MΩ a 25 °C.

2.2 Validación de método para determinar sulfametoxazol (SMX)

La validación del método de cuantificación de SMX se hizo de la siguiente manera:

1. Primeramente se realizaron los experimentos en modo SCAN y SIM del SMX y la SMR, después se optimizaron los parámetros del espectrómetro de masas en modo MRM.
2. Una vez optimizados los parámetros del espectrómetro de masas se procedió a la obtención de las condiciones cromatográficas óptimas, así como la determinación de los parámetros de validación instrumental.
3. Posteriormente se realizó la optimización del tratamiento de preparación de muestra utilizando extracción en fase sólida.
4. Finalmente se realizaron los experimentos para evaluar el recobro empleando muestras de agua de manantial, agua subterránea proveniente de un piezómetro y agua residual.

2.2.1 Optimización del espectrómetro de masas

Todos los experimentos desarrollados para la optimización y selección de las condiciones idóneas del espectrómetro de masas, fueron obtenidos utilizando el modo de ionización ESI (+).

2.2.1.1 Experimentos SCAN para SMX y SMR

Se prepararon dos disoluciones por separado de SMX y SMR, con una concentración de 1 mg/L. Para el SMX se utilizó MeOH como disolvente, para la SMR se empleó como disolvente una mezcla de MeOH : H₂O (3:7).

Posteriormente se inyectaron 10 µL de cada una de las disoluciones al espectrómetro de masas, realizando un barrido desde 70 a 500 unidades m/z para obtener el espectro de masas correspondiente a SMX y SMR. Dichos experimentos fueron realizados por triplicado, con el fin de identificar los iones que presentan repetibilidad y muestran una mayor abundancia.

2.2.1.2 Experimentos SIM para SMX y SMR

Ya que el espectro de masas del experimento SCAN fue determinado para SMX y SMR, se realizó una serie de experimentos en modo Single Ion Monitoring (SIM), con el fin de determinar qué fragmento o fragmentos brindan la mayor cantidad de área.

Los fragmentos seleccionados fueron aquellos que presentan una mayor abundancia y son repetibles en el experimento SCAN. Para cumplir ese objetivo se inyectaron 10 µL de ambas especies con una concentración de 1 mg/L al espectrómetro de masas, como lo muestra la Tabla 2.1

Tabla 2.1 Fragmentos seleccionados para experimentos SIM de SMX y SMR

Fragmentos (m/z)	
SMX [M+H] ⁺ 254	SMR [M+H] ⁺ 264.9
155.9	171.9
150.1	156.0
126.9	126.9
114.0	110.0
98.9	-----

2.2.1.3 Optimización de parámetros del espectrómetro de masas

Una vez que fueron definidos los iones que brindan una mayor área en el experimento SIM, se realizó la optimización de 8 parámetros del espectrómetro de masas utilizando el modo Multiple Reaction Monitoring (MRM) de análisis. Este experimento permite monitorear varias fragmentaciones a partir de un ion parental. Dicho experimento fue realizado con el fin de obtener la máxima cantidad de área de cada fragmento, la cual depende significativamente de las condiciones de operación.

Los parámetros optimizados se muestran en la Tabla 2.2. Es necesario señalar que los iones seleccionados para SMX fueron 156 y 99 m/z y para SMR fueron 156 y 109.9 m/z.

Tabla 2.2 Parámetros optimizados del espectrómetro de masas para SMX y SMR

Parámetro optimizado	Intervalo de optimización
Temperatura de gas de secado (°C)	250 a 350
Flujo de gas (L/min)	5 a 13
Presión del nebulizador (psi)	10 a 60
Fragmentación (V)	65 a 150
Voltaje capilar (V)	500 a 6000
Energía de colisión (eV)	3 a 24
Medición de señal por muestreo (Dwell)	50 a 300

2.2.2 Determinación de las condiciones cromatográficas para la determinación de sulfametoxazol

Para el establecimiento de las condiciones cromatográficas idóneas del SMX, donde la SMR tiene la función de estándar interno, se utilizó como fase estacionaria una columna ZORBAX SB-C18 (fase reversa). Se inyectaron 10 µL de una disolución de 1 µg/L de SMX con SMR como estándar interno. La fase móvil utilizada fue una mezcla de ácido fórmico al 0.1 % y acetonitrilo grado cromatográfico; en una proporción inicial 70:30 ácido fórmico 0.1 % : acetonitrilo desde el tiempo 0 hasta los 7 minutos, posteriormente se aumentó la proporción de acetonitrilo hasta llegar a un 100 % hasta a los 15 minutos y finalmente se recuperaron las condiciones iniciales 70:30 ácido fórmico 0.1 % : acetonitrilo de los 15 hasta los 18 minutos. Las condiciones cromatográficas y el programa de gradiente optimizado se muestran en las tablas 2.3 y 2.4

Tabla 2.3 Condiciones cromatográficas para la determinación de SMX

Columna	Modo
ZORBAX SB-C18 (fase reversa)	Gradiente Disolución A: ácido fórmico 0.1 % Disolución B: acetonitrilo

Tabla 2.4 Programa de gradiente empleado para la separación de SMX

Tiempo (min)	%B
0	30
7	100
15	100
18	30

2.2.2.1 Determinación del volumen de inyección de la muestra

Con las condiciones cromatográficas de trabajo establecidas previamente en las Tablas 2.3 y 2.4, se realizaron 3 ensayos en los cuales se determinó el área obtenida en función del volumen de inyección en el cromatógrafo (Tabla 2.5); con el fin de establecer el volumen de inyección óptimo para obtener una mayor cantidad de área y mejorar la forma del pico cromatográfico. Para ello se preparó una disolución de 1 mg/L de SMX y SMR.

Tabla 2.5 Experimentos de volumen de inyección.

Volumen de inyección (µL)	Columna	Modo
5 10 12	ZORBAX SB-C18 (fase reversa)	Gradiente Disolución A: ácido fórmico 0.1 % Disolución B: acetonitrilo

Las condiciones óptimas de separación fueron evaluadas mediante la determinación de los parámetros cromatográficos tradicionales, utilizando una disolución de 1 mg/L de SMX y SMR e inyectando 10 µL al cromatógrafo.

2.2.3 Validación del método cromatográfico

Una vez definidas y evaluadas las condiciones cromatográficas, se desarrolló el proceso de cuantificación del SMX, para ello se determinaron los parámetros típicos de una validación analítica: Intervalo lineal, precisión, exactitud, límites de detección y de cuantificación; por medio de una curva de calibración utilizando SMR como estándar interno. El procedimiento utilizado se describe a continuación.

Se preparó una disolución madre de SMX con una concentración de 60 mg/L en MeOH, a partir de ella se realizaron las diluciones correspondientes para la determinación de los parámetros de validación, utilizando agua grado HPLC como disolvente. De manera análoga se preparó una disolución madre de SMR con una concentración de 62 mg/L, a partir de dicha disolución se preparó otra de 5 µg/L que fue empleada como estándar interno en todos los experimentos de la validación.

Intervalo lineal. Se prepararon disoluciones estándar de SMX en un intervalo de concentración comprendido entre 0.4 y 50 µg/L en agua grado cromatográfico; los estándares fueron preparados por triplicado para cada nivel de concentración e inyectando 10 µL de cada disolución.

Residuales. Se determinó para tres niveles de concentración (10, 30 y 44 µg/L) por quintuplicado [102]. Con los valores de área y los parámetros de regresión de la curva de calibración obtenidos, se determinó la concentración experimental de cada nivel de concentración, el cual se comparó con el valor conocido; finalmente se calculó el porcentaje de error, empleando la siguiente ecuación.

$$\% \text{ error} = \frac{\text{Concentración}_{\text{Calculada}} - \text{Concentración}_{\text{Real}}}{\text{Concentración}_{\text{Real}}} 100$$

Precisión. Este parámetro se determinó para tres niveles de concentración (6, 25 y 40 µg/L), cada nivel de concentración fue preparado por quintuplicado de manera independiente [102]. Este parámetro fue evaluado mediante el cálculo del porcentaje del coeficiente de variabilidad (%CV) de las áreas de la señal analítica determinadas para cada uno de los niveles de concentración.

$$\% CV = \frac{S}{X} * 100$$

Límite de detección (LOD). Se realizaron siete inyecciones de disoluciones preparadas de forma independiente, de una concentración 0.4 µg/L de SMX. Se eligió esa concentración ya que en esa concentración se obtiene la señal más baja diferenciable con respecto al ruido. Con dichos valores de área se calcularon la media (\bar{x}) y la desviación estándar (s); con esto se reporta el límite de detección como lo indica Miller y Miller [109].

$$LOD = \frac{X_B + 3S_B}{m_B}$$

Límite de cuantificación (LOQ). Para obtener este parámetro se realizó el mismo procedimiento experimental y tratamiento de datos que el reportado en el límite de detección (LOD), finalmente el límite de cuantificación se reportó conforme lo indica Miller y Miller [109].

$$LOD = \frac{X_B + 10S_B}{m_B}$$

2.3 Optimización del método de preparación de muestra: extracción en fase sólida (EFS/SPE) para el SMX

Con el fin de purificar y preconcentrar el SMX de la muestra, se optimizó el protocolo de extracción en fase sólida de los cartuchos OASIS[®] HLB. Para conseguirlo se optimizaron los siguientes parámetros de extracción: disolvente de lavado y elución, concentración del disolvente de lavado y finalmente el volumen de ruptura.

2.3.1 Selección del disolvente de elución y de lavado.

Se realizaron dos experimentos a partir de los cuales se eligió el disolvente de elución y el de lavado, el procedimiento se describe a continuación. En la etapa de carga se agregó una cantidad constante y conocida de SMX (0.5 µg) en un volumen de 50 mL. Se evaluaron MeOH y AcCN como disolventes de lavado y elución, en el primer experimento se eluyó con MeOH y el segundo con AcCN, ambas eluciones con un volumen constante de 5 mL.

En todos los experimentos los parámetros de acondicionamiento y lavado fueron realizados como se describe a continuación.

Acondicionamiento: 5 mL de MeOH y 5 mL de H₂O

Lavado: 5 mL de H₂O

Con base en los porcentajes de recuperación entre MeOH y AcCN, se seleccionó el disolvente con mayor porcentaje, el cual sería utilizado como disolvente de elución, mientras que el disolvente con menor porcentaje de recuperación se utilizó como disolvente de lavado.

2.3.2 Determinación de la concentración porcentual del disolvente de lavado

Del experimento anterior fue seleccionado AcCN como disolvente de lavado, por lo tanto, se realizaron 3 ensayos en los cuales se agregó una cantidad constante y conocida de (0.5 µg) de SMX contenida en un volumen constante de 50 mL. En la etapa de lavado se utilizó un volumen constante de 5 mL, en el cual se varió la concentración porcentual de AcCN, como se ejemplifica a continuación (Tabla 2.6).

Tabla 2.6 Variación porcentual de AcCN como disolvente de lavado

Concentración de AcCN (% v/v)	Volumen del disolvente de lavado (mL)	Cantidad de SMX cargada (µg)
5	5	0.52
13		
20		

En todos los experimentos el acondicionamiento y la elución se realizaron de la siguiente manera.

Acondicionamiento: 5 mL de MeOH y 5 mL de H₂O

Elución: 5 mL de MeOH

2.3.3 Determinación del volumen de ruptura

Finalmente se determinó el volumen de ruptura del cartucho, al hacer pasar 0.5 µg de SMX variando el volumen de la disolución de carga como se muestra a continuación (Tabla 2.7).

Tabla 2.7 Condiciones de variación del volumen en la etapa de carga del SMX

Volumen de disolución SMX (mL)	Concentración de SMX (µg/L)	Cantidad total de SMX cargada (µg)
10	50	0.5
25	20	
50	10	
100	5	
250	2	
500	1	

Las condiciones de las etapas de acondicionamiento, lavado y elución utilizadas en los ensayos, son las siguientes.

Acondicionamiento: 5 mL de MeOH y 5 mL de H₂O

Lavado: 5 mL de AcCN 5 %

Elución: 5 mL de MeOH

Es necesario mencionar que dentro de lo posible, en todos los ensayos de extracción en fase sólida para SMX, la velocidad de flujo se mantuvo constante, a aproximadamente de 1 mL/min.

2.4 Optimización de la extracción en fase sólida (EFS/SPE) para ATZ y sus principales productos de degradación 2-HA y DEA

En el caso de la ATZ y sus principales metabolitos de degradación 2-HA y DEA; el método de validación instrumental fue desarrollado previamente por Cortés, 2016 [110] en el laboratorio de cromatografía del Instituto de Geología de la UNAM, cuyas condiciones cromatográficas y parámetros estadísticos de validación se muestran en las Tablas 2.8 y 2.9, respectivamente.

No obstante, para realizar la purificación y preconcentración de los analitos, fue necesario optimizar los parámetros más significativos de los cartuchos de extracción en fase sólida, que son los siguientes: Disolvente y volumen de lavado, disolvente y volumen de elución, volumen de ruptura y finalmente la velocidad de flujo.

Tabla 2.8 Condiciones cromatográficas para la determinación de 2-HA, DEA y ATZ [110]

Columna	Fase Móvil	λ (nm)	Modo	Flujo
Spherisorb ODS2 (fase reversa) de 250 mm de longitud por 4 mm de diámetro interno	AcCN-buffer de fosfatos 0.005 M pH 7.2 40-60 (v/v)	220	Isocrático	1 mL/min

2.4.1 Selección de los disolventes de lavado y acondicionamiento

Los disolventes de acondicionamiento y lavado fueron seleccionados a partir de las recomendaciones de fabricante Water Sep-Pak[®], por ello se realizó una carga de 250 µg de los tres analitos y se utilizaron 5 mL de MeOH y 5 mL de H₂O como disolventes de acondicionamiento, donde se realizaron 2 experimentos en cuanto al orden de adición de los disolventes (tabla 2.11). Para la etapa de lavado se utilizó únicamente MeOH al 5 % como disolvente de lavado.

Tabla 2.9 Experimentos en la etapa de acondicionamiento y lavado de los cartuchos SPE

Orden de adición	Acondicionamiento	Volumen de acondicionamiento (mL)
1	MeOH / H ₂ O	5
2	H ₂ O / MeOH	

Para este experimento la etapa de elución fue evaluada con 10 mL de MeOH

2.4.2 Selección del disolvente de elución

Para seleccionar el disolvente de elución se realizaron dos ensayos en los que se probaron 15 mL de MeOH y AcCN como eluyentes. En estos ensayos se agregó una cantidad conocida y constante de 250 µg de los tres analitos en un volumen de 25 mL. Para estos experimentos las condiciones de acondicionamiento y lavado son las siguientes:

Acondicionamiento: 5 mL de MeOH y 5 mL de H₂O

Lavado: 5 mL de MeOH (5 %)

2.4.3 Determinación del volumen de elución

Una vez establecido el MeOH como disolvente de elución, fue necesario encontrar el volumen de elución necesario para extraer del cartucho a los 3 analitos de interés, esto se logró por medio de una serie de ensayos en los cuales se mantuvo una cantidad constante de 250 µg de los 3 analitos; finalmente se modificaron los volúmenes de elución para establecer el volumen necesario para eluir la mayor cantidad de analitos (Tabla 2.12).

Tabla 2.10. Determinación del volumen de elución de 2-HA, DEA, ATZ

Volumen de MeOH de elución (mL)	Cantidad cargada de 2-HA, DEA, ATZ (µg)
15	250
20	
25	
30	

Las condiciones en las etapas de acondicionamiento y lavado son las siguientes:

Acondicionamiento: 5 mL de MeOH y 5 mL de H₂O

Lavado: 5 mL de MeOH (5 %)

2.4.4 Determinación del volumen de ruptura

Para determinar el volumen de ruptura se realizaron 6 experimentos, en los cuales se mantuvo una cantidad constante de 250 µg para los tres analitos, sin embargo, se varió el volumen de la disolución de carga como se observa a continuación (tabla 2.13).

Tabla 2.11 Variación del volumen de disolución de carga de HA, DEA, ATZ

Volumen de disolución HA, DEA, ATZ (mL)	Concentración de HA, DEA, ATZ ($\mu\text{g/L}$)	Cantidad total de HA, DEA, ATZ cargada (μg)
10	50	250
25	20	
50	10	
100	5	
250	2	
500	1	

Las condiciones de acondicionamiento, lavado y elución en estos ensayos son las que se muestran a continuación:

Acondicionamiento: 5 mL de MeOH y 5 mL de H₂O

Lavado: 5 mL de MeOH (5 %)

Elución: 2 0mL de MeOH

2.4.5 Efecto de la velocidad de flujo en la percolación

En esta fase del experimento se evaluó la dependencia existente entre la velocidad de flujo y la retención del cartucho de extracción. Para ello se probaron 3 velocidades de flujo diferentes manteniendo una cantidad constante y conocida de 250 μg totales de los analitos y un volumen de 500 mL en la etapa de carga (Tabla 2.14).

Tabla 2.12 Variación de la velocidad de flujo en el cartucho SPE

Velocidad de flujo (mL/min)	Cantidad total de HA, DEA, ATZ cargada (μg)
1	250
2	
4	

Las condiciones de acondicionamiento, lavado y elución de estos experimentos son las siguientes:

Acondicionamiento: 5 mL de MeOH y 5 mL de H₂O

Lavado: 5 mL de MeOH (5 %)

Elución: 30 mL de MeOH

2.5 Implementación del protocolo de extracción en fase sólida optimizado en matrices reales

Una vez validados los métodos instrumentales y optimizadas las condiciones del tratamiento de extracción en fase sólida; es de suma importancia someter las muestras de origen natural a dos sitios de estudio seleccionados, al protocolo de tratamiento de muestra optimizado en el presente trabajo, con el fin de determinar los recobros y el efecto generado por la matriz.

2.5.1 Descripción del sitio de estudio A [109-111]

El sitio de estudio se encuentra en el municipio de Tlahuelilpan, en la región conocida como Valle del Mezquital. El Valle del Mezquital está dentro de los límites del estado de Hidalgo, situado en lo alto de la meseta mexicana a 60 km de la Ciudad de México con una altitud entre los 1 700 m y 2 100 m sobre el nivel del mar, este sitio cuenta con una población estimada de 495 000 habitantes, cuya actividad económica principal es la agricultura. La actividad agrícola se desarrolla principalmente por el uso de un sistema de riego que tiene como base el agua residual cruda o parcialmente tratada proveniente de la Ciudad de México. Esto ha permitido incrementar la producción de maíz, frijol, trigo, avena, cebada, alfalfa, entre otros, al mejorar la calidad del suelo por la carga de nutrientes asociada a este tipo de aguas. Empero el agua residual también transporta contaminantes como organismos patógenos y sustancias químicas que pueden ser nocivas para la salud de los consumidores [110].

A causa de esto se ha generado un gran interés en estudiar y comprender factores como la actividad microbiana, así como la dinámica del agua y los analitos que transporta, para lograr esto es necesaria la correcta determinación de especies químicas en el agua residual. Dentro del Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la UNAM, particularmente el grupo de trabajo de Prado y

colaboradores, han establecido el monitoreo sistemático y periódico de varios puntos localizados a lo largo de un piedemonte irrigado con agua residual.

El piedemonte volcánico se localiza en el poblado de Tlahuelilpan, ubicado en el centro del Valle del Mezquital; tiene una forma convexa y una pendiente moderada de 2-5°, cuya altitud se encuentra entre los 2 071 y los 2 040 m sobre el nivel del mar a lo largo de la parte superior del pie de monte del canal Tlamaco-Juandhó hasta el agua superficial del manantial Cerro Colorado. Durante más de 5 años se han monitoreado 6 puntos de interés a lo largo del pie de monte.

El objetivo de dicho monitoreo es comprender la dinámica y la variación de la calidad del agua a lo largo de la zona crítica del piedemonte, i.e. de las copas de los árboles al acuífero, desde una perspectiva de paisaje (Figura 2.1) [112].

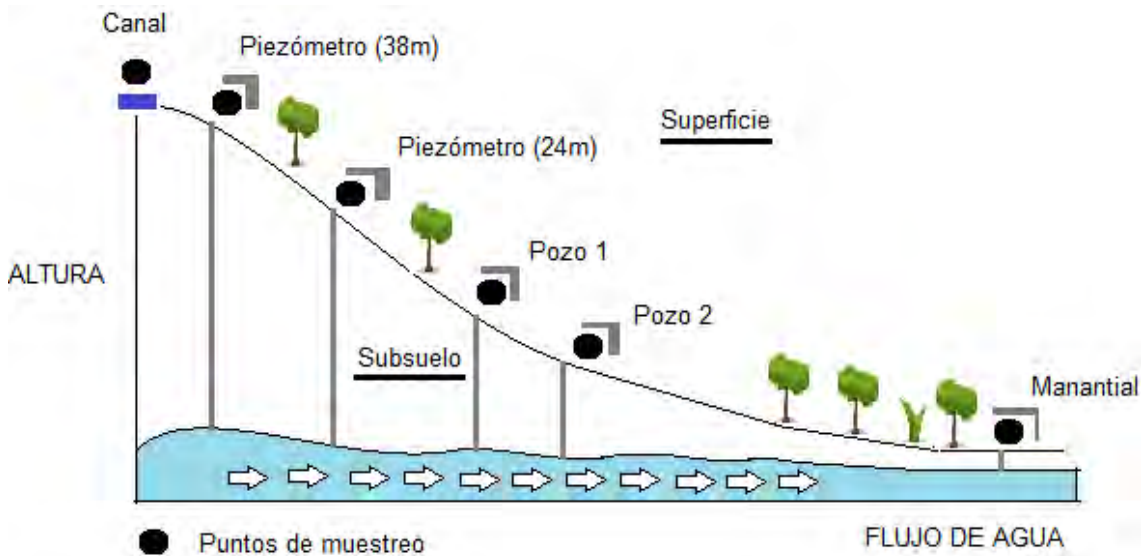


Figura 2.1 Corte lateral del *piedemonte

**Piedemonte. Nombre técnico utilizado para indicar el punto donde nace una montaña*

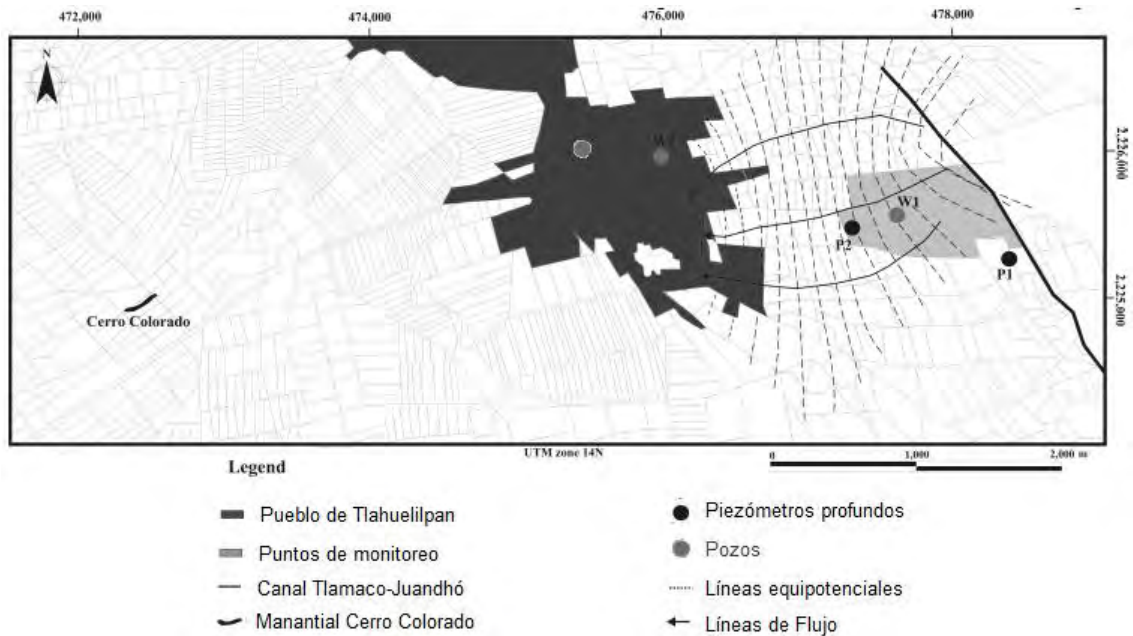


Figura 2.2 Localización de los sitios de monitoreo de agua subterránea

Los estudios realizados por Prado y colaboradores [113] demostraron que la dirección del flujo de agua subterránea, ocurre desde el canal de aguas residuales en lo más alto del piedemonte, posteriormente al Valle del Mezquital y finalmente en el agua superficial del manantial de Cerro Colorado. Aparentemente existe una depuración natural en el camino, es decir, la concentración de ciertos contaminantes estudiados disminuye. Un ejemplo de esto es la concentración del antiepiléptico carbamazepina a lo largo de la zona monitoreada, donde se observa una mayor concentración en aguas residuales (275 ng/L), su disminución gradual a lo largo de los puntos seleccionados hasta la menor concentración en el agua de manantial de Cerro Colorado es también reportada (7.2 ng/L) (figura 2.3).

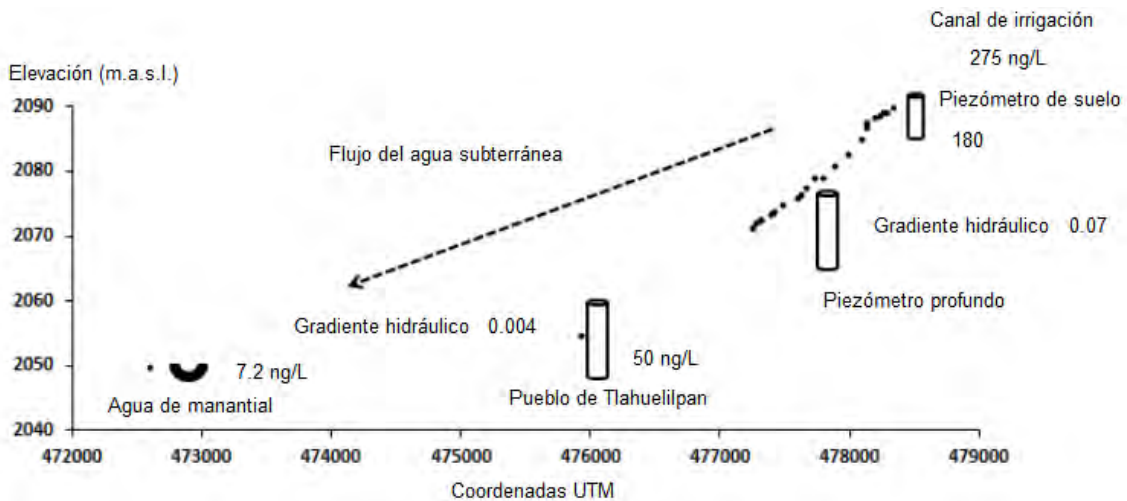


Figura 2.3 Concentración de carbamazepina en agua residual, a diferentes niveles del acuífero y en el agua de manantial

Con base en esto, se plantearon los siguientes puntos de monitoreo para la determinación de los analitos propuestos en el presente trabajo.

- Canal de aguas residuales Tlamaco-Juandhó
- Piezómetro profundo No. 1 a 38 m de profundidad
- Piezómetro profundo No. 2 a 24 m de profundidad
- Agua de pozo No. 1 a 22 m de profundidad y ubicada dentro del pueblo de Tlahuelilpan
- Agua de pozo No. 2 a 15 m de profundidad y ubicada en los límites del pueblo de Tlahuelilpan
- Agua de manantial Cerro Colorado

La colecta de muestras se realizó durante un periodo de 12 meses, de febrero 2016 a enero de 2017.

2.5.2 Descripción del sitio de estudio B

La recolección de muestras del sitio B fue realizada en el rancho “Las Palmas”, localizado en el municipio de Tlahuelilpan, cuyas coordenadas geográficas son: 20°07’29” Norte y 99°12’50” Oeste. Es un rancho de uso agrícola, donde se utiliza un sistema de siembra rotativo, primero con maíz y gramíneas, seguido de alfalfa, la cual es sembrada durante 3 años. El riego de dichos cultivos se hace por inundación con aguas residuales.

El grupo de trabajo de Suelo y Ambiente del Departamento de Edafología del Instituto de Geología, UNAM, ha estudiado los suelos del rancho “Las Palmas” en diversos aspectos edafológicos y dinámica del riego con agua residual. De manera análoga, es importante determinar la calidad del agua residual utilizada para riego, por ello se ha decidido implementar estudios que permitan la identificación y cuantificación de los posibles contaminantes que se infiltran en el suelo, así como los que salen por escorrentía superficial.

El análisis de la capacidad amortiguadora del suelo, para los compuestos evaluados en la tesis, se hizo mediante el monitoreo de un riego con agua residual, en la parcela RosiTere, en el rancho Las Palmas (Figura 2.4). En un primer tiempo se midió la superficie de la parcela.

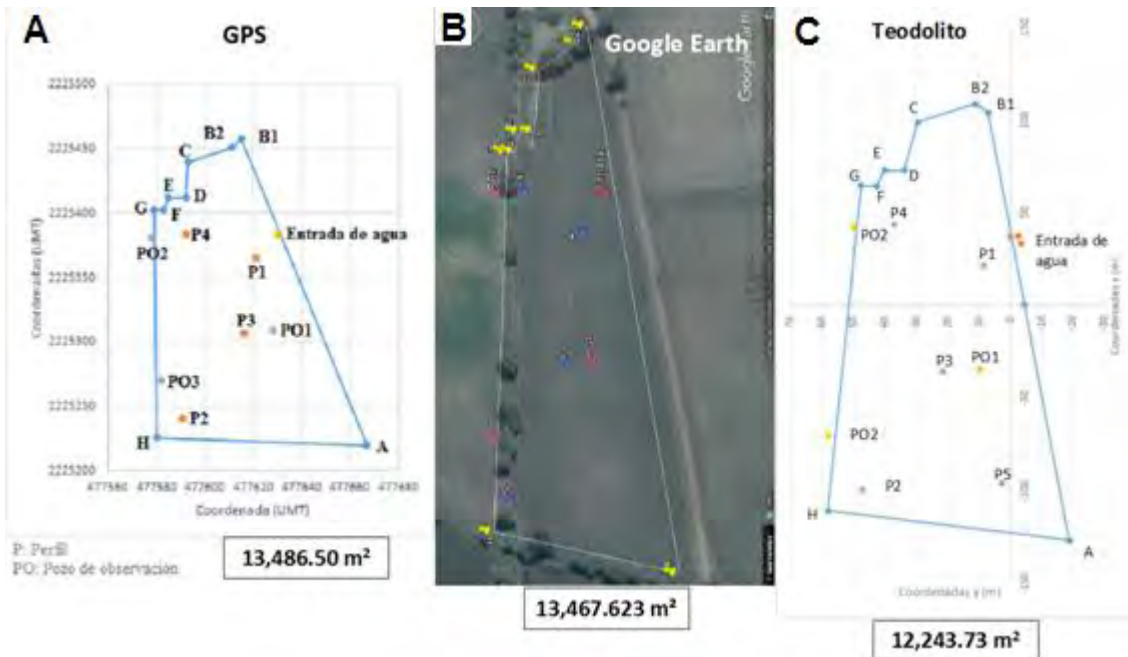


Figura 2.4. Determinación de área total de la parcela, sitio B. Coordenadas UTM, B. GPS utilizando Google earth, C. Área utilizando un Teodolito.

Una vez determinada el área total de la parcela, se decidió tomar los puntos de recolección de muestra. Para la determinación de SMX presente en diferentes profundidades de la parcela se establecieron los siguientes puntos de toma de muestra.

- Entrada de agua del riego (100 cm)
- Punto medio de la parcela (P1, 80 cm)
- Extremo inferior izquierdo de la parcela (P2, 140 cm)
- Extremo inferior izquierdo de la parcela (pozo profundo, P2P)
- Extremo inferior derecho de la parcela (P3, 132 cm)
- Salida de agua del riego (0 cm)

La recolección de muestras se realizó de forma continua, es decir, se mantuvo un monitoreo constante en cada uno de los puntos de muestra, tomando muestras cada treinta minutos, durante el tiempo en el que el flujo de agua se mantuvo constante.

2.6 Toma de muestras ambientales de SMX, 2-HA, DEA y ATZ

Se realizaron diferentes procedimientos para la recolección de las muestras de agua en los puntos descritos en el numeral anterior. Las muestras procedentes del agua de manantial (Cerro Colorado) y de agua residual son superficiales. El agua extraída de los piezómetros profundos, así como el agua de las norias (pozos), proceden de la zona crítica del suelo.

2.6.1 Recolección de muestras del agua residual

Para la recolección del agua residual se utilizó una cubeta flexible amarrada en una cuerda de aproximadamente 30 m de largo, la cual era arrojada hacia la parte media del canal, con el fin de recolectar una muestra más homogénea.

2.6.2 Recolección de muestras del agua de los piezómetros

Para recolectar las muestras de agua subterránea procedentes de los piezómetros de 38 y 24 m de profundidad, primero se colocó un tripié adaptado con una polea, en la cual se sujetaba un bailer (muestreador) de PVC transparente que consiste en un tubo de 1.2 m de longitud y 0.1 m de diámetro. Dicho muestreador fue utilizado para tratar de extraer la mayor cantidad del agua estancada contenida dentro del piezómetro, de tal manera que conforme éste se iba vaciando, permitiera la entrada del agua subterránea contenida en el acuífero, con el fin de obtener una muestra representativa del punto de muestreo. Para ello, el muestreador se introdujo 10 veces. Una vez terminado el proceso de vaciado, el muestreador de PVC se retiró de la polea y se colocó un muestreador discreto de intervalos, que consiste en un tubo de acero inoxidable conectado a una manguera de polietileno de baja densidad montada en un carrete con un adaptador para una bomba manual de presión que sirve para aplicar o liberar la presión al muestreador. Así, éste se introducía en el piezómetro y se recolectaba la muestra de agua subterránea.

2.6.3 Recolección de muestra del agua procedente de las norias (pozos)

Para recolectar el agua de las norias (pozos utilizados por los lugareños como fuente de abastecimiento) de 22 y 15 m de profundidad, se utilizó un muestreador de acero inoxidable, ya que al ser norias son reabastecidas continuamente y no hay estancamientos (no es necesario entonces el proceso de vaciado previo a la toma de muestra).

2.6.4 Recolección de muestra del agua de manantial

El agua de manantial era recolectada directamente con la botella de vidrio color ámbar de uno de los bordes del manantial, se eligió la zona donde se observaba el brote de agua.

En todos los puntos el volumen de muestra recolectado fue de 1 L, utilizando un frasco de vidrio color ámbar previamente etiquetado (nombre de la muestra y fecha de la recolección), posteriormente se le añadió 1 mL de MeOH con el fin de inhibir la actividad microbiana. Las muestras eran conservadas en una hielera hasta su llegada al laboratorio, donde se guardaron en el congelador a una temperatura de -20 °C para su posterior análisis.

2.7 Tratamiento de la muestra previo a la extracción en fase sólida

Antes de pasar las muestras a través de los cartuchos de extracción fue necesario filtrarlas, con el objetivo de eliminar cualquier tipo de residuo sólido que pueda obstruir el paso de la muestra a través del cartucho y dentro de la columna cromatográfica. Para ello se realizó un proceso de doble filtrado al vacío; en el primer filtrado se utilizó un embudo Büchner montado en un matraz kitasato de 250 mL con un papel filtro Whatman® de 55 mm de diámetro.

El agua recolectada del primer filtrado se volvió a filtrar a través de una membrana de celulosa regenerada de 47 mm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro, el cual era colocado en un matraz kitasato de 1 L, después de recolectar el segundo filtrado la muestra se ajustó a un pH de 3 con ácido fórmico para finalmente ser sometida al protocolo de extracción en fase sólida.

2.8 Evaluación del protocolo de extracción SPE en muestras ambientales

Una vez que las muestras fueron filtradas, se sometieron al protocolo de extracción en fase sólida desarrollado en el presente trabajo. Esto tiene como objetivo evaluar tres aspectos significativos del protocolo. El primero fue determinar el factor de concentración experimental del protocolo de extracción, el segundo determinar los valores de recobro del método de extracción y el tercero fue identificar si existe un efecto importante de la matriz ambiental en la determinación de los analitos de interés.

Tres muestras ambientales de cada tipo fueron seleccionadas para cada uno de los analitos de interés (Tabla 2.15), las cuales fueron sometidas al protocolo SPE desarrollado para los analitos.

Tabla 2.13 Matrices seleccionadas para ser sometidas al protocolo SPE dependiendo del analito de interés

Analito	Matrices acuosas seleccionadas
SMX	Residual, piezómetro, manantial
ATZ, 2-HA, DEA	Piezómetro, noria (pozos), manantial

2.8.1 Determinación del factor de concentración experimental

Determinar el factor de concentración experimental es muy importante, ya que la preconcentración de las muestras es una de las principales ventajas de la extracción en fase sólida y así disminuir los límites de detección y cuantificación,

para determinar este factor se plantearon experimentos de recobro. Las muestras ambientales fueron fortificadas a 5 niveles de concentración (Tabla 2.16).

Las concentraciones fortificadas y el factor de concentración experimental fueron determinados por medio de curvas de calibración, donde el valor de la pendiente es el valor del factor de concentración experimental; dicha curva de calibración fue determinada con base en la metodología propuesta en el presente trabajo tanto para SMX como para ATZ.

Para todos los analitos se realizaron experimentos de blancos de muestra, los cuales consistieron en inyectar una muestra sin fortificar por cada nivel de concentración fortificado. Dichos blancos fueron utilizados para realizar las correcciones de concentración de las muestras fortificadas como lo muestra la ecuación (18).

$$\text{Concentración recobro} = \text{Conc. fortificada} - \text{Conc. sin fortificar} \quad (18)$$

El uso de blancos es necesario para contar con una estimación más real de las interferencias que pueden encontrarse en el sistema.

Tabla 2.14 Niveles de concentración utilizados para los analitos de interés en los experimentos de recobro.

Analito	Niveles de concentración (µg/L)	Analitos	Niveles de concentración (µg/L)
SMX	1	ATZ, 2-HA, DEA	0.05
	0.5		0.03
	0.1		0.015
	0.01		0.01
	0.001		0.005

2.8.2 Determinación de los porcentajes de recobro

Una vez obtenida la preconcentración experimental, éste fue utilizado para determinar el porcentaje de recobro para todos los niveles de concentración mostrados en la Tabla 2.16.

El porcentaje de recobro para cada nivel de concentración es el cociente de la cantidad de analito recuperada de la elución entre la cantidad de analito esperada para la elución por cien.

$$C.A.s = C.A. * F.C.exp \quad (18)$$

$$\%R = \frac{C.A.e}{C.A.s} X 100 \quad (19)$$

Donde:

C.A.s. representa la concentración de analito esperada

F.C.exp. es el factor de concentración experimental

C.A.e. es la concentración de analito eluida

2.8.3 Determinación de los límites de detección y cuantificación de los analitos

Para la determinación de los límites de detección y cuantificación del método de análisis considerando la extracción en fase sólida, se utilizó la relación señal-ruido (SNR) que arroja el instrumento sobre los menores niveles de concentración de los experimentos de recobro.

El límite de detección será aquel cuya $SNR \geq 3$, mientras tanto para el límite de cuantificación la $SNR \geq 10$.

2.12 Determinación de la concentración de los analitos de interés en los sitios de estudio A y B en el Valle del Mezquital, Hidalgo

Una vez realizados todos los experimentos pertinentes a la validación instrumental, la optimización de la extracción en fase sólida y los experimentos de recobro para todos los analitos de interés, se decidió realizar el análisis de los monitoreos planteados en los sitios de estudio A y B.

2.12.1 Determinación de SMX en los sitios A y B

El monitoreo de SMX en la zona del Valle del Mezquital se dividió en dos etapas; la primer etapa constó de un monitoreo en extenso realizando 5 muestreos a lo largo de un año y abarcó prácticamente todo el piedemonte del canal Tlamaco-Juandhó hasta el manantial Cerro Colorado (sitio A). Dicho monitoreo fue realizado a diferentes alturas del pie de monte:

- La mayor altura corresponde al agua superficial proveniente del canal de agua residual Tlamaco-Juandhó,
- En la altura media del piedemonte a través del agua subterránea proveniente de los piezómetros profundos,
- La parte baja del pie de monte donde nuevamente se recolectó el agua superficial del manantial Cerro Colorado.

Dicho monitoreo fue realizado los meses de febrero, marzo, mayo, septiembre del año 2016 y el último en enero del 2017. La segunda etapa consta de un monitoreo a nivel de parcela en el Rancho “Las Palmas” (sitio B), correspondiente a la parte media del pie de monte. Este monitoreo se realizó el mes de enero del 2017 y buscó establecer la presencia de SMX dentro de la parcela de cultivo a diferentes alturas del suelo, en este estudio se monitorearon todos los puntos propuestos anteriormente.

2.12.2 Determinación de 2-HA, DEA y ATZ en el sitio de estudio A

Del mismo modo que el SMX, la ATZ y dos de sus principales metabolitos de degradación 2-HA y DEA, fueron monitoreados a lo largo de un año, realizando 5 muestreos en los meses de febrero, marzo, mayo, septiembre del año 2016 y el último de ellos en enero del 2017. Para este estudio los puntos de toma de muestra seleccionados fueron: Agua subterránea proveniente del piezómetro profundo 2, agua extraída de norias (pozos) dentro del pueblo de Tlahuelilpan y finalmente el agua del manantial de Cerro Colorado (Figura 2.4). Estos estudios se realizaron a partir de la altura media del pie de monte hasta la altura más baja del mismo.

Es necesario mencionar que en todos los casos se hicieron pasar 500 mL de muestra a través del de extracción correspondiente a cada analito.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3 Resultados y discusión

3.1 Desarrollo y validación de un método para la determinación de sulfametoxazol (SMX)

3.1.1 Optimización de parámetros del espectrómetro de masas

3.1.1.1 Experimentos SCAN

Con la finalidad de obtener los fragmentos de las moléculas de SMX y SMR procedentes de la ionización de ambos compuestos, se realizó el estudio cualitativo de dichos compuestos mediante un experimento de barrido másico (SCAN), esto permite obtener los espectros de masas del SMX y la SMR; que se presentan en las figuras 3.1 y 3.2, respectivamente.

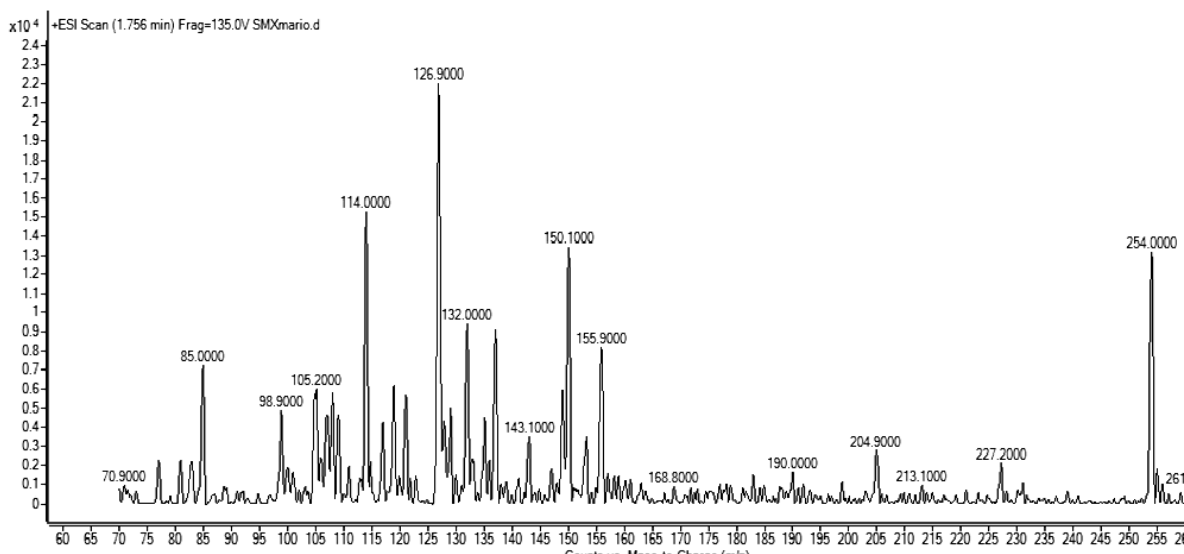


Figura 3.1. Espectro de masas correspondiente al SMX

De la figura 3.1 se determinó el patrón de fragmentación correspondiente a la molécula de SMX, que presentaron repetibilidad de aparición en los tres ensayos donde: el ion 254.0 m/z está asociado al ion molecular protonado $[M+H]^+$ del SMX; también se determinaron los siguientes iones: 155.9, 150.1 m/z, el ion 126.9 m/z es denominado pico base del espectro y finalmente los iones 114.0 y 98.9 m/z.

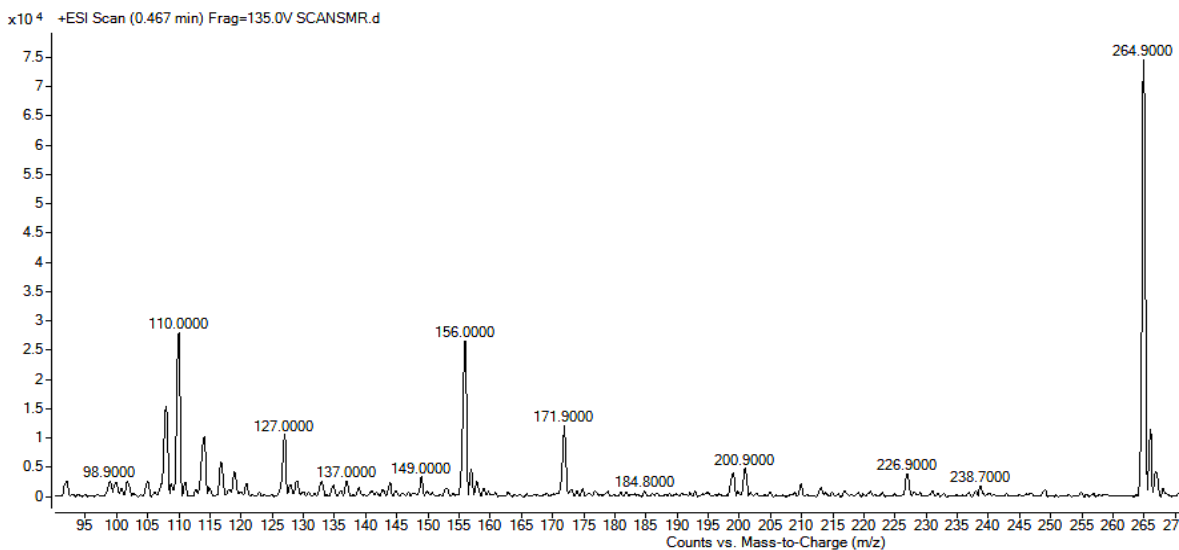


Figura 3.2 Espectro de masas correspondiente a la SMR

El patrón de fragmentación correspondiente a la SMR de la figura 3.2 se muestra más limpio en comparación al SMX, esto hace posible la identificación de los fragmentos de forma sencilla, donde el ion 264.9 m/z está asociado al ion molecular protonado $[M+H]^+$ y también al pico base de espectro perteneciente a la SMR, aunado a esto se determinaron los iones 171.9, 156.0, 127.0 y 110.0 m/z.

El hecho de que los patrones de fragmentación antes mencionados aparezcan de forma consistente en todos los experimentos es preponderante, ya que es el principal criterio seleccionado para realizar un análisis cuantitativo.

3.1.1.2 EXPERIMENTOS SIM

El experimento SIM permitió definir los fragmentos que brindaron la mayor cantidad de área (u.a.) para ambos compuestos. Estos fragmentos serán utilizados posteriormente para el análisis cuantitativo.

En la Tabla 3.1 se muestran las áreas obtenidas para los fragmentos determinados del SMX por un análisis en modo SIM.

Tabla 3.1 Áreas determinadas para cada fragmento de SMX

Ion molecular [M ⁺]	Fragmentos (m/z)	Área (u.a.)
254.0	155.9	82385
	150.1	4555
	126.9	1779
	114.0	4771
	98.9	31427

En la Tabla 3.1 se puede observar que los fragmentos 155.9 y 98.9 m/z presentan una cantidad de área significativamente mayor en comparación a los demás fragmentos.

Por otro lado las áreas obtenidas en los experimentos SIM para los fragmentos de SMR se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Áreas determinadas para cada fragmento de SMR

Ion molecular [M ⁺]	Fragmentos (m/z)	Área (u.a.)
264.9	171.9	82722
	156.0	154100
	126.9	52859
	110.0	150580

En la Tabla 3.2 se observa que todos los fragmentos correspondientes a SMR presentan áreas elevadas, empero los fragmentos 156.0 y 110.0 m/z son los que presentan prácticamente el doble de área que los fragmentos 171.9 y 126.9 m/z.

Los fragmentos determinados experimentalmente concuerdan con los reportados en la literatura [122, 123 ,124]. El hecho de que estos iones presenten repetibilidad en la fragmentación del experimento SCAN, así como un área de pico elevada en los experimentos SIM, hace que estos fragmentos sean considerados idóneos

para la realización de los experimentos cuantitativos. Por esta razón, dichos iones fueron seleccionados para optimizar los 8 parámetros con más significativos del espectrómetro de masas en el modo de adquisición Multiple Reaction Monitoring (MRM).

3.1.1.3 Experimentos de optimización en modo MRM

El modo MRM fue seleccionado ya que se desea tener una cuantificación lo más específica posible, ya que las matrices que se trataron en el presente trabajo pueden ser muy complejas. De forma análoga es necesario aumentar la sensibilidad del espectrofotómetro de masas, este modo de monitoreo permite establecer un seguimiento de fragmentos específicos a partir de un fragmento parental, es por esto que se realizaron los experimentos de SCAN completo y SIM.

Con base en los resultados de SCAN y SIM se decidió establecer a los iones moleculares de SMX y SMR como iones parentales, así como los iones que brindaron la mayor cantidad de área como los iones a seguir en el experimento MRM, como se muestra en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Establecimiento de los iones parentales y los iones a seguidos por MRM

SMX		SMR	
Ion parental (m/z)	Iones seguidos (m/z)	Ion parental (m/z)	Iones seguidos (m/z)
254.0	155.9	264.9	156.0
	98.9		110.0

Los parámetros de voltaje capilar, temperatura de gas de secado, flujo de gas y presión de nebulizador, fueron optimizados en función de la máxima área obtenida

para los iones de SMX seleccionados y permanecieron constantes para los iones correspondientes al estándar interno (SMR). Mientras tanto los parámetros de energía de colisión, fragmentación y la medición de señal por muestreo (dwell) fueron optimizados para los cuatro iones de ambas especies. En la Tabla 3.4 se muestran los valores optimizados de cada uno de los parámetros para cada uno de los iones seleccionados.

Tabla 3.4 Optimización de parámetros del espectrofotómetro de masas

Parámetros optimizados	Iones seleccionados (m/z)			
	SMX		SMR	
	155.9	98.9	156.0	110.0
Temperatura de gas de secado (°C)	340			
Flujo de gas (L/min)	11			
Presión del nebulizador (psi)	30			
Voltaje capilar (V)	6000			
Fragmentador (V)	85	60	80	90
Energía de colisión (eV)	12	18	12	18
Dwell	50	100	50	100

La optimización de estos parámetros está asociada al máximo incremento en el área de un pico, en este caso el área de pico para cada uno de los iones. Es fundamental determinar el área máxima ya que esta optimización está directamente relacionada con el correcto establecimiento de los parámetros de validación.

3.1.2 Optimización de las condiciones cromatográficas para la determinación de SMX

3.1.2.1 Selección de la fase móvil

La selección de la fase móvil se hizo considerando la estabilidad del SMX y la SMR con respecto al pH, la polaridad de las moléculas con respecto a los disolventes de la fase móvil, así como las impurezas existentes en la matriz ambiental, las cuales pueden presentar interferencias en el análisis.

El primer aspecto a considerar es el pH de la fase móvil en conjunto con los pka's del SMX y la SMR, ya que éstos deben estar en su forma molecular para que puedan ser analizados por cromatografía en fase reversa; es por esto que el pH debe ser ligeramente ácido, para que esto ocurra se utilizó ácido fórmico 0.1 % con un pH de 3 [114], aproximadamente, como uno de los disolventes de la fase móvil. El segundo aspecto considerado fue la polaridad, donde se probaron MeOH y AcCN como disolventes que conforman la fase móvil. Finalmente se consideró que al existir matrices complejas, las impurezas existentes en ellas tienden a salir en bajos tiempos de retención, por lo cual se aplica un gradiente de elución con un flujo constante de 0.6 mL/min. Estos resultados se muestran en las Tablas 3.5 y 3.6.

Tabla 3.5 Tiempos de retención obtenidos para SMX y SMR al evaluar dos composiciones de fase móvil

Fase móvil	Analitos	tr (min)
(A) HCO ₂ H (0.1 %)/ (B) MeOH	SMR	3.5
	SMX	22.3
(A) HCO ₂ H (0.1 %)/ (B) AcCN	SMR	6.6
	SMX	12.0

Tabla 3.6 Tiempos de retención obtenidos para SMX y SMR al evaluar dos gradientes de elución de la fase móvil: donde A es HCO₂H (0.1 %) y B es AcCN.

Gradiente	Tiempo	Proporción		tr (min)	
		% A	% B	SMR	SMX
1	0-3	90	10	2.7	6.0
	3-6	0	100		
	6-12	90	10		
2	0-7	70	30	6.6	12
	7-12	0	100		
	12-15	70	30		

A partir de la Tabla 3.5 es posible observar que la fase móvil HCO₂H (0.1%)/MeOH promueve la rápida elución de la SMR, esto se traduce en tiempos de retención bajos, esto puede provocar interferencias entre el estándar interno y las impurezas existentes en la matriz al eluir, mientras tanto el SMX presenta una mayor afinidad por la fase estacionaria (fase reversa), lo que provoca que el tiempo de retención aumente significativamente. Además, la fase móvil HCO₂H (0.1%)/AcCN permite que la afinidad del estándar interno (SMR) por la fase estacionaria sea mayor, por lo que su tiempo de retención aumenta alejándose de las posibles interferencias de matriz, aunado a esto la fuerza de elución es mayor al usar AcCN, esto permite aumentar la afinidad del SMX por la fase móvil, provocando la disminución del tiempo de retención y por ello un menor tiempo de corrida total de análisis.

Análogamente el gradiente 2 mostrado en la Tabla 3.6 brinda tiempos de retención que favorecen la separación del estándar interno (SMR) de las impurezas y tiempos de retención en ambas sustancias que permiten establecer una mejor separación cromatográfica en un tiempo de corrida total relativamente bajo.

3.1.2.2 Volumen de inyección de muestra

Otro parámetro que fue importante considerar en el establecimiento de las condiciones cromatográficas fue el volumen de inyección, ya que éste puede afectar la cantidad de área obtenida, así como la forma del pico de ambas especies. La optimización de este parámetro fue evaluada con diferentes volúmenes de inyección como se muestran en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7 Evaluación de los volúmenes de inyección de la muestra

Volumen de inyección (μL)	Área	
	SMR	SMX
5	82180	78120
10	204367	238762
12	ND	ND

*ND. Compuesto no determinado

En la Tabla 3.7 es posible observar que la inyección de 5 μL de muestra brinda la menor cantidad de área y picos definidos, la inyección de 10 μL genera una mayor cantidad de área y picos definidos claramente diferenciables (Figura 3.3). Por otro lado la inyección de 12 μL de muestra no es determinable ya que presenta una partición completa del pico correspondiente al SMX.

Finalmente la Tabla 3.8 resume las condiciones cromatográficas para el desarrollo del método.

Tabla 3.8 Condiciones cromatográficas del método desarrollado

Condiciones cromatográficas			
Volumen de inyección (µL)	10		
Flujo (mL/min)	0.6		
Fase móvil	(A) HCO ₂ H (0.1 %)/ (B) AcCN		
Columna	ZORBAX SB-C18 (fase reversa)		
Gradiente	Tiempo (min)	%A	%B
	0-7	70	30
	7-12	0	100
	12-15	70	30

Bajo estas condiciones se encontró que la SMR tiene un tiempo de retención aproximadamente de 6.6 min y el SMX tiene un tiempo de retención aproximado de 12.0 min y un tiempo de corrida total de 15 min. Finalmente se toma como tiempo muerto 2.8 min (figura 3.3).

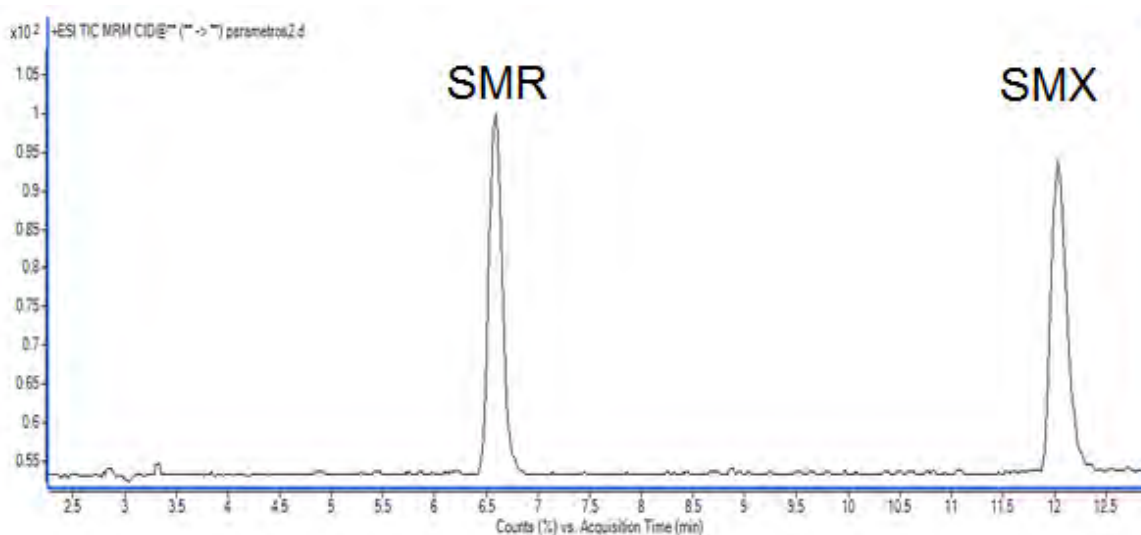


Figura 3.3 Cromatograma obtenido con las condiciones óptimas de trabajo para una concentración de 1 mg/L de SMX empleando SMR como estándar interno

3.1.2.3 Parámetros cromatográficos del sistema

Las condiciones óptimas del sistema cromatográfico determinadas en los numerales anteriores deben ser adecuadas para asegurar una buena separación del SMX y la SMR, es por esa razón que fueron determinados los parámetros cromatográficos del sistema, dichos parámetros se muestran en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9 Parámetros cromatográficos del método desarrollado

Compuesto	Parámetros cromatográficos						
	tr (min)	tr' (min)	N	Wb	K'	α	Rs
SMR	6.6	3.8	526	1.1	1.3	2.5	4.9
SMX	12.0	9.2	2092	1.1	3.2		

Cuando se trabaja con cromatografía HPLC, se sugiere que el coeficiente de selectividad α debe tener un valor mayor o igual a la unidad y la resolución entre dos picos adyacentes debe ser mayor a 2 para garantizar que la separación entre ellos es adecuada. Se puede observar en la tabla 3.9 que estos dos parámetros se cumplen satisfactoriamente entre el estándar interno y el analito de interés.

3.1.3 Validación del método

Intervalo lineal

Para elaborar las curvas de calibración con estándar interno, se prepararon disoluciones de concentración conocida a 9 niveles de concentración por triplicado en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.4 a 50 µg/L. Empero la respuesta lineal se determinó en el intervalo de 1 a 50 µg/L (Figura 3.4).

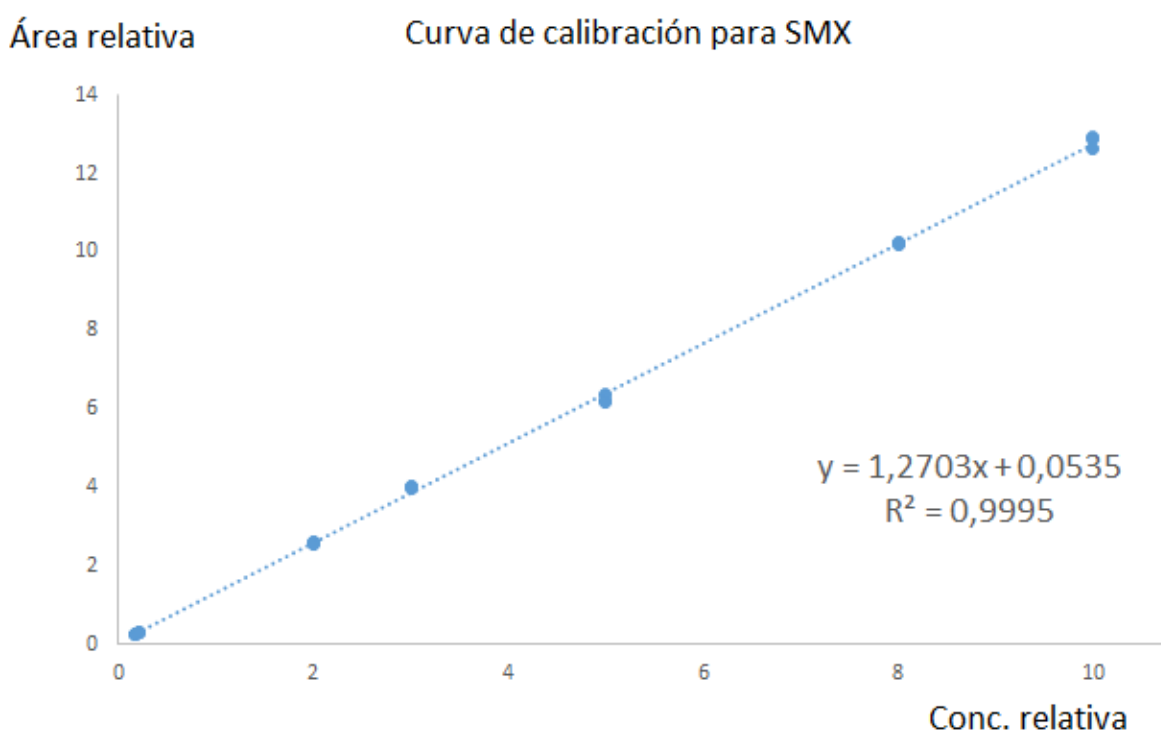


Figura 3.4 Curva de calibración de estándar interno correspondiente al SMX utilizando SMR como estándar interno.

Como se observa en la Figura 3.4 a partir de los datos obtenidos, el modelo matemático de regresión lineal es el que describe mejor el comportamiento de la curva de calibración.

$$Y = mx + b \quad (18)$$

En el caso de una curva de calibración con estándar interno, la ecuación de regresión relaciona el área relativa de los picos cromatográficos con la concentración relativa, esto es:

$$A_{REL} = mC_{REL} + b \quad (19)$$

Donde:

$$A_{REL} = \frac{A_{ANALITO}}{A_{E.I.}} \quad y \quad C_{REL} = \frac{C_{ANALITO}}{C_{E.I.}}$$

Por lo cual la determinación de la concentración del analito se puede reescribir de la siguiente manera:

$$C_{ANALITO} = \left(\frac{A_{ANALITO}}{A_{E.I.}} - b \right) \frac{C_{E.I.}}{m} \quad (20)$$

Siendo esta última la ecuación utilizada para determinar la concentración de analito presente. En dicha ecuación es sumamente importante que los valores de la pendiente (m) y de ordenada al origen (b) provienen de un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados de la curva de calibración. Los datos obtenidos por el análisis de regresión lineal se presentan a continuación en la Tabla 3.10 y fueron trabajados con un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 3.10 Análisis de regresión lineal para SMX con n=14

Parámetro	Valor
Intervalo lineal (µg/L)	1 - 50
n	14
Pendiente (m)	1.2700±0.022
Ordenada al origen (b)	0.06±0.12
Coefficiente de correlación (r)	0.9996
Ecuación de regresión	Y=1.2700X+0.06

Para establecer la existencia de un intervalo lineal, es necesario verificar el coeficiente de correlación (r) como un criterio de aceptación. De la tabla anterior se observa que el valor del coeficiente de correlación de la curva de calibración es $(r) \geq 0.999$. Por lo cual es posible decir que existe una proporcionalidad lineal entre el área del pico y las concentraciones de SMX comprendidas en el intervalo de 1 a 50 µg/L para corroborar la linealidad propuesta se analizó el gráfico de residuos (Anexo) y se observó una tendencia aleatoria en los residuales, lo cual reafirma la linealidad del intervalo propuesto.

Evaluación de residuales

La evaluación de los residuales fue evaluada para tres niveles de concentración por quintuplicado, mediante la determinación de las concentraciones de dichos niveles a través de la ecuación de regresión lineal mostrada anteriormente, la cual fue comparado posteriormente contra la concentración analítica (concentración real). Finalmente se determinó el porcentaje de error asociado a la medición.

$$\% \text{ error} = \frac{\text{Concentración}_{\text{Calculada}} - \text{Concentración}_{\text{Real}}}{\text{Concentración}_{\text{Real}}} 100$$

Los resultados obtenidos para el porcentaje de error se muestran en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11. Evaluación de los residuales para tres niveles de concentración (n=15)

Analito	Concentración real (µg/L)	Área SMR (u.a.)	Área SMX (u.a.)	Área relativa	Concentración relativa	Concentración SMX (µg/L)	Media de la Concentración SMX (µg/L)	%Error
SMX	10	1 682	4 492	2.6706	2.0591	10.2953	10.2568	2.6
		1 688	4 443	2.6321	2.0287	10.1437		
		1 677	4 521	2.6959	2.0789	10.3947		
		1 745	4 689	2.6871	2.0720	10.3602		
		1 701	4 454	2.6185	2.0180	10.0900		
	30	1 727	13 255	7.6752	5.9987	29.9935	30.2168	0.7
		1 715	13 263	7.7335	6.0447	30.2233		
		1 715	13 159	7.6729	5.9969	29.9846		
		1 747	13 492	7.7230	6.0363	30.1817		
		1 716	13 479	7.8549	6.1402	30.7010		
	44	1 766	19 835	11.2316	11.2316	43.9920	44.1218	0.3
		1 767	19 910	11.2677	11.2677	44.1340		
		1 721	19 479	11.3184	11.3184	44.3337		
		1 745	19 589	11.2258	11.2258	43.9691		
		1 757	19 818	11.2795	11.2795	44.1803		

En los resultados obtenidos y mostrados en la Tabla 3.11, se observa que el porcentaje de error es relativamente pequeño en los tres niveles de concentración propuestos. Se observa que conforme disminuye la concentración de SMX aumenta el porcentaje de error.

a) Prueba estadística sobre la pendiente

Se realizó una prueba de hipótesis sobre la pendiente con el fin de corroborar si existe una dependencia entre el área de pico y la concentración de SMX. De acuerdo con lo descrito en el anexo.

Los resultados de esta prueba se presentan en la Tabla 3.12 donde se hace evidente que el valor de $t_{calculada}$ es significativamente mayor al obtenido en $t_{crítica}$, por lo cual se rechaza la hipótesis nula ($H_0=0$), esto quiere decir que el valor de la pendiente es mayor a cero ($m>0$), por lo tanto existe dependencia entre el área de pico y la concentración de las disoluciones de SMX.

Tabla 3.12 Prueba de hipótesis sobre la pendiente (nivel de confianza $\alpha=0.05$)

$t_{calculada}$	$t_{crítica}$	Decisión
127.1	1.8	Rechazar H_0

b) Prueba estadística sobre la ordenada

Del mismo modo se planteó una prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen, de las curvas de calibración del método desarrollado en el presente trabajo.

Con los datos experimentales mostrados en la Tabla 3.13, se calculó el valor de $t_{calculada}$, el cual fue menor al valor establecido por tablas $t_{crítica}$, por lo cual la hipótesis nula se acepta ($H_0=0$), esto significa que el valor de la ordenada al origen es cero, por lo cual se concluye que no hay errores sistemáticos en el método de cuantificación del presente trabajo.

Tabla 3.13 Prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen (nivel de confianza $\alpha=0.05$)

$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$	Decisión
1.1	1.8	Aceptar H_0

Precisión

Este parámetro se evaluó en términos de repetibilidad, determinando el porcentaje del coeficiente de variación (%CV) del área del pico para tres niveles de concentración, los cuales fueron preparados e inyectados por quintuplicado de forma independiente, cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.14.

Tabla 3.14 Evaluación de la precisión para tres niveles de concentración (n= 15)

Analito	Concentración (µg/L)	Área SMR (u.a.)	Área SMX (u.a.)	Área relativa	Media (X)	Desviación estándar (σ)	%CV
SMX	6	1 778	2 792	1.5703	1.6071	0.0386	2.4
		1 674	2 692	1.6081			
		1 719	2 696	1.5684			
		1 677	2 736	1.6315			
		1 677	2 779	1.6571			
	25	1 685	10 760	6.3858	6.4472	0.0569	0.9
		1 678	10 802	6.4374			
		1 668	10 733	6.4347			
		1 665	10 718	6.4372			
		1 652	10 806	6.5412			
	40	1 603	16 347	10.1978	10.2134	0.0266	0.3
		1 584	16 223	10.2418			
		1 603	16 314	10.1772			
		1 602	16 396	10.2347			
		1 601	16 355	10.2155			

Taverniers et al [115] señalan que un sistema de medición preciso es aquel en el cual sus %CV < 3 %. Si se presta atención a los resultados mostrados en la Tabla 3.14 se puede observar que los porcentajes del coeficiente de variación (%CV) para los tres niveles de concentración evaluados son menores al tres por ciento, esto implica que la curva de calibración propuesta es precisa en prácticamente el intervalo lineal establecido. Por otro lado se puede observar que conforme disminuye la concentración de SMX a lo largo de la curva de calibración, el %CV aumenta, esto quiere decir que la precisión es ligeramente menor a menores concentraciones.

Límites de detección (LDD) y cuantificación (LDC)

Primero se realizó el análisis del blanco, dado que no se encontró un pico generado por el SMX, se prepararon siete disoluciones de manera independiente con una concentración de 0.4 µg/L, mismas que fueron inyectadas al cromatógrafo. Se eligió esa concentración ya que era la concentración más baja que se puede diferenciar con respecto al ruido en el HPLC utilizado, dando una relación señal ruido (SNR por sus siglas en inglés) SNR=15.0.

Finalmente la Tabla 3.15 muestra los resultados obtenidos para la determinación de los límites de detección y cuantificación instrumentales para el SMX.

Con base en los resultados obtenidos y mostrados en la tabla 3.15, se puede establecer que en el sistema cromatográfico la concentración mínima detectable con precisión se encuentra alrededor de 0.44 µg/L y la concentración mínima cuantificable con precisión es de 1.02 µg/L, Esto implica que el método instrumental permite la cuantificación de SMX en concentraciones sumamente pequeñas, a partir de 1 µg/L ya que la concentración mínima cuantificable es prácticamente el punto más bajo del intervalo lineal aceptado en la curva de calibración propuesta.

Tabla 3.15 Determinación de los límites de detección (LDD) y cuantificación (LDC) para el análisis de SMX (n=7)

Analito	Concentración (µg/L)	Área relativa	LDD Área relativa	LDC Área relativa	LDD Concentración relativa	LDC Concentración relativa	LDD (µg/L)	LDC (µg/L)
SMX	0.4	0.1231	0.1410	0.2563	0.0677	0.1584	0.44	1.02
		0.0920						
		0.0777						
		0.1020						
		0.0781						
		0.0886						
		0.798						
	X Área relativa	0.0916						
	S Área relativa	0.0162						

Los límites de detección y cuantificación se reportan según lo establecido por Miller y Miller, donde: $LDD = X_B + 3\sigma/m_B$, $LDC = X_B + 10\sigma/m_B$

3.2 Optimización del método de extracción en fase sólida (EFS/SPE) para sulfametoxazol, 2-hidroxiatrazina, desetilatrazina y atrazina

3.2.1 Extracción en fase sólida (SPE) para SMX

3.2.1.1 Selección del disolvente de elución y de lavado

Se evaluaron 5 mL de MeOH y el AcCN como disolventes de elución y de lavado, Estos ensayos se realizaron en la etapa de elución y se calculó el porcentaje de recuperación de SMX, conforme a la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Cantidad analito eluida}}{\text{Cantidad de analito cargada}} \times 100$$

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.16.

Tabla 3.16 Porcentaje de SMX recuperado para MeOH y AcCN

Disolvente	SMX cargado (µg)	SMX eluido (µg)	% Recuperación
MeOH	0.127	0.128	100.6
AcCN	0.125	0.105	83.8

A partir de la tabla anterior se observa que el disolvente que logra la mejor elución del SMX de los cartuchos es el MeOH, ya que brinda un porcentaje de recuperación del cien por ciento, por esta razón se decidió utilizar al MeOH como el disolvente de elución. Se pudo observar que 5 mL fueron suficientes para realizar una elución exitosa del SMX cargado.

El AcCN no logró extraer todo el SMX del cartucho, esto implica que existe SMX remanente en el cartucho de extracción; esto se hace evidente al no encontrarse SMX en la etapa de carga y lavado. Es por esto que se decidió utilizar AcCN como disolvente de lavado.

3.2.1.2 Determinación de la concentración porcentual de AcCN como disolvente de lavado

Al decidir utilizar al AcCN como disolvente de lavado, se tiene que considerar que si bien no es el mejor de los disolventes de elución, si logra recuperar más del 80 % de SMX del cartucho, por lo cual se probaron 3 concentraciones diferentes de AcCN en la etapa de lavado. Para ello se calcularon los porcentajes de recuperación de las etapas de lavado y elución. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla 3.17. Es necesario mencionar que el disolvente utilizado en la etapa de elución fue MeOH.

Tabla 3.17 Porcentaje de recuperación de SMX utilizando AcCN en 3 concentraciones diferentes

Concentración (%v/v) de AcCN	SMX cargado (µg)	SMX eluido (µg)	% Recuperación (Lavado)	% Recuperación (Elución)
20	0.44	0.006	73.7	25.5
13	0.48	0.122	54.2	45.8
5	0.50	0.495	0.2	99.8

Los resultados de la tabla 3.17 permiten decir que al disminuir la concentración porcentual de AcCN disminuyen los porcentajes de recuperación de la etapa de lavado y aumentan los porcentajes de elución. Por lo cual una concentración de ACN al 5 % permite realizar un lavado del cartucho extrayendo la menor cantidad de SMX del mismo y con un porcentaje de recuperación aceptable del 99.8 %. Por ello, 5 mL de una disolución de AcCN con una concentración del 5 % será utilizada para eliminar todas las especies interferentes de la matriz del cartucho de extracción, permitiendo una buena purificación del SMX, sin embargo, esto deberá corroborarse con las matrices deseadas.

3.2.1.3 Determinación del volumen de ruptura

Al considerar que el SMX se encuentra en matrices ambientales con mucha complejidad, es sumamente importante determinar cuánto volumen es posible hacer pasar a través del cartucho en la etapa de carga sin que éste se sature e inhiba la retención del analito. Para ello se realizaron experimentos en los cuales se incrementaba el volumen mientras se mantenía la cantidad de analito constante; así se determinaron los porcentajes de recuperación, que se denotan a continuación (Tabla 3.18).

Tabla 3.18. Determinación del volumen de ruptura

Volumen cargado (mL)	SMX cargado (µg)	SMX eluido (µg)	% Recuperación
25	0.495	0.497	100.4
50	0.491	0.483	98.4
100	0.559	0.552	98.7
200	0.521	0.517	99.2
500	0.509	0.498	97.8

Los experimentos de volumen de ruptura muestran porcentajes de recuperación superiores al 97 %, dichos porcentajes indican que prácticamente el SMX no ha saturado el cartucho en la etapa de carga, por lo cual no existe una fuga del analito a pesar de aumentar el volumen. Esto es un resultado importante ya que permite establecer un volumen de muestra de 50 mL que podrá someterse al protocolo de extracción en fase sólida. Debe señalarse que este experimento no considera saturación, ya que se encuentra libre de una matriz compleja.

Con base en los resultados anteriores, se propone un protocolo de extracción en fase sólida para la purificación y pre concentración de SMX en diversas matrices acuosas del tipo ambiental. Este procedimiento se resume en la Tabla 3.19.

Tabla 3.19 Protocolo de extracción en fase sólida (SPE) para SMX

Etapas	Tratamiento	Volumen (mL)
Acondicionamiento	MeOH y H ₂ O	5 y 5 respectivamente
Carga	Estándar o muestra	25-500
Lavado	AcCN (5%)	5
Elución	MeOH	5

3.2.2 Extracción en fase sólida (SPE) para SMX

Como se mencionó en el capítulo de metodología, la validación del método instrumental para la determinación de 2-HA, DEA y ATZ fue desarrollada previamente. Sin embargo, en el presente trabajo también se desarrolló la optimización del método de extracción en fase sólida para purificar y pre concentrar las muestras de agua.

3.2.2.1 Selección de los disolventes de lavado y acondicionamiento

En este experimento se evaluaron las etapas de lavado y acondicionamiento para 2-HA, DEA, ATZ, el acondicionamiento se realizó primero con 5 mL de MeOH seguidos 5 mL de H₂O y después se acondicionó de forma inversa. Mientras tanto el lavado se realizó con 5 mL de MeOH (5 %) en ambos casos.

En la tabla 3.20 se presentan los µg de los analitos obtenidos en cada una de las etapas, así como el porcentaje de recuperación.

Tabla 3.20 Porcentajes de recuperación de los analitos en las etapas de acondicionamiento y lavado.

Acondicionamiento (5 mL) respectivamente	2-HA, DEA y ATZ cargados (µg)	Analitos en la etapa lavado MeOH (5 %)	2-HA, DEA y ATZ eluidos (µg)	% Recuperación
MeOH y H ₂ O	250	0	212.7	85.1
H ₂ O y MeOH		0	212.1	84.8

Con base en los resultados de la Tabla 3.20, es evidente que la inversión de disolventes en la etapa de acondicionamiento no tiene un efecto significativo en la eficiencia del cartucho, de la misma forma el MeOH (5 %) es un disolvente que permite realizar el lavado del cartucho sin tener pérdidas de ningún analito de interés.

3.2.2.2 Selección del disolvente de elución

En la Tabla 3.20 también se observa que el MeOH tiene un porcentaje de recuperación superior al 80 %, sin embargo, es necesario evaluar si es el mejor disolvente de elución. Por ello se decidió evaluar la etapa de elución con 15 mL de MeOH y AcCN (Tabla 3.21).

Tabla 3.21 Porcentaje de recuperación para MeOH y AcCN en la etapa de elución

Disolvente (15 mL)	analitos cargados (µg)	Analitos eluidos (µg)			% Recuperación		
		2-HA	DEA	ATZ	2-HA	DEA	ATZ
MeOH	250	244.6	255.0	142.3	97.8	102.0	56.9
AcCN		237.4	246.9	135.4	95.0	98.8	54.2

Al comparar los porcentajes de recuperación de ambos experimentos no se observa una diferencia significativa en los porcentajes de recuperación entre el MeOH y el AcCN para ninguno de los analitos, sin embargo, el MeOH brinda los mejores porcentajes de recuperación y por ende fue seleccionado como disolvente de elución.

3.2.2.3 Determinación del volumen de elución

Si bien el MeOH fue seleccionado como el disolvente que brinda una mejor elución, se puede notar que 15 mL de MeOH son suficientes para eluir 2-HA y DEA ya que se observan recobros superiores al 95 % pero no son suficientes para eluir a la ATZ. Por esta razón se probaron diferentes volúmenes de MeOH hasta encontrar uno que permitiera eluir a la ATZ con un porcentaje de recuperación que estuviera muy cercano o bien fuera del 100 % (Tabla 3.22).

Tabla 3.22 Variación del volumen de MeOH para la etapa de elución

Volumen de MeOH (mL)	Cantidad ATZ cargada (µg)	Cantidad ATZ eluida (µg)	%Recuperación ATZ
15	250.1	142.3	56.9
20	250.0	237.5	95.0
25	250.1	243.1	97.2
30	249.9	256.2	102.5

Con base en los resultados obtenidos en la Tabla 3.22 se denota que al aumentar el volumen de disolvente aumenta relativamente la cantidad de ATZ eluida del cartucho. La diferencia del porcentaje de recuperación entre 15 y 20 mL es notable, sin embargo, este valor es prácticamente constante en los volúmenes comprendidos entre 20 y 30 mL, ya que todos ellos muestran porcentajes de recuperación superiores al 95 %. Finalmente se decidió que 30 mL de MeOH eran suficientes para garantizar la elución ATZ del cartucho.

3.2.2.4 Determinación del volumen de ruptura

Al igual que el SMX, la ATZ y sus principales metabolitos de degradación (2-HA, DEA) también pueden estar presentes en las matrices de agua seleccionadas, por eso es imprescindible determinar qué tanto volumen se puede percolar en el cartucho sin eluir el analito, como se muestra en la Tabla 3.23.

Tabla 3.23 Determinación del volumen de ruptura

Volumen de disolvente (mL)	µg de analitos cargados			µg de analitos eluidos			% Recuperación		
	2-HA	DEA	ATZ	2-HA	DEA	ATZ	2-HA	DEA	ATZ
10	254.4	281.8	251.2	249.4	285.3	254.6	94.1	101.2	101.4
25	262.8	267.1	252.5	268.9	267.3	242.3	102.3	100.1	96.0
50	250.0	250.0	243.9	244.6	255.0	237.5	97.8	102.0	96.2
100	267.7	255.9	250.0	276.4	257.7	243.1	96.8	99.3	97.2
250	250.2	270.1	245.0	264.5	281.7	238.0	105.7	104.3	90.1
500	261.4	291.7	262.2	261.2	301.5	256.2	103.8	103.3	101.6

Los porcentajes de recuperación determinados para los tres analitos a diferentes volúmenes de carga son superiores al 95 % y prácticamente es posible decir que todo el analito es percolado. Esto quiere decir que al hacer pasar los diferentes volúmenes de carga, el analito queda retenido en el cartucho, el cual no alcanza su nivel de saturación.

Lo anterior implica que se puede hacer pasar un volumen de 500 mL de muestra sin que exista fuga de analito a causa de la etapa de carga.

3.2.2.5 Efecto de la velocidad de flujo en la percolación de analitos

Finalmente se evaluó el efecto que existe entre la velocidad de flujo de la muestra con respecto al cartucho, donde se mantuvo la cantidad de analitos constante, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.24.

Tabla 3.24 Efecto de la velocidad de flujo en la percolación de analitos

Velocidad de flujo (mL/min)	Analitos cargados (µg)	Analitos eluidos (µg)	% Recuperación
1	250	254.8	101.92
2		259.0	103.6
4		256.2	102.48

Para todas las velocidades evaluadas se encontró un porcentaje de recuperación alrededor del cien por ciento, esto significa que la velocidad de flujo no es un parámetro que afecte la retención de los analitos cuando son percolados en los cartuchos. Esto es sumamente importante, ya que al no existir dependencia de la velocidad de flujo, es posible utilizar un instrumento que permita aplicar el protocolo de extracción de forma más rápida y por ende reducir el tiempo de tratamiento de muestra de forma importante.

3.3 Evaluación del protocolo de extracción para sulfametoxazol en matrices reales

Como parte final de este procedimiento de validación y técnica de preparación de muestra, es sumamente importante evaluar el efecto que presentan las matrices a tratar en el presente trabajo, antes de ofrecer algún resultado cuantitativo de la determinación de cualquiera de los analitos en los monitoreos realizados en el Valle de Tlahuelilpan.

3.3.1 Protocolo de extracción en fase sólida para SMX en matrices reales

Se realizó la determinación de SMX específicamente en tres aguas diferentes procedentes del Valle del mezquital que son agua de manantial, de piezómetro y residual. Considerando la complejidad que estas matrices presentan, se realizaron y analizaron los experimentos de recobros, los cuales arrojan la información que se muestra a continuación.

3.3.2 Determinación del factor de concentración experimental para el SMX

Los experimentos realizados para la determinación del factor de concentración experimental se determinaron para cada nivel de concentración propuesto y por medio del ajuste de mínimos cuadrados. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.5.

Las gráficas de correlación lineal de los factores de concentración experimental (figura 3.5) muestran coeficientes de correlación $R^2 \geq 0.999$, esto quiere decir que la correlación lineal entre la cantidad cargada y la cantidad recuperada es adecuada. Además los factores de concentración experimentales determinados son los siguientes: 100.61 para el agua de manantial, 99.97 para agua de noria (piezómetro) y 96.73 para el agua procedente del canal de agua residual.

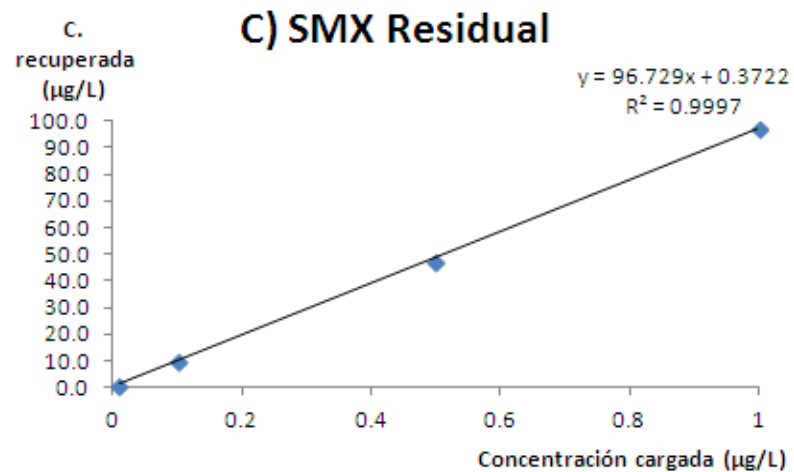
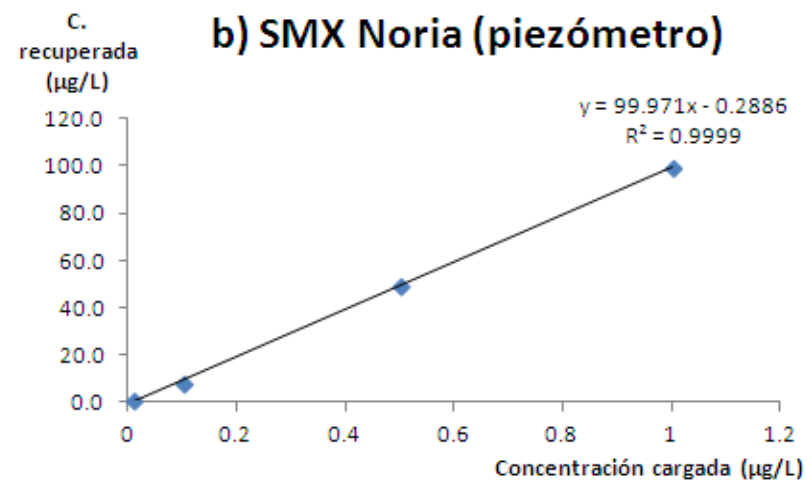
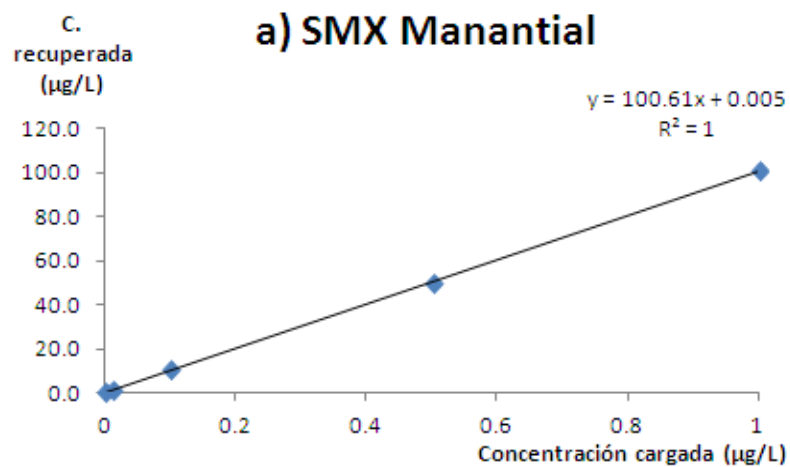


Figura 3.5 Gráficas para la determinación del factor de concentración experimental para SMX

Al eluir el SMX procedente de una disolución de 500 mL con 5 mL de MeOH, el factor de concentración esperado es de 100, al observar los valores experimentales obtenidos para cada matriz, podría decirse que son los mismos, sin embargo, es preferible realizar una prueba de hipótesis para asegurar la igualdad de valores, por ello se propone como hipótesis nula ($H_0=0$) que los factores de concentración experimentales y el teórico son iguales.

Las pruebas de hipótesis sobre dichos valores fueron aceptadas (ANEXO) para $H_0=0$, esto significa que todos los valores de concentración son estadísticamente iguales a 100, por lo cual se concluye que el cartucho brinda una eficiencia aceptable para pre concentrar el SMX en las muestras ambientales.

3.3.3 Determinación del porcentaje de recobro para SMX

Finalmente se decidió evaluar el porcentaje de recobro para el SMX sometido al protocolo SPE en las tres matrices; los resultados se muestran en la Tabla 4.25.

Como se puede observar en la Tabla 3.25, los porcentajes de recobro varían entre matrices en los niveles de concentración propuestos, ya que el nivel de concentración más bajo $0.001 \mu\text{g/L}$ puede ser detectado y posiblemente cuantificado en el agua de manantial, mientras que en las aguas de piezómetro y residuales no es posible determinarlo. Aunado a esto se observa que los porcentajes de recobro determinados en las tres matrices se encuentran en un intervalo comprendido entre el 74 y 119 % de recobro; con base en lo sugerido por Taverniers et al. [115], estos porcentajes de recobro son aceptables para todos los niveles de concentración en las tres matrices ambientales evaluadas; sin embargo, se puede notar un mayor efecto matriz en las aguas residuales ya que los porcentajes de recobro tienen una mayor tolerancia.

Tabla 3.25 Recobros individuales para SMX en cada nivel de concentración en las matrices ambientales

Matriz natural (agua)	Concentración cargada (µg/L)	Concentración esperada (µg/L)	Concentración recuperada (µg/L)	% Recobros
Manantial	1	100.6	100.8	100.1
	0.5	50.3	50.0	99.4
	0.1	10.0	10.4	103.1
	0.01	1.00	0.93	92.1
	0.001	0.1	0.075	74.6
Piezómetro	1	99.97	99.6	99.6
	0.5	49.99	50.07	100.2
	0.1	9.99	9.02	90.2
	0.01	0.99	1.15	115
	0.005	0.51	ND	ND
Residual	1	96.7	97.5	100.8
	0.5	48.4	47.8	98.9
	0.1	9.7	10.8	111.2
	0.01	0.97	1.1	118.8
	0.001	0.097	ND	ND

N.D. No determinado

Con base en los resultados de porcentaje de recobro anteriores se propone que el cartucho de extracción en fase sólida logró disminuir los límites de detección y cuantificación instrumentales de la técnica HPLC-MS/QqQ y se sugieren los siguientes límites de detección y cuantificación (Tabla 3.26).

Tabla 3.26. Valores de los límites de detección y cuantificación adquiridos con la pre concentración con cartucho SPE para SMX

Matriz	Parámetro	SPE/Instrumental (ng/L)	SNR
Agua de manantial	LDD	0.8	
	LDC	1	10.7
Agua de piezómetro	LDD	1	3.2
	LDC	10	16.0
Agua residual	LDD	5	4.6
	LDC	10	13.1

3.4 Evaluación del protocolo de extracción para 2-hidroxiatrazina, desetilatrazina y atrazina en matrices reales

Al igual que el SMX los analitos 2-HA, DEA y ATZ también fueron sometidos al protocolo desarrollado; a continuación se denotan los resultados de cada uno de los analitos de forma independiente, para cada uno de ellos se muestra el factor de concentración experimental, el porcentaje de recobro para cada nivel de concentración.

3.4.1 Determinación del factor de concentración para el 2-HA

La determinación del factor de concentración experimental del 2-HA para cada nivel de concentración se realizó a través del procedimiento de correlación lineal y su análisis por mínimos cuadrados para cada matriz; los resultados se muestran en la Tabla 3.27 y la Figura 3.6.

A partir de las gráficas de correlación lineal de la figura 3.6, se determinó que los coeficientes de determinación son $R^2 \geq 0.99$, esto quiere decir que existe un ajuste lineal adecuado entre la cantidad de 2-HA cargada y la recuperada, siendo el agua de manantial la que presenta un mejor ajuste lineal.

Por otro lado, es necesario recordar que el valor de la pendiente representa el factor de concentración experimental, el cual debe ser cercano o el mismo al factor de concentración teórico. El factor de concentración teórico está definido como la concentración recuperada entre la concentración cargada y tiene un valor de 16.66, al observar el valor de la pendiente en las diferentes matrices se denota que para la matriz correspondiente al agua de manantial el factor de concentración es 16.49, para el agua de piezómetro es de 16.96 y finalmente para el agua procedente de la noria (pozo) es 17.43.

Los valores de las pendientes son muy cercanos al valor teórico esperado, sin embargo, se aplicaron pruebas de hipótesis para todas las pendientes (ANEXO), bajo la propuesta de que todos los factores de concentración experimentales son iguales en todos los casos al factor de concentración teórico ($H_0=0$). Los resultados obtenidos establecen que para las tres matrices estudiadas, el factor de concentración es igual al factor de concentración teórico.

Esto implicaría que la eficiencia del cartucho para pre concentrar a la 2-HA en las muestras es adecuada en todos los niveles de concentración propuestos para las tres matrices ambientales.

3.4.2 Determinación del porcentaje de recobro para 2-HA

En la tabla 3.27 se observa que los porcentajes de recobro se encuentran definidos en el intervalo que va desde los 95 al 110 %, en las tres matrices, por lo cual cumplen los requerimientos sugeridos por Taverniers et al [115], dado que las concentraciones evaluadas están en el orden de $\mu\text{g/L}$.

Esto quiere decir que en todos los niveles de concentración propuestos con las tres matrices son aceptables, por lo cual se presume que las matrices ambientales no presentan un efecto significativo en la determinación de la 2-HA.

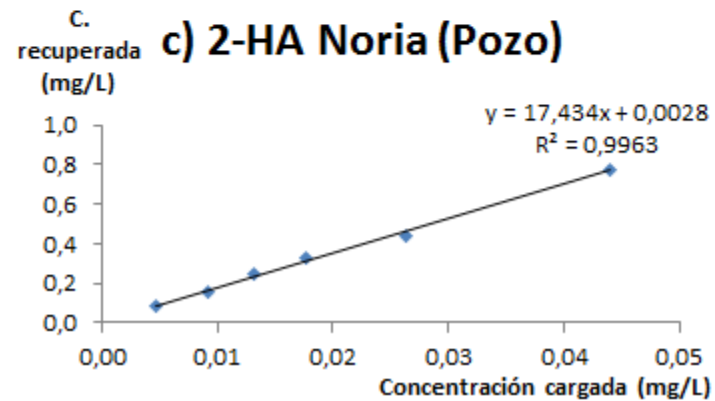
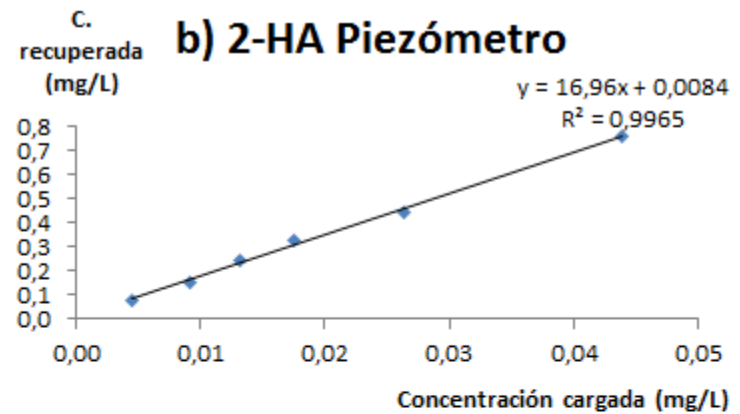
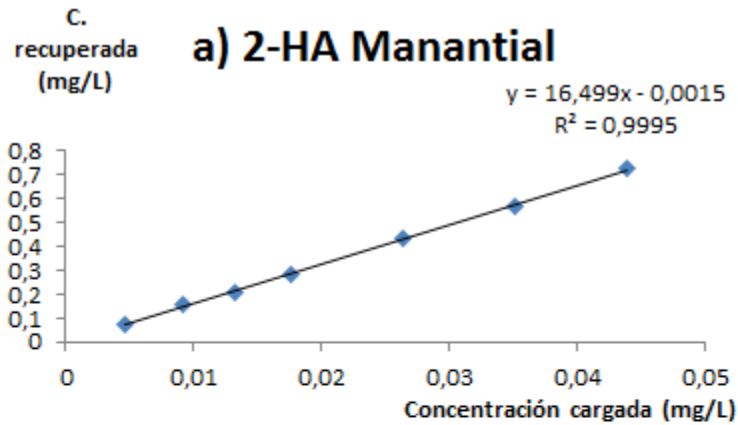


Figura 3.6 Gráficas para la determinación del factor de concentración experimental por ajuste de mínimos cuadrados para 2-HA

Tabla 3.27 Recobros individuales de 2-HA para cada nivel de concentración en las matrices ambientales

Matriz natural (agua)	Concentración esperada (mg/L)	Concentración recuperada (mg/L)	% Recobro
Manantial	0.7253	0.7279	100.4
	0.5803	0.5729	98.7
	0.4352	0.4362	100.2
	0.2901	0.2856	98.4
	0.2173	0.2120	97.4
	0.1518	0.1590	104.7
	0.0759	0.0722	95.2
Piezómetro	0.7456	0.7544	101.2
	0.4474	0.4397	98.3
	0.2982	0.3263	110.2
	0.2237	0.2464	109.4
	0.1560	0.1538	98.5
	0.0780	0.0785	100.6
Noria (pozo)	0.7674	0.7744	101.0
	0.4599	0.4397	95.6
	0.3066	0.3263	106.5
	0.2299	0.2464	107.2
	0.1604	0.1538	95.9
	0.0802	0.0795	99.1

3.4.3 Determinación del factor de concentración para la DEA

Del mismo modo que para la 2-HA, se realizó un análisis de correlación lineal por medio de mínimos cuadrados y el cálculo de los porcentajes de recobro para cada nivel de concentración propuesto para la DEA en las mismas matrices ambientales, que se muestran en la Tabla 3.28 y la Figura 3.7.

En las gráficas de correlación lineal se puede observar que los coeficientes de determinación son $R^2 \geq 0.99$ en el agua de manantial, mientras que para las aguas de piezómetro y pozo $R^2 > 0.98$, esta ligera diferencia en el ajuste, quiere decir que si bien se puede asignar un comportamiento lineal, en el caso de las aguas de piezómetro y pozo, el comportamiento del DEA en agua de piezómetro puede verse afectado en mayor medida por el efecto de dicha matriz.

Los resultados mediante el ajuste de mínimos cuadrados determinaron el valor del factor de concentración experimental para la DEA en las tres matrices, donde: el agua de manantial tiene un valor de 16.738, el agua del piezómetro 16.01 y finalmente se tiene un valor de 16.2 para el agua de pozo.

Los factores de concentración experimental para cada nivel de concentración, fueron evaluados por medio de pruebas de hipótesis sobre el valor de la pendiente obtenida a partir de las gráficas de correlación lineal; donde la pendiente es el factor de concentración experimental (ANEXO). La prueba de hipótesis realizada propone como hipótesis nula que el factor de concentración experimental es igual al factor de concentración teórico ($H_0=0$), al verificar los resultados de las pruebas se determinó que los factores de concentración experimentales son estadísticamente iguales a los factores de concentración teóricos para las tres matrices y con ello se comprueba la eficiencia del cartucho para la pre concentración de DEA.

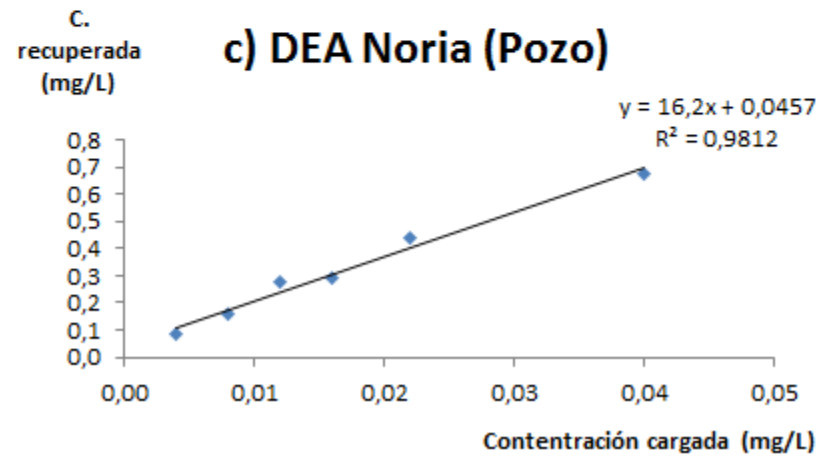
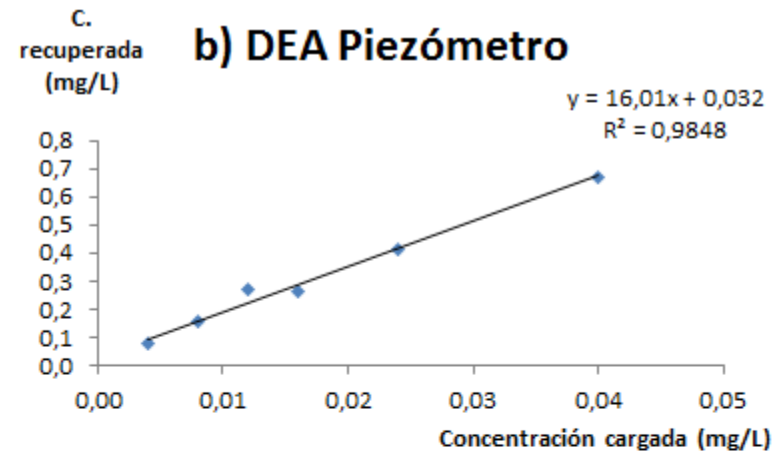
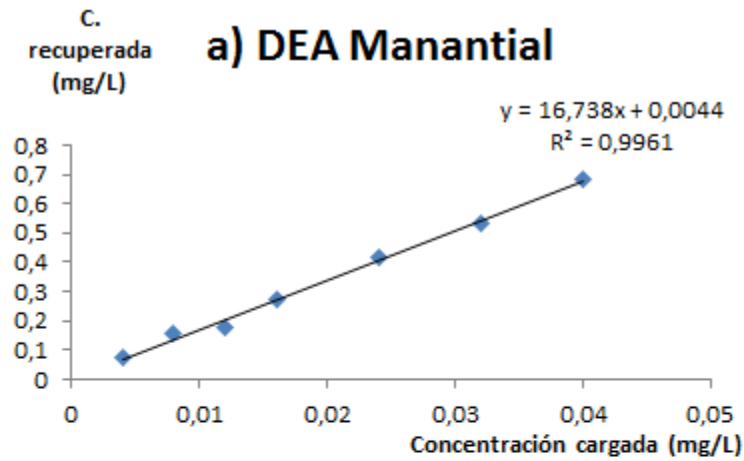


Figura 3.7 Gráficas para la determinación del factor de concentración por ajuste de mínimos cuadrados para DEA

3.4.4 Determinación del porcentaje de recobro para la DEA

Del mismo modo se presentan los valores de los porcentajes de recobro obtenidos para cada nivel de concentración en las mismas matrices (Tabla 3.28).

Según lo recomendado por Taverniers et al [115], los valores de los recobros individuales obtenidos en estos experimentos denotan que para el agua de manantial todos los porcentajes de recobro son aceptados, ya que se encuentran en el intervalo de 89 a 117 % de recobro, empero para las aguas de piezómetro y pozo es evidente la variabilidad de resultados, siendo los de menor nivel concentración aquellos que presentan la mayor discordancia con los criterios establecidos.

Donde la concentración de 0.06 mg/L es la que presenta porcentajes de recobro ligeramente superiores a los sugeridos. Esto involucraría la posibilidad de encontrar un efecto de matriz importante para este nivel de concentración, por lo cual algún resultado cuantitativo estaría comprometido.

Tabla 3.28 Recobros individuales de la DEA para cada nivel de concentración en las matrices ambientales

Matriz natural (agua)	Concentración esperada (mg/L)	Concentración recuperada (mg/L)	% Recobro
Manantial	0.6700	0.6799	101.5
	0.5360	0.5339	99.6
	0.4020	0.4137	102.9
	0.2680	0.2717	101.4
	0.2010	0.1792	89.2
	0.1338	0.1563	116.8
	0.0669	0.0744	103.6
Piezómetro	0.6411	0.6726	104.9
	0.3847	0.4129	107.3
	0.2565	0.2642	103.0
	0.2001	0.2237	111.8
	0.1281	0.1512	118.1
	0.0640	0.0759	118.5
Noria (pozo)	0.6502	0.6726	103.4
	0.3576	0.4429	123.8
	0.2601	0.2942	113.1
	0.1951	0.2737	140.3
	0.1299	0.1572	121.1
	0.0649	0.0879	135.4

3.4.5 Determinación del factor de concentración para la ATZ

Finalmente para la ATZ se realizaron los mismos experimentos y tratamientos estadísticos aplicados a la 2-HA y DEA. En la figura 3.8 se presentan las gráficas de correlación lineal para la determinación del factor de concentración experimental y en la Tabla 3.29 se muestran los porcentajes de recobro obtenidos.

A partir de la figura 3.8 se observa que el ajuste de correlación lineal en todos los casos es adecuado ya que $R^2 > 0.99$, esto quiere decir que la correlación entre la concentración de ATZ cargada es linealmente proporcional a la concentración de ATZ recuperada después de implementar el protocolo de extracción, para todas las matrices propuestas.

En el caso de los factores de concentración experimentales, los valores de las pendientes determinados en la figura 3.8 muestran que en principio los factores de concentración experimental son iguales al factor de concentración teórico. Donde los valores de los factores de concentración experimental son: para el agua de manantial 16.2, agua de piezómetro 16.1 y finalmente para agua de pozo 16.2. Empero es necesario realizar nuevamente las pruebas de hipótesis correspondientes al valor de concentración experimental (pendiente), donde se propone que el factor de concentración experimental es igual al teórico ($H_0=0$).

En los tres casos la prueba de hipótesis arrojó como resultado la igualdad de los factores de concentración con respecto al valor teórico predicho, esto quiere decir que también para la ATZ el cartucho de extracción es eficiente para permitir su preconcentración.

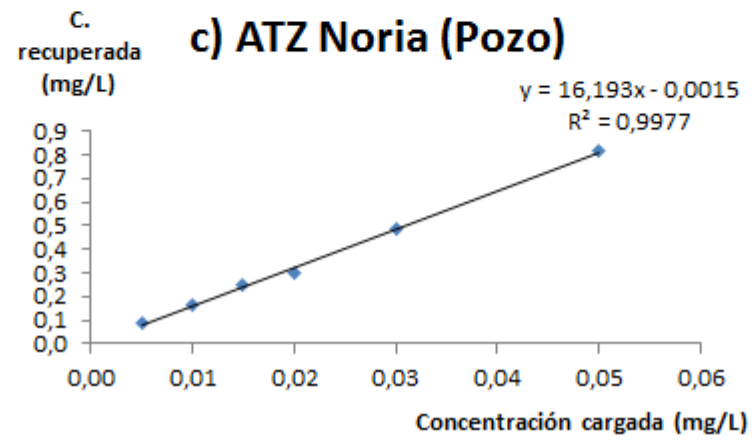
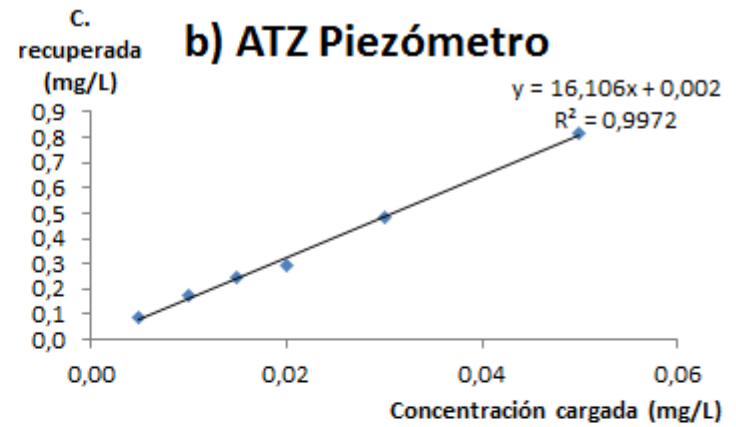
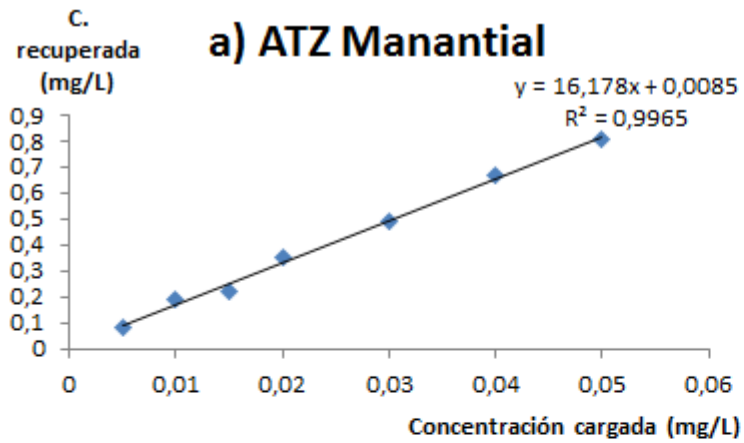


Figura 3.8 Gráficas para la determinación del factor de concentración por ajuste de mínimos cuadrados para ATZ

3.4.6 Determinación del porcentaje de recobro para la ATZ

Para concluir los experimentos en muestras reales, se determinaron los porcentajes de recobro de la ATZ con respecto a las tres matrices propuestas; los cuales se muestran a continuación en la Tabla 3.29.

Los porcentajes de recobro individuales para cada nivel de concentración se encuentran en un intervalo comprendido entre 91 y 110 % de recobro, esto concuerda satisfactoriamente con lo propuesto por Taverniers [115] para este nivel de concentración e implica que los porcentajes de recobro son aceptables para las tres matrices. Por ende se puede sugerir que el efecto ocasionado por la matriz sobre la determinación de ATZ es prácticamente despreciable.

Tabla 3.29 Recobros individuales de la ATZ para cada nivel de concentración en las matrices ambientales

Matriz natural (agua)	Concentración esperada (mg/L)	Concentración recuperada (mg/L)	% Recobro
Manantial	0.8091	0.8099	100.1
	0.6473	0.6648	102.7
	0.4855	0.4926	101.5
	0.3236	0.3496	108.0
	0.2427	0.2235	92.1
	0.1618	0.1862	115.1
	0.0809	0.0838	103.6
Piezómetro	0.8055	0.8142	101.1
	0.4833	0.4868	100.7
	0.3222	0.2967	92.1
	0.2416	0.2456	101.6
	0.1611	0.1746	108.4
	0.0805	0.0885	109.9
Noria (pozo)	0.8098	0.8142	100.5
	0.4859	0.4868	100.2
	0.3239	0.2967	91.6
	0.2430	0.2456	101.1
	0.1619	0.1646	101.7
	0.0810	0.0885	109.3

Después de analizar y aceptar estadísticamente los factores de concentración y porcentajes de recobro en los niveles de concentración más bajos para los tres analitos, se sugiere que se han logrado establecer nuevos límites de detección (LDD) y cuantificación (LDC) para la ATZ y sus metabolitos de degradación 2-HA y DEA para los tres tipos de agua; en la tabla 3.30 se muestran de forma comparativa los límites de detección y cuantificación instrumentales con los propuestos después del tratamiento de la muestra.

Tabla 3.30 Valores de los límites de detección y cuantificación adquiridos con la preconcentración con cartucho SPE para 2-HA. DEA y ATZ

Analito	Parámetro	SPE/Instrumental (µg/L)
2-HA	LDD	1
	LDC	5
DEA	LDD	5
	LDC	10
ATZ	LDD	1
	LDC	5

3.5 Determinación de SMX en los sitios de estudio A y B

Con el establecimiento de la validación, la optimización de los cartuchos de extracción y la evaluación de los estudios de recobro para el SMX se realizó el monitoreo del mismo, en los puntos de toma de muestra mencionados anteriormente en los sitios de estudio A y B.

3.5.1 Determinación de SMX en el sitio de estudio A

Los resultados obtenidos para el sitio de estudio A se muestran a continuación en la Tabla 3.31.

Tabla 3.31 Monitoreo de SMX en el sitio A

Procedencia	Fecha	Concentración de SMX ($\mu\text{g/L}$)	Concentración de SMX (ng/L)
Manantial 2040 (m.a.s.l.)	Febrero 2016	<LDC	<LDC
	Marzo 2016	0.0025	2.5
	Mayo 2016	0.0027	2.75
	Enero 2017	0.0058	5.8
Piezómetro 2060 (m.a.s.l.)	Febrero 2016	<LDC	<LDC
	Marzo 2016		
	Mayo 2016		
	Septiembre 2016		
	Enero 2017		
Residual 2080 (m.a.s.l.)	Febrero 2016	0.2261	226.1
	Marzo 2016	0.2050	205.0
	Mayo 2016	0.2034	203.4
	Septiembre 2016	0.2134	213.4
	Enero 2017	0.1969	196.9

<LDC. Debajo del límite de detección

Como es posible observar las mayores concentraciones de SMX se observan en el agua que proviene del canal de aguas residuales Tlamaco-Juandhó y son ampliamente diferentes a las encontradas en el agua del piezómetro y manantial.

Sin embargo, en trabajos previos reportados por Prado et al., se sabe que el pie de monte tiene una forma convexa con una pendiente moderada entre 2-5°, por ende el flujo de agua ocurre de la parte superior del pie de monte 2 090 m.a.s.l. a la parte inferior del mismo aproximadamente 2 040 m.a.s.l. Por lo que es de esperarse que las sustancias presentes en el agua residual se movieran en la misma dirección.

Con base en los resultados anteriores, se propone que el SMX presente en el agua residual se mueve en la misma dirección que el flujo de agua, ya que se determinó la presencia del SMX en los tres puntos de muestra propuestos.

De manera análoga se observa un decremento del 98.2 % en la concentración promedio del SMX determinado en el agua residual que es de 209 ng/L con respecto al último punto de muestra que corresponde al agua de manantial, donde se determinó que la concentración promedio de SMX presente es de 3.7 ng/L, por otro lado, el hecho de no presentar valores en el agua de piezómetro ya que se encuentran < LOD, permite proponer que el decremento más significativo en la concentración de SMX ocurre en los primeros 20 metros sobre nivel del mar (m.a.s.l. en sus siglas en inglés) (Figura 3.9).

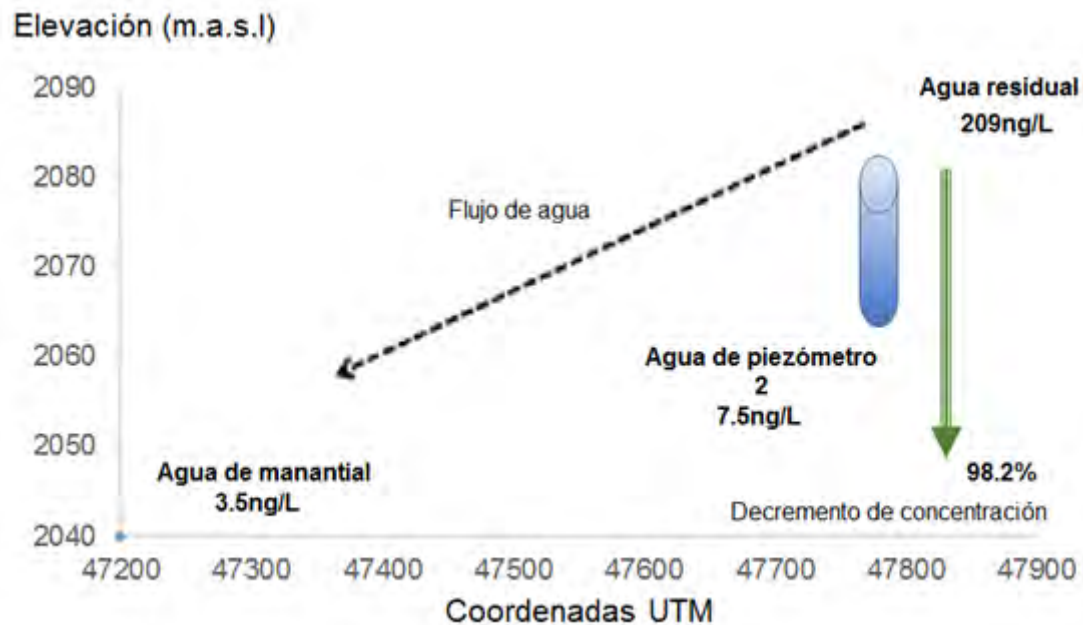


Figura 3.9 Concentración de SMX en diferentes niveles de altitud del piedemonte

Este decremento del 98.2 % en la concentración promedio del SMX puede ser atribuido a dos factores preponderantes, el primero es la elevada capacidad del suelo para retener al SMX y el segundo es a una posible actividad microbiana que promueve la degradación de la concentración inicial del fármaco observado en el agua residual.

Por otro lado, considerando las concentraciones determinadas del fármaco a lo largo del año de muestreo, no se observa un efecto significativo del tiempo en la concentración del SMX determinada.

4.5.2 Determinación de SMX en el sitio de estudio B

Los resultados obtenidos para la determinación de SMX a nivel parcela (sitio B), se muestran en la Tabla 3.32.

Tabla 3.32 Monitoreo de SMX en el sitio B

Punto de toma de muestra en la parcela	Concentración de SMX ($\mu\text{g/L}$)	Concentración de SMX (ng/L)
Entrada (100 cm)	0.1557	155.7
P1 punto medio (80 cm)	0.0755	75.5
P2 extremo izquierdo (140 cm)	0.0125	12.5
P2p piezómetro profundo	<LDC	<LDC
P3 extremo derecho (132 cm)	0.0428	42.8
Salida (0 cm)	<LDC	<LDC

<LDC. Debajo del límite de cuantificación

Se realizó el monitoreo del primer metro y medio de suelo con diferentes puntos de profundidad, en ellos se observó que existe un decremento del 92 % de la concentración inicial de SMX en el riego con agua residual (155.7 ng/L) con respecto a la concentración de SMX determinada en el punto de muestreo P2 (12.5 ng/L), es decir dentro de los primeros 40 cm de suelo. Después de esta profundidad ya no se pudo determinar el fármaco en cuestión. El hecho de

que el SMX tuviera un decremento en su concentración del 94.6 % en los primeros 140 cm, refuerza la idea de que el suelo tiene una elevada capacidad de retener el analito de interés, ya que las muestras fueron tomadas el mismo día. Por ende la capacidad de retención del suelo es preponderante con respecto a la posible actividad microbiana.

3.6 Determinación de 2-HA, DEA y ATZ en el sitio de estudio A

El estudio de estos analitos se desarrolló desde el nivel parcela, atravesando el pueblo de Tlahuelilpan hasta desembocar en el manantial de Cerro Colorado. Los resultados se muestran en la Tabla 3.33.

Tabla 3.33 Monitoreo de 2-HA, DEA y ATZ en el sitio de estudio A

Procedencia	Fecha	Concentración de SMX ($\mu\text{g/L}$)	Concentración de SMX (ng/L)
Manantial	Febrero 2016	<LDC	<LDC
	Marzo 2016		
Piezómetro	Mayo 2016		
Noria (pozo)	Septiembre 2016		
	Enero 2017		

<LDC. Debajo del límite de cuantificación

A pesar de que se logró disminuir los límites de detección y cuantificación del método cromatográfico para la determinación de la ATZ y sus metabolitos por medio de la técnica de extracción en fase sólida, no fue posible determinar la presencia de los analitos de interés, ya que si están presentes, su concentración se encuentra debajo de los límites establecidos en el presente trabajo.

Esto puede ser ocasionado por dos factores, el primero es una notable afinidad de los analitos de interés por el suelo y la otra puede ser la rápida degradación del herbicida en el medio ambiente.

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES

La determinación de sulfametoxazol mediante la técnica HPLC-MS (ESI+)/QqQ fue validada y utilizada satisfactoriamente como un método analítico de medición, brindando resultados precisos y exactos, así como límites de detección y cuantificación instrumentales del orden de ppb, sin ningún tratamiento de muestra previo.

Empero mediante el uso de la técnica de extracción en fase sólida se logró realizar de manera exitosa la purificación y preconcentración de todos los analitos de interés en todas las matrices propuestas, ya sean simples o complejas. La purificación de los analitos se hace evidente al obtener factores de concentración experimentales que son prácticamente iguales al factor teórico esperado de 16.66, así como porcentajes de recobro aceptables para todos los niveles de concentración propuestos; esto se traduce en la disminución del efecto generado por la matriz. Por otro lado la preconcentración se hace evidente al disminuir los límites de detección y cuantificación para todos los analitos en todas las matrices ambientales, lo que hace posible determinar a todos los analitos en concentraciones bajas del orden de ppt (ng/L) para sulfametoxazol y ppb ($\mu\text{g/L}$) para la atrazina y dos de sus productos de degradación 2-hidroxiatrazina y desetilatrazina.

El trabajo de tesis también incluyó el monitoreo de la presencia de los compuestos en agua subterránea, residual y manantial sitios A y B, respectivamente. Utilizando el método analítico desarrollado se logró determinar la presencia de sulfametoxazol en el agua residual y en el agua de manantial.

El resultado obtenido permite establecer la variación de la concentración del antibiótico en el sentido del flujo del agua subterránea, esto es desde la parte más elevada del piedemonte que corresponde al canal de agua residual Tlamaco-Juandhó hasta la parte más baja del pie de monte donde se encuentra el manantial de Cerro Colorado. De este modo se puede concluir que el suelo del Valle del Mezquital es poseedor de una gran capacidad amortiguadora de contaminantes, ya que los principales decrementos en la concentración de sulfametoxazol ocurren en los primeros metros del suelo; esto

fue comprobado al realizar un monitoreo en el sitio B, donde es evidente que a pocas profundidades la concentración disminuye considerablemente con valores superiores al 95 %.

Pese a que se logró disminuir los límites de detección y cuantificación utilizando la técnica de extracción en fase sólida, no fue posible detectar la presencia de atrazina ni de 2-hidroxiatrazina y desetilatrazina.

CAPÍTULO V. REFERENCIAS

1. Kamminga, T. Menno., **1995**, *Environmental policy in an international context*, Vol. 1, 111-131.
2. van Heijnsbergen, P., **1979**, *Environmental policy and Law*, Vol. 5, Issue 1, 11-13.
3. A/CONF.48/14/Rev.1., **1972**, *Report of the United Nations Conference on the Human Environment*, Stockholm.
4. A/CONF.151/26, 31 ILM., **1992**, *Rio Declaration on Environment and Development*, Vol. 1, p.874.
5. Rusell, V.S., *Biological Conservation*, **1974**, Vol. 6, Issue 3, p. 157-161.
6. La Farré, M. Pérez, S. Kantiani, L. Barceló, D., **2008**, *Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment*, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 27, Issue 11, p. 991-1007.
7. Kostopoulou, M. Nicolaou., **2008**, A., *Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices*, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 27, Issue 11, p. 1023-1035.
8. Manahan, E.S., *Introducción a la Química Ambiental*, **2007**, Ed. Reverté UNAM, Cap. 4, p. 145-190.
9. Murray, E.K. Thoba, M.S. Bodour, A.A., **2010**, *Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the fresh water environment*, Environmental Pollution, 158, 3462-3471.
10. Daughton, C.G., **2001**, *Emerging pollutants, and communicating the science of environmental chemistry and mass spectrometry: pharmaceuticals in the environment*, Journal of American Society for Mass Spectrometry 12, 1067-1076.
11. David, M.D., Campbell, S., Li, Q.X., **2000**, *Pressurized fluid extraction of nonpolar pesticides and polar herbicides using in situ derivatization*, Analytical Chemistry, 72, 3665-3670.
12. Barnes, K.K., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Meyer, M.T., Barber, L.B., **2008**, *A national reconnaissance of pharmaceuticals and other waste water contaminants in the United States-I groundwater*, Science of the Total Environment, 402, 192-200.

13. Bauer, M.G., Herrmann, R., **1997**, *Estimation of the environmental contamination by phthalic acid esters leaching from household wastes*, Science of the Total Environment, 208, 49-57.
14. Lapworth, D.J., Baran, N., Stuart, M.E., Ward, R.S., **2012**, *Emerging organic contaminants in ground water: A review of sources, fate and occurrence*, Environmental Pollution, 163, 2087-303.
15. Hilton, M., Thomas, K.V., Ashton, D., **2003**, *Targeted monitoring programme for pharmaceuticals in aquatic environment*, Environment agency R&D Technical Report P6-012/6, Environment Agency, UK.
16. Hinkle, S.R., Weick, R.J., Johnson, J.M., Cahill, J.D., Smith, S.G., Rich, B.J., **2005**, *Organic waste water compounds, pharmaceuticals and coliphage in ground water receiving discharge from outside waste water treatment systems near La Pine-Oregon occurrence and implications and implications of transport* US Geological Survey, *Scientific Investigations Report*, 98, 2005-2055.
17. Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.-L., **1999**, *Ocurrence of antibiotics in the aquatic environment*, 225, Science of the Total Environment, 109-118.
18. Loos, R., Gawlik, B.M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., Bidoglio, G., **2009**, *EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters*, Environmental pollution, 157, 561-568.
19. Kolpin, D.W., Barbash, J.E., Gilliom, R.J., **2002a**, *Atrazine and metolachlor occurrence in shallow groundwater of the United States 1993 to 1995: relations to explanatory factors*, Journal of the American Water Resources Association 38, 301-311.
20. Guilliom, R.J., Barbash, J.E., Crawford, C.G., Hamilton, P.A., Martin, J.D., Nakagaki, L., Howell, L.H., Scott, J.C., Stackelberg, P.E., Thelin, G.P., Wolock, D.M. **2006**, *The Quality of Our Nation's Waters-Pesticides in the Nations Streams and Ground Water 1992-2001*, US Geological Survey, Reston VA, 172.
21. Amrita, P., Yew-Hong Gin, K., Yu-Chen Lin, A., Reinhard, M. **2010**, *Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects*, Science of the Total Environment, 408, 6062-6069.

22. Hoeger, B., Kollner, B., Dietrich, D.R., Hitzfeld, B. **2005**, *Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (Salmo Trutta f. fario)*, *Aquat Toxicol.* 75, 53-64.
23. Kolok, A.S., Snow, D.D., Kohno, S. **2007**, *Occurrence and biological effect of exogenous steroids in the Elkhorn River, Nebraska, USA*, *Science of Total Environment*, 388, 104-115.
24. Pomati, F., Castiglioni, S., Zuccato, **2006**, E. *Effects of a complex mixture of therapeutic drugs at environmental levels on human embryonic cells*, *Environmental Science and Technology*, 40, 2442-2447.
25. Lai, H.T., Hou, J.H., Su, C.L., Chen, C.L., **2009**, *Effects of chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol on growth of algae Chlorella pyrenoidosa, Isocrysis galbana and Tetraselmis chui.*, *Ecotoxicol Environ Safe*, 72, 329-334.
26. Siemens, J., Huschek, G., Siebe, C., Kaupenjohann, M., **2008**. *Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the World's largest wastewater irrigation system, Mexico City-Mezquital Valley*. *Water Res.* 42, 2124-2134.
27. Murillo-Torres, R., Duran-Alvarez, J.C., Prado-Pano, B., Jimenez-Cisneros, B.E., **2012b**. *Sorption and mobility of two micropollutants in three agricultural soils: A comparative analysis of their behavior in batch and column experiments*. *Geoderma* 189, 462-468.
28. Duran-Alvarez, J.C., Prado, B., Ferroud, A., Juajerk, N., Jimenez-Cisneros, B., **2014**. *Sorption, desorption and displacement of ibuprofen, estrone, and 17 beta estradiol in wastewater irrigated and rainfed agricultural soils*. *Sci. Total Environ.* 473, 189-198.
29. García García Laura, **2014**, *Desarrollo y validación de una metodología para determinación y cuantificación simultánea de 2,4-D y 2,4-DCP, por medio de CLAR-UV-DAD con aplicación en experimentos de sorción en suelos*, UNAM.
30. Asociación Nacional de la Industria Química, *Anuario estadístico de la Industria Química Mexicana*, **1996**, ANIQ, México.
31. **NOM-045-SSA1-1993**. Plaguicidas, productos para uso agrícola, forestal, pecuario, de jardinería, urbano e industrial, etiquetado.

32. FAO/OMS, **2011**, *Comisión del Codex Alimentarius: Manual de procedimiento. Secretaría del programa FAO/OMS sobre Normas alimentarias*, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación, Roma.
33. Clasificación de plaguicidas SEMARNAT, [en línea], disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/25247/clasificaciones.pdf> , (Agosto, 2016).
34. FAO, Los plaguicidas en cuanto contaminantes del agua, [en línea] disponible en: <http://www.fao.org/docrep/W2598S/w2598s06.htm> (Agosto, 2016)
35. Carod Benedico., *Herbicidas*, **2002**, *¿Qué debemos saber los profesionales de atención primaria?*, SEMERGEN, 28(8), 424-428.
36. Hansen, A.M., Treviño-Quintanilla, L.G., Márquez-Pacheco, H., Villada-Canela, M., González-Márquez, L.G., Guillén-Garcés, R.A., Hernández-Antonio, A., **2013**, *Atrazina: Un herbicida polémico*, Rev. Int. Contam. Amb. 29, 65-84
37. EPA, Atrazine pdf, [en línea] disponible en: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/atrazine-background-and-updates> , (Agosto, 2016).
38. Prado, B., Duwig, C., Hidalgo, C., Müller, K., Mora, L., Raymundo, E., Etchevers, J.D., **2014**, *Transport, sorption and degradation of atrazine in two clay soils from Mexico: Andosol and Vertisol*, Geoderma, 232-234, 628-639.
39. Hernández-Martínez J. L. Prado, B., Durán-Álvarez J.C., Bischoff, W. A., Siebe, C. **2014**, *Movement of water and solutes in a wastewater irrigated piedmont*, Procedia earth and Planetary Science, 10, 365-369.
40. Hernández-Martínez, J. L., Prado, P., Cayetano-Salazar, M., Bischoff, W.A., Siebe, C. **2016**, *Ammonium-nitrate dynamics in the critical zone during single irrigation events with untreated sewage effluents*, J. Soil Sediments, 10.1007/s11368-016-1506-2.
41. Prado, B., C. Duwig, C. Hidalgo, K.Müller, L.Mora, E. Raymundo, J.D. Etchevers. **2014**. *Transport, sorption and degradation of atrazine in two clay soils from Mexico: Andosol and Vertisol. Geoderma: 232–234, 628–639.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.06.011>.
42. **Prado**, B., M. Fuentes, N. Verhulst, B. Govaerts, F. de León, O. Zamora. **2014**. *Fate of atrazine in a soil under different agricultural systems*. Journal of

Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 49:11, 844-855.

<http://dx.doi.org/10.1080/03601234.2014.938555>

43. EPA, Atrazine monitoring program, [en línea] disponible en:

<https://www.regulations.gov/docket?D=EPA-HQ-OPP-2003-0367> , (Agosto, 2016).

44. Laird, A.D., Korhonen, W.C., Triazine soil interactions, In: LeBaron, Homer, M.; McFarland, Janis, E., Burnside, Orvin, C. (Eds.), **2008**, *The triazine herbicides, 50 Years Revolutionizing Agriculture*, 1st Edition, El Sevier, Amsterdam, p. 275.

45. USGS., National Water-Quality Assessment Program, U.S. Geological Survey Circular 1291. Pesticides in the nation's streams and ground water 1992-2001.

46. Hernández-Antonio, A. Hansen, A. M., **2011**, *Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos.*, Rev. Int. Contam. Ambie. 27 (2), 115-127.

47. Beth Sass, J., Colangelo, A., **2006**, *European Union bans atrazine, while the United States negotiates continued use.* Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16967834>

48. Rusiecki, J.A., De Roos, A., Lee, W.J., et al. **2004**, *Cancer incidence among pesticide applicators exposed to atrazine in the agricultural health study.* J. Nat. Cancer. Inst. 96, 1375-1382.

49. International Agency for Research on Cancer. **1999**, *Monographs of the evaluation of carcinogenic risks to humans.* IARC Monograph, 73:59-113.

50. Kniewald, J., Jakominic, M., Tomjelnovic, A. et al. **2000.**, *Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine.* J. Appl. Toxicol. 20:61-8.

51. Swan, S.H., Kruse, R.L., Liu, F. et al., **2003**, *Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure.*, Environ. Health Perspect., 111: 1478-1484.

52. Prado, B., Gastelum Strotzzi, A., Huerta, E., Duwig, C., Zamora, O., Delmas, P., Casasola, D., Márquez, J. **2016**, *2,4D-mobility in clay soils: Impact of macrofauna abundance on soil porosity*, Geoderma 279, 87-96.

53. Nieto, A., Borrull, F., Marcé, R. M., Pocurull, E. **2007.**, *Selective extraction of sulfonamides, macrolides and other pharmaceuticals from sewage sludge by pressurized liquid extraction*, Journal of chromatography A, 1174, 125-131.
54. Jones-Leep, T.L., Stevens, R., **2007**, Anal. Bioanal. Chem. 384, 1173.
55. Hilton, M.J., Thomas, K. V., **2003**, *Determination of selected human pharmaceuticals compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1015, 129-141.
56. Kathryn, D.B., Jerzy, K., Bruce, T., Timothy, H.C., Douglas, B.M., **2005**, *Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico*, Sci. Total Environ. 366, 772-783.
57. Chang, X., Meyer, M.T., Liu, X., Zhao, Q., Chen, H., Chen, J., Qiu, Z., Yang, L., Cao, J., Shu, W. **2010**, *Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China*, Environmental Pollution, 158, 1444-1450.
58. Balakrishnan, K. V., Terry, K. A., Toito, J., **2006**, *Determination of sulfonamides antibiotics in wastewater: A comparison of solid phase microextraction and solid phase extractions methods*, Journal of Chromatography A, 1131, 1-10.
59. Kemper, N., **2008**, *Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment*, Ecol. Indic. 8, 1-13.
60. Miao, X.-S., Bishay, F., Chen, M., Metcalfe, C.D., **2004**, *Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada*, Environ. Sci. Technol. 38, 3533.
61. Ahrer, W., Scherwenk, E., Buchberger, W., **2001**, *Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry*, J. Chromatogr. A. 910, 69.
62. Gobel, A., McArdell, C.S. Suter, M.J.-F., Giger, W., **2004**, *Trace Determination of Macrolide and Sulfonamide Antimicrobials, a Human Sulfonamide Metabolite, and Trimethoprim in Wastewater Using Liquid*

Chromatography Coupled to Electrospray Tandem Mass Spectrometry, Anal. Chem. 76, 4756.

63. Thorsten, C., Schneider, R., Färber, H., Skutlarek, D., Meyer, M., Goldbacj, H., **2003**, *Determination of antibiotic residues in manure, soil and surface waters*, Acta. Hydrochim. Hydrobiol. 31, 1, 36-44.

64. Beltán, J.F., Aguinaco, A., García-Araya, J.F., Oropesa, A., **2008**, *Ozone and photocatalytic processes to remove the antibiotic sulfamethoxazole from water*, Water Research, 42, 3799-3808.

65. Drugs and Supplements, Sulfamethoxazole/Trimethoprim, [en línea] disponible en: <http://www.mayoclinic.org/drugs-supplements/sulfamethoxazole-trimethoprim-oral-route/description/drg-20071899> , (Septiembre, 2016).

66. Lindsey, M., 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, 4640-4646.

67. Schauss, K., Focks, A., Heuer, H., Kotzerke, A., Schmitt, H., Thiele-Bruhn, S., Smalla, K., Wilke, B., Matthies, M., Amelung, M., Klasmeier, J., Schlot, M., **2009**, *Analysis, fate and effects of the antibiotic sulfadiazine in soil ecosystems*, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 5.

68. Radke, M., Lauwigi, C., Heinkele, G., Mürdter, T., Letzel, M., **2009**, *Fate of the Antibiotic Sulfamethoxazole and Its Two Major Human Metabolites in a Water Sediment Test*, Environ. Sci. Technol., 43, 3135–3141.

69. Gros, M., Petrovic, M., Barcelò, D., **2006**, *Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters*, Talanta, 70, 678-690.

70. Skoog, D.S., West, DM., Holler, F.J., 1995, *Química Analítica*, 6º Ed., México, McGraw Hill.

71. Skoog, D.S., West, DM., Nieman, T.A., 2001, *Principios de análisis instrumental*, 5º Ed., España, McGraw Hill.

72. Harris, D.C., **2001**, *Análisis químico cuantitativo*, 2º Ed., Barcelona, Reverté S.A.

73. *Química analítica cuantitativa*, [en línea] disponible en:

http://www.academia.edu/6790083/QU%C3%8DMICA_ANAL%C3%8DTICA_CUANTITATIVA Septiembre, 2016.

74. Christian, D.G., **2009**, *Química Analítica*, 6º Ed., México, McGraw Hill.

75. IUPAC, **1997**, *Compendium of Chemical Technology (the "Gold Book")*, 2nd Ed. Compiled by McNaught, A.D., Wilkinson, A., Blackwell scientific publications, Oxford.

76. Galindo Zavala Viviana Berenice, 2016, *Desarrollo y validación de una metodología para la determinación simultánea de los iones Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} por medio de cromatografía de iones por detección conductimétrica en muestras ambientales*. TESIS, UNAM.

77. Harvey, D., **2000**, *Modern analytical chemistry*, 1º Ed. United States, McGraw Hill.

78. Legaz González, M.E., Sacristán San Cristobal, M., Díaz Peña, E.M., Alarcón Agualeles, B., Vicente Córdoba, C., Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. Parte I. Introducción y práctica de laboratorio: cálculo de la eficiencia y representación gráfica de la ecuación de van Deemter, Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología, Madrid, España.

79. Gritti, F., 2013, The van Deemter Equation 2 Assumptions, limits, and adjustment to modern HPLC, *Journal of Chromatography A.*, S0021-9673(13)00927-8.

80. Chrom Academy, The Theory of HPLC Band Broadening, [en línea] disponible en: <http://www.chromacademy.com/> , Septiembre, 2016.

81. Rouessac, F., Rouessac, A., **2007**, *Chemical Analysis*, 2º Ed. Southern Gate, Ingraterra.

82. Castro de Esparza, M.A., Litter, M. I., Wong, M., Mori, V., *Métodos espectrofotométricos UV-Vis.*, Capítulo 3, [en línea] disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/texcom/cd045364/MCEcap3.pdf>.

83. Choi, H., Advantages of Photodiode Array, [en línea] disponible en : http://www.hwe.oita-u.ac.jp/kiki/ronnbunn/paper_choi.pdf Enero, 2017.

84. Fenn, J.B., Matthias Mann., Meng, C.K., Wong, F., **1990**, *Electrospray ionization-Principle and practice*.

85. Fundamentos de la espectrometría de masas, [en línea] disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/masas_10832.pdf Enero, 2017.

86. Antignac, J.P., de Wasch, K., Monteau, F., De Brabander, H., Andre, F., Le Bizec, B., **2005**, *The ion suppression phenomenon in liquid chromatography–mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis*, *Analytica Chimica Acta*, 529, 129-136.
87. Pitt, J.J., **2009**, *Review Article Principles and Applications of Liquid Chromatography- Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry*, *Clin. Biochem. Rev.* Research gate.
87. Smith, R.M., **2003**, *Before injection- modern methods of sample preparation for separation techniques*, *Journal of Chromatography A*, 1000, 3-27.
88. Ridgway, K., Lalljie, S.P.D., Smith, R.M., **2007**, *Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods*, 1153, 36-53.
89. Horwitz, W., Kamps, L.R., Boyer, K.W., **1980**, *J.Assoc. Off. Anal. Chem.* 63, 1344.
90. Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F., *A Review of Solid Phase Extraction: Basic Principles and New Developments*, Bilbao, España.
91. Hennion, M.C., **1999**, *Review Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography*, *Journal of Chromatography A*, 856, 3–54.
92. Posyniak, A., Zmudzki, S., Semeniuk, S., **2001**, *Journal of chromatography A*. 914, 89.
93. M. J. M. Wells, **2000**, *Handling large volume samples: applications of SPE to environmental matrices*, in N. J. K. Simpson, ed., *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*, Marcel Dekker, New York, pp. 97–123.
94. M. J. M. Wells, **1986**, *O-line multistage extraction chromatography for ultrasensitive herbicide residue isolation*, in *Proceedings of the 3rd Annual International Symposium on Sample Preparation and Isolation Using Bonded Silicas*, Analytichem International, Harbor City, CA, pp. 117–135.
95. M. J. M. Wells and J. L. Michael, J. **1987**, *Chromatogr. Sci.*, 25, 345.
96. J. S. Fritz and M. Macka, **2000**, *J. Chromatogr. A*, 902, 137.
97. Barceló, D., Hennion, M.C., **1997**, *Trace determination of pesticides and their degradation product in water*, Elsevier, Amsterdam.

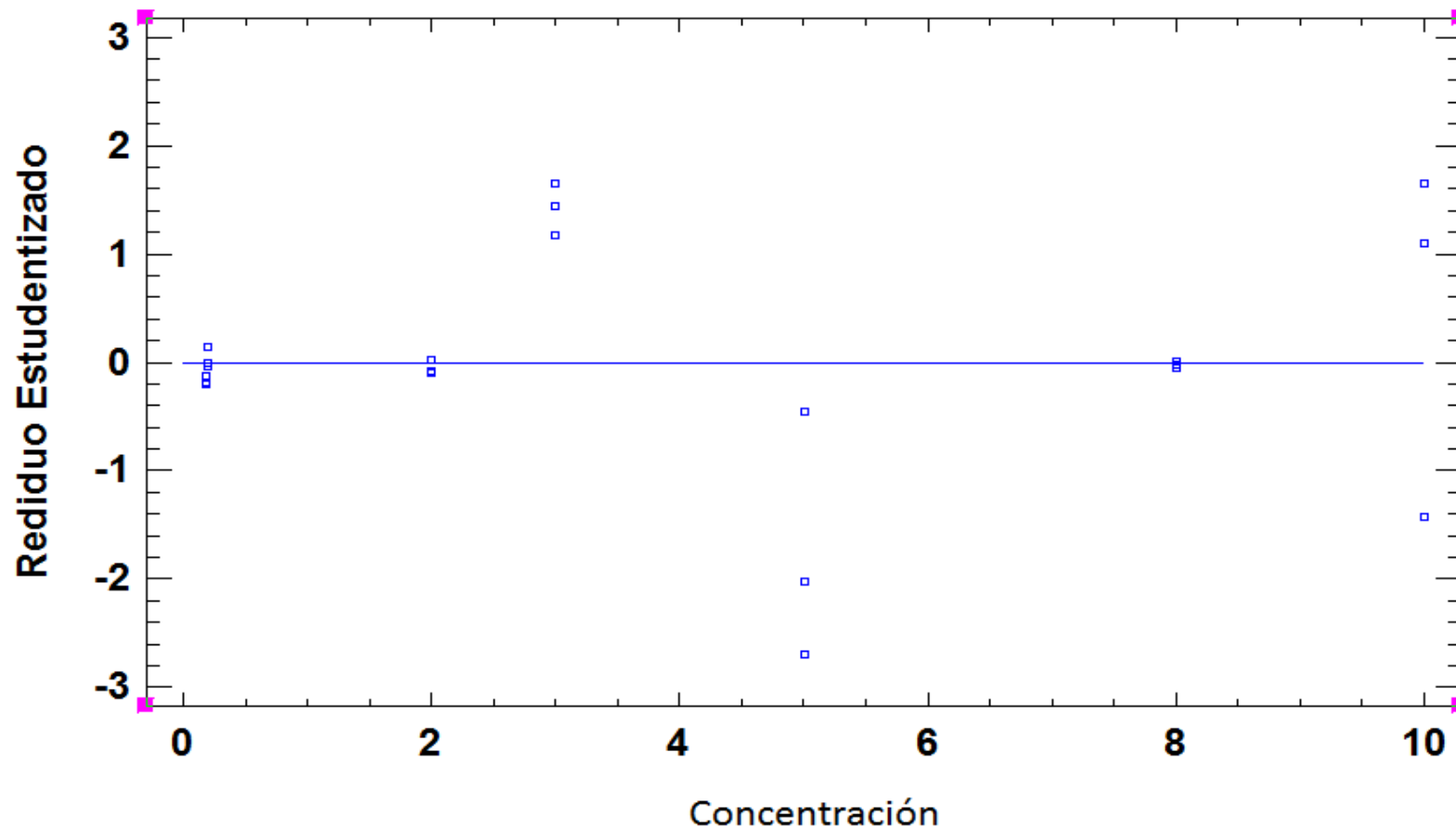
98. Yargeau, V., Caitlin, J., Rodayan, A., Rouleau, L., Roy, R., Leask, R.L., **2007**, *Impact of Degradation Products of Sulfamethoxazole on Mammalian Cultured Cells*, Montreal, Canada.
99. Abellán, M.N., Bayarri, B., Giménez, J., Costa, J., **2007**, *Photocatalytic degradation of sulfamethoxazole in aqueous suspension of TiO₂*, *Applied catalyzed B: Environmental*, 74, 233-241.
100. ISO 8402:1994. Quality-Vocabulary.
101. ISO/IEC-17025.
102. EMA, CENAM, **2008**, *Guía para la validación y verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados para el laboratorio clínico*, 1º Ed. México.
103. Elaboración de cartas de trazabilidad en el CENAM, Recomendación GIT 3/2005, Centro Nacional de Metrología, www.cenam.mx, México, 2005.
104. Lazos Martínez, R.J., Hernández Gutiérrez, I., **2004**, *Validación de métodos: un enfoque práctico*, Centro Nacional de Metrología, Querétaro, México.
105. Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016). Disponible en www.eurachem.org .
106. Peters, F., Drummer, O., Musshoff, F. **2007**, *Validation of New Methods*, *Forensic Science International*, 165, 216-224.
107. CCAyAC-P-058, Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos.
108. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), US Food and Drug Administration (**1994**, Noviembre), Reviewer guidance. *Validation of Chromatographic Methods*.
109. Miller, J.N., Miller, J.C., **2002**, *Estadística y quimiometría para Química Analítica*, 4º Ed. Madrid, España
110. Víctor Cortés Hernández., **2016**, Tesis., “*Determinación simultánea de hidroxiatrazina, desetilatrazina y atrazina por medio de CLAR-UV-DAD en muestras de agua de las lagunas de Montebello*”, UNAM, Cd.Mx.
111. ISO 3534-1:1993, *Statistics- Vocabulary and Symbols- Part 1, Probability and general statistical terms*.

112. Hernández Antonio, A., Hansen, M.A., **2001**, USO DE PLAGUICIDAS EN DOS ZONAS AGRÍCOLAS DE MÉXICO Y EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DE AGUA Y SEDIMENTOS, *Rev. Int. Contam. Ambie.* 27, 115-127.
113. Durán-Álvarez J.C., Becerril E., Castro V., Jiménez B., Gibson R. **2009** *The analysis of a group of acidic pharmaceuticals, carbamazepine, and potential endocrine disrupting compounds in wastewater irrigated soils by gas chromatography-mass spectrometry.* *Talanta.* **78**(3): 1159-1166.
114. Balakrishnan, VK.; Terry, KA.; Toito, J. **2006**, *Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: a comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods*, *J Chromatogr A.* 27;1131(1-2):1-10. Epub 2006 Aug 1
115. Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E., **2004**, *Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance.* *TrAC*, 23(8), 535-552.
116. Kostopoulou, M; Nikolaou, A.; **2008**, *Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices*, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 27, No. 11, 2008.
117. M. Kostopoulou, A. Petsas, M. Vagi, A. Nikolaou, **2009**, *Analytical optimizations and problems during the development of a GC-MS method for the determination of selected pharmaceuticals in wastewater*, *International Conference Xenobiotics in the Urban Water Cycle*, Paphos, Cyprus, submitted for publication.
118. Xiaosong Chang a, Michael T. Meyer b, Xiaoyun Liu c, Qing Zhao a, Hao Chen a, Ji-an Chen a, Zhiqun Qiu a, Lan Yang a, Jia Cao d, Weiqun Shu.; **2010**, *Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China*, *Environmental Pollution* 158 1444–1450.
119. Eleni Botitsi, Charalampia Frosyni, and Despina Tsipi.; **2007**, *Determination of Sulfonamide Antibiotics in Wastewater by Liquid Chromatography– Tandem Mass Spectrometry*, Thermo scientific.

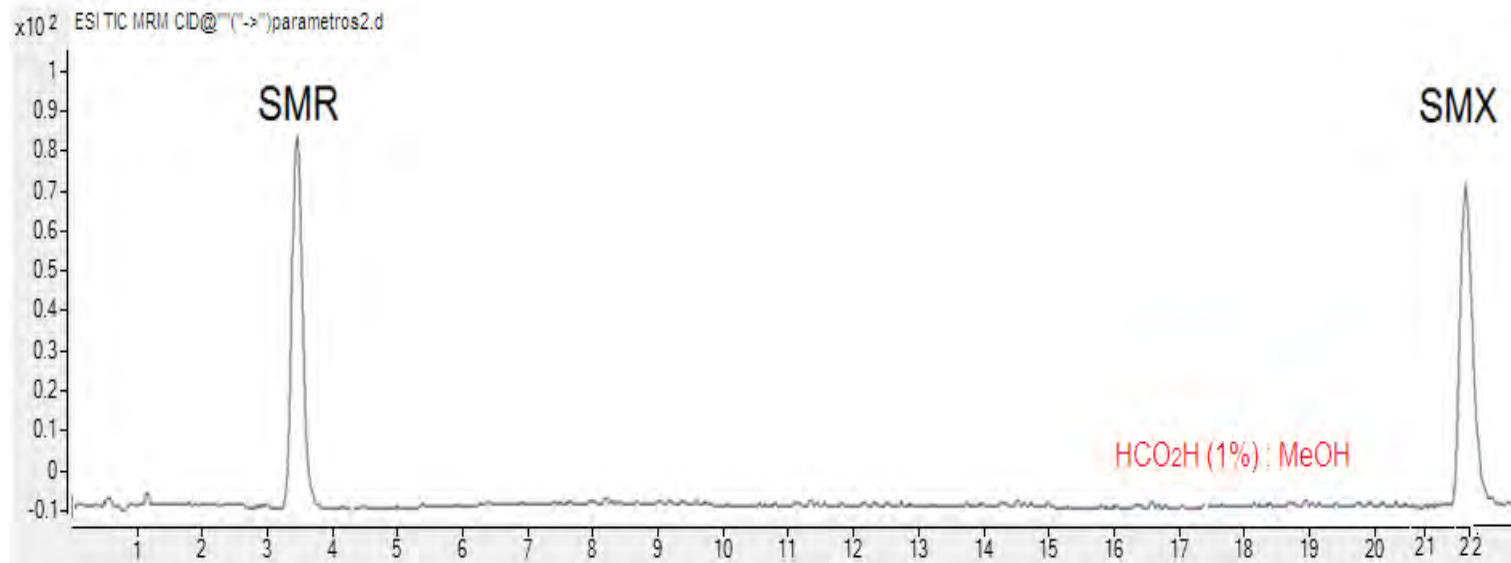
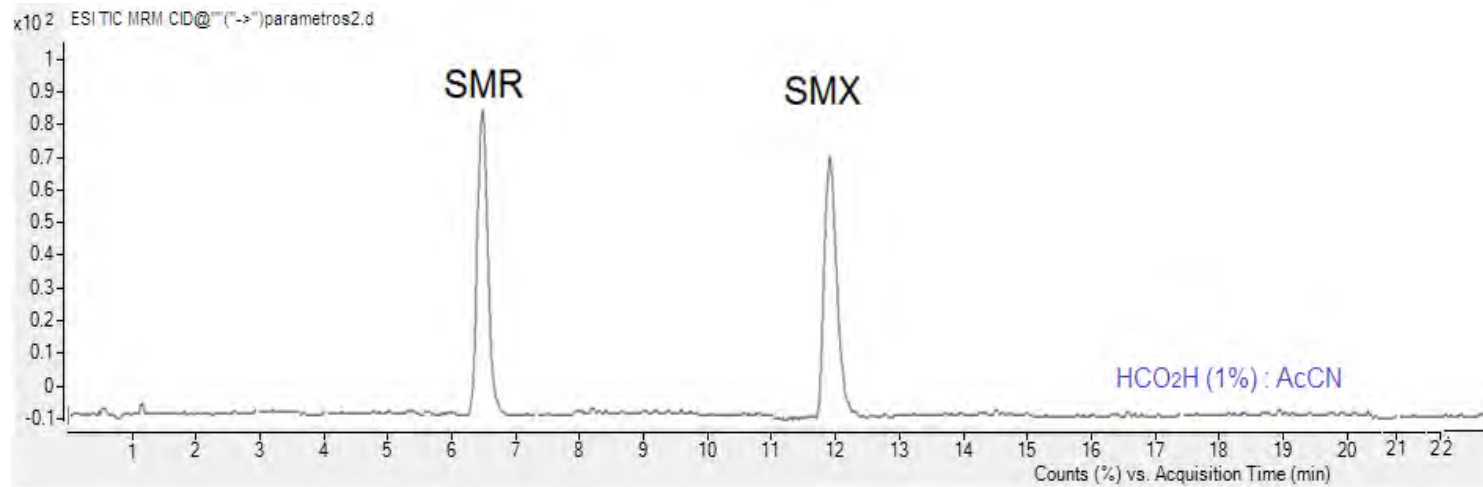
120. Khan GA, Lindberg R, Grabic R, Fick J. **2012**, *The development and application of a system for simultaneously determining anti-infectives and nasal decongestants using on-line solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, *J Pharm Biomed Anal.*,66:24-32. doi: 10.1016/j.jpba.2012.02.011. Epub 2012.
121. Lacey et al., **2008** C. Lacey, G. McMahon, J. Bones, L. Barron, A. Morrissey, J.M. Tobin An, **2008**, LC–MS method for the determination of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plant influent and effluent samples *Talanta*, 75 (4) , pp. 1089–1097.
122. Antonio Nieto, Francesc Borrull, Rosa Maria Marc´e *, Eva Pocurull.; **2007.**; *Selective extraction of sulfonamides, macrolides and other pharmaceuticals from sewage sludge by pressurized liquid extraction*, *Journal of Chromatography A*, 1174 125–131
123. Jessica Richarda,b,*, Andrea Boergersc, Claudia vom Eyserc, Kai Besterd, Jochen Tuerkb, **2013**, *Toxicity of the micropollutants Bisphenol A, Ciprofloxacin, Metoprolol and Sulfamethoxazole in water samples before and after the oxidative treatment*, *International Journal of Hygiene and Environmental Health* xxx– xxx

ANEXOS

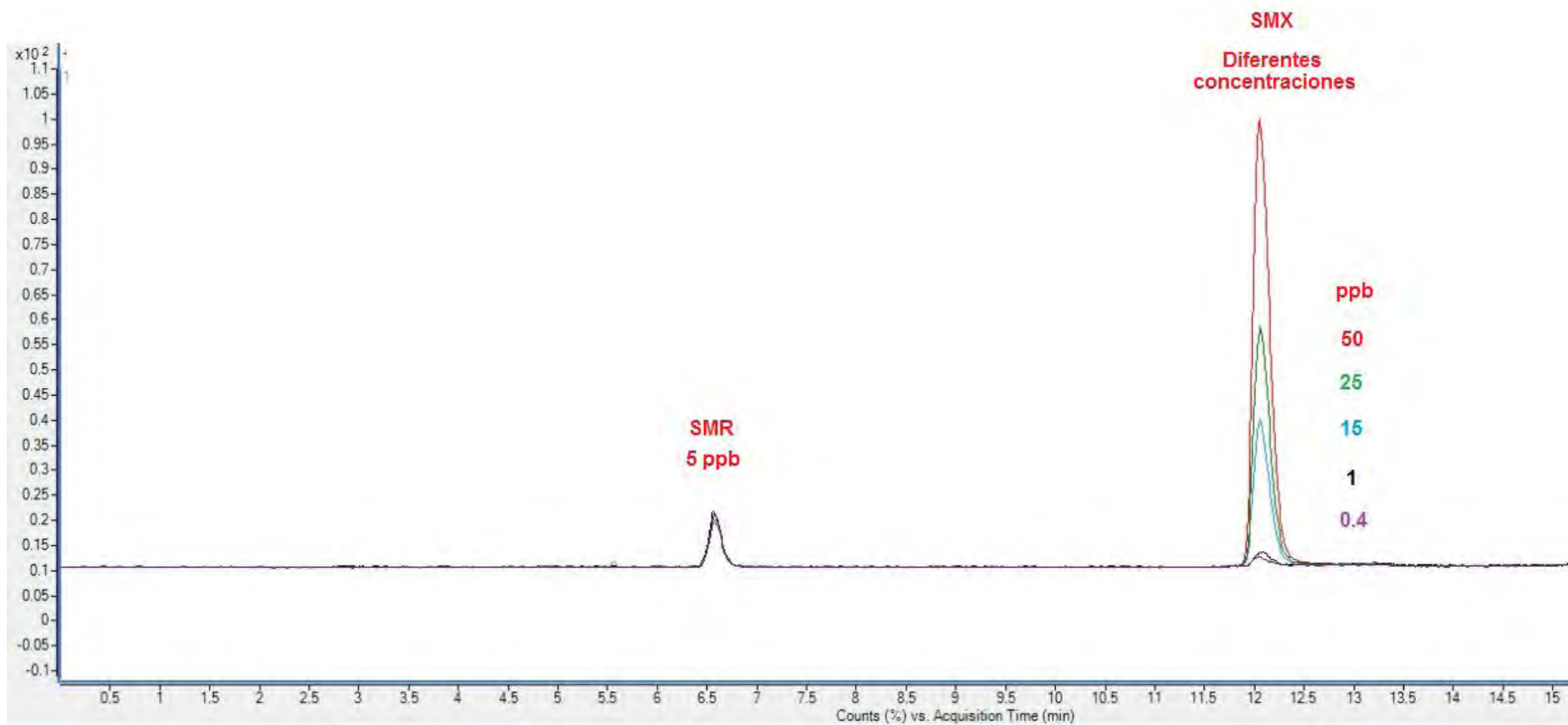
Gráfico de Residuos



Gráficos de residuales del SMX en el intervalo 1-50 ng/L



Selección de la fase móvil para la determinación de SMX



Curva de calibración para el sulfametoxazol y sulfamerazina como estándar interno.

Pruebas de hipótesis sobre la curva de calibración para la determinación de SMX

Prueba de hipótesis sobre la pendiente

Hipótesis nula, H_0

Hipótesis alterna, H_1

$m = 1.270$, riesgo $\alpha = 0.05$

$t_{cal} = 120$

$H_0 : m = 1.27$

$t_{tabla} = 2.18$

$H_1 : m \neq 1.27$

$t_{cal} > t_{tabla}$ por lo que se rechaza H_0

Prueba de hipótesis sobre la ordenada

Hipótesis nula, H_0

Hipótesis alterna, H_1

$m = 0.06$, riesgo $\alpha = 0.05$

$t_{cal} = -0.049$

$H_0 : m = 0.06$

$t_{tabla} = 2.18$

$H_1 : m \neq 0.06$

$t_{cal} < t_{tabla}$ por lo que se acepta H_0

Pruebas de hipótesis sobre el factor de concentración experimental para SMX con diferentes matrices ambientales

Prueba de hipótesis sobre la pendiente en agua de manantial

Hipótesis nula, H_0

Hipótesis alterna, H_1

$m = 100.59$, riesgo $\alpha = 0.05$

$t_{cal} = -0.039$

$H_0 : m = 100.61$

$t_{tabla} = 4.30$

$H_1 : m \neq 100.61$

$t_{cal} < t_{tabla}$ por lo que se acepta H_0

Prueba de hipótesis sobre la pendiente en agua de piezómetro

Hipótesis nula, H_0

Hipótesis alterna, H_1

$m = 100.53$, riesgo $\alpha = 0.05$

$t_{cal} = 0.54$

$H_0 : m = 99.97$

$t_{tabla} = 12.7$

$H_1 : m \neq 99.97$

$t_{cal} < t_{tabla}$ por lo que se acepta H_0

Pruebas de hipótesis sobre el factor de concentración experimental para ATZ, 2-HA y DEA con diferentes matrices ambientales

Prueba de hipótesis sobre la pendiente en agua de manantial

2-HA

Hipótesis nula, H_0

$m = 16.45$, riesgo $\alpha = 0.05$

$H_0 : m = 16.45$

$H_1 : m \neq 16.45$

Hipótesis alterna, H_1

$t_{cal} = 0.011$

$t_{tabla} = 2.77$

$t_{cal} < t_{tabla}$ por lo que se acepta H_0

DEA

Hipótesis nula, H_0

$m = 16.81$, riesgo $\alpha = 0.05$

$H_0 : m = 16.8$

$H_1 : m \neq 16.8$

Hipótesis alterna, H_1

$t_{cal} = 0.018$

$t_{tabla} = 2.77$

$t_{cal} < t_{tabla}$ por lo que se acepta H_0

AZT

Hipótesis nula, H_0

$m = 16.07$, riesgo $\alpha = 0.05$

$H_0 : m = 16.1$

$H_1 : m \neq 16.1$

Hipótesis alterna, H_1

$t_{cal} = -0.051$

$t_{tabla} = 2.77$

$t_{cal} < t_{tabla}$ por lo que se acepta H_0

Prueba de hipótesis sobre la pendiente en agua de piezómetro

2-HA

Hipótesis nula, H_0

$m = 16.78$, riesgo $\alpha = 0.05$

$H_0 : m = 16.8$

$H_1 : m \neq 16.8$

Hipótesis alterna, H_1

$t_{cal} = 1.064$

$t_{tabla} = 3.18$

$t_{cal} < t_{tabla}$ por lo que se acepta H_0

DEA

Hipótesis nula, H_0

$m = 15.56$, riesgo $\alpha = 0.05$

$H_0 : m = 15.16$

$H_1 : m \neq 15.16$

Hipótesis alterna, H_1

$t_{cal} = 0.032$

$t_{tabla} = 3.18$

$t_{cal} < t_{tabla}$ por lo que se acepta H_0

AZT

Hipótesis nula, H_0

$m = 16.22$, riesgo $\alpha = 0.05$

$H_0 : m = 16.2$

$H_1 : m \neq 16.2$

Hipótesis alterna, H_1

$t_{cal} = 0.044$

$t_{tabla} = 3.18$

$t_{cal} < t_{tabla}$ por lo que se acepta H_0

Prueba de hipótesis sobre la pendiente en agua de pozo

2-HA

Hipótesis nula, H_0

$m = 16.35$, riesgo $\alpha = 0.05$

$H_0 : m = 17.4$

$H_1 : m \neq 17.4$

Hipótesis alterna, H_1

$t_{cal} = -0.066$

$t_{tabla} = 3.18$

$t_{cal} < t_{tabla}$ por lo que se acepta H_0

DEA

Hipótesis nula, H_0

$m = 15.63$, riesgo $\alpha = 0.05$

$H_0 : m = 15.6$

$H_1 : m \neq 15.6$

Hipótesis alterna, H_1

$t_{cal} = 0.028$

$t_{tabla} = 3.18$

$t_{cal} < t_{tabla}$ por lo que se acepta H_0

AZT

Hipótesis nula, H_0

$m = 16.37$, riesgo $\alpha = 0.05$

$H_0 : m = 16.4$

$H_1 : m \neq 16.4$

Hipótesis alterna, H_1

$t_{cal} = -0.053$

$t_{tabla} = 3.18$

$t_{cal} < t_{tabla}$ por lo que se acepta H_0