



**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR
Y LIMNOLOGÍA**

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



**Metodología para la determinación de
residuos de fármacos en matrices acuosas
por Extracción en Fase Sólida-
Cromatografía de Líquidos/UV. Aplicación
en muestras de agua de los canales de
Xochimilco.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
**MAESTRO EN CIENCIAS
(QUÍMICA ACUÁTICA)**

Presenta

Q.A. Saldaña Díaz Blanca Lilia

Director de tesis

Dra. Luz Elena Vera Ávila

Comité tutorial

Dra. Guadalupe de la Lanza Espino

M. en C. Santiago Capella Viscaíno

Dra. Marisa Mazari Hiriart

Dra. Martha Patricia García Camacho de Llasera



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. GUADALUPE DE LA LANZA ESPINO

SECRETARIO: DRA. LUZ ELENA VERA ÁVILA

VOCAL: M. EN C. SANTIAGO CAPELLA VIZCAÍNO

SUPLENTE: DRA. MARISA MAZARI HIRIART

SUPLENTE: DRA. MARTHA PATRICIA GRACÍA CAMACHO DE LLASERA

SITIO DONDE SE DEARROLLÓ EL TEMA:

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

RESULTADOS PRELIMINARES DERIVADOS DE ESTE TRABAJO FUERON PRESENTADOS EN EL XXIII CONGRESO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA ORGANIZADO POR LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE QUÍMICA ANALÍTICA, CELEBRADO EN ACAPULCO GUERRERO, DEL 30 DE JUNIO AL 2 DE JULIO DE 2010.

ASESOR DEL TEMA:
DRA. LUZ ELENA VERA ÁVILA

SUPERVISOR TÉCNICO:
M. EN C. ROSARIO COVARRUBIAS HERRERA

SUSTENTANTE:
Q.A. SALDAÑA DÍAZ BLANCA LILIA

**Dedicada a mis padres y a mi hija los grandes motores de mi vida
que me impulsan a seguir adelante**

Gracias por creer y confiar siempre en mí. LOS AMO

AGRADECIMIENTOS

A la ***Universidad Nacional Autónoma de México***, por acogerme en sus brazos y por ser mi segunda casa durante todo este tiempo.

Al ***Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)*** por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

A la ***Doctora Luz Elena Vera Ávila*** por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por su invaluable apoyo y conocimiento en la dirección de este proyecto y su gran influencia en mi desarrollo tanto profesional como personal.

A mi supervisora técnica ***M. en C. Rosario Covarrubias Herrera*** por el tiempo, paciencia, comprensión y cariño al enseñar, pero sobre todo por su gran amistad incondicional.

A la ***Doctora Vilaclara*** y a ***la Doctora Vilma*** por todo el apoyo brindado, por su paciencia y dedicación, no tengo palabras que expresen mi gratitud. En verdad mil gracias.

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

A mis padres Blanca Rosa Díaz y Alberto Saldaña por haberme dado la vida, su infinito amor y por supuesto el gran apoyo que me han dado en todos los momentos difíciles por los que he atravesado sin ustedes este segundo éxito no habría sido posible. Gracias por todo!!!

Al gran amor de mi vida, mi pequeña Fatima, por ser esa energía positiva que me impulsa a seguir adelante, por tu comprensión, por aguantar mis largas ausencias pero sobre todo por darme ese amor incondicional. TE AMO.

A mis hermanos Norma y Beto por estar conmigo en las buenas y en las malas, a mi abuelita, a cada uno de mis tíos, tías y primos por comprenderme y apoyarme tanto. Ustedes saben que no lo hubiera logrado sola. ¡Muchas Gracias!

En especial, mi agradecimiento infinito al Doctor Guillermo Aguilar Osorio por las enseñanzas a lo largo de mi viaje Universitario. Mil gracias por seguir aguantándome.

A mi gran amigo David por estar conmigo siempre, por tus consejos y esas terapias de choque. Gracias por ser parte de mi vida.

A Marce, Olivia, Raúl y Deny por cada consejo y ayuda brindada pero sobre todo por cada momento y sonrisa que hicieron una estancia más amena en el laboratorio.

A mis queridos amigos, “Los corridos de las donas”, como olvidarme de ustedes de todos los momentos que hemos pasado juntos, por estar en los momentos que más necesite apoyo, por compartir su tiempo; gracias Raúl, María, Cecilia, Paola, Paty, Arturo, Mela, Javier, Mónica, Pablito, Wendy, Maya, Brenda, Carla, Tere, Esmeralda, por ser tan maravillosas personas. A mi gran amiga Ruth, por su inestimable amistad.

| Índice | Página |
|---|---------------|
| Índice de tablas | 9 |
| Índice de figuras | 12 |
| Lista de abreviaturas | 15 |
| Resumen | 17 |
| Abstract | 19 |
| I. Introducción | 21 |
| II. Antecedentes | 23 |
| II.1. Contaminantes emergentes | 23 |
| II.2. Fármacos | 25 |
| II.3. Presencia de fármacos en el ambiente | 29 |
| II.4. Consumo de fármacos en México | 31 |
| II.4.1. Fármacos de interés | 32 |
| II.5. Métodos de análisis | 35 |
| II.5.1. Pretratamiento de la muestra | 35 |
| II.5.2. Muestras acuosas | 37 |
| II.5.2.1 Extracción líquido-líquido (ELL) | 37 |
| II.5.2.2. Extracción en fase sólida (EFS) | 38 |
| II.5.2.3. Microextracción en fase sólida (MEFS) | 39 |
| II.5.3. Análisis cromatográfico | 40 |
| II.5.4. CLAR/UV: una alternativa apropiada | 42 |
| II.6. Planteamiento del problema | 45 |
| III. Objetivos | 46 |
| III.1. Objetivo general | 46 |
| III.2. Objetivos específicos | 46 |

| | |
|--|----|
| IV. Desarrollo experimental | 47 |
| IV.1. Colecta y almacenamiento de muestras | 47 |
| IV.1.1. Determinación de parámetros fisicoquímicos | 48 |
| IV.2. Procedimiento y metodología analítica | 49 |
| IV.2.1. Condiciones cromatográficas para la separación y detección de los fármacos de interés | 50 |
| IV.2.2. Estudio de estabilidad de los fármacos | 50 |
| IV.2.3. Desarrollo del método de preparación de muestra | 51 |
| IV.2.3.1. Extracción líquido-líquido | 51 |
| IV.2.3.2. Preconcentración de los fármacos por extracción en fase sólida | 51 |
| IV.3. Validación del método analítico | 55 |
| IV.3.1. Linealidad del método | 56 |
| IV.3.2. Precisión del método (medida como repetibilidad) | 56 |
| IV.3.3. Límites de detección y cuantificación del método | 57 |
| IV.4. Aplicación del método en muestras de agua colectadas en los canales de Xochimilco | 57 |
| IV.4.1. Preparación previa de la muestra | 57 |
| IV.4.2. Preconcentración y análisis de las muestras | 57 |
| V. Resultados y discusión | 60 |
| V.1. Desarrollo del método analítico | 60 |
| V.1.1. Condiciones cromatográficas para la separación y detección de los fármacos de interés | 60 |
| V.1.2. Estudio de la estabilidad de los fármacos | 64 |
| V.1.3. Desarrollo del método de preparación de muestra | 66 |
| V.1.3.1. Pre-purificación de la muestra por extracción líquido-líquido | 66 |
| V.1.3.2. Preconcentración de los fármacos por extracción en fase sólida | 68 |
| V.2. Validación del método analítico | 77 |
| V.2.1. Estabilidad de los fármacos de interés | 78 |
| V.2.2. Linealidad del método | 79 |
| V.2.3. Precisión y % de Recobro del método | 80 |

| | |
|---|-----|
| V.2.4. Límites de detección y cuantificación | 81 |
| V.3. Análisis de muestras de aguas colectadas en los canales de Xochimilco | 82 |
| V.3.1. Aplicación del método desarrollado: Análisis cualitativo y cuantitativo de los fármacos en las muestras | 82 |
| V.3.2. Descriptores físicos y químicos de las muestras colectadas en Xochimilco | 95 |
| VI. Conclusiones | 99 |
| Recomendaciones | 100 |
| VII. Bibliografía | 101 |
| VIII. Anexos | 107 |
| Anexo I. Revisión bibliográfica de las condiciones ambientales de Xochimilco | 107 |
| Anexo II. Material y equipo | 109 |
| Anexo III. Espectros de absorción de los fármacos de interés | 112 |
| Anexo IV. Gráficas de Cantidad de soluto recuperado vs Cantidad de soluto adicionado | 114 |
| Anexo V. Pruebas para la ordenada al origen y la pendiente de las rectas de regresión | 117 |
| Anexo VI. Listado de ecuaciones estadísticas (Miller and Miller, 2002) | 118 |

Índice de Tablas

| Tabla | Contenido | Página |
|--------------|--|---------------|
| II-1 | Clases de contaminantes emergentes | 24 |
| II-2 | Porcentajes de excreción en su forma original y como conjugados hidrolizables para algunos fármacos y los metabolitos producidos | 27 |
| II-3 | Concentraciones de fármacos detectadas en aguas residuales y efluentes de depuradoras | 29 |
| II-4 | Concentración de algunos fármacos en aguas residuales (influentes y efluentes de plantas depuradoras), superficiales y subterráneas y en agua para consumo humano | 30 |
| II-5 | Consumo de fármacos en Cuernavaca | 32 |
| II-6 | Fármacos de interés. Concentración expresada en µg/L | 32 |
| II-7 | Procedimientos de extracción de fármacos empleados en muestras ambientales. | 36 |
| II-8 | Métodos para el análisis de fármacos en muestras acuosas ambientales | 42 |
| IV-1 | Condiciones experimentales para la preconcentración de muestras | 55 |
| IV-2 | Intervalo de concentración de los fármacos para el estudio de linealidad del método | 56 |
| IV-3 | Concentración de los fármacos en el estudio de precisión del método | 56 |
| IV-4 | Niveles de fortificación aplicados a las muestras de La Candelaria y Caltongo para evaluar la detectabilidad de los fármacos en aguas naturales con alta carga de materia orgánica | 59 |
| IV-5 | Niveles de fortificación aplicados a las muestras de La Draga y San Diego para el análisis cualitativo y cuantitativo de los fármacos | 59 |
| V-1 | Programa de gradiente para la separación del grupo final de fármacos en la columna Gemini C18 | 64 |
| V-2 | Principales máximos de absorción detectados para cada fármaco | 64 |
| V-3 | Seguimiento del proceso de extracción líquido-líquido (ELL) | 67 |

| | | |
|------|---|----|
| V-4 | Estudio de la retención del acetaminofén en la precolumna PLRP-S | 69 |
| V-5 | Programa de gradiente para la separación del grupo preliminar de fármacos en la columna Hypercarb | 71 |
| V-6 | Condiciones experimentales para la EFS fuera de línea utilizando la columna Hypercarb para la preconcentración de los fármacos a partir de muestras acuosas | 72 |
| V-7 | % Recobro obtenido en la preconcentración y análisis de fármacos, utilizando una columna de carbón grafitizado como dispositivo para la EFS | 73 |
| V-8 | Recobros obtenidos a dos diferentes volúmenes de carga en una mini columna (20X2 mm, d.i.) empacada con 250 mg de carbón grafitizado | 75 |
| V-9 | Efecto de la pre-purificación de la muestra por extracción líquido-líquido sobre el recobro de los fármacos en el proceso por EFS | 75 |
| V-10 | Condiciones de elución de los fármacos previamente concentrados en una mini columna (30X4.6 mm, d.i.) empacada con carbón grafitizado | 76 |
| V-11 | Estabilidad de los fármacos en presencia de azida de sodio en la disolución acuosa | 78 |
| V-12 | Parámetros estadísticos de las rectas de regresión <i>Cantidad recuperada vs Cantidad adicionada</i> (n=8) | 79 |
| V-13 | Parámetros de las pruebas de hipótesis sobre el valor de la ordenada al origen. Nivel de confianza $\alpha=0.05$ (n=8) | 80 |
| V-14 | Parámetros de la prueba de hipótesis sobre el valor de la pendiente. Nivel de confianza $\alpha=0.05$ (n=8) | 80 |
| V-15 | Precisión y % de Recobro del método en análisis replicados (n=12) | 81 |
| V-16 | Límites de detección y cuantificación del método | 81 |
| V-17 | Evaluación de los límites de detección (LDM) de los fármacos en las muestras de agua de los canales Caltongo y La Candelaria | 86 |
| V-18 | Determinación de la concentración de los fármacos detectados en muestras de agua de Xochimilco por el método de adiciones patrón | 93 |
| V-19 | Evaluación de los límites de detección (LDM) de los fármacos en las muestras de agua de los afluentes La Draga y San | 94 |

Diego

V-20 Descriptores físicos y químicos de los sitios de muestreo

95

Índice de figuras

| Figura | Contenido | Página |
|---------------|--|---------------|
| IV-1 | Localización geográfica de los puntos de muestreo (tomado de Google Earth). | 47 |
| IV-2 | Esquema del sistema utilizado en el proceso de EFS fuera de línea en una mini columna empacada con 250 mg de carbón grafitizado no poroso (40-100 μ m) | 54 |
| IV-3 | Diagrama de flujo para el análisis de muestras de agua por EFS-CLAR/UV-DAD | 58 |
| V-1 | Cromatogramas de tres fármacos obtenidos a diferentes longitudes de onda: a) acetaminofén, b) aspirina, c) naproxeno. Columna Hypersil ODS (150X4.6 mm, d.i) de 5 μ m, fase móvil AcCN-H ₂ O (HClO ₄) 0.1M): a) 15:85 (v/v), b) 50:50 (v/v), c) 60:40 (v/v) | 60 |
| V-2 | Separación isocrática de una mezcla de fármacos. Columna Hypersil ODS (150X4.6 mm, d.i.) de 5 μ m, fase móvil AcCN-MeOH-H ₂ O (HClO ₄ 0.1M) 50:10:40 (v/v), detección UV a 215 nm. Solutos (1) aspirina, (2) ácido salicílico, (3) enalapril, (4) naproxeno, (5) ibuprofeno | 61 |
| V-3 | Separación isocrática de los fármacos en la columna Gemini C18 (150X4.6 mm, d.i.) de 5 μ m. Fase móvil AcCN-MeOH-H ₂ O (HClO ₄ 0.1M) 50:10:40 (v/v), detección UV a 215 nm. Solutos (1) acetaminofen, (2) enalapril, (3) aspirina, (4) ácido salicílico, (5) naproxeno, (6) ibuprofeno | 62 |
| V-4 | Separación del grupo final de fármacos por gradiente de elución. Columna Gemini C18 (150X4.6 mm, d.i.) de 5 μ m; programa de gradiente como en la Tabla V-1, con Fase A: ácido trifluoroacético acuoso 2×10^{-3} M y Fase B: ácido trifluoroacético en acetonitrilo 1×10^{-3} M, flujo 0.5 mL/min. Solutos: (1) enalapril, (2) aspirina, (3) ácido salicílico, (4) naproxeno, (5) indometacina, (6) ibuprofeno | 63 |
| V-5 | Degradación de la ampicilina, aspirina y amoxicilina a pH=11. Los cromatogramas se obtuvieron por inyección directa de la disolución de cada fármaco en el medio de estudio después de transcurrir el tiempo señalado. Columna Hypersil ODS (150X4.6 mm, d.i.) de 5 μ m, fase móvil AcCN-H ₂ O (HClO ₄ 0.1 M) 25:75 (v/v) | 65 |
| V-6 | Estabilidad de ampicilina y amoxicilina en disolución acuosa | 66 |

| | | |
|------|---|----|
| | a temperatura ambiente. Columna Hypersil ODS (150X4.6 mm, d.i.) de 5 μ m, fase móvil AcCN-H ₂ O (HClO ₄ 10 ⁻¹ M) 25:75 (v/v) | |
| V-7 | Separación de los fármacos en una columna de carbón grafitizado. Columna Hypercarb (100X3 mm, d.i.) de 5 μ m; gradiente de elución con Fase A: agua (pH 1) y Fase B AcCN-THF-isopropanol 50:30:20 (v/v), programa como en la Tabla V-5, flujo 0.5 mL/min. Solutos: (1) enalapril, (2) acetaminofén, (3) aspirina, (4) ibuprofeno, (5) ácido salicílico, (6) naproxeno, (*) pico de gradiente | 71 |
| V-8 | Cromatogramas obtenidos de un estándar y dos muestras sintéticas de agua grado reactivo fortificadas con los fármacos y procesadas según el método desarrollado. Las muestras y el estándar contenían la misma cantidad de cada fármaco. Solutos: (1) enalapril, (2) aspirina, (3) ácido salicílico, (4) naproxeno, (5) indometacina, (6) ibuprofeno. Columna Gemini (150X 4.6 mm, d.i.) 5 μ m; fase móvil A: ácido trifluoroacético acuoso 2X10 ⁻³ M y fase móvil B: acetonitrilo, programa de gradiente como en la Tabla V-1 | 77 |
| V-9 | Cromatograma obtenido del análisis de la muestra de agua colectada en el Canal de Caltongo. Condiciones cromatográficas como en la Figura V-4 | 82 |
| V-10 | Cromatograma obtenido del análisis de la muestra de agua colectada en el Canal de La Candelaria. Condiciones cromatográficas como en la Figura V-4 | 83 |
| V-11 | Cromatograma obtenido del análisis de la muestra de agua colectada en el afluente La Draga. Condiciones cromatográficas como en la Figura V-4 | 83 |
| V-12 | Cromatograma obtenido del análisis de la muestra de agua colectada en el afluente San Diego. Condiciones cromatográficas como en la Figura V-4 | 84 |
| V-13 | Cromatogramas obtenidos del análisis de una muestra de agua colectada en el Canal de Caltongo (muestra blanco) y la misma fortificada con los fármacos a dos niveles de concentración. Solutos: (1) enalapril 25 y 50 ppb, (2) aspirina 10 y 20 ppb, (3) ácido salicílico 8 y 16 ppb, (4) naproxeno 3 y 6 ppb, (5) indometacina 6 y 12 ppb, (6) ibuprofeno 10 y 20 ppb | 85 |
| V-14 | Cromatogramas obtenidos del análisis de una muestra de agua colectada en el Canal de La Candelaria (muestra blanco) y la misma fortificada con los fármacos a dos niveles de concentración. Solutos: (1) enalapril 25 y 50 ppb, (2) aspirina 10 y 20 ppb, (3) ácido salicílico 8 y 16 ppb, (4) | 85 |

| | | |
|------|---|----|
| | naproxeno 3 y 6 ppb, (5) indometacina 6 y 12 ppb, (6) ibuprofeno 10 y 20 ppb | |
| V-15 | Comparación de los espectros de absorción de los fármacos puros con los espectros de los picos que eluyeron al mismo tiempo de retención en las muestras de La Draga y San Diego | 88 |
| V-16 | Comparación del espectro de absorción del diclofenaco con el espectro del pico que eluye a un tiempo de retención semejante en la muestra colectada en San Diego | 89 |
| V-17 | Sección ampliada de la región donde eluye el naproxeno en los cromatogramas obtenidos del análisis de una muestra de agua colectada en La Draga, y la misma muestra fortificada con este fármaco a tres niveles de concentración | 90 |
| V-18 | Secciones ampliadas de las regiones donde eluyen (a) el ácido salicílico y (b) la indometacina y el ibuprofeno, en los cromatogramas obtenidos del análisis de una muestra de agua colectada en San Diego, y la misma muestra fortificada con los fármacos a tres niveles de concentración: ácido salicílico 4, 6 y 8 ppb, indometacina 3, 4.5 y 6 ppb, ibuprofeno 5, 7.5 y 10 ppb. | 91 |
| V-19 | Curva de calibración para la cuantificación de naproxeno en la muestra de agua del afluente La Draga por el método de adiciones patrón. | 92 |
| V-20 | Curva de calibración para la cuantificación de ácido salicílico en la muestra de agua del afluente de San Diego por el método de adiciones patrón | 92 |
| V-21 | Curva de calibración para la cuantificación de ibuprofeno en la muestra de agua del afluente de San Diego por el método de adiciones patrón | 93 |

Lista de abreviaturas

| | |
|------------------|---|
| AcCN | Acetonitrilo |
| AcOEt | Acetato de etilo |
| APCI | Por sus siglas en inglés: ionización química a presión atmosférica |
| CG-ES | Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas |
| CLAR | Cromatografía de líquidos de alta resolución |
| CLAR-UV | Cromatografía de líquidos de alta resolución con detección ultravioleta |
| CL-ES | Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas |
| CV | Coeficiente de variación |
| DAD | Detector con arreglo de diodos |
| DBO ₅ | Demanda bioquímica de oxígeno |
| D.E. | Desviación estándar |
| DQO | Demanda química de oxígeno |
| DVB | Divinilbenceno |
| EAS | Extracción acelerada con disolventes |
| EDAR | Estación depuradora de aguas residuales |
| EFS | Extracción en fase sólida |
| ELL | Extracción líquido-líquido |
| EM | Espectrometría de masas |
| ESI | Por sus siglas en inglés: ionización por electrospray |
| EtOH | Etanol |
| IT | Ionización por termospray |
| L | litros |
| LCM | Límite de cuantificación del método |
| LDM | Límite de detección del método |
| MEFS | Microextracción en fase sólida |

| | |
|--------|---|
| MeOH | Metanol |
| MTBE | éter metil tert-butílico |
| OD | Oxígeno disuelto |
| %SO | % de saturación de oxígeno |
| PDMS | Polidimetilsiloxano |
| ppm | partes por millón (mg/L) |
| ppb | partes por billón (µg/L) |
| PLRP-S | Fase reversa polimérica |
| PPCP's | Por sus siglas en inglés: productos farmacéuticos y de cuidado personal |
| PTAR | Planta de tratamiento de aguas residuales |
| SDT | Sólidos totales disueltos |
| SS | Sólidos suspendidos |
| THF | Tetrahidrofurano |
| US-EPA | Agencia para la protección al ambiente de Estados Unidos |
| UV | Ultravioleta |

Resumen

Aunque los primeros reportes sobre la presencia de productos farmacéuticos en el ambiente datan de los años 1970s, no tuvieron gran repercusión, ya que en esa época y durante los años ochenta el interés por el cuidado y preservación del medio ambiente estuvo focalizado en otro tipo de contaminantes como los metales pesados, hidrocarburos aromáticos polinucleares, dioxinas, bifenilos policlorados, pesticidas, etc. Fue hasta mediados de la década de los noventa cuando realmente surgió una preocupación por el posible impacto medioambiental de las sustancias con actividad biológica, lo que impulsó una creciente y variada investigación en este campo. Los primeros trabajos conocidos sobre productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCP's) en el ambiente, y particularmente en el medio acuático, son relativamente recientes y provienen de países como E.U., Canadá y algunos de Europa. Estos estudios demostraron que los tratamientos de aguas residuales en plantas de depuración no son suficientes para eliminar en su totalidad estas sustancias o sus metabolitos, por lo que acaban migrando hacia los ríos, lagos, mares y acuíferos y, al final, pueden terminar en las redes de agua potable. Por esta razón, se ha vuelto de importancia fundamental el conocer con mayor precisión las rutas de entrada, el destino y los efectos que estos productos pueden causar sobre los organismos acuáticos y de forma directa o indirecta sobre el hombre. Para ello el primer paso consiste en determinar los niveles de concentración que estos compuestos bioactivos alcanzan en las aguas residuales y tratadas, así como en los diferentes cuerpos de agua superficial y subterránea.

Las metodologías reportadas para la determinación de trazas de fármacos y otros PPCP's en aguas ambientales se basan en el uso de instrumentación costosa y sofisticada como la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas tándem (CLAR-EM/EM). En México y otros países en vías de desarrollo, son pocos los laboratorios que cuentan con el equipo y personal capacitado para llevar a cabo este tipo de análisis. Tomando en consideración todos estos factores, el objetivo principal que se planteó el presente trabajo fue desarrollar una metodología más simple y accesible para la determinación de seis fármacos de uso común (aspirina, ácido salicílico, naproxeno, ibuprofeno, enalapril e indometacina) en matrices acuosas.

El método finalmente establecido y propuesto consta básicamente de tres etapas:

- 1) Pre-purificación de la muestra por extracción líquido-líquido para remover impurezas de baja y mediana polaridad, dejando los analitos hidrofílicos en la fase acuosa. En esta etapa la muestra se lleva a pH básico para provocar la ionización de los fármacos, asegurando con ello su permanencia cuantitativa en el medio acuoso durante el proceso de extracción.
- 2) Concentración de los analitos por extracción en fase sólida (EFS). Para alcanzar un alto factor de preconcentración fue necesario probar una gran diversidad de adsorbentes y modalidades de operación de la EFS. Finalmente se seleccionó al carbón grafitizado por su alto poder de retención y a la modalidad de EFS fuera de línea por su mayor simplicidad y versatilidad. El procedimiento establecido se resume en lo siguiente: 100 mL de muestra acidificada se cargan en

una mini columna de carbón grafitizado, la cual se lava con agua y se eluye (en sentido inverso a la carga) con una mezcla de disolventes, calentando a 60°C; el eluato obtenido es evaporado casi a sequedad y reconstituido a un volumen final de 1 mL con una mezcla de metanol y agua acidificada.

- 3) Separación y determinación de los fármacos preconcentrados por CLAR-UV. Un volumen de 100 µL de extracto se inyecta en una columna de fase reversa modificada con grupos polares realizando la separación mediante un gradiente de elución agua-acetonitrilo, ambos acidificados con ácido trifluoroacético; la detección se efectúa a 115 nm.

La validación del método se llevó a cabo con muestras sintéticas de agua grado reactivo fortificadas con los analitos de interés a concentraciones ≤ 50 ppb. Los porcentajes de recobro promedio obtenidos en el intervalo de concentraciones estudiado para cada fármaco fueron: enalapril 88.3 ± 5.3 , aspirina 84.8 ± 3.3 , ácido salicílico 92.9 ± 5 , naproxeno 87.5 ± 7.9 , indometacina 70.9 ± 4.7 e ibuprofeno 69.2 ± 3.4 . El tratamiento estadístico de los resultados demostró la linealidad del método en el intervalo de concentraciones estudiadas ($r^2 > 0.99$), con una excelente precisión para estos niveles de concentración (desviación estándar relativa $< 8\%$). Los límites de detección y cuantificación del método estuvieron comprendidos en los intervalos de 0.17-1.14 ppb y 0.54-2 ppb, respectivamente, dependiendo del fármaco.

El método fue aplicado en muestras de aguas colectadas en 4 sitios de la zona lacustre de Xochimilco, dos de ellos fueron los canales Caltongo y La Candelaria, y los otros dos fueron San Diego y La Draga, afluentes de la planta de tratamiento de aguas residuales de Cerro de la Estrella. Sólo en estas últimas muestras se detectó la presencia de tres de los fármacos estudiados; las concentraciones determinadas por el método de adiciones patrón fueron: naproxeno ~ 0.3 ppb (La Draga), ácido salicílico 5.4 ppb (San Diego) e ibuprofeno 6 ppb (San Diego). Aunque estos resultados provienen de un muestreo único, los niveles encontrados de ibuprofeno y ácido salicílico en el agua del afluente San Diego son preocupantes ya que podrían indicar la existencia de un foco de contaminación puntual. Por ello, sería recomendable dar un seguimiento cercano a este sitio y la zona aledaña. Por otra parte, el alto contenido de materia orgánica polar (probablemente ácidos húmicos y/o fúlvicos) en las muestras provenientes de los canales, interfirió fuertemente en la detección de los fármacos afectando la sensibilidad del método en estas difíciles matrices. Los límites de detección ($s/n = 3$) para los fármacos más hidrofílicos, enalapril y aspirina, aumentaron hasta 35 y 15 ppb, respectivamente; para los demás fármacos los límites de detección estuvieron entre 1.5 y 6 ppb. Por tal motivo, no se descarta la presencia de residuos de los fármacos, a concentraciones inferiores a las mencionadas, en el agua de los canales Caltongo y La Candelaria.

En conclusión, se desarrolló un método simple, relativamente económico y con sensibilidad aceptable para la determinación de 6 fármacos de alto consumo en México en muestras acuosas. El diseño del método propuesto es tal, que fácilmente puede ser implementado en cualquier laboratorio de nuestro país que cuente con la instrumentación básica para la realización de análisis ambientales. Esto lo convierte en una útil herramienta para el seguimiento rutinario de la presencia de los fármacos considerados en cuerpos de agua susceptibles a este tipo de contaminación.

Abstract

Although the presence of pharmaceutical products in the environment was reported since the 1970s, these initial findings were practically ignored because the concerns regarding the preservation of the environment at that time, and during the 1980s, were focused on a different type of pollutants, such as heavy metals, polynuclear aromatic hydrocarbons, dioxins, polychlorinated biphenyls, pesticides, etc. It was until the mid nineties that the presence of substances with biological activity in the environment and their possible impact began to be seriously considered. As a result, the number and variety of research works on this matter rapidly increased and is still growing until now. The first known studies on pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in the environment and especially in the aquatic medium, are, thus, relatively recent and come from U.S., Canada and some European countries. These works demonstrated that residual water treatment processes in depuration plants are not sufficient for totally eliminating these substances or their metabolites; therefore, the residues can migrate and reach the rivers, lakes, seas, aquifers and may finally end in the potable water network. Because of this, it has become of prime importance to increase the knowledge about the precise entrance routes, the fate and the effects that these products can have on the aquatic life and directly or indirectly on the human being. For this end, the first step is the determination of concentration levels that these bioactive compounds can reach in residual and treated water, as well as in the different surface water and ground water reservoirs.

Reported methodologies for determination of trace pharmaceuticals and other PPCPs in environmental waters are based on the use of sophisticated and costly instrumental techniques such as high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). In Mexico and other developing countries, the laboratories having the equipment and specialized personnel for this type of analysis are scarce. Considering all these facts, the main objective of the present work was to develop a more simple and accessible methodology for the determination of six pharmaceutical products of common use (aspirin, salicylic acid, naproxen, ibuprofen, enalapryl and indomethacin) in aqueous matrices.

The finally established and proposed method consists of three main parts:

- 1) Pre-cleaning of the sample by means of liquid-liquid extraction for the removal of low and medium polarity impurities, leaving the hydrophilic analytes in the aqueous phase. In this step, the sample is brought to an alkaline pH in order to ionize the compounds of interest, thus, ensuring that they will quantitatively remain in the aqueous medium during the extraction process.
- 2) Analyte concentration using solid-phase extraction (SPE). In order to achieve a high preconcentration factor, it was necessary to test a diversity of adsorbents and SPE operation modes. Finally selected conditions were: a graphitized carbon adsorbent, because of its strong retention power, and off-line SPE because more simple and flexible. The adopted procedure was as follows: 100 mL of acidified sample are loaded in a graphitized carbon mini column, which is

then rinsed with water and back flush eluted with a mixture of solvents while heating at 60°C; the obtained eluate is evaporated to almost dryness and reconstituted to 1 mL with a mixture of methanol and acidified water.

- 3) Separation and determination of pre-concentrated pharmaceuticals by HPLC-UV. A 100 µL volume of extract is injected in a polar modified reverse-phase column using an acetonitrile-water elution gradient for separation (both solvents are acidified with trifluoro acetic acid); detection is carried out at 115 nm.

Method validation was performed using synthetic reagent water samples spiked with the 6 compounds of interest at concentrations ≤ 50 ppb. Mean percent recoveries for each pharmaceutical product in the studied concentration range were: enalapryl 88.3 ± 5.3 , aspirin 84.8 ± 3.3 , salicylic acid 92.9 ± 5 , naproxen 87.5 ± 7.9 , indomethacin 70.9 ± 4.7 and ibuprofen 69.2 ± 3.4 . Statistical treatment of results demonstrated the method linearity in the studied concentration range ($r^2 > 0.99$). An excellent precision for this concentration level was also achieved (RSD $< 8\%$). The limits of detection and quantitation of the method were comprised in the range 0.17-1.14 ppb and 0.54-2 ppb, respectively, depending on the compound.

The method was applied to water samples collected from 4 sites in the lake zone of Xochimilco. Two of them were the channels Caltongo and La Candelaria, and the other two were San Diego and La Draga, affluents of the residual water treatment plant Cerro de la Estrella. Studied pharmaceuticals were only detected in samples from the two effluents; determined concentrations using the standard addition method for quantitation were: naproxen ~ 0.3 ppb (La Draga), salicylic acid 5.4 ppb (San Diego) and ibuprofen 6 ppb (San Diego). Although these results come from a unique sampling, the levels of ibuprofen and salicylic acid in the water from San Diego affluent are of concern as this finding may indicate the existence of a punctual contamination focus. A close monitoring of this site and the surrounding area is therefore recommended. On the other hand, the high content of organic matter (probably humic and/or fulvic acids) in samples coming from the two channels, strongly interfered in the detection of pharmaceuticals affecting the method sensitivity in these difficult matrices. Detection limits ($s/n = 3$) for the most hydrophilic compounds, enalapryl and aspirin, increased up to 35 and 15 ppb, respectively; for the other compounds, the detection limits were between 1.5 and 6 ppb. For this reason, the presence of pharmaceuticals, at concentrations below the above mentioned, cannot be discarded in Caltongo and La Candelaria.

In conclusion, a simple, relatively economical and acceptably sensitive method was developed for the determination of 6 pharmaceuticals in water samples. The selected compounds are of high consumption in Mexico. The proposed method has been designed in such a way that it can be easily adopted by Mexican laboratories equipped with the most basic instrumentation for environmental analyses. Therefore, it can become a useful tool for the routine monitoring of these bioactive products in water reservoirs that are susceptible to this type of pollution.

I. Introducción

El interés actual por el cuidado y protección al ambiente, ha impulsado el desarrollo de metodologías analíticas cada vez más sensibles y selectivas para la detección y determinación de contaminantes en diversas matrices ambientales. Recientemente, el enfoque de estos análisis ha cambiado de los contaminantes clásicos, como los contaminantes orgánicos persistentes, hacia los denominados contaminantes emergentes, como los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCP's, por sus siglas en inglés: *Pharmaceuticals and Personal Care Products*), que en la mayoría de los casos son sustancias no reguladas que podrían serlo en el futuro dependiendo de su presencia en el ambiente y sus efectos en la salud (Aga, 2008).

La gravedad radica en que estas sustancias son incorporadas por diversas vías a ríos, lagos, aguas marinas y subterráneas y pasado un tiempo, que puede ser en la mayoría de los casos corto, pueden llegar a ingresar en las redes de distribución de agua y ser ingeridos por las personas, traduciéndose entonces en un peligro potencial para la salud humana. Se estima que la principal fuente de contaminación por PPCP's son las aguas residuales urbanas no tratadas y los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, atendiendo a que éstas no fueron diseñadas para eliminar ese tipo de compuestos y, por lo tanto, una alta proporción de los mismos y de sus metabolitos entra al ambiente cuando los efluentes son liberados a los cuerpos de agua superficial, al suelo o, en casos muy específicos, reinyectadas a los acuíferos (Daughton y Ternes, 1999; Aga, 2008; Durán, 2009). Es importante notar que en el caso de los países en vías de desarrollo, como México, una notable fracción del agua residual no es tratada, siendo entonces el drenaje la principal ruta de entrada de los contaminantes emergentes al ambiente (Castillo, 2008).

Dentro de los contaminantes emergentes se distinguen dos grupos principales. Por un lado están los disruptores endocrinos, clasificados en función del efecto biológico generado en los organismos, así como por su modo de acción (Daughton y Ternes, 1999; Aga, 2008). Por otra parte, se encuentran los productos farmacéuticos y de cuidado personal, los cuales están clasificados de acuerdo con el uso para el que se fabrican. Son productos químicos bioactivos, sustancias que tienen un efecto en tejidos vivos y comprenden una amplia y diversa colección de miles de compuestos; dicha colección se refiere, en general, a cualquier producto utilizado por las personas para el cuidado personal y de la salud o empleado por razones estéticas (Daughton, 2004).

Los fármacos, en particular, son los compuestos a los que se están enfocando la mayor parte de las investigaciones debido a su continuo vertido en los cuerpos de agua y al escaso conocimiento científico sobre sus efectos potenciales a corto, mediano y largo plazo tanto en la salud como en el ambiente. Estos compuestos son diseñados para interactuar con receptores específicos en el hombre y los animales, o bien, para ejercer un efecto tóxico sobre organismos infecciosos como las bacterias, hongos y parásitos, entre otros. No existe una lista oficial para este tipo de contaminantes, por lo que su clasificación se ha basado en criterios médicos y su impacto se determina mediante estrategias TIE (Toxicity Identification and Evaluation) que combinan técnicas analíticas y ensayos biológicos (Daughton, 2004; Daughton, 2007).

Uno de los factores que explica el poco conocimiento que se tiene sobre los efectos que causan o podrían causar los fármacos y productos de cuidado personal en el ambiente, es la dificultad asociada con su detección y determinación. Esto es debido a que generalmente son compuestos polares muy hidrofílicos que se encuentran al nivel de trazas ($\mu\text{g/L}$ o menores) en las complejas matrices ambientales, constituidas por muchos otros compuestos orgánicos e inorgánicos millones de veces más concentrados. Los avances actuales en el desarrollo de técnicas analíticas poderosas (Hennion y Scribe, 1993; Barceló, 2003; Daughton, 2004; Aga, 2008), como la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM o CG-EM/EM) o la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (CL-EM o CL-EM/EM), han permitido detectar y cuantificar estos compuestos a muy bajos niveles de concentración. Sin embargo, a pesar de la alta selectividad y sensibilidad de estas técnicas, en la mayoría de los casos también es indispensable realizar un buen pretratamiento de las muestras para mejorar la recuperación de los compuestos de interés a partir de su matriz, reducir los niveles de interferencias y alcanzar los límites de detección y cuantificación requeridos (Daughton y Ternes, 1999; Vanderford *et al.*, 2003; Aga, 2008)

Considerando lo anterior y para contribuir al estudio y evaluación del problema de los contaminantes emergentes en nuestro país, el presente trabajo pretende aportar los medios necesarios para recabar información acerca de la presencia de compuestos farmacéuticos de alto consumo; tales como ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, naproxeno, ibuprofeno, indometacina y enalapril- en aguas naturales y tratadas. En una primera etapa se buscó desarrollar una metodología analítica simple, robusta y confiable, al alcance de cualquier laboratorio dedicado a análisis ambientales, para detectar y cuantificar los fármacos de interés a niveles de concentración del orden de partes por billón ($\mu\text{g/L}$) en muestras acuosas. La siguiente etapa consistió en probar el método desarrollado para el análisis de los fármacos en una matriz compleja, como lo es el agua de los canales de Xochimilco. El interés de este lugar radica en que es una zona altamente poblada, donde una buena parte de los pobladores realiza actividades estrechamente relacionadas con el sistema lacustre. La situación urbana de este lago lo hace muy susceptible a la contaminación por PPCP's (Díaz, 2009).

Dado que muchos compuestos farmacéuticos son sensibles a la degradación térmica, la técnica más apropiada para su determinación es la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Aunque en la gran mayoría de las publicaciones relacionadas con la determinación de PPCP's se utiliza la espectrometría de masas tandem (EM/EM) como método de detección (Barceló, 2003), los equipos acoplados CLAR-EM/EM son sumamente costosos, requieren de personal altamente especializado para su manejo y todavía son muy pocos los laboratorios en México que cuentan con ellos. Por esta razón, el trabajo realizado en esta investigación se enfoca a la búsqueda de un método apropiado de preparación de muestra que haga viable el uso de equipo convencional de cromatografía de líquidos con detección ultravioleta (CLAR-UV) en la etapa de separación y análisis del grupo de fármacos. Es importante considerar que los fármacos seleccionados, además de ser ampliamente utilizados por la población, son compuestos con propiedades ácido-base, muy polares y por ello difíciles de extraer, purificar y concentrar a partir de matrices acuosas.

II. Antecedentes

II.1. Contaminantes emergentes

Durante las últimas tres décadas, el impacto de la contaminación ambiental por sustancias químicas en agua, aire y suelo, ha llamado la atención de las autoridades responsables hacia el estudio y monitoreo de los llamados contaminantes prioritarios, los cuales comprenden una gran variedad de sustancias que han sido clasificadas en este rubro con base en su carcinogenicidad, teratogenicidad, mutagenicidad o toxicidad aguda (Daughton y Ternes, 1999; Aga, 2008).

Estos contaminantes son sólo una parte de la larga lista de compuestos potencialmente tóxicos, ya que existen muchas otras sustancias, aún no legisladas, cuyos efectos han comenzado a estudiarse en años recientes (US EPA, 2010). Tales sustancias no son necesariamente compuestos químicos nuevos. Algunos de ellos han estado presentes en el ambiente durante mucho tiempo, pero su presencia e impacto ambiental apenas empiezan a ser evaluados (Daughton, 2004; Aga, 2008).

Estas sustancias se han denominado contaminantes emergentes (tabla II-1). Dichos contaminantes abarcan un amplio grupo de compuestos químicos, los cuales han sido clasificados de manera general de acuerdo con su origen (ruta de entrada al ambiente), tipo de uso (industrial, humano o veterinario), funcionalidad química, tipo de efecto (receptores específicos, interacciones ligando-receptor conocidas) y mecanismos de acción (Daughton y Ternes, 1999; Cortacans *et al.*, 2005). Entre los compuestos que se han incluido dentro de esta clasificación, en los últimos años, están ciertos tensoactivos, aditivos de gasolina, productos farmacéuticos y de higiene personal.

La característica fundamental de estas sustancias es que no es necesario que persistan en el ambiente para producir efectos nocivos, puesto que su eliminación o transformación pueden ser compensadas por su introducción continua en el mismo. Una de las principales fuentes de contaminantes emergentes son las aguas residuales urbanas no tratadas y los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, atendiendo a que la mayoría de ellas no están diseñadas para eliminar este tipo de compuestos y, por lo tanto, una alta proporción de los mismos y de sus metabolitos pasan a los sistemas acuáticos. (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Daughton, 2004; Cortacans *et al.*, 2005; Aga, 2008).

Tabla II-1. Clases de contaminantes emergentes (Barceló, 2003)

| Clases de compuestos | Ejemplos |
|---|--|
| Productos farmacéuticos | |
| Antibióticos usados en veterinaria y medicina | trimetoprim, eritromicina, lincomicina, sulfametoxazol |
| Medicamentos analgésicos y anti-inflamatorios | codeína, ibuprofeno, acetaminofen, ácido acetilsalicílico, diclofenaco, fenoprofen |
| Medicamentos psiquiátricos | diazepam |
| Reguladores de lípidos | bezafibrato, ácido clofíbrico, ácido fenofíbrico |
| β -bloqueantes | metoprolol, propranolol, timolol |
| Medios de contraste de Rayos X | Iopromide, iopamidol, diatrizoato |
| Esteroides y hormonas (anticonceptivos) | estradiol, estrona, estriol, dietilisobutilestriol |
| Productos de cuidado personal | |
| Perfumes | almizcles nitro, policíclicos y macrocíclicos |
| Agentes de protección solar | benzofenona, alcanfor, metilbencilideno |
| Repelentes de insectos | N,N-dietiltoluamida |
| Antisépticos | triclosán, clorofeno |
| Detergentes tensoactivos y sus metabolitos | alquilfenoles etoxilados, alquilfenoles (nonilfenol y octilfenol), alquilfenol carboxilados |
| Retardadores de llama | difenil éteres polibrominados (PBDEs), tetrabromo bisfenol A, tris(2-cloroetil)fosfato |
| Aditivos y agentes industriales | agentes quelantes (EDTA), sulfonatos aromáticos |
| Aditivos de la gasolina | dialquil éteres, metil- <i>t</i> -butil éter (MTBE) |
| Subproductos de desinfección | yodo, trihalometanos, bromoacetnitrilos, bromoácidos, bromoaldehidos, cianoformaldehido, bromato, NDMA |

Entre la amplia variedad de compuestos considerados como contaminantes emergentes se distinguen dos grupos. Por un lado están los fármacos y productos de cuidado personal, los cuales están clasificados de acuerdo con el uso para el que son fabricados (antibióticos, anti-inflamatorios, repelentes de insectos, antibacteriales, etc.). Si bien estos compuestos están diseñados para tener un modo específico de acción, pueden tener efectos desconocidos en otros organismos para los cuales no fueron diseñados (Daughton, 2004). Por otra parte, se encuentran los disruptores endocrinos, que son sustancias o mezclas de

substancias exógenas capaces de alterar la estructura o función del sistema endocrino al mimetizar o antagonizar las funciones hormonales en el organismo. Estos últimos se clasifican en función del efecto biológico generado en los organismos, así como por su mecanismo de acción. Los dos grupos pueden intersectarse en cierto grado ya que algunos fármacos y productos de cuidado personal son disruptores endocrinos y viceversa (Petrovic *et al.*, 2004; Aga, 2008; Durán, 2009).

Como se mencionó anteriormente, dichos compuestos están presentes en el ambiente desde que el hombre comenzó a utilizarlos como productos de uso común; sin embargo, durante los últimos años se han identificado numerosos compuestos de este tipo en cuerpos de agua considerados como no contaminados. Los primeros en ser detectados fueron los productos farmacéuticos, destacando los antibióticos y antiinflamatorios, seguidos por los fármacos de uso psiquiátrico, antisépticos, reguladores lipídicos y medios de contraste para rayos X. La detección y determinación de estos compuestos polares y de muchos otros, antes difícilmente analizables, se debe principalmente al desarrollo de las técnicas analíticas acopladas, como cromatografía de gases-espectrometría de masas y cromatografía de líquidos-espectrometría de masas, que son sumamente sensibles y permiten alcanzar límites de detección en el orden de trazas ($\mu\text{g/L}$ o menores) (Barceló, 2003; Boyd, 2006).

A continuación se explican las razones por las que el grupo de los fármacos son contaminantes que deben de ser tomados en consideración en estudios de contaminación e impacto ambiental en sistemas acuáticos afectados.

II.2. Fármacos

El alto consumo de fármacos alrededor del mundo, su parcial metabolismo después de la ingesta y el vertido continuo al sistema de drenaje hacen que la presencia de estos compuestos en el ambiente acuático sea inevitable. Por ello, este grupo de contaminantes emergentes está adquiriendo cada vez mayor relevancia y atrayendo el interés de los científicos en todo el mundo (Daughton, 2004). Los primeros esfuerzos se han enfocado a comprender e identificar las vías de introducción y el destino de los fármacos en los sistemas acuáticos, su transformación y degradación en el ambiente y los potenciales efectos sobre la salud humana y los organismos acuáticos (Daughton y Ternes, 1999; US EPA, 2010). La razón por la que los fármacos son de particular interés, es porque han sido desarrollados con la intención de provocar un efecto biológico específico en el organismo y tejidos vivos; a su vez, los efectos secundarios que a menudo pasan desapercibidos tras su uso en personas y animales, podrían ser de enorme importancia en organismos inferiores, por ejemplo integrantes de los reinos Monera y Protista. Por otro lado, la presencia simultánea de numerosos principios activos farmacológicos que presentan diferentes modos de acción, podría causar efectos significativos debido a fenómenos de sinergismo. La continua introducción en el mercado de nuevas fórmulas farmacéuticas aumenta el espectro de componentes activos, cuya actividad biológica en el ambiente es, hoy en día, desconocida (Santos, 2006).

Dentro de las sustancias farmacológicamente activas, pueden considerarse como más representativos los siguientes grupos terapéuticos:

Antiinflamatorios y analgésicos. Se emplean fundamentalmente para combatir el dolor. La mayor parte de estos fármacos tienen propiedades analgésicas y antipiréticas. Su forma de acción es inhibiendo la síntesis de compuestos involucrados en la respuesta inflamatoria. Dentro de este grupo los compuestos más

empleados son el paracetamol, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno y diclofenaco.

Antidepresivos. Los más frecuentes son las benzodiazepinas, fármacos que aumentan la actividad de algunos neurotransmisores inhibidores, reduciendo así el funcionamiento de ciertas áreas del cerebro. Producen somnolencia, descenso en la ansiedad y relajación de los músculos.

Antiepilépticos. El más común es la carbamazepina, la cual evita el cúmulo excesivo, rápido y repetitivo de impulsos eléctricos entre células nerviosas, manteniendo normal la actividad cerebral.

Antineoplásicos. Son fármacos empleados para el tratamiento del cáncer, entre los que se encuentran el bisulfán, ciclofosfamidias, etc.

Antilipemiantes. Se aplican fundamentalmente para bajar los niveles de colesterol en sangre en personas con arterioesclerosis. Los fármacos más frecuentes son fibratos (derivados del ácido fíbrico) y estatinas. Los fibratos reducen los niveles de triglicéridos y aumentan los niveles de HDL, mientras que las estatinas son más efectivas sobre el LDL.

Betabloqueantes. Bloquean los receptores beta que existen en el corazón, consiguiendo disminuir la necesidad de oxígeno de este órgano, reducir el ritmo cardíaco, disminuir la fuerza de contracción del corazón y reducir la contracción de los vasos sanguíneos. Están indicados para combatir la hipertensión arterial, angina de pecho, arritmias cardíacas, etc. Los más utilizados son el atenolol, propranolol y metoprolol.

Antiulcerosos y antihistamínicos. Se emplean contra la acidez de estómago, úlceras y otras alteraciones estomacales. Son bloqueadores de receptores H1 y H2 de la histamina. Estos receptores se encuentran en unas células que recubren el estómago, cuando la histamina se une a ellos, las células producen ácido. Los fármacos (como ranitidina, famotidina) reducen la unión de la histamina a estos receptores, por lo que la producción de ácido disminuye.

Antibióticos. Se emplean contra las infecciones bacterianas, entre los antibióticos más importantes se encuentran las sulfonamidias, fluoroquinolonas, cloranfenicol, tilosina y trimetoprim.

Otras sustancias. Se pueden incluir aquí compuestos que alteran la mente sin una necesidad médica y que con frecuencia son objeto de abuso como por ejemplo el alcohol, marihuana, cocaína, barbitúricos, metadona, heroína y otros narcóticos, anfetaminas, LSD (dietilamina del ácido lisérgico) y la PCP (fenilciclidina) (Remington, 2000; Cortacans *et al.*, 2005; Rodríguez, 2005).

Las sustancias farmacéuticas activas llegan al ambiente a través de varias rutas, como son:

- a) Excreción por animales y seres humanos. La mayoría de los medicamentos consumidos pueden ser excretados sin ningún cambio, en forma de conjugados de glucoronidos o sulfatos o como una mezcla de muchos metabolitos. En general, los fármacos son metabolizados en el organismo por diversos mecanismos (oxidación, reducción, hidrólisis, conjugaciones, etc.) y luego excretados en forma de derivados más polares y solubles en agua, que presentan una actividad farmacológica

reducida respecto al compuesto original (Daughton, 2004; Aga, 2008; Durán, 2009). En la tabla II-2 se muestran algunos ejemplos de fármacos encontrados en el ambiente, indicando los porcentajes del compuesto original y sus conjugados hidrolizables excretados por la orina y heces fecales, así como los metabolitos producidos. Los conjugados hidrolizables como los glucoronidos o los sulfatos son de particular importancia debido a que pueden ser parcialmente hidrolizados en el agua, incrementando con ello la cantidad de fármaco inalterado liberado al ambiente (Aga, 2008).

Tabla II-2. Porcentajes de excreción en su forma original y como conjugados hidrolizables para algunos fármacos y los metabolitos producidos (Cortacans *et al.*, 2005)

| Compuesto | Compuesto original | Conjugados hidrolizables | Metabolitos |
|------------------------|--------------------|--------------------------|---|
| Ibuprofeno | 10% | 5% | 1-hidroxi ibuprofeno 2-hidroxi ibuprofeno 2-carboxi ibuprofeno 2-hidroximetil ibuprofeno acil glucoronido |
| Diclofenaco | 22% | 15% | 3-hidroxi diclofenaco 4-hidroxi diclofenaco 5-hidroxi diclofenaco diclofenaco-O-glucoronido |
| Naproxeno | 10% | 60% | O-desmetil naproxeno O-desmetil naproxeno glucoronido acil glucoronido |
| Ácido acetilsalicílico | 8% | 85% | ácido salicílico ácido salicilúrico ácido gentísico ácido glucoronido |
| Ketoprofeno | 10% | 70% | ácido (3-hidroxil carboximetil) hidratópico acil glucoronido |
| Trimetoprina | 43% | 2% | α -hidroxi trimetoprim |
| Sulfametoxazol | 30% | 1% | N ₄ -acetil sulfametoxazol |
| Acetaminofen | 3% | 93% | acetofenitidina |

- b) Inadecuada disposición de los fármacos caducos y derrames accidentales. El primero se refiere a la eliminación directa por el sistema de drenaje, utilizada para evitar el almacenamiento indefinido o como método “seguro” para evitar la ingestión accidental de medicamentos caducos (Daughton, 2004; Aga, 2008; Durán, 2009).
- c) Aguas residuales. Una vez que los medicamentos se desechan o se excretan (junto con sus metabolitos) acaban en las aguas residuales que llegan a las depuradoras para ser tratadas. Como su eliminación en las plantas depuradoras no está garantizada, una buena parte de estas

substancias sale inalterada en los efluentes y es finalmente vertida en los cuerpos de agua superficial o enviada a los sistemas de distribución de agua tratada (Cortacans *et al.*, 2005).

El destino de estos principios activos en las estaciones depuradoras de aguas residuales puede resumirse en lo siguiente (Miao *et al.*, 2004; Cortacans *et al.*, 2005):

- Eliminación por microorganismos presentes en los procesos de depuración. Es el caso de los fármacos fácilmente biodegradables, como el ácido acetilsalicílico.
- Absorción en lodos generados durante el proceso de depuración. Los fármacos que presentan persistencia y que además tienen características lipofílicas quedan retenidos en los lodos, ya sea debido a su carácter lipofílico o a la presencia de grupos funcionales (carboxílicos, aminas, aldehídos, etc.) que por su naturaleza tienen la capacidad de formar enlaces con las partículas del sólido, dependiendo del pH y de otros constituyentes de la matriz. A su vez, aquellos fármacos que presentan mayor movilidad en el sólido, pueden incorporarse a las aguas subterráneas o superficiales a través de procesos de lixiviado.
- Persistencia en los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Los fármacos con estructuras polares pasan a través de los procesos de depuración sin que se produzcan modificaciones importantes en su concentración, llegando directamente al medio acuático.

Como ejemplo de la baja eficacia de las depuradoras para eliminar este tipo de contaminantes, la tabla II-3 muestra el resultado del análisis de diversos fármacos en cinco depuradoras de aguas residuales urbanas en Cataluña.

Tabla II-3. Concentraciones de fármacos detectadas en aguas residuales y efluentes de depuradoras (Petrovic *et al.*, 2004)

| Grupo terapéutico | Compuesto | Entrada EDAR* (ng/L) | Efluente EDAR* (ng/L) |
|---------------------------------|------------------|----------------------|-----------------------|
| Analgésicos y antiinflamatorios | Ketoprofeno | 451 | 318 |
| | Naproxeno | 99 | 108 |
| | Ibuprofeno | 516 | 266 |
| | Diclofenaco | 250 | 215 |
| | Acetaminofen | 10194 | 2102 |
| Antilipemiantes | Ácido clofibrico | 72 | 28 |
| | Gemfibrozil | 155 | 120 |
| | Bezafibrato | 23 | 10 |
| Antiepilépticos | Carbamazepina | 420 | 410 |
| Antiulcerosos | Ranitidina | 188 | 135 |
| Antibióticos | Azitromicina | 152 | 96 |
| | Sulfametoxazol | 590 | 390 |
| | Trimetoprim | 1172 | 290 |
| β -bloqueantes | Atenolol | 400 | 395 |
| | Sotalol | 185 | 167 |
| | Propranolol | 290 | 168 |

*EDAR: estaciones depuradoras de aguas residuales

II.3. Presencia de fármacos en el ambiente

El primer estudio acerca de la presencia de fármacos en el ambiente fue publicado en 1977 por Hignite *et al.*, seguido en 1985 por un reporte de Richardson *et al.* En estos trabajos se investigó la ocurrencia y destino de estas sustancias en ambientes acuáticos. Sin embargo, este problema no captó la atención de los científicos sino hasta la década pasada, cuando fueron presentadas revisiones bibliográficas publicadas por Halling-Sorenson *et al.* (1998), Daughton *et al.* (1999), Roembke *et al.* (1996), Ternes *et al.* (1999) y Velagaleti (1998), entre otros. En estas publicaciones se pone de manifiesto la magnitud del problema en tres aspectos importantes: el potencial de dichas sustancias para permanecer en el ambiente, el desconocimiento de los efectos fisiológicos en los organismos acuáticos y el desconocimiento de las concentraciones reales de cada uno de los numerosos fármacos que son utilizados y por ende excretados a los cuerpos de agua (Heberer, 2002a; Daughton, 2004).

Posteriormente, la presencia de varios fármacos fue confirmada en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales de Holanda, Brasil, Suiza, Reino Unido, Estados Unidos, Francia, Suecia, Grecia, Canadá, España y Australia. Estos estudios demostraron la capacidad limitada que tienen las plantas de depuración para eliminar los residuos farmacológicos en su totalidad, por lo que acaban migrando hacia los ríos, lagos, mares, acuíferos y al final, aunque en cantidades muy pequeñas, terminan en los grifos. En la tabla II-4 se muestran, a manera de ejemplo, las concentraciones reportadas para algunos compuestos

farmacéuticos desde la entrada a las plantas depuradoras hasta el agua para consumo humano (Richardson y Bowron, 1985; Ternes *et al.*, 1999; Heberer, 2002b; Quintanay Reemtsma, 2004; Aga, 2008).

Tabla II-4. Concentración de algunos fármacos en aguas residuales (influentes y efluentes de plantas depuradoras), superficiales y subterráneas y en agua para consumo humano (Aga, 2008)

| Compuesto | Influyente (µg/L) | Efluente* (µg/L) | Agua superficial* (µg/L) | Agua subterránea (µg/L) | Agua potable* (µg/L) |
|----------------|----------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Acetaminofen | 0.13-26.09 | nd-5.99 | nd-0.25 | 0.015 | 0.0081-0.0653 |
| Aspirina | | | 0.037 | | |
| Carbamazepina | 2.1 | 0.75 | 0.5 | 0.071 | 0.043-0.09 |
| Diclofenaco | 0.16 | 0.12 | 0.12 | 0.05 | |
| Eritromicina | 0.71-0.141 | 0.145-0.29 | nd-0.07 | 0.075 | |
| Ibuprofeno | 3.59 | 0.15 | 0.22 | 0.129 | 0.009 |
| Indometacina | 0.151 | 0.091 | 0.066 | | |
| Naproxeno | 3.65 | 0.25 | 0.25 | | |
| Sulfametoxazol | 0.52 | 0.13 | nd-0.12 | 0.012 | nd-0.0592 |

*nd: no detectado

Se calcula, como promedio, que en el agua residual se hallan más de 20 clases distintas de fármacos según el país y el consumo. La presencia de un determinado fármaco en el ambiente depende de diversos factores como: la cantidad manufacturada, la cantidad ingerida por los pacientes y la frecuencia de la dosis, la eficiencia de excreción del compuesto original y sus metabolitos, la propensión de estas sustancias a adsorberse en los sólidos suspendidos del agua residual y las transformaciones metabólicas sufridas en los sistemas de tratamiento de agua residual (Daughton y Ternes, 1999; Ternes *et al.*, 1999; Cortacans *et al.*, 2005).

Por ejemplo, en España, un trabajo del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) fue el primero que dio la alerta en 2005. En él se rastrearon los residuos farmacológicos en aguas del río Ebro y se detectaron: ibuprofeno (60 ng/L), acetaminofen (42 ng/L), gemfibrozil (46 ng/L), carbamazepina (30 ng/L) y atenolol (72 ng/L) (Richardson y Bowron, 1985; Bendz *et al.*, 2005).

En el caso de la Ciudad de México, Siemens *et al.* (2008) hicieron una estimación de las cantidades de fármacos introducidas al Valle de Tula a través del agua residual utilizada para riego, con base en las ventas registradas y el flujo de aguas negras dirigido a esa zona. Los autores encontraron que el consumo de fármacos en la Ciudad de México (4 gramos *per cápita* al año) es comparable con el consumo en los países de la Unión Europea (entre 4 y 6 gramos *per cápita* al año). Las concentraciones de 11 fármacos, antibióticos y antiinflamatorios, introducidas al ambiente por medio del agua residual fueron calculadas en cerca de 1 µg/L, valor que resulta ser el límite para el requerimiento de una evaluación de riesgo ambiental en Estados Unidos.

II.4. Consumo de fármacos en México

En México el consumo de fármacos es promovido por dos vías, la prescripción médica y la automedicación. De éstas, la automedicación presenta un problema más complejo ya que entran en **juego** aspectos atribuibles a la población como **la educación** médica, la **cultura**, los usos y costumbres, etc., que de alguna manera son influenciados por la amplia difusión en medios publicitarios, ocasionando el uso irracional de los medicamentos. Sin embargo, habría que considerar la automedicación en el ámbito de los países en **desarrollo**, como lo es México, ya que el bajo nivel de escolaridad y las malas condiciones de trabajo y de vida de una gran parte de la población se traducen en fuente de constantes malestares físicos, lo que aunado con las malas prácticas médicas incrementan el problema.

Se conocen pocos estudios formales sobre automedicación, entre ellos el de Knapp en Ohio (1992), en el que se encontró que en Estados Unidos las farmacias tradicionales y de descuento constituyen la principal fuente proveedora de medicamentos sin prescripción y que cada familia demostró tener remedios caseros a la mano en su botiquín tradicional. En México, Ortega encontró que personas con un nivel socioeconómico medio-alto almacenan medicamentos tales como antimicrobianos, analgésicos y psicofármacos, y que el 83% los utiliza para curar en otras personas cuadros clínicos similares a los propios. El estudio menciona que el porcentaje de personas que se auto recetan es del 88%.

Un estudio sobre automedicación realizado en una población de Cuernavaca reporta que el 80.3% de la población ha consumido medicamentos, destacando que, de todos los que consumieron medicamentos, el 64.9% correspondió al sexo femenino y el 53.3% de los consumidores lo hizo mediante automedicación. Esto indica que más de la mitad de las personas que consumen medicamentos lo realiza por recomendación de algún familiar, farmacéutico, amigo, etc., mientras que sólo el 46.7% lo hizo bajo prescripción médica. Por grupo de edad, existen datos que indican que la mayor frecuencia de automedicación se dio en **niños** menores de un año con un 91.3%, seguido en frecuencia por la población de cinco a 24 años. Estos datos llaman la atención sobre los riesgos que corre esta población, sobre todo la de niños menores de un año, quienes son los más expuestos a enfermar gravemente (Angeles-Chimipal *et al.*, 1992).

En lo que se refiere a los sitios de obtención de los medicamentos el lugar más frecuente fue la farmacia, siguiéndole la institución médica. Por otro lado, entre los medicamentos más consumidos por la población a que se refiere el estudio, sobresalieron los antibióticos, seguidos por los medicamentos para el dolor (tabla II-5). Los antibióticos representan una de cada seis compras de medicamentos. El 40% de los antibióticos se compran sin prescripción médica en farmacias privadas, en donde se encontró que no existe casi ninguna restricción para la venta de cualquier medicamento, siendo fácil obtenerlos sin importar en ocasiones la edad del comprador ni la presentación de una receta médica (Canifarma, 2010).

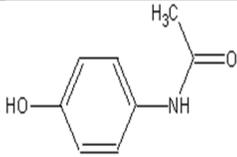
Tabla II-5. Consumo de fármacos en Cuernavaca (Angeles-Chimipal *et al.*, 1992)

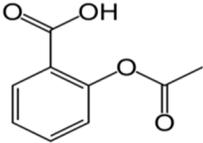
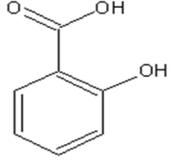
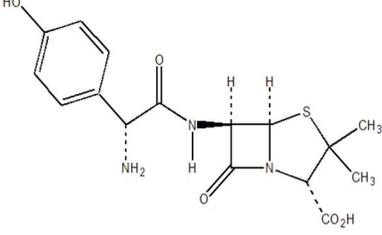
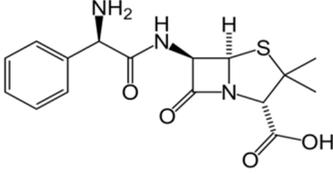
| Grupo | Porcentaje (%) |
|-------------------|----------------|
| Antibióticos | 21.59 |
| Analgésicos | 15.30 |
| Antigripales | 11.51 |
| Antitusígenos | 4.39 |
| Vitaminas | 4.15 |
| Broncodilatadores | 3.68 |
| Antiparásitos | 3.44 |
| Antiácidos | 2.73 |
| Antihipertensivos | 2.61 |
| Antiinflamatorios | 2.61 |
| Otros (27 grupos) | 27.99 |
| Total | 100 |

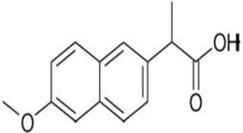
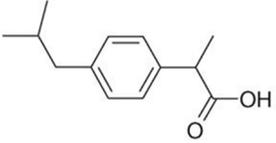
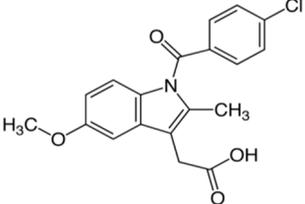
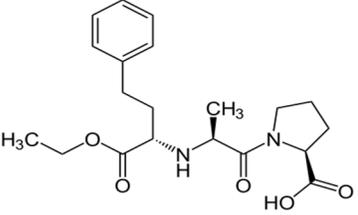
II.4.1. Fármacos de interés

Como se mencionó en el apartado anterior, los medicamentos más consumidos son los antibióticos seguidos por los medicamentos para el dolor. Con base en esta información y debido a que en México el patrón de consumo es bastante estable (Siemens *et al.*, 2008), se seleccionaron varios fármacos ácidos para el desarrollo de este proyecto; sin embargo, durante el curso de las investigaciones, algunos de ellos fueron finalmente descartados. En la tabla II-6 se reportan algunas características fisicoquímicas de todos estos fármacos, así como datos respecto a su presencia en algunas matrices acuosas.

Tabla II-6. Fármacos de interés. Concentración expresada en $\mu\text{g/L}$

| Fármaco | Concentración en influentes de plantas de tratamiento de aguas residuales | Concentración en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales | Concentración en aguas superficiales | Referencia |
|---|---|--|--------------------------------------|---------------------------|
|  <p>Acetaminofen p.f. 169-170.5°C, pka: 9.51 Solubilidad: 1 g en 70 mL de agua, en 10 mL de alcohol, en 50 mL de CH_2Cl_2 y en 40 mL de glicerina.</p> | 0.13-26.09 | *nd-5.99 | *nd-0.25 | Gros <i>et al.</i> , 2006 |

| | | | | |
|--|-------|-------|-----------|---------------------------|
|  <p>Ácido acetilsalicílico p.f. 135°C, pka: 3.49 Solubilidad: 1 g en 300 mL de agua, en 5 mL de alcohol, en 17 mL de CH₂Cl₂ y de 10 a 15 mL de éter.</p> | ----- | ----- | *nd-0.037 | Quintana y Reemtsma, 2004 |
|  <p>Ácido salicílico p.f. 159°C, pka: 4.19</p> | 1.098 | 0.861 | 0.092 | Quintana y Reemtsma, 2004 |
|  <p>Amoxicilina p.f. 37°C, pka: 2.8, 7.2 Solubilidad: 1 g en 370 mL de agua o 2000 mL de alcohol.</p> | ----- | ----- | ----- | ----- |
|  <p>Ampicilina p.f. 159-163°C, pka: 2.62 Solubilidad: 1 g en 90 mL de agua, en 250 mL de alcohol, prácticamente insoluble en éter y cloroformo.</p> | ----- | ----- | ----- | ----- |

| | | | | |
|--|-------|-------|-------------|----------------------------------|
|  <p>Naproxeno p.f. 155°C, pka: 4.15 Solubilidad: prácticamente insoluble en agua a pH<4; soluble en agua a pH>6, escasamente soluble en alcohol.</p> | 3.65 | 0.25 | 0.25 | Bendz <i>et al.</i> , 2005 |
|  <p>Ibuprofeno p.f. 75 – 77°C, pka: 5.2 Solubilidad: soluble en alcohol, dimetil sulfoxido, cloroformo, acetona.</p> | 3.59 | 0.15 | 0.22 | Bendz <i>et al.</i> , 2005 |
|  <p>Indometacina p.f. 75 – 77°C, pka: 4.5 Solubilidad: prácticamente insoluble en agua poco soluble en alcohol.</p> | 0.151 | 0.091 | 0.066 | Bendz <i>et al.</i> , 2005 |
|  <p>Enalapril, maleato de: p.f. 143°C, pka: 3 Solubilidad: muy soluble en agua, soluble en etanol, muy soluble en metanol.</p> | ----- | ----- | 0.0005 max. | Castiglioni <i>et al.</i> , 2004 |

II.5. Métodos de análisis

La cuantificación y análisis de fármacos en muestras ambientales representa todo un reto debido, en primera instancia, a la baja concentración en que dichos contaminantes se hayan presentes en las muestras ambientales y, por otro lado, a la complejidad de las matrices en que estos compuestos se encuentran inmersos. Estas matrices contienen frecuentemente altas concentraciones de materia orgánica, la cual está constituida por una gran variedad de compuestos orgánicos, principalmente carbohidratos, proteínas y lípidos, que actúan como interferentes durante la separación y análisis de los contaminantes emergentes. Gracias al desarrollo de nuevas estrategias analíticas ha sido posible detectar compuestos farmacéuticos presentes en el ambiente a niveles traza. La importancia de desarrollar y validar métodos analíticos para aislar y analizar compuestos farmacéuticos en diversas matrices ambientales ha sido reconocida como pieza clave para proveer, en una etapa inicial, un panorama general de las fuentes, persistencia y destinos de las sustancias farmacológicamente activas, para después profundizar en cómo están afectando estos compuestos a la flora y fauna del cauce (Barceló, 2003; Gros *et al.*, 2006).

II.5.1. Pretratamiento de la muestra

En el desarrollo de un método analítico existen numerosos pasos antes de llegar a resultados útiles, sin embargo, el proceso más lento y lleno de imprecisiones suele ser el de la preparación de muestra. Dicho tratamiento resulta a veces tedioso e implica diversas operaciones como secado, tamizado, filtración, purificación, evaporación y reconstitución antes de llegar a la determinación cromatográfica final. El principal objetivo del tratamiento previo de las muestras es el de conseguir un extracto con analitos concentrados y libres de interferentes con el fin de satisfacer los requerimientos en cuanto a límites de detección y cuantificación (Berrueta, 1998).

El tratamiento al que son sometidas las muestras para su posterior determinación cromatográfica difiere en función de la naturaleza de la muestra, aunque frecuentemente se tienen etapas comunes. En la tabla II-7 se presentan algunos métodos que se han utilizado para la extracción y purificación de fármacos a partir de diversas matrices ambientales.

Tabla II-7 Procedimientos de extracción de fármacos empleados en muestras ambientales.
(Santos, 2006)

| Compuesto | Matriz | Procedimiento de extracción* |
|---|-------------------|--|
| Ácido salicílico Trimetoprim | Agua de arroyo | EFS con Oasis HLB/MCX |
| Fluoxetina β-bloqueantes Antilipémicos Antiinflamatorios Estrógenos | Aguas residuales | EFS con Oasis HLB/MCX MEFS con fibras PDMS-DVB, Carbowax- DVB |
| Aspirina Ácido clorfibrico Ibuprofeno Triclosán | Aguas residuales | ELL (diclorometano) |
| Antibióticos | Aguas residuales | Liofilización |
| Antiinflamatorios Antilipémicos Antibióticos Carbamazepina | Suelo | EAS (AcCN:H ₂ O) |
| Antiinflamatorios Antilipémicos Antibióticos | Sedimentos de río | Ultrasonido (Acetona, AcOEt, MeOH) + limpieza por EFS |
| Antiinflamatorios Antilipémicos | Lodos EDAR | Ultrasonido (Acetona, MeOH) + limpieza por EFS |

* EFS: extracción en fase sólida; MEFS: microextracción en fase sólida; ELL: extracción líquido-líquido; EAS: extracción acelerada con disolventes; AcCN: acetonitrilo; MeOH: metanol; AcOEt: acetato de etilo, EDAR: estación depuradora de aguas residuales.

La selección del método y condiciones para la preparación de la muestra depende de varios factores, entre los más importantes se encuentran:

- Propiedades físicas y químicas del analito como: estructura química, peso molecular, solubilidad, propiedades ácido-base (pKa) y respuesta frente al detector seleccionado. El conocimiento de estas propiedades es de gran ayuda para el diseño de una preparación de muestra apropiada.
- Concentración del analito en la muestra. Este factor es muy importante ya que para analitos que se encuentran en la muestra a altas concentraciones, generalmente sólo se requiere de operaciones sencillas para la preparación de muestra como solubilización y filtración. Por el contrario, para analitos que se encuentran en bajas concentraciones se requiere de procesos más elaborados como extracción líquido-líquido, extracción con fluidos supercríticos, extracción en fase sólida, etc., para lograr que su concentración alcance un nivel detectable y/o cuantificable.

-
- Naturaleza de la matriz de la muestra. La remoción de algunos componentes de la matriz puede ser un paso indispensable en la preparación de muestra cuando el analito se detecta con dificultad o no se detecta debido a impurezas que interfieren con la señal que genera (por ejemplo pico cromatográfico), o bien, cuando algunas sustancias presentes pudieran dañar los instrumentos analíticos o alguno de sus componentes.
 - Forma en que se presenta el analito en la muestra. Se refiere a si el analito está simplemente disuelto o disperso en la matriz o presenta alguna interacción o afinidad particular por la matriz o sus componentes, como ocurre a menudo en el caso de muestras biológicas (Snyder y Kirkland, 1989).

II.5.2. Muestras acuosas

Previo a la extracción de los analitos de la muestra, ésta es filtrada, generalmente con una membrana de poro muy fino para eliminar la materia sólida que puede provocar problemas durante el proceso de extracción. En muestras complejas como las aguas residuales que pueden contener microorganismos, la etapa de filtración también puede ayudar a eliminar dichos microorganismos contribuyendo a la conservación de la muestra. Con el fin de preservar las muestras, éstas son generalmente conservadas a 4°C hasta el momento de su análisis (Santos, 2006).

Una de las técnicas de preparación de muestra más utilizadas para el análisis de contaminantes en matrices acuosas es la extracción en fase sólida (EFS), la cual ha reemplazado a la tradicional extracción líquido-líquido y se ha convertido en la técnica de elección debido a que es más simple, segura y genera menos residuos tóxicos (Pichon, 2000; Aga, 2008;). Sin embargo existen en la literatura algunas metodologías analíticas que emplean técnicas como liofilización (Hirsch *et al.*, 1998), extracción líquido-líquido (Soliman *et al.*, 2004) o microextracción en fase sólida (Moeder *et al.*, 2000).

II.5.2.1. Extracción líquido-líquido (ELL)

Este método de separación se basa en la distinta distribución de los componentes de la muestra entre dos disolventes inmiscibles, uno de los cuales puede ser la propia muestra, de modo que los interferentes de matriz y los analitos de interés pueden separarse si presentan diferente solubilidad en las dos fases líquidas. El proceso está regido por la ley de distribución de Nernst, la cual establece que un soluto se distribuye entre dos fases líquidas inmiscibles de manera que, en el equilibrio, el cociente de concentraciones del soluto en las dos fases es una constante a una temperatura dada. La ecuación correspondiente para un soluto S que se distribuye entre dos disolventes 1 y 2 se expresa:

$$K_d = \frac{[S_2]}{[S_1]}$$

donde, K_d es el coeficiente de distribución. Cuando la concentración del soluto en las dos fases es suficientemente pequeña, la relación anterior se denomina constante de distribución y tiene un valor constante a una temperatura determinada, independientemente de la concentración inicial del soluto (Harris, 1999).

La extracción con disolventes o líquido-líquido fue por mucho tiempo el método habitual para purificar y/o concentrar moléculas orgánicas. Su uso y popularidad como método de separación aún se mantiene, quizá porque es un método relativamente sencillo, reproducible y versátil. Sin embargo, esta técnica presenta algunos inconvenientes. El principal de ellos es el empleo de grandes volúmenes de disolventes orgánicos y por ende la evaporación de éstos para concentrar los extractos, lo que añade una etapa más al proceso analítico. Otro problema común en muestras que contienen surfactantes o grasas es la formación de emulsiones que en ocasiones son difíciles de romper (Bahamonde, 2011).

II.5.2.2. Extracción en fase sólida (EFS)

La EFS es en esencia una cromatografía en columna a microescala y por lo tanto el principio de separación se basa en las interacciones débiles (tipo Van der Waals, electrostáticas, iónicas, hidrófobas) entre los componentes de la fase móvil, constituida por la propia muestra, y una fase estacionaria. Estas interacciones determinan la repartición de los solutos entre las dos fases (Berrueta, 1998).

En la versión más expandida comercialmente, la fase estacionaria para la EFS se encuentra empacada en cartuchos de uso único de polipropileno u otro polímero inerte. Los rellenos de los cartuchos de EFS son polímeros tridimensionales que generalmente están constituidos por dos tipos de materiales: sílices o resinas. Las interacciones que se produzcan entre el analito y el relleno del cartucho están condicionadas por el tipo de material de relleno y por los grupos funcionales presentes en su superficie.

Los adsorbentes (relleno) más populares son los basados en sílice debido principalmente a que son rígidos, no excesivamente caros, reproducibles, estables y no presentan problemas de encogimiento o hinchamiento con solventes acuosos u orgánicos. Los rellenos de sílice modificada químicamente contienen grupos funcionales unidos covalentemente a la superficie del soporte por enlaces carbón-silano. El objetivo de modificar la superficie de la sílice es modificar la selectividad o modular su fuerza de interacción (Huetos, 2004).

Los adsorbentes de tipo resina son generalmente copolímeros orgánicos, principalmente de poliestireno-divinilbenceno (PSDV o SDB). Sus características dependen de la naturaleza del monómero que los conforma aunque generalmente son no polares y fuertemente hidrofóbicos. Puede modificarse su polaridad por introducción de grupos funcionales (Harris, 1999).

El procesamiento de las muestras puede realizarse de dos maneras según el objetivo deseado. En el caso de que se desee concentrar y recuperar solutos que se encuentran a bajas concentraciones en la muestra a analizar, ésta se hace pasar por el cartucho bajo condiciones en las cuales los compuestos de interés son retenidos fuertemente en la fase estacionaria, mientras que otros componentes de la muestra no deseados pasan a través del cartucho sin retenerse, o bien son lavados utilizando un disolvente débil. Posteriormente los analitos se eluyen con un volumen pequeño de un disolvente de mayor fuerza. Esta muestra concentrada y limpia puede ya ser empleada para el análisis cromatográfico. El procedimiento descrito es típicamente usado para el enriquecimiento de compuestos que están al nivel de trazas en la muestra original, de modo que puedan ser detectados durante la etapa de análisis.

En un segundo enfoque, las condiciones se ajustan para que los analitos no se retengan en el adsorbente y se recolecten en el efluente del cartucho mientras que los componentes de la matriz de la muestra se adsorben en la fase estacionaria y se desechan con el cartucho. Este procedimiento se emplea cuando los compuestos de interés se encuentran en concentraciones elevadas en la muestra y sólo se requiere eliminar posibles interferentes.

En otra estrategia, la muestra se aplica sin saturar la columna y se fracciona en dos o más porciones eluyendo con una serie de disolventes de fuerza creciente. De esta manera una muestra muy compleja se puede subdividir en distintas fracciones, cada una de las cuales contiene diferentes analitos agrupados por similitud en sus interacciones con las fases (Berrueta, 1998).

Los procedimientos antes descritos corresponden al modo de EFS llamado “fuera de línea”. En el modo “en línea” el dispositivo de EFS es una pequeña precolumna de acero inoxidable la cual se empaca con el adsorbente adecuado según la muestra a tratar. La precolumna se inserta entre dos puertos de una válvula de conmutación colocada entre el inyector y la columna de un cromatógrafo de líquidos. Los compuestos retenidos en la precolumna durante los pasos de carga de muestra y lavado, son posteriormente eluidos directamente hacia la columna analítica para su separación y determinación (Harris, 1999).

A diferencia de los sistemas fuera de línea, donde sólo unos microlitros del eluato final son inyectados al cromatógrafo y analizados, en los sistemas en línea toda la muestra preconcentrada es analizada. Por ello la EFS en línea ha encontrado amplia aplicación en el análisis de trazas pues permite alcanzar límites de detección y cuantificación más bajos. Adicionalmente, la menor manipulación de la muestra conlleva generalmente a mayor precisión y exactitud en los análisis.

La extracción en fase sólida presenta varias ventajas respecto a la extracción líquido-líquido. Es una técnica sencilla y rápida, se puede automatizar y emplea cantidades mucho menores de disolvente orgánico evitando la posterior evaporación de grandes volúmenes de disolvente. Normalmente el volumen de disolvente empleado para la elución cuantitativa del analito suele ser mucho menor que el volumen original de la muestra pudiéndose alcanzar altos factores de preconcentración. No hay formación de emulsiones. Se puede acoplar a otras técnicas de separación y en el caso de utilizar alguna técnica cromatográfica como método último de análisis se alarga la vida útil de las columnas al eliminar componentes de difícil elución (Hennion y Scribe, 1993; Harris, 1999).

II.5.2.3. Microextracción en fase sólida (MEFS)

La microextracción en fase sólida apareció como una variante de la EFS desde los años 1990. Esta técnica se basa en la extracción de los analitos de la muestra mediante una fibra de sílice fundida recubierta de un sorbente, en la mayoría de los casos polimérico. Se emplea principalmente para la extracción de compuestos orgánicos volátiles o semivolátiles. El procedimiento de la MEFS implica dos etapas. Por un lado la etapa de extracción, que puede llevarse a cabo sumergiendo la fibra en el interior de una disolución ya sea directamente o protegida por una membrana, o bien manteniéndola en la fase gaseosa que está en equilibrio con la disolución acuosa en un recipiente cerrado (headspace). La segunda etapa es la desorción que se puede hacer térmicamente (en el inyector de un cromatógrafo de gases), o bien,

utilizando disolventes orgánicos (en un inyector *ad-hoc* acoplado a un cromatógrafo de líquidos) (Castillo, 2008).

La MEFS presenta algunas ventajas frente a técnicas rutinarias como ELL o EFS. En primer lugar puede utilizarse como técnica de muestreo *in situ* integrando extracción y reconcentración en un solo paso, además, la desorción se realiza directamente en el instrumento de análisis (CG o CLAR). Por ello es una técnica bastante sencilla, relativamente barata y se lleva a cabo con una nula utilización de disolventes orgánicos. Su inconveniente principal es que no es una técnica de extracción exhaustiva sino que está basada en equilibrios de reparto de los solutos que involucran en algunas de sus modalidades hasta tres fases (muestra-vapor-fibra o muestra-membrana-fibra), por lo que es necesario un riguroso control de las condiciones experimentales para obtener resultados reproducibles. Otra desventaja que se puede mencionar es que no permite conservar el extracto para otros análisis (Hennion y Scribe, 1993; Castillo, 2008).

II.5.3. Análisis cromatográfico

Los métodos analíticos para determinar contaminantes emergentes en el ambiente varían según el tipo de compuesto, sin embargo, la mayor parte de estos contaminantes son analizados por Cromatografía de Gases (CG) o Cromatografía de Líquidos (CLAR), técnicas cruciales para la determinación de diferentes grupos farmacéuticos presentes en el ambiente. El sistema de detección más eficaz para este tipo de análisis se basa en el acoplamiento de la espectrometría de masas a los métodos cromatográficos, ya sea en su versión simple (EM) o, mejor aún, en su versión tandem (EM-EM) (Barceló, 2003; Castiglioni *et al.*, 2004; Aga, 2008).

El análisis por CG-EM o CG-EM/EM fue el primero en ser empleado para la detección de compuestos farmacéuticos en matrices ambientales debido a su alta sensibilidad, a su capacidad para identificar o corroborar la estructura de los compuestos detectados y también a que muchos laboratorios disponen actualmente de estos equipos. La principal desventaja de la CG para el análisis de contaminantes emergentes es que está limitada a compuestos termoestables y con alta presión de vapor; sin embargo, la mayoría de los principios activos en los productos farmacéuticos son fuertemente polares y no cumplen con dichas características, por lo que es necesario llevar a cabo reacciones de derivatización antes de inyectarlos al CG. Por esta razón, la técnica preferida hoy en día para el análisis de residuos de fármacos es la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas, ya sea con ionización química a presión atmosférica (APCI-EM), ionización por electrospray (ESI-EM) o ionización por termospray (TSI-EM). En estos equipos se han utilizado distintos analizadores como: cuadrupolo, trampa de iones, tiempo de vuelo, o combinaciones de ellos (EM-EM) como el triple cuadrupolo o cuadrupolo-tiempo de vuelo (Aga, 2008; Durán, 2009).

Desafortunadamente estas poderosas herramientas analíticas son sumamente costosas y requieren de personal altamente especializado para su operación. De hecho, aún son pocos los laboratorios en México que cuentan con equipos CLAR-EM. Por ello, se considera poco probable que en el corto plazo pueda convertirse en una técnica de uso común para el monitoreo rutinario de la contaminación de los cuerpos de agua en nuestro país.

La CLAR acoplada a detectores más sencillos, económicos y robustos como el UV podría ser una buena alternativa ya que la gran mayoría de los laboratorios nacionales dedicados al análisis ambiental cuentan con esta instrumentación. No obstante, sus mayores limitaciones en cuanto a selectividad y sensibilidad (comparada con CLAR-EM) deben ser compensadas con un efectivo tratamiento previo de la muestra acuosa antes de su análisis (Hennion y Scribe, 1993).

Debido a la dilución y posible degradación parcial de los fármacos en el ambiente, las concentraciones esperadas en los cuerpos de agua contaminados son sumamente bajas, del orden de las ppb o aún menores (Barceló, 2003; Daughton, 2004; Bendz *et al.*, 2005; Aga, 2008). Adicionalmente, en aguas fuertemente expuestas a la contaminación de origen antropogénico, son de esperarse una gran cantidad y variedad de sustancias en concentraciones mucho más altas que los analitos de interés. Por consiguiente, el tratamiento de las muestras se convierte en un paso indispensable, aún si se emplearan técnicas poderosas como CLAR-EM para el análisis.

En la tabla II-8 se enlistan diversos trabajos publicados sobre la determinación de residuos de fármacos en diversas matrices ambientales acuosas. Los fármacos analizados por estos métodos fueron seleccionados con base en su consumo en el país donde se realizó el estudio, la ocurrencia y persistencia en el ambiente y la cantidad del compuesto original excretada después de la ingesta. Como puede constatarse, la técnica empleada con mayor frecuencia es CLAR-EM, pero en ningún caso se inyecta la muestra directamente al cromatógrafo, sino que previamente se realiza una etapa de pretratamiento por EFS.

Tabla II-8. Métodos para el análisis de fármacos en muestras acuosas ambientales

| Analitos | Matriz | Tratamiento de muestra (EFS): sorbente, ajuste pH, solvente(s) de elución | Método de separación y detección | Recobros (%) | Referencia |
|---|---|--|----------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Fármacos neutros y 2 metabolitos | Agua subterránea Agua residual Agua superficial | C18, pH 7-7.5, MeOH | CLAR ESI-MS/MS | 80 9-97 9-97 | Ternes <i>et al.</i> , 2001 |
| 15 Fármacos y 4 metabolitos | Agua para beber Agua superficial Agua residual | Oasis HLB, MeOH/MTBE (1:9) | CLAR ESI-MS/MS | 90-110 90-110 90-110 | Vanderford <i>et al.</i> , 2003 |
| Fármacos neutros, ácidos y 5 metabolitos | Agua subterránea Agua residual Agua superficial | C18, MeOH | CLAR APCI-MS/MS | 87-117 87-117 87-117 | Zuelke <i>et al.</i> , 2004 |
| 4 fármacos y un metabolito | Agua subterránea Agua residual Agua superficial | SDB-XC, pH 2, MeOH, CH ₂ Cl ₂ /MeOH | CG-MS | 47-88 47-88 47-88 | Boyd <i>et al.</i> , 2006 |
| 11 Fármacos y 2 metabolitos | Agua superficial Agua residual | Strata X, pH 3, MeOH, MeOH (+2% HAcO), MeOH (+2% NH ₃) | CLAR ESI-IT-MS | >60 >60 | Hilton y Thomas, 2003 |
| 31 antimicrobianos | Aguas residuales | (1) Oasis HLB, pH 6, (2) Oasis HLB, pH 3 y Na2EDTA; MeOH | CLAR ESI-MS/MS | 72-99 | Miao <i>et al.</i> , 2004 |
| Carbamazepina y 4 metabolitos | Agua superficial Agua residual | Oasis HLB, pH 7, MeOH | CLAR ESI-MS/MS | 96-103 84-104 | Miao y Metcalfe, 2003 |
| 7 Estrógenos | Agua superficial Agua residual | Acetona | CG-TSI-MS/MS | 41-90 56-82 | Ternes <i>et al.</i> , 1999 |
| 4 medios de contraste para rayos X y 2 posibles metabolitos | Agua superficial Agua residual | ENV + envi-Carb, pH 3.5, MeOH, AcCN/agua (1:1) en sentido inverso de carga | CLAR ESI-MS/MS | 55-100 55-100 | Putschew <i>et al.</i> , 2001 |

II.5.4. CLAR/UV: una alternativa apropiada

La CLAR es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas, la fase móvil y la columna cromatográfica. En esta técnica se trabaja a presión elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas del adsorbente o fase estacionaria, consiguiendo así separaciones eficientes y de gran resolución.

Un pequeño volumen de la muestra a analizar es introducido en la columna y sus componentes migran diferencialmente, dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria y la fase móvil, a medida que avanzan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto y de la composición de las fases estacionaria y móvil (Harris, 1999).

En cromatografía, la naturaleza de la fase estacionaria impone el mecanismo de separación y determina o define la técnica cromatográfica. Las principales técnicas en CLAR son (Valls y Del Castillo, 2002):

- Cromatografía en fase normal: se caracteriza por separar los compuestos con base en su polaridad. Esta técnica utiliza una fase estacionaria polar enlazada a un soporte de sílice y una fase móvil poco polar. Se utiliza para separar compuestos con grupos funcionales polares, poco solubles en agua y solubles en disolventes orgánicos. Los mecanismos de retención están basados en interacciones por puentes de hidrógeno y uniones dipolo-dipolo.
- Cromatografía en fase reversa: es una técnica muy versátil ya que permite separar una gran variedad de compuestos orgánicos. Se usa para separar compuestos que difieren en el tamaño de su área hidrocarbonada o en el número y polaridad de sus grupos funcionales. En particular, es la técnica de elección para separar compuestos orgánicos contenidos en una matriz o muestra acuosa. La fase reversa más común está constituida por cadenas hidrocarbonadas químicamente enlazadas a un soporte de sílice, por lo que es apolar. Dado que las interacciones soluto – fase estacionaria son relativamente débiles (fuerzas de London), el mecanismo realmente responsable de la retención y separación es el efecto hidrofóbico, ya que la fase móvil está constituida por mezclas de agua con un disolvente orgánico polar (metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano).
- Cromatografía de adsorción: el mecanismo de separación se puede explicar a través de dos modelos. Uno fue propuesto por Snyder y se basa en la competición entre el soluto y los componentes de la fase móvil por los grupos activos de la fase estacionaria, que es un adsorbente polar. El segundo mecanismo propuesto por Scott se basa en la formación de una doble capa de disolvente en la superficie del adsorbente, los solutos desplazan moléculas de disolvente de la segunda capa para quedar retenidos. Puesto que los adsorbentes utilizados son polares, los solutos más retenidos son los más polares. Las fases móviles son mezclas de un disolvente poco polar y uno más polar; su fuerza eluyente aumenta a medida que aumenta la proporción del disolvente más polar.
- Cromatografía de exclusión molecular: también conocida como cromatografía por filtración en gel o de permeación en gel. Separa los componentes de la muestra en función de su tamaño. Generalmente se trata de una cromatografía de baja resolución de forma que se suele utilizar en los pasos preliminares del proceso de purificación, para separar analitos pequeños de grandes moléculas presentes en la matriz de la muestra.
- Cromatografía de intercambio iónico: la retención se basa en la atracción eléctrica entre los iones en solución y los grupos funcionales iónicos de carga contraria inmovilizados en la fase

estacionaria. Se usa para la separación de compuestos iónicos o ionizables en muestras acuosas de baja fuerza iónica.

- Cromatografía de afinidad: el sólido que constituye la fase estacionaria tiene enlazado un ligando específico (anticuerpo, proteína o enzima) que interacciona selectivamente con un analito (antígenos, sustrato).

El detector más común en CLAR es el detector de absorción de la luz ultravioleta. Este detector mide el cambio en la intensidad de la luz emitida por una fuente luminosa cuando ésta atraviesa la celda por la que circula el efluente de la columna. El cambio es registrado en unidades de absorbancia y esta magnitud es proporcional a la concentración del soluto absorbente presente en la celda según lo define la ley de Lambert – Beer. El detector es más o menos selectivo ya que sólo los compuestos capaces de absorber la luz a la longitud de onda seleccionada darán una respuesta (Harris, 1999; Valls y del Castillo, 2002).

La mayoría de los instrumentos modernos de CLAR están equipados con un detector UV de longitud de onda variable, o bien con un detector de arreglo de diodos. El primero permite seleccionar la longitud de onda que corresponde a la máxima absorbancia del soluto de interés para optimizar la sensibilidad; alternativamente se puede seleccionar una longitud de onda que permita eliminar o disminuir la respuesta de posibles compuestos interferentes. El detector de arreglo de diodos (UV–DAD) representa un avance tecnológico importante ya que permite obtener la señal generada por el analito presente en la celda a múltiples longitudes de onda simultáneamente, cubriendo toda la región espectral UV. Esta señal es almacenada en la memoria del instrumento y posteriormente puede ser reprocesada para generar cromatogramas de la misma muestra a diferentes longitudes de onda, o bien para obtener espectros de absorción de los analitos que eluyen a diferentes tiempos de retención. Las capacidades del detector UV con arreglo de diodos son de sumo interés en el análisis de muestras complejas ya que ayudan a corroborar la identidad de un pico cromatográfico o a determinar si existe coelución de interferentes en un pico dado (Harris, 1999; Vera-Avila *et al.*, 2001).

El intervalo lineal de los detectores UV es bastante amplio, abarcando varios órdenes de magnitud en unidades de concentración del analito (típicamente 10^3 - 10^4). Su sensibilidad es moderada y depende fuertemente del analito; puede llegar a límites de detección inferiores al nanogramo inyectado en el caso de solutos favorables. Estos detectores son estables, robustos, compatibles con las separaciones en gradiente y poco sensibles a las variaciones en el flujo. Por todo ello, la detección UV es la más utilizada en los análisis por CLAR (Harris, 1999).

II.6. Planteamiento del problema

En México son pocos los estudios realizados acerca de la contaminación del agua por productos farmacéuticos. Una parte de estos estudios se ha dirigido al desarrollo de métodos para la determinación y cuantificación de productos farmacéuticos y de cuidado personal. Entre éstos se pueden mencionar los trabajos de Castillo Alanís (2008), que desarrolló un método por MEFS-CG-EM para la identificación y cuantificación simultánea de triclosan, clorofeno, bisfenol A, naproxeno e ibuprofeno en aguas residuales de las plantas de tratamiento de Cerro de la Estrella, Ciudad Universitaria e Iztapalapa. Bahamonde Soria (2011) desarrolló un método para la cuantificación simultánea de siete sulfas en matrices acuosas por EFS-CLAR/UV; el método fue aplicado en muestras de aguas superficiales provenientes de Parque Ecológico Loreto y Peña Pobre, Parque Nacional Fuentes Brotantes y Chalma. Por otra parte, también se encuentran algunos reportes acerca de la presencia de fármacos en el ambiente como el de Durán Álvarez (2009), que estudió la presencia y distribución de doce contaminantes emergentes en suelos del distrito de riego 03 “Tula” Hidalgo por ASE-EFS-CG/EM, y el de Díaz Torres (2009), quien realizó determinaciones de 10 disruptores endocrinos en la zona lacustre de Xochimilco por CG-EM.

Tomando en cuenta que los estudios sobre contaminantes emergentes en México son escasos e incipientes, este proyecto busca aportar una herramienta sencilla y accesible que permita recabar información acerca de la presencia de algunos compuestos farmacéuticos en cuerpos acuáticos. La eficacia del método desarrollado se evaluó aplicándolo en muestras de agua colectadas en cuatro sitios de la zona lacustre de Xochimilco, una zona impactada por las actividades antropogénicas, donde los analitos de interés son susceptibles de encontrarse presentes en concentraciones traza ($\mu\text{g/L}$ o menores), mientras que muchos otros compuestos orgánicos e inorgánicos se encuentran millones de veces más concentrados.

Los fármacos considerados en este estudio son: ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, naproxeno, ibuprofeno, acetaminofen y enalapril. Todos ellos, además de ser ampliamente utilizados por la población, son compuestos con propiedades ácido-base, muy polares y por ello muy difíciles de extraer a partir de matrices acuosas. Dado que estos compuestos son sensibles a la degradación térmica, la técnica más apropiada para su determinación es la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Sin embargo, el utilizar un equipo convencional CLAR-UV en el análisis, implicó un gran reto para el método de preparación de muestra, pues el detector es poco selectivo y relativamente poco sensible para los compuestos de interés.

III. Objetivos

III.1. Objetivo general

Desarrollar una metodología analítica para la determinación de residuos de fármacos de alto consumo en México en matrices acuosas y aplicarla en el análisis de muestras de agua de los canales de Xochimilco, como un medio simple y accesible para obtener información acerca de la presencia de estos contaminantes emergentes en el sistema lacustre.

III.2. Objetivo específicos

- Desarrollar una metodología analítica simple y robusta para la determinación de un grupo de fármacos de uso común a bajos niveles de concentración (ppb) en matrices acuosas complejas. Los fármacos contemplados son: ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, naproxeno, ibuprofeno, indometacina y enalapril. La metodología estará basada en el uso de la extracción en fase sólida y la cromatografía de líquidos de alta resolución con detección UV, con el objeto de que pueda ser fácilmente implementada en cualquier laboratorio de análisis ambientales.
- Dada la complejidad de la muestra en estudio, desarrollar complementariamente una metodología de pre-purificación por extracción líquido-líquido aprovechando las propiedades ácido-base de los compuestos seleccionados.
- Realizar una validación estadística de la metodología completa desde la etapa de pre-purificación hasta la de separación y análisis.
- Aplicar la metodología para el análisis puntual de muestras de aguas colectadas en canales de Xochimilco, así como en los dos principales afluentes de la planta de tratamiento de aguas residuales que se encuentra en este sitio, con el fin de probar la técnica en un lugar con probable contaminación por PPC's.
- Con el objeto de contar con elementos de análisis y discusión ambiental en relación con el objetivo anterior, estimar algunos descriptores físicos y químicos en las muestras de agua colectadas, relacionados con aspectos de contaminación.

IV. Desarrollo experimental

IV.1. Colecta y almacenamiento de muestras

Con el fin de probar la efectividad de la técnica desarrollada en aguas contaminadas, se colectaron muestras en cuatro sitios del sistema lacustre de Xochimilco. La Delegación Xochimilco se localiza al sur del Distrito Federal entre las coordenadas geográficas extremas $19^{\circ} 19'$ y $19^{\circ} 09'$ de latitud norte y $99^{\circ} 00'$ y $99^{\circ} 09'$ de longitud oeste. Colinda al norte con la Delegación Coyoacán, al noroeste con Iztapalapa y Tláhuac, al sur con Milpa Alta y al oeste con Tlalpan (Ortiz y Ruvalcaba, 2005).

Los sitios seleccionados fueron los dos afluentes principales de la planta de tratamiento de aguas residuales del Cerro de la Estrella (La Draga y San Diego), así como dos canales correspondientes a la zona urbana de Xochimilco (Caltongo y La Candelaria) (Figura IV-1). Estos sitios de muestreo fueron seleccionados con base en la información reportada en un trabajo anterior (Díaz, 2009), en el cual se indica que en ellos se detectó la presencia de ocho disruptores endocrinos de alto consumo.

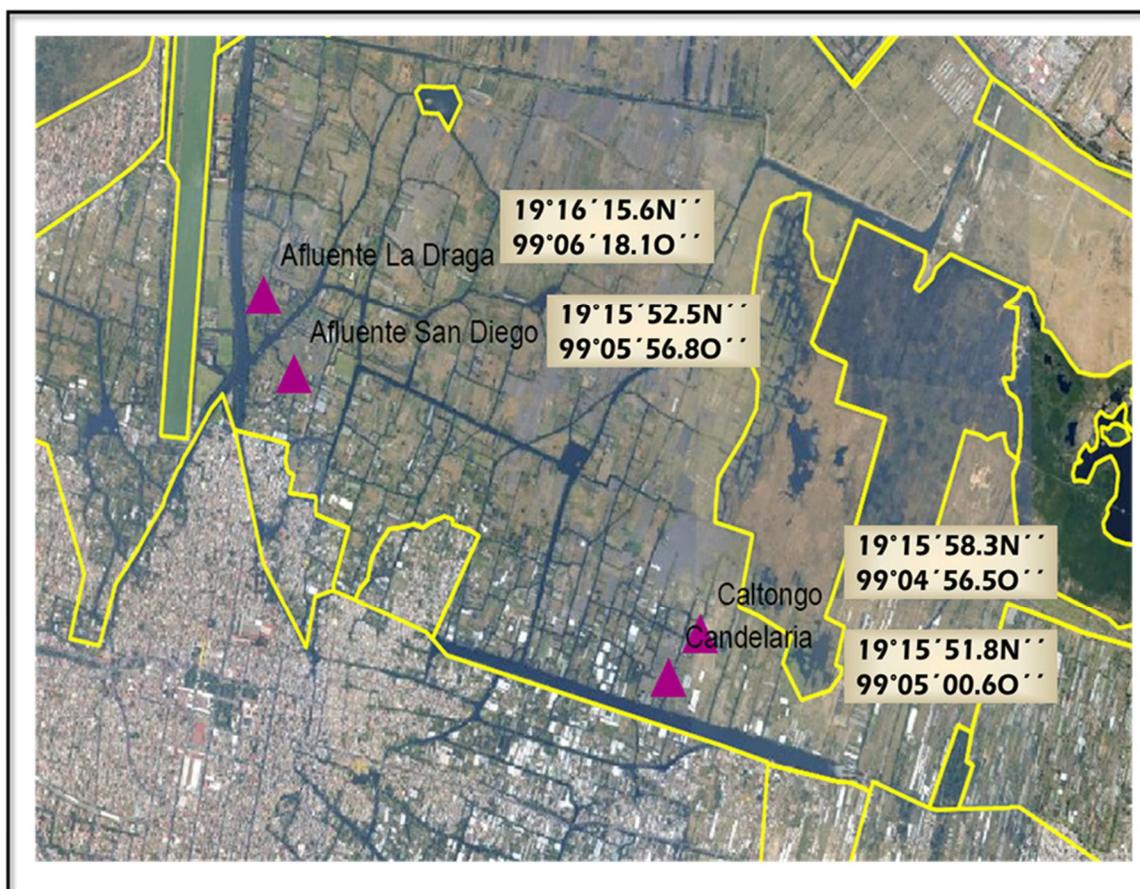


Figura IV-1. Localización geográfica de los puntos de muestreo (tomado de Google Earth).

En los cuatro sitios, la colecta se realizó en época de post-lluvias (octubre), tomando las muestras a dos terceras partes de profundidad con ayuda de una botella muestreadora Uwitec. Se midió *in situ* lo siguiente: profundidad, temperatura, pH, OD, %SO, conductividad (K_{25}), SDT y SS. En el laboratorio se determinó DQO y DBO₅.

La colecta y almacenamiento de muestras se realizó de acuerdo a lo recomendado por APHA (2005):

- Análisis de DBO₅ y sólidos suspendidos: se llenaron tres botellas de plástico de 1.5 L, las cuales se protegieron del sol y se mantuvieron a 4°C hasta su posterior análisis.
- Análisis de DQO: se llenaron tres botellas de plástico de 0.5 L a las cuales se les agregó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado para la preservación de la muestra.
- Análisis de fármacos por la técnica desarrollada: se llenaron tres botellas de vidrio ámbar de 1L a las cuales se les agregó azida de sodio al 0.1% (p/v) con la finalidad de evitar la posible degradación de la muestra. Las muestras se mantuvieron en un contenedor con hielo a una temperatura de 4°C hasta su posterior análisis.

IV.1.1. Determinación de parámetros fisicoquímicos

Los análisis de DQO, DBO₅ y SS se realizaron en un periodo inferior a las 24 h de haber tomado las muestras, en la FES-Iztacala en el Laboratorio de Conservación y Mejoramiento del Ambiente bajo la supervisión de la M. en C. Esperanza Robles. Los análisis para la detección y determinación de fármacos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Cromatografía de Líquidos de la División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.

- a) Sólidos suspendidos. Las muestras homogenizadas se filtraron a través de un filtro estándar de fibra de vidrio de 1.2 μm de tamaño de poro, previamente llevado a peso constante. El residuo retenido en el filtro se secó a temperatura de 103-105°C hasta peso constante. La diferencia corresponde al total de sólidos suspendidos (Rodier, 1990; APHA, 2005).
- b) DBO₅. La determinación se realizó por el método de dilución. Este método consistió en introducir un volumen conocido del agua a analizar en un matraz aforado y llevar a aforo con el agua de dilución*, verificando que el valor de pH se encontrara entre 6-8 y evitando la formación de burbujas. De la misma forma se hace un duplicado, una de las mezclas se analiza inmediatamente para determinar el oxígeno inicial, el duplicado se almacena durante 5 días, manteniéndolo en oscuridad a 20 °C y al término de este tiempo se mide el oxígeno presente. La DBO₅ se calcula a partir de la diferencia entre el oxígeno disuelto inicial y final.

- * El agua de dilución se prepara con agua destilada, añadiendo por cada litro de ésta 1 mL de las siguientes soluciones: cloruro de calcio (25 g/L), cloruro de hierro (1.5 g/L) y buffer de fosfatos (pH 7.2). La solución se mantiene a 20°C, aireándola hasta que la concentración de oxígeno disuelto llegue a un valor de 8 mg/L; durante esta etapa se debe evitar toda posible contaminación por metales, materia orgánica y cualquier sustancia oxidante o reductora (NMX-AA-028-SCFI-2001; APHA, 2005).

-
- c) DQO. La determinación se llevó a cabo por titulación. A un volumen de 50 mL del agua a analizar se le agregó 1 g de sulfato de mercurio cristalizado y 5 mL de solución sulfúrica de sulfato de plata. La muestra se calentó hasta completa dilución de los reactivos adicionados y posteriormente se le añadieron 25 mL de dicromato de potasio 0.25 N y 70 mL de solución sulfúrica de sulfato de plata. La mezcla se llevó a ebullición durante 2 horas, adaptando un refrigerante al matraz, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente, se diluyó a 350 mL con agua destilada y se le añadieron 3 gotas de ferroína. Finalmente se tituló con una disolución estándar de sulfato de hierro y amonio hasta observar el viraje a rojo violáceo (APHA, 2005; NMX-AA-030-SCFI-2001).

En el Anexo II se reporta el Material y Equipo empleado para el desarrollo de la metodología analítica.

IV. 2. Procedimiento y metodología analítica

El trabajo realizado para el establecimiento de la metodología analítica finalmente adoptada puede dividirse en tres etapas:

- 1) Implementación de la separación y detección de los fármacos de interés por CLAR-UV/DAD.

Inicialmente se trabajó con los primeros siete fármacos seleccionados (ampicilina, amoxicilina, enalapril, aspirina, acetaminofen, naproxeno e ibuprofeno), inyectando en el cromatógrafo disoluciones individuales de cada uno para observar su retención en una columna convencional de fase reversa C-18 y determinar la longitud de onda óptima para su detección. Paralelamente se llevaron a cabo estudios de estabilidad de cada compuesto en disolución acuosa, lo cual permitió definir el grupo preliminar de fármacos con los que se pretendía continuar el trabajo (descartando ampicilina y amoxicilina e incluyendo al ácido salicílico). Para este grupo se establecieron condiciones de separación tanto en modo isocrático como por gradiente de elución. Estas condiciones se reajustaron posteriormente ya que el acetaminofen fue finalmente excluido del grupo y se sustituyó con la indometacina.

- 2) Desarrollo del método de preparación de la muestra:
 - a. Pre-purificación de la muestra (extracción líquido-líquido, ELL)
 - b. Preconcentración de los fármacos (extracción en fase sólida, EFS)
 - c. Concentración del extracto

La optimización de condiciones en estos procesos se basó en los porcentajes de recobro obtenidos para cada fármaco. A partir de los ensayos realizados y los resultados obtenidos se definió el grupo final de fármacos que se analizaría durante este proyecto.

- 3) Validación del método analítico

Para el desarrollo y validación de la metodología analítica se utilizaron muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con los analitos a concentraciones ≤ 50 ppb.

IV.2.1. Condiciones cromatográficas para la separación y detección de los fármacos de interés

Primero se optimizaron las condiciones de detección, buscando una longitud de onda en la que todos los fármacos presentaran una buena señal. Para ello, se inyectaron 20 μL de disoluciones individuales de los fármacos a concentración de 10 ppm en el sistema CLAR-UV a tres diferentes longitudes de onda: 215, 230 y 254 nm. En estos ensayos se utilizó una columna de fase reversa Hypersil ODS y se trabajó en condiciones isocráticas con fases móviles acetonitrilo-agua (HClO_4 0.1 M) en diferentes proporciones, dependiendo del fármaco inyectado.

Para poner a punto la separación del conjunto preliminar de fármacos a estudiar, se probaron diferentes columnas de fase reversa (Hypersil ODS, Gemini C-18 y Synergi Fusion) y fases móviles agua-disolvente orgánico (metanol y acetonitrilo) en diferentes proporciones. Así mismo, se realizaron barridos de pH ajustando la porción acuosa de la fase móvil a diferentes valores en el intervalo de 1-6, mediante la adición de ácido perclórico (pH 1-4), buffer formiato (pH 3.5), buffer acetato (pH 4.5) o acetato de amonio (pH 6).

En las condiciones isocráticas que permitieron obtener una buena resolución de la mayoría de los fármacos en un tiempo adecuado, el compuesto más hidrofílico (acetaminofen) eluyó muy cerca del volumen muerto. Por ello, se decidió desarrollar un gradiente de elución que permitiera retener y separar apropiadamente todos los compuestos en la misma corrida. Así mismo, a partir de este punto se decidió incrementar el volumen de inyección a 100 μL para aumentar la sensibilidad del método. Estos ensayos se realizaron utilizando la columna Gemini. Para el diseño del programa de gradiente se partió de las condiciones cromatográficas exploradas anteriormente. La mejor separación se logró utilizando como fase móvil débil una disolución acuosa de ácido trifluoroacético 2×10^{-3} M (Fase A) y como fase móvil fuerte una disolución de ácido trifluoroacético 1×10^{-3} M en acetonitrilo (Fase B).

Una vez optimizada la separación, se inyectó una mezcla estándar de los fármacos de interés a concentración de 0.5 ppm y se realizaron barridos de longitud de onda (en el intervalo de 190 a 360 nm) con el detector UV de diodos a los tiempos de elución de cada pico, con el fin de obtener sus espectros de absorción bajo las condiciones de trabajo establecidas. Esto permitió generar una biblioteca de espectros de absorción de los compuestos puros para, posteriormente, poder compararlos con los espectros de absorción de los picos que eluían al mismo tiempo de retención durante el análisis de las muestras reales y poder determinar, con mayor certeza, la identidad de éstos.

IV.2.2. Estudio de estabilidad de los fármacos

Por las condiciones a las cuales se tenía planeado realizar el tratamiento de las muestras, se decidió llevar a cabo un estudio preliminar de estabilidad de los fármacos de interés en disoluciones acuosas ajustadas a diferentes valores de pH. Para ello se prepararon disoluciones de cada compuesto por separado, a concentración de 10 ppm (Anexo II, pág 103) en los siguientes medios: solución acuosa de HClO_4 a pH 1, solución acuosa de sosa a pH 11, solución acuosa de amoníaco a pH 9. El seguimiento de cada fármaco se llevó a cabo por CLAR, inyectando las disoluciones mencionadas en los tiempos: 0, 30, 60 y 90 minutos, a partir de que fueron preparadas. Posteriormente, debido a algunos problemas detectados durante los experimentos, se dio un seguimiento más amplio a los antibióticos ampicilina y amoxicilina.

IV.2.3. Desarrollo del método de preparación de muestra

IV.2.3.1. Extracción líquido – líquido

Se realizó una pre-purificación de las muestras por extracción líquido-líquido a pH controlado. La muestra (100 mL) se ajustó a pH 9 con buffer amoniacal (0.1 M), se le agregó Na₂SO₄ (0.1 M) y se colocó en un embudo de separación para extraerla primero con diclorometano y luego con hexano, ambos en una relación muestra-disolvente orgánico 10:1. Las fases orgánicas se desecharon y las acuosas que contenían los analitos se recuperaron y acidificaron con ácido trifluoroacético concentrado hasta pH 2. Cada uno de estos pasos se monitoreó para comprobar que no hubiera pérdida de los fármacos.

IV.2.3.2. Preconcentración de los fármacos por extracción en fase sólida

En este trabajo se ensayaron diversos procedimientos de EFS: en línea, en columna y fuera de línea. Inicialmente se intentó llevar a cabo la preconcentración de la muestra en una pequeña precolumna (20 × 2 mm, d.i.) empacada con fase reversa polimérica PLRP-S. La precolumna se activó con metanol y se acondicionó con agua seguida de una disolución acuosa de HClO₄ 0.1 M. Luego se cargó con 5 mL de una mezcla de los fármacos (0.5 ppm) en agua acidificada a pH 1, se lavó con 1 mL de agua y finalmente se acopló a la columna analítica del cromatógrafo de líquidos para su elución y análisis en línea.

Como segunda opción se ensayó la preconcentración directa de los fármacos en columnas analíticas de fase reversa, probando 4 diferentes columnas: Hypersil ODS, Gemini C-18, Synergi Fusion e Hypercarb. Las tres primeras columnas contienen un adsorbente constituido principalmente por cadenas alquílicas de 18 carbonos unidas covalentemente a un soporte de sílice, la cuarta columna contiene un adsorbente de carbón grafitizado. En los cuatro casos, las columnas se cargaron con muestras sintéticas de agua grado reactivo acidificada a pH 2 y fortificada con la mezcla de fármacos y se eluyeron utilizando un gradiente de fase móvil, por lo que fue necesario diseñar gradientes *ad hoc* para estos ensayos.

Posteriormente se decidió realizar la concentración de los fármacos en la modalidad fuera de línea, utilizando en primera instancia y a modo de ensayo a la propia columna Hypercarb como si fuera un cartucho para EFS. La columna se acondicionó, cargó y lavó, luego se eluyó con un pequeño volumen de acetonitrilo puro invirtiendo el sentido de flujo. Dada la alta caída de presión de este tipo de columna, particularmente en medios acuosos, todas las operaciones se realizaron a flujo ≤ 0.7 mL/min.

Habiendo optimizado las condiciones de EFS en la columna Hypercarb, los siguientes experimentos tuvieron por objeto extrapolar dichas condiciones para la preconcentración de los fármacos en cartuchos Supelclean-Envicarb de 1g. Sin embargo, al aplicar el protocolo establecido, se observó que el comportamiento no fue similar al de la columna ya que la elución de los analitos fue muy incompleta y, consecuentemente, los porcentajes de recuperación fueron muy bajos.

Debido a la fuerte retención de los fármacos en los cartuchos que contenían 1 g de adsorbente, se optó por preparar dispositivos de EFS más pequeños, los cuales fueron empacados en el laboratorio con el carbón grafitizado recuperado de uno de los cartuchos comerciales. Los dispositivos fueron dos mini columnas

de acero inoxidable, una pequeña (20 × 2 mm, d.i.) empacada con 20 mg de carbón y otra grande (30 × 4.6 mm, d.i.) empacada con 250 mg del mismo adsorbente.

Tanto con la columna Hypercarb como con los cartuchos y mini columnas, se realizaron numerosas pruebas (aproximadamente 30) con el objeto de optimizar las condiciones experimentales en todas las etapas del proceso de EFS, buscando alcanzar un alto factor de preconcentración y una buena recuperación de los analitos. Las condiciones especificadas en los siguientes párrafos son las que fueron finalmente adoptadas usando como dispositivo de EFS la mini columna empacada con 250 mg de carbón grafitizado.

Acondicionamiento

Por tratarse de muestras acuosas, la EFS se llevó a cabo en el modo de fase reversa. La etapa de activación y acondicionamiento suele realizarse percolando un solvente orgánico polar (MetOH, AcCN, THF, etc.), seguido de un lavado con una disolución acuosa. En este estudio el adsorbente de carbón grafitizado se activó con metanol y acetonitrilo, se lavó con agua para desalojar los disolventes orgánicos y se acondicionó con una disolución acuosa de HClO₄ 0.1 M a un flujo de 2 mL/min. Estas condiciones son adecuadas para los dispositivos empacados con el adsorbente Supelclean-Envicarb, cuyo diámetro de partícula es relativamente grande (40-100 μm), lo que permite operar a velocidades de flujo más o menos altas manteniendo una baja caída de presión.

Carga

La disolución de carga (muestra acuosa dopada con los fármacos) se acidificó con unas gotas de ácido trifluoroacético concentrado, ajustando el pH a 2 para mantener los solutos en su forma molecular. Se preparó una muestra sintética de agua grado reactivo acidificada y fortificada con los fármacos a concentración relativamente alta (enalapril 1.25 ppm, aspirina e ibuprofeno 0.5 ppm, ácido salicílico 0.4 ppm, indometacina 0.3 ppm y naproxeno 0.15 ppm), se cargaron 100 mL en la mini columna a una velocidad de 2 mL/min y se colectó el efluente en fracciones de 10 mL. Cada fracción se analizó por inyección directa en el CLAR para ver si en alguna de ellas se detectaban los fármacos.

Lavado

El lavado se llevó a cabo con 15 mL de agua destilada y desionizada. El interés primordial de esta etapa es eliminar sales provenientes de la muestra que quedan atrapadas en el volumen intersticial del lecho estacionario, así como impurezas débilmente retenidas, sin provocar la desorción y pérdida de los compuestos de interés.

Elución

El objetivo de los ensayos realizados fue encontrar un eluyente capaz de desorber cuantitativamente a los fármacos retenidos en el adsorbente de carbón grafitizado, usando el menor volumen posible. Con este fin se probaron diversos disolventes como THF, AcCN, MeOH y etanoles, tanto solos como mezclados con agua en diferentes combinaciones y proporciones. Así mismo, se ensayaron diferentes condiciones de flujo (0.5-2 mL/min), dirección de elución de la precolumna (en el mismo sentido que la carga y en sentido inverso) y temperatura (50-60°C). La temperatura se controló colocando la mini columna en un calefactor de columnas.

Concentración del eluato

Una vez obtenido el eluato, fue necesario reducir su volumen para concentrar los analitos, y reconstituirlo en un solvente compatible con la fase móvil utilizada al inicio del gradiente en el análisis cromatográfico. Con el fin de evitar la pérdida o degradación de los fármacos, se probaron diversos procedimientos para la evaporación del disolvente (vacío, corriente de nitrógeno, calentamiento en baño maría a diferentes temperaturas). El criterio para definir las condiciones óptimas se basó en el recobro de los analitos y el tiempo requerido para la evaporación del disolvente. La reconstitución del residuo se llevó a cabo aforando a 1 mL con una mezcla Fase A-MeOH 80:20 (v/v), donde Fase A es la fase móvil débil utilizada en la separación cromatográfica (solución acuosa de ácido trifluoroacético 0.002 M).

Montaje experimental

Para llevar a cabo el proceso de EFS fuera de línea, controlando adecuadamente las condiciones experimentales, se utilizó el montaje mostrado en la Figura IV-2. Este montaje está constituido por una bomba isocrática a la que se conectó el dispositivo de EFS finalmente seleccionado (la mini columna de 3 × 4.6 mm, d.i, empacada con 250 mg de carbón grafitizado). Las etapas de acondicionamiento, carga y lavado se llevaron a cabo a temperatura ambiente, desechando el efluente de la mini columna. En la etapa de elución, la mini columna se conectó a la bomba en sentido inverso (respecto a las etapas anteriores) y se colocó en un calefactor de columnas; cuando se alcanzó la temperatura deseada, se envió el eluyente mediante la bomba, colectando el efluente de la mini columna en un recipiente mantenido en agua fría para evitar posibles pérdidas de los fármacos por volatilización.

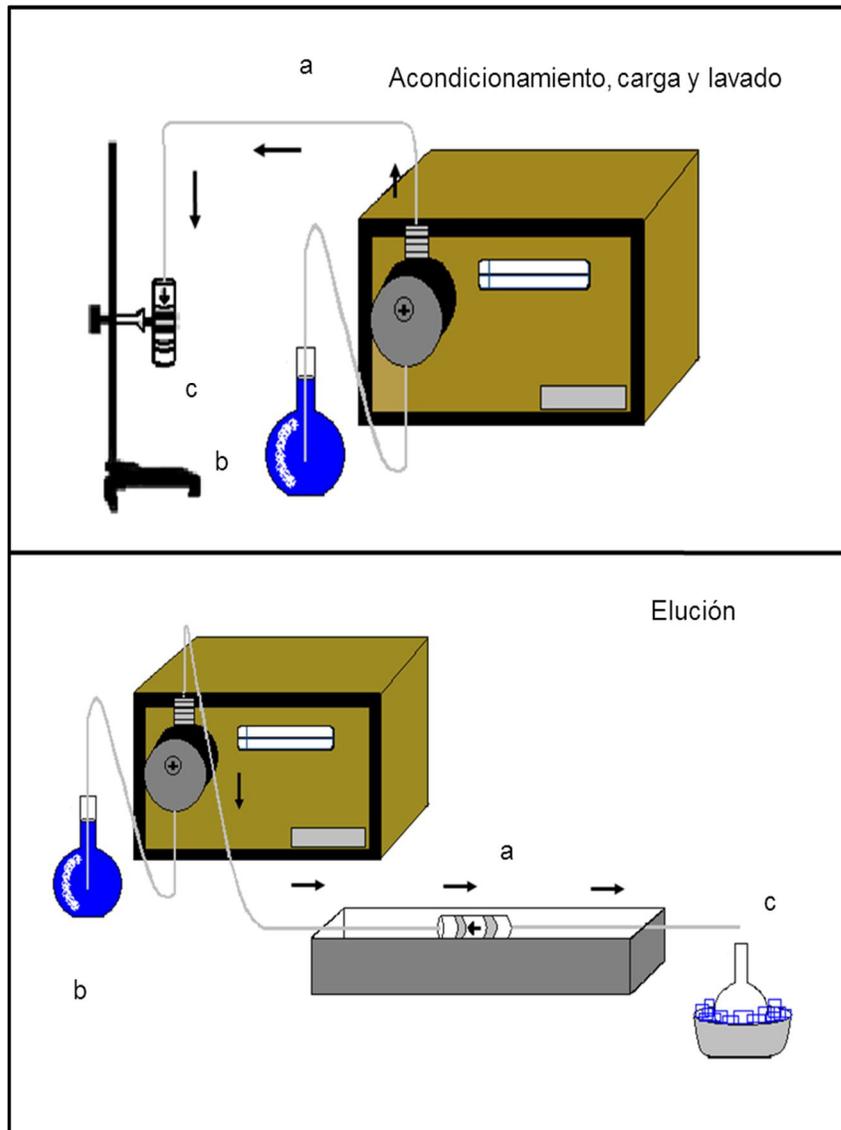


Figura IV-2. Esquema del sistema utilizado en el proceso de EFS fuera de línea en una mini columna empacada con 250 mg de carbón grafitizado no poroso (40-100 μm). (a) Dirección del flujo señalada por las flechas, (b) disolución percolada en las diferentes etapas del proceso, (c) efluentes. Los efluentes de las etapas de acondicionamiento, carga y lavado se desechan mientras que el de la etapa de elución es colectado en un recipiente enfriado. Notar la inversión del sentido de flujo en la mini columna durante la última etapa.

Las condiciones finalmente establecidas para la preconcentración de los fármacos por EFS se resumen en la tabla IV-1.

Tabla IV-1. Condiciones experimentales para la preconcentración de las muestras.

| Operación | Extracción en fase sólida fuera de línea |
|--------------------------|---|
| Acondicionamiento | 15 mL de H ₂ O 15 mL de HClO ₄ 0.1 M Flujo 2 mL/min |
| Carga de muestra | 100 mL de muestra ajustada a pH 2 con ácido trifluoroacético Flujo 2 mL/min |
| Lavado | 15 mL de H ₂ O Flujo 2 mL/min |
| Elución | Inversión del sentido de flujo 6 mL H ₂ O-mezcla orgánica 30:70 (v/v) + 6 mL mezcla orgánica* Temperatura 60°C Flujo 0.5 mL/min |
| Concentración del eluato | Adición de una gota de amoníaco concentrado al eluato. Evaporación al vacío manteniendo el recipiente en baño maría a 40°C |
| Reconstitución | A 1 mL con mezcla Fase A-MeOH 80:20 (v/v)** |

* Mezcla orgánica: AcCN-MeOH 80:20 (v/v) con ácido trifluoroacético 0.1 M.

**Fase A: disolución acuosa de ácido trifluoroacético 0.002 M.

IV.3. Validación del método analítico

Una vez optimizado todo el procedimiento para el tratamiento de la muestra, así como las condiciones cromatográficas para la separación y detección del grupo de fármacos de interés, se realizó la evaluación del método desarrollado. Todos los experimentos de esta sección se llevaron a cabo con muestras sintéticas de agua grado reactivo (100 mL) fortificada con la mezcla de fármacos.

Los eluatos reconstituidos, obtenidos al final del procesamiento de cada muestra, se analizaron por duplicado. La cuantificación de los fármacos se llevó a cabo por estandarización externa utilizando alturas de pico. Para cada muestra, el estándar inyectado como referencia para la cuantificación fue el mismo que se utilizó para dopar la muestra en cuestión. Dado que el volumen de inyección (100 µL) y el volumen de dopaje (100 µL por cada 100 mL de muestra) fueron idénticos, la comparación de alturas de pico en los cromatogramas de muestra y estándar es una medida directa de la recuperación de los solutos.

Para certificar la calidad del método se llevaron a cabo las siguientes pruebas, realizando un análisis estadístico de los resultados.

IV.3.1. Linealidad del Método

Se analizaron muestras de agua grado reactivo fortificada con los fármacos a ocho niveles de concentración. Como se mencionó en una sección anterior, la mezcla patrón de fármacos y los estándares de trabajo utilizados para dopar las muestras fueron preparados de modo a tener picos de aproximadamente el mismo tamaño para todos los analitos en los cromatogramas. Por ello, las concentraciones de cada fármaco (tabla IV-2) en las muestras dopadas son diferentes y lo mismo ocurre para los intervalos de concentración estudiados; sin embargo, la relación de concentraciones entre los seis fármacos es la misma en todas las muestras analizadas.

Tabla IV-2. Intervalo de concentración de los fármacos para el estudio de linealidad del método

| Fármaco | Concentración ($\mu\text{g/L}$) |
|------------------|---|
| Enalapril | 3.0 – 50 |
| Aspirina | 1.2 – 20 |
| Ácido salicílico | 0.96 – 16 |
| Naproxeno | 0.36 – 6 |
| Indometacina | 0.72 – 12 |
| Ibuprofeno | 1.2 – 20 |

IV.3.2. Precisión del Método (medida como repetibilidad)

Se analizaron doce muestras independientes dopadas con los seis fármacos a la concentración indicada en la Tabla IV-3. A partir de los resultados obtenidos se calculó la concentración promedio determinada para cada compuesto y el porcentaje de recobro, ambos con su respectivo intervalo de confianza. La precisión del método se evaluó por el coeficiente de variación de la concentración determinada en las doce muestras.

Tabla IV-3. Concentración de los fármacos en el estudio de precisión del método

| Fármaco | Concentración ($\mu\text{g/L}$) |
|------------------|---|
| Enalapril | 12.5 |
| Aspirina | 5.0 |
| Ácido salicílico | 4.0 |
| Naproxeno | 1.5 |
| Indometacina | 3.0 |
| Ibuprofeno | 5.0 |

IV.3.3. Límites de detección y cuantificación del método

El Límite de Detección del Método (LDM) se estimó de acuerdo con el criterio recomendado por la EPA (Environmental Protection Agency, agencia de protección ambiental de E.U.) para el análisis de contaminantes orgánicos en aguas naturales. Según este criterio, el LDM se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{LDM} = t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)} * S$$

Donde:

$t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)}$ es la t de Student para un nivel de incertidumbre de 1% con $n-1$ grados de libertad (prueba de una cola) y S es la desviación estándar obtenida en el análisis de al menos siete muestras fortificadas con el analito a niveles de concentración no mayores a diez veces el LDM esperado. En este trabajo el LDM se calculó utilizando la desviación estándar (en unidades de concentración) obtenida en el estudio de repetibilidad del método, es decir, a partir del análisis de doce muestras independientes dopadas con los fármacos a las concentraciones especificadas en la tabla IV-3. El límite de cuantificación del método se estimó como 3.104 veces el valor del LDM, de acuerdo con las recomendaciones de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (Currie, 1995).

IV.4. Aplicación del método en muestras de agua colectadas en los canales de Xochimilco

IV.4.1. Preparación previa de la muestra

Las muestras de aguas naturales contienen generalmente una gran cantidad de sólidos suspendidos, por lo que no pueden ser cargadas directamente en los dispositivos de EFS ya que tapan los filtros que se encuentran a la entrada y salida de éstos. Debido a ello, y para agilizar la filtración, las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm por 20 min, para asegurar la sedimentación de la mayor cantidad posible de partículas presentes. Esta operación se realizó a temperatura controlada de 4 °C para evitar la degradación de los analitos de interés.

Posteriormente, las muestras se filtraron al vacío por papel filtro Whatman No. 1 en un embudo Büchner y finalmente los filtrados se sometieron a una segunda filtración a través de una membrana de Nylon con diámetro de poro de 0.45 µm en el sistema de filtración Millipore. Las muestras filtradas se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis.

IV.4.2. Preconcentración y análisis de las muestras

De cada muestra colectada y filtrada se tomaron alícuotas de 100 mL, las cuales fueron sometidas a los procesos de purificación, preconcentración y análisis según el método desarrollado. En la Figura IV-3 se esquematiza el procedimiento empleado. El análisis de las muestras se realizó por triplicado.

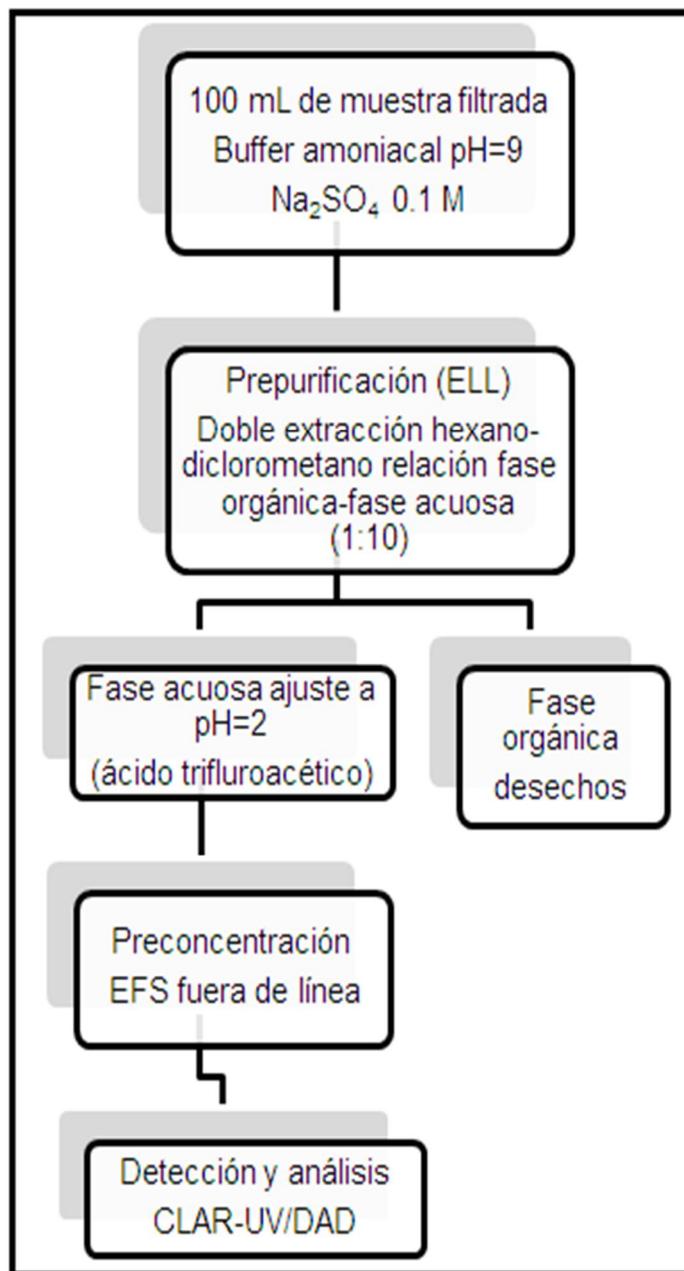


Figura IV-3. Diagrama de flujo para el análisis de muestras de agua por EFS- CLAR/UV-DAD

En las muestras colectadas en los canales La Candelaria y Caltongo del sistema lacustre de Xochimilco no se observaron señales que indicaran la presencia de alguno de los fármacos estudiados en este trabajo. Para estimar el grado de detectabilidad de los analitos al aplicar el método propuesto en estas aguas con fuerte carga orgánica, se tomaron alícuotas de 100 mL de cada muestra, se fortificaron con los 6 fármacos a dos niveles de concentración (tabla IV-4) y se volvieron a analizar.

Tabla IV-4. Niveles de fortificación aplicados a las muestras de La Candelaria y Caltongo para evaluar la detectabilidad de los fármacos en aguas naturales con alta carga de materia orgánica

| Fármaco | Concentración adicionada (µg/L) |
|------------------|--|
| Enalapril | 25 y 50 |
| Aspirina | 10 y 20 |
| Ácido salicílico | 8 y 16 |
| Naproxeno | 3 y 6 |
| Indometacina | 6 y 12 |
| Ibuprofeno | 10 y 20 |

Por otra parte, en los cromatogramas obtenidos del análisis de las muestras provenientes de San Diego y La Draga, los dos afluentes principales de la planta de tratamiento de Cerro de la Estrella, se observaron señales a tiempos de retención muy parecidos a los de algunos fármacos. Para confirmar o descartar la presencia de estos fármacos en las muestras, se obtuvieron los espectros de absorción del efluente de la columna a los tiempos de elución de las señales mencionadas. Estos espectros fueron comparados con los espectros de estándares puros de los fármacos, obtenidos bajo las mismas condiciones cromatográficas. Adicionalmente, las muestras se fortificaron con los fármacos respectivos a tres niveles de concentración (tabla IV-5) y se volvieron a analizar para corroborar que las señales supuestamente debidas a los analitos aumentarían de tamaño en función del nivel de fortificación. Para aquellos casos en donde las dos pruebas anteriores resultaron positivas, la cuantificación del fármaco correspondiente en la muestra blanco (muestra original no dopada) se realizó por el método de adiciones patrón, empleando para ello los cromatogramas obtenidos en el análisis de las muestras fortificadas.

Tabla IV-5. Niveles de fortificación aplicados a las muestras de La Draga y San Diego para el análisis cualitativo y cuantitativo de los fármacos.

| Fármaco | Concentración (µg/L) |
|------------------|---------------------------------|
| Enalapril | 12.5; 18.75; 25 |
| Aspirina | 5; 7.5; 10 |
| Ácido salicílico | 4; 6; 8 |
| Naproxeno | 1.5; 2.2; 3 |
| Indometacina | 3; 4.5; 6 |
| Ibuprofeno | 5; 7.5; 10 |

V. Resultados y discusión

V.1. Desarrollo del método analítico

V.1.1. Condiciones cromatográficas para la separación y detección de los fármacos de interés

Con la finalidad de alcanzar la mayor sensibilidad posible en la detección de los fármacos, se exploraron tres diferentes longitudes de onda en el detector UV: 215, 230 y 254 nm, las cuales fueron seleccionadas con base en lo reportado en la literatura. Estos ensayos se llevaron a cabo con soluciones individuales de cada fármaco, ajustando la composición de la fase móvil de modo a tener tiempos de retención cortos (2-5 min) para todos ellos. En la Figura V-1 se presentan, como ilustración, los cromatogramas obtenidos para el acetaminofen, la aspirina y el naproxeno a las tres longitudes de onda.

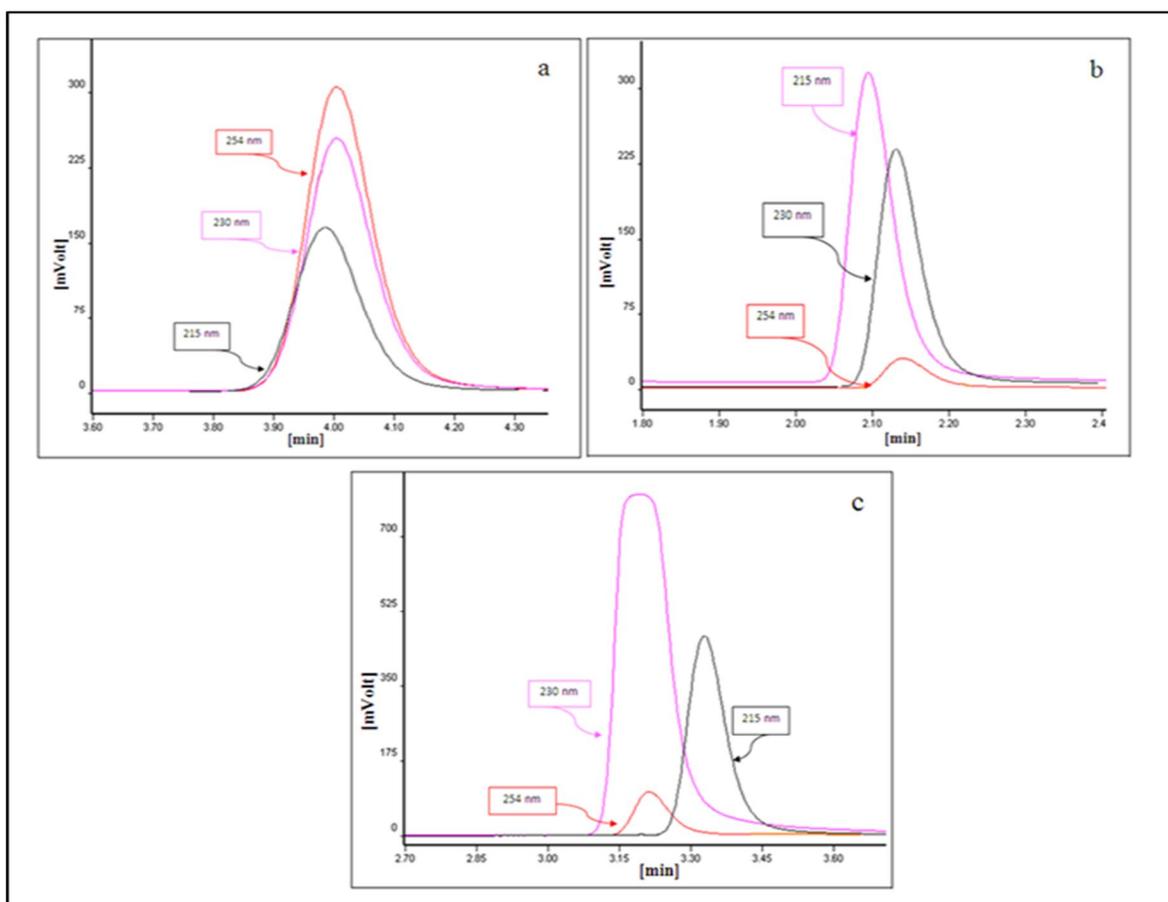


Figura V-1. Cromatogramas de tres fármacos obtenidos a diferentes longitudes de onda: a) acetaminofen, b) aspirina, c) naproxeno. Columna Hypersil ODS (150 × 4.6 mm, d.i.) de 5 μ m, fase móvil AcCN-H₂O (HClO₄ 0.1 M): a) 15:85 (v/v), b) 50:50 (v/v), c) 60:40 (v/v).

Como puede observarse en la figura anterior, la longitud de onda que produce la máxima respuesta varía según el compuesto considerado. Sin embargo, la mayoría de los fármacos inicialmente seleccionados

presentó una buena respuesta a 215 nm e incluso algunos de ellos tuvieron su máxima absorción a esta longitud de onda. Tal fue el caso de enalapril, aspirina, ibuprofeno, ampicilina y amoxicilina. Los compuestos con comportamiento diferente fueron el naproxeno, que presentó una respuesta considerablemente mayor a 230 nm, y el acetaminofen, cuya absorción aumentó conforme aumentó la longitud de onda (de 215 a 254 nm). Con base en estos resultados se decidió trabajar a 215 nm.

Una vez definido el grupo preliminar de fármacos con el que se pretendía trabajar (según el estudio de estabilidad reportado en la siguiente sección), se buscó la composición de fase móvil apropiada para su separación en la columna de fase reversa Hypersil ODS.

Considerando las propiedades ácido-base de los compuestos, se probaron fases móviles AcCN-H₂O ajustando el pH de la fracción acuosa a 1 (con ácido perclórico), 3.5 (con buffer formiato) y 6 (con acetato de amonio). Los cromatogramas obtenidos mostraron que al aumentar el pH se lograba una buena separación de enalapril, naproxeno e ibuprofeno, pero los tiempos de retención de aspirina, ácido salicílico y acetaminofen disminuían notablemente y sus picos se traslapaban. Se decidió entonces mantener el pH en 1 y trabajar con fases móviles ternarias. Finalmente, se logró una separación aceptable de cinco de los seis fármacos con la mezcla AcCN-MeOH-H₂O (HClO₄ 0.1M) 50:10:40 (v/v); en estas condiciones el acetaminofen no fue retenido y eluyó en el volumen muerto. Por otra parte, como se muestra en la Figura V-2, se obtuvieron picos coleados especialmente en el caso del ácido salicílico.

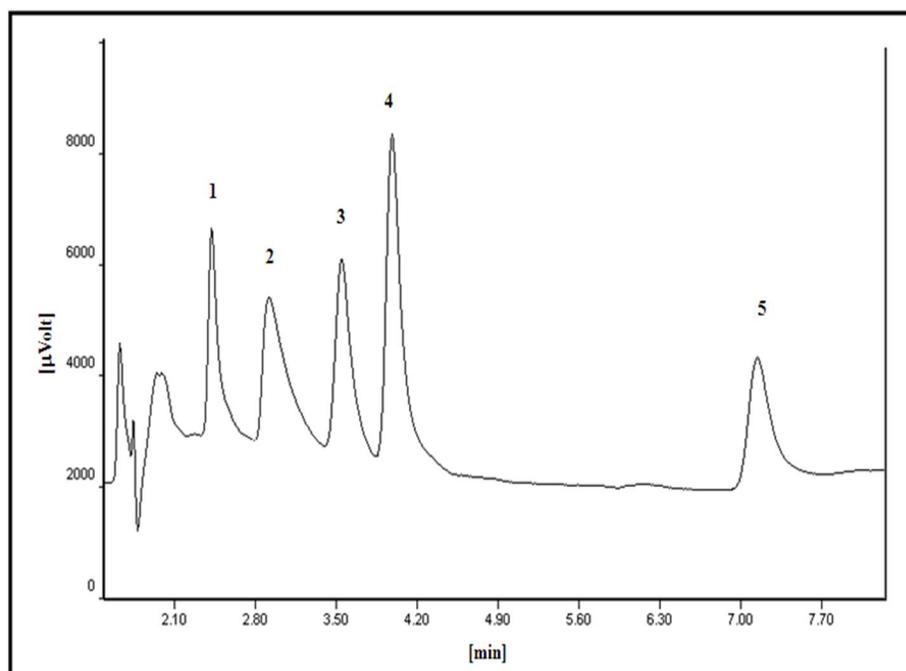


Figura V-2. Separación isocrática de una mezcla de fármacos. Columna Hypersil ODS (150 × 4.6 mm, d.i.) de 5 µm, fase móvil AcCN-MeOH-H₂O (HClO₄ 0.1 M) 50:10:40 (v/v), detección UV a 215 nm. Solutos: (1) aspirina, (2) ácido salicílico, (3) enalapril, (4) naproxeno, (5) ibuprofeno.

Para tratar de mejorar la separación se ensayaron las columnas Gemini y Synergi Fusion que, además de las cadenas alifáticas C-18, tienen enlazadas a la matriz de sílice pequeñas cadenas con grupos polares.

Esto les confiere un carácter dual hidrofílico-hidrofóbico que ha resultado muy exitoso para la separación de compuestos con grupos polares, que tienden a colear en las fases reversas convencionales. Con estas columnas se hicieron varias pruebas empleando la fase móvil ternaria antes descrita y ajustando el pH de la fracción acuosa a diferentes valores. Los resultados de estos ensayos confirmaron que las mejores condiciones de separación se tenían con la fase móvil acidificada a pH 1, ya que en las fases móviles de mayor pH se produjo un traslape de los picos de aspirina y enalapril.

En general, los picos fueron más simétricos en las columnas Gemini y Synergi Fusion que en la columna Hypersil. Además, el acetaminofen se retuvo un poco más, sin embargo, aún eluyó muy cerca del volumen muerto por lo que podría ser afectado por los picos de matriz que comúnmente aparecen al inicio del cromatograma cuando se analizan muestras de aguas naturales, ya sea superficiales o subterráneas. En la Figura V-3 se muestra el cromatograma obtenido con la columna Gemini, bajo condiciones idénticas a las de la Figura V-2, donde se usó la columna Hypersil. La separación relativa y el orden de elución de los picos son diferentes debido a un aumento en la retención de naproxeno e ibuprofeno y una marcada disminución en la retención de enalapril. Posiblemente, los silanoles residuales son menos accesibles en la columna Gemini, lo que explicaría la notable mejora en la simetría del pico del ácido salicílico y la disminución en la retención del enalapril (cuya molécula contiene grupos amino, de alta afinidad por los silanoles). Cabe mencionar que el comportamiento de los solutos en la columna Synergi Fusion fue prácticamente igual que en la columna Gemini y finalmente se decidió continuar el trabajo con esta última.

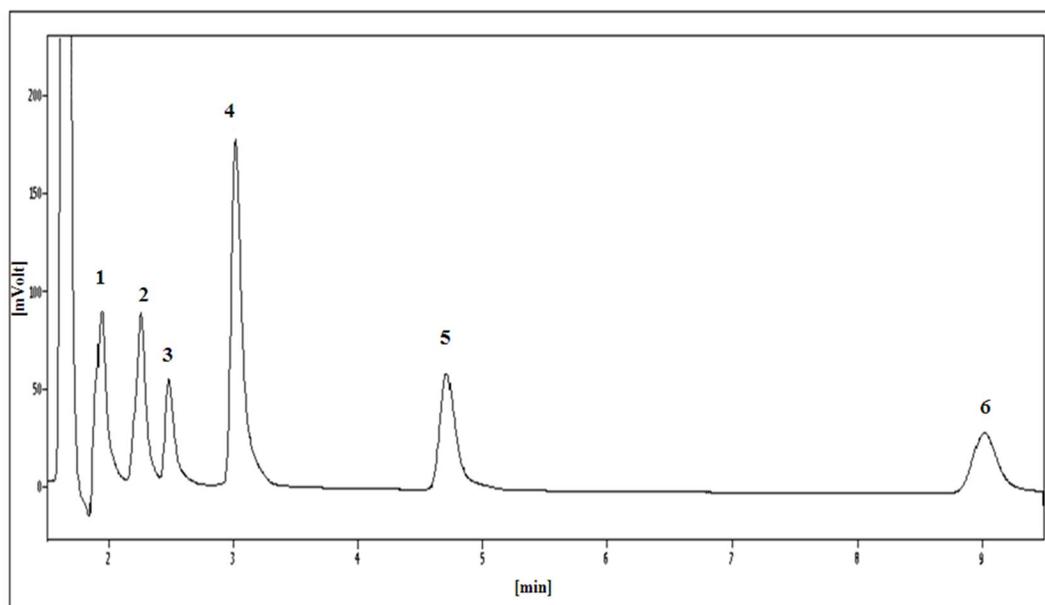


Figura V-3. Separación isocrática de los fármacos en la columna Gemini C-18 (150 × 4.6 mm, d.i.) de 5 μm. Fase móvil AcCN-MeOH-H₂O (HClO₄ 0.1 M) 50:10:40 (v/v), detección UV a 215 nm. Solutos: (1) acetaminofen, (2) enalapril, (3) aspirina, (4) ácido salicílico, (5) naproxeno, (6) ibuprofeno.

Como la fase móvil utilizada para la separación isocrática de los fármacos era relativamente fuerte, los compuestos más hidrofílicos fueron poco retenidos. Para aumentar su retención se decidió diseñar un gradiente de elución, comenzando la separación con una fase móvil mucho más débil. Por otra parte, el

ácido perclórico utilizado para fijar el pH de la fase móvil se sustituyó por ácido trifluoroacético, ya que este último permitió obtener una línea base con menos perturbaciones a la longitud de onda de trabajo. Inicialmente el gradiente de elución fue diseñado utilizando como Fase A (débil) ácido trifluoroacético acuoso al 0.1% y como Fase B (fuerte) una mezcla AcCN-MeOH 80:20 (v/v), con un programa de gradiente lineal que iniciaba en 10% de fase B, hasta llegar a 90% en 30 min. Estas condiciones fueron satisfactorias para la separación del grupo preliminar de fármacos; sin embargo, por motivos que se detallarán más adelante, el grupo fue modificado (se incluyó a la indometacina y se excluyó al acetaminofen), por lo que el gradiente tuvo que ser reajustado. Las condiciones definitivas para la separación del grupo final de fármacos fueron por gradiente de elución a un flujo de 0.5 mL/min, utilizando como Fase A ácido trifluoroacético acuoso 2×10^{-3} M y como Fase B ácido trifluoroacético en acetonitrilo 1×10^{-3} M. El programa de gradiente se muestra en la tabla V-1 y el cromatograma correspondiente se presenta en la Figura V-4.

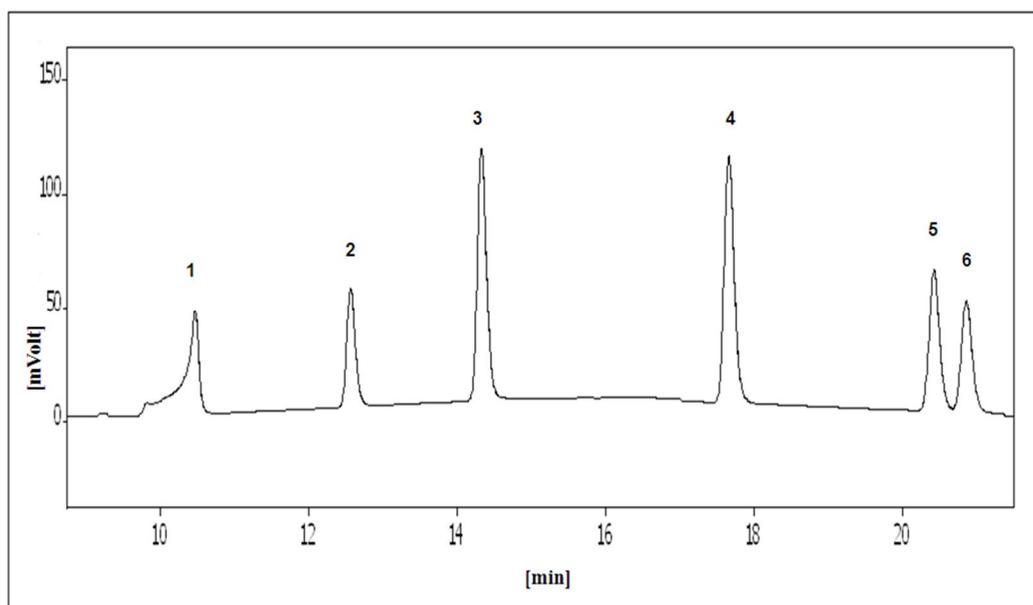


Figura V-4. Separación del grupo final de fármacos por gradiente de elución. Columna Gemini C-18 (150 x 4.6 mm, d.i.) de 5 μ m; programa de gradiente como en la tabla V-1, con Fase A: ácido trifluoroacético acuoso 2×10^{-3} M y Fase B: ácido trifluoroacético en acetonitrilo 1×10^{-3} M, flujo 0.5 mL/min. Solutos: (1) enalapril, (2) aspirina, (3) ácido salicílico, (4) naproxeno, (5) indometacina, (6) ibuprofeno.

Tabla V-1. Programa de gradiente para la separación del grupo final de fármacos en la columna Gemini C-18

| Tiempo (min) | Fase B (%) |
|---------------------|-------------------|
| 0 | 20 |
| 10 | 65 |
| 30 | 100 |

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la separación del grupo final de fármacos se obtuvo el espectro de absorción de cada uno en el intervalo de 190 a 370 nm (Anexo III). Los principales máximos de absorción reportados por el detector UV de diodos al finalizar el barrido espectral se presentan en la tabla V-2. Como se mencionó anteriormente, la longitud de onda finalmente seleccionada para la detección del conjunto de analitos fue a 215 nm.

Tabla V-2. Principales máximos de absorción detectados para cada fármaco

| Fármaco | Longitud de onda (nm) |
|------------------|------------------------------|
| Enalapril | 197, 219 |
| Aspirina | 197, 229 y 277 |
| Ácido salicílico | 205, 238 y 306 |
| Naproxeno | 232, 268 y 329 |
| Indometacina | 196, 223, 259 y 320 |
| Ibuprofeno | 206, 213 y 229 |

V.1.2. Estudio de la estabilidad de los fármacos

Por las condiciones básicas a las que se planeaba realizar la pre-purificación de la muestra y las condiciones ácidas requeridas para su preconcentración y análisis cromatográfico, fue necesario estudiar previamente la estabilidad de los fármacos en disoluciones acuosas ajustadas a diferentes valores de pH. Durante el tiempo que duró el ensayo (90 min), se observó que todos los analitos eran estables a pH 1. Por el contrario, a pH 11, la ampicilina, la aspirina y la amoxicilina comenzaron a degradarse antes de los 30 min, aumentando la degradación conforme transcurría el tiempo; los demás compuestos no sufrieron cambios con el tiempo a este pH. En la Figura V-5 se muestran los cromatogramas obtenidos para ampicilina, aspirina y amoxicilina a diferentes tiempos de contacto con la disolución de sosa a pH 11.

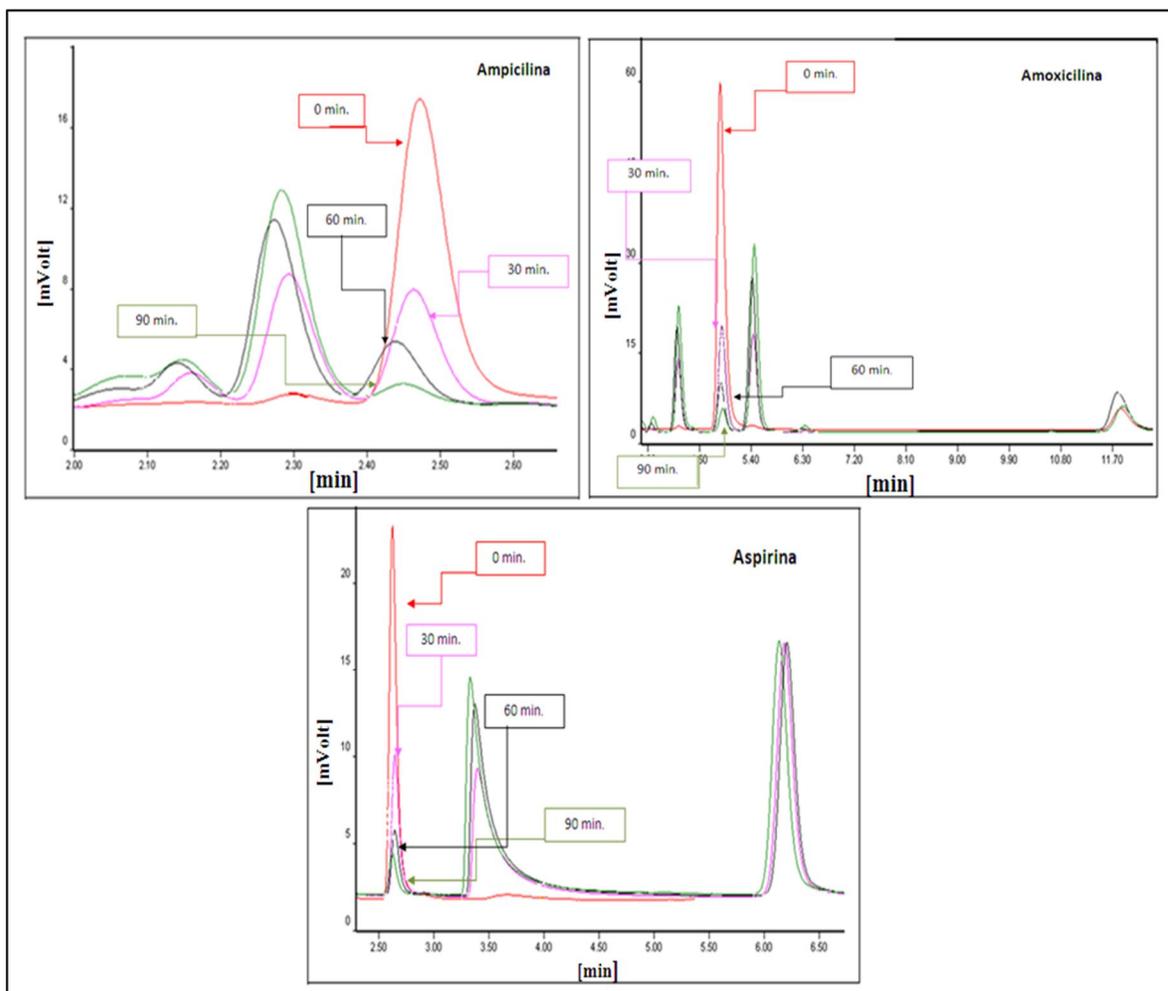


Figura V-5. Degradación de la ampicilina, aspirina y amoxicilina a pH 11. Los cromatogramas se obtuvieron por inyección directa de la disolución de cada fármaco en el medio en estudio después de transcurrir el tiempo señalado. Columna Hypersil ODS (150 × 4.6 mm, d.i.) de 5 μm, fase móvil AcCN-H₂O (HClO₄ 0.1 M) 25:75 (v/v).

De acuerdo con estos resultados y como era necesario trabajar a pH básico para purificar las muestras, se decidió explorar un medio de pH 9 ajustado con amoníaco. Los cromatogramas obtenidos mostraron que la degradación de aspirina, amoxicilina y ampicilina era insignificante hasta los 90 min de contacto con la disolución acuosa ligeramente alcalina.

Sin embargo, en experimentos posteriores en los que la mezcla de fármacos en disolución acuosa (no amortiguada) se dejó a temperatura ambiente por tiempos largos, se observó una disminución notable de los picos de ampicilina y amoxicilina en algunos cromatogramas e incluso éstos llegaron a desaparecer en ciertos casos. Por tal motivo se decidió dar un seguimiento más minucioso a estos compuestos.

Se prepararon nuevas disoluciones stock de ampicilina y amoxicilina (100 mg/L) en una mezcla metanol-agua 50:50 (v/v). A partir de éstas se prepararon disoluciones más diluidas (5 mg/L) en agua pura, las cuales se dejaron a temperatura ambiente. Las disoluciones se analizaron por CLAR a los siguientes tiempos a partir de su preparación: 0, 30, 60, 90 y 120 min, y 48 h (Figura V-6). Ambos compuestos permanecen más o menos estables durante las primeras 2 horas, pero al cabo de 48 horas su degradación es casi total.

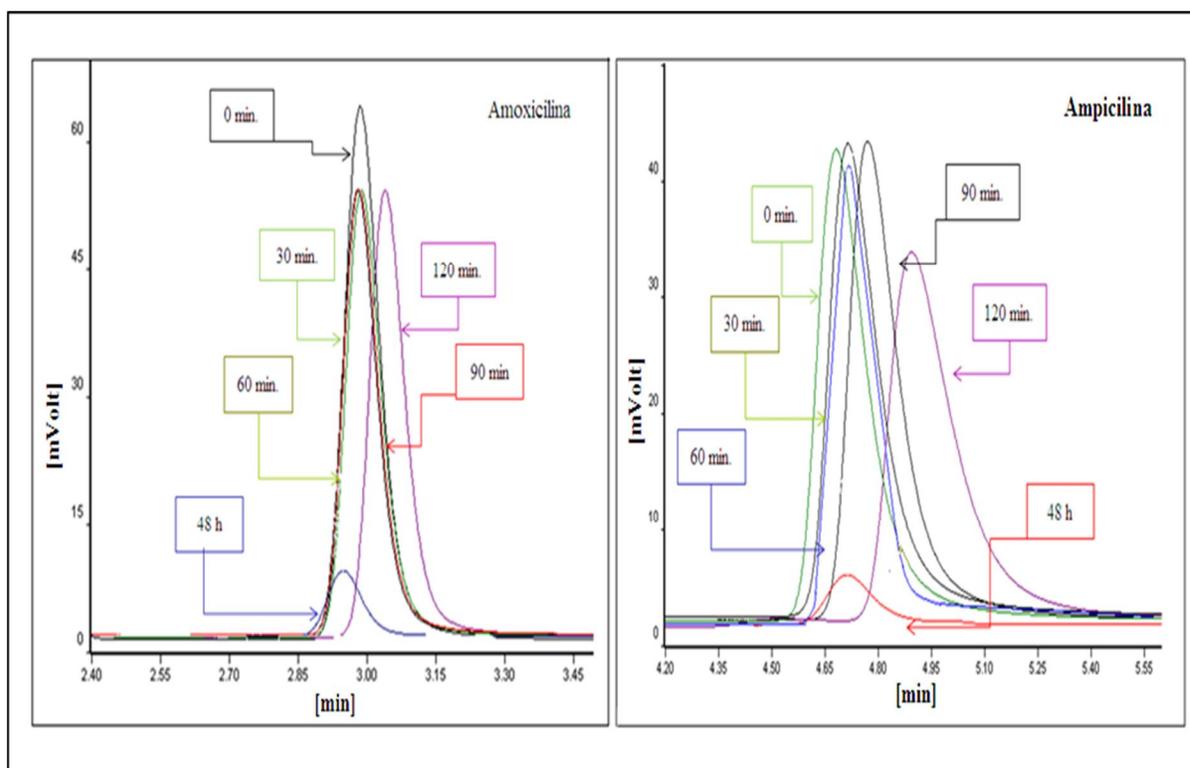


Figura V-6. Estabilidad de ampicilina y amoxicilina en disolución acuosa a temperatura ambiente. Columna Hypersil ODS, fase móvil: AcCN-H₂O (HClO₄ 10⁻¹ M) 25:75 (v/v).

Con base en estos resultados se decidió descartar a los dos antibióticos como parte del grupo de fármacos a estudiar en las muestras de agua. En efecto, si los fármacos demostraron no ser estables bajo condiciones controladas de laboratorio, la probabilidad de encontrar residuos de estas sustancias en muestras ambientales es prácticamente nula.

V.1.3. Desarrollo del método de preparación de muestra

V.1.3.1. Pre-purificación de la muestra por extracción líquido – líquido

Considerando que en este proyecto se pretendía desarrollar un método para la determinación de trazas de fármacos de alto consumo en aguas superficiales, donde hay una alta posibilidad de tener muchos

interferentes orgánicos e inorgánicos, era necesario diseñar un método eficaz de purificación de las muestras previo a su análisis.

Los fármacos seleccionados son compuestos polares de carácter ácido, con valores de pka entre 3 y 5.2, excepto el acetaminofen que es un ácido muy débil con pka de 9.5, pero es también el compuesto más hidrofílico. Todos ellos se ionizan en medio suficientemente básico, aumentando aún más su afinidad por el agua. Con esta base, se planteó realizar una doble extracción líquido-líquido de la muestra alcalinizada para separar interferentes orgánicos de polaridad media y baja, dejando los analitos ionizados en la fase acuosa.

Para ello, fue necesario verificar previamente que los compuestos de interés no eran extraídos parcialmente por los disolventes orgánicos. Los primeros experimentos se realizaron con disoluciones acuosas de 5 fármacos por separado, de acuerdo con el siguiente procedimiento. La disolución acuosa del fármaco (10 mL a 10 mg/L) se ajustó a pH 9 con unas gotas de amoniaco concentrado y se extrajo con 10 mL de hexano; la fase orgánica se separó y la fase acuosa se recuperó, sometiéndola a una segunda extracción con 10 mL de cloroformo. Nuevamente se separó la fase orgánica y la fase acuosa se acidificó a pH 1 con unas gotas de ácido perclórico concentrado. El seguimiento del proceso se llevó a cabo analizando la fase acuosa después de cada paso por inyección directa de 20 µL en el cromatógrafo de líquidos. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. En la tabla V-3 se reportan las áreas de pico medidas a lo largo del proceso para cada fármaco. Se puede constatar que las áreas de pico no varían significativamente, demostrando que los fármacos no fueron extraídos ni por el hexano ni por el cloroformo a partir de la disolución acuosa a pH 9. Así mismo, se confirma que no hay pérdidas significativas por degradación de los solutos o debidas a la manipulación de la muestra.

Como los resultados fueron satisfactorios, el siguiente paso fue repetir la doble extracción con la mezcla de los fármacos. En este caso, la disolución acuosa se analizó utilizando un gradiente de elución para la separación de los compuestos. En el cromatograma obtenido se observó la aparición de un pico relativamente grande, adicional al de los fármacos, el cual se traslapaba con el pico del naproxeno. Mediante algunos experimentos con muestras blanco (no dopadas con los analitos), sometidas al mismo proceso, se encontró que este pico era debido a residuos de cloroformo que quedaban en la fase acuosa después de la segunda extracción.

Tabla V-3. Seguimiento del proceso de extracción líquido-líquido (ELL)

| Solutos | Área de pico en la disolución acuosa | | | |
|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|--------------|
| | Inicial (pH 9) | Después de ELL con hexano | Después de ELL con cloroformo | Final (pH 1) |
| Acetaminofen ¹ | 19192 | 19071 | 18986 | 18069 |
| Aspirina ² | 13460 | 13345 | 13313 | 12870 |
| Enalapril ³ | 11766 | 11732 | 11738 | 11550 |
| Naproxeno ³ | 63915 | 63880 | 63159 | 61280 |
| Ibuprofeno ³ | 19632 | 21930 | 21609 | 21094 |

Columna Hypersil ODS (150 × 4.6 mm, d.i.), fase móvil: AcCN-H₂O (HClO₄ 0.1 M)

¹ 15:85 (v/v), ² 50:50 (v/v), ³ 60:40 (v/v).

Para resolver el problema anterior, se cambió el cloroformo por éter de petróleo, que tiene una polaridad semejante y no generó picos interferentes en los cromatogramas. El problema con el nuevo disolvente fue que la separación de las fases orgánica y acuosa se volvió muy lenta debido a la formación de emulsiones. Con el objeto de disminuir la miscibilidad del éter en la fase acuosa y evitar la formación de emulsiones se decidió añadir una sal inorgánica. Para ello se utilizó sulfato de sodio a concentración 0.1 M en la fase acuosa, cuidando de mantener su pH en 9 mediante la adición de un buffer amoniacal. El resultado fue satisfactorio ya que la formación de una interfase de separación bien definida entre el agua y el disolvente orgánico fue inmediata después de la agitación del embudo, reduciéndose considerablemente el tiempo requerido para los pasos de extracción líquido-líquido. Además se comprobó que esta modificación no alteraba el reparto de los fármacos entre las fases y que éstos seguían permaneciendo cuantitativamente en la fase acuosa. Evidentemente, esto fue debido a su estado ionizado, por lo que el control cuidadoso del pH en la muestra acuosa es imperativo.

En ensayos posteriores, cuando se trabajó con muestras más diluidas y a alta sensibilidad de detección, se observó que la línea base de los cromatogramas era relativamente ruidosa, lo que se atribuyó a impurezas del éter de petróleo que quedaban en la fase acuosa después de la extracción líquido-líquido. Por ello, se sustituyó este disolvente por diclorometano grado HPLC, el cual permitió obtener una línea base más estable, sin generar picos o perturbaciones interferentes bajo las condiciones cromatográficas establecidas para la separación del grupo final de fármacos.

El proceso definitivo de pre-purificación de la muestra por extracción líquido-líquido quedó establecido de la siguiente manera:

A la muestra acuosa a tratar se le agrega buffer amoniacal (pH 9) y Na_2SO_4 , ambos hasta concentración 0.1 M. Esta disolución se somete a una doble extracción con diclorometano y hexano, ambos en una relación muestra-disolvente orgánico 10:1 (v/v). Las fases orgánicas se desechan y la fase acuosa que contiene los analitos se recupera. Ésta última se acidifica ajustando su pH a 2 con ácido trifluoroacético.

Los ensayos realizados en estas condiciones demostraron que en ninguno de los pasos de este proceso había pérdida de analitos.

V.1.3.2. Preconcentración de los fármacos por extracción en fase sólida

Una vez que se optimizaron las condiciones cromatográficas y las condiciones de pre-purificación de las muestras mediante la doble extracción líquido-líquido, se comenzó con la búsqueda de condiciones para la preconcentración de los fármacos.

De acuerdo con reportes de la literatura (Daughton y Ternes, 1999; Daughton, 2004; Aga, 2008), las concentraciones a las que podrían encontrarse los fármacos en aguas ambientales contaminadas con éstos son del orden de las partes por billón o menores. Dada la sensibilidad limitada de los detectores UV, este

nivel de concentraciones no puede ser alcanzado por inyección directa de la muestra, por eso era necesario incluir un paso de preconcentración de los fármacos antes de su análisis. Sin embargo, debido a la gran afinidad de los analitos por el agua, éste fue el paso más crítico en el desarrollo de la metodología analítica.

Ensayos de EFS en línea

La extracción en fase sólida en línea es una de las técnicas más utilizadas para la determinación de contaminantes orgánicos en agua porque permite alcanzar una alta sensibilidad, precisión y exactitud en los análisis. Esto se debe a que toda la muestra cargada en el dispositivo de EFS (una pequeña precolumna) es posteriormente transferida en línea directamente a la columna del cromatógrafo de líquidos para su separación y análisis. El proceso completo puede ser automatizado utilizando la instrumentación apropiada, que se encuentra disponible comercialmente. Por estas razones fue la primera técnica que se decidió ensayar para la preconcentración de los fármacos.

Los experimentos se realizaron en una precolumna de acero inoxidable empacada con fase reversa polimérica (PLRP-S). Para empezar a explorar su capacidad de retención de los fármacos, la precolumna se cargó con sólo 5 mL de una muestra acuosa fortificada con los compuestos de interés, se lavó con 1 mL de agua y se eluyó en línea con la columna analítica. Los resultados obtenidos en este primer ensayo no fueron satisfactorios ya que, a pesar del pequeño volumen de muestra cargado, el acetaminofen se perdió totalmente y los recobros de algunos otros fármacos como el ácido salicílico y el ibuprofeno fueron bastante bajos (~60%).

Para corroborar el resultado anterior se realizaron dos ensayos más, cargando la precolumna con 1 y 3 mL de una disolución relativamente concentrada de acetaminofen (4 mg/L) y colectando el efluente durante las etapas de carga y lavado. Los efluentes colectados fueron analizados por inyección directa en el CLAR para hacer un seguimiento del proceso. En la tabla V-4 se muestran los resultados obtenidos. Como puede constatarse, una fracción importante del acetaminofen se fuga de la precolumna desde el primer mililitro cargado.

Tabla V-4. Estudio de la retención del acetaminofen en la precolumna PLRP-S

| Volumen de carga | Cantidad cargada (µg) | Cantidad determinada en el efluente de la carga (µg) | Cantidad determinada en el efluente del lavado (µg) |
|-------------------------|------------------------------|---|--|
| 1 mL | 4 | 2.17 | 1.6 |
| 3 mL | 12 | 4.69 | 3.45 |

Ensayos de EFS en columna

La concentración de compuestos en la “cabeza” de la propia columna analítica de fase reversa es otra técnica que se ha empleado para el enriquecimiento de trazas de contaminantes orgánicos a partir de matrices acuosas. Esta técnica se basa en que la matriz de la muestra es un eluyente muy débil en estas columnas, por lo que es posible pasar un volumen importante de muestra a través de ellas sin que los

compuestos de interés migren significativamente. En consecuencia, se genera una banda de solutos concentrados a la entrada de la columna. En la siguiente etapa, los solutos son eluidos mediante un gradiente de fase móvil convenientemente diseñado, de tal manera que logre separarlos y, al mismo tiempo, comprimir sus bandas para contrarrestar el ensanchamiento que tuvieron durante la etapa de carga.

Dado que la pequeña precolumna no fue capaz de retener a los fármacos de interés, se decidió probar la concentración directa en la columna analítica, considerando que por su mayor tamaño y contenido de adsorbente sería más eficaz. Los primeros ensayos se realizaron probando tres columnas de fase reversa C-18 químicamente unida: Hypersil ODS, Gemini C-18 y Synergi Fusion. Ninguna de ellas dio buenos resultados, ya que los fármacos más hidrofílicos migraron significativamente durante la etapa de carga de la muestra acuosa (25 mL), dispersándose a lo largo de la columna. Por ello, no pudieron ser re-enfocados convenientemente al correr el gradiente de elución. Incluso, el acetaminofen se fugó de las tres columnas durante la carga.

En vista de estos resultados, se decidió utilizar una columna de carbón grafitizado que tiene un poder de retención más fuerte que las columnas C-18. El carbón grafitizado es un adsorbente mucho más hidrofóbico que cualquiera de las fases estacionarias antes probadas; además es sabido que este material presenta interacciones importantes con anillos aromáticos y con algunos grupos funcionales polares, como el grupo fenol. Sin embargo, una desventaja de las columnas analíticas de carbón grafitizado es su alta caída de presión, que es considerablemente mayor a la de otro tipo de columnas empacadas con partículas del mismo diámetro. Esto obliga a trabajarlas a flujos muy bajos, especialmente con disolventes acuosos.

En el primer ensayo exploratorio, la columna se acondicionó de la misma manera que en los casos anteriores, se cargó con 25 mL de una disolución de acetaminofen de 25 µg/L y se eluyó con un gradiente de fase móvil a flujo de 0.7 mL/min. Los resultados fueron alentadores ya que la recuperación del acetaminofen fue >90% pero su tiempo de retención fue de ~23 minutos. Esto significaba que los solutos más hidrofóbicos no podrían ser eluidos y que era necesario encontrar nuevas condiciones para separar los fármacos en esta columna en tiempos razonables.

Después de probar diferentes composiciones de la fase móvil fuerte y diferentes programas de gradiente, se encontraron condiciones adecuadas para la separación de los 6 fármacos en la columna de carbón grafitizado. En la Figura V-7 se muestra el cromatograma obtenido al inyectar la mezcla de fármacos en la columna Hypercarb, usando las fases móviles indicadas en el pie de figura y el programa de gradiente mostrado en la tabla V-5. El orden de elución es diferente comparado con el que se tenía en las columnas C-18 (Figs. V-2 a V-4). El acetaminofen y el ácido salicílico que tienen un grupo fenólico aumentaron su retención respecto a los otros compuestos, mientras que el naproxeno que tiene dos anillos aromáticos fue el compuesto más retenido.

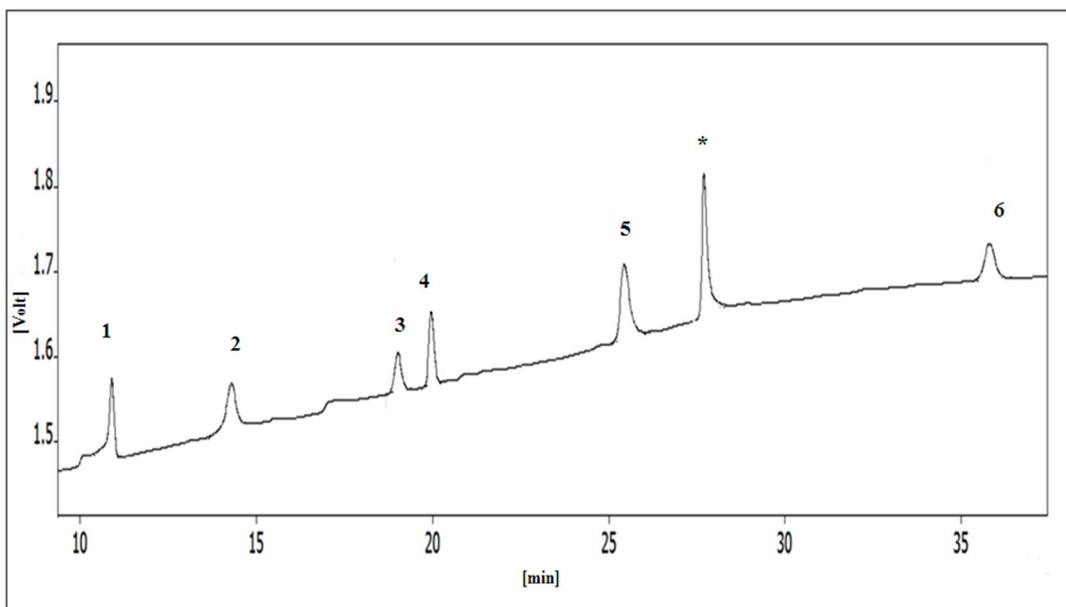


Figura V-7. Separación de los fármacos en una columna de carbón grafitizado. Columna Hypercarb (100 × 3 mm, d.i.) de 5 μm; gradiente de elución con Fase A: agua (pH 1) y Fase B AcCN-THF-isopropanol 50:30:20 (v/v), programa como en la tabla V-5, flujo 0.5 mL/min. Solutos: (1) enalapril, (2) acetaminofen, (3) aspirina, (4) ibuprofeno, (5) ácido salicílico, (6) naproxeno, (*) pico de gradiente.

Tabla V-5. Programa de gradiente para la separación del grupo preliminar de fármacos en la columna Hypercarb*

| Tiempo (min) | Fase B (%) |
|--------------|------------|
| 0 | 15 |
| 10 | 50 |
| 20 | 80 |
| 25 | 100 |
| 50 | 100 |

*Fase A: agua (acidificada a pH 1);
Fase B: AcCN-THF- isopropanol 50:30:20 (v/v)

Una vez que se tuvieron condiciones de retención y separación adecuadas, se realizaron tres cargas de 25, 50 y 100 mL de una disolución acuosa de los 6 fármacos a concentración de 25 μg/L en la columna Hypercarb. La columna se eluyó utilizando el gradiente diseñado. En los tres casos se observaron fuertes fluctuaciones de la línea base durante los primeros 15 minutos, lo que impidió detectar al enalapril y al acetaminofen. Adicionalmente, al realizar réplicas de los experimentos, no se obtuvieron tiempos de retención reproducibles para los otros compuestos. Por todo ello, se decidió no continuar con la EFS en columna y buscar otra alternativa

Ensayos de EFS fuera de línea

Los experimentos anteriores mostraron que sólo con un adsorbente a base de carbón era posible retener a todos los fármacos de interés y preconcentrar un volumen importante de muestra para alcanzar límites de detección y cuantificación suficientemente bajos.

Con el fin de explorar la factibilidad de uso del carbón grafitizado en un sistema de extracción en fase sólida fuera de línea, se hicieron pruebas iniciales empleando la columna Hypercarb como si fuera un cartucho. Los ensayos mostraron que en esta columna era posible cargar grandes volúmenes de muestra sin que ocurriera fuga de los analitos, sin embargo, la posterior elución de los solutos se convirtió en un problema crítico a causa de la fuerte retención. Después de muchos ensayos, se logró establecer un protocolo de EFS que permitió obtener recobros aceptables y repetibles para todos los compuestos (tabla V-6). La metodología completa, incluyendo los pasos de pre-purificación de la muestra por extracción líquido-líquido, se aplicó a una muestra sintética de agua grado reactivo (100 mL) fortificada con los fármacos a las siguientes concentraciones: enalapril 50 µg/L, acetaminofen, aspirina e ibuprofeno 20 µg/L cada uno, ácido salicílico 16.7 µg/L y naproxeno 6 µg/L. En la tabla V-7 se reportan los recobros obtenidos.

Como puede observarse en el protocolo descrito en la tabla V-6, la elución finalmente pudo llevarse a cabo invirtiendo el sentido de flujo en la columna y recuperando los solutos en las primeras gotas de efluente. Esto se atribuye a que la retención de los fármacos en el carbón grafitizado fue tan fuerte que quedaron atrapados en las primeras capas de adsorbente durante la etapa de carga y prácticamente no migraron dentro de la columna al pasar los 100 mL de muestra o el disolvente de lavado. Por lo tanto, al eluir la columna en sentido contrario al de la carga, los solutos fueron rápidamente desalojados.

Tabla V-6. Condiciones experimentales para la EFS fuera de línea utilizando la columna Hypercarb para la preconcentración de los fármacos a partir de muestras acuosas

| EFS fuera de línea | <i>Columna de grafito (flujo 0.7 ml/min)</i> |
|---------------------------|--|
| Acondicionamiento | 20 mL de agua 20 mL de HClO ₄ 0.1M |
| Carga de muestra | 100 ml de muestra ajustada a pH 1 con ácido trifluoroacético |
| Limpieza de muestra | 5 mL de HClO ₄ 0.1M |
| Elución | En sentido inverso a la carga con acetonitrilo (sólo se colectan los primeros 1.5 mL de eluato y se afora a 2 mL con agua) |

Tabla V-7. % Recobro obtenido en la preconcentración y análisis de fármacos, utilizando una columna de carbón grafitizado como dispositivo para la EFS

| Fármaco | % Recobro |
|----------------|------------------|
| Acetaminofen | 90 |
| Aspirina | 102 |
| Enalapril | 100 |
| Salicílico | 82 |
| Naproxeno | 99 |
| Ibuprofeno | 99 |

Habiendo obtenido resultados convenientes en los ensayos con la columna Hypercarb, el siguiente paso fue encontrar un dispositivo apropiado para realizar las operaciones de extracción en fase sólida. En efecto, las columnas analíticas no están diseñadas para esta tarea puesto que están empacadas con materiales de alta eficiencia (partículas de tamaño muy pequeño y regular), lo que se traduce en una alta caída de presión y un costo elevado. Los dispositivos para EFS fuera de línea no requieren de empaques de alta eficiencia y, por el contrario, deben permitir trabajar a altas velocidades de flujo para procesar grandes volúmenes de muestra en tiempos cortos; además, deben ser relativamente baratos ya que, en el análisis de muestras reales, sólo se usan para una muestra o un número limitado de muestras antes de ser desechados.

Por lo antes señalado, las siguientes pruebas se llevaron a cabo utilizando cartuchos comerciales para EFS (Supelclean-Envicarb) empacados con 1 gramo de carbón grafitizado con un diámetro de partícula de 40-100 μm . De acuerdo con la información proporcionada por el proveedor, estos cartuchos se pueden trabajar a velocidades de flujo de hasta 5 mL/min. Inicialmente se pensó que su comportamiento de retención sería similar al de la columna Hypercarb por lo que bastaría con extrapolar las condiciones de EFS antes encontradas aumentando la velocidad de flujo. Sin embargo, al aplicar el protocolo establecido (tabla V-6), los porcentajes de recuperación fueron muy bajos para todos los solutos y en particular para el acetaminofen. Las pruebas realizadas demostraron que las pérdidas observadas no eran debidas a la fuga de los analitos durante la carga sino a una elución incompleta.

Con el fin de mejorar el recobro, se aumentó el volumen de elución y se ensayaron una gran diversidad de disolventes y mezclas, tanto a temperatura ambiente como con calentamiento. Sin embargo, los resultados no fueron exitosos. En primer lugar, el acetaminofen presentó una interacción sumamente fuerte con el adsorbente y bajo ninguna condición se lograron obtener porcentajes de recobro mayores al 10%. Este comportamiento podría parecer extraño dado que el acetaminofen fue el fármaco menos retenido en las columnas de fase reversa C-18, lo que indica que es el más hidrofílico. No obstante, es necesario considerar que en el caso del carbón no sólo intervienen los efectos hidrofóbicos, sino también interacciones de superficie muy específicas que pueden incluso dar lugar a adsorciones irreversibles. La molécula del acetaminofen está constituida por un anillo aromático al que se encuentran unidos un grupo acetamida y un grupo fenol, en posición *para* uno respecto al otro. Es sabido que el carbón presenta una alta afinidad por los compuestos fenólicos, lo que explicaría la fuerte retención de este soluto. Aunque el ácido salicílico también tiene un grupo fenólico, éste se encuentra en posición *orto* respecto al grupo ácido carboxílico por lo que entre ambos grupos se pueden formar puentes hidrógeno; en consecuencia, el

fenol de esta molécula está menos disponible para interactuar con la superficie del adsorbente de carbón. En lo que respecta a los otros fármacos (incluyendo al ácido salicílico), los recobros no fueron tan bajos pero sí muy dispares y poco repetibles, lo que se atribuye a efectos de contaminación cruzada debidos a la elución incompleta de los compuestos y la imposibilidad de asegurar la limpieza total del cartucho entre ensayos subsecuentes, a pesar de la gran variedad de disolventes utilizados.

Comparando estos resultados con los previamente obtenidos en la columna Hypercarb, suponemos que la estructura menos compacta del empaque, en el caso del cartucho, permitió que los solutos alcanzaran a migrar dentro del lecho estacionario durante la carga, ocupando los sitios de adsorción más activos disponibles y repartiéndose en varias capas de adsorbente hasta cierta profundidad. Por eso, al invertir el sentido de flujo durante la elución, no fue posible desalojarlos completamente, a diferencia de la rápida elución observada al invertir la columna Hypercarb. Cabe hacer notar que, de acuerdo con los datos de los proveedores, la superficie específica del carbón grafitizado en la columna y en el cartucho es similar (120 y 100 m²/g, respectivamente) por lo que este parámetro no explicaría la diferencia de comportamiento.

Con base en el análisis de resultados, se tomaron dos decisiones para continuar con el desarrollo del método. La primera fue sustituir al acetaminofen por otro fármaco de uso común; después de algunas pruebas se eligió a la indometacina. La segunda fue reducir drásticamente la cantidad de adsorbente utilizado para la EFS. Con este fin, se desempacó un cartucho Supelclean-Envicarb y con el material recuperado se empacaron dos pequeñas columnas de acero inoxidable, una de 20 × 2 mm empacada con 20 mg de adsorbente y otra de 30 × 4.6 mm empacada con 250 mg de adsorbente.

Ensayos de EFS en mini columnas empacadas con carbón grafitizado

Las pruebas iniciaron con la mini columna más pequeña (20 × 2 mm, diámetro interno: d.i.), la cual fue cargada con una disolución acuosa acidificada a pH 1 y fortificada con los 6 fármacos finalmente seleccionados. Se probaron dos diferentes volúmenes de carga, 25 y 100 mL, ambos con la misma cantidad de analitos disueltos. La elución se realizó con 10 mL de tetrahidrofurano (THF). El eluato recuperado se evaporó a sequedad mediante vacío y ligero calentamiento (40°C) y se reconstituyó a 1 mL con la fase móvil débil (solución acuosa de ácido trifluoroacético). El análisis se realizó por CLAR-UV de acuerdo con las condiciones establecidas previamente (ver Fig. V-4). En la tabla V-8 se reportan los recobros obtenidos.

Tabla V-8. Recobros obtenidos a dos diferentes volúmenes de carga en una mini columna (20×2 mm, d.i.) empacada con 20 mg de carbón grafitizado

| Compuestos | Cantidad cargada (ng) | % Recobro Volumen de carga 25 mL | % Recobro Volumen de carga 100 mL |
|------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Enalapril | 1250 | 90 | 75 |
| Aspirina | 500 | 100 | 40 |
| Ácido salicílico | 417 | 73 | 30 |
| Naproxeno | 150 | 100 | 80 |
| Indometacina | 300 | 75 | 65 |
| Ibuprofeno | 500 | 92 | 68 |

La notable disminución del recobro al aumentar el volumen de carga (a cantidad cargada constante) indica que la pérdida es debida a fuga de los compuestos de la mini columna durante el paso de la muestra. Aparentemente el volumen de fuga de enalapril, aspirina, naproxeno e ibuprofeno es cercano o superior a 25 mL, mientras que para el ácido salicílico es menor a este volumen. En el caso de la indometacina, la disminución del recobro al aumentar el volumen de carga fue relativamente pequeña, pero aún con el menor volumen de carga el recobro fue de sólo 75%, lo que hace pensar en un problema de elución incompleta.

Con el objeto de ver el efecto que podía tener el paso de pre-purificación previa de la muestra (por extracción líquido-líquido) sobre el proceso de EFS en esta mini columna, se realizaron tres ensayos: 1) una sola extracción líquido-líquido con hexano, 2) una doble extracción con hexano y cloroformo, y 3) doble extracción con hexano y diclorometano. La EFS se llevó a cabo como se describió en el párrafo anterior, cargando 25 mL de muestra fortificada con los fármacos. En la tabla V-9 se presentan los recobros obtenidos.

Tabla V-9. Efecto de la pre-purificación de la muestra por extracción líquido-líquido sobre el recobro de los fármacos en el proceso de EFS*

| Compuestos | Cantidad cargada (ng) | Recobro Hexano (%) | Recobro Cloroformo-Hexano (%) | Recobro Diclorometano-Hexano (%) |
|------------------|-----------------------|--------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Enalapril | 625 | 93 | 65 | 80 |
| Aspirina | 250 | 79 | 75 | 78 |
| Ácido salicílico | 209 | 73 | 75 | 75 |
| Naproxeno | 75 | 100 | 100 | 100 |
| Indometacina | 150 | 86 | 59 | 70 |
| Ibuprofeno | 250 | 82 | 70 | 80 |

* EFS en mini columna de carbón grafitizado (20 × 2 mm, d.i.)

Para la mayoría de los analitos hay una disminución del recobro cuando la muestra es previamente sometida a extracción líquido-líquido y el efecto es mayor al aumentar el número de extracciones, particularmente si se utiliza cloroforno como disolvente de extracción. Este comportamiento se atribuye a la disolución de una pequeña fracción del o los disolventes de extracción en la muestra acuosa, lo que aumenta la fuerza de elución de la propia muestra disminuyendo la retención (y por lo tanto el volumen de fuga) en la mini columna de EFS. No obstante, los recobros continúan siendo mayores al 70% cuando se efectúa la doble extracción líquido-líquido con hexano y diclorometano, por lo que esta condición quedó confirmada como el mejor compromiso para la pre-purificación de la muestra.

Debido a que se quería alcanzar la mayor sensibilidad posible en el método, era necesario poder preconcentrar volúmenes de muestra superiores a 25 mL. Por ello, se decidió evaluar el proceso de EFS en una mini columna más grande (30 × 4.6 mm, d.i.) empacada con el mismo adsorbente (carbón grafitizado). En un primer ensayo, la columna se cargó con 100 mL de una disolución acuosa de los fármacos a concentración relativamente alta (0.5 mg/L), recuperando el efluente de la carga en fracciones de 10 mL e inyectando cada fracción directamente en el cromatógrafo. En ninguna de las fracciones analizadas se detectaron los fármacos, lo que indica que el volumen de fuga para todos ellos es superior a los 100 mL en esta columna. Sin embargo, cuando se realizó el proceso completo de EFS, se volvieron a tener muy bajos recobros para algunos compuestos, debido a una elución incompleta. Para mejorar el recobro, se hicieron nuevamente modificaciones en el paso de elución (disolvente, volumen, flujo y temperatura) hasta lograr obtener resultados aceptablemente satisfactorios y sobre todo reproducibles. En la tabla V-10 se detallan las condiciones finalmente establecidas para la elución.

Tabla V-10. Condiciones de elución de los fármacos previamente concentrados en una mini columna (30 × 4.6 mm, d.i.) empacada con carbón grafitizado

| Flujo | Temperatura | Disolvente de elución | Evaporación y reconstitución del eluato |
|------------|-------------|--|---|
| 0.5 mL/min | 60 °C | 6 mL H ₂ O-mezcla orgánica* 30:70 (v/v) + 6 mL mezcla orgánica* | Añadir una gota de amoníaco Evaporar a sequedad con vacío en baño maría a 40°C Reconstituir a 1mL con fase móvil A-MeOH 80:20 (v/v)** |

*Mezcla orgánica: AcCN-MeOH 80:20 (v/v) con ácido trifluoroacético 0.1 M

** Fase móvil A: solución acuosa de ácido trifluoroacético 2×10^{-3} M

Las condiciones finalmente adoptadas para todo el proceso de EFS y los montajes experimentales utilizados para llevarlo a cabo fueron presentados en el capítulo anterior (sección IV.3.3.2, tabla IV-1 y Fig. IV-2). La Figura V-8 muestra los cromatogramas obtenidos en el análisis completo de dos muestras independientes (incluyendo la extracción líquido-líquido) y de un estándar. La cantidad de cada fármaco en los 100 mL de muestra procesados y en los 100 µL de estándar inyectado fue idéntica. Como puede apreciarse, hay una ligera pérdida de algunos analitos en las muestras procesadas pero ésta no es excesiva

y los resultados de muestra a muestra son bastante parecidos. Cabe mencionar que la deriva de la línea base es debida al gradiente pues las fases móviles débil y fuerte utilizadas en estos ensayos no tenían la misma absorbancia a 215 nm. En ensayos posteriores, a la fase fuerte se le agregó un poco de ácido trifluoroacético, lo que aumentó su absorbancia y permitió obtener una línea base más horizontal (ver cromatograma mostrado en la Fig. V-4).

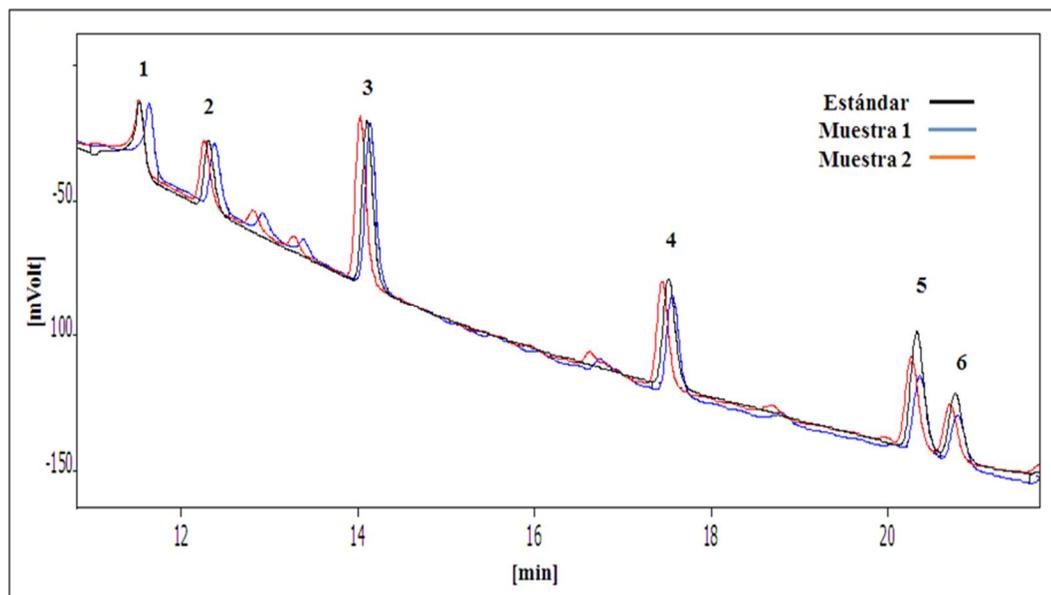


Figura V-8. Cromatogramas obtenidos del análisis de un estándar y de dos muestras sintéticas de agua grado reactivo fortificadas con los fármacos y procesadas según el método desarrollado. Las muestras y el estándar contenían la misma cantidad de cada fármaco. Solutos: (1) enalapril, (2) aspirina, (3) ácido salicílico, (4) naproxeno, (5) indometacina, (6) ibuprofeno. Columna Gemini (150 x 4.6 mm, d.i.) de 5 μm , fase móvil A: *ácido trifluoroacético acuoso* $2 \times 10^{-3} \text{M}$, fase móvil B: *acetonitrilo*, programa de gradiente como en la tabla V-1.

V.2. Validación del método analítico

Una vez desarrollado el método analítico para la determinación de trazas de fármacos en agua, fue necesario validarlo para determinar las condiciones en que éste puede ser aplicado (particularmente el intervalo de concentraciones) y la confiabilidad de los datos que se obtienen a través de él.

Para realizar este estudio se prepararon muestras sintéticas de agua grado reactivo, dopadas con el grupo de fármacos a varios niveles de concentración. La pre-purificación, preconcentración y análisis de las muestras se llevó a cabo según el método desarrollado. Los resultados de este estudio se describen a continuación.

V.2.1. Estabilidad de los fármacos de interés

Para evitar la degradación de los analitos por la acción de los microorganismos presentes en las aguas ambientales es recomendable adicionar un agente antimicrobiano a la muestra para preservarla hasta su análisis. Por ello, se consideró importante verificar la estabilidad de los fármacos en disoluciones acuosas que contuvieran una sustancia de este tipo. El estudio se realizó con 1 L de muestra sintética de agua grado reactivo fortificada con los seis fármacos a 10 µg/L, a la cual se le agregó azida de sodio a concentración 0.1 M y se guardó en refrigeración. La muestra se monitoreó durante 11 días, analizando una alícuota de 100 mL cada día. Los recobros se calcularon por estandarización externa, comparando las alturas de pico de los solutos de interés en las alícuotas de muestra analizadas cada día con las obtenidas por inyección de un estándar. Como se muestra en la tabla V-11, no se observó ningún cambio significativo en la concentración de la mayoría de los solutos, excepto en la aspirina que empezó a degradarse entre el cuarto y el quinto día, y al final del ensayo sólo quedó alrededor del 50% de la cantidad inicial. Simultáneamente se observó un aumento en la concentración de ácido salicílico, el cual acabó teniendo una ganancia de aproximadamente 40% al final del ensayo. Como era de esperarse, la aspirina degradada se transformó en ácido salicílico. Cabe mencionar que, en ausencia de azida de sodio, la aspirina en disolución acuosa se degradó casi dos veces más rápido. En vista de estos resultados, se decidió utilizar la azida de sodio como agente antimicrobiano.

Tabla V-11. Estabilidad de los fármacos (en % de recobro) en presencia de azida de sodio en la disolución acuosa

| Día | Enalapril | Aspirina | Ácido salicílico | Naproxeno | Ibuprofeno | Indometacina |
|-----|-----------|----------|------------------|-----------|------------|--------------|
| 1 | 88 | 91 | 100 | 94 | 78 | 68 |
| 2 | 89 | 88 | 100 | 90 | 74 | 69 |
| 3 | 90 | 89 | 98 | 95 | 78 | 61 |
| 4 | 92 | 90 | 100 | 97 | 73 | 64 |
| 5 | 94 | 73 | 108 | 97 | 71 | 65 |
| 6 | 88 | 72 | 115 | 92 | 76 | 72 |
| 7 | 88 | 60 | 129 | 99 | 70 | 67 |
| 8 | 91 | 63 | 133 | 90 | 74 | 75 |
| 9 | 95 | 50 | 137 | 92 | 73 | 70 |
| 10 | 90 | 59 | 140 | 89 | 71 | 77 |
| 11 | 90 | 45 | 141 | 96 | 77 | 74 |

V.2.2. Linealidad del método

La linealidad del método se evaluó a partir de los resultados obtenidos en el análisis de muestras de agua grado reactivo fortificadas con la mezcla de fármacos a ocho niveles de concentración. La cantidad recuperada de cada compuesto se calculó comparando las alturas de pico en los cromatogramas de las muestras analizadas con las obtenidas por inyección directa de una mezcla estándar.

En el Anexo IV se presentan las gráficas de *cantidad de soluto recuperado vs cantidad de soluto adicionado*. Los resultados del tratamiento estadístico se presentan en la tabla V-12.

Tabla V-12. Parámetros estadísticos de las rectas de regresión de *cantidad recuperada vs cantidad adicionada* (n = 8)

| Compuesto | Coefficiente de determinación (r^2) | Pendiente de la recta ($b \pm s$)* | Ordenada al origen ($a \pm s$)* |
|------------------|---|--------------------------------------|-----------------------------------|
| Enalapril | 0.996 | 0.883 ± 0.053 | 8 ± 15 |
| Aspirina | 0.998 | 0.848 ± 0.033 | 2.9 ± 3.7 |
| Ácido salicílico | 0.997 | 0.929 ± 0.05 | 0.2 ± 4.4 |
| Naproxeno | 0.991 | 0.875 ± 0.079 | 0.6 ± 2.6 |
| Indometacina | 0.995 | 0.709 ± 0.047 | -0.2 ± 3.1 |
| Ibuprofeno | 0.997 | 0.691 ± 0.034 | 2.2 ± 3.7 |

*s = desviación estándar

Los coeficientes de determinación obtenidos en el análisis de regresión lineal son superiores a 0.99, lo que demuestra que existe una relación lineal entre la cantidad de soluto determinada por el método y la cantidad de soluto añadida a la muestra analizada.

Las ecuaciones de las rectas de regresión que describen la variación de la *cantidad de soluto recuperado* en función de la *cantidad de soluto adicionado* son un buen indicador de las características del método analítico desarrollado. Si la ordenada al origen es estadísticamente igual a cero, significa que el método no presenta errores sistemáticos. Por otra parte, el valor de la pendiente representa la fracción de soluto recuperado; si este valor es estadísticamente igual a uno, significa que no hay pérdidas de soluto durante el proceso analítico, o ganancia por coelución de interferencias o por contaminación cruzada. En los Anexos V y VI se presentan los detalles de las pruebas estadísticas realizadas y las ecuaciones empleadas, los resultados obtenidos se resumen en la tablas V-13 y V-14.

Tabla V-13. Parámetros de la prueba de hipótesis sobre el valor de la ordenada al origen. Nivel de confianza $\alpha = 0.05$ ($n = 8$).

| Compuestos | t_{calculada} | t_{crítica} | Decisión |
|-------------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Enalapril | 1.25 | 2.44 | Aceptar H₀ |
| Aspirina | 1.91 | 2.44 | Aceptar H₀ |
| Ácido salicílico | 0.11 | 2.44 | Aceptar H₀ |
| Naproxeno | 0.53 | 2.44 | Aceptar H₀ |
| Indometacina | 0.11 | 2.44 | Aceptar H₀ |
| Ibuprofeno | 1.33 | 2.44 | Aceptar H₀ |

Como se muestra en la tabla V-13, en todos los casos el valor absoluto de $t_{calculada}$ fue menor que el de $t_{crítica}$, por lo que se acepta la hipótesis nula, es decir, el valor de la ordenada al origen de las rectas de regresión obtenidas en el estudio de linealidad es igual a cero y, en consecuencia, se admite que no existen errores de tipo sistemático en el método propuesto.

Tabla V-14. Parámetros de la prueba de hipótesis sobre el valor de la pendiente. Nivel de confianza $\alpha = 0.05$ ($n = 8$).

| Compuestos | t_{calculada} | t_{crítica} | Decisión |
|-------------------|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Enalapril | 40.7 | 2.44 | Rechazar H₀ |
| Aspirina | 62.3 | 2.44 | Rechazar H₀ |
| Ácido salicílico | 45.3 | 2.44 | Rechazar H₀ |
| Naproxeno | 27.2 | 2.44 | Rechazar H₀ |
| Indometacina | 36.7 | 2.44 | Rechazar H₀ |
| Ibuprofeno | 49.4 | 2.44 | Rechazar H₀ |

En lo que concierne a la prueba sobre el valor de la pendiente de las rectas de regresión, los resultados presentados en la tabla V-14 muestran que el valor absoluto de $t_{calculada}$ fue mayor que el de $t_{crítica}$ para todos los fármacos, por lo que se rechaza la hipótesis nula. En este caso, la pendiente de todas las rectas es significativamente menor a 1, lo que indica que hubo pérdidas de analito durante el procesamiento de las muestras.

V.2.3. Precisión y % de Recobro del método

La precisión del método se evaluó con base en el coeficiente de variación (% CV) obtenido en el análisis de 12 réplicas independientes de una muestra dopada con los 6 fármacos (concentraciones especificadas en la parte experimental, tabla IV-3). En la tabla V-15 se reporta la concentración y el recobro promedio determinados para cada compuesto con sus respectivos intervalos de confianza (al nivel de significancia $\alpha = 0.05$).

Tabla V-15. Precisión y % de recobro del método en análisis replicados (n = 12).

| Compuestos | Concentración determinada ($\mu\text{g/L}$) | DE ($\mu\text{g/L}$) | CV (%) | R (%) |
|------------------|---|------------------------|--------|----------------|
| Enalapril | 11.35 ± 0.34 | 0.54 | 4.7 | 90.8 ± 2.7 |
| Aspirina | 4.3 ± 0.19 | 0.30 | 7.1 | 85.9 ± 3.9 |
| Ácido salicílico | 3.95 ± 0.17 | 0.27 | 6.8 | 98.8 ± 4.3 |
| Naproxeno | 1.41 ± 0.05 | 0.08 | 5.6 | 94.1 ± 3.4 |
| Indometacina | 2.17 ± 0.1 | 0.16 | 7.4 | 72.3 ± 3.4 |
| Ibuprofeno | 3.7 ± 0.1 | 0.16 | 4.4 | 74 ± 2.1 |

DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación, R: recobro

Los resultados muestran que la recuperación promedio de los fármacos en estudio se sitúa entre 72% y 99%, además el coeficiente de variación es $< 8\%$. Según los criterios establecidos por la EPA para el análisis de contaminantes orgánicos en aguas naturales, se considera aceptable una recuperación de los compuestos de interés entre 70% y 130% y un coeficiente de variación de hasta 30%, cuando se analizan muestras fortificadas al nivel de las partes por billón. Aunque estos criterios se refieren a contaminantes orgánicos típicos (pesticidas, bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos y otras sustancias tóxicas), y no a contaminantes emergentes que son menos tóxicos y más hidrofílicos, se puede decir que el método desarrollado cumple con los criterios de calidad comúnmente aceptados.

V.2.4. Límites de detección y cuantificación

En la tabla V-16 se presentan los límites de detección y cuantificación del método, calculados según las recomendaciones de la EPA y de la IUPAC, respectivamente.

Tabla V-16. Límites de detección y cuantificación del método

| Compuestos | DE ($\mu\text{g/L}$) | $t_{(0.01, n-1)}$ | LDM ($\mu\text{g/L}$) | LCM ($\mu\text{g/L}$) |
|------------------|------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|
| Enalapril | 0.54 | 2.72 | 1.5 | 4.5 |
| Aspirina | 0.30 | 2.72 | 0.83 | 2.6 |
| Ácido salicílico | 0.27 | 2.72 | 0.73 | 2.3 |
| Naproxeno | 0.079 | 2.72 | 0.22 | 0.67 |
| Indometacina | 0.16 | 2.72 | 0.44 | 1.4 |
| Ibuprofeno | 0.16 | 2.72 | 0.44 | 1.4 |

DE: desviación estándar, LDM: límite de detección del método, LCM: límite de cuantificación del método.

Con excepción del enalapril, los límites de detección del método para los fármacos estudiados son inferiores a la parte por billón.

Cabe señalar que los límites de detección del método, tal como está diseñado, podrían reducirse en varios órdenes de magnitud si se utilizara un espectrómetro de masas en vez del detector UV. En dicho caso sólo se requeriría ajustar algunos parámetros cromatográficos (diámetro de columna y flujo) y eventualmente adaptar los tiempos del programa de gradiente a estas condiciones. El extracto obtenido al final del procesamiento de la muestra puede ser inyectado directamente en un sistema acoplado CLAR-EM, sin requerir de ninguna modificación.

V.3. Análisis de muestras de agua colectadas en los canales de Xochimilco

V.3.1. Aplicación del método desarrollado: Análisis cualitativo y cuantitativo de los fármacos en las muestras.

En las Figuras V-9, V-10, V-11 y V-12 se presentan los cromatogramas obtenidos al analizar las muestras colectadas en Caltongo, La Candelaria, La Draga y San Diego, respectivamente. En estas figuras se utilizó la misma escala en el eje de respuesta para facilitar la comparación de los perfiles generados por cada muestra. Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que las especificadas en la Figura V-4

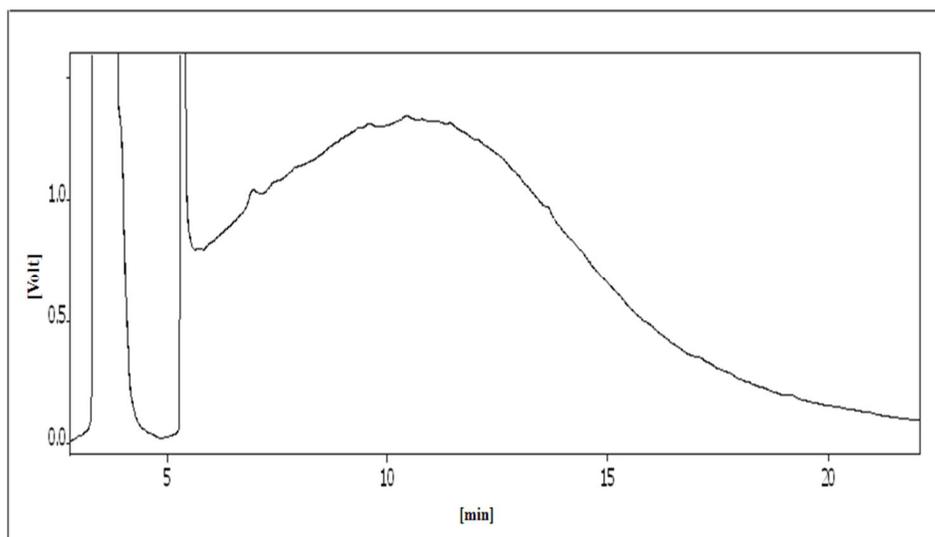


Figura V-9. Cromatograma obtenido del análisis de la muestra de agua colectada en el Canal de Caltongo.

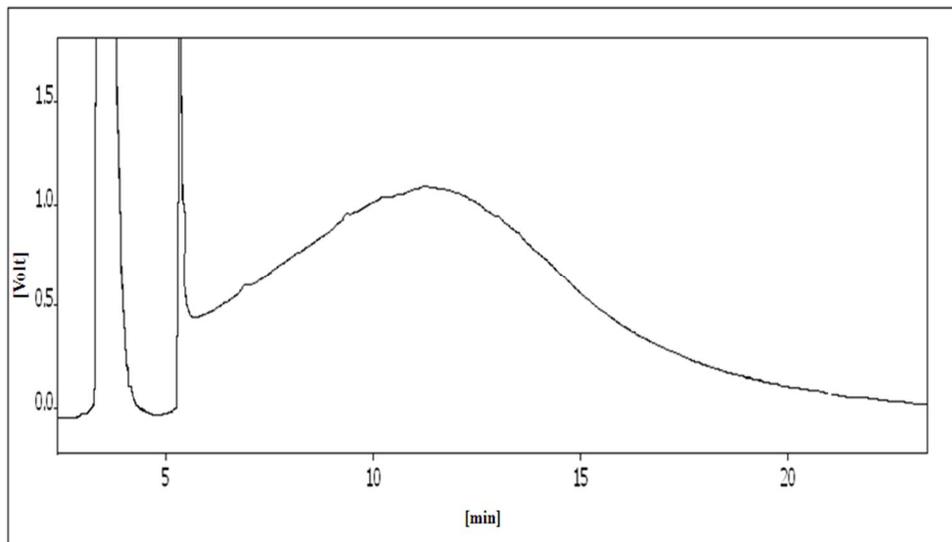


Figura V-10. Cromatograma obtenido del análisis de la muestra de agua colectada en el Canal de La Candelaria.

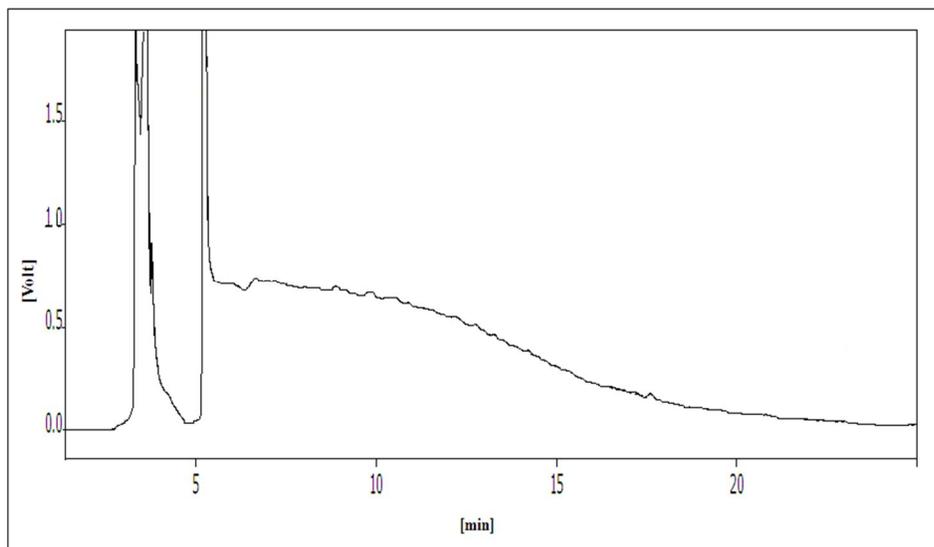


Figura V-11. Cromatograma obtenido del análisis de la muestra de agua colectada en el afluente La Draga.

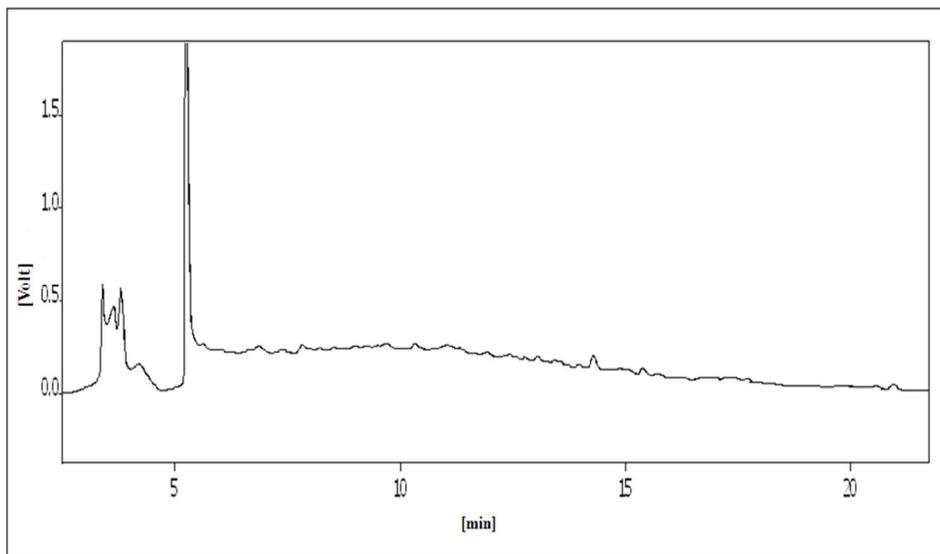


Fig. V-12. Cromatograma obtenido del análisis de la muestra de agua colectada en el afluente San Diego.

La absorbancia de fondo cambia notablemente según el sitio de colección de las muestras. En general, en todos los cromatogramas se observa un pico de matriz muy ancho que eluye a bajos tiempos de retención, presentando un máximo alrededor de los 11-12 min, para luego descender lentamente a la línea base. Por el tiempo de elución de esta señal, se deduce que los compuestos que la originan tienen características hidrofílicas, por lo que es posible que se trate de residuos de ácidos húmicos y/o fúlvicos que no alcanzaron a ser eliminados durante el procesamiento de las muestras. Estas sustancias húmicas (ácidos húmicos y ácidos fúlvicos) se definen en términos de sus características de solubilidad ácido-base. Son similares en forma estructural pero difieren en su peso molecular y en el contenido de los grupos funcionales; son componentes refractarios que se descomponen lentamente por lo que tienden a acumularse en el agua dándole un color que puede variar desde el amarillo hasta el café.

El tamaño del pico de matriz disminuye en el orden siguiente: Caltongo > La Candelaria > La Draga > San Diego, lo que indica una reducción de materia orgánica en los afluentes de la planta de tratamiento de Cerro de la Estrella comparados con los canales.

Los cromatogramas de las cuatro muestras fueron ampliados y examinados cuidadosamente para ver si presentaban señales a los tiempos de retención de los fármacos en estudio. En el caso de las muestras provenientes de los canales Caltongo y La Candelaria no se observó ninguna señal que indicara la presencia de alguno de los fármacos estudiados. Sin embargo, debido a que el pico de matriz en estas muestras es muy importante, se decidió fortificarlas a dos niveles de concentración y reanalizarlas para evaluar la detectabilidad de los analitos en aguas con alto contenido de materia orgánica. Los niveles de fortificación ensayados fueron indicados en la Parte Experimental de este trabajo (tabla IV-4), los cromatogramas obtenidos se muestran en las Figuras V-13 y V-14.

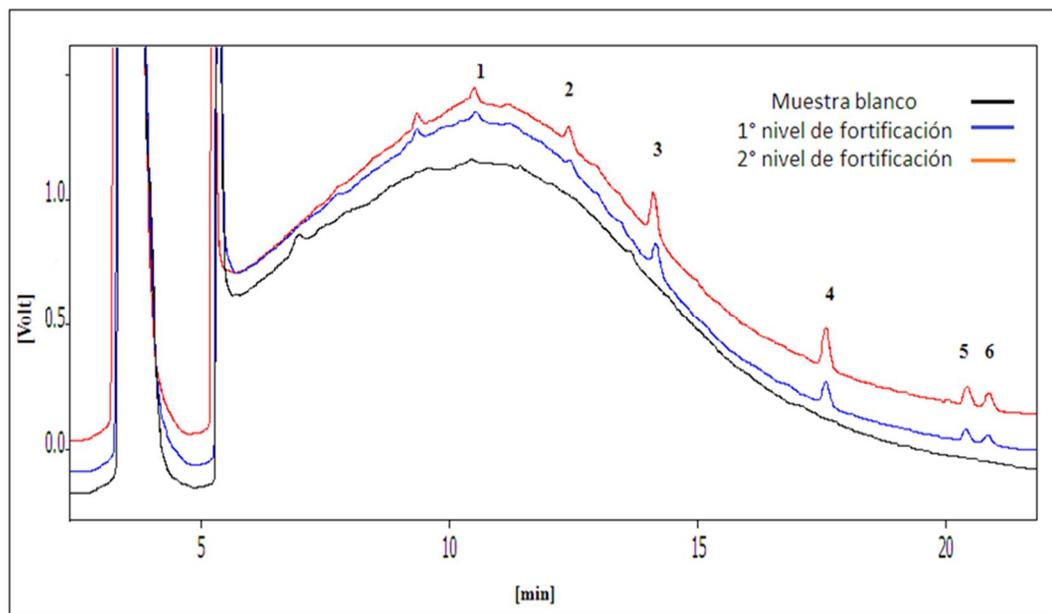


Figura V-13. Cromatogramas obtenidos del análisis de una muestra de agua colectada en el Canal de Caltongo (muestra blanco) y la misma muestra fortificada con los fármacos a dos niveles de concentración. Solutos: (1) enalapril 25 y 50 $\mu\text{g/L}$, (2) aspirina 10 y 20, (3) $\mu\text{g/L}$, ácido salicílico 8 y 16 $\mu\text{g/L}$, (4) naproxeno 3 y 6 $\mu\text{g/L}$, (5) indometacina 6 y 12 $\mu\text{g/L}$, (6) ibuprofeno 10 y 20 $\mu\text{g/L}$.

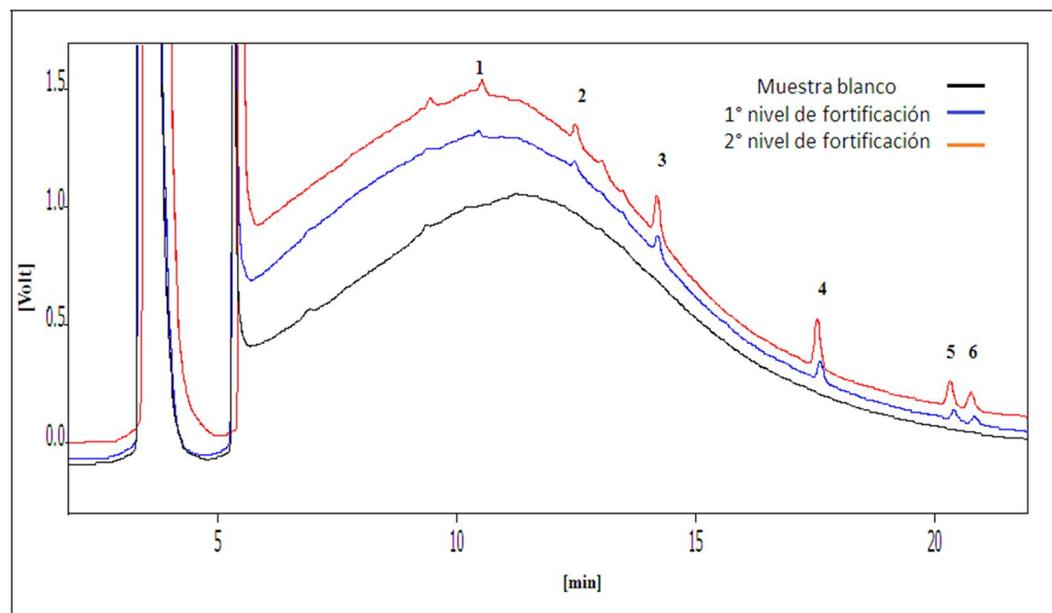


Figura V-14. Cromatogramas obtenidos del análisis de una muestra de agua colectada en el Canal La Candelaria (muestra blanco) y la misma muestra fortificada con los fármacos a dos niveles de concentración. Solutos: (1) enalapril 25 y 50 $\mu\text{g/L}$, (2) aspirina 10 y 20 $\mu\text{g/L}$, (3) ácido salicílico 8 y 16 $\mu\text{g/L}$, (4) naproxeno 3 y 6 $\mu\text{g/L}$, (5) indometacina 6 y 12 $\mu\text{g/L}$, (6) ibuprofeno 10 y 20 $\mu\text{g/L}$.

En los cromatogramas anteriores se observa claramente que los interferentes de la matriz afectan principalmente a los dos solutos más hidrofílicos -enalapril y aspirina- y en menor medida al ácido salicílico. Los compuestos más hidrofóbicos -naproxeno, indometacina e ibuprofeno- eluyen en una zona donde la absorbancia de fondo es menor, por lo que son poco afectados. El límite de detección experimental de un método se define como: “la concentración en la muestra que genera una señal de tres veces el ruido de fondo cuando dicha muestra es analizada según el método desarrollado”. Con esta base, se pueden establecer aproximadamente los límites de detección de los fármacos en las muestras de agua de los canales Caltongo y La Candelaria a partir de los cromatogramas mostrados en las Figuras V-13 y V-14. Para enalapril y aspirina, se alcanzaría a percibir una señal aproximadamente equivalente a tres veces el ruido de fondo de la región adyacente al pico para una concentración entre el primero y el segundo nivel de fortificación. Para los demás analitos, los límites de detección serían cercanos a la mitad o las dos terceras partes de la concentración utilizada en el primer nivel de fortificación. Estas consideraciones se resumen en la tabla V-17. Por otra parte, para una correcta cuantificación de los fármacos, si estuvieran presentes a concentraciones detectables en estas aguas, sería necesario utilizar el método de adiciones patrón en vez de la estandarización externa, de modo a tomar en cuenta los fuertes efectos de matriz.

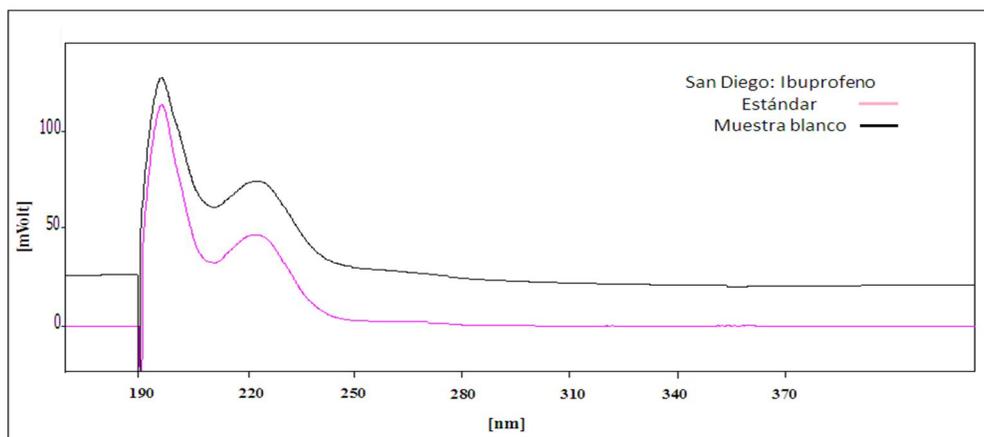
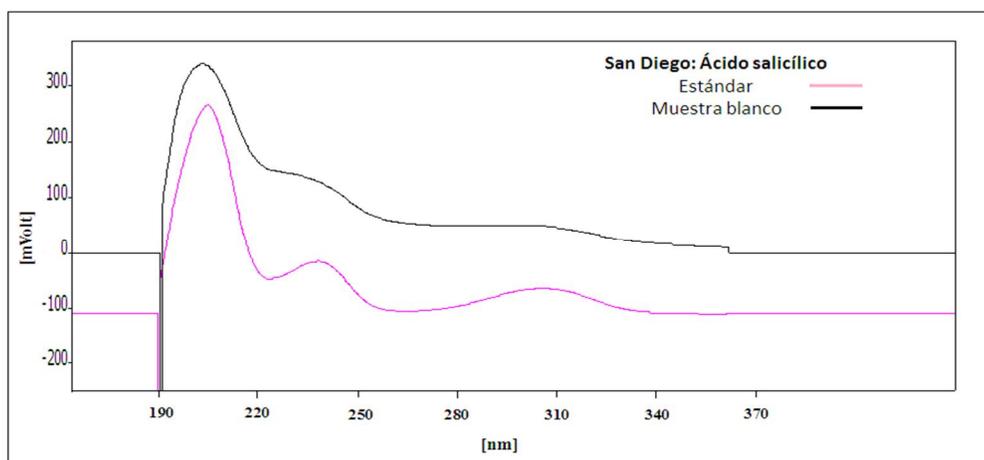
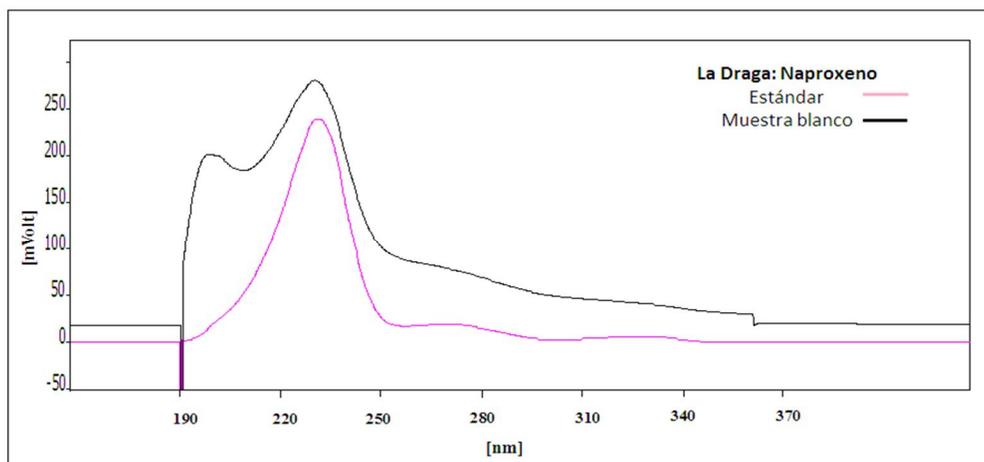
Tabla V-17. Evaluación de los límites de detección (LDM) de los fármacos en las muestras de agua de los canales Caltongo y La Candelaria

| Fármaco | LDM experimental (µg/L) |
|------------------|--------------------------------|
| Enalapril | ~35 |
| Aspirina | ~15 |
| Ácido salicílico | ~4 |
| Naproxeno | ~1.5 |
| Indometacina | ~4 |
| Ibuprofeno | ~6 |

Los cromatogramas obtenidos del análisis de las muestras provenientes de los afluentes La Draga y San Diego fueron más limpios (Figs. V-11 y V-12); al ampliarlos y examinarlos minuciosamente, se detectaron algunos picos cuyo tiempo de retención era muy parecido al de alguno de los fármacos. En el agua de La Draga se observó un pico cerca de los 18 min, tiempo que corresponde a la elución del naproxeno. En el agua de San Diego se observaron picos bien diferenciados a los 14, 20 y 21 min, tiempos que corresponden a la elución de ácido salicílico, indometacina e ibuprofeno, respectivamente.

La confirmación inequívoca de identidad de los picos que tentativamente fueron asignados a los cuatro fármacos requiere del uso de un espectrómetro de masas acoplado al cromatógrafo de líquidos. Puesto que no se contaba con este tipo de instrumentación, se utilizaron las capacidades del detector UV con arreglo de diodos para programar barridos espectrales a los tiempos de elución de los presuntos picos de fármacos en las muestras blanco. Los espectros de absorción UV se obtuvieron en el intervalo de 190 a 360 nm y se compararon con los espectros de nuestra biblioteca generada a partir de la inyección de

estándares de los fármacos puros, analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas. En la Figura V-15 se presenta la comparación de espectros para los cuatro fármacos.



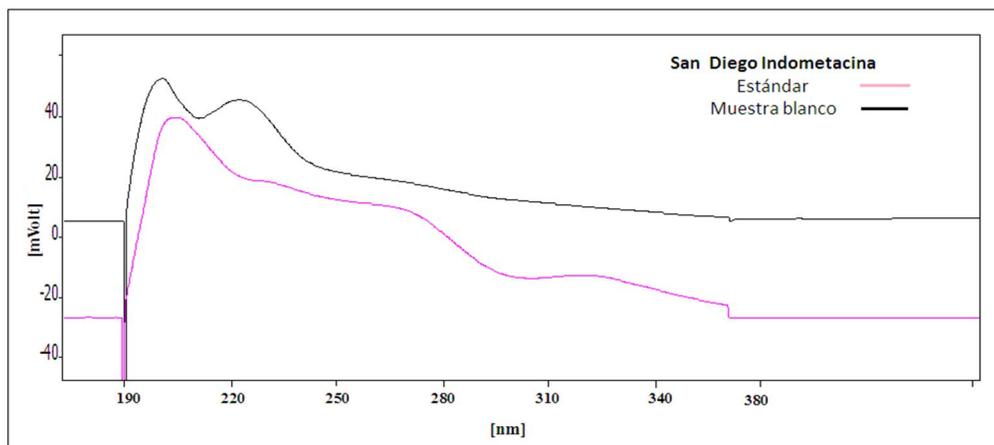


Figura V-15. Comparación de los espectros de absorción de los fármacos puros con los espectros de los picos que eluyeron al mismo tiempo de retención en las muestras de La Draga y San Diego.

Como puede observarse en las figuras que corresponden al naproxeno y al ácido salicílico, los espectros de absorción obtenidos para las muestras blanco difieren un poco con respecto al espectro del estándar puro. Esto puede deberse a que los picos eluyen acompañados de la matriz de la muestra, la cual contiene otros compuestos que contribuyen a la absorción medida, modificando el perfil del espectro con respecto al del fármaco puro. Las diferencias son un poco más notorias en el caso del naproxeno, en parte porque este compuesto fue detectado en el afluente de La Draga cuya matriz presentó mayor absorbancia de fondo (comparada con la de San Diego), y también porque fue el pico más pequeño entre los cuatro examinados, por lo que la influencia de la matriz es comparativamente más fuerte (0.8 V en la muestra de la Draga en comparación con San Diego que fue de 0.3 V). A pesar de las diferencias observadas, en ambos casos se constata que el pico máximo y las señales que le siguen en el espectro de las muestras blanco, se presentan a las mismas longitudes de onda que en el espectro del correspondiente estándar. Por lo tanto, la presencia de naproxeno en la muestra de La Draga y de ácido salicílico en la muestra de San Diego no puede descartarse.

Por otra parte, el espectro de absorción del ibuprofeno en el estándar y la muestra blanco es prácticamente idéntico, por lo que se puede afirmar con bastante confiabilidad que este compuesto sí estaba presente en la muestra colectada en el afluente San Diego. Cabe señalar que este compuesto por ser el más hidrofóbico eluye a un tiempo de retención suficientemente alto, donde la influencia de la matriz es mínima, particularmente en el caso de la muestra de San Diego.

Finalmente, en lo que se refiere al presunto pico de indometacina, la comparación de espectros arroja muchas dudas sobre la identidad inicialmente asignada. En primer lugar, el máximo del pico de mayor absorbancia en el espectro de la muestra blanco está significativamente desplazado a longitudes de onda más bajas en comparación con el estándar. Además, el perfil del espectro de la muestra blanco en la región de 250-360 nm es notoriamente diferente al del estándar. Dado que la indometacina, al igual que el ibuprofeno, eluye a tiempos de retención altos, donde los efectos de matriz son mínimos, las diferencias observadas en los espectros no pueden atribuirse a la influencia de la matriz. Por lo tanto, se concluye que

el pico que eluye al mismo tiempo de retención que la indometacina en el cromatograma de la muestra colectada en San Diego no se debe a este fármaco sino a otro compuesto.

Durante el transcurso de esta investigación se ensayaron diversos fármacos que finalmente fueron descartados, ya sea por su rápida degradación en medio acuoso (amoxicilina y ampicilina) o por problemas de baja recuperación en el proceso de EFS (acetaminofen y diclofenaco). Debido a ello, se sabía que en las condiciones cromatográficas empleadas para el análisis de las muestras, el diclofenaco eluía en un tiempo de retención muy cercano al de la indometacina. Por esta razón se pensó que el pico no identificado, mencionado en el párrafo anterior, podía ser diclofenaco ya que este fármaco es ampliamente utilizado. Con el fin de poner a prueba esta hipótesis, se analizó un estándar de diclofenaco bajo las condiciones cromatográficas establecidas y se obtuvo el espectro del correspondiente pico. En la Figura V-16 se compara el espectro del diclofenaco con el del pico no identificado que tiene un tiempo de retención semejante en la muestra blanco de San Diego. Los espectros fueron muy diferentes, por lo tanto, se concluye que dicho pico no se debe al diclofenaco.

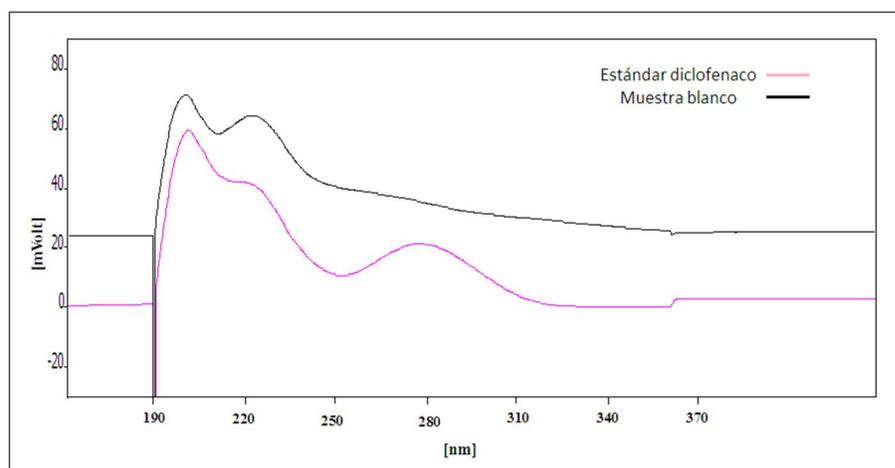


Figura V-16. Comparación del espectro de absorción del diclofenaco con el espectro del pico que eluye a un tiempo de retención semejante en la muestra colectada en San Diego.

En vista de los resultados anteriores, se consideró muy probable la presencia de naproxeno en la muestra de agua de La Draga y de ácido salicílico e ibuprofeno en la muestra de agua de San Diego (tabla V-18). Como una prueba adicional para corroborar la identidad de los picos asignados a estos fármacos en los cromatogramas de las muestras blanco, se decidió doparlas y reanalizarlas. Las muestras se fortificaron a tres niveles de concentración con el objeto de utilizar los resultados para una posterior cuantificación de los solutos por el método de adiciones patrón. Este método de cuantificación es especialmente apropiado cuando la composición de la muestra es desconocida o compleja y afecta la señal analítica. Sin embargo, para su aplicación se requiere demostrar que la respuesta del compuesto de interés en la muestra analizada

es lineal a los niveles de fortificación empleados. El supuesto subyacente en el método de adiciones patrón es que la matriz ejerce el mismo efecto sobre el analito añadido que sobre el analito originalmente presente en la muestra problema.

En los cromatogramas obtenidos se observó un incremento progresivo del tamaño de los picos que eluían al mismo tiempo de retención que algunos de los fármacos al aumentar la concentración añadida en las muestras fortificadas. Esto se aprecia claramente en las Figuras V-17 (La Draga) y V-18 (San Diego) que presentan secciones ampliadas de las regiones del cromatograma donde eluyen los fármacos cuya identidad se desea comprobar. Como puede constatarse, en ningún caso apareció un nuevo pico al fortificar y analizar las muestras, así como tampoco se aprecia un hombro o deformación en la señal observada. Aunque esta no es una prueba concluyente de identidad, combinada con la prueba de comparación de espectros confiere mayor certidud. Cabe señalar que en la muestra de San Diego también se observó un aumento progresivo del pico que eluye al tiempo de retención de la indometacina al fortificar la muestra con cantidades crecientes de este fármaco. Sin embargo, como ya se discutió, este analito no pasó la prueba de comparación de espectros.

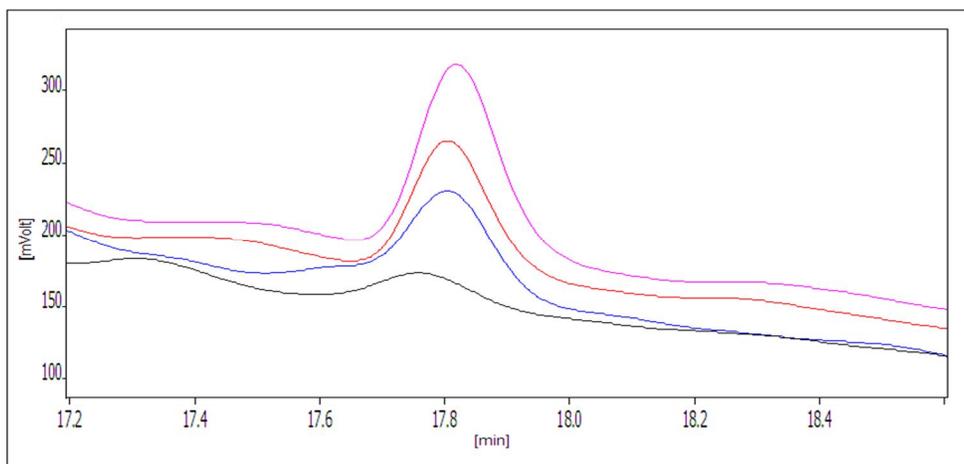


Figura V-17. Sección ampliada de la región donde eluye el naproxeno en los cromatogramas obtenidos del análisis de una muestra de agua colectada en La Draga, y la misma muestra fortificada con este fármaco a tres niveles de concentración.

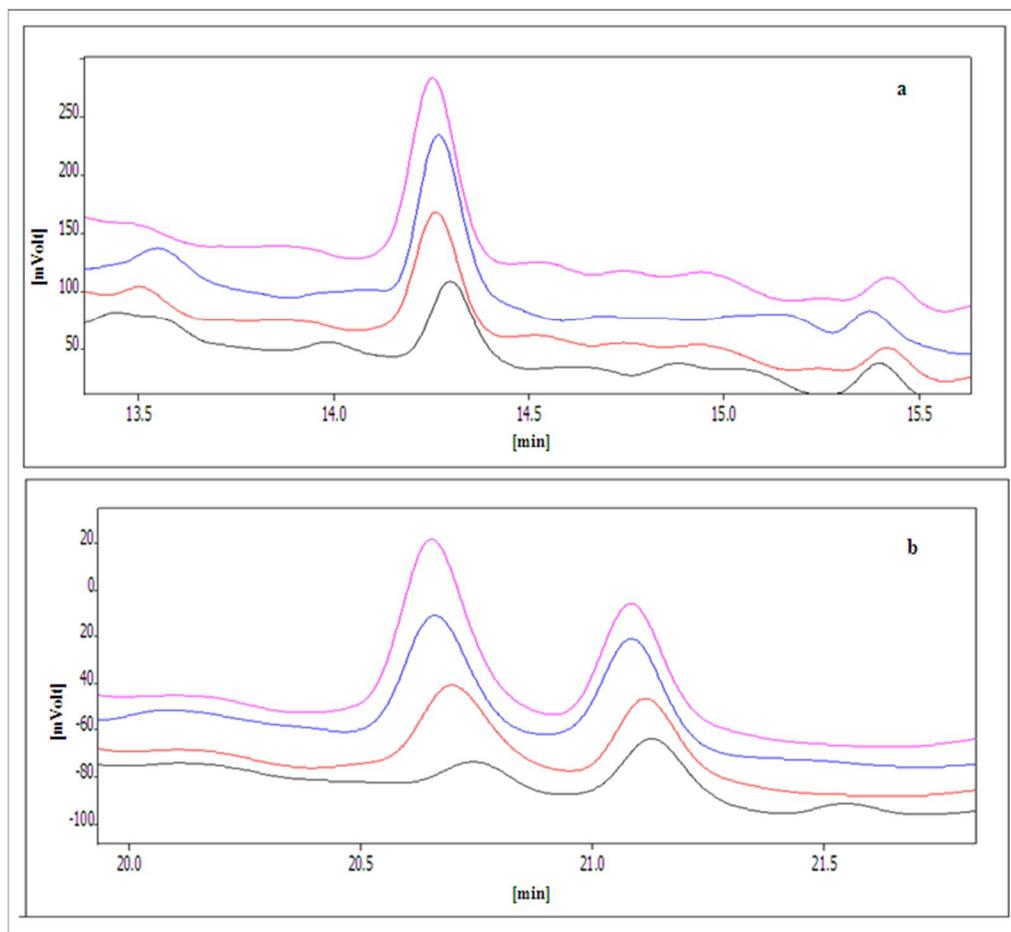


Figura V-18. Secciones ampliadas de las regiones donde eluyen (a) el ácido salicílico y (b) la indometacina y el ibuprofeno, en los cromatogramas obtenidos del análisis de una muestra de agua colectada en San Diego, y la misma muestra fortificada con los fármacos a tres niveles de concentración: ácido salicílico 4, 6 y 8 $\mu\text{g/L}$, indometacina 3, 4.5 y 6 $\mu\text{g/L}$, ibuprofeno 5, 7.5 y 10 $\mu\text{g/L}$.

En la Figura V-19 se presenta la gráfica de respuesta en función de la concentración añadida para la cuantificación de naproxeno en la muestra colectada en La Draga. Similarmente, en las Figuras V-20 y V-21 se presentan las correspondientes gráficas de adiciones patrón para la cuantificación de ácido salicílico e ibuprofeno en la muestra colectada en San Diego. En todos los casos, la señal analítica (altura de pico) se relacionó con las concentraciones añadidas de los respectivos fármacos y se llevó a cabo la regresión lineal mediante el ajuste de mínimos cuadrados. Una vez trazada la recta de regresión, ésta se extrapoló al punto del eje x en donde $y=0$; el valor absoluto de x en dicho punto corresponde a la concentración del fármaco en la muestra problema.

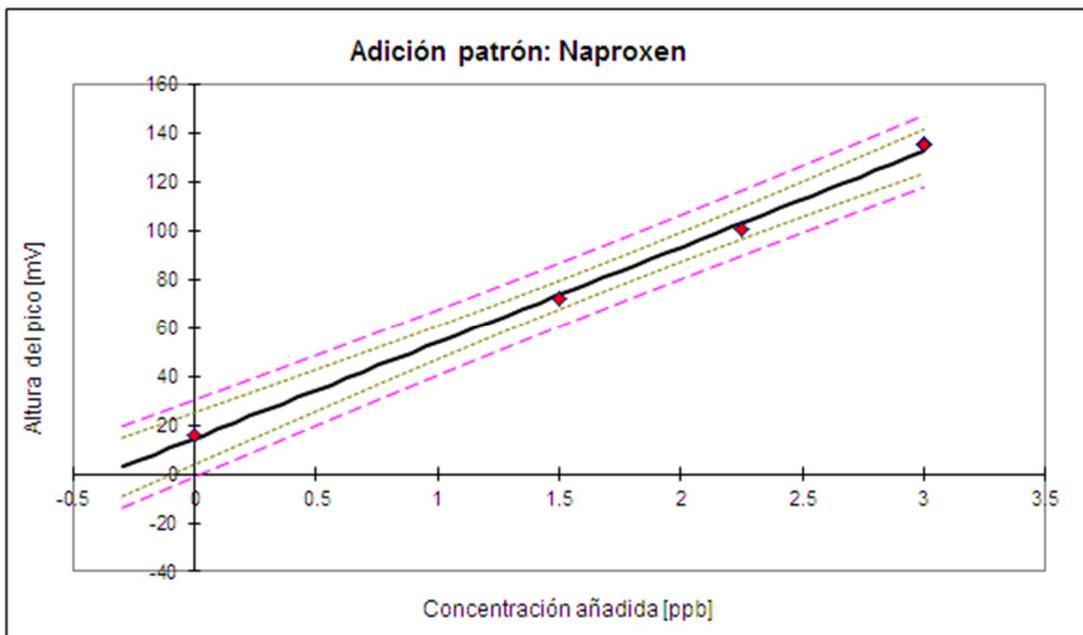


Figura V-19. Curva de calibración para la cuantificación de naproxeno en la muestra de agua del afluente La Draga por el método de adiciones patrón.

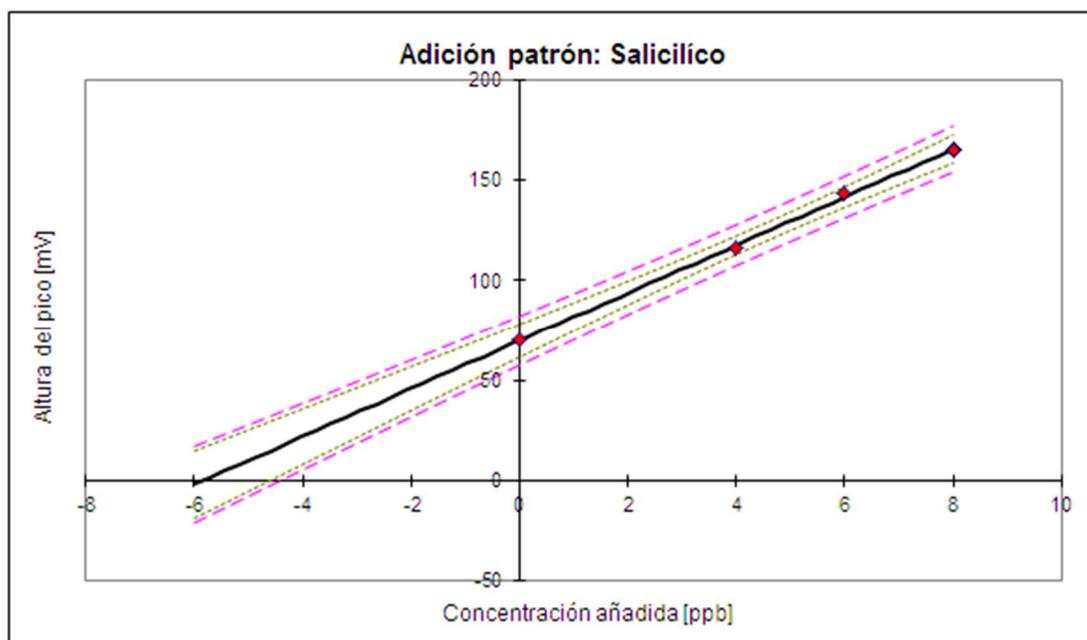


Figura V-20. Curva de calibración para la cuantificación de ácido salicílico en la muestra de agua del afluente San Diego por el método de adiciones patrón.

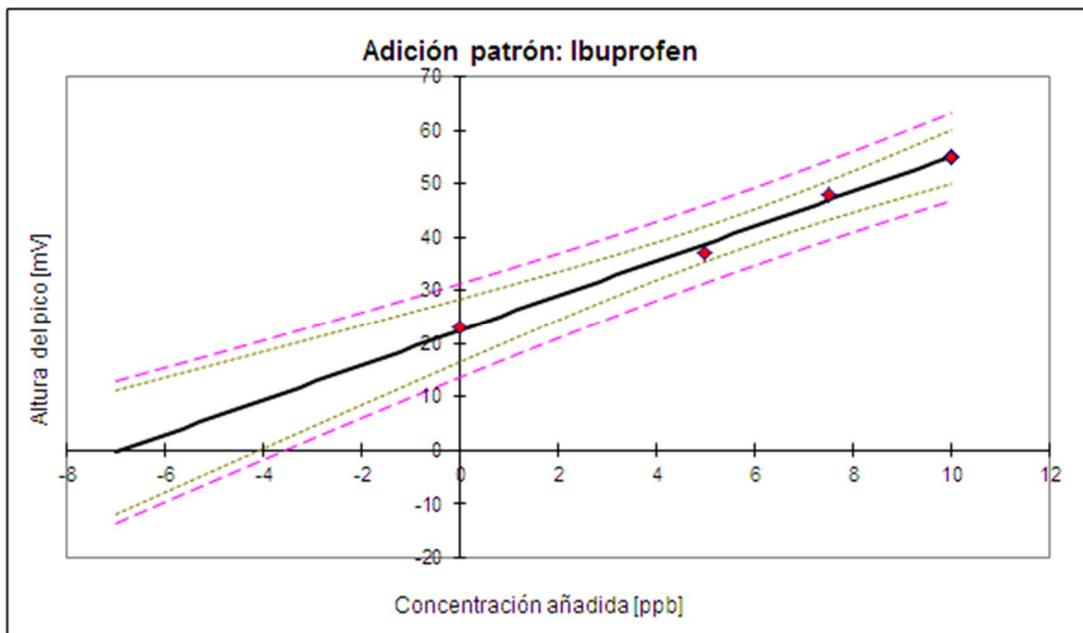


Figura V-21. Curva de calibración para la cuantificación de ibuprofeno en la muestra de agua del afluente San Diego por el método de adiciones patrón.

Como lo muestran las figuras anteriores, se observa una relación lineal entre la altura de pico y la concentración adicionada del fármaco en cuestión. En la tabla V-18 se reportan las ecuaciones de regresión de las rectas de calibración con sus correspondientes coeficientes de determinación (r^2), así como las concentraciones determinadas para los fármacos detectados en las muestras de La Draga y San Diego.

Tabla V-18. Determinación de la concentración de los fármacos detectados en muestras de agua de Xochimilco por el método de adiciones patrón

| Fármaco | Muestra | Ecuación de regresión $y = a + bx$ | r^2 * | Concentración ($\mu\text{g/L}$) |
|------------------|-----------|---------------------------------------|---------|--------------------------------------|
| Naproxeno | La Draga | $y = 10 + 39x$ | 0.9990 | ~ 0.3 |
| Ácido salicílico | San Diego | $y = 70 + 12x$ | 0.9991 | 6 ± 2 |
| Ibuprofeno | San Diego | $y = 22 + 3.3x$ | 0.9940 | 7 ± 4 |

* Coeficiente de determinación

De acuerdo con los valores de esta tabla, la concentración calculada para naproxeno es inferior al límite de cuantificación determinado con muestras sintéticas de agua grado reactivo fortificada con los fármacos (tabla V-16). Por ello, el valor reportado debe tomarse como una concentración aproximada. Es de notar que, aplicando el método desarrollado, la detectabilidad de este soluto en muestras de agua que no contienen una alta carga de materia orgánica es parecida a la que se obtuvo con muestras de agua muy pura.

Por otra parte, es importante destacar que las concentraciones de ácido salicílico y de ibuprofeno encontradas en el afluente San Diego son sumamente altas en comparación con las concentraciones reportadas en la literatura para estos fármacos en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales ($< 0.2 \mu\text{g/L}$, tabla II-8); incluso son más altas que las concentraciones medidas en influentes de las plantas, es decir en aguas residuales no tratadas. Curiosamente, estos fármacos no fueron detectados en el afluente La Draga. Dado que ambos afluentes son alimentados con aguas tratadas procedentes de la planta de Cerro de la Estrella, llama la atención por qué sólo se detectó la presencia de estos fármacos en San Diego. Esta situación debe tomarse como una alerta pues podría existir un foco de contaminación particular en la zona de San Diego. Es necesario realizar monitoreos regulares del sitio para ver si los altos niveles de ibuprofeno y ácido salicílico son una constante en el tiempo.

La estimación de la detectabilidad de los fármacos en las aguas de los afluentes La Draga y San Diego se hizo de la misma manera que en el caso del agua de los canales. A partir de los cromatogramas de las muestras fortificadas a 3 niveles de concentración (tabla IV-5), se dedujo aproximadamente la concentración que daría un pico de tamaño equivalente a tres veces el ruido de fondo de la zona circundante. Los límites de detección experimentales, se presentan en la tabla V-19.

Tabla V-19. Evaluación de los límites de detección (LDM) de los fármacos en las muestras de agua de los afluentes La Draga y San Diego

| Fármaco | LDM experimental ($\mu\text{g/L}$) | Muestra usada para evaluación |
|------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| Enalapril | ~19 | ambas |
| Aspirina | ~8 | ambas |
| Ácido salicílico | ~2 | La Draga |
| Naproxeno | ~0.3 | San Diego |
| Indometacina | ~1 | La Draga |
| Ibuprofeno | ~2 | La Draga |

V.3.2. Descriptores físicos y químicos de las muestras colectadas en Xochimilco

Para los sitios de muestreo seleccionados se midieron los siguientes descriptores físico-químicos: profundidad (Z), color aparente, temperatura (T), oxígeno disuelto (OD), saturación de oxígeno (%SO), demanda química de oxígeno (DQO), demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅), pH, conductividad (K₂₅), sólidos totales disueltos (SDT) y sólidos suspendidos (SS), además de los valores de PPCs ya comentados (Tabla V-20).

Tabla V-20. Descriptores físicos-químicos de los sitios de muestreo

| | Caltongo | Candelaria | La Draga | San Diego |
|---|-----------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| Z _{MAX} (m) | 1.3 | 1.3 | 1.7 | 2.2 |
| Color aparente | Verde | Amarillo-verdoso | Amarillo-transparente | Amarillo-transparente |
| T (°C) | 20.9 ± 0.6 | 20.1 ± 1.5 | 20.4 ± 0.0 | 20.2 ± 0.0 |
| pH | 8.0 ± 0.1 | 8.1 ± 0.3 | 7.8 ± 0.0 | 7.5 ± 0.0 |
| Conductividad (K ₂₅ , μS/cm) | 1165 ± 226 | 1142 ± 94 | 922 ± 3 | 605 ± 27 |
| OD (mg/L) | 9.3 ± 1.1 | 5.1 ± 3.9 | 5.1 ± 0.0 | 5.7 ± 0.0 |
| % SO | 134 ± 17 | 85 ± 59 | 85 ± 1 | 80 ± 0 |
| DBO ₅ (mg /L) | 20 | 9 | 37 | – |
| DQO (mg /L) | 108 | 78 | 78 | – |
| SDT (mg/L) | 644 ± 125 | 645 ± 57 | 516 ± 2 | 340 ± 15 |
| SS (mg/L) | 38 | 21 | 24 | – |
| MIMA ^a (V) | 1.5 | 1.1 | 0.8 | 0.3 |
| Enalapril (ppb) ^b | < 35 | < 35 | < 19 | < 19 |
| Aspirina (ppb) ^b | < 15 | < 15 | < 8 | < 8 |
| Ác. Salicílico (ppb) ^b | < 4 | < 4 | < 2 | 6 |
| Naproxeno (ppb) ^b | < 1.5 | < 1.5 | ~0.3 | < 0.3 |
| Indometacina (ppb) ^b | < 4 | < 4 | < 1 | – |
| Ibuprofeno (ppb) ^b | < 6 | < 6 | < 2 | 7 |

Z_{MAX}: profundidad máxima del cuerpo acuático.

T °, pH, K₂₅, OD, %SO, SDT valores consideran promedio ± desviación estándar (n=60)

^a MIMA: estima de los interferentes, es decir, es el valor máximo de la señal en los cromatogramas obtenidos del análisis de las muestras debido a los interferentes de la matriz acuosa en el lapso de 5-15 min.

^b Los valores con signo “ < ” indican el límite de detección experimental de los fármacos.

En negritas se presentan los fármacos detectados por el método desarrollado.

– Sin datos.

Las profundidades observadas en los cuatro sitios seleccionados muestran un sistema acuático somero, con una profundidad mínima de 1.3 m para los canales y máxima para el afluente San Diego, con 2.2 m. Los sistemas acuáticos de escasa profundidad y una amplia frontera con los sistemas terrestres, como es el caso de Xochimilco, se consideran humedales. Los humedales son ecosistemas de gran importancia y deben ser preservados con el fin de aumentar su funcionalidad ecológica, especialmente los humedales urbanos y periurbanos, como son los de Xochimilco, protegiéndolos de los impactos negativos causados por el creciente vertido de aguas contaminadas. Dicha situación genera el menoscabo de los servicios ecosistémicos que prestan estos sistemas acuáticos a sus habitantes (Humedales y Urbanización, www.ramsar.org). A continuación se analizan algunos parámetros indicadores de contaminación en los sitios muestreados.

El color aparente del agua es un descriptor cualitativo que ofrece información interesante en cuanto a una primera impresión de la calidad del agua. El color se suele expresar comparándolo con patrones convencionales (Margalef, 1985); sin embargo, en este estudio sólo se hizo de forma apreciativa, ya que no se pudo utilizar una escala, como la de Forel-Ule (APHA, 2005), que nos hubiera permitido hacer una mejor comparación. Para registrar el color de los canales y afluentes estudiados se recurrió a la observación directa de al menos tres observadores, y –a pesar de que la observación del color es subjetivo (Wetzel, 2001)-, hubo coincidencia en los colores asentados en la tabla V-20, pues variaron de un verde oscuro a amarillo-verdoso o amarillo claro. El verde oscuro probablemente se relaciona con la presencia de fitoplancton, lo que se refuerza al haber observado sobresaturaciones de oxígeno (producto típicamente de procesos fotosintéticos que superan a los respiratorios), es decir, que el sitio de Caltongo posiblemente presenta condiciones hipotéticamente eutróficas con base en el color y la sobresaturación de oxígeno. La Draga y San Diego presentaron condiciones más cercanas a la de los vertidos, con colores amarillentos, sin el desarrollo evidente de crecimientos algales. Candelaria aparentemente mostró una situación intermedia. Es interesante observar que la estima de interferente (MIMA) es superior a 1 V en los dos sitios con coloraciones verdosas y presumiblemente con presencia de algas, que en los sitios cercanos a la descarga de los efluentes, donde, al parecer, todavía no se habían empezado a desarrollar comunidades autóctonas, dado el color amarillento y la transparencia de sus aguas. Lo anterior posiblemente está indicando que la técnica puede ser más útil para aguas contaminadas que no han desarrollado biomasas algales.

En general se observó que las temperaturas registradas oscilaron entre los 20°C y los 21°C, atribuibles a la radiación solar por la época del año (octubre) y las horas de muestreo (entre 12:00 y 16:00 hrs). Estos valores son similares a los observados por otros autores para esta zona (Ortiz y Ruvalcaba, 2005; Mazari *et al.*, 2008; Zambrano *et al.*, 2008; Díaz, 2009). Cabe mencionar que dichas temperaturas no ejercen efecto alguno en la atenuación de la actividad farmacológica, puesto que ésta se ve afectada sólo con temperaturas superiores a 30°C (Remington, 2000).

El pH varió entre valores inferiores a 7.8 (San Diego y La Draga) y ≥ 8 (Candelaria y Caltongo). De acuerdo con la relación que existe entre el pH y las cantidades relativas presentes de los compuestos inorgánicos de carbono, se puede decir que en estos sistemas se encuentra una mayor cantidad de HCO_3^- (bicarbonatos), en comparación con las concentraciones de CO_2 y $\text{CO}_3^{=}$. Las aguas con un contenido dominante de bicarbonatos son características de sistemas acuáticos de relativamente baja mineralización (aguas dulces; Margalef, 1983). Al igual que ocurre con la temperatura, los valores registrados,

ligeramente básicos, no ejercen ningún efecto sobre los compuestos farmacéuticos en la columna de agua, ya que bajo estas condiciones los analitos se encuentran en forma ionizada, asegurando con ello su permanencia en la matriz acuosa (Togola y Budsinki, 2007).

En general, la mineralización (conductividad y salinidad medida como SDT) es un parámetro “compuesto” que permite evaluar de manera global la magnitud de las concentraciones iónicas. La conductividad estandarizada a una temperatura constante depende de la cantidad de sólidos disueltos y de la dominancia iónica, de forma que cuanto mayor sea el contenido de SDT, mayor será la conductividad eléctrica; cuando se trata de una contaminación de tipo doméstico, como la de Xochimilco, las lecturas son aproximadamente de 50 a 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (APHA, 2005; CONAGUA, 2009). La mineralización fue similar entre Caltongo y Candelaria (K_{25} 1165 y 1142 $\mu\text{S}/\text{cm}$, respectivamente y SDT, ~645 mg/L,) y menor en San Diego (K_{25} 605 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y SDT 340 mg/L). Estos valores de conductividad y salinidad son similares a los reportados por Mazari *et al.* (2008) y Díaz (2009). Según diversos autores (Margalef, 1985; APHA, 2005), los valores obtenidos indican que se trata de aguas dulces con mineralizaciones intermedias (San Diego, La Draga) a relativamente elevadas (Caltongo, Candelaria). Dado que son aguas dulces de mineralización intermedia a elevada, es improbable que la concentración de iones influya en la presencia de los analitos de interés, es decir, no se detecta el riesgo de que haya una disminución de solubilidad en los compuestos orgánicos (lo que ocurriría si las salinidades fueran mayores). Togola y Budsinki (2007) encontraron que este efecto varía con los grupos funcionales de los compuestos: para compuestos básicos, la solubilidad disminuye al aumentar la concentración de sales; en cambio, la solubilidad de los compuestos ácidos no varía con respecto a este parámetro. Ellos sugieren que, al aumentar las sales en el agua, aumenta también la fuerza iónica de ésta y, con ello, la hidrofobicidad de los compuestos ácidos.

En relación con el oxígeno, aunque cada gas tiene una capacidad individual para disolverse en el agua, la disolución está controlada por una serie de factores, tales como temperatura y presión del agua (relacionado con la profundidad), presión parcial del gas (relacionada con la altitud) y la concentración de iones disueltos. En latitudes tropicales, la posibilidad de disolución de los gases es menor, ya que las temperaturas de los ambientes acuáticos suelen ser más elevadas (Horne y Goldman, 1994). En Xochimilco, la profundidad y la salinidad no son un factor que afecte la solubilidad del oxígeno, pero sí la altura sobre el nivel del mar -que hace que la presión parcial atmosférica sea menor- y las temperaturas -relativamente elevadas-. Por lo tanto, el 100% de saturación de oxígeno se alcanzará en valores de OD menores, de aproximadamente 6.9 mg/L (calculado según Wetzel y Likens, 1991), siendo éste un valor de equilibrio producto de la difusión física, sin afectaciones ni de la fotosíntesis, ni de la respiración. En los resultados obtenidos, vemos que no se alcanza el valor aproximado de equilibrio. Los mayores valores de oxígeno disuelto se obtuvieron en Caltongo (9.3 mg/L, 134% SO) y los menores en La Draga y Candelaria (~5.5 mg/L, 80-85% SO). Como ya se indicó al comentar el color, en Caltongo los altos niveles de oxígeno probablemente sean producto de una mayor producción primaria que genera elevadas cantidades de oxígeno en el sistema (Wetzel, 2001); lo anterior, a pesar de una DBO_5 relativamente elevada, lo que indica también que la carga de materia orgánica del sistema está consumiendo oxígeno, es decir, se puede decir que Caltongo está liberando oxígeno hacia el exterior. En los demás sitios, el oxígeno se encuentra subsaturado, indicando que los procesos de respiración dominan sobre los de fotosíntesis. Aunque el factor de la producción de oxígeno por la fotosíntesis no fue medido, se describe ampliamente en la literatura como responsable de la sobresaturación de oxígeno (Kemka *et al.*, 2006;

Roldán y Ramírez, 2008). En Candelaria, La Draga y San Diego se observa una disminución de su concentración. Esto puede ser resultado de procesos de consumo, lo que señala el predominio de la respiración y de la descomposición de la materia orgánica presente en el medio (Wetzel, 2001).

La Draga presentó el mayor valor de DBO_5 (junto a una menor concentración de OD), lo que podría ser indicativo de una mayor cantidad de desechos biodegradables.

Sólo se observaron cantidades superiores al valor de detección para el naproxeno en La Draga, y llama la atención los valores de franca contaminación del ácido salicílico y el ibuprofeno en San Diego, puesto que rebasan ampliamente la concentración establecida por la US FDA de $1 \mu\text{g/L}$, valor que resulta ser el límite para el requerimiento de una evaluación de riesgo ambiental. En general, vemos que las aguas con mayor interferencia (por eutrofia, como parece ocurrir en Caltongo, y quizá por algún vertido no detectado, pero que pueda alterar a los organismos, como podría ocurrir en Candelaria), presentan dificultades para la detección de los analitos, mientras que aguas de vertido con menores interferencias, permiten esta detección. Por lo anterior, no se recomienda la aplicación de la técnica desarrollada en aguas eutróficas, ni de vertidos de características más complejas (con base en valores de MIME por encima de 1 V), a menos que se mejore la técnica de pre-purificación de la muestra antes de su inyección al cromatógrafo. Con la técnica que se ha desarrollado, la recomendación es aplicarla a las aguas cercanas a los vertidos en Xochimilco, a condición de que el valor de MIME sea inferior a 1 V, e idealmente, inferior a 0.5 V.

VI. Conclusiones

- Se desarrolló un método analítico para la determinación de residuos de fármacos de uso común, a niveles de concentración del orden de las partes por billón (ng/mL) en aguas naturales y tratadas. Los fármacos contemplados en el método son: enalapril, aspirina, ácido salicílico, naproxeno, indometacina e ibuprofeno.
- El método propuesto es relativamente simple y sólo requiere de instrumentación convencional con la que cuentan todos los laboratorios dedicados a análisis ambientales. Este método consta de los siguientes pasos: pre-purificación de la muestra por extracción líquido-líquido, preconcentración de los analitos por extracción en fase sólida e inyección del extracto para su análisis por cromatografía de líquidos con detección UV.
- La validación del método con muestras sintéticas de agua grado reactivo fortificada con el grupo de fármacos demostró que éste es lineal en el rango de concentraciones estudiado, con excelente precisión para estos niveles de concentración (desviación estándar relativa < 8%) y con aceptables recobros para todos los compuestos ($\geq 70\%$).
- Con el procedimiento propuesto, el factor de preconcentración de la muestra es de 100 veces, lo que permitió alcanzar límites de detección en muestras sintéticas inferiores a 1 ppb para todos los fármacos, con excepción del enalapril cuyo límite de detección fue de 1.5 ppb. Cabe señalar que los límites de detección del presente método pueden ser reducidos en varios órdenes de magnitud si se emplea como detector un espectrómetro de masas en vez del UV.
- El método propuesto fue aplicado a cuatro diferentes muestras de agua colectadas en Xochimilco; dos de ellas provenían de los canales Caltongo y La Candelaria, y las otras dos de San Diego y La Draga, afluentes de la planta de tratamiento de aguas residuales Cerro de la Estrella. Sólo en estas dos últimas muestras se detectó la presencia de algunos de los fármacos estudiados. Las concentraciones determinadas por el método de adiciones patrón fueron: naproxeno ~0.3 ppb (La Draga), ácido salicílico 5.4 ppb (San Diego) e ibuprofeno 6 ppb (San Diego).
- Los límites de detección del método en estas difíciles matrices fueron más altos, particularmente en las muestras de los canales Caltongo y La Candelaria debido a su alta carga de materia orgánica. Por tal motivo, no se descarta la presencia de residuos de fármacos en estas aguas. Las altas concentraciones de ibuprofeno y ácido salicílico encontradas en el afluente San Diego son un llamado de alerta que debe ser atendido estableciendo programas de monitoreo regular de estas sustancias en esta zona de Xochimilco.
- El presente método, a pesar de sus limitaciones en cuanto a sensibilidad, puede convertirse en una alternativa menos costosa y más fácil de implementar para dar un seguimiento rutinario a la presencia de fármacos de alto consumo en cuerpos de agua susceptibles a este tipo de contaminación.

Recomendaciones

A futuro, sería recomendable realizar un trabajo más exhaustivo conducente a la puesta a punto de la etapa de pre-purificación de la muestra, con el fin de que la técnica desarrollada sirva asimismo para detectar posibles analitos en aguas de elevada interferencia (e.g., aguas eutróficas). Lo anterior permitirá conocer si las aguas de desecho que están pasando por un proceso de tratamiento secundario (biológico, i.e., crecimientos algales que coadyuvan a transformar la materia orgánica contaminante en nutrientes y biomasa; CONAGUA, 2009), todavía contienen cantidades apreciables de los analitos, o bien si éstos ya han sido eliminados del sistema.

Sería asimismo recomendable hacer un muestreo intensivo con el fin de conocer la incidencia de estos analitos, por lo menos -en relación con la técnica actualmente desarrollada- en aquellos puntos de vertidos que permitan mantener un factor de interferencia (MIME) inferior idealmente a 0.5 V.

A la par de estos muestreos, también sería recomendable planear un muestreo limnológico de las mismas estaciones, considerando los factores analizados en el presente trabajo, así como luz, reserva alcalina, nutrientes, otros contaminantes, etc., con el fin de contar con un marco de referencia más completo que permita deducir si la presencia de otros compuestos, o las condiciones ambientales en la columna de agua, enmascaran la presencia de los compuestos farmacéuticos, disminuyendo su concentración.

Por último, convendría llevar a cabo el estudio científico a la par que uno socio-económico, con el objeto de detectar orígenes y posibles efectos de estos fármacos en el ambiente de Xochimilco.

VII. Bibliografía

Aga D., 2008. Fate of pharmaceuticals in the environment and in water treatment systems. CRC Press, Taylor & Francis Group, Estados Unidos, pp. 3-101.

Angeles-Chimipal P., Medina Flores M., Molina Rodríguez J., 1992. Automedicación en población urbana de Cuernavaca, Morelos. *Salud Pública de México*, 34: 554-561.

APHA-AWWA-WPCF. 2005. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Ed. Díaz de Santos, Madrid, pp. 515-860.

Aréchiga E., 2004. De la exuberancia al agotamiento. Xochimilco y el agua 1882-2004. En: *A la orilla del agua. Política urbanización y medio ambiente. Historia de Xochimilco en el siglo XX*, Terrones M. (Ed.). GDF / Delegación Xochimilco / Instituto Mora, México D.F., pp. 97-149.

Bahamonde Soria R., 2011. Desarrollo de una metodología analítica por EFS-CLAR/UV para la determinación de sulfas a niveles traza en aguas ambientales. Tesis de maestría, Posgrado de Ciencias Químicas, UNAM, México, pp. 6-88.

Barceló D., 2003. Emerging pollutants in water analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 22: xiv-xvi.

Benz D., Paxeus N. A., Ginn T. R., Loge F. J., 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials*, 122: 195-204.

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

Boyd G.R., Reemtsma H., Grimm D.A., Mitra S., 2006. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario Canada. *Science of the Total Environment*, 311: 135-149.

Canifarma: <http://canifarma.com.mx> (Último acceso: 15 de diciembre de 2010).

Castiglioni S., Fanelli R., Calamari D., Bagnati R., Zuccato E., 2004. Methodological approaches for studying pharmaceuticals in the environment by comparing predicted and measured concentrations in River Po, Italy. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39: 25-35.

Castillo Alanís A., 2008. Identificación y cuantificación de PPCP's en aguas residuales por microextracción en fase sólida – cromatografía de gases – espectrometría de masas (MEFS – CG – EM). Tesis de Maestría, UNAM, México, pp. 6-90.

CONAGUA/ Indicadores de agua, 2009. www.cna.gob.mx (último acceso: 15 de diciembre de 2010)

Cortacans Torre J., Hernández Lehman A., Castillo González I., Montes Carmona E., Hernández Muñoz A., 2005. Presencia de fármacos en aguas residuales y eficacia de los procesos convencionales en su eliminación. Cátedra de ingeniería sanitaria y ambiental, Universidad Politécnica de Madrid, pp.1-30.

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

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

Daghton C. G., 2004. Non-regulated water contaminants: Emerging research. *Environmental Impact Assessment Review*; 24: 711-732.

Daughton C. G., 2007. *Pharmaceuticals in the environment: Sources and their management*, Chapter 1, 1-58, In *Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the eater cycle* (M. Petrovic and D. Barceló, Eds.), *Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry series* (D. Barceló, Ed.), Elsevier Science; 50: 564-600.

Díaz Torres E., 2009. Determinación de disruptores endocrinos por cromatografía de gases-masas en la zona lacustre de Xochimilco, Distrito Federal. Tesis de Maestría, UNAM, México, pp. 10-60.

Durán Álvarez J., 2009. Cuantificación de doce contaminantes emergentes, provenientes del agua residual empleada para riego, en suelos del distrito de riego 03 "Tula" Hidalgo. Tesis de Maestría, UNAM, México, pp.16-113.

Gobierno del Distrito Federal en Xochimilco-UNESCO, 2005. Proyecto para la identificación participativa de un plan de rehabilitación integral del patrimonio cultural de Xochimilco. México D. F.

GDF, 2005a. SMA, programa de retribución por la conservación de servicios ambientales en reservas ecológicas comunitarias. México D. F.

GDF, 2005b. Decreto que contiene el programa delegacional de desarrollo urbano para la Delegación del Distrito Federal en Xochimilco. México D. F.

Gros M., Petrovic M., Barceló D., 2006. Development of a multiresidue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewater. *Talanta*, 70: 678:690.

Halling-Sorensen B., Nielsen N., Lansky P. F., Ingerslev F., Hansen Lützholf H. C., Jorgensen S. E., 1998. Ocurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment: A review. *Chemosphere*, 36: 357-394.

Harris C. D., 1999. *Análisis químico cuantitativo*. 2ª ed., Reverté, Barcelona, pp. 692-720.

Heberer T., 2002a. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data. *Toxicology Letters*, 131: 5-17.

Heberer T., 2002b. Tracking persistent pharmaceuticals residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology*; 266: 175 -189.

Hennion M.C., Scribe P., 1993. *Environmental analysis techniques*. Elsevier Science; 9: 361-372.

Hilton M.J., Thomas K.V., 2003. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1015: 129-141.

Hirsch R., Ternes T., Heberer K., Kratz K-L., 1998. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 225: 109-118.

Horne A. J., Goldman G. R., 1994. *Limnology*. 2nd edition. McGraw-Hill Co., New York, New York, USA. 480 p.

Huetos O., 2004. Estudio comparativo y evaluación de diferentes técnicas cromatográficas en el análisis de residuos corticosteroides en muestras biológicas. Tesis Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España, pp. 16-140.

INEGI, 2006. Cuaderno estadístico delegacional de Xochimilco, Distrito Federal, México.

Kemka N., Njine T., Cebase S. H., Menbohan S. F., Nola M., Monkiedje A., Niyitegeka D., Compère P., 2006. Eutrophication of lakes in urbanized areas: the case of Yaoundé Municipal Lake in Cameroon, Central Africa. *Lakes, Reservoirs and Management* 11: 47–55.

Margalef L. R., 1985. *Limnología*. Ed. Omega, Barcelona, 1005 p.

Mazari-Hiriart M., Ponce de León S., López-Vidal Y., Islas-Macías P., Amieva-Fernández R., Quiñones-Falconi G., 2008. Microbiological implications of periurban agriculture and water reuse in Mexico City. *PLoS ONE*, 3: 1-8.

Miao X.S., Bishay F., Chen M., Metcalfe C.D., 2004. Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environment Science Technology*., 38: 3533-3541.

Miao X. S., Metcalfe C. D., 2003. Determination of carbamazepine and its metabolites in aqueous samples using liquid-chromatography-electrospray ionization tandem mass-spectrometry. *Analytical Chemistry*, 75: 3731-3738.

Miller J., Miller J., 2002. *Estadística y quimiometría para química analítica*. Prentice Hall, España, pp. 35-90.

Moeder M., Schrader S., Winkler M., Popp P., 2000. Solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry of biologically active substances in water samples. *Journal of Chromatography A*, 873:95-106.

NMX-AA-028-SCFI-2001. Análisis de agua-determinación de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO5) en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba (cancela a la NMX-AA-028-1981).

NMX-AA-030-SCFI-2001. Análisis de agua-determinación de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba (cancela a la NMX-AA-030-1981).

Ortiz Ramos J., Ruvalcaba García A., 2005. Evaluación del estado trófico de Xochimilco México. Tesis de Licenciatura, UNAM, México, pp. 11-70.

Pichon V., 2000. Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water. *Journal of Chromatography A*, 885: 195-215.

Petrovic M., Eljarrat E., López de Alda M., Barceló D., 2004. Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitors strategies occurrence data. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378: 549-562.

Putschew A., Schittko S., Jekel M., 2001. Quantification of triiodinated benzene derivatives and X-ray contrast media in water samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 930: 127-134.

Quintana B., Reemtsma T., 2004. Sensitive determination of acidic drugs and triclosan in surface and wastewater by ion-pair reverse-phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18: 765-774.

Ramsar: http://www.ramsar.org/cda/es/ramsar-about-40-k8/main/ramsar/1-36%5E24938_4000_2 (ultimo acceso Noviembre 2011)

Remington Gennaro A., 2000. *Farmacía*, Tomos 1-3. 20ª ed., Panamericana.

Richardson M. L., Bowron J. M., 1985. The fate of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 37: 1-12.

Rodier J., 1990. *Análisis de las aguas: aguas naturales, aguas residuales y agua de mar*. Ed. Omega, Barcelona.

Rodríguez Mozaz S., López de Alda M., Barceló D., 2007. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. *Journal of Chromatography A*, 1152: 97-115.

Rodríguez Carranza R., 2005. *Vademecum académico de medicamentos*. 4ª ed., Mc Graw Hill.

Roembke J., Knacker Th, Stahlschmidt-Allner P., 1996. Study about environmental problems in context with drugs. Vorhabens Nr. 106: 4-121. Umweltbundesamt, Berlín.

Roldán, G., Ramírez, J., 2008. Fundamentos de Limnología Neotropical. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Segunda Edición. Editorial Universidad de Antioquía.

Romero L., Duffing P., 2004. Tres procesos contradictorios: Desarrollo urbano, medio ambiente y políticas públicas del siglo XX. En: *A la orilla del agua. Política, urbanización y medio ambiente. Historia de Xochimilco en el siglo XX*, Terrones M. (Ed.). GDF / Delegación Xochimilco / Instituto Mora., México D.F., pp. 211-250.

Ruvalcaba García A., 2009. Modelación matemática del comportamiento hidrogeológico de la zona lacustre de Xochimilco, México. Tesis de maestría, UNAM, México, pp. 11-60.

Salinas Velázquez F.U., 2002. Evaluación de la salinización y sodificación de los suelos de la zona lacustre de San Gregorio, Xochimilco, D.F. Tesis de Maestría, UNAM, México, pp. 12-70.

Santos Morcillo, J.L., 2006. Análisis y distribución de principios activos farmacológicos en los procesos convencionales de depuración de aguas residuales urbanas. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, España, pp. 20-200.

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 Research*, 42: 2124-2134.

Snyder L. R., Kirkland J. J., 1989. Introduction to modern liquid chromatography. 2nd ed., John Wiley & Sons, N.Y, pp. 12-35.

Soliman M. A., Pedersen J. A., Suffer I. H., 2004. Rapid gas chromatography-mass spectrometry screening method for human pharmaceuticals, hormones, antioxidants and plasticizers in water. *Journal of Chromatography A*, 1029:223-237.

Ternes T. A., Bonerz M., Schmidt T., 2001. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid-chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 938: 175-185.

Ternes T. A., Stumpf M., Müller J. H., Wilken R. D., Servos M., 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-1. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of the Total Environment*, 225: 81-90.

Togola A., Budzinski H., 2007. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, 1117: 150-158.

UNESCO-Xochimilco, 2005. Proyecto para la identificación participativa de un plan de rehabilitación integral del patrimonio cultural de Xochimilco.

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

US-EPA. US-Environmental protection agency. 2010. <http://www.epa.gov/ppcp/faq.html> (Ultimo acceso: 20 de diciembre de 2010).

Valls Oriol, Del Castillo B., 2002. *Técnicas instrumentales en Farmacia y Ciencias de la Salud*. Edición Mexicana, México, pp. 517-530.

Vanderford B. J., Pearson R. A., Rexig D. J., Snyder S., 2003. Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 75: 6265-6274.

Vera-Avila L. E., García-Ac A., Covarrubias-Herrera R., 2001. Trace level determination of benzidine and 3,3'-dichlorobenzidine in aqueous environmental samples by on-line solid-phase extraction and liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatographic Science*, 39: 301-307.

Wetzel R. G., Likens G. E., 1991. *Limnological Analyses*. 2° ed., Springer-Verlag, New York, Inc. pp 75.

Wetzel R. G., 2001. *Limnology lake and river ecosystem*. 3rd ed., Academic Press, California.

Zambrano L., Contreras V., Mazari-Hiriart M., Zarco-Arista A. E., 2008. Spatial heterogeneity of water quality in a highly degraded tropical freshwater ecosystem. *Environmental Management*, ENM-07-0397.

Zuelke S., Duennbier U., Heberer T., 2004. Determination of polar drugs residues in sewage and surface water applying liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 76: 6548-6554.

VIII. Anexos

Anexo I

Revisión bibliográfica de las condiciones ambientales de Xochimilco

La Delegación Xochimilco se localiza al sur del Distrito Federal entre las coordenadas geográficas extremas 19° 19' y 19° 09' de latitud norte y 99° 00' y 99°09' de longitud oeste. Colinda al norte con la Delegación Coyoacán, al noroeste con Iztapalapa y Tláhuac, al sur con Milpa Alta y al oeste con Tlalpan (Ortiz y Ruvalcaba, 2005).

En el imaginario social Xochimilco se asocia de inmediato con el paisaje lacustre y chinampero. Sin embargo, solamente 30% de la superficie de la delegación corresponde al antiguo lecho lacustre y el resto forma parte de las Sierras Chichinautzin y Xochitepec (GDF, 2005). Es así que dentro del territorio de la Delegación se distinguen tres zonas: a) la zona lacustre y chinampera, localizada en la parte centro y norte, a una altitud de 2,240 m s.n.m.; b) las planicies y laderas, también llamadas zonas de lomeríos, considerada como una zona de transición urbano-rural, ubicada al oriente, sur y surponiente de la delegación, cuya altitud va de los 2,250 a los 2,400 m s.n.m., y c) la zona cerril o zona de montaña, también localizada al oriente, sur y surponiente, arriba de los 2,400 m s.n.m. El clima predominante es el templado subhúmedo, con una precipitación promedio anual de entre 700 y 900 mm, la concentración de lluvias ocurre de junio a octubre, aunque en algunos años se presenta de mayo a septiembre, la temperatura media anual es de 16°C, con extremos de 32°C y 3°C en el vaso lacustre, mientras que en la faja montañosa la media es de 12°C con extremos de 29°C, llegándose a presentar heladas en los últimos y primeros meses del año (INEGI, 2006).

Las condiciones del entorno natural de Xochimilco explican la abundancia de agua en esta zona, su ubicación geográfica, su estructura geológica y edafológica junto con la existencia de amplias superficies rurales (agrícolas, ganaderas y forestales) favorecen la infiltración de la precipitación pluvial al subsuelo. Durante casi todo el siglo XX y hasta la actualidad, Xochimilco ha contribuido con importantes caudales de agua para abastecer parte de la demanda de la Ciudad de México. El agua de los manantiales de Xochimilco era conducida hacia el centro de la ciudad a través del acueducto inaugurado en 1910 y a partir de 1936, con la construcción de los primeros pozos profundos, se intensificó la extracción del agua del acuífero de la zona (Romero y Duffing, 2004).

Años después en los 40's y 60's, los manantiales dejaron de abastecer a los canales y lagunas de la región, las chinampas de Tulyehualco, Alcapixca y Nativitas casi desaparecieron, y las de Xochimilco, San Gregorio, San Luis y Tláhuac se redujeron drásticamente. Los chinamperos iniciaron entonces una lucha para que el Departamento del Distrito Federal los dotara del agua necesaria para continuar con sus actividades productivas. Como respuesta, en 1957 se inició la alimentación artificial de los canales, primero con los ríos Churubusco y San Buenaventura por el cauce abierto del Canal Nacional, y en 1959 con aguas negras tratadas provenientes de la planta Aculco en Coyoacán. Posteriormente, a partir de 1971, la planta Cerro de la Estrella aportó el agua residual tratada a los canales de Xochimilco, San Gregorio, San Luis Tlaxialtemaco y Tláhuac (Salinas, 2002).

La retroalimentación del lago con aguas tratadas y aguas negras trajo como consecuencia cambios en el ecosistema, sobre todo en lo que se refiere a las poblaciones de organismos acuáticos, la declinación en la productividad de algunos cultivos y el deterioro de la salud de la población como consecuencia de la contaminación del agua (UNESCO, 2005). Sin embargo, y hasta la fecha, los caudales de agua tratada no alcanzan a cubrir la demanda para riego agrícola. A todo ello se suma la contaminación por las descargas domiciliarias de los asentamientos irregulares, ya que éstos carecen de sistema de drenaje (Aréchiga, 2004).

Aunado al deterioro en la calidad del agua, se presentaron problemas de agrietamientos y hundimientos del terreno, principalmente en los ejidos de Xochimilco y San Gregorio, ocasionados por la excesiva extracción del agua subterránea y por los movimientos telúricos. A partir de 1980 se han presentado agrietamientos superficiales asociados a los lugares donde existieron manantiales; estos agrietamientos causan filtraciones de agua sin control a los canales y el acuífero, contaminando las aguas superficiales y subterráneas, con los consiguientes daños para la salud. Como producto del sismo de alta intensidad que sacudió a la Ciudad de México en 1985, se produjo una fractura en la zona del pueblo de San Gregorio, que rápidamente secó gran parte de la zona chinampera e hizo desaparecer la mayor parte de los canales de los pueblos de Tulyehualco, San Gregorio Atlapulco y Santa Cruz Alcapixca (GDF, 2005). Esta situación motivó que se estableciera un convenio entre el Gobierno Federal y la UNESCO para el rescate de la zona de Xochimilco y Tláhuac. En este contexto, se realizaron obras hidráulicas para frenar el deterioro de los canales así como algunos estudios para elaborar un diagnóstico sobre la situación de los recursos naturales y la problemática ambiental de la zona. Como resultado de estos trabajos y considerando el valor cultural que representa el sistema de agricultura chinampera, en 1987 Xochimilco fue declarado Patrimonio Cultural de la Humanidad por la UNESCO (Aréchiga, 2004). Sin embargo, en por lo menos dos ocasiones, ha estado a punto de perder esa calidad debido al deterioro constante de la zona chinampera y a la amenaza que representa para la región el avance de la urbe capitalina (Ruvalcaba, 2009).

En la década de 1990 se registró un hundimiento del suelo en la delegación, lo que deterioró aún más la zona chinampera. Debido a los desniveles de agua en los canales, se generaron zonas de inundación en la zona norte y zonas con disminución del nivel de agua en la parte sur, lo que una vez más afectó la producción agrícola. En mayo de 1992, la superficie que comprende a los ejidos de Xochimilco y de San Gregorio Atlapulco, así como toda la zona chinampera, fue declarada como Área Natural Protegida, bajo la categoría de zona sujeta a conservación ecológica. No obstante, esta protección legal no ha sido suficiente para evitar los efectos de la expansión de la urbanización y el deterioro de estas áreas de gran valor ambiental y cultural (UNESCO, 2005).

La problemática ambiental que sufre actualmente la región incluye los siguientes aspectos: a) crecimiento acelerado y desordenado de la urbe sobre áreas verdes y productivas, b) explotación de los mantos acuíferos, c) recarga del sistema lacustre con aguas residuales que contaminan el agua de los canales y los suelos de chinampa, d) disminución de la diversidad y densidad de especies vegetales y animales, e) hundimientos diferenciales del terreno, f) degradación de los suelos, g) abatimiento de la producción agrícola, h) inundación, salinización y sodificación de los suelos de las zonas bajas, i) deforestación y erosión de los suelos del área montañosa y cerril (Salinas, 2002).

Anexo II

Material y equipo

Material Volumétrico

- Matraces aforados de 5, 10, 25, 50, 100 y 1000 mL.
- Pipetas volumétricas de 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 25, 50 y 100 mL.
- Pipetas graduadas.
- Micropipetas Eppendorf de 250 y 1000 μl con puntas Transferpette, Wertheim Alemania.
- Vasos de precipitados.
- Matraces Kitazato de 25 y 1000 mL.
- Jeringa de 100 μl para cromatografía de líquidos, Hamilton Microliter 710.
- Botellas de vidrio ámbar con capacidad de 1 L.
- Botellas de plástico con capacidad de 0.5 y 1.5 L.
- Botella muestreadora Uwitec con capacidad de 2.5 L.

Equipo y Accesorios

- Sistema purificador y desionizador de agua NANOPURE, Barnstead Thermolyne modelo 04747.
- Balanza analítica con capacidad de 210 g y precisión de 0.1 mg, Ohaus AP210S.
- pHmetro Corning modelo 220.
- Electrodo combinado de calomel, Cole-Palmer modelo 60648.
- Baño de ultrasonido, P-Selecta Ultrasons serie 0416297.
- Cromatógrafo de líquidos Gilson con capacidad para gradiente binario, equipado con bomba maestra para cromatografía de líquidos Gilson modelo 305, bomba secundaria Gilson 306, mezclador dinámicos Gilson modelo 811B, detector UV-DAD (detector con arreglo de diodos) Spectromonitor 5000 de Thermo Separation Products y sistema de adquisición y tratamiento de datos mediante el software Apex Clarity versión 3.03.358 de Datapex Podohradska, Praga, República Checa.
- Inyector Rheodyne 7125 con bucles de 20 y 100 μl .
- Bombas isocráticas auxiliares: Beckman modelo 110B y Eldex Laboratories modelo CC-30-S.
- Columna Gemini C-18 (150 \times 4.6 mm, d.i.) de 5 μm , Thermo Electron Corporation.
- Columna Hypersil ODS (150 \times 4.6 mm, d.i.) de 5 μm , Thermo Electron Corporation.
- Columna Synergi Fusion RP80A (150 \times 4.6 mm, d.i.) de 4 μm , Thermo Electron Corporation.
- Columna Hypercarb (100 \times 3 mm, d.i.) de Thermo Scientific. Especificaciones: tamaño de partícula 5 μm , 100% carbón grafitizado poroso, diámetro de poro 250 Å , superficie específica 120 m^2/g .
- Cartuchos de extracción en fase sólida Supelclean-Envicarb de 1 gramo, Supelco Analytical. Especificaciones: carbón grafitizado no poroso, tamaño de partícula 120-400 mallas (\sim 40-100 μm), superficie específica 100 m^2/g .
- Precolumna de concentración (20 \times 2 mm, d.i.) empacada en el laboratorio con fase reversa polimérica PLRP-S, 10-15 μm , de Polymer Laboratories.
- Mini columna de concentración (20 \times 2 mm, d.i.) empacada en el laboratorio con 20 mg de carbón grafitizado no poroso (Supelclean-Envicarb).
- Mini columna de concentración (30 \times 4.6 mm, d.i.) empacada en el laboratorio con 250 mg de carbón grafitizado no poroso (Supelclean-Envicarb).

-
- Bloque para calentamiento de columnas Thermasphere TS-130 HPLC (Phenomenex).
 - Centrífuga Beckman J2-MC equipada con rotor Beckman modelo JA-10.
 - Sonda multiparámetros Hanna Instruments modelo 9828 con GPS incluido.
 - Ecosonda Speedtech Instruments.
 - Equipo para filtración Millipore modelo OM027.
 - Embudo Büchner de 2 cm de diámetro.
 - Papel filtro Whatman No. 1 (2 cm de diámetro).
 - Membranas de filtración Millipore de Nylon 66 (4.5 cm de diámetro con poro de 0.45 μm).

Reactivos y disolventes

- Acetonitrilo grado HPLC, Prolabo.
- Metanol grado HPLC, Fisher Scientific.
- Ácido perclórico 70%, J.T.Baker.
- Hexano grado HPLC, Tecsiquim.
- Cloroformo grado HPLC, Mallinckrodt.
- Éter de petróleo grado reactivo, Productos Químicos Monterrey.
- Hidróxido de amonio, J.T. Baker.
- Hidróxido de sodio grado reactivo, J.T. Baker.
- Diclorometano grado HPLC, Burdick and Jackson.
- Tetrahidrofurano grado HPLC, Tecsiquim.
- Etanol grado HPLC, J.T. Baker.
- Azida de sodio 99.5%, Sigma-Aldrich.
- Na_2SO_4 anhidro 99%, Meyer.
- Ácido trifluoroacético grado HPLC, J.T. Baker.
- Ácido sulfúrico, J.T. Baker.
- Acetaminofen grado USP, Sigma-Aldrich.
- Ampicilina grado reactivo, Sigma-Aldrich.
- Amoxicilina grado reactivo, Sigma-Aldrich.
- Ácido salicílico grado reactivo, Sigma-Aldrich.
- Ácido acetilsalicílico grado reactivo, Sigma-Aldrich.
- Enalapril, maleato de, grado reactivo, Sigma-Aldrich.
- Ibuprofeno grado reactivo, Sigma-Aldrich.
- Naproxeno grado reactivo, Sigma-Aldrich.
- Indometacina grado reactivo, Sigma-Aldrich.
- Diclofenaco grado farmacéutico.

Disoluciones preparadas

- Disolución acuosa de HClO_4 0.1M y 0.01M
- Disolución acuosa de ácido trifluoroacético al 0.1 % (v/v)
- Buffer de amoníaco 1 M (pH 9)
- Buffer de formiatos 0.01 M, pH 3.5
- Buffer de acetatos 0.01 M, pH 4.5
- Disolución de acetato de amonio 0.01M (pH 6)
- Disoluciones "stock" de los fármacos y estándares de trabajo.

Se prepararon disoluciones "stock" de 1000 ppm de cada uno de los fármacos, pesando la cantidad apropiada del estándar correspondiente, disolviéndola en acetonitrilo y aforando al volumen establecido con el mismo disolvente. A partir de éstas, se hicieron diluciones para preparar soluciones de menor concentración, tanto de los fármacos individuales como de mezclas de ellos, según se iba requiriendo.

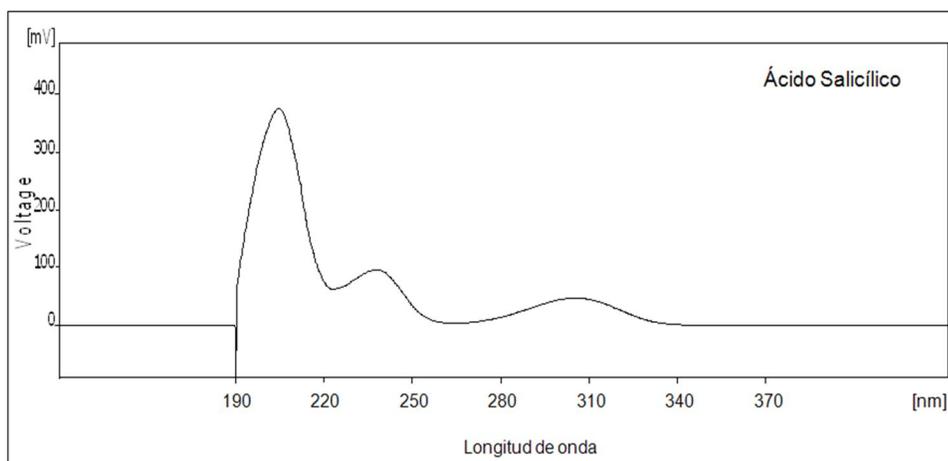
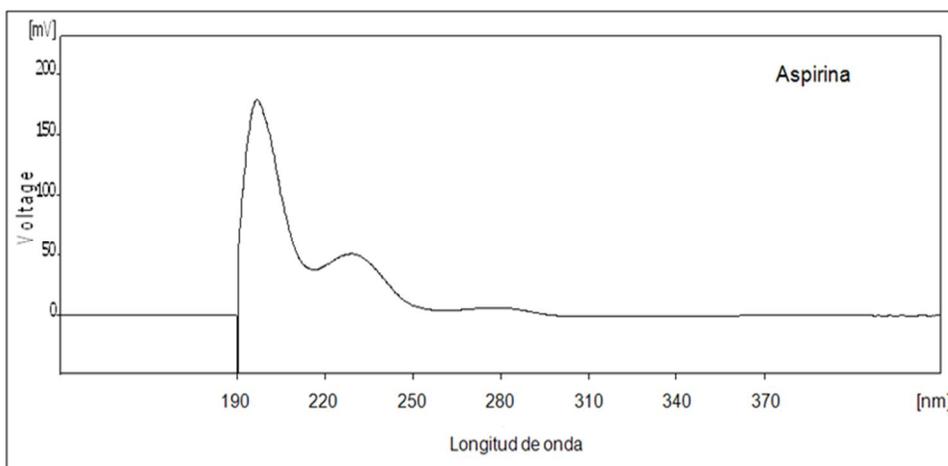
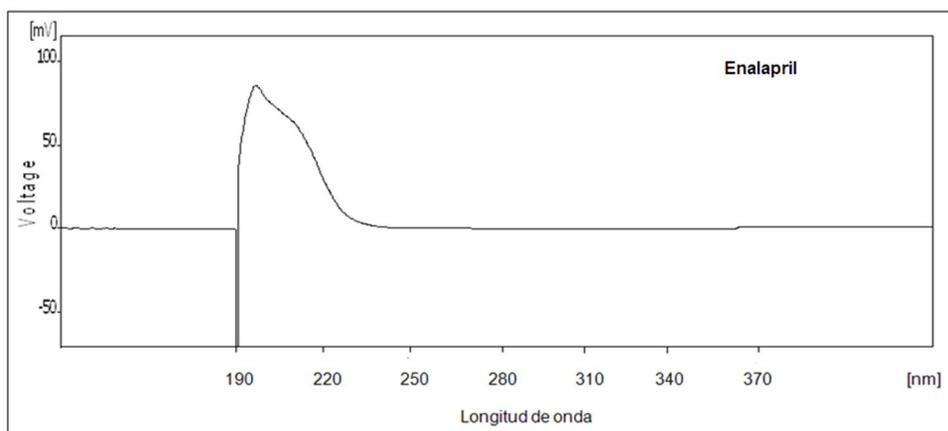
Las soluciones o estándares de trabajo se prepararon a partir de una mezcla patrón de los fármacos en metanol. Las concentraciones de cada compuesto en la mezcla patrón fueron las siguientes: enalapril 25 ppm, aspirina 10 ppm, ácido salicílico 8 ppm, naproxeno 3 ppm, indometacina 6 ppm e ibuprofeno 10 ppm. Estas concentraciones fueron ajustadas de modo a tener picos de aproximadamente el mismo tamaño en los cromatogramas, ya que las respuestas de los analitos en el detector UV a 215 nm son muy diferentes. Para denotar la concentración, tanto de la mezcla patrón como de las soluciones de trabajo preparadas a partir de ella, se utilizó como referencia la concentración de la aspirina. Todas las soluciones de trabajo fueron preparadas en agua.

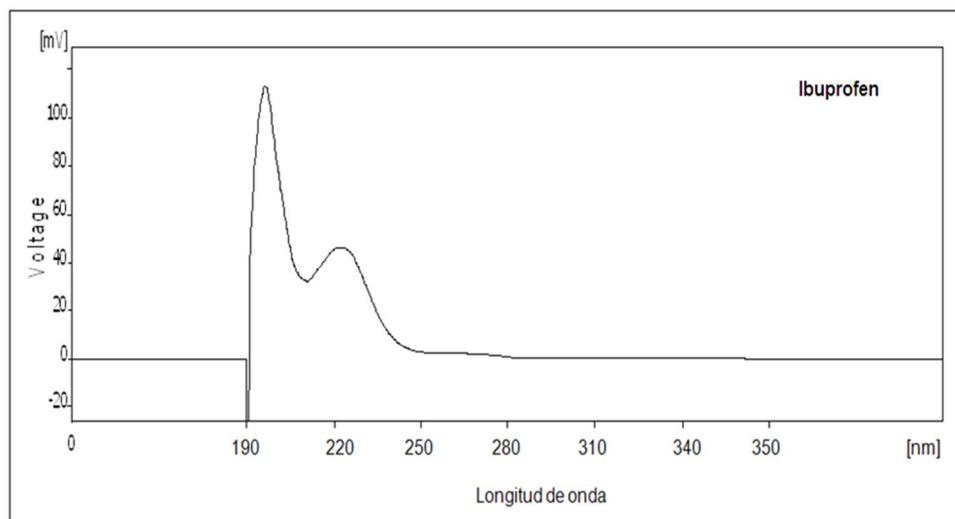
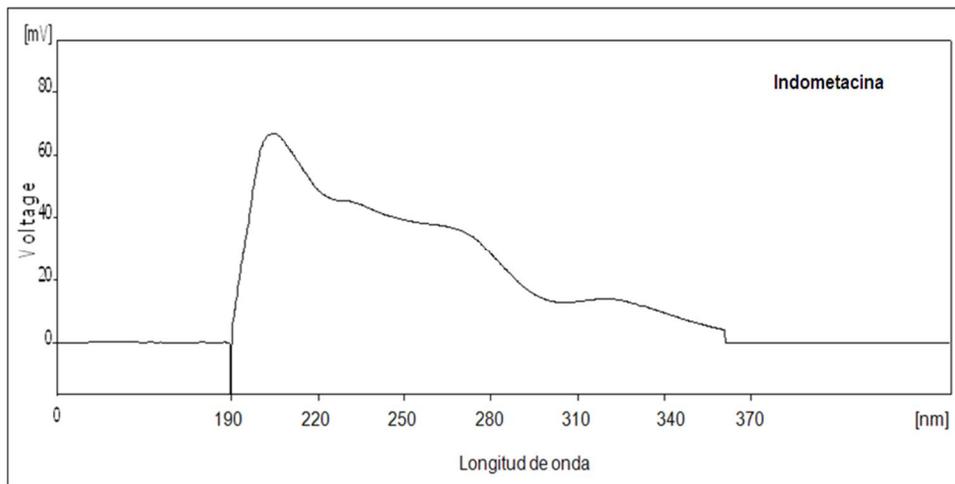
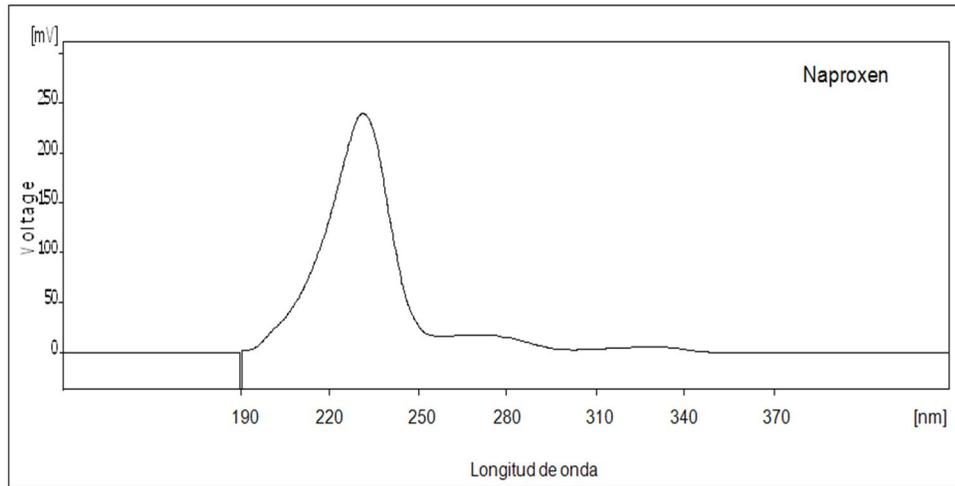
Las disoluciones "stock" de cada fármaco y la mezcla patrón fueron almacenadas en congelación (-20°C). Todas las demás disoluciones fueron almacenadas en refrigeración (4°C) cuando no estaban en uso y se renovaron periódicamente.

Anexo III

Espectros de absorción de los fármacos de interés

Espectros de absorción de los fármacos de interés, obtenidos por barrido espectral durante la separación cromatográfica por gradiente de elución. Detector UV con arreglo de diodos Spectromonitor 5000. Otras condiciones como en la Figura V-4.

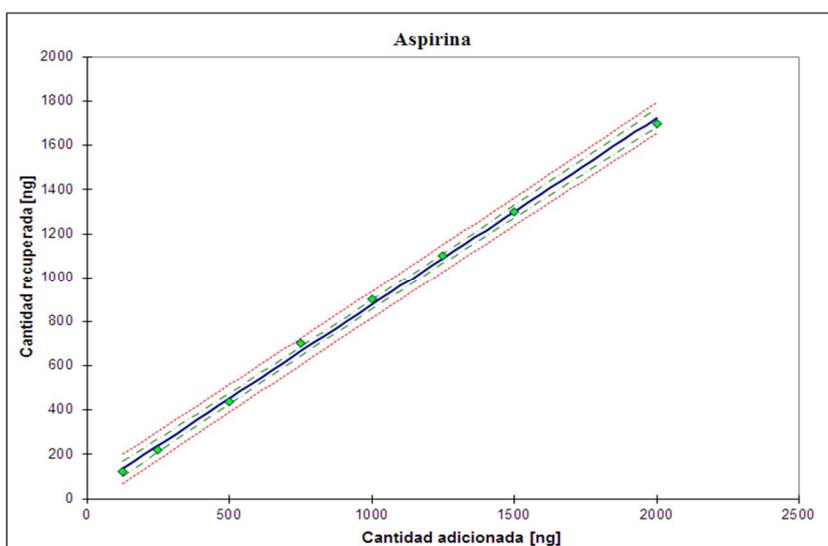
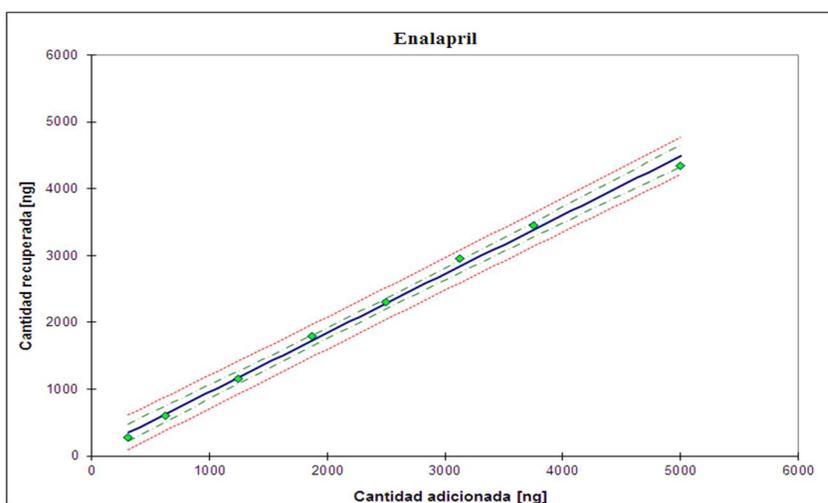


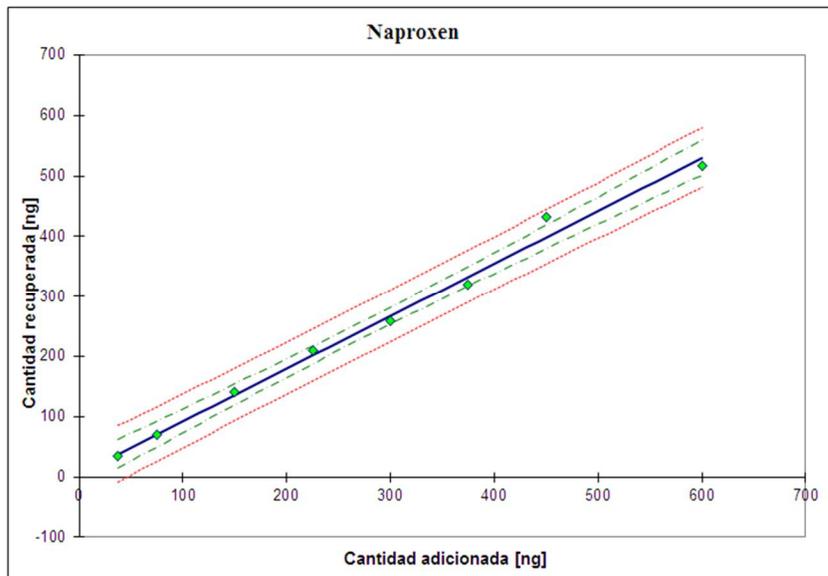
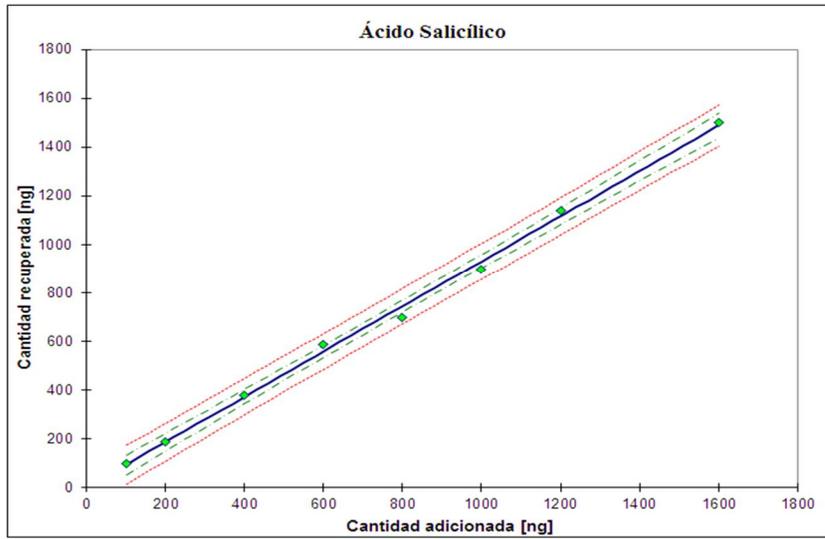


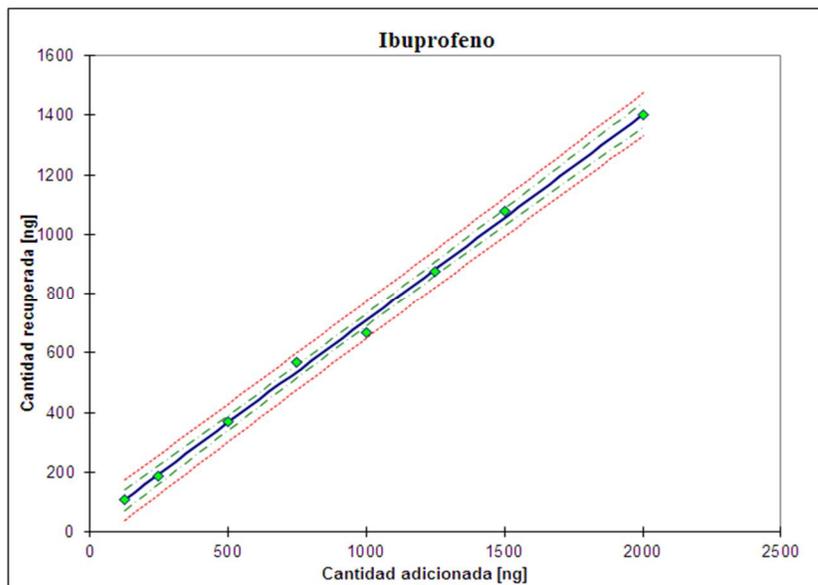
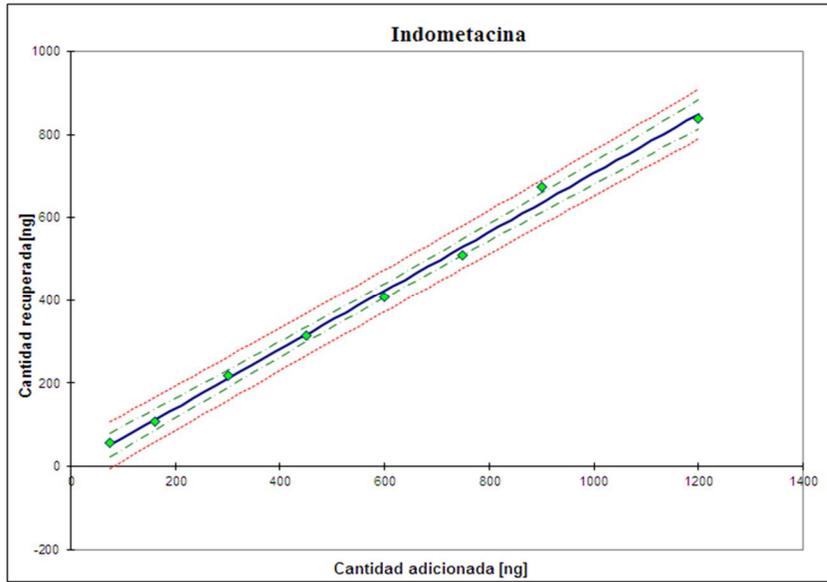
Anexo IV

Gráficas de Cantidad de soluto recuperado vs Cantidad de soluto adicionado

A continuación se presentan las gráficas de Cantidad de soluto recuperado vs Cantidad de soluto adicionado, en donde los puntos representan los datos experimentales y las líneas continuas son las rectas de regresión correspondientes calculadas por el método de mínimos cuadrados. En cada figura se muestra también el cinturón de confianza de los puntos de calibración.







Anexo V

Pruebas para la ordenada al origen y la pendiente de las rectas de regresión

Las ecuaciones de las rectas de regresión que describen la variación de la *Cantidad de soluto recuperado* en función de la *Cantidad de soluto adicionado* son un buen indicador de las características del método analítico desarrollado:

- Si la pendiente es estadísticamente igual a uno significa que no hay ninguna pérdida de soluto durante el proceso analítico o ganancia por contaminación cruzada o por coelución de interferencias.
- Si la ordenada al origen es estadísticamente igual a cero indica que el método no presenta errores sistemáticos.

Con la finalidad de verificar la ausencia de errores sistemáticos en el método desarrollado se realizó una prueba de hipótesis sobre el valor de la ordenada al origen de las rectas de regresión calculadas para cada fármaco. La prueba de hipótesis planteada fue:

Hipótesis nula H_0 : $\mathbf{a} = 0$

Hipótesis alterna H_1 : $\mathbf{a} \neq 0$

Con los datos experimentales se calculó el valor del estadístico \mathbf{t} y se comparó con el respectivo valor de tablas ($\mathbf{t}_{critica}$).

Similarmente, para saber si la recuperación de los solutos podía ser considerada estadísticamente igual al 100%, se efectuó la siguiente prueba de hipótesis:

Hipótesis nula H_0 : $\mathbf{b} = 1$

Hipótesis alterna H_1 : $\mathbf{b} \neq 1$

Anexo VI

Listado de ecuaciones estadísticas (Miller and Miller, 2002)

| Parámetro | Ecuación | Componentes |
|--|---|---|
| Media Aritmética (\bar{x} es el estimador de la media poblacional (μ) obtenido a partir de una muestra) | $\hat{\mu} = \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n Xi}{n}$ | X_i , representa cada una de las medidas n , número de datos |
| Desviación estándar poblacional (s es el estimador de la desviación estándar poblacional (σ) obtenido a partir de una muestra) | $\hat{\sigma} = s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (xi - \bar{x})^2}{n - 1}}$ | X_i , representa cada una de las medidas n , número de datos \bar{x} , estimador de la media poblacional obtenido a partir de una muestra |
| Coefficiente de variación porcentual o desviación estándar relativa | $RSD\% = CV\% = 100 * \frac{s}{\bar{x}}$ | s , es el estimador de la desviación estándar poblacional obtenido a partir de una muestra \bar{x} , estimador de la media poblacional obtenido a partir de una muestra n , número de datos |
| Distribución muestral de la media (intervalo de confianza sobre la media) | $\bar{x} \pm t_{0.95, n-1} * \frac{s}{\sqrt{n}}$ | \bar{x} y s , son la media y la desviación estándar estimadas $t_{0.95, n-1}$, distribución t de student con un riesgo $\alpha=0.05$ y $n-1$ grados de libertad |
| Análisis de regresión lineal | $y = b * x + a$ | b , es la constante llamada pendiente a , es la constante llamada ordenada al origen |
| Intervalo de confianza sobre la ordenada | $a \pm t_{0.95, n-2} * S_e \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{xx}}}$ | $t_{0.95, n-2}$, distribución t de student con un riesgo $\alpha=0.05$ y $n-2$ grados de libertad |
| Intervalo de confianza sobre la pendiente | $b \pm t_{0.95, n-2} * S_e \frac{1}{\sqrt{S_{xx}}}$ | |

Los parámetros de S_{xx} , S_{yy} , S_{xy} , S_e se calcularon de acuerdo con:

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

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

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

$$s_{yy} - \frac{(s_{xy})^2}{s_{xx}}$$

$$s_e = \frac{\quad}{n-2}$$

Hipótesis sobre la ordenada

$$t_{\text{exp.}} = \frac{(a-0)}{s_e \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}}{s_{xx}}}}$$

Estadístico de prueba \hat{t}

Hipótesis sobre la pendiente

$$t_{\text{exp.}} = \frac{(b-1)}{s_e} \sqrt{s_{xx}}$$

Estadístico de prueba \hat{t}