



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACOS ASOCIADOS AL TRATAMIENTO DE
COVID-19 EN MUESTRAS DE AGUA RESIDUAL**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. Ruth Silvana Cortés Lagunes

Dr. Juan Carlos Durán Álvarez
Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología

CDMX, SEPTIEMBRE DE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA
LA CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACOS ASOCIADOS AL
TRATAMIENTO DE COVID-19 EN MUESTRAS DE AGUA RESIDUAL**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. Ruth Silvana Cortés Lagunes

Dr. Juan Carlos Durán Álvarez
Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología



Ciudad de México, 9 de septiembre de 2023

Jurado Asignado

Presidente:	Dr. José Luz González Chaves
Vocal:	Dra. Martha Patricia García Camacho
Vocal:	Dr. Alberto Rojas Hernández
Vocal:	Dra. Blanca Lucía Prado Pano
Secretario:	Dr. Armando Hernández García

Lugar dónde se realizó el trabajo:

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio Universitario de Nanotecnología Ambiental (LUNA) del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la asesoría del Dr. Juan Carlos Durán Álvarez.

Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, en especial al **Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas** por la oportunidad de continuar mi formación profesional.

Al **Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT)** por el apoyo económico otorgado a través de la beca de maestría, con número de CVU: 1101000.

A la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM)** por el apoyo financiero proporcionado para la realización del presente trabajo a través del proyecto PAPIIT-IV200321 *Potencial de diseminación ambiental de SARS-COV-2; un enfoque de riesgo a partir del suelo y ciclo urbano del agua en el centro de México*.

Al **Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT)** de la UNAM, en particular al **Laboratorio Universitario de Nanotecnología Ambiental (LUNA)** por el uso de sus instalaciones, equipo y material para el desarrollo del presente trabajo.

A mi asesor, el **Dr. Juan Carlos Durán Álvarez** por su apoyo durante todo el desarrollo de este trabajo. Su tiempo y disposición para aclarar dudas y trabajar en equipo, así como su amistad y guía durante el tiempo del posgrado.

Al **Instituto de Geología** y al **Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía (LANGEM)**, sede Ciudad Universitaria, de la UNAM, por el uso de sus instalaciones, equipos y materiales.

A las **Dra. Martha Patricia García Camacho y Blanca Lucía Prado Pano** y, así como a los **Dr. José Luz González Chaves, Alberto Rojas Hernández y Armando Hernández García**, miembros del jurado, por la revisión de este trabajo además de sus contribuciones y recomendaciones.

A la **Dra. Andrea Garduño Jiménez**, por todo el conocimiento, experiencia y la amistad que me brindó durante su tiempo en el laboratorio, sin ella este proyecto no se hubiera logrado.

Al **Dra. Olivia Zamora Martínez** por su apoyo, amistad y conocimiento durante el desarrollo experimental.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Objetivos	2
2.1 Objetivo general.....	2
2.2 Metas	2
3. Metodología.....	3
3.1 Desarrollo y optimización de la metodología HPLC-MS/MS	3
3.2 Validación instrumental del método HPLC-MS/MS	5
3.3 Desarrollo y optimización del protocolo de extracción en fase sólida	6
3.4 Validación del método EFS-HPLC-MS/MS en agua residual cruda	7
3.5 Evaluación del método EFS-HPLC-MS/MS en otras matrices acuosas ambientales	8
3.6 Aplicación del método EFS-HPLC-MS/MS en matrices acuosas ambientales	8
4. Resultados y análisis de resultados	9
4.1 4.1 Desarrollo y optimización de la metodología HPLC-MS/MS	9
4.2 Validación instrumental del método HPLC-MS/MS	14
4.3 Optimización del protocolo de Extracción en Fase Sólida (EFS)	16
4.4 Validación del método EFS-HPLC-MS/MS en agua residual cruda	21
4.5 Evaluación de la robustez de la metodología EFS-HPLC-MS/MS en diferentes matrices acuosas ambientales	24
5. Conclusiones	25
6. Referencias	26

1. Introducción

La epidemiología basada en agua residual (WBE, por sus siglas en inglés) se basa en el monitoreo de marcadores químicos y biológicos en agua residual para rastrear patrones de diseminación de enfermedades y tendencias de salud pública en una población determinada [1]. Con ello, se pueden realizar evaluaciones a nivel comunitario sobre el consumo, uso o liberación per cápita de sustancias farmacéuticamente activas, así como monitorear la propagación de enfermedades infecciosas y otras condiciones de salud que pueden reflejarse en las aguas residuales, como el uso de drogas ilícitas o la exposición a toxinas [1–3].

Al monitorear los niveles de material genético en las aguas residuales, se puede obtener una alerta temprana de brotes de enfermedades y rastrear la propagación de los agentes etiológicos en una comunidad determinada [4]. Por ejemplo, en el estado de Hidalgo se midieron los residuos de ARN del virus SARS-CoV-2 (0–197 655 copias/L) en aguas residuales, con el fin de determinar la prevalencia de contagio y obtener un intervalo de casos de COVID-19. Se encontró que la población infectada osciló entre el 1.4 % y el 41.7 %, en contraste con los datos oficiales que reportaron entre el 0.1 % y el 0.3 %. Esto puede estar indicando la subestimación de contagios basado solo en los reportes de nuevos casos positivos, y por ello, la WBE puede ser empleada como una herramienta complementaria de seguimiento epidemiológico [5]. Al monitorear los niveles de los medicamentos usados para el tratamiento de enfermedades específicas en las aguas residuales, los funcionarios de salud pública pueden obtener información sobre la prevalencia y los patrones de consumo en una población determinada, lo que convierte a la WBE en una herramienta prometedora para monitorear la salud pública y proporcionar una alerta temprana de brotes de enfermedades [6–8].

Durante la emergencia sanitaria por COVID-19, no se especificó ningún tratamiento profiláctico o preventivo con evidencia demostrada por parte de la Secretaría de Salud (Instituto Mexicano del Seguro Social 2020). Fue hasta agosto de 2021 cuando se publicó la guía clínica para su tratamiento, en la que se aprobó el uso de los fármacos dexametasona, remdesivir y tocilizumab [10]. A continuación, se enlistan algunos medicamentos para el tratamiento del COVID-19 y la evidencia que lo sustenta.

En junio de 2020, el ensayo RECOVERY (Randomized Evaluation of COVID-19 Therapy), realizado en el Reino Unido mostró que el corticosteroide dexametasona tuvo un efecto beneficioso en la reducción de la mortalidad entre los pacientes gravemente enfermos con COVID-19 que requerían asistencia respiratoria. El estudio encontró la reducción en un tercio de la mortalidad en pacientes con ventiladores y en una quinta parte en pacientes que recibieron oxigenoterapia [11].

Así mismo, el uso del agente antiulceroso famotidina se asoció con un menor riesgo de mortalidad e intubación en pacientes graves de COVID-19 [12,13]. En el caso de metformina, principal medicamento para el tratamiento de la diabetes tipo 2, se observaron casos de reducción de la mortalidad en pacientes con uso previo de éste, ya que coadyuva a aliviar la inflamación severa y el daño al tejido pulmonar; ello debido a sus propiedades antihiperglucémicas e inmunomoduladoras [14,15].

La indometacina, antiinflamatorio no esteroideo se ha administrado, en dosis bajas, como tratamiento para la COVID-19, debido a su actividad antiinflamatoria y antiviral, reduciendo los síntomas como fiebre, tos y dolor muscular de manera eficiente [16,17]. El antibiótico azitromicina también se usó como una terapia el tratamiento de la COVID-19 e infecciones bacterianas secundarias dado su actividad antiviral e inmunomoduladora con un perfil de seguridad bien conocido [18].

Aunque a mediados del 2021 se determinó que el uso de azitromicina en combinación con el antiparasitario ivermectina no mostró evidencia positiva en el tratamiento de los síntomas por COVID-19 [10]. Durante 2021, el IMSS recomendó su uso en combinación con ivermectina, como profiláctico en personal de salud y en pacientes con atención ambulatoria, observando que con un manejo temprano y seguimiento estrecho se lograba limitar la progresión de la enfermedad y disminuir potencialmente la necesidad de servicios hospitalarios, además de ser un tratamiento económico y seguro [19].

En la siguiente tabla se enlistan algunas de las propiedades físicas y químicas de los analitos previamente mencionados.

Tabla 1.1. Propiedades fisicoquímicas de los fármacos previamente mencionados.

	Azitromicina [24]	Dexametasona [23]	Famotidina [21]	Indometacina [22]	Ivermectina [25]	Metformina [20]
Masa molecular	478.98 g/mol	392.46 g/mol	337.44 g/mol	357.79 g/mol	875.1	129.16 g/mol
Solubilidad*	0.514 mg/mL	0.89 mg/mL	1.0 mg/mL	0.937 mg/mL	Insoluble	1.38 mg/mL
pKa	8.5	12.42	9.29 8.38	4.5	12.47	12.4
logP	3.03	1.83	- 0.64	4.27	4.37	- 2.6

*Solubilidad en agua a 25 °C.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Desarrollar y validar un método analítico basado en EFS-HPLC-MS/MS para la preconcentración, purificación y cuantificación de los fármacos metformina, famotidina, indometacina, dexametasona, azitromicina e ivermectina en muestras de agua residual cruda.

2.2 Metas

- Desarrollar y optimizar un método analítico basado en HPLC-MS/MS mediante diseño de experimentos para seis analitos.
- Optimizar una metodología de extracción en fase sólida (EFS) para la extracción, purificación y preconcentración de los seis fármacos propuestos.
- Validar la metodología analítica desarrollada (EFS-HPLC-MS/MS) en muestras de agua residual cruda.
- Evaluar la robustez del método en otras matrices acuosas ambientales, tal como son agua de pozo, lixiviado de agua residual y efluente de planta de tratamiento de agua residual.

3. Metodología

3.1 Desarrollo y optimización de la metodología HPLC-MS/MS

3.1.1 Optimización de la detección mediante espectrometría de masas

La detección de los analitos se llevó a cabo usando un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo (Agilent Technologies 6400, modelo 6420). El modo de adquisición de datos fue el *MRM* (Multiple Reaction Monitoring). Primero fue necesario identificar las fragmentaciones a monitorear de cada uno de los analitos (ion precursor y ion producto, m/z), así como las condiciones óptimas de la ionización por electrospray (*ESI, electrospray ionization*). La optimización se llevó a cabo mediante inyecciones individuales de 10 μL de una disolución estándar de 500 $\mu\text{g/L}$ de los analitos en metanol. Con el fin de favorecer la ionización, se adicionó ácido fórmico a la fase móvil, la cual se compuso por 60 % acetonitrilo, 30 % metanol y 10 % agua destilada con 0.1 % ácido fórmico y 10 mmol/L acetato de amonio

A través del empleo del modo de adquisición de datos *SCAN*, se obtuvo el perfil de masas característico de cada analito, de donde se identificó el ion molecular, los iones de mayor abundancia y, en algunos casos, los aductos estables. Posteriormente, se procedió a buscar dos fragmentaciones estables y características para cada analito y mediante el modo *Production*, se seleccionó un ion precursor (ión molecular o aducto) del cual se buscaron sus iones producto. En este paso se optimizaron las variables voltaje del fragmentador (V , *Frag.*), energía de colisión (eV , *CE*) y *CAV* (V).

Por último, se realizó la optimización individual de los parámetros espectrométricos para cada transición, con el fin alcanzar una mayor sensibilidad en la detección. En este paso se utilizó el modo de análisis *MRM*, en modo de ionización positivo, se eligió una de las dos transiciones determinadas previamente para cada uno de los analitos y uno por uno se comenzó a variar el voltaje del fragmentador (*Frag.*), seguido por la energía de colisión (*CE*), el *Dwell* (mediciones de señal por muestreo) y el voltaje del acelerador de la celda de colisión (*CAV*, en V). Tras cada variación de las condiciones de ionización, en el software Agilent MassHunter Qualitative Data Analysis, los cromatogramas obtenidos se superpusieron para elegir la condición que resultara en mayor sensibilidad.

3.1.2 Optimización de las condiciones cromatográficas para la separación de los analitos

Una vez determinadas las transiciones por monitorear en modo *MRM*, se estableció el gradiente óptimo para la separación de los seis analitos, lo cual se llevó a cabo con un cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies 1260 Infinity, constituido por una bomba cuaternaria y una columna ZORBAX SB-C18 ($4.6 \times 150 \text{ mm}$) de 5 μm de tamaño de partícula (Agilent Technologies).

Primero se determinaron las composiciones adecuadas para la elución individual de los analitos en la columna, para lo cual se inyectaron 10 μL de un estándar individual (500.0 $\mu\text{g/L}$) y se variaron los porcentajes de la composición de la fase móvil, compuesta por A: Acetonitrilo, B: Metanol y C: 10 mmol/L de acetato de amonio y 0.1 % de ácido fórmico en agua. Con base en lo encontrado, se buscó el gradiente y flujo adecuado para mejorar la separación de los seis analitos en un solo método con la mayor resolución posible.

3.1.3 Optimización de los parámetros instrumentales mediante diseño de experimentos

Para la determinación de los parámetros instrumentales que influyen en la respuesta analítica se realizó un diseño de experimento de cribado, con el fin de determinar cuáles factores tienen el mayor impacto en dicha respuesta. Una vez identificados los parámetros, se realizó un diseño de experimentos de superficie de respuesta para optimizar la respuesta analítica y con ello obtener la mayor sensibilidad.

Ambos diseños de experimentos, así como el análisis estadístico se realizaron usando el software STATGRAPHICS (Centurion XVIII), haciendo uso de la herramienta «asistente de diseño de experimentos». La obtención de las áreas de pico de los cromatogramas se realizó mediante el software Agilent MassHunter Quantitative Data Analysis.

El diseño de experimento (DDE) de cribado se realizó usando el modelo Plackett-Burman (DPB), con el cual se ignoran las interacciones y se pueden determinar los factores principales que afectan a la variable de respuesta. Se establecieron seis variables respuesta, a saber, el área de pico de los analitos (metformina, famotidina, indometacina, dexametasona, azitromicina e ivermectina) y 8 factores experimentales: Temperatura del gas de secado (250 – 350 °C), flujo del gas de secado (7 – 11 mL/min), presión del nebulizador (7 – 15 psi), voltaje del capilar (2000 – 6000 V), temperatura de columna (20 – 40 °C), volumen de inyección (3 – 10 µL), concentración de NH₄HCO₂ (1.0 – 10 mmol/L) y concentración de HCOOH (0.1 – 0.5 % v/v). Las condiciones frontera del intervalo señalado se codificaron como -1, límite inferior, y 1 para el límite superior, en tanto 0 fue el intermedio.

Se planteó un diseño de 39 ejecuciones, 3 bloques de 13 experimentos, considerando un punto central. En la Tabla 3.1 se muestran las condiciones del bloque 1 para cada experimento, siendo los bloques 2 y 3 réplicas del 1. Estos fueron realizados con una disolución multi-estándar de 1000 µg/L, utilizando el gradiente previamente optimizado, así como las condiciones óptimas del análisis por MRM.

Tabla 3.1. Condiciones experimentales codificadas para el DPB para la selección de efectos principales en la detección de los seis analitos en el método HPLC-MS/MS.

Bloque	T. gas secado (°C)	Flujo gas secado (mL/min)	Presión nebulizador (psi)	Voltaje capilar (V)	Temp. Columna (°C)	Volumen inyección (µL)	Conc. NH ₄ CH ₃ CO ₂ (mmol)	Conc. HCOOH (% v/v)
1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
	0	0	0	0	0	0	0	0
	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
	1	1	1	-1	1	1	-1	1
	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
	-1	1	1	1	-1	1	1	-1

Una vez que los factores más significativos se identificaron, se realizó un DDE de superficie de respuesta para determinar el escenario óptimo. Se especificaron las mismas seis variables de respuesta y tres factores experimentales: presión del nebulizador (psi), voltaje del capilar (V) y temperatura del gas de secado (°C), en el mismo intervalo. El diseño de Box-Benhken (DBB) tuvo 45 ejecuciones, 15 ejecuciones por bloque, con dos réplicas. Se obtuvo un modelo cuadrático con 10 coeficientes. En la tabla 3.2 se muestran las condiciones de cada uno de los experimentos para el diseño. Estos experimentos se realizaron con las mismas condiciones cromatográficas que aquellos realizados para el DPB.

Tabla 3.2. Condiciones experimentales codificadas para el bloque 1 del diseño de superficie de respuesta de Box-Behnken

Bloque	Presión nebulizador (psi)	Voltaje capilar (V)	T. gas de secado (°C)
1	-1	1	0
	1	0	-1
	0	0	0
	-1	0	1
	0	-1	1
	-1	-1	0
	0	-1	-1
	0	1	1
	1	-1	0
	-1	0	-1
	0	1	-1
	1	1	0
	1	0	1
	0	0	0
	0	0	0

3.2 Validación instrumental del método HPLC-MS/MS

Tras optimizar el método cromatográfico, se evaluó su desempeño. Los parámetros evaluados en la validación instrumental se basaron en los recomendados por la CCAYAC en 2017 [26], así como por la EURACHEM [27]. A continuación, se enlistan los parámetros de desempeño evaluados, seguido de una breve descripción del procedimiento realizado.

- **Intervalo lineal:** Intervalo de concentraciones en el cual los analitos presentan una respuesta lineal de área en función de la concentración. Se prepararon curvas de calibración con los seis fármacos, por triplicado y de manera independiente, cada una con 17 niveles de concentración (1.0, 3.0, 5.0, 8.0, 10.0, 30.0, 50.0, 80.0, 100.0, 300.0, 500.0, 800.0, 1 000.0, 1 300.0, 1 500.0, 1 800.0 y 2 000.0 µg/L), en metanol grado HPLC. Se realizó la inspección visual de la linealidad, y con el gráfico de residuales se evaluó el ajuste de los datos al modelo lineal.
- **Intervalo de trabajo:** Se considera aceptable cuando el valor del coeficiente de HorRat es menor a 2 en cada uno de los niveles de concentración que lo conforman. Así también, cuando el valor de coeficiente de correlación del gráfico de concentración recuperada vs concentración adicionada se encuentre entre 0.98 y 1.00 y el intervalo de confianza de la pendiente incluya el valor de la unidad [26].

- **Sensibilidad analítica:** Se reporta como el valor de la pendiente obtenida para el intervalo de trabajo.
- **Recuperación y sesgo:** Se determinó el % de recobro y su intervalo de confianza para cada uno de los niveles evaluados en el intervalo de trabajo. Dichos valores se compararon con los valores de referencia establecidos en la guía de la CCAYAC de 2017 y por Taverniers et al [28]. Además, éste debe de incluir al 100 % para establecer que el método no presenta sesgo.
- **Límite de detección (LDD):** Se prepararon de manera independiente 11 réplicas de estándares a siete niveles de concentración (0.08, 0.09, 0.1, 1.0, 2.0, 3.0 y 6.0 µg/L) para cada analito. Se determinó el área de pico y el valor de la relación señal/ruido (S/N), siendo el LDD la concentración donde el valor promedio de S/N ≥ 3 .
- **Límite de cuantificación (LDC):** Se determinó como el nivel más bajo del intervalo de trabajo, siguiendo la recomendación en la guía CCAYAC-CR-03/1 [26].
- **Repetibilidad y precisión intermedia:** Se prepararon por triplicado multi-estándares correspondientes a los niveles inferior, medio y superior del intervalo de trabajo. Se obtuvo el % recobro, y mediante una prueba ANOVA se determinó si existía diferencia significativa entre ambos días de medición (prueba F), así como su significancia estadística (*p*-valor), además de determinar las desviaciones estándar relativas de repetibilidad (DER_r) y de precisión intermedia (DER_{PI}).

3.3 Desarrollo y optimización del protocolo de extracción en fase sólida

En un experimento típico de extracción en fase sólida se siguen los siguientes pasos: acondicionamiento, equilibramiento, carga, lavado, elución y regeneración. Con la finalidad de conseguir la máxima cuantitatividad en el proceso de extracción de los analitos en la muestra, los pasos anteriores deben ser cuidadosamente optimizados, así como seleccionar el cartucho de extracción más adecuado.

En los experimentos descritos a continuación, los cartuchos de extracción en fase sólida fueron acondicionados con 6.0 mL de metanol y equilibrados con 6.0 mL de agua destilada, como lo reporta el fabricante [29]. En ambos pasos, el percolado fue por gravedad.

Para la selección del cartucho se probaron 4 productos comerciales, con fases sólidas de características diferentes, a saber, Sep-Pak[®] Diol de 66 cc y 1 g de sorbente, Sep-Pak[®] Floirisil de 6 cc y 1 g de sorbente, Oasis[®] HLB de 6 cc con 500 mg de sorbente (todos de Waters[®]) y los cartuchos Supelclean[™] ENVI[™]-18 de 6 cc y 1 g de sorbente, de Supelco (C18). Los cartuchos se acondicionaron y equilibraron, posteriormente se cargaron por triplicado con 100.0 mL de agua destilada fortificada a 100.0 µg/L con los seis fármacos (10.0 µg de cada uno). En este paso se varió el pH de la disolución a valores de 2.0, 5.0 y 9.0, así mismo se percoló usando una bomba de vacío. Del eluato resultante se tomó 1.0 mL. El análisis se realizó usando el método cromatográfico optimizado y se calculó el porcentaje de fuga: $\% Fuga = \frac{c_e}{c_i} \times 100$, donde c_e es la concentración recuperada en los eluatos de la carga y c_i es la concentración con la que se fortificó la muestra.

Para determinar el volumen de carga adecuado, se cargaron cuatro diferentes volúmenes de muestra (100.0, 250.0, 500.0 y 1 000.0 mL), en los cartuchos que mostraron el mayor desempeño de extracción, a pH = 9.0, conservando 10.0 µg de cada fármaco, y se determinó el % de fuga, para cada volumen por triplicado.

Con el objetivo de determinar la capacidad de retención del cartucho durante el lavado, se analizaron los lixiviados recolectados en dicha etapa. Previo al lavado, se cargaron por triplicado 250.0 mL de agua destilada fortificada con 40.0 µg/L de cada analito a pH = 9.0. Las condiciones evaluadas fueron: lavado con 5.0 mL de agua destilada o con 5.0 mL de agua 5 % metanol, con el % de fuga como parámetro de respuesta.

En la extracción en fase sólida, el eluyente adecuado es capaz de eluir a los analitos con el menor volumen posible. Se propusieron seis diferentes disoluciones para el paso de elución, a saber, metanol (MeOH), MeOH ácido fórmico al 0.5, 1.0 y 2.0 %, MeOH con ácido acético al 1.0 % [30–32] y acetonitrilo (AcN). Los cartuchos fueron cargados como se describió previamente y se eluyeron con 10.0 mL de cada disolvente, por triplicado. Una vez determinado el % de recuperación utilizando la ecuación $\% \text{ Recuperación} = \frac{C_{\text{Recuperada}}}{C_{\text{Inicial}}} \times 100$, se seleccionó la fase con la que se obtuvo el mejor desempeño.

Para determinar el volumen óptimo con el cual se obtiene un mayor factor de concentración se eluyeron, por triplicado, cartuchos cargados con las condiciones de carga descritas previamente. Para ello se probaron 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 y 10.0 mL de metanol al 2 % con ácido fórmico. El eluato resultante se analizó para determinar el % recuperación.

Para aumentar el factor de concentración y disminuir los límites de cuantificación del método, se evaluó el paso de evaporación y reconstitución de los eluatos. En esta etapa se prepararon 6.0 mL de disolución fortificada a 160.0 µg/L de cada analito en MeOH 2 % ácido fórmico (FA, n = 5). Se evaporaron a sequedad en una parrilla a 25 °C, asistido con campana de extracción por aproximadamente 8 horas. Luego, se adicionó 1.0 mL de MeOH 2 % FA, se homogenizó con un vórtex y se sumergió en un baño ultrasónico por ≈ 10 s. Se determinó la concentración final de cada analito y su % de recuperación.

3.4 Validación del método EFS-HPLC-MS/MS en agua residual cruda

Una vez optimizado el protocolo de extracción en fase sólida, y con el método instrumental HPLC-MS/MS optimizado y validado para los seis analitos, se procedió a la validación del método completo EFS-HPLC-MS/MS para matrices acuosas. Se comenzó con la matriz más compleja, siguiendo lo recomendado por las guías de validación de métodos analíticos [26,27]; agua residual cruda procedente del canal Tlamaco en Tlathuelilpan, Hidalgo.

La validación del método se realizó de manera análoga a lo descrito en el apartado 3.2, pero utilizando agua residual cruda y agregando el paso de extracción en fase sólida para evaluar cada uno de los parámetros de desempeño. A continuación, se describe brevemente la metodología seguida en cada parámetro.

- **Intervalo lineal:** Para evaluar la respuesta de los analitos en la matriz agua residual, se cargaron, por triplicado, 250.0 mL de muestra previamente filtrada, modificada a pH = 9.0 con NaOH ≈ 2 mol/L, y se siguió el protocolo de extracción en fase sólida previamente optimizado. Una vez obtenidos los eluatos, se fortificaron en 11 niveles (1.0, 3.0, 5.0, 8.0, 10.0, 30.0, 50.0, 80.0, 100.0, 300.0, 500.0 µg/L). Se realizó la inspección visual de la curva de calibración y el gráfico de residuales para cada analito. Adicionalmente, también se verificó la linealidad en un intervalo de concentraciones menor, evaluado para la recuperación del método (0.05 – 1.0 µg/L), esto de manera análoga al intervalo superior, en el gráfico de concentración recuperada en función de concentración añadida.

- **Intervalo de trabajo:** Se siguió el mismo procedimiento del apartado 3.2, considerando el intervalo evaluado para la recuperación del método (0.05 – 1.0 µg/L). Se siguieron los criterios de aceptación antes descritos.
- **Sensibilidad analítica:** Se reportó como el valor de pendiente obtenido para el intervalo de trabajo.
- **Recuperación:** Se cargaron, por triplicado y de manera independiente, muestras de agua residual cruda fortificadas (250.0 mL, pH = 9.0) en 7 niveles de concentración (0.05, 0.08, 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 y 1.0 µg/L) para los seis analitos, además del blanco. Se determinó el % de recobro y su intervalo de confianza. Dichos valores se compararon con los valores de referencia establecidos en las referencias [26,28].
De igual manera, se determinó la recuperación total del método, al obtener el valor de la pendiente de la recta del gráfico masa recuperada en función de la masa cargada.
- **Límite de detección (LDD):** Se estimó a partir del límite de detección instrumental, considerando el factor de concentración para cada analito tras agregar el paso de EFS [26,33].
- **Límite de cuantificación (LDC):** Se determinó como el nivel más bajo del intervalo de trabajo, siguiendo la recomendación en la guía CCAYAC-CR-03/1 [26].
- **Repetibilidad y precisión intermedia:** Se cargaron 250.0 mL de agua residual cruda (pH = 9.0) fortificada a 0.05, 0.3 y 1.0 µg/L (niveles inferior, medio y superior). Se obtuvo el % recobro, y se realizaron las pruebas ANOVA y F, y se determinaron los valores de p, DER_r y DER_{PI} para cada analito.

3.5 Evaluación del método EFS-HPLC-MS/MS en otras matrices acuosas ambientales

Se comprobó el desempeño del método EFS-HPLC-MS/MS validado en agua residual cruda para matrices ambientales más sencillas, tales como efluente de planta de tratamiento de agua residual (PTAR), agua de pozo, así como el lixiviado de agua residual proveniente de la estación de lisímetros del Instituto de Geología. Estos lisímetros son monolitos de suelo, con un volumen de entre 1 y 2 m³, extraídos de un campo agrícola del Valle del Mezquital. Siendo herramientas experimentales metodológicas para estudiar los flujos de agua y químicos disueltos en la zona vadosa y establecer su destino ambiental [34].

Las muestras se filtraron y se fortificaron a tres niveles, el nivel inferior para agua de pozo y lixiviado de agua residual fue de 50 ng/L, mientras que para el efluente fue de 80 ng/L. Para todos los casos, los niveles medio y superior coincidieron en 300 y 1 000 ng/L, respectivamente. Se modificó el pH de las muestras a 8.0 y se sometieron al protocolo EFS optimizado. Los extractos se evaporaron a sequedad y se reconstituyeron en 1.0 mL de metanol 2 % FA. Se determinó el % de recobro promedio y la desviación estandar para cada matriz.

3.6 Aplicación del método EFS-HPLC-MS/MS en matrices acuosas ambientales

Se colectaron 30 muestras provenientes de la estación de lisímetros de la UNAM entre los meses de enero y febrero de 2023. Los lixiviados se obtuvieron tras regar a los lisímetros con agua residual cruda proveniente del Valle del Mezquital. Las muestras se colocaron en frascos ámbar de vidrio y se almacenaron en refrigeración (4 °C) hasta la preparación de muestra. Cada muestra se preparó siguiendo el protocolo de extracción en fase sólida optimizado y se determinó la concentración para los 6 fármacos mediante la técnica HPLC-MS/MS desarrollada en el presente trabajo. Para cada muestra, el procedimiento se realizó de manera independiente y por triplicado.

4. Resultados y análisis de resultados

4.1 Desarrollo y optimización de la metodología HPLC-MS/MS

4.1.1 Optimización de la detección mediante espectrometría de masas

En la detección mediante espectrometría de masas en modo MRM, se monitorean dos reacciones características para cada analito, lo que hace que esta técnica sea muy específica para la detección. Tras obtener los espectros de masas de cada analito (análisis *SCAN*), se determinaron los iones precursores, iones moleculares $[M+H]^+$, y en el caso de ivermectina el aducto $[M+NH_4]^+$. A partir de éstos, se determinaron los iones productos más abundantes (modo *product-ion*) y así se seleccionaron las transiciones por monitorear (Tabla 4.1).

Con la finalidad de obtener la mayor respuesta analítica, se optimizaron las condiciones espectrométricas. De manera individual para cada una de las transiciones, se optimizaron el voltaje del fragmentador (Frag, V), la energía de colisión (CE, eV), el Dwell (mediciones de señal por muestreo) y el voltaje del acelerador de la celda de colisión (CAV, en V).

El método de optimización univariable impide conocer si existen interacciones positivas o negativas entre los parámetros evaluados. Ello puede corregirse mediante un diseño de experimentos de superficie de respuesta, con la cual se optimiza la sensibilidad para cada analito.

Tabla 4.1. Parámetros optimizados del espectrómetro de masas para la detección de los analitos por MRM

Analito	Ion precursor (m/z)	Ion producto (m/z)	Dwell	Frag (V)	CE (eV)	CAV (V)
Metformina	130.1	85.2	200	80	10	4
	130.1	71.2	200	60	20	2
Famotidina	338.1	259.1	200	80	8	4
	338.1	189.1	200	70	19	3
Indometacina	358.1	174.2	200	100	8	7
	358.1	139.0	200	80	15	7
Dexametasona	393.2	373.2	200	100	3	5
	393.2	355.2	200	110	7	5
Azitromicina	749.6	591.4	200	160	30	1
	749.6	158.2	200	135	40	3
Ivermectina	892.5	569.3	200	100	10	1
	892.5	307.2	200	100	20	4

4.1.2 Optimización de las condiciones cromatográficas para la separación de los analitos

Una vez determinadas condiciones de ionización para la detección por MRM, fue necesario establecer el gradiente óptimo para la separación de los seis analitos. Primero, se determinó la composición con la que se logró eluir a los analitos de la columna ZORBAX C18-SB, individualmente en fase reversa. Tras una revisión bibliográfica, se encontró que los analitos se eluyen con distintas proporciones de A: Acetonitrilo, B: Metanol y una fase acuosa, a la cual fue necesario adicionar acetato de amonio, con el fin de visualizar el aducto $[M+NH_4]^+$ de ivermectina [35–37], pues la determinación de este fármaco por HPLC-MS/MS suele hacerse en modo de ionización negativo [38]. Además, se adicionó un porcentaje de ácido

fórmico para favorecer las ionizaciones positivas de las moléculas, por lo cual C se compone por 10 mmol/L de acetato de amonio y 0.1 % ácido fórmico en agua.

Metformina, famotidina, indometacina y dexametasona se eluyen con una mayor proporción de acetonitrilo, a diferencia de azitromicina e ivermectina que necesitan de mayor proporción de metanol para su elución en fase reversa. Esto puede deberse a que el metanol, a diferencia del acetonitrilo, es un disolvente polar prótico, lo que lo hace capaz de formar puentes de hidrógeno con las moléculas como ivermectina y azitromicina, que poseen gran cantidad de grupos funcionales alcohol, cetona y éter.

Se optimizó el gradiente adecuado para integrar a los 6 analitos en un solo método, mediante la modificación de los porcentajes de disolvente en la fase móvil hasta lograr mejorar la visualización de los seis picos. El reto más importante fue encontrar la composición con la que se separasen metformina, famotidina, indometacina y dexametasona, que eluyen con mayor proporción de acetonitrilo. Es importante mencionar que con la detección por espectrometría de masas es posible diferenciar a los analitos en los cromatogramas, aunque éstos no se encuentren resueltos cromatográficamente.

Durante la optimización, metformina co-eluía con indometacina, en tanto que famotidina no se resolvía con dexametasona. Al disminuir el flujo y hacer un ligero cambio en el gradiente (figura 4.1) se logró visualizar a los cuatro picos. A pesar de no contar con una buena resolución, es posible diferenciar a los analitos mediante la selectividad que proporciona el espectrómetro de masas. Para eluir a azitromicina e ivermectina, se aumentó la proporción de acetonitrilo y el porcentaje de metanol, sin dejar de lado que el sistema debe regresar a las condiciones iniciales una vez eluidos los analitos. La tabla 4.2, muestra el gradiente óptimo, en tanto que la figura 4.1 presenta el cromatograma correspondiente.

Tabla 4.2. Gradiente optimizado para la cuantificación de metformina, famotidina, indometacina, dexametasona, azitromicina e ivermectina mediante HPLC-MS/MS.

Tiempo (min)	A (%)	B (%)	C (%)	Flujo (mL/min)
0.00	60.0	30.0	10.0	0.500
3.80	60.0	30.0	10.0	0.500
3.90	60.0	30.0	10.0	0.300
4.50	60.0	30.0	10.0	0.300
5.50	80.0	5.0	15.0	0.500
11.00	80.0	5.0	15.0	0.500
11.50	15.0	80.0	5.0	0.550
12.00	15.0	80.0	5.0	0.600
18.00	15.0	80.0	5.0	0.500
21.50	15.0	80.0	5.0	0.500
22.50	60.0	30.0	10.0	0.500
27.00	60.0	30.0	10.0	0.500

*A: Acetonitrilo, B: Metanol y C: 0.1 % ácido fórmico 10 mmol/L acetato de amonio en agua.

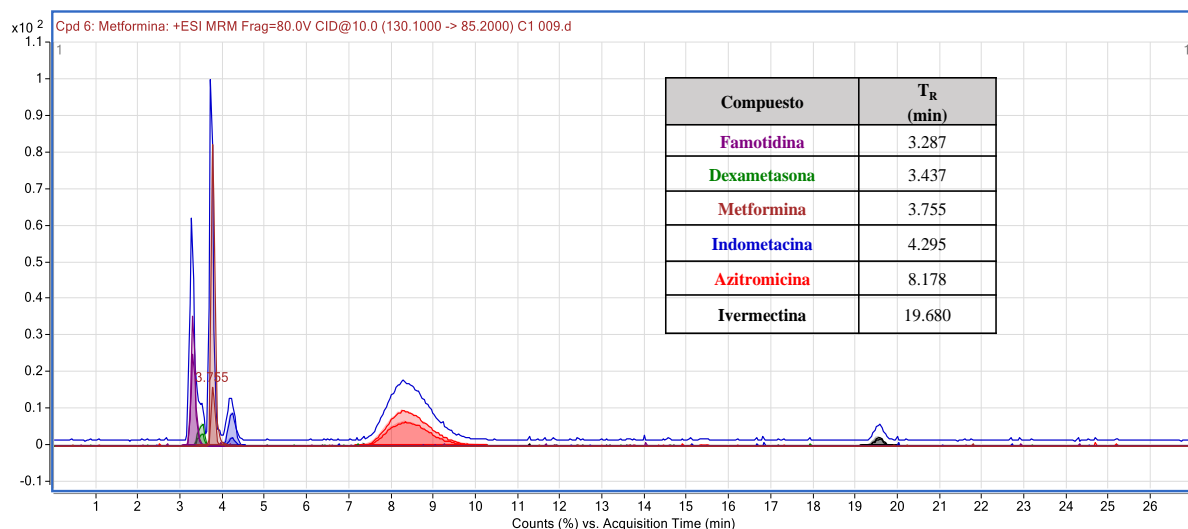


Figura 4.1. Cromatograma obtenido al emplear las condiciones óptimas de separación para un estándar (500.0 µg/L) de metformina, famotidina, indometacina, dexametasona, azitromicina e ivermectina.

4.1.3 Optimización de los parámetros instrumentales mediante diseño de experimentos

En los métodos cromatográficos acoplados a espectrometría de masas, la sensibilidad de los analitos puede verse afectada, tanto por las condiciones cromatográficas, como por las espectrométricas. Con la finalidad de optimizar ambos aspectos, y con ello ahorrar tiempo y recursos, se realizaron dos diseños de experimentos. El primero fue uno de cribado para determinar los factores principales, el segundo fue uno de superficie de respuesta, con los factores principales para optimizar la respuesta analítica.

El diseño de experimentos de Placket-Burmann es un método eficaz que se utiliza para seleccionar los factores significativos de entre un gran número de factores que afectan al proceso [39]. Se evaluaron ocho factores experimentales, incluida la temperatura del gas de secado (A), el flujo del gas de secado (B), la presión del nebulizador (C), el voltaje del capilar (D); todos ellos corresponden a condiciones en la ionización por electro-spray. Por otro lado, se evaluó la temperatura de la columna (E), el volumen de inyección (F), la concentración de acetato de amonio (NH₄CH₃CO₂, G) y la concentración de ácido fórmico (HCOOH) en la fase móvil (H).

El análisis estadístico de los datos experimentales se llevó a cabo utilizando la prueba de Fisher para el análisis de la varianza (ANOVA). La tabla 4.3 presenta los valores *p* para cada variable, los factores con *p* < 0.05 (niveles de confianza > 95 %) se consideraron como significativos. También, se muestra el estadístico *r*², el cual representa el grado de ajuste del modelo a la variable de respuesta.

Los valores del coeficiente de determinación (*r*²) para cada analito se encontraron entre 0.8023 y 0.9584, lo que indica que el modelo aplicado es capaz de explicar más del 80 % de la variabilidad. En lo que respecta a los factores cromatográficos, F resultó significativo para todos los analitos (volumen de inyección), pues el análisis de los diagramas de Pareto indicó que existe una relación directamente proporcional entre éste y el área de pico. Ello indica que no ocurre saturación del sistema al inyectar el volumen máximo evaluado, por lo que se eligió 10 µL como volumen de inyección.

Tabla 4.3. Resultados del análisis estadístico de ocho factores utilizando el diseño de experimentos de Plackett-Burman para el área de pico de cada analito.

	Valor- <i>p</i>								<i>r</i> ²
	A	B	C	D	E	F	G	H	
Metformina	0.0000	0.8355	0.0000	0.0000	0.0300	0.0000	0.0000	0.0987	0.9584
Famotidina	0.0037	0.0564	0.0000	0.0007	0.0674	0.0000	0.0000	0.9528	0.9447
Indometacina	0.0001	0.0892	0.0009	0.0038	0.0001	0.0000	0.0100	0.0012	0.8023
Dexametasona	0.0269	0.0177	0.0000	0.0038	0.0000	0.0000	0.5957	0.0000	0.8279
Azitromicina	0.0000	0.1744	0.2408	0.0870	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.8933
Ivermectina	0.0005	0.5086	0.0000	0.0001	0.0002	0.0002	0.0000	0.0002	0.8337

El factor temperatura de columna (E) fue significativo para todos los analitos, con excepción de famotidina, y mostró un efecto negativo para casi todos los casos, excepto para metformina, que aumentó. Dado que la metformina es el analito que presenta mayor sensibilidad de los seis (figura 4.1), se eligió $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el método analítico.

En la composición de la fase móvil, la concentración de acetato de amonio (G) resultó significativamente negativa para metformina, famotidina e indometacina y positiva para azitromicina e ivermectina, el cual es el analito con la menor sensibilidad, debido a que se encuentra condicionado por la presencia de este ion para la formación del aducto en su detección. Al priorizar la detección de ivermectina, se eligió 10 mmol/L como la concentración de acetato de amonio en la fase acuosa. Por otro lado, el porcentaje de ácido fórmico (H) en la fase resultó significativo para indometacina, dexametasona, azitromicina e ivermectina, pues tuvo un efecto negativo en todos los casos. Por esta razón, se eligió la proporción más baja evaluada, a saber, 0.1 % v/v.

Los factores del A al D se incluyeron al diseño de experimentos, pues intervienen en el funcionamiento general de una fuente de electrospray (ESI). El gas de secado (nitrógeno) se encarga de que las gotas producidas en la fuente se evaporen, reduciendo su tamaño y aumentando su carga superficial [40]. El flujo de gas de secado (B), solo resultó significativo para la dexametasona, para la cual el área de pico presentó una relación inversamente proporcional. Por esta razón se eligieron 7 mL/min como el flujo del gas de secado. La temperatura del gas de secado (A) fue significativa para todos los casos, influyendo de manera positiva para metformina, famotidina, indometacina y dexametasona y negativamente para azitromicina e ivermectina. Azitromicina fue el único analito para el que la presión del nebulizador (C) y el voltaje capilar (D) no resultaron significativos, variando su influencia positiva o negativamente. A diferencia de los factores anteriores, no se logró discriminar entre las condiciones con base en solo estos resultados, razón por la cual su optimización se realizó mediante un diseño de experimentos de superficie de respuesta.

Se seleccionó un diseño de experimentos de superficie de respuesta, de tipo Box-Benhken (DBB). Éste consiste en un diseño giratorio e independiente, con un conjunto de variables que se encuentran en el punto medio de cada superficie y variables replicadas en el punto central del cubo [41]. Éstos son diseños de 3 niveles por factor, lo que los hace eficientes al estimar los coeficientes de primer y segundo orden (interacciones entre factores).

Se especificaron seis variables de respuesta (área de pico de cada analito) y 3 factores experimentales, a saber, A: presión del nebulizador (7-15 psi), B: voltaje capilar y C: temperatura del gas de secado. Los resultados de la prueba de Fisher para el análisis de la

varianza (ANOVA) se presentan en la tabla 4.4, así como los valores p y el estadístico r^2 . El DBB puede estimar las interacciones entre factores denotadas en la tabla como AA, AB, AC, BB, BC, etc.

Tabla 4.4. Resultados del análisis estadístico de tres factores utilizando el diseño de experimentos de Box-Benken para el área de pico de cada uno de los analitos.

	Valor- p									r^2
	A	B	C	AA	AB	AC	BB	BC	CC	
Metformina	0.0000	0.0000	0.6568	0.0700	0.0000	0.8756	0.0000	0.4456	0.8247	0.9666
Famotidina	0.0000	0.6600	0.1311	0.4769	0.7159	0.7427	0.0090	0.0056	0.8257	0.9036
Indometacina	0.0000	0.0083	0.0000	0.0591	0.0014	0.6044	0.0010	0.9229	0.0000	0.9883
Dexametasona	0.0000	0.4096	0.0922	0.0530	0.0001	0.4883	0.0308	0.6420	0.0067	0.7999
Azitromicina	0.0004	0.0000	0.0000	0.0078	0.2957	0.0051	0.3112	0.0000	0.4189	0.9234
Ivermectina	0.0000	0.3674	0.0000	0.0001	0.0000	0.0030	0.0114	0.0491	0.0001	0.8874

Los valores de r^2 de la tabla 4.4 se encuentran entre 0.80 y 0.98, lo que indica una buena relación entre los datos experimentales y el modelo ajustado, ilustrando la idoneidad del modelo. El factor A (Presión del nebulizador) resultó significativo para todos los analitos, mientras que los factores B y C lo hicieron solo en algunos casos. Las interacciones y factores cuadráticos resultaron significativos para algunos analitos, mostrando que no existe una relación lineal simple entre los factores experimentales y los factores de respuesta.

El software STATGRAPHICS permitió determinar las configuraciones de los factores experimentales para alcanzar características deseadas para más de una respuesta simultáneamente, a través de la construcción de una función de deseabilidad basada en valores de las variables de respuesta, misma que después es maximizada a partir de los resultados de un DBB. Los valores óptimos para maximizar la respuesta analítica se muestran en la tabla 4.5. Dichas condiciones permiten que el método HPLC-MS/MS tenga un porcentaje de deseabilidad de 70.31 % para el análisis de los seis analitos.

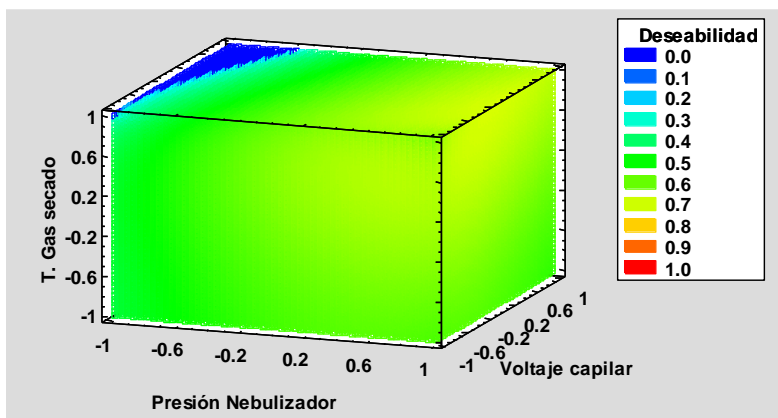


Figura 4.2. Gráfico de deseabilidad obtenido de los resultados del diseño de experimentos de superficie de respuesta (DBB).

La distribución de deseabilidad en función de la presión del nebulizador, el voltaje capilar y la temperatura del gas de secado se muestra en la figura 4.2. Es evidente que al acercarse a los máximos de presión y voltaje la deseabilidad aumenta. La tonalidad verde se hace más clara en el punto medio del voltaje capilar, lo que indica el 70 % de deseabilidad.

Tabla 4.5. Factores experimentales óptimos resultados del diseño de experimentos de Box-Benhken.

Factor experimental	Condición óptima experimental
A: Presión del nebulizador	15.0 psi
B: Voltaje capilar	4 100.0 V
C: Temperatura del gas de secado	350.0 °C

4.2 Validación instrumental del método HPLC-MS/MS

La validación instrumental del método se inició con la determinación del intervalo lineal. Se midieron 17 estándares en el intervalo de 1.0 a 2000.0 µg/L. El valor del área bajo la curva se graficó en función de la concentración y se consideró como intervalo lineal la zona donde la respuesta del analito fue directamente proporcional a la concentración [26].

Metformina y famotidina cuentan con intervalos dinámicos de linealidad, pues la tendencia cambia drásticamente en 500.0 µg/L, por lo que este punto fue el límite superior del intervalo de trabajo y 1.0 µg/L el inferior. Para los demás fármacos se encontró adecuada linealidad en todo el intervalo propuesto, pero se decidió acortar el intervalo de trabajo hasta 1000.0 µg/L, respetando el nivel más bajo de concentración determinado en cada caso.

Para evaluar el intervalo lineal se realizó el gráfico de residuales, en los que no se encontró una clara tendencia que indique que el modelo lineal no es adecuado para describir a los datos obtenidos, pues en todos los casos los residuales se encontraron distribuidos entre negativos y positivos. Mediante regresión lineal se determinó la ecuación de la recta, así como el error asociado para la ordenada al origen y la pendiente. Se obtuvieron los coeficientes de determinación y de correlación (tabla 4.6).

Adicionalmente, se calcularon los coeficientes HorRat, para cada nivel de concentración, y en todos los casos se cumplió el criterio establecido en la guía CCAYAC-CR-03/1, (menor a 2) [26]. También se cumplió, para todos los fármacos, el criterio para el intervalo de confianza de la pendiente del gráfico concentración recuperada promedio en función de la concentración adicionada. Ello incluye obtener un valor de 1.0, además de un valor del coeficiente de correlación entre 0.98 y 1.0.

Se determinó el % de recobro para cada nivel del intervalo de trabajo (promedio y desviación estándar), a partir de los cuales se logró determinar el intervalo de confianza. El criterio de aceptación que establece la guía CCAYAC-CR-03/1 [26] se cumplió para todos los analitos; debido a que el intervalo de concentraciones es muy amplio se tomó como referencia el criterio de aceptación más estricto, el cual es para los niveles de concentración del orden de 0.1 µg/L, donde el porcentaje de recuperación debe permanecer dentro del intervalo de 75 a 120 %. La recuperación evaluada de manera instrumental se encontró por arriba del 80 %. De manera particular, éstos estuvieron entre 82.8 y 118.8 % para metformina, para famotidina entre 83.1 y 116.1 %, para indometacina de 91.8 a 115.3 %, para dexametasona de 82.8 a 110.3 %, para azitromicina de 87.9 a 118.5 % y para ivermectina de 87.1 a 111.8 %.

Para determinar si el método analítico presentaba sesgo, se comprobó que el 100 % se encontraba dentro del intervalo de confianza del % de recuperación, condición que también se cumple para todos los niveles de concentración y para todos los analitos.

Tabla 4.6. Parámetros estadísticos de las regresiones lineales de las curvas de calibración, límites de detección (LDD) y límites de cuantificación (LDC) obtenidos para cada uno de los seis fármacos mediante la técnica HPLC-MS/MS.

Analito	Metformina	Famotidina	Indometacina	Dexametasona	Azitromicina	Ivermectina
Intervalo lineal (µg/L)	1.0 – 500.0	1.0 – 495.1	3.0 – 1 997.4	3.0 – 1 957.0	3.0 – 1 893.0	9.0 – 1 798.0
Intervalo de trabajo(µg/L)	1.0 – 500.0	1.0 – 495.0	3.0 – 998.70	3.0 – 979.0	3.0 – 947.0	9.0 – 899.0
Pendiente (uA L/µg)	1356.1 ± 2.9	826.4 ± 1.4	74.6 ± 0.08	39.7 ± 0.05	413.7 ± 1.0	8.2 ± 0.01
Ordenada al origen (uA)	8161.6 ± 531.4	4586.9 ± 254.6	-261.3 ± 33.2	13.2 ± 21.6	-1915.1 ± 373.8	-3.6 ± 5.0
Ecuación de la recta	A = 1356.1*C + 8161.6	A = 826.4*C + 4586.9	A = 74.6*C – 261.3	A = 39.7*C + 13.2	A = 413.7*C - 1915.1	A = 8.2*C – 3.6
Coefficiente de determinación (r ²)	0.9983	0.9989	0.9995	0.9992	0.9975	0.9992
Coefficiente de correlación (r)	0.9992	0.9995	0.9997	0.9996	0.9988	0.9996
N	33	33	36	36	36	27
LDD (µg/L)	0.08	0.08	1.99	1.00	1.89	1.89
LDC (µg/L)	1.00	1.00	3.0	2.94	2.84	8.99

*El error asociado se determinó considerando el estadístico t-Student al 95 % de confianza con n-2 grados de libertad.

Tras medir con el método cromatográfico optimizado cada uno de los siete niveles de concentración (0.08, 0.09, 0.1, 1.0, 2.0, 3.0 y 6.0 µg/L), se determinó el área bajo la curva, así como el valor de la relación señal/ruido (S/N). Donde el límite de detección (LDD) se determinó cuando el valor promedio resultó ser mayor o igual a 3. En la tabla 4.6, se muestra la concentración a la cual dicho criterio se cumplió, además del límite de cuantificación práctico (LDC), el cual se estableció como el nivel más bajo de la curva de calibración.

La repetibilidad es una medida de la variabilidad en los resultados cuando una medición se realiza en un corto periodo, en tanto que la precisión intermedia ofrece una estimación de la variación en los resultados cuando las mediciones se realizan en un solo laboratorio [27]. Mediante el ANOVA de un factor, la repetibilidad puede calcularse como la precisión dentro del grupo, mientras que la precisión intermedia se obtiene como la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de la precisión dentro del grupo y entre grupos. Del análisis de varianza, se obtuvieron los cuadrados medios intra y entre días, con los que se determinaron las desviaciones estándar relativas para repetibilidad y precisión intermedia. La precisión del método analítico puede evaluarse usando como criterio de aceptación un valor de $DER \leq 10\%$ [42,43]. Cuando el valor de F de Fisher calculada es menor o igual al valor crítico de F, no existe diferencia estadísticamente significativa entre los días de medición, lo que se comprueba con el valor de $p > 0.05$ (tabla 4.7).

Tabla 4.7. Parámetros para evaluar la repetibilidad y precisión intermedia de los seis analitos con la técnica HPLC-MS/MS.

	DER_r (%)	DER_{pi} (%)	p-Valor	F_{Calculada}	F_{Tablas}
Metformina	6.22	6.66	0.074	3.64	4.494
Famotidina	5.36	5.50	0.927	0.009	
Indometacina	5.41	5.55	0.185	1.923	
Dexametasona	5.01	5.39	0.067	3.851	
Azitromicina	9.75	9.77	0.317	1.067	
Ivermectina	9.74	9.91	0.386	0.543	

Partiendo de lo antes expuesto, y con base en los resultados mostrados en la tabla 4.7, se puede afirmar que el método analítico instrumental es preciso en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia, debido a que ambas desviaciones estándar se encuentran por debajo del 10 % para todos los casos. Respecto a azitromicina e ivermectina, el porcentaje aumenta, lo que puede deberse a que el perfil del pico resulta un poco más irregular en comparación con los otros cinco analitos, lo que genera mayor diferencia al comparar el área bajo la curva. En el caso del valor de p , todos los valores se encuentran por arriba de 0.05, mientras que el valor de F calculado es menor al valor crítico, lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa en la medición de los estándares utilizando la técnica HPLC-MS/MS optimizada.

4.3 Optimización del protocolo de Extracción en Fase Sólida (EFS)

Para la selección del cartucho de extracción y el pH de carga de la muestra, se evaluaron los cartuchos comercialmente disponibles, así como valores de pH en un amplio intervalo. Lo anterior considerando que los analitos contienen grupos funcionales ionizables y el estado de ionización de un compuesto puede cambiar sus características de retención y elución para un adsorbente dado. En estos ensayos se obtuvo el % fuga promedio y la desviación estándar, con el fin de elegir las condiciones de mayor retención de los analitos (figura 4.3).

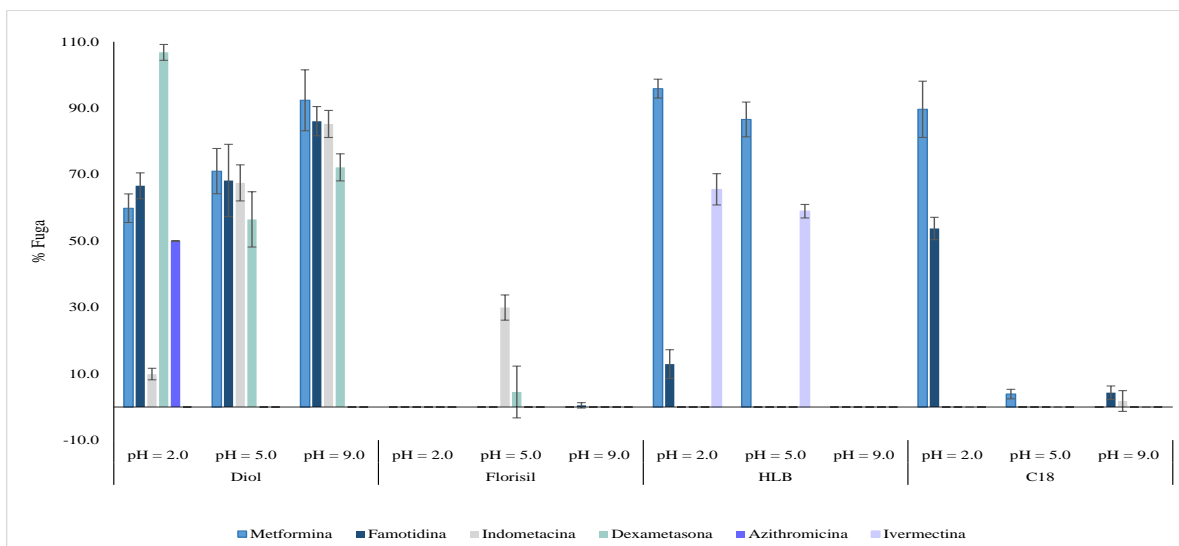


Figura 4.3. % de fuga 100.0 mL de una disolución 100.0 µg/L de los seis analitos a pH = 2.0, 5.0 y 9.0 en cartuchos Diol, Florisil, HLB y C18.

La completa retención de los analitos se logró con el cartucho HLB a pH = 9.0 y con el florisil a pH de 2.0. Los cartuchos florisil tienen un adsorbente de gel de sílice adherido a óxido de magnesio ($MgO \cdot SiO_2$), lo que los hace altamente polares [23, 36]. Con estos cartuchos se obtuvo una buena retención para los analitos en todo el intervalo de pH, debido a que todas las moléculas poseen grupos funcionales polares (cetonas, alcoholes, aminas y éteres) en su estructura, los cuales tienen afinidad por la resina funcionalizada del cartucho.

La resina de los cartuchos HLB se compone de un copolímero macroporoso hecho de una proporción equilibrada de dos monómeros, el divinilbenceno (lipofílico) y la N-vinilpirrolidona (hidrofílica) [44]. Este es considerado como un cartucho universal por la naturaleza no selectiva de su fase estacionaria. Al modificar a 9.0 el valor de pH en la disolución, se esperaba que los grupos funcionales amino y sulfonamida de metformina y famotidina se encontraran neutros ($pK_a = 12.4$ y 9.29 , respectivamente), lo que favorecería su afinidad, pues ambas son moléculas muy pequeñas. Para las otras moléculas, la interacción lipofílica gobernó su retención, ya que no hubo diferencia significativa en la retención al variar el pH.

Los cartuchos diol presentan polaridad media, debido a los grupos diol con los que está funcionalizada la resina. Se esperaba que con estos cartuchos se lograra retener a los analitos polares, como metformina y famotidina; sin embargo, a los tres niveles de pH hubo fuga de todos los analitos. Las interacciones entre los grupos funcionales de metformina y famotidina con los grupos diol de la fase del cartucho no fueron lo suficientemente fuertes para lograr su retención. En el caso de los otros compuestos, la interacción no polar con la cadena alifática y la sílica tampoco logró una retención cuantitativa, con excepción de la ivermectina.

Con los cartuchos C18 se observó un buen desempeño en general. Estos cartuchos utilizan octadecil sílice como adsorbente [44], siendo adecuada para compuestos no polares mediante una fuerte interacción hidrófoba. Ello se observa en los resultados mostrados previamente, pues se determinó una buena retención para todos los analitos, salvo a valores de pH ácido, cuando los grupos polares se encuentran protonados.

Los cartuchos con mejor desempeño en la retención al pH adecuado se eluyeron adicionando 3.0 mL de MeOH, seguido por 3.0 mL de AcN. Los porcentajes de recuperación para el cartucho florisil fueron menores al 4 %, para todos los analitos con ambos disolventes, lo que indica una fuerte interacción entre los analitos y la resina. Por otro lado, para el HLB se obtuvieron tasas de recuperación de entre 20 y 53 %, con metanol, y 3 y 60 %, con acetonitrilo. Debido a lo expuesto anteriormente, se seleccionó al cartucho HLB, con un pH inicial de la muestra de 9.0, como el cartucho óptimo para el protocolo de extracción en fase sólida. Lo anterior fue considerando que se debe optimizar el paso de elución.

La selección del volumen de carga se realizó tras medir a los eluatos resultantes de cargar 100.0, 250.0, 500.0 y 1 000.0 mL, en los que se conservó una masa de 10.0 µg de los analitos. Se determinó el % de fuga, y se obtuvo el promedio y desviación estándar (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Porcentaje de fuga y desviación estándar, al cargar 10.0 µg de masa de cada analito contenidos en diferentes volúmenes de muestra a pH = 9.0 en cartuchos HLB (6 cc,500 mg).

Disolución de carga		100.0 mL 100.0 µg/L		250.0 mL 40.0 µg/L		500.0 mL 20.0 µg/L		1 000.0 mL 10.0 µg/L	
Analitos	mCarga (µg)	% Fuga	% DE (n=3)	% Fuga	% DE (n=3)	% Fuga	% DE (n=3)	% Fuga	% DE (n=3)
Metformina	10.0	0.0	0.0	15.8	4.4	67.1	3.8	94.4	4.6
Famotidina		0.0	0.0	7.1	1.0	10.5	1.8	16.3	2.1
Indometacina		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.5	4.2
Dexametasona		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Azitromicina		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	65.3	3.5
Ivermectina		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Con los resultados mostrados en la tabla anterior se puede inferir que un mayor volumen de muestra cargada resulta en un mayor porcentaje de fuga de los analitos, sobre todo para el caso de la metformina. Con la finalidad de tener un mayor factor de concentración al finalizar el protocolo de extracción en fase sólida, es necesario cargar la mayor cantidad de volumen posible, por lo que se eligieron 250.0 mL como volumen de carga de la muestra.

Para determinar la capacidad de retención del cartucho de extracción durante la etapa de lavado, se analizaron los lixiviados recolectados en dicha etapa, empleando como disolución de lavado 3.0 mL de agua destilada y 3.0 mL de agua destilada con 5 % de MeOH. En la tabla 4.9, se presenta el valor de % de fuga y la desviación estándar tras evaluar las dos disoluciones de lavado, después de cargar 250.0 mL de agua destilada fortificada a 100.0 µg/L de cada uno de los fármacos a pH = 9.0, de manera independiente y por triplicado.

Tabla 4.9 Volumen de fuga para las disoluciones de lavado para el protocolo de EFS tras cargar 100.0 mL de agua destilada a 10.0 µg/L de cada fármaco a pH = 9.0 en cartucho HLB

Disolución de lavado	3.0 mL de agua destilada		3.0 mL de agua destilada 5 % MeOH	
Analito	% Fuga	%D.E.	% Fuga	%D.E.
Metformina	2.6	2.8	7.3	6.1
Famotidina	0.0	0.0	0.0	0.0
Indometacina	0.0	0.0	0.0	0.0
Dexametasona	0.0	0.0	0.0	0.0
Azitromicina	0.0	0.0	0.0	0.0
Ivermectina	0.0	0.0	0.0	0.0

No se encontró una respuesta asociada a los analitos, a excepción de metformina, con porcentajes menores al 10 %. Esto indica que los fármacos retenidos durante la etapa de carga no son extraídos por ninguna de las dos disoluciones de lavado. Por ello, se decidió utilizar agua destilada con 5 % MeOH para el lavado de los cartuchos HLB, pues la fracción de metanol permite retirar interferentes orgánicos retenidos en la etapa de carga.

Para la selección del disolvente capaz de eluir a los analitos de la manera más eficiente, se cargaron 250.0 mL de agua fortificada a 40.0 $\mu\text{g/L}$ ($\text{pH} = 9.0$) en cartuchos HLB, y se eluyeron con 10.0 mL de metanol, metanol al 0.5 %, 1.0 % y 2.0 % de ácido fórmico, también con metanol 1.0 % ácido acético y acetonitrilo puro. Se obtuvo el porcentaje de recuperación promedio y su desviación estándar ($n = 3$). En la figura 4.4 se muestran los resultados obtenidos tras estas pruebas.

En la figura 4.4 se observa cómo el acetonitrilo resulta ser el eluyente menos adecuado para todos los analitos, en tanto que el metanol puro mostró porcentajes de recuperación superiores al 40 % para todos los analitos. Al utilizar los eluyentes basados en metanol, indometacina y dexametasona se recuperaron en su totalidad, lo cual ocurre de manera opuesta para los demás analitos, pues su recuperación aumenta al incrementar el porcentaje de ácido fórmico y de manera independiente disminuye cuando el ácido cambia de fórmico a acético.

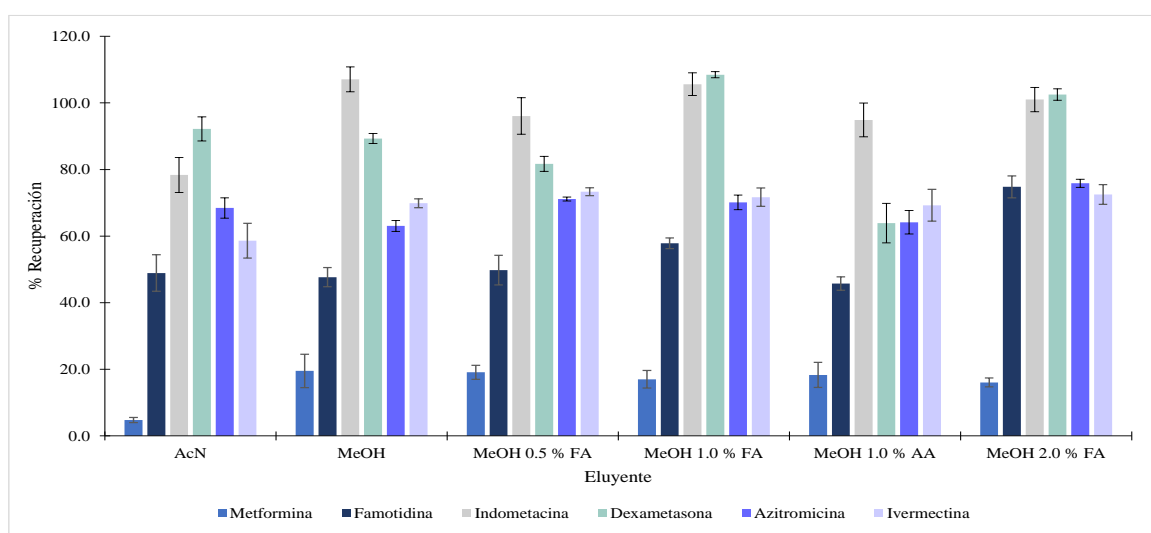


Figura 4.4. Porcentaje promedio de recuperación tras la elución con 10.0 mL de acetonitrilo (AcN), metanol (MeOH), metanol al 0.5 %, 1.0 % y 2.0 % de ácido fórmico y MeOH 1.0 % de ácido acético.

De acuerdo con las observaciones previas, la acidificación del eluyente mejora la extracción, ya que puede mejorar la solubilidad de los compuestos. El caso más evidente de ello fue la famotidina, pues en medios ácidos se protona la guanidina presente en la molécula, produciendo una sal, lo que incrementa su afinidad con el metanol [45]. Al utilizar ácido acético, el desempeño disminuye debido a que el valor de pK_a es mayor (4.7) al del ácido fórmico ($\text{pK}_a = 3.75$), el cual puede no ser suficiente para protonar a las moléculas.

Con base en lo anterior, se seleccionó al metanol con 2 % de ácido fórmico para la elución de metformina, famotidina, indometacina, dexametasona, azitromicina e ivermectina de

cartuchos HLB. Una vez seleccionado el eluyente, se determinó el menor volumen con el que se logra eluir a los seis analitos. Se evaluaron seis volúmenes de elución: 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 y 10.0 mL de metanol al 2 % de ácido fórmico, y se obtuvo el porcentaje promedio de recuperación y desviación estándar. Los resultados se muestran en la figura 4.5.

No se observaron diferencias importantes en el porcentaje de recuperación de los analitos al aumentar el volumen del eluyente a partir de 6.0 mL, por lo que este volumen se seleccionó para el paso de elución en el protocolo de extracción en fase sólida, además de permitir un mayor factor de concentración de los analitos. Los contaminantes emergentes se encuentran en concentraciones traza en matrices ambientales, por ello es necesario obtener un mayor factor de concentración, el cual puede alcanzarse al evaporar los eluatos hasta la sequedad y reconstituirlos antes del análisis cromatográfico. En este sentido, cuando se cargan 250.0 mL de muestra y se eluyen con 6.0 mL se obtiene un factor de concentración de 41.67 veces; luego entonces, si esos 6.0 mL recuperados se evaporan y se reconstituyen en 1.0 mL, el factor de concentración incrementa hasta 250. Esto disminuye de manera importante los límites de cuantificación del método analítico.

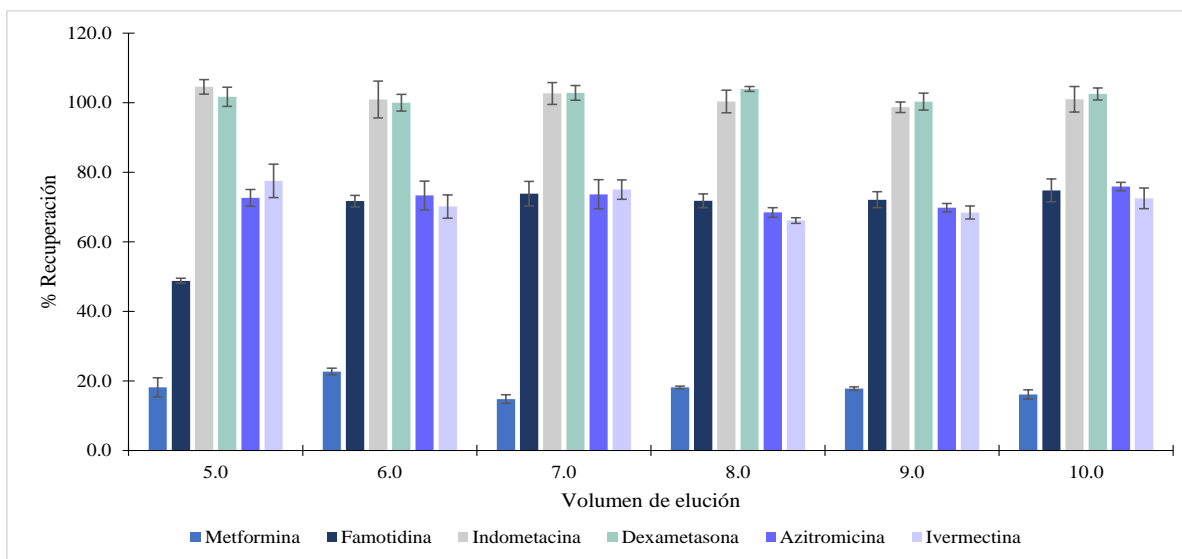


Figura 4.5. Porcentajes promedio de recuperación mediante la elución con 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 y 10.0 mL de metanol con 2 % de ácido fórmico.

Una vez evaporados los eluatos, provenientes de disoluciones estándar, hasta la sequedad y reconstituidos con 1.0 mL de metanol, se determinó su concentración, el % de recuperación, y la desviación estándar ($n = 5$), con el fin de evaluar si durante la evaporación y reconstitución había pérdida de los analitos. Para metformina se obtuvieron recuperaciones promedio de 90.0 ± 9.1 %, mientras que para famotidina los valores fueron de 100.1 ± 12.3 %, de 99.9 ± 5.5 % para indometacina, 110.0 ± 2.5 % para dexametasona, 105.0 ± 8.1 % para azitromicina y 87.2 ± 5.2 % para ivermectina.

Tras analizar los resultados, se puede concluir que el proceso de evaporación y reconstitución de las muestras no afecta de manera significativa la recuperación de los analitos, pues en todos los casos se obtiene una recuperación mayor al 85 %, lo cual se compensa con el gran factor de concentración que se obtiene al incluir este paso en la preparación de la muestra.

4.4 Validación del método EFS-HPLC-MS/MS en agua residual cruda

El agua residual usada en la validación del método analítico se recolectó entre los meses de abril y mayo de 2022, en el canal de riego Tlamaco, en la comunidad de Tlahuelilpan, Hidalgo. Este canal deriva del Gran Canal de Desagüe, en la Ciudad de México. El protocolo de toma de muestra se basó en lo señalado por la norma mexicana NMX-AA-003-1980-Aguas Residuales Muestreo [46], así como en los procedimientos para recolección de muestras de aguas residuales de la US EPA [47].

Los resultados mostrados en la tabla 4.10 provienen de fortificar los extractos procedentes del protocolo de EFS para 250.0 mL de agua residual cruda en un intervalo de concentración entre 1.0 y 50 $\mu\text{g/L}$. Esto con el fin de garantizar que los extractos provenientes de la preconcentración de las muestras se encuentren dentro del intervalo lineal. Al graficar el área obtenida en función de la concentración se determinó el intervalo lineal, el intervalo de trabajo, la pendiente de la recta, el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación. Se observó la linealidad para cada analito, así como el gráfico de residuales, en los que no se encontró alguna tendencia que denotara que el modelo lineal no es el adecuado. Adicional a las pruebas realizadas para evaluar el intervalo de trabajo (intervalo de confianza de la pendiente, $\text{HorRat} < 2$), se contempló el intervalo de concentraciones evaluado en la recuperación (0.05 – 1.0 $\mu\text{g/L}$).

El límite de cuantificación práctico para el método analítico se estableció como el nivel más bajo de la curva de calibración, considerando la EFS (Tabla 4.10). El LDD se determina cuando existe una señal asociada con un valor de $S/N > 3$ [26]. Debido a que la matriz seleccionada contiene a los analitos, no es posible determinar dicha concentración, sin embargo, éste se estimó a partir del valor del LDD instrumental, considerando el factor de concentración que se obtiene con la adición del método de EFS.

La recuperación del método EFS-HPLC-MS/MS se evaluó a través de los porcentajes obtenidos tras cargar, por triplicado, muestras de agua residual fortificadas entre 0.05 – 1.0 $\mu\text{g/L}$, siguiendo el protocolo optimizado de EFS. Dichos valores de concentración se eligieron a partir del nivel de concentración más bajo cuantificable, sin un método de preparación de muestra previo. En la tabla 4.11 se muestran los valores de recuperación para cada nivel de concentración y su desviación estándar ($n = 3$). La guía de la CCAYAC del 2017 [26] establece que el criterio de aceptación para niveles de concentración de 1.0 $\mu\text{g/L}$ es una recuperación entre 40 y 120 %. Los niveles evaluados son menores, sin embargo, el criterio de aceptación se relaja en niveles más bajos, dado que este criterio es el más flexible en la guía, y por ello se acepta la recuperación del método.

En la tabla 4.11, también se muestra el valor del porcentaje de recuperación global del método, el cual se obtuvo como el valor de la pendiente de la recta en el gráfico de masa recuperada (tras el protocolo de EFS) en función de la masa cargada. Estos valores resultaron comparables con los obtenidos para cada nivel de concentración y se encuentran dentro de los parámetros de aceptación establecidos por CCAYAC [26].

Tabla 4.10. Parámetros estadísticos de las regresiones lineales de las curvas de calibración, límites de detección (LDD) y límites de cuantificación (LDC) obtenidos para cada uno de los seis fármacos para el método EFS-HPLC-MS/MS.

Analito	Metformina	Famotidina	Indometacina	Dexametasona	Azitromicina	Ivermectina
Intervalo lineal (µg/L)	3.0 – 500.0	3.0 – 495.1	3.0 – 499.3	3.0 – 489.3	4.7 – 473.3	7.1 – 449.5
Intervalo de trabajo (µg/L)	0.050 – 500.0	0.050 – 495.1	0.050 – 499.3	0.049 – 489.3	0.047 – 473.3	0.047 – 449.5
Pendiente (uA L/µg)*	2150.77 ± 4.17	198.42 ± 0.23	151.43 ± 0.25	78.63 ± 0.24	618.53 ± 1.99	17.67 ± 0.09
Ordenada al origen (uA)*	4359.08 ± 790.48	-118.68 ± 43.76	874.50 ± 46.62	7.40 ± 44.22	-3924.98 ± 376.08	25.32 ± 16.66
Ecuación de la recta*	A = 2150.77*C + 4359.08	A = 198.42*C - 118.68	A = 151.43*C + 874.50	A = 78.63*C + 7.40	A = 618.53*C - 3924.98	A = 17.67*C - 25.32
Coefficiente de determinación (r²)	0.9989	0.9996	0.9992	0.9973	0.9976	0.9956
Coefficiente de correlación (r)	0.9995	0.9998	0.9996	0.9987	0.9988	0.9978
N	30	30	30	30	27	24
LDD (µg/L)	0.0005	0.0005	0.0080	0.0040	0.0070	0.0104
LDC (µg/L)	0.050	0.050	0.050	0.049	0.047	0.047

*El error asociado se determinó considerando el estadístico t-Student al 95 % de confianza con n-2 grados de libertad.

El factor de concentración (F. C.) experimental, mostrado también en la tabla 4.11, y su intervalo de confianza, se obtuvieron como el valor de la pendiente de la recta tras graficar la concentración recuperada en función de la concentración adicionada. Solo para indometacina y dexametasona se obtuvo el valor teórico esperado (250 veces), lo cual es similar a lo obtenido en la optimización del método. Sin embargo, para azitromicina se obtuvo un factor superior al esperado, lo que indica que hay un efecto matriz positivo para este analito. Adicionalmente se muestra el valor de r^2 el cual establece que existe un comportamiento lineal.

Tabla 4.11. Porcentaje de recuperación (Rec.) promedio en el intervalo 50 – 1 000 ng/L para el método EFS-HPLC-MS/MS en agua residual cruda.

C (µg/L)	Metformina		Famotidina		Indometacina		Dexametasona		Azitromicina		Ivermectina	
	Rec. (%)	D.E. (%)	Rec. (%)	D.E. (%)	Rec. (%)	D.E. (%)	Rec. (%)	D.E. (%)	Rec. (%)	D.E. (%)	Rec. (%)	D.E. (%)
0.05	50.0	3.1	62.1	2.1	100.7	5.2	115.2	4.4	107.6	6.5	84.0	1.9
0.08	55.9	3.5	60.9	2.1	98.8	2.4	101.8	0.6	112.8	9.8	79.9	5.4
0.10	60.5	9.1	61.7	2.3	99.4	2.0	101.5	2.4	109.5	6.3	81.4	8.7
0.30	60.7	2.3	62.3	4.8	95.2	5.3	107.4	10.8	109.6	5.0	77.2	4.0
0.50	58.2	4.5	64.6	2.9	103.1	3.4	98.8	0.1	110.3	4.6	79.7	4.5
0.80	53.2	3.1	61.4	3.4	98.9	3.7	99.3	1.5	108.5	2.8	73.7	1.8
1.00	61.4	6.6	63.4	2.4	98.6	3.1	101.4	1.9	113.2	1.1	72.4	7.1
Rec. global (%)	58.6 ± 0.8		63.0 ± 0.4		99.0 ± 0.4		100.0 ± 0.4		107.8 ± 0.3		72.3 ± 0.6	
F. C.*	146.54 ± 1.88		157.40 ± 0.88		247.54 ± 1.09		249.96 ± 0.96		269.54 ± 0.87		180.81 ± 1.63	
r²	0.9786		0.9958		0.9974		0.9980		0.9986		0.9893	

* El error asociado se determinó considerando el estadístico t-Student al 95 % de confianza con n-2 grados de libertad.

La repetibilidad y precisión intermedia se determinaron de manera análoga a la validación instrumental, pero añadiendo el paso de EFS. En la tabla 4.12 se muestran los resultados obtenidos del análisis de varianza, así como las desviaciones estándar de repetibilidad y reproducibilidad.

Tabla 4.12. Parámetros para evaluar la repetibilidad y precisión intermedia de los seis analitos con el método HPLC-MS/MS.

	DER _r (%)	DER _{pi} (%)	p-Valor	F _{Calculada}	F _{Tablas}
Metformina	9.03	9.27	0.885	0.021	4.494
Famotidina	4.99	5.02	0.378	0.823	
Indometacina	4.93	5.04	0.196	1.818	
Dexametasona	6.25	6.319	0.257	1.383	
Azitromicina	5.00	5.05	0.261	1.356	
Ivermectina	6.76	6.78	0.307	1.113	

El criterio de aceptación utilizado fue que el valor de la desviación estándar relativa (DER) fuese menor o igual al 10 % [34, 35], así como que el valor de $F_{calculada} < F_{tablas}$, y que $p > 0.05$, lo que indica que para ninguno de los analitos existe diferencia significativa entre los días de medición. Dado que dichos criterios se cumplieron para todos los analitos, el método SPE-HPLC-MS/MS es preciso en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia.

Con base en lo anterior, el método EFS-HPLC-MS/MS desarrollado y optimizado demostró, a través de los parámetros de desempeño evaluados, ser apto para la cuantificación de metformina, famotidina, indometacina, dexametasona, azitromicina en agua residual cruda, en niveles de concentración por arriba de 10 ng/L.

4.5 Evaluación de la robustez de la metodología EFS-HPLC-MS/MS en diferentes matrices acuosas ambientales

El método completo se evaluó en otras matrices de interés ambiental, esto tras determinar el recobro para los niveles inferior, medio y superior y compararlos con los resultados obtenidos para la validación de agua residual. En la tabla 4.13 se muestran dichos resultados.

Tabla 4.12. Porcentaje de recuperación promedio para los seis analitos en 250.0 mL de agua de pozo, lixiviado de agua residual y efluente de planta de tratamiento de agua residual cargados en cartuchos HLB y fortificados hasta 50, 80, 300 y 1 000 ng/L.

Matriz		Agua de pozo		Lixiviado de agua residual		Efluente de PTAR	
Analitos	C _{Carga} (ng/L)	% Rec.	D.E. (%) (n=3)	% Rec.	D.E. (%) (n=3)	% Rec.	D.E. (%) (n=3)
Metformina	50	49.7	5.1	58.6	5.0	N/A	N/A
	80	N/A	N/A	N/A	N/A	51.3	7.7
	300	53.9	1.6	57.6	1.1	60.9	1.1
	1 000	57.8	0.9	51.3	5.1	61.7	2.4
Famotidina	50	61.5	5.3	64.9	4.0	N/A	N/A
	80	N/A	N/A	N/A	N/A	51.7	1.8
	300	60.8	3.9	65.7	1.2	59.3	1.4
	1 000	62.7	4.9	60.9	1.5	61.7	0.3
Indometacina	50	98.6	2.9	102.0	5.7	N/A	N/A
	80	N/A	N/A	N/A	N/A	90.6	4.1
	300	103.4	7.9	103.8	3.7	95.2	5.8
	1 000	102.9	2.0	98.1	2.7	93.9	1.6
Dexametasona	50	96.6	2.6	106.6	2.1	N/A	N/A
	80	N/A	N/A	N/A	N/A	88.4	2.1
	300	105.1	2.2	99.3	4.2	91.2	4.0
	1 000	101.8	6.8	105.0	4.8	89.9	4.6
Azitromicina	50	98.3	4.0	91.7	0.4	N/A	N/A
	80	N/A	N/A	N/A	N/A	81.1	2.5
	300	97.3	4.3	91.1	2.3	92.2	4.2
	1 000	95.6	5.7	91.9	1.2	90.2	3.6
Ivermectina	50	70.4	9.2	75.4	6.3	N/A	N/A
	80	N/A	N/A	N/A	N/A	75.1	2.2
	300	72.4	3.1	75.2	7.1	78.7	6.2
	1 000	72.8	0.4	69.0	3.4	75.0	7.2

*N/A: No aplica.

Dado que la validación inicialmente se realizó con agua residual, se esperaba que en matrices más sencillas se tuvieran resultados similares a los mostrados en la tabla 4.10, lo cual se cumple para el agua de pozo y los lixiviados de agua residual. En contraste, con el agua proveniente de la PTAR no se logró obtener una respuesta repetible para el nivel de fortificación de 50 ng/L, y fue hasta 80 ng/L donde se estableció el nivel inferior. Lo anterior

puede deberse a que el agua residual pasa por el proceso de floculación, resultando en un alto nivel de turbidez que la hace difícil de percolar a través de los cartuchos de extracción en fase sólida. Ello puede evitar que los analitos interactúen lo suficiente con la resina del cartucho, evitando así su retención.

Para las tres matrices se tuvieron resultados repetibles y aceptables, de acuerdo con los criterios establecidos por la CCAYAC en 2017 [26], pues en todos los casos se cumple el intervalo de recuperación entre 40 y 120 %.

4.6 Aplicación del método EFS-HPLC-MS/MS en matrices acuosas ambientales

Se determinó la concentración de los seis analitos evaluados en 30 muestras de lixiviado de agua residual provenientes de la estación de lisímetros de la UNAM, siendo dexametasona el fármaco del cual se encontró mayor concentración. La concentración de dexametasona osciló entre 0.1 y 15.7 $\mu\text{g/L}$, seguido por azitromicina entre 0.05 y 4.6 $\mu\text{g/L}$ e indometacina en un intervalo de 0.05 a 1.15 $\mu\text{g/L}$. En particular, para estos dos últimos analitos, se encontraron señales asociadas por debajo de los límites de cuantificación del método validado, por lo que es necesario validar el método para abarcar un intervalo de concentraciones más bajo.

Por otro lado, no se encontró una señal asociada para famotidina en ninguna de las muestras, mientras que metformina se encontró en el intervalo de 0.05 a 2.3 $\mu\text{g/L}$, teniendo un comportamiento opuesto a lo esperado, pues al ser los analitos con mayor polaridad se esperaba encontrarlos en los lixiviados debido a que no se retienen por el suelo. Por último, para ivermectina se reportan concentraciones entre 0.05 y 1.0 $\mu\text{g/L}$.

5. Conclusiones

Se desarrolló, optimizó y validó una metodología de extracción en fase sólida acoplada a HPLC-MS/MS para la cuantificación de metformina, famotidina, indometacina, dexametasona, azitromicina e ivermectina en muestras de agua residual. El método fue capaz de concentrar a los analitos en promedio 208 veces, con porcentajes de recuperación entre 50 y 113 %, dentro de intervalo de concentración de 12 a 500 000 ng/L . Así mismo, con la evidencia mostrada, este método puede emplearse en otras matrices ambientales, como agua de pozo, lixiviado de agua residual y efluente de planta de tratamiento.

Mediante diseño de experimentos se logró alcanzar una deseabilidad del 70.31 % para el método HPLC-MS/MS, siendo la presión del nebulizador, el voltaje capilar y la temperatura del gas de secado los factores significativos. Por otro lado, la retención en cartuchos HLB de moléculas polares como metformina y famotidina, solo se logra al subir el valor de pH de las muestras a 9.0, pues se encuentran en su forma neutra, lo que favorece la interacción con la resina de los cartuchos.

A través del seguimiento de los fármacos usados para el tratamiento de la sintomatología de la COVID-19 en agua residual es posible tener un trazador en tiempo real de la población infectada y posiblemente lograr una alerta temprana de nuevos brotes, como se señala en la literatura. El presente trabajo es un paso para comenzar de manera adecuada, el uso de la herramienta de la epidemiología basada en agua residual.

6. Referencias

- [1] P.M. Choi, B.J. Tschärke, E. Donner, J.W. O'Brien, S.C. Grant, S.L. Kaserzon, R. Mackie, E. O'Malley, N.D. Crosbie, K. V. Thomas, J.F. Mueller, Wastewater-based epidemiology biomarkers: Past, present and future, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 105 (2018) 453–469. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.004>.
- [2] W. Hall, J. Prichard, P. Kirkbride, R. Bruno, P.K. Thai, C. Gartner, F.Y. Lai, C. Ort, J.F. Mueller, An analysis of ethical issues in using wastewater analysis to monitor illicit drug use, *Addiction*. 107 (2012) 1767–1773. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2012.03887.x>.
- [3] G. Medema, L. Heijnen, G. Elsinga, R. Italiaander, A. Brouwer, Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in the Netherlands, *Environ. Sci. Technol. Lett.* 7 (2020) 511–516. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357>.
- [4] C.G. Daughton, Wastewater surveillance for population-wide Covid-19: The present and future, *Sci. Total Environ.* 736 (2020) 139631. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139631>.
- [5] J.R. González-Reyes, M. de la L. Hernández-Flores, J.E. Paredes-Zarco, A. Téllez-Jurado, O. Fayad-Meneses, L. Carranza-Ramírez, Detection of SARS-CoV-2 in wastewater northeast of Mexico city: Strategy for monitoring and prevalence of COVID-19, *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 18 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijerph18168547>.
- [6] B. Subedi, K. Kannan, Mass loading and removal of select illicit drugs in two wastewater treatment plants in New York State and estimation of illicit drug usage in communities through wastewater analysis, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 6661–6670. <https://doi.org/10.1021/es501709a>.
- [7] M.G. Jiménez-Rodríguez, F. Silva-Lance, L. Parra-Arroyo, D.A. Medina-Salazar, M. Martínez-Ruiz, E.M. Melchor-Martínez, M.A. Martínez-Prado, H.M.N. Iqbal, R. Parra-Saldívar, D. Barceló, J.E. Sosa-Hernández, Biosensors for the detection of disease outbreaks through wastewater-based epidemiology, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 155 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116585>.
- [8] E. Archer, E. Castrignanò, B. Kasprzyk-Hordern, G.M. Wolfaardt, Wastewater-based epidemiology and enantiomeric profiling for drugs of abuse in South African wastewaters, *Sci. Total Environ.* 625 (2018) 792–800. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.269>.
- [9] Instituto Mexicano del Seguro Social, Recomendaciones para el tratamiento de la infección por SARS-CoV-2, agente causal de COVID-19, Gob. México. (2020) 7. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)90296-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)90296-8).
- [10] Instituto Mexicano del Seguro Social, Guía clínica para el tratamiento de la COVID-19 en México, Gob. México. (2021) 24. https://www.gob.mx/telecomm/documentos/guia-clinica-para-el-tratamiento-de-la-covid19-en-mexico%0Ahttps://coronavirus.gob.mx/wp-content/uploads/2021/08/GuiaTx_COVID19_ConsensoInterinstitucional_2021.08.03.pdf.
- [11] V.R. Emani, S. Goswami, D. Nandanoor, S.R. Emani, N.K. Reddy, R. Reddy, Randomised controlled trials for COVID-19: evaluation of optimal randomisation methodologies—need for data validation of the completed trials and to improve ongoing and future randomised trial designs, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 57 (2021) 106222. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106222>.
- [12] D.E. Freedberg, J. Conigliaro, T.C. Wang, K.J. Tracey, M. V. Callahan, J.A. Abrams, M.E. Sobieszczyk, D.D. Markowitz, A. Gupta, M.R. O'Donnell, J. Li, D.A. Tuveson, Z. Jin, W.C. Turner, D.W. Landry, Famotidine Use Is Associated With Improved Clinical Outcomes in Hospitalized COVID-19 Patients: A Propensity Score Matched Retrospective Cohort Study, *Gastroenterology*. 159 (2020) 1129–1131.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.05.053>.
- [13] J.F. Mather, R.L. Seip, R.G. McKay, Impact of Famotidine Use on Clinical Outcomes of Hospitalized Patients with COVID-19, *Am. J. Gastroenterol.* 115 (2020) 1617–1623. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000832>.
- [14] M. Zangiabadian, S.A. Nejadghaderi, M.M. Zahmatkesh, B. Hajikhani, M. Mirsaedi, M.J. Nasiri, The Efficacy and Potential Mechanisms of Metformin in the Treatment of COVID-19 in the Diabetics: A Systematic Review, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 12 (2021) 1–9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.645194>.
- [15] S. Ibrahim, J.R. Lowe, C.T. Bramante, S. Shah, N.R. Klatt, N. Sherwood, L. Aronne, M. Puskarich, L. Tamariz, A. Palacio, E. Bomberg, M. Usher, S. King, B. Benson, D. Vojta, C. Tignanelli, N. Ingraham, Metformin and Covid-19: Focused Review of Mechanisms and Current Literature Suggesting Benefit, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 12 (2021) 1–11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.587801>.
- [16] M.A. Marinella, Indomethacin and resveratrol as potential treatment adjuncts for SARS-CoV-

- 2/COVID-19, *Int. J. Clin. Pract.* 74 (2020) 25–27. <https://doi.org/10.1111/ijcp.13535>.
- [17] N. Shekhar, H. Kaur, P. Sarma, A. Prakash, B. Medhi, Indomethacin: an exploratory study of antiviral mechanism and host-pathogen interaction in COVID-19, *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 20 (2022) 383–390. <https://doi.org/10.1080/14787210.2022.1990756>.
- [18] D. Echeverría-Esnal, C. Martín-Ontiyuelo, M.E. Navarrete-Rouco, M. De-Antonio Cuscó, O. Ferrández, J.P. Horcajada, S. Grau, Azithromycin in the treatment of COVID-19: a review, *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 19 (2021) 147–163. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1813024>.
- [19] Instituto Mexicano del Seguro Social, Análisis breve de la evidencia y recomendaciones sobre el uso de Ivermectina en COVID-19, (2020). <https://covid19.cdmx.gob.mx/storage/app/media/Articulos/revision-de-ivermectina-corregida13ene20.pdf>.
- [20] W.J. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, Chang Z, Metformin (DB00331), Drugbank a Compr. Resour. Silico Drug Discov. Explor. *Acids Res.* (2006). <https://go.drugbank.com/drugs/DB00331> (accessed June 10, 2023).
- [21] W.J. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, Chang Z, Famotidine (DB00927), Drugbank a Compr. Resour. Silico Drug Discov. Explor. *Nucleic Acids Res.* (2006). <https://go.drugbank.com/drugs/DB00927> (accessed June 10, 2023).
- [22] W.J. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, Chang Z, Indomethacin (DB00328), Drugbank a Compr. Resour. Silico Drug Discov. Explor. *Nucleic Acids Res.* (2006). <https://go.drugbank.com/drugs/DB00328> (accessed June 10, 2023).
- [23] W.J. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, Chang Z, Dexamethasone (DB01234), Drugbank a Compr. Resour. Silico Drug Discov. Explor. *Nucleic Acids Res.* (2006). <https://go.drugbank.com/drugs/DB01234> (accessed June 10, 2023).
- [24] W.J. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, Chang Z, Azithromycin (DB00207), Drugbank a Compr. Resour. Silico Drug Discov. Explor. *Nucleic Acids Res.* (2006). <https://go.drugbank.com/drugs/DB00207> (accessed June 10, 2023).
- [25] W.J. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, Chang Z, Ivermectin (DB00602), Drugbank a Compr. Resour. Silico Drug Discov. Explor. *Nucleic Acids Res.* (2006). <https://go.drugbank.com/drugs/DB00602> (accessed June 10, 2023).
- [26] Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura, Criterios para la Validación Interna y Confirmación de Métodos Físicoquímicos CCAYAC-CR-03/1, (2017) 46.
- [27] B. Magnusson, U. Örnemark, Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2nd ed., 2014.
- [28] I. Taverniers, M. De Loose, E. Van Bockstaele, Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 535–552. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.04.001>.
- [29] Waters Corporation, Technical Note. Oasis Sample Extraction Products: Chemistry & Formats, (2010) 2.
- [30] Y. Tao, B. Zhang, Y. Zhao, Z. Zhu, B. Chen, Enhanced Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)-Based Analysis of Metformin and Guanylurea in Water Samples, *Water, Air, Soil Pollut.* 231 (2020) 576. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04867-6>.
- [31] T.L. Jones-Lepp, Chemical markers of human waste contamination: Analysis of urobilin and pharmaceuticals in source waters, *J. Environ. Monit.* 8 (2006) 472–478. <https://doi.org/10.1039/b512858g>.
- [32] V. Sok, F. Marzan, D. Gingrich, F. Aweeka, L. Huang, Development and validation of an LC-MS/MS method for determination of hydroxychloroquine, its two metabolites, and azithromycin in EDTA-treated human plasma, *PLoS One.* 16 (2021) 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247356>.
- [33] E. Vulliet, J.B. Baugros, M.M. Flament-Waton, M.F. Grenier-Loustalot, Analytical methods for the determination of selected steroid sex hormones and corticosteroids in wastewater, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 2143–2151. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-1084-z>.
- [34] T. Pütz, J. Fank, M. Flury, Lysimeters in Vadose Zone Research, *Vadose Zo. J.* 17 (2018) 1–4. <https://doi.org/10.2136/vzj2018.02.0035>.
- [35] J.C. FLÁVIA LADA DEGAUT PONTES, ROBERTO PONTAROLO, FRANCINETE RAMOS CAMPOS, M.S.P.A.A.C.L.B.T. GASPARETTO, MARCO ANDRÉ CARDOSO, Development and validation of an HPLC-MS / MS method for simultaneous determination of Ivermectin , Febantel , Praziquantel , Pyrantel Pamoate and Academic Sciences Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical

- Research IN - FIXED, *J. Pharm. Clin. Res.* 6 (2013) 190–200.
- [36] N.S. Rashed, S. Zayed, A. Abdelazeem, F. Fouad, Development and validation of a green HPLC method for the analysis of clorsulon, albendazole, triclabendazole and ivermectin using monolithic column: Assessment of the greenness of the proposed method, *Microchem. J.* 157 (2020) 105069. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105069>.
- [37] E. Morbidelli, J. Rambaldi, L. Ricci Bitti, A. Zaghini, A. Barbarossa, A quick and simple method for the determination of ivermectin in dog plasma by LC–MS/MS, *MethodsX.* 5 (2018) 1503–1507. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.11.011>.
- [38] D. Löffler, T.A. Ternes, Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1021 (2003) 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.08.089>.
- [39] R.N. McGrath, Y. Xu, A. Taylor, Screening main and interaction effects in a Plackett-Burman design, *Commun. Stat. - Simul. Comput.* 0 (2023) 1–21. <https://doi.org/10.1080/03610918.2023.2171058>.
- [40] C.S. Ho, C.W.K. Lam, M.H.M. Chan, R.C.K. Cheung, L.K. Law, L.C.W. Lit, K.F. Ng, M.W.M. Suen, H.L. Tai, Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications., *Clin. Biochem. Rev.* 24 (2003) 3–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18568044>.
- [41] T. Tang, W. Chen, L. Li, S. Cao, Design of experiments (DoE) to develop and to optimize extraction of psychoactive substances, *Anal. Methods.* (2023) 1601–1609. <https://doi.org/10.1039/d3ay00059a>.
- [42] T.A. Little, Establishing Acceptance Criteria for Analytical Methods, *BioPharm Int.* (2016) 2–6.
- [43] H.T. Karnes, C. March, Precision, Accuracy, and Data Acceptance Criteria in Biopharmaceutical Analysis, *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* 10 (1993) 1420–1426. <https://doi.org/10.1023/A:1018958805795>.
- [44] Hawach Scientific, Reversed Phase SPE Cartridge, (n.d.). <https://www.specartridge.com/product/normal-phase-diol-spe-cartridges>.
- [45] A. Marosi, Z. Szalay, S. Béni, Z. Szakács, T. Gáti, Á. Rácz, B. Noszál, Á. Demeter, Solution-state NMR spectroscopy of famotidine revisited: Spectral assignment, protonation sites, and their structural consequences, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 1653–1666. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5599-6>.
- [46] NMX-AA-003, Aguas residuales- Muestreo, NMX-AA-003-1980. (1980) 9.
- [47] E.L. Berg, Handbook for Sampling and Sample Preservation of Water and Wastewater, U.S. Environmental Prot. Agency Off. Res. Dev. (1992) 418.