

Desarrollo de metodologías por Cromatografía de gases para la identificación y cuantificación de compuestos orgánicos clorados en aguas residuales y municipales.

INFORME FINAL

PROYECTO TC1006.1

MANUEL SÁNCHEZ Z.
MARTHA AVILES F.
LUIS A. GONZÁLEZ E.
NORMA RAMÍREZ S.

ÍNDICE GENERAL

DESARROLLO DE METODOLOGÍAS PARA CROMATOGRAFÍA DE GASES PARA LA IDENTIFICACION Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS CLORADOS EN AGUA RESIDUALES Y MUNICIPALES

Introducción.....	1
Fuentes de contaminantes emergentes.....	2
Fuentes puntuales.....	2
Fuentes no puntuales.....	2
Problemática de los fármacos en aguas residuales.....	2, 3, 4
Compuestos farmacéuticos reguladores de lípidos.....	4, 5, 6, 7
Tabla 1. Características físico-químicas de fármacos reguladores de lípidos.....	5
Tabla 2. Concentraciones de fármacos reguladores de lípidos en plantas tratamiento de aguas residuales municipales.....	6
Fármacos veterinarios.....	7
Objetivo.....	7
Metodología.....	7
Implementación de las metodologías.....	8
Tabla 1.....	8
Tabla 2.....	9
Figura 1.....	9
Tabla 3.....	10
Resultados.....	11
Discusión.....	11, 12
Conclusiones.....	12
Anexos.....	14 - 26
Bibliografía.....	27, 28

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) PARA LA DETERMINACIÓN DE TILOSINA

Introducción.....	29, 30
Figura 1.....	29
Objetivo.....	30
Metodología.....	30
Materiales y métodos.....	31
Tabla 1.....	32
Resultados.....	32
Figura 2.....	32
Tabla 2.....	33
Tabla 3.....	33
Figura 3.....	34
Tabla 4.....	34
Discusiones.....	35
Conclusiones.....	35
Referencias.....	36
Anexos.....	37 - 41

INTRODUCCIÓN.

Hasta principios de 1990, los compuestos peligrosos no polares, y por tanto los contaminantes orgánicos persistentes (COP) y los metales pesados, fueron el foco de interés y etiquetados como contaminantes prioritarios, consecuentemente fueron parte de intensos programas de monitoreo y por tanto están regulados por distintas legislaciones (Becker et al., 2008; Bandala et al., 2006; Presuman et al. , 2004; Xia et al., 2005 ; Mattson, 2007). Actualmente estos compuestos son menos relevantes para los países industrializados desde que se logró una drástica reducción de la emisión debido a la adopción de medidas apropiadas y de eliminación de las fuentes dominantes de contaminación.

Sin embargo, la emisión de compuestos orgánicos llamados contaminantes emergentes o nuevos no regulados han surgido como un problema ambiental y existe un amplio consenso que esta clase de contaminantes requiere una intervención legislativa. Afortunadamente el desarrollo de nuevos y sensibles técnicas de análisis instrumental ha permitido alertar de la presencia de estos compuestos emergentes.

La Agencia de Protección al Ambiente los Estados Unidos de América (EPA) se refiere a ellos como materiales o productos químicos caracterizados por ser una amenaza para la salud humana y para el ambiente, ya que son relativamente nuevos y no se tiene un amplio conocimiento de su impacto en el ambiente y, en el hombre, así como de carecer de una legislación que los regule (EPA 2008).

La lista de contaminantes emergentes incluye una amplia variedad de productos de uso diario con aplicaciones tanto industriales como domésticos. Dentro de ellos se encuentran los compuestos bromados retardantes de llama, parafinas cloradas, pesticidas polares, metabolitos, compuestos perfluorados, drogas, productos para el cuidado e higiene personal y fármacos.

La característica más relevante de este grupo de contaminantes es que no necesariamente tienen que persistir para causar efectos negativos debido a que las elevadas tasas de transformación/renovación pueden ser compensadas por su introducción continua al ambiente. Desafortunadamente, para la mayoría de los contaminantes emergentes no hay datos disponibles que indiquen su presencia, riesgo y ecotoxicidad, por lo que es difícil predecir cuales serían sus efectos sobre la salud humana y los organismos acuáticos.

Algunos especialistas indican que de todos los contaminantes emergentes, los antibióticos son los compuestos de mayor preocupación; a pesar de ello, otros compuestos, especialmente los metabolitos polares y las mezclas complejas representan grandes retos para los toxicólogos (Barceló 2003).

FUENTES DE CONTAMINANTES EMERGENTES.

Los fármacos así como otros contaminantes, provienen de una amplia variedad de fuentes, estos compuestos pueden tener implicaciones para los humanos en caso de exposición, así como otros efectos en el ambiente y en la vida silvestre, donde además se acumulan. De manera general, las fuentes de contaminación caen dentro de dos categorías: puntuales y dispersas.

FUENTES PUNTUALES.

Una fuente puntual es una entrada localizada y definida de contaminantes al ambiente, puede ser una descarga, una crecida de lluvia o algún punto conocido donde el agua es vertida de manera constante. Este tipo de fuentes tienden a ser más fáciles de controlar que las no puntuales.

FUENTES NO PUNTUALES.

Algunas veces se les ha llamado también fuentes difusas, y el término se refiere a aquellas fuentes que no tienen un sitio de entrada definido. Algunos ejemplos de fuentes no puntuales son la deposición atmosférica y el agua de escorrentía. El punto exacto donde los contaminantes entran al cuerpo receptor dependen del tipo de fuente, su localización y de las propiedades físicas de los contaminantes. Si los contaminantes son un gas o partículas finas éstos pueden caer directamente al suelo con la lluvia. La misma lluvia puede lavar las partículas que han sido depositadas en las superficies cercanas a los causes y, si los contaminantes son solubles en el agua, éstos pueden ser transportados a gran distancia. Durante las lluvias, las partículas mayores, incluyendo el suelo, pueden ser acarreadas hasta los cuerpos de agua. Estas pueden tener contaminantes tales como pesticidas adheridos a ellos.

PROBLEMÁTICA DE LOS FARMACOS EN AGUAS RESIDUALES.

Actualmente está demostrada la presencia de productos farmacológicamente activos en las aguas residuales debido a su alto consumo y sus altas tasas de excreción (Soliman *et al.*, 2004; Ternes, 2001; Lajeunesse y Gagnon, 2007). Tanto los fármacos como sus componentes han llamado la atención de la comunidad científica, debido a los posibles efectos que provoca en el ambiente (Perez y Barceló, 2007; Muñoz *et al.*, 2008; Parrott y Bennie, 2009; Sumpter, 2007; Kanda *et al.*, 2003), sin embargo, el riesgo potencial y los bajos niveles de concentración de los fármacos en ambientes acuáticos aun esta en debate (Pomati *et al.*, 2006; Poseidon, 2004; Diedrich, 2007). La presencia de fármacos humanos como veterinarios en aguas residuales ha incrementado, así como sus efectos en receptores ecológicos; por lo cual la comunidad científica esta buscando nuevas herramientas y métodos para mejorar la evaluación de dichos riesgos (Dorne *et al.*, 2007; Lajeunesse y Gagnon, 2007; Watkinson *et al.*, 2007; Gagnon *et al.*, 2008).

Estudios revelan que en el agua residual se han encontrado más de 20 tipos de fármacos de distinta composición, según el país y el consumo (Poblete, 2007), inclusive la venta de fármacos se ha incrementado en todo el mundo en un 25%

(European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations, 2003; Robinson *et al.*, 2007). La Unión Europea (UE) tiene registrados más de 3,000 fármacos que al ser excretados pueden provocar posibles efectos a nivel ambiental, resistencia bacteriana, genotoxicidad hasta llegar a dañar al ser humano. (Petrovic *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 20007; Muñoz *et al.*, 2008; Sumpter, 2007). Debido a su ubicua presencia en el medio ambiente Barceló (2007), los cataloga como contaminantes pseudo persistentes.

En E.U.A, se producen grandes cantidades de fármacos y drogas, tanto recetadas y no recetadas; aproximadamente el consumo humano de antibióticos en este país es de 11,000,000 kg cada año (Soliman *et al.*, 2004). Su persistencia en el medio ambiente es desde más de un año (fármacos como la eritromicina, ciclofamida, naproxeno y sulfametoxazol) hasta varios años para el ácido clofibrico (ACL). Incluso en estudios de suelo se ha encontrado en los primeros 10 cm fármacos como: ibuprofeno, naproxeno, triclosan y bisfenol y a profundidades de 30 cm se ha encontrado ACL y estrona (Xu *et al.*, 2009). También se han encontrado fármacos en sedimentos de ríos (Antonic y Heath., 2007). El resultado de encontrar contaminantes trazas en el suelo es que pueden acumularse en la superficie lo cual con el tiempo y la infiltración del agua se han llegado a encontrar en las aguas subterráneas (Xu *et al.*, 2008).

Las aguas superficiales y las aguas subterráneas son actualmente la mayor fuente de producción de agua potable en todo el mundo, sin embargo estudios han revelado recientemente la presencia de fármacos en ellas, tal es el caso de ciudades como Alemania , Italia, US, Canada, algunos de los fármacos mencionados son: Acido clofibrico ($270 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$), bezafibrato ($27 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$), gemfibrozil ($70 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$), carbamezapina ($258 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$), diclofenaco ($6 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$), penazona ($400 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$), provocando un alta preocupación al presentarse en agua potable. (Zwiener, 2007; Yi Hua *et al.*, 2006; Quintana y Reemtsma, 2004; Gross *et al.*, 2007; Farre *et al.*, 2007; Drewes *et al.*, 2003).

Los fármacos llegan al medio ambiente por medio de su metabolización y excreción por el hombre. El fármaco administrado puede ser excretado sin ningún cambio, en forma de conjugados de glucurónidos o sulfatos, como metabolito principal o como una mezcla de muchos metabolitos (Strenn *et al.*, 2004). En general, en el organismo los fármacos son metabolizados por diversos mecanismos, luego son excretados en forma de derivados más polares y solubles en agua, que presentan una actividad farmacológica reducida respecto al compuesto original (Flores *et al.*, 2008; Bellido, 2006).

Por ejemplo, la carbamecapina es metabolizada en el cuerpo humano y solo se excreta un 2-3 % de la dosis administrada en su forma original. El bezafibrato (BZF) es un antilipemiente del cual se excreta un 50 % en forma de glucurónidos y 20 % en su forma original (Scharf *et al.*, 2002). Los fibratos se excretan entre el 95% y el 99% en la orina como ACL libre y conjugado, (MD consult, 2009; Davidson *et al.*, 2007). El gemfibrozil (GFZ) se excreta aproximadamente un 70% por orina, principalmente como glucurónido, menos del 2% se excreta como GFZ sin cambios y un 6% de la dosis se encuentra en las heces (Sacks, 2008). Otros autores, como Siemens *et al.* (2008), mencionan que la cantidad de Gemfibrosil excretada es de un 6% vía urinaria y 70 % como metabolitos y para el BZF un 50 % vía urinaria y 20 % como glucurónidos.

Los fármacos están diseñados para ser muy activos e interaccionar con receptores específicos en el hombre y animales. Los efectos potencialmente acumulativos en el agua residual ya sea a mediano o largo plazo pueden ocasionar daños en el medio ambiente o en el hombre causando procesos psicológicos anormales, debilitación

reproductiva (US Department of Health and human Services, 1998; EMEA, 2006), efectos crónicos y en incluso toxicidad (Radjenovic *et al.*, 2007a; Verenitch *et al.*, 2006), además de crear una proliferación de microorganismos resistentes a los fármacos. Se ha reportado que los fármacos pueden generar toxicidad a niveles específicos en organismos acuáticos como algas, moluscos, crustáceos y peces (Smital, 2008). Se ha observado que el triclosan causa toxicidad en el crecimiento de las algas (Orvos *et al.*, 2002), la carbamezapina ha mostrado toxicidad aguda en algas, invertebrados y peces (Ferrari *et al.*, 2003) y en conjunto con el ibuprofeno y Acido clofíbrico se han encontrado efectos sinérgicos en algas (Cleuvers, 2003). Inclusive algunos fármacos son clasificados por algunos autores como disruptores endocrinos (Deborde y Gunten, 2008; Benotti *et al.*, 2009; Comerton *et al.*, 2009).

Usualmente los contaminantes del agua son eliminados en las plantas tratadoras de agua pero para los nuevos Compuestos Emergentes al presentarse en concentraciones muy pequeñas ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$) no es posible obtener una alta remoción de ellos con los procesos de depuración convencionales (Clara *et al.*, 2005b; Joss *et al.*, 2004; Miao *et al.*, 2004; Paxeus, 2004; Petrovic *et al.*, 2003; Strenn *et al.*, 2003; Zwiener y Frimmel, 2003) y en ocasiones no son detectados (Antoníc y Heath 2007; Schröder, 2002).

COMPUESTOS FARMACÉUTICOS REGULADORES DE LÍPIDOS.

Los clofibratos han sido utilizados desde 1962 como drogas antilipidémicas y posteriormente fueron desarrollados el Gemfibrosil, Bezafibrato y fenofibrato (Sampayo *et al.*, 2006; Cortancans *et al.*, 2005). El metabolito activo del clofibrato es el Acido clofíbrico. Los fibratos y sus derivados son drogas que se utilizan para el tratamiento de Hipertrigliceridemia, para la prevención de arteroesclerosis (Krakoff *et al.*, 2000; Sampayo *et al.*, 2006), para reducir los niveles de triglicéridos y aumentan los niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL) (Flores *et al.*, 2008). En la Tabla 1 se muestran las características físico-químicas de estos fármacos y su identificación numérica química (CAS).

En un estudio realizado en el Río Ebro se detectaron concentraciones alrededor de los $600 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ de diversos fármacos. Los fármacos más prevalentes fueron el Acido clofíbrico y Gemfibrosil (Segarra, 2006). El Río Llobregat y Río Ebro fueron unas de las primera cuencas españolas en las que se puso de manifiesto la existencia de fenómenos de feminización en peces ocasionados por la presencia de compuestos disruptores endocrinos con actividad estrógena (Labandeira *et al.*, 2007; Lacorte *et al.*, 2006). Posteriormente en estos mismos ríos se hicieron estudios evidenciando la presencia de otros fármacos como el Acido clofíbrico con concentraciones por debajo de los $250 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (Barceló y López, 2007). En el Rio Taff al sur de Gales se han encontrado concentraciones de Acido clofíbrico de $101 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ y en Bezafibrato de $60 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (Kasprzyk *et al.*, 2008). Nakada *et al.*, (2007) reportaron que en el Río Tone, Japón se han encontrado concentraciones de Bezafibrato que oscilan de $425\text{-}1,500 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Con el paso del tiempo estas concentraciones pueden acumularse provocando daños en el ambiente sin embargo esta información a un es limitada (Nikolaou *et al.*, 2007).

Tabla 1. Características físico-químicas de fármacos reguladores de lípidos.

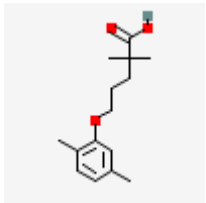
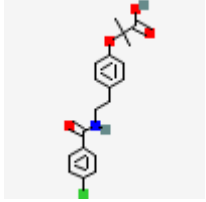
NOMBRE	N° CAS	ESTRUCTURA MOLECULAR	PESO MOLECULAR
Gemfibrozil	25812-30-0	 <chem>CC(C)(C)C(C)COC1=CC=C(C)C=C1</chem> $C_{15}H_{22}O_3$	250.33 g·mol ⁻¹
Bezafibrato	41859-67-0	 <chem>CC(C)(C)C(C)COC1=CC=C(C=C1)C2=CC=C(C=C2)C3=CC=C(C=C3)C4=CC=C(C=C4)C5=CC=C(C=C5)C6=CC=C(C=C6)C7=CC=C(C=C7)C8=CC=C(C=C8)C9=CC=C(C=C9)C10=CC=C(C=C10)C11=CC=C(C=C11)C12=CC=C(C=C12)C13=CC=C(C=C13)C14=CC=C(C=C14)C15=CC=C(C=C15)C16=CC=C(C=C16)C17=CC=C(C=C17)C18=CC=C(C=C18)C19=CC=C(C=C19)C20=CC=C(C=C20)C21=CC=C(C=C21)C22=CC=C(C=C22)C23=CC=C(C=C23)C24=CC=C(C=C24)C25=CC=C(C=C25)C26=CC=C(C=C26)C27=CC=C(C=C27)C28=CC=C(C=C28)C29=CC=C(C=C29)C30=CC=C(C=C30)C31=CC=C(C=C31)C32=CC=C(C=C32)C33=CC=C(C=C33)C34=CC=C(C=C34)C35=CC=C(C=C35)C36=CC=C(C=C36)C37=CC=C(C=C37)C38=CC=C(C=C38)C39=CC=C(C=C39)C40=CC=C(C=C40)C41=CC=C(C=C41)C42=CC=C(C=C42)C43=CC=C(C=C43)C44=CC=C(C=C44)C45=CC=C(C=C45)C46=CC=C(C=C46)C47=CC=C(C=C47)C48=CC=C(C=C48)C49=CC=C(C=C49)C50=CC=C(C=C50)C51=CC=C(C=C51)C52=CC=C(C=C52)C53=CC=C(C=C53)C54=CC=C(C=C54)C55=CC=C(C=C55)C56=CC=C(C=C56)C57=CC=C(C=C57)C58=CC=C(C=C58)C59=CC=C(C=C59)C60=CC=C(C=C60)C61=CC=C(C=C61)C62=CC=C(C=C62)C63=CC=C(C=C63)C64=CC=C(C=C64)C65=CC=C(C=C65)C66=CC=C(C=C66)C67=CC=C(C=C67)C68=CC=C(C=C68)C69=CC=C(C=C69)C70=CC=C(C=C70)C71=CC=C(C=C71)C72=CC=C(C=C72)C73=CC=C(C=C73)C74=CC=C(C=C74)C75=CC=C(C=C75)C76=CC=C(C=C76)C77=CC=C(C=C77)C78=CC=C(C=C78)C79=CC=C(C=C79)C80=CC=C(C=C80)C81=CC=C(C=C81)C82=CC=C(C=C82)C83=CC=C(C=C83)C84=CC=C(C=C84)C85=CC=C(C=C85)C86=CC=C(C=C86)C87=CC=C(C=C87)C88=CC=C(C=C88)C89=CC=C(C=C89)C90=CC=C(C=C90)C91=CC=C(C=C91)C92=CC=C(C=C92)C93=CC=C(C=C93)C94=CC=C(C=C94)C95=CC=C(C=C95)C96=CC=C(C=C96)C97=CC=C(C=C97)C98=CC=C(C=C98)C99=CC=C(C=C99)C100=CC=C(C=C100)C101=CC=C(C=C101)C102=CC=C(C=C102)C103=CC=C(C=C103)C104=CC=C(C=C104)C105=CC=C(C=C105)C106=CC=C(C=C106)C107=CC=C(C=C107)C108=CC=C(C=C108)C109=CC=C(C=C109)C110=CC=C(C=C110)C111=CC=C(C=C111)C112=CC=C(C=C112)C113=CC=C(C=C113)C114=CC=C(C=C114)C115=CC=C(C=C115)C116=CC=C(C=C116)C117=CC=C(C=C117)C118=CC=C(C=C118)C119=CC=C(C=C119)C120=CC=C(C=C120)C121=CC=C(C=C121)C122=CC=C(C=C122)C123=CC=C(C=C123)C124=CC=C(C=C124)C125=CC=C(C=C125)C126=CC=C(C=C126)C127=CC=C(C=C127)C128=CC=C(C=C128)C129=CC=C(C=C129)C130=CC=C(C=C130)C131=CC=C(C=C131)C132=CC=C(C=C132)C133=CC=C(C=C133)C134=CC=C(C=C134)C135=CC=C(C=C135)C136=CC=C(C=C136)C137=CC=C(C=C137)C138=CC=C(C=C138)C139=CC=C(C=C139)C140=CC=C(C=C140)C141=CC=C(C=C141)C142=CC=C(C=C142)C143=CC=C(C=C143)C144=CC=C(C=C144)C145=CC=C(C=C145)C146=CC=C(C=C146)C147=CC=C(C=C147)C148=CC=C(C=C148)C149=CC=C(C=C149)C150=CC=C(C=C150)C151=CC=C(C=C151)C152=CC=C(C=C152)C153=CC=C(C=C153)C154=CC=C(C=C154)C155=CC=C(C=C155)C156=CC=C(C=C156)C157=CC=C(C=C157)C158=CC=C(C=C158)C159=CC=C(C=C159)C160=CC=C(C=C160)C161=CC=C(C=C161)C162=CC=C(C=C162)C163=CC=C(C=C163)C164=CC=C(C=C164)C165=CC=C(C=C165)C166=CC=C(C=C166)C167=CC=C(C=C167)C168=CC=C(C=C168)C169=CC=C(C=C169)C170=CC=C(C=C170)C171=CC=C(C=C171)C172=CC=C(C=C172)C173=CC=C(C=C173)C174=CC=C(C=C174)C175=CC=C(C=C175)C176=CC=C(C=C176)C177=CC=C(C=C177)C178=CC=C(C=C178)C179=CC=C(C=C179)C180=CC=C(C=C180)C181=CC=C(C=C181)C182=CC=C(C=C182)C183=CC=C(C=C183)C184=CC=C(C=C184)C185=CC=C(C=C185)C186=CC=C(C=C186)C187=CC=C(C=C187)C188=CC=C(C=C188)C189=CC=C(C=C189)C190=CC=C(C=C190)C191=CC=C(C=C191)C192=CC=C(C=C192)C193=CC=C(C=C193)C194=CC=C(C=C194)C195=CC=C(C=C195)C196=CC=C(C=C196)C197=CC=C(C=C197)C198=CC=C(C=C198)C199=CC=C(C=C199)C200=CC=C(C=C200)C201=CC=C(C=C201)C202=CC=C(C=C202)C203=CC=C(C=C203)C204=CC=C(C=C204)C205=CC=C(C=C205)C206=CC=C(C=C206)C207=CC=C(C=C207)C208=CC=C(C=C208)C209=CC=C(C=C209)C210=CC=C(C=C210)C211=CC=C(C=C211)C212=CC=C(C=C212)C213=CC=C(C=C213)C214=CC=C(C=C214)C215=CC=C(C=C215)C216=CC=C(C=C216)C217=CC=C(C=C217)C218=CC=C(C=C218)C219=CC=C(C=C219)C220=CC=C(C=C220)C221=CC=C(C=C221)C222=CC=C(C=C222)C223=CC=C(C=C223)C224=CC=C(C=C224)C225=CC=C(C=C225)C226=CC=C(C=C226)C227=CC=C(C=C227)C228=CC=C(C=C228)C229=CC=C(C=C229)C230=CC=C(C=C230)C231=CC=C(C=C231)C232=CC=C(C=C232)C233=CC=C(C=C233)C234=CC=C(C=C234)C235=CC=C(C=C235)C236=CC=C(C=C236)C237=CC=C(C=C237)C238=CC=C(C=C238)C239=CC=C(C=C239)C240=CC=C(C=C240)C241=CC=C(C=C241)C242=CC=C(C=C242)C243=CC=C(C=C243)C244=CC=C(C=C244)C245=CC=C(C=C245)C246=CC=C(C=C246)C247=CC=C(C=C247)C248=CC=C(C=C248)C249=CC=C(C=C249)C250=CC=C(C=C250)C251=CC=C(C=C251)C252=CC=C(C=C252)C253=CC=C(C=C253)C254=CC=C(C=C254)C255=CC=C(C=C255)C256=CC=C(C=C256)C257=CC=C(C=C257)C258=CC=C(C=C258)C259=CC=C(C=C259)C260=CC=C(C=C260)C261=CC=C(C=C261)C262=CC=C(C=C262)C263=CC=C(C=C263)C264=CC=C(C=C264)C265=CC=C(C=C265)C266=CC=C(C=C266)C267=CC=C(C=C267)C268=CC=C(C=C268)C269=CC=C(C=C269)C270=CC=C(C=C270)C271=CC=C(C=C271)C272=CC=C(C=C272)C273=CC=C(C=C273)C274=CC=C(C=C274)C275=CC=C(C=C275)C276=CC=C(C=C276)C277=CC=C(C=C277)C278=CC=C(C=C278)C279=CC=C(C=C279)C280=CC=C(C=C280)C281=CC=C(C=C281)C282=CC=C(C=C282)C283=CC=C(C=C283)C284=CC=C(C=C284)C285=CC=C(C=C285)C286=CC=C(C=C286)C287=CC=C(C=C287)C288=CC=C(C=C288)C289=CC=C(C=C289)C290=CC=C(C=C290)C291=CC=C(C=C291)C292=CC=C(C=C292)C293=CC=C(C=C293)C294=CC=C(C=C294)C295=CC=C(C=C295)C296=CC=C(C=C296)C297=CC=C(C=C297)C298=CC=C(C=C298)C299=CC=C(C=C299)C300=CC=C(C=C300)C301=CC=C(C=C301)C302=CC=C(C=C302)C303=CC=C(C=C303)C304=CC=C(C=C304)C305=CC=C(C=C305)C306=CC=C(C=C306)C307=CC=C(C=C307)C308=CC=C(C=C308)C309=CC=C(C=C309)C310=CC=C(C=C310)C311=CC=C(C=C311)C312=CC=C(C=C312)C313=CC=C(C=C313)C314=CC=C(C=C314)C315=CC=C(C=C315)C316=CC=C(C=C316)C317=CC=C(C=C317)C318=CC=C(C=C318)C319=CC=C(C=C319)C320=CC=C(C=C320)C321=CC=C(C=C321)C322=CC=C(C=C322)C323=CC=C(C=C323)C324=CC=C(C=C324)C325=CC=C(C=C325)C326=CC=C(C=C326)C327=CC=C(C=C327)C328=CC=C(C=C328)C329=CC=C(C=C329)C330=CC=C(C=C330)C331=CC=C(C=C331)C332=CC=C(C=C332)C333=CC=C(C=C333)C334=CC=C(C=C334)C335=CC=C(C=C335)C336=CC=C(C=C336)C337=CC=C(C=C337)C338=CC=C(C=C338)C339=CC=C(C=C339)C340=CC=C(C=C340)C341=CC=C(C=C341)C342=CC=C(C=C342)C343=CC=C(C=C343)C344=CC=C(C=C344)C345=CC=C(C=C345)C346=CC=C(C=C346)C347=CC=C(C=C347)C348=CC=C(C=C348)C349=CC=C(C=C349)C350=CC=C(C=C350)C351=CC=C(C=C351)C352=CC=C(C=C352)C353=CC=C(C=C353)C354=CC=C(C=C354)C355=CC=C(C=C355)C356=CC=C(C=C356)C357=CC=C(C=C357)C358=CC=C(C=C358)C359=CC=C(C=C359)C360=CC=C(C=C360)C361=CC=C(C=C361)C362=CC=C(C=C362)C363=CC=C(C=C363)C364=CC=C(C=C364)C365=CC=C(C=C365)C366=CC=C(C=C366)C367=CC=C(C=C367)C368=CC=C(C=C368)C369=CC=C(C=C369)C370=CC=C(C=C370)C371=CC=C(C=C371)C372=CC=C(C=C372)C373=CC=C(C=C373)C374=CC=C(C=C374)C375=CC=C(C=C375)C376=CC=C(C=C376)C377=CC=C(C=C377)C378=CC=C(C=C378)C379=CC=C(C=C379)C380=CC=C(C=C380)C381=CC=C(C=C381)C382=CC=C(C=C382)C383=CC=C(C=C383)C384=CC=C(C=C384)C385=CC=C(C=C385)C386=CC=C(C=C386)C387=CC=C(C=C387)C388=CC=C(C=C388)C389=CC=C(C=C389)C390=CC=C(C=C390)C391=CC=C(C=C391)C392=CC=C(C=C392)C393=CC=C(C=C393)C394=CC=C(C=C394)C395=CC=C(C=C395)C396=CC=C(C=C396)C397=CC=C(C=C397)C398=CC=C(C=C398)C399=CC=C(C=C399)C400=CC=C(C=C400)C401=CC=C(C=C401)C402=CC=C(C=C402)C403=CC=C(C=C403)C404=CC=C(C=C404)C405=CC=C(C=C405)C406=CC=C(C=C406)C407=CC=C(C=C407)C408=CC=C(C=C408)C409=CC=C(C=C409)C410=CC=C(C=C410)C411=CC=C(C=C411)C412=CC=C(C=C412)C413=CC=C(C=C413)C414=CC=C(C=C414)C415=CC=C(C=C415)C416=CC=C(C=C416)C417=CC=C(C=C417)C418=CC=C(C=C418)C419=CC=C(C=C419)C420=CC=C(C=C420)C421=CC=C(C=C421)C422=CC=C(C=C422)C423=CC=C(C=C423)C424=CC=C(C=C424)C425=CC=C(C=C425)C426=CC=C(C=C426)C427=CC=C(C=C427)C428=CC=C(C=C428)C429=CC=C(C=C429)C430=CC=C(C=C430)C431=CC=C(C=C431)C432=CC=C(C=C432)C433=CC=C(C=C433)C434=CC=C(C=C434)C435=CC=C(C=C435)C436=CC=C(C=C436)C437=CC=C(C=C437)C438=CC=C(C=C438)C439=CC=C(C=C439)C440=CC=C(C=C440)C441=CC=C(C=C441)C442=CC=C(C=C442)C443=CC=C(C=C443)C444=CC=C(C=C444)C445=CC=C(C=C445)C446=CC=C(C=C446)C447=CC=C(C=C447)C448=CC=C(C=C448)C449=CC=C(C=C449)C450=CC=C(C=C450)C451=CC=C(C=C451)C452=CC=C(C=C452)C453=CC=C(C=C453)C454=CC=C(C=C454)C455=CC=C(C=C455)C456=CC=C(C=C456)C457=CC=C(C=C457)C458=CC=C(C=C458)C459=CC=C(C=C459)C460=CC=C(C=C460)C461=CC=C(C=C461)C462=CC=C(C=C462)C463=CC=C(C=C463)C464=CC=C(C=C464)C465=CC=C(C=C465)C466=CC=C(C=C466)C467=CC=C(C=C467)C468=CC=C(C=C468)C469=CC=C(C=C469)C470=CC=C(C=C470)C471=CC=C(C=C471)C472=CC=C(C=C472)C473=CC=C(C=C473)C474=CC=C(C=C474)C475=CC=C(C=C475)C476=CC=C(C=C476)C477=CC=C(C=C477)C478=CC=C(C=C478)C479=CC=C(C=C479)C480=CC=C(C=C480)C481=CC=C(C=C481)C482=CC=C(C=C482)C483=CC=C(C=C483)C484=CC=C(C=C484)C485=CC=C(C=C485)C486=CC=C(C=C486)C487=CC=C(C=C487)C488=CC=C(C=C488)C489=CC=C(C=C489)C490=CC=C(C=C490)C491=CC=C(C=C491)C492=CC=C(C=C492)C493=CC=C(C=C493)C494=CC=C(C=C494)C495=CC=C(C=C495)C496=CC=C(C=C496)C497=CC=C(C=C497)C498=CC=C(C=C498)C499=CC=C(C=C499)C500=CC=C(C=C500)C501=CC=C(C=C501)C502=CC=C(C=C502)C503=CC=C(C=C503)C504=CC=C(C=C504)C505=CC=C(C=C505)C506=CC=C(C=C506)C507=CC=C(C=C507)C508=CC=C(C=C508)C509=CC=C(C=C509)C510=CC=C(C=C510)C511=CC=C(C=C511)C512=CC=C(C=C512)C513=CC=C(C=C513)C514=CC=C(C=C514)C515=CC=C(C=C515)C516=CC=C(C=C516)C517=CC=C(C=C517)C518=CC=C(C=C518)C519=CC=C(C=C519)C520=CC=C(C=C520)C521=CC=C(C=C521)C522=CC=C(C=C522)C523=CC=C(C=C523)C524=CC=C(C=C524)C525=CC=C(C=C525)C526=CC=C(C=C526)C527=CC=C(C=C527)C528=CC=C(C=C528)C529=CC=C(C=C529)C530=CC=C(C=C530)C531=CC=C(C=C531)C532=CC=C(C=C532)C533=CC=C(C=C533)C534=CC=C(C=C534)C535=CC=C(C=C535)C536=CC=C(C=C536)C537=CC=C(C=C537)C538=CC=C(C=C538)C539=CC=C(C=C539)C540=CC=C(C=C540)C541=CC=C(C=C541)C542=CC=C(C=C542)C543=CC=C(C=C543)C544=CC=C(C=C544)C545=CC=C(C=C545)C546=CC=C(C=C546)C547=CC=C(C=C547)C548=CC=C(C=C548)C549=CC=C(C=C549)C550=CC=C(C=C550)C551=CC=C(C=C551)C552=CC=C(C=C552)C553=CC=C(C=C553)C554=CC=C(C=C554)C555=CC=C(C=C555)C556=CC=C(C=C556)C557=CC=C(C=C557)C558=CC=C(C=C558)C559=CC=C(C=C559)C560=CC=C(C=C560)C561=CC=C(C=C561)C562=CC=C(C=C562)C563=CC=C(C=C563)C564=CC=C(C=C564)C565=CC=C(C=C565)C566=CC=C(C=C566)C567=CC=C(C=C567)C568=CC=C(C=C568)C569=CC=C(C=C569)C570=CC=C(C=C570)C571=CC=C(C=C571)C572=CC=C(C=C572)C573=CC=C(C=C573)C574=CC=C(C=C574)C575=CC=C(C=C575)C576=CC=C(C=C576)C577=CC=C(C=C577)C578=CC=C(C=C578)C579=CC=C(C=C579)C580=CC=C(C=C580)C581=CC=C(C=C581)C582=CC=C(C=C582)C583=CC=C(C=C583)C584=CC=C(C=C584)C585=CC=C(C=C585)C586=CC=C(C=C586)C587=CC=C(C=C587)C588=CC=C(C=C588)C589=CC=C(C=C589)C590=CC=C(C=C590)C591=CC=C(C=C591)C592=CC=C(C=C592)C593=CC=C(C=C593)C594=CC=C(C=C594)C595=CC=C(C=C595)C596=CC=C(C=C596)C597=CC=C(C=C597)C598=CC=C(C=C598)C599=CC=C(C=C599)C600=CC=C(C=C600)C601=CC=C(C=C601)C602=CC=C(C=C602)C603=CC=C(C=C603)C604=CC=C(C=C604)C605=CC=C(C=C605)C606=CC=C(C=C606)C607=CC=C(C=C607)C608=CC=C(C=C608)C609=CC=C(C=C609)C610=CC=C(C=C610)C611=CC=C(C=C611)C612=CC=C(C=C612)C613=CC=C(C=C613)C614=CC=C(C=C614)C615=CC=C(C=C615)C616=CC=C(C=C616)C617=CC=C(C=C617)C618=CC=C(C=C618)C619=CC=C(C=C619)C620=CC=C(C=C620)C621=CC=C(C=C621)C622=CC=C(C=C622)C623=CC=C(C=C623)C624=CC=C(C=C624)C625=CC=C(C=C625)C626=CC=C(C=C626)C627=CC=C(C=C627)C628=CC=C(C=C628)C629=CC=C(C=C629)C630=CC=C(C=C630)C631=CC=C(C=C631)C632=CC=C(C=C632)C633=CC=C(C=C633)C634=CC=C(C=C634)C635=CC=C(C=C635)C636=CC=C(C=C636)C637=CC=C(C=C637)C638=CC=C(C=C638)C639=CC=C(C=C639)C640=CC=C(C=C640)C641=CC=C(C=C641)C642=CC=C(C=C642)C643=CC=C(C=C643)C644=CC=C(C=C644)C645=CC=C(C=C645)C646=CC=C(C=C646)C647=CC=C(C=C647)C648=CC=C(C=C648)C649=CC=C(C=C649)C650=CC=C(C=C650)C651=CC=C(C=C651)C652=CC=C(C=C652)C653=CC=C(C=C653)C654=CC=C(C=C654)C655=CC=C(C=C655)C656=CC=C(C=C656)C657=CC=C(C=C657)C658=CC=C(C=C658)C659=CC=C(C=C659)C660=CC=C(C=C660)C661=CC=C(C=C661)C662=CC=C(C=C662)C663=CC=C(C=C663)C664=CC=C(C=C664)C665=CC=C(C=C665)C666=CC=C(C=C666)C667=CC=C(C=C667)C668=CC=C(C=C668)C669=CC=C(C=C669)C670=CC=C(C=C670)C671=CC=C(C=C671)C672=CC=C(C=C672)C673=CC=C(C=C673)C674=CC=C(C=C674)C675=CC=C(C=C675)C676=CC=C(C=C676)C677=CC=C(C=C677)C678=CC=C(C=C678)C679=CC=C(C=C679)C680=CC=C(C=C680)C681=CC=C(C=C681)C682=CC=C(C=C682)C683=CC=C(C=C683)C684=CC=C(C=C684)C685=CC=C(C=C685)C686=CC=C(C=C686)C687=CC=C(C=C687)C688=CC=C(C=C688)C689=CC=C(C=C689)C690=CC=C(C=C690)C691=CC=C(C=C691)C692=CC=C(C=C692)C693=CC=C(C=C693)C694=CC=C(C=C694)C695=CC=C(C=C695)C696=CC=C(C=C696)C697=CC=C(C=C697)C698=CC=C(C=C698)C699=CC=C(C=C699)C700=CC=C(C=C700)C701=CC=C(C=C701)C702=CC=C(C=C702)C703=CC=C(C=C703)C704=CC=C(C=C704)C705=CC=C(C=C705)C706=CC=C(C=C706)C707=CC=C(C=C707)C708=CC=C(C=C708)C709=CC=C(C=C709)C710=CC=C(C=C710)C711=CC=C(C=C711)C712=CC=C(C=C712)C713=CC=C(C=C713)C714=CC=C(C=C714)C715=CC=C(C=C715)C716=CC=C(C=C716)C717=CC=C(C=C717)C718=CC=C(C=C718)C719=CC=C(C=C719)C720=CC=C(C=C720)C721=CC=C(C=C721)C722=CC=C(C=C722)C723=CC=C(C=C723)C724=CC=C(C=C724)C725=CC=C(C=C725)C726=CC=C(C=C726)C727=CC=C(C=C727)C728=CC=C(C=C728)C729=CC=C(C=C729)C730=CC=C(C=C730)C731=CC=C(C=C731)C732=CC=C(C=C732)C733=CC=C(C=C733)C734=CC=C(C=C734)C735=CC=C(C=C735)C736=CC=C(C=C736)C737=CC=C(C=C737)C738=CC=C(C=C738)C739=CC=C(C=C739)C740=CC=C(C=C740)C741=CC=C(C=C741)C742=CC=C(C=C742)C743=CC=C(C=C743)C744=CC=C(C=C744)C745=CC=C(C=C745)C746=CC=C(C=C746)C747=CC=C(C=C747)C748=CC=C(C=C748)C749=CC=C(C=C749)C750=CC=C(C=C750)C751=CC=C(C=C751)C752=CC=C(C=C752)C753=CC=C(C=C753)C754=CC=C(C=C754)C755=CC=C(C=C755)C756=CC=C(C=C756)C757=CC=C(C=C757)C758=CC=C(C=C758)C759=CC=C(C=C759)C760=CC=C(C=C760)C761=CC=C(C=C761)C762=CC=C(C=C762)C763=CC=C(C=C763)C764=CC=C(C=C764)C765=CC=C(C=C765)C766=CC=C(C=C766)C767=CC=C(C=C767)C768=CC=C(C=C768)C769=CC=C(C=C769)C770=CC=C(C=C770)C771=CC=C(C=C771)C772=CC=C(C=C772)C773=CC=C(C=C773)C774=CC=C(C=C774)C775=CC=C(C=C775)C776=CC=C(C=C776)C777=CC=C(C=C777)C778=CC=C(C=C778)C779=CC=C(C=C779)C780=CC=C(C=C780)C781=CC=C(C=C781)C782=CC=C(C=C782)C783=CC=C(C=C783)C784=CC=C(C=C784)C785=CC=C(C=C785)C786=CC=C(C=C786)C787=CC=C(C=C787)C788=CC=C(C=C788)C789=CC=C(C=C789)C790=CC=C(C=C790)C791=CC=C(C=C791)C792=CC=C(C=C792)C793=CC=C(C=C793)C794=CC=C(C=C794)C795=CC=C(C=C795)C796=CC=C(C=C796)C797=CC=C(C=C797)C798=CC=C(C=C798)C799=CC=C(C=C799)C800=CC=C(C=C800)C801=CC=C(C=C801)C802=CC=C(C=C802)C803=CC=C(C=C803)C804=CC=C(C=C804)C805=CC=C(C=C805)C806=CC=C(C=C806)C807=CC=C(C=C807)C808=CC=C(C=C808)C809=CC=C(C=C809)C810=CC=C(C=C810)C811=CC=C(C=C811)C812=CC=C(C=C812)C813=CC=C(C=C813)C814=CC=C(C=C814)C815=CC=C(C=C815)C816=CC=C(C=C816)C817=CC=C(C=C817)C818=CC=C(C=C818)C819=CC=C(C=C819)C820=CC=C(C=C820)C821=CC=C(C=C821)C822=CC=C(C=C822)C823=CC=C(C=C823)C824=CC=C(C=C824)C825=CC=C(C=C825)C826=CC=C(C=C826)C827=CC=C(C=C827)C828=CC=C(C=C828)C829=CC=C(C=C829)C830=CC=C(C=C830)C831=CC=C(C=C831)C832=CC=C(C=C832)C833=CC=C(C=C833)C834=CC=C(C=C834)C835=CC=C(C=C835)C836=CC=C(C=C836)C837=CC=C(C=C837)C838=CC=C(C=C838)C839=CC=C(C=C839)C840=CC=C(C=C840)C841=CC=C(C=C841)C842=CC=C(C=C842)C843=CC=C(C=C843)C844=CC=C(C=C844)C845=CC=C(C=C845)C846=CC=C(C=C846)C847=CC=C(C=C847)C848=CC=C(C=C848)C849=CC=C(C=C849)C850=CC=C(C=C850)C851=CC=C(C=C851)C852=CC=C(C=C852)C853=CC=C(C=C853)C854=CC=C(C=C854)C855=CC=C(C=C855)C856=CC=C(C=C856)C857=CC=C(C=C857)C858=CC=C(C=C858)C859=CC=C(C=C859)C860=CC=C(C=C860)C861=CC=C(C=C861)C862=CC=C(C=C862)C863=CC=C(C=C863)C864=CC=C(C=C864)C865=CC=C(C=C865)C866=CC=C(C=C866)C867=CC=C(C=C867)C868=CC=C(C=C868)C869=CC=C(C=C869)C870=CC=C(C=C870)C871=CC=C(C=C871)C872=CC=C(C=C872)C873=CC=C(C=C873)C874=CC=C(C=C874)C875=CC=C(C=C875)C876=CC=C(C=C876)C877=CC=C(C=C877)C878=CC=C(C=C878)C879=CC=C(C=C879)C880=CC=C(C=C880)C881=CC=C(C=C881)C882=CC=C(C=C882)C883=CC=C(C=C883)C884=CC=C(C=C884)C885=CC=C(C=C885)C886=CC=C(C=C886)C887=CC=C(C=C887)C888=CC=C(C=C888)C889=CC=C(C=C889)C890=CC=C(C=C890)C891=CC=C(C=C891)C892=CC=C(C=C892)C893=CC=C(C=C893)C894=CC=C(C=C894)C895=CC=C(C=C895)C896=CC=C(C=C896)C897=CC=C(C=C897)C898=CC=C(C=C898)C899=CC=C(C=C899)C900=CC=C(C=C900)C901=CC=C(C=C901)C902=CC=C(C=C902)C903=CC=C(C=C903)C904=CC=C(C=C904)C905=CC=C(C=C905)C906=CC=C(C=C906)C907=CC=C(C=C907)C908=CC=C(C=C908)C909=CC=C(C=C909)C910=CC=C(C=C910)C911=CC=C(C=C911)C912=CC=C(C=C912)C913=CC=C(C=C913)C914=CC=C(C=C914)C915=CC=C(C=C915)C916=CC=C(C=C916)C917=CC=C(C=C917)C918=CC=C(C=C918)C919=CC=C(C=C919)C920=CC=C(C=C920)C921=CC=C(C=C921)C922=CC=C(C=C922)C923=CC=C(C=C923)C924=CC=C(C=C924)C925=CC=C(C=C925)C926=CC=C(C=C926)C927=CC=C(C=C927)C928=CC=C(C=C928)C929=CC=C(C=C929)C930=CC=C(C=C930)C931=CC=C(C=C931)C932=CC=C(C=C932)C933=CC=C(C=C933)C934=CC=C(C=C934)C935=CC=C(C=C935)C936=CC=C(C=C936)C937=CC=C(C=C937)C938=CC=C(C=C938)C939=CC=C(C=C939)C940=CC=C(C=C940)C941=CC</chem>	

Tabla 2. Concentraciones de fármacos reguladores de lípidos en plantas de tratamiento de aguas residuales municipales.

FÁRMACO	INFLUENTE, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	EFLUENTE, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	REFERENCIA
GEMFIBROZIL	0.453-0.965	-	Lishman <i>et al.</i> , 2006
	nd-0.36	-	Gross <i>et al.</i> , 2006
	-	1	Metcalf <i>et al.</i> , 2003a, b
	-	4.76	Andreozzi <i>et al.</i> , 2003
	-	0.143	Rodriguez <i>et al.</i> , 2008
	0.090	-	Radjenovic, 2007a
	2	5.9	Radjenovic, 2009
	-	-	Verenitch <i>et al.</i> , 2006
	-	4.8	Pedersen <i>et al.</i> , 2005

En aguas superficiales al norte de America y Europa, se han detectado concentraciones de $0.75\text{-}1.50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Gemfibrosil (Sanderson *et al.*, 2003) mientras que Pedersen *et al.* (2005) reportaron concentraciones de Gemfibrosil en cuerpos de irrigación en regiones áridas de Estados Unidos de $190\text{-}790 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ y en corrientes de agua de $160\text{--}360 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

En México Siemens *et al.* (2008) realizaron un estudio con muestras de agua residual municipal provenientes del Valle del Mezquital en México, con el objetivo de determinar las concentraciones y flujos de fármacos en este sistema de irrigación. Como resultado, las concentraciones de Gemfibrosil oscilaron entre 0.02 y $0.22 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Estas concentraciones son menores en comparación con los resultados de los estudios en ciudades europeas (Carballa *et al.*, 2005).

Se necesita el desarrollo de procedimientos para evaluar el riesgo toxico que existe al tener la presencia de fármacos en el ambiente. Actualmente, se tienen y se planean nuevas regulaciones en E.U.A, Canada y Europa (U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 1998; Gorman, 2001; EMEA, 2001; Ferrari *et al.*, 2004). El análisis químico tradicional permite identificar y cuantificar los contaminantes presentes pero no ofrece suficiente información de su toxicidad. Algunos de los métodos utilizados para determinar la toxicidad se realizan en algas, peces, bacterias, células de embriones entre otros (Pomati *et al.*, 2006).

Con respecto a la toxicidad de los fármacos reguladores de lípidos, Rosal *et al.* (2009) realizaron un estudio con muestras de agua residuales provenientes de un clarificador secundario de una planta de tratamiento de agua residuales (con una pequeña contribución de aguas industriales y farmacéuticas), localizada en Alcalá de Henares (Madrid). Se realizaron bioensayos y el Gemfibrosil resultó tóxico con la prueba de *Anabaena* con un EC_{50} de $4.42 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. En otro estudio, realizado en USA, en 139 puntos de muestreo, se encontraron concentraciones de Gemfibrosil de $0.79 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y un LC_{50} menor a $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en aguas superficiales y subterráneas (Kolpin *et al.*, 2002).

Quinn *et al.* (2008) en un estudio, llevaron a cabo pruebas de toxicidad de diversos fármacos calificando al GemfibrosilFZ y Bezafibrato como los más tóxicos con respecto a la prueba en *H attenuata* con EC_{50} de $320 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ considerándolos de alto riesgo al acumularse en cuerpos de agua. Hernando *et al.* (2004) mencionaron que en concentración menores de $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Gemfibrosil, BZF y ACL no existe toxicidad en *Daphnia Magna*.

FARMACOS VETERINARIOS.

Un estudio realizado en Reino Unido ayudó a identificar fármacos veterinarios presentes en el ambiente. Se encontró que 56 compuestos pueden ser liberados al ambiente en cantidades significativas, entre los que se destacan las clortetraciclina, cipermetrina, diazinona, emamectin benzoato, ivermectina, lincomicina, ácido oxolínico, oxitetraciclina, srafloxacina, tetraciclina, trimetropina y tilosina (Boxall et al., 2003b).

Debido a la problemática de los fármacos se planteo la implementación del desarrollo de metodologías por cromatografía de gases para la identificación y cuantificación de compuestos orgánicos clorados en aguas residuales industriales y municipales.

OBJETIVO

- Implementar y validar dos metodologías por Cromatografía
- Disminuir el gasto de solventes en la extracción para la identificación de compuestos orgánicos farmacéuticos en agua residual y municipal

METODOLOGÍA

Busqueda de información bibliográfica de determinación de compuestos emergentes, específicamente ácido clofibrico, gemfibrozil, tilosina mediante cromatografía y extracción en fase sólida.

Busqueda de métodos de análisis EPA

Revisión de las metodologías y selección de los métodos de derivatización con posterior determinación por cromatografía de los compuestos de ácido clofibrico, gemfibrozil, tilosina.

1. Búsqueda bibliográfica de métodos de análisis.
2. Selección de los métodos a implementar.
3. Cotización de reactivos, material y estándares requeridos.
4. Adquisición de material y reactivos.
5. Implementación de metodologías

IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍAS. PARA EL ÁCIDO CLOFÍBRICO Y GEMFIBROZIL.

La implementación se realizó por cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas (CG/MS). Para el ácido clofibrico y gemfibrozil se requiere derivatizar los compuestos previamente al análisis cromatográfico para determinar sus tiempos de retención y los picos característicos de los compuestos en estudio.

La metodología consistió en preparar un estándar de cada compuesto en un disolvente afín (metanol grado pesticida o HPLC) de 1 µg/mL y 5 µg/mL . Cabe mencionar que se usaron estándares certificados marca CHEMSERVICE.

Los estándares se derivatizaron con dos derivatizantes, el trimetilsilildiazometano (TSDM) 2 M en hexano y el N-(t-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) marca SIGMA ALDRICH con de pureza mayor a 98%. Los estándares se inyectaron para generar el método cromatográfico, variando condiciones de análisis, es decir rampas de temperatura para generar picos bien definidos y resueltos, hasta obtener las condiciones cromatográficas y de la trampa iónica adecuadas (tablas 1 y 2) y cromatogramas 1 y 2. Los cromatogramas generados en modo SCAN inyectados independientemente y mezclados se observan en la figura 1.

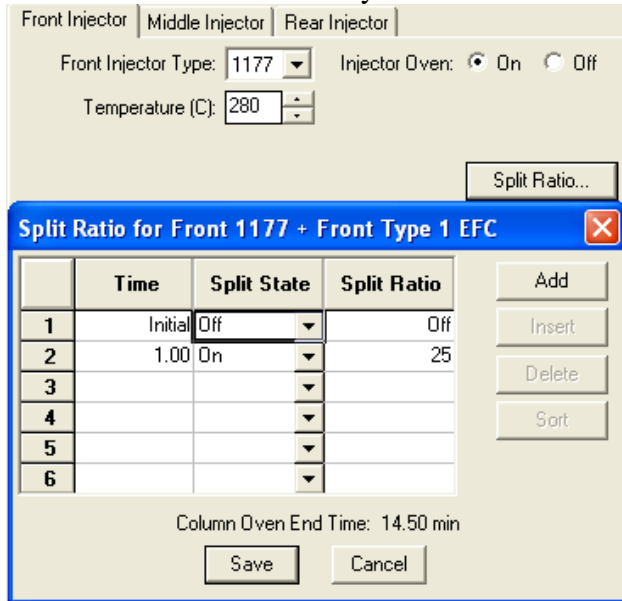
Tabla 1. Condiciones cromatograficas para la deteccion y cuantificacion del Acido Clofibrico y Gemfibrozil .

Rampeo

	Temp (C)	Rate (C/min)	Hold (min)	Total (min)
1	65		2.00	2.00
2	180	30.0	1.00	6.83
3	230	15.0	1.00	11.17
4	300	30.0	1.00	14.50
5				
6				
7				
8				

Flujo de la Columna : 1mL/min

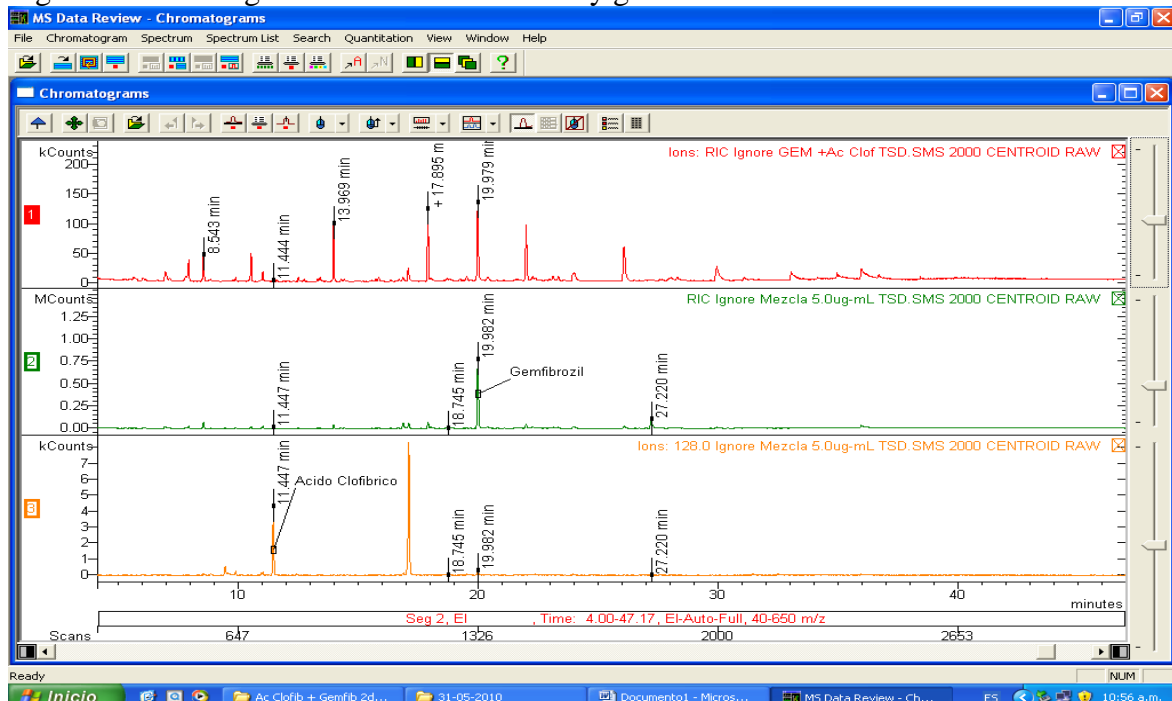
Tabla 2. Condiciones del Inyector



La inyeccion se realizo en modo split/splitless

TR	Compuesto	Ion Caracteristico
8.231	Acido Clofibrico	128, C:1
10.589	4,4-Diclorobifenilo	222, C:1
10.733	Gemfibrozil	122.0, C:1 143,C2

Figura 1. Cromatograma de Acido clofibrico y gemfibrosil en modo SCAN



Para hacer más sensible el método y alcanzar los límites de cuantificación más bajos y los límites de detección se genero el método de ion selectivo (SIS) tabla 3.

Tabla 3. Metodo SIS, Con un rango de masa 40m/z400m/z

	Segment Description	Start (min.)	End (min.)	Low Mass (m/z)	High Mass (m/z)	Ionization Mode	Ion Preparation
1	FIL/MUL DELAY	0.00	5.00	40	650	None	None
2	EI	5.00	8.00	40	650	EI Auto	None
3	Ac Clofibrico	8.00	8.70	40	400	EI Auto	SIS
4	EI	8.70	10.30	40	650	EI Auto	None
5	4,4-diclorobifenilo	10.30	10.70	40	400	EI Auto	SIS

Add Insert Delete Defaults Restore Special Applications...

Segment Setpoints Ionization Mode - EI Auto Ion Preparation - SIS

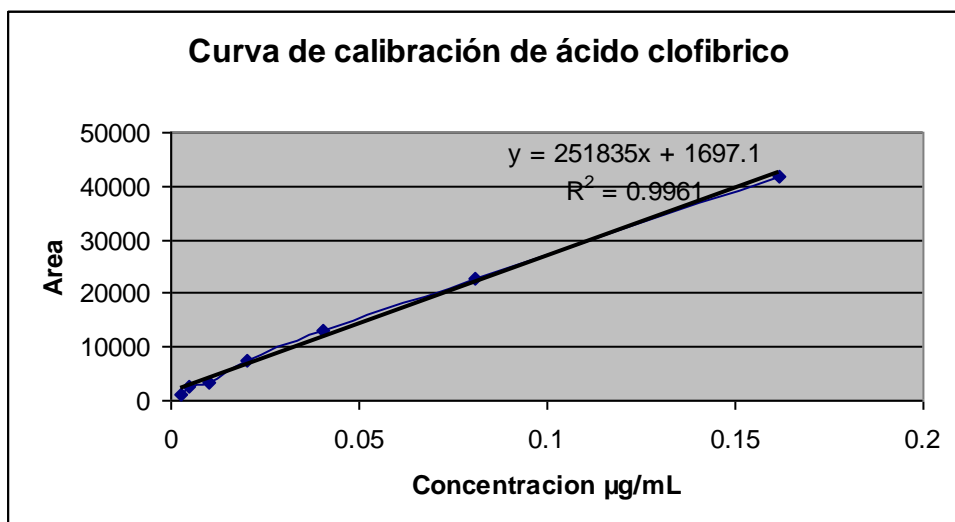
Scan Time: 1.00 seconds/scan (3 uScans) Count Threshold: 2 counts
 Multiplier Offset: 180 +/- volts Mass Defect: 100 mmu/100u
 Emission Current: 20 uamps Cal Gas

Defaults Restore

Una vez generado el método se procedió a generar la curva de calibración para los dos fármacos.

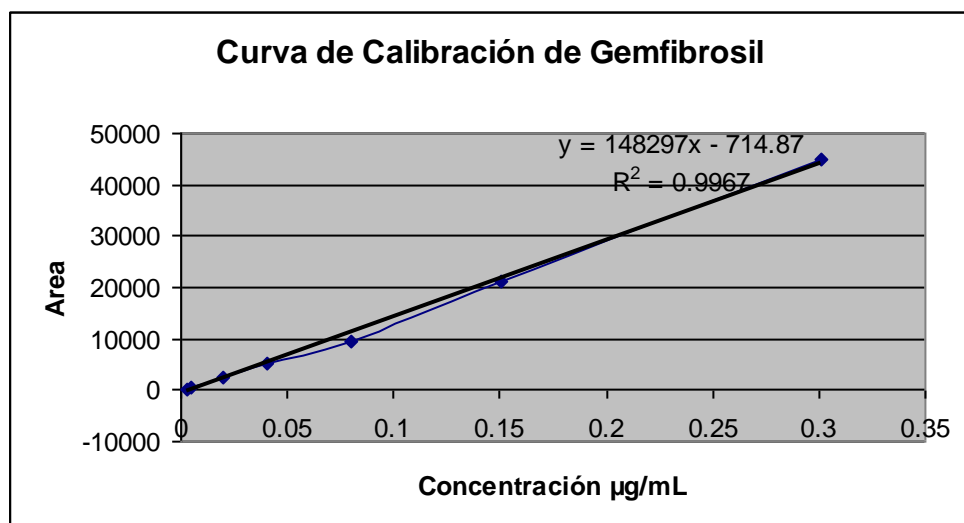
La curva de calibración tiene un rango de 2.5225 – 161.44 ng/L, el gráfico se presenta a continuación.

Curva de calibración de ácido clofíbrico.



La curva de calibración de Gemfibrozil tiene un rango de 2.5 -301.5 ng/ mL. El gráfico de la curva se presenta a continuación.

Curva de calibración de Gemfibrozil.



Una vez generadas las curvas de calibración y obtenidos los parámetros de linealidad (m,b,r), se procedió a realizar dos curvas de calibración más para iniciar de esta forma el proceso de validación como se indica en el procedimiento CAGC7-06.

RESULTADOS.

De la gráficas se puede observar que ambos fármacos presentan coeficientes de correlación mayores de 0.99, lo que indica una alta relación entre la respuesta del instrumento en áreas y la concentración de los dos analitos.

Por otra parte se presenta también un coeficiente de variación menor del 10%, lo que indica que es un método altamente preciso y por último se tiene una exactitud del 89 para ácido clofibríco y 106 para gemfibrozil.

En el Anexo se presentan los datos de linealidad, los límites de detección del método, límites de cuantificación, precisión, exactitud e intervalos de confianza para los dos fármacos.

Como último resultado se genera un procedimiento de análisis de estos dos fármacos en agua potable y agua residual.

DISCUSIÓN

El método de derivatización más adecuado y que presenta una mayor sensibilidad es con el TSDM, el ácido clofibríco en el cromatograma tiene una mayor señal con respecto al MTBSFTA.

De las pruebas de desempeño se observan que los límites de detección son del orden de nanogramos 0.3 y 0.6 para ácido clofibríco y gemfibrozil respectivamente.

Se calculo la Linealidad y posteriormente se prepararon las soluciones requeridas en el procedimiento de prueba de desempeño para obtener los límites de detección, cuantificación, precisión, exactitud e intervalos de confianza como se indica en el procedimiento CAGC7-06.

Los resultados se presentan en el anexo para ácido clofibríco y gemfibrozil.

En cuanto a los límites de cuantificación se obtuvieron de 5.3 y 7.1 para el ácido clofibrato y gemfibrozil por debajo de las concentraciones reportadas en la bibliografía, lo que hace al método aplicable a aguas residuales y de abastecimiento.

La precisión fue de 1.82 y la exactitud de 89.11 lo que confirma que el método es aplicable para la determinación de estos compuestos y que además cumple con los criterios del procedimiento CAGC7-06.

CONCLUSIONES.

La cromatografía de gases masas con extracción en fase sólida es una técnica sensible y adecuada para la determinación de ácido clofibrato y gemfibrozil en agua de abastecimiento y en agua residual.

El método fue probado con agua de pozo y en agua residual obteniéndose porcentajes de recuperación aceptables en ambos tipos de matriz.

La determinación se realizó mediante extracción química y extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos OASIS Hidrofílico-Lipofílico HLB. Se aplicaron dos métodos de derivatización N-(t-butildimetilsilil)-N metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) y trimetilsildiazometano (TSDM).

El derivatizante TSDM presentó la mejor sensibilidad con respecto al MTBSTFA en relación de 10:1. La curva de calibración fue lineal en el rango de concentraciones establecido. El método fue preciso y exacto con un límite de cuantificación de 7.1 ngL⁻¹, límite de detección de 0.6 ngL⁻¹ y porcentajes de recuperación dentro del intervalo de 96-109%.

El método validado se probó con muestras reales de agua de pozo y agua residual.

Se generó un procedimiento de análisis de gemfibrozil y ácido clofibrato.

ANEXO

CALIDAD DEL AGUA				
AREA ORGANICOS				
LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA				
PRUEBA DE DESEMPEÑO		ACIDO CLOFIBRICO		
STD : 2-(4-Chlorophenoxy)-2-methylpropionic acid, 97%, ALDRICH , EC 212-925-9				
LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO				
PROM.BCOS		0 ug/L		t 99% 3.747
LDM = B+ (t) (S)				
LDM =			0.0003	
LIMITE DE CUANTIFICACIÓN				
LCM= 10S + X				
LCM =			0.0053	
MUESTRA	CONC TEOR (ug-L)	CONC PROM (ug-L)	% RECUP	BLANCOS
SD1	0.005045	0.004600	91.18	0
SD2	0.005045	0.004500	89.20	0
SD3	0.005045	0.004483	88.86	0
SD4	0.005045	0.004400	87.22	0
SD5	0.005045	0.004340	86.03	0
SD6	0.005045	0.004360	86.42	0
SD7	0.005045	0.003530	69.97	0
	PROMEDIO	0.004496	89.11	
	DESV.STD	0.000082	1.63	
PRECISIÓN DEL METODO				
%R= (Con Cuant/Conc Teor)*100				
%R =		89.11		
CV = (s / R) (100)		1.826	CUMPLE CRITERIO PROCED. CAGC7-06	
EXACTITUD DEL METODO				
Exactitud = (Conc.cuantificada prom. /Conc. Real)*100				
Exactitud=		89.11	CUMPLE CRITERIO PROCED. CAGC7-06	
LIMITES DE CONFIANZA				
LC=R+ - (t n-1, 95) (s/n)				t 95% 2.132
LC =E25 + (2.132*E26/7)		LCS=	89.98	
LC =E25-(2.132*E26/7)		LCI=	88.25	
ANALISTA			SUPERVISOR	
LUIS A GONZALEZ E.			Manuel Sánchez Zarza	

CALIDAD DEL AGUA				
AREA ORGANICOS				
LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA				
PRUEBA DE DESEMPEÑO		GEMFIBROZIL		
STD: GEMFIBROZI, SIGMA, 097K1312				
LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO				
PROM.BCOS	0 ug/L		t 99%	3.747
LDM = B+ (t) (S)				
LDM =			0.0006	
LIMITE DE CUANTIFICACIÓN				
LCM= 10S + X				
LCM =			0.0071	
MUESTRA	CONC TEOR (ug-L)	CONC PROM (ug-L)	% RECUP	BLANCOS
SD1	0.005250	0.005760	109.71	0
SD2	0.005250	0.005680	108.19	0
SD3	0.005250	0.005500	104.76	0
SD4	0.005250	0.005440	103.62	0
SD5	0.005250	0.005400	102.86	0
SD6	0.005250	0.005040	96.00	0
SD7	0.005250	0.005830	111.05	0
	PROMEDIO	0.005595	106.57	
	DESV.STD	0.000150	2.86	
PRECISIÓN DEL METODO				
%R= (Con Cuant/Conc Teor)*100				
%R =	106.57			
CV = (s / R) (100)	2.681	CUMPLE CRITERIO PROCED. CAGC7-06		
EXACTITUD DEL METODO				
Exactitud = (Conc.cuantificada prom. /Conc. Real)*100				
Exactitud=	106.57	CUMPLE CRITERIO PROCED. CAGC7-06		
LIMITES DE CONFIANZA				
			t 95%	2.132
LC=R+ - (t n-1, 95) (s/n)				
LC =E25 + (2.132*E26/7)	LCS=	108.09		
LC =E25-(2.132*E26/7)	LCI=	105.05		
ANALISTA			SUPERVISOR	
LUIS A GONZALEZ E.			Manuel Sánchez Zarza	

**LABORATORIO DE CALIDAD DEL AGUA
CROMATOGRAFIA DE GASES**

HOJA DE CÁLCULO

LINEALIDAD DEL MÉTODO

Parámetro: ACIDO CLOFEBRICO
Analista: LUIS ALBERTO GONZALEZ
Fecha: 2010-12-01

Se introducen los valores de KI y KI de una de las tres curvas de calibración, obtenidos en el Cromatografía VARIAN 3800 ó en su defecto calcular la m y la b tomando en cuenta que el área es la variable independiente y la concentración es la variable dependiente.

Ecuación $C = KI_0 + (KI_1A)$ ó $Conc = b + (m \cdot A)$
KI ó b = -0.006391209
KI ó m = 3.92258E-06

Curva [archivo bitácora

CARPETA VALIDACIONES 2010

concentración µg-ml x	AREA	AREA	AREA	conc. obtenida1 y1	conc. obtenida2 y2	conc. obtenida3 y3	suma conc. teórica X mg/L	suma de las conc. obtenidas Y mg/L	%Y	%2	%2	
0.0025225	1291	1127	1330	-0.001327187	-0.00197049	-0.00174207	0.0075675	-0.00447188	-1.12803E-05	1.9089E-05	7.023E-06	
0.0050445	2639	2951	2441	0.0033960421	0.005184289	0.003183754	0.015135	0.012228434	6.21969E-05	7.63561E-05	5.26978E-05	
0.01009	3494	3551	3887	0.007314207	0.007537793	0.007679005	0.03027	0.022531006	0.000227338	0.000305424	0.000169283	
0.02018	7642	6813	7478	0.023684976	0.020333176	0.022941676	0.08054	0.068859828	0.001349231	0.001221897	0.00149601	
0.04036	13104	15966	12784	0.0450039985	0.056236344	0.043754766	0.12108	0.14501095	0.005852244	0.004886789	0.007102905	
0.08072	22733	24954	23971	0.082780291	0.091492291	0.087636417	0.24216	0.261908998	0.021141294	0.019547155	0.022903557	
0.16144	41654	45162	41485	0.156939001	0.170759332	0.156336088	0.49432	0.494094421	0.078152203	0.078188621	0.078248408	
Nº de curvas				n =	sumatoria =							
Puntos de la Curva				m =	0.9610725		0.988251901		0.106773228		0.104245131	
pendiente				t =	EX		EY		EX^Y		E%2	
intercepción				b =	0.00032							
				c =	1.292456056							
				d =	1.265487409							
				e =	1.332335739							
				f =	1.670442668							
				f' =	0.990294874							
coeficiente de correlación				r =	0.9951							

Conclusión: Cumple criterio de acuerdo al punto 3 del procedimiento CARGC7-06

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD
MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

ÁREA: COMPUUESTOS ORGANICOS	TEMA: DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE FARMACOS EN AGUA
-----------------------------	--

1. OBJETIVO

Identificar y cuantificar ácido clorhídrico y gemfibrozil en muestras de agua.

2. CAMPO DE APLICACIÓN

Este método cuantifica los fármacos ácido clorhídrico y gemfibrozil en muestras de agua natural y sea superficial, subterránea, agua potable, residual y residual tratada.

3. DEFINICIONES

Las definiciones de: Blanco de muestra, Blanco de método, Muestra sintética, Muestra duplicada y Muestra fortificada están en el procedimiento de control de calidad analítico C-ACAC 7-08.

4. FUNDAMENTO

La extracción en fase sólida es una forma de cromatografía digital (paso a paso) diseñado para extraer, distribuir, y/o adsorber uno o más componentes de una fase líquida (muestras) dentro de una fase estacionaria (adsorbente o resina). Una sustancia adsorbente puede removerse del adsorbente paso a paso incrementando la fuerza de elución del eluyente (técnica de gradiente).

5. EQUIPO

Cromatógrafo de gases modelo 3800 acoplado a espectrómetro de masas modelo 2200.
Sistema de extracción de fase sólida
Rotavapor
Colocador de muestras Minilup
Vortex

6. REACTIVOS

Estándar de ácido clorhídrico
Estándar de gemfibrozil
Metanol grado HPLC
Hexano grado HPLC
Acetona grado HPLC
Derivatizante Trimetilhidrazometano 2M en solución de hexano
Subrogado 4,4'-Diclorobifenilo
Helio
Nitrógeno
Ácido clorhídrico
Agua grado HPLC

Fecha de edición:	D	M	A	Elaboró:	D	M	A	Revisó:	Clave:
	07	77	2008		27	72	2008	08	
Elaboró:				Revisó:				Aprueba:	Fecha:
								M. G. NÚÑEZ-SALINAS	Holz de

Forma CP-03

**SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD
 MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO**
ÁREA: COMPUESTOS ORGANICOS
**TEMA: DETERMINACION Y CUANTIFICACION
 DE FARMACOS EN AGUA**

Sulfato de sodio anhidro grado reactivo

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ESTÁNDAR.

Solución de ácido clorhídrico de aproximadamente 1000 µg/mL.

Pesar 10 miligramos de ácido clorhídrico en balanza analítica, disolver en metanol y abrilar en matraz volumétrico de 10 mL con metanol.

Solución de gemfibrozil de aproximadamente 1000 µg/mL.

Pesar aproximadamente 10 mg de gemfibrozil en balanza analítica, disolver con metanol y abrilar en matraz volumétrico de 10 mL con metanol.

Preparación de la curva de calibración:

Procedimiento para la detección y cuantificación de Ácido Clorhídrico y Gemfibrozil

1.-Para la curva de calibración se parte de los estándares de:

Conc. Inicial	Vol. Inicial (µL)	Vol. Final (µL)	Conc. Final (µg-mL)	Compuesto
0.098455	25	1000	0.002461	Ac Clorhídrico
0.098455	50	1000	0.004922	Ac Clorhídrico
0.098455	100	1000	0.0098455	Ac Clorhídrico
0.98455	20	1000	0.019691	Ac Clorhídrico
0.98455	40	1000	0.039382	Ac Clorhídrico
0.98455	80	1000	0.078764	Ac Clorhídrico
0.98455	160	1000	0.157528	Ac Clorhídrico
9.8455	32	1000	0.315056	Ac Clorhídrico
0.1005	25	1000	0.0025125	Gemfibrozil
0.1005	50	1000	0.005025	Gemfibrozil
0.1005	100	1000	0.01005	Gemfibrozil

Fecha de edición:	D	M	A	Elaboró:	D	M	A	Revisó:	Clave:
	07	27	2003		27	22	2003	08	
Eliberó:				Revisó:				Aprobó:	
								M. en C. ROSMARA SÁNCHEZ SALINAS	
								Hoja 2 de 3	

Form. CP-03

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD
 MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

AREA: COMPUESTOS ORGANICOS

TEMA: DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE FARMACOS EN AGUA

1.005	20	1000	0.0201	Gemfibrosil
1.005	40	1000	0.0402	Gemfibrosil
1.005	80	1000	0.0804	Gemfibrosil
1.005	160	1000	0.1608	Gemfibrosil
1.005	32	1000	0.3216	Gemfibrosil

2.-A cada punto de la curva de calibración se le agrega 50µL de una concentración de 9.00 µg/mL aprox. de Sirogado (4,4-Diclorobifenilo)

3.-Cada punto de la curva se concentra a flujo de Nitrógeno (Moderado), hasta sequedad.

4.-A cada vial (punto de la Curva) se le agrega 50µL del Derivatizante (Trimetilhidrazometano 2.0 M solución en Hexano) y 100µL de MeOH.

5.-Se homogeniza en el vortex por un lapso de 1 minuto

6.-Se libera el exceso de presión de cada uno de los viales y se deja reposar por un lapso de 2 horas con agitación y venteo periódico.

7.-Pasado el tiempo se concentra a flujo de Nitrógeno hasta sequedad y se realiza el cambio de disolvente a Hexano

8.-Ya que se cambio del disolvente homogenizar en el vortex por 10 segundos aprox. Y dejar reposar por un lapso de 5 minutos, concentrar a flujo de Nitrógeno. Repetir este paso de cambio de disolvente en 2 ocasiones más.

9.- Por último se abre a 1mL con Hexano

10.-Se inyecta al sistema cromatográfico lo mas pronto posible.

Condiciones Cromatografías para la detección y cuantificación del ácido clorírico y Gemfibrosil

El instrumento analítico fue el Cromatografía Variar CP 3800 y el detector de masas Saturn

2200, acoplado a una columna capilar Factor Four VF -5ms de 30m x 0.25mm, 0.25

La corriente de gas Helio fue de 1.00 mL/min

 Se inyecta un volumen de 1µL en inyección **splitless**, la temperatura del inyector es de 280°C

El programa de temperatura fue de

Temp °C	Rate (°C/min)	Hold (min)
65		2.00
180	30	1.00
230	15	1.00
300	30	1.00
		14.50

Se realizó la detección por medio de SIS (Sistema de los Selectivos)

Las temperaturas de análisis fueron de

Trampa 220 Manifold 50 y línea de Transferencia fue de 280

Para la identificación, los iones principales de los compuestos fueron

Acido Clorírico 128

Fecha de edición:	D	M	A	Elaborado:	D	M	A	Revisión:	Ciudad:
	07	07	2008		27	02	2008	01	
Elaboró:	Revisó:			Aprobó:			Fecha de la		
				M. en G. ROSA ROSALES SALINAS					

Form. CP-03

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD
 MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

AREA: COMPUESTOS ORGANICOS

 TEMA: DETERMINACION Y CUANTIFICACION
 DE FARMACOS EN AGUA

1.005	20	1000	0.0201	Gemfibrosil
1.005	40	1000	0.0402	Gemfibrosil
1.005	80	1000	0.0804	Gemfibrosil
1.005	160	1000	0.1608	Gemfibrosil
1.005	32	1000	0.3216	Gemfibrosil

2.-A cada punto de la curva de calibración se le agrega 50µL de una coicestración de 9.00 µg/mL Laprox de Sirogado (4,4-Diclorobifenilo)

3.-Cada punto de la curva se concentra a flujo de Nitrógeno (Moderado), hasta sequedad.

4.-A cada vial (punto de la Curva) se le agrega 50µL del Derivatizante [(Trimetilhidrazometano 2.0 M solución en Hexano) y 100µL de MeOH.

5.-Se homogeniza en el borbéx por un lapso de 1 minuto

6.-Se libera el exceso de presión de vial de cada uno de los viales y se deja reposar por un lapso de 2 horas con agitación y venteo periódico.

7.-Pasado el tiempo se coicestrara a flujo de Nitrógeno hasta sequedad y se realiza el cambio de disolvente a Hexano

8.-Ya que se cambio de disolvente homogenizar en el borbéx por 10 segundos aprox. Y dejar reposar por un lapso de 5 minutos, coicestrara a flujo de Nitrógeno. Repetir este paso de cambio de disolvente en 2 ocasiones más.

9.- Por último se abra a 1mL con Hexano

10.-Se inyecta al sistema cromatográfico lo mas pronto posible.

Condiciones Cromatograficas para la detección y cuantificación del ácido clorhídrico y Gemfibrosil

El sistema de análisis tiene un Cromatográfico Varian CP 3800 y un detector de masas Saturn

2200, acoplado a una columna capilar Factor Four VF-5ms de 30m x 0.25mm, 0.25

La corriente de gas Helio tiene de 1.00 mL/min

Se inyecta un volumen de 1µL en inyección **splitless**, la temperatura del inyector es de 280°C

El programa de temperatura fue de

Temp °C	Rate (°C/min)	Hold (min)
65		2.00
180	30	1.00
230	15	1.00
300	30	1.00
		14.50

Se realizo la detección por medio de SIS (Sistema de los Selectivos)

Las temperaturas de análisis fueron de

Trampa 220 Manifold 50 y línea de Transferencia de 280

Para la identificación, los datos principales de los compuestos fueron

Acido Clorhídrico 128

Fecha de edición:	D	M	A	Substancia:	D	M	A	Revisión:	Ciclo:
	07	77	2009		27	72	2009	05	
Elaboro:				Revisó:				Aprobó:	Fecha de a
								M. en G. ROSA RAMÍREZ SALINAS	

Form. CP-03

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD
 MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

AREA: COMPUESTOS ORGANICOS

 TEMA: DETERMINACION Y CUANTIFICACION
 DE FARMACOS EN AGUA

Gemfibrozil 122-143

7. MATERIAL

Columna capilar VF5ms 30 m X 0.25 mm X 0.25 µm
 Cartuchos de extracción en fase sólida CHROMABOND C18 ec 3 mL/500 mg
 Viales de 1.8 mL
 Microfrías de 1000, 500, 100, 50, 25 µL

8. CONDICIONES DE LA MUESTRA

La muestra debe conservarse con metalol al 2% u/te en frasco ámbar y refrigeración a 4 °C.

9. INTERFERENCIAS

Las interferencias se pueden agrupar en tres categorías:

1. Disolventes y/o reactivos
2. Material de laboratorio contaminado
3. Partes del cromatografía; Gas acarreador, columnas y/o detector contaminado
4. Compuestos extraídos de la matriz que causan respuesta en el detector. Las interferencias coeluidas de las muestras pueden variar considerablemente.

10. PRECAUCIONES

Las muestras deben protegerse de la luz natural.

11. PROCEDIMIENTO
Análisis de muestras

1. Realizar un blanco de extracción a todo el material a utilizar como a continuación se describe:
2. Dar dos lavados con acetona (20 mL cada lavado) grado HPLC al material y descartar los lavados.
3. Dar dos lavados con metalol (20 mL cada lavado) grado HPLC y descartar los lavados.
4. Por último es necesario lavar el material con metalol (20 mL a cada matriz e inyección) este lavado se recolecta en una matraz bola de 500 mL y se concentra en rotavapor procurando no llegar a sequedad.

Fecha de edición:	D	M	A	Revisión:	D	M	A	Clave:
	07	77	2009		27	72	2009	08
Elaboró:	Revisó:			Aprobó:	Fecha de revisión:			
				M. en G. INDSMIA/SALVAREZ SALINAS	Hoy 4 de 5			

Form. CP-03

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD
 MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

ÁREA: COMPUESTOS ORGANICOS	TEMA: DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE FARMACOS EN AGUA
----------------------------	--

5. El extracto se transfiere a un vial de 1.8 mL y se concentra a flujo de nitrógeno, a la par de la concentración, se realiza tres enjagues con metanol al matraz bola y los lavados se agregan al vial de 1.8 mL para concentrar a 1 mL.

6. Se pone a temperatura ambiente la muestra.

7. Se homogeniza la muestra con agitación.

8. Se toma un litro de muestra y se deposita en un matraz Erlenmeyer de 1 litro.
 9. Se agregas 100 µL de una concentración de aproximadamente 9 µg/mL.
 10. Se deja reposar la muestra por un lapso de 1 hora con agitación periódica.

Acidificación del cartucho de extracción en fase sólida.

1. Los cartuchos se acidifican con metanol 2 X 2 mL y agua HPLC acidificada (con ácido clorhídrico a pH menor o igual a 2) con 2X 2 mL.

2. Una vez acidificados los cartuchos de extracción se hace pasar un litro de muestra a través de ellos a razón de 5-10 mL/min.

3. Se lava el cartucho con agua acidificada a pH=2 y se deja secar el cartucho por dos horas.

4. Elución.

4.1 Para la elución de los fármacos, se agregan 2 mL de metanol, se dejan humedecer los cartuchos aproximadamente por 2 minutos y posteriormente se eluye lentamente. Se repite este paso una vez más.

4.2 Los eluatos se recolectan en viales de 5 mL y posteriormente se concentra a flujo de nitrógeno hasta sequedad.

5. Derivatización de los concentrados.

5.1 La derivatización se lleva a cabo añadiendo 50 µL de TSDM 2 M en solución de hexano y 100 µL de metanol al vial seco.

5.2 Se homogenizan en el Bortex y se libera el exceso de presión generada dentro del vial, se tapa nuevamente el vial y se deja reaccionar por un tiempo de 2 hrs. Transcurrido el tiempo se concentran a sequedad y se realiza el cambio de disolvente

Fecha de edición:	D	M	A	Sancti Spiritus:	D	M	A	Revisión:	Clave:
	07	77	2003		27	72	2003	08	
Elaboró:	Revisó:							Aprobó:	Hojas de a
								M. en C. ROSA RIVERA SALINAS	

Forma CP-02

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD
 MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

AREA: COMPUESTOS ORGANICOS

 TEMA: DETERMINACION Y CUANTIFICACION
 DE FARMACOS EN AGUA

a Hexano por ultimo se aforan a 1 mL y se inyecta lo mas pronto posible al sistema CGMS.

12. CÁLCULOS

- 12.1 Hacer la integración bajo la curva de las señales que coinciden en tiempo de retención con los estándares.
- 12.2 Llevar a cabo el ajuste de la curva y el cálculo del coeficiente de correlación estadísticamente. Determinar por este medio la pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación.
- 12.3 Interpolación los valores de las áreas de los picos de las muestras positivas en la curva de calibración de los estándares.
- 12.4 En caso de que alguna muestra presente analitos en concentraciones mayores a los límites de la curva de calibración, se preparará una nueva curva de calibración que cubra el rango de concentración del analito en la muestra o se diluirá el extracto.

13. FORMATOS

No aplica.

14. BIBLIOGRAFÍA

- Gibson, R. et al. 2007. Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1169, 31-39.
- Farre, M., Petrovic, M., Barcelo, D. (2007). Recently developed GC/MS and LC/MS methods for determining NSAIDs in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1203-1214.
- Patterson, D.B., Brimley W.C., Kelleher, V., Ferguson, P.L. Method to determine PPCPs in the Environment: Application of U.S. EPA Methods to the Determination of Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment. Determination of Chloric Acid in Sewage Effluent by GC/MS. *Amer. Lab.* 34, 20-28 (2000).
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Lompart, M., Garcia, C., Rodriguez, I., Gomez, M., Ternes, T., 2005. Behaviour of pharmaceutical and personal care products in a sewage treatment plant of north west Spain. *Water Science and Technology*, 8, 29-35.

Fecha de edición:	D	M	A	Substancias:	D	M	A	Revisión:	Ciclo:
	07	27	2005		27	22	2005	05	
Elaboró:				Revisó:				Aprueba:	Fecha de a:
								M. en G. NORMA RAMÍREZ SALINAS	

Form. CP-03

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD
 MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

AREA: COMPUESTOS ORGANICOS

 TEMA: DETERMINACION Y CUANTIFICACION
 DE FARMACOS EN AGUA

Pedersen, K., Heberer, T. Multi-compound methods for the detection of pharmaceutical residues in various waters applying solid phase extraction (SPE) and gas chromatography with mass spectrometric (GC-MS) detection. *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 1443-1450.

Barceló, D. y Petrovic, M., (2006). The handbook of environmental chemistry. Emerging contaminants from industrial and municipal waste: Occurrence, Analysis and effects Vol.5. 288p.

Farre, M., Petrovic, M., Barceló, D. (2007). Recently developed GC/MS and LC/MS methods for determining NSAIDs in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1203-1214.

Johnson, P.D., Rimmer, D.A., Brown, R.H. Adaptation and application of a multiresidue method for the determination of a range of pesticides, including phenoxy acid herbicides in vegetation, based on high resolution gel permeation chromatographic clean-up gas chromatographic analysis with mass-selective detection. *J. Chromatogr. A* 1997; 765; 245-250 and Johnson, P.D., Rimmer, D. A., Brown, R.H. Determination of phenoxy acid herbicides in vegetation, utilizing high resolution gel permeation chromatographic clean-up methylation with trimethylsilyldiazomethane prior to gas chromatographic analysis with mass-selective detection. *J. Chromatogr. A* 1996; 755; 3-11.

Pedersen, J., Sollman, M., Siffert, M. (2005). Human pharmaceuticals, hormones, and personal care products: ingredients in runoff from agricultural fields irrigated with treated wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1625-1632.

Johnson, P.D., Rimmer, D.A., Brown, R.H. Adaptation and application of a multiresidue method for the determination of a range of pesticides, including phenoxy acid herbicides in vegetation, based on high resolution gel permeation chromatographic clean-up gas chromatographic analysis with mass-selective detection. *J. Chromatogr. A* 1997; 765; 245-250 and Johnson, P.D., Rimmer, D. A., Brown, R.H. Determination of phenoxy acid herbicides in vegetation, utilizing high resolution gel permeation chromatographic clean-up methylation with trimethylsilyldiazomethane prior to gas chromatographic analysis with mass-selective detection. *J. Chromatogr. A* 1996; 755; 3-11.

Okita, B., Reemtsma, T. (2006). Sensitive determination of acidic drugs and triclosan in surface and wastewater by ion-pair reverse-phase liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 18, 765-774.

Radjenovic, J., Petrovic, M., Barcelo, D. (2007a). Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1365-1377.

Fecha de edición:	D	M	A	Substituya:	D	M	A	Revisión:	01	Clave:
	07	17	2008		27	12	2008			
Elaboró:				Revisó:				Aprobó:	M. en C. ROSA RIVERA SALINAS	
									Fecha de	

Form. CP-03

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD
 MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

AREA: COMPUESTOS ORGANICOS

 TEMA: DETERMINACION Y CUANTIFICACION
 DE FARMACOS EN AGUA

Radouk, J., Petrouk, M., Barceló, D. Advanced mass spectrometric methods applied to the study of the adsorption and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment. Trends in analytical Chemistry, Vol. 26, No. 11, 2007.

15. REFERENCIAS
 No aplica



Fecha de edición:	D	M	A	Substancias:	D	M	A	Revisión:	Códe:
	07	77	2005		27	72	2005	05	
Elaboró:				Revisó:				Aprobó:	Fecha de a
								M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS	

Form. CP-03

Bibliografía.

- Barceló, D. y Petrovic, M., 2006. The handbook of environmental chemistry. Emerging contaminant from industrial and municipal waste: Occurrence, Analysis and effects Vol.5. 288p.
- Bellido, D., 2006. Metabolismos de fármacos y sus implicaciones clínicas. Manual de Nutrición y metabolismo. Cap 10. 1 ed. Sep. 625p.
- Farre, M., Petrovic, M., Barcelo, D. (2007). Recently developed GC/MS and LC/MS methods for determining NSAIDs in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 387, 1203-1214.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Lompart, M., Garcia, C., Rodriguez, I., Gomez, M., Ternes, T., 2005. Behaviour of pharmaceutical and personal care products in a sewage treatment plant of northwest Spain. *Water Science and technology*. 8, 29-35.
- Gross, M., Petrovic, M., Barcelo, D. (2007). Wastewater treatment plant as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro River basin (Northeast Spain). *Environmental toxicology and chemistry*. 26, 1553-1562.
- Patterson, D.B., Brumley W.C. Kellieher, V., Ferguson, P.L. Method to determine PPCPs in the Environment: Application of U.S. EPA Methods to the Determination of Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment. Determination of Clofibric Acid in Sewage Effluent by GC/MS. *Amer. Lab.* 34, 20-28 (2000).
- Drewes, J.E., Heberer, T., Rauch, T., Reddersen, K., 2003. Fate on pharmaceutical during Ground Water Recharge. *Ground Water Monitoring and Remediation*. 23, 64-72.
- Flores, J., Media, V.A., Armijo, J.A., 2008. Metabolismo de los fármacos. *Farmacología humana*. 6 Ed. Masson Barcelona. 1540 p.
- Gibson., R.et.al. 2007. Determination of acidic pharmaceuticals nad potencial endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and análisis by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1169, 31-39.
- Johnson, P.D., Rimmer, D.A., Brown, R.H. Adaptation and application of a multiresidue method for the determination of a range of pesticides, including phenoxy acid herbicides in vegetation, based on high resolution gel permeation chromatographic clean-up gas chromatographic analysisi with mass-selective detection. *J. Chromatogr. A* 1997; 765; 245-250 and Johnson, P.D., Rimmer, D. A., Brown, R.H. Determination of phenoxy acid herbicides in vegetation, utilizing high resolution gel permeation chromatographic clean-up methylation with trimethylsilyldiazomethane prior to gas chromatographic analysis with mass-selective detection. *J. Chromatogr. A* 1996; 755: 3-11.

Pedersen, J., Soliman, M., Suffet, M. (2005). Human pharmaceuticals, hormones, and personal care products ingredients in runoff from agricultural fields irrigated with treated wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 1625-1632.

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 Communication in Mass Spectrometry*. 18, 765-774.

Quintana, B., Rodill, R., Reemtsma, T. (2004). Suitability of hollow fiber liquid-phase micro-extraction for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry without matrix effects. *Journal of Chromatography A*. 1061, 19-26.

Radjenovic, J., Petrovic, M., Barcelo, D. (2007a). Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 387, 1365:1377.

Radjenovic, J., Petrovic, M., Barceló, D. Advanced mass spectrometric methods applied to the study of fate and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment. *Trends in analytical Chemistry*, Vol. 26, No. 11, 2007.

Redersen, K., Heberer, T. Multi-compound methods for the detection of pharmaceutical residues in various waters applying solid phase extraction (SPE) and gas chromatography with mass spectrometric (GC-MS) detection. *J. Sep. Sci.* 2003, 26,1443-1450.

Sanderson, H., Johnson, D.J., Wilson, C.J., Brain, R.A., Solomon, K.R., 2003. Probabilistic Hazard assessment of environmentally occurring pharmaceutical toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. *Toxicology Letters* 144, 383-395.

Siemens, J., Huschek, G., Siebe, C., Kaupenjohann, M., 2008. Concentration and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system. Mexico City-Mezquital valley. *Water Research*. 42, 2124-2134.

Yi Hua, W., Bennett, E., Maio, X., Metcalfe, C., Letcher, R. (2006). Seasonality effects on pharmaceuticals and S-Triazine herbicides in wastewater effluent and surface water from the Canadian side of the upper Detroit River. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25, 2356-2365.

Zwiener C. (2007). Occurrence and analysis of pharmaceuticals and their transformation products in drinking water treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 387, 1159-1162.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) PARA LA DETERMINACIÓN DE TILOSINA

INTRODUCCIÓN

Los hábitos de consumo actuales en nuestro país están generando una serie de residuos o microcontaminantes que hace tan solo unos años no existían. Entre estas nuevas sustancias aparecen los PPCPs (fármacos y productos de higiene personal) que son un amplio grupo de compuestos químicos utilizados en medicina veterinaria, prácticas agrícolas, salud humana y cosmetología.

Una vez que se han ingerido estos medicamentos son absorbidos y metabolizados por el organismo y luego excretados junto con las aguas residuales; algunas de estas sustancias no son degradadas en las depuradoras y llegan a las aguas superficiales con los vertidos de los efluentes depurados.

Dentro de las sustancias farmacológicamente activas, pueden considerarse como mas representativos los siguientes grupos terapéuticos: Antiinflamatorios y analgésicos, antidepresivos, antiepilépticos, antineoplásicos, betabloqueadores, antibióticos, etc.

La tilosina es un antibiótico macrólido, que fue aislado de cultivos de suelo obtenido originalmente de Tailandia. El espectro antimicrobiano ha sido descrito como esencialmente Gram-positivo. Las pruebas *in vivo* han mostrado actividad contra *Leptospira sp.* en animales de laboratorio y cerdos, erisipelas de pavos y cerdos y *Haemophilus pertussis*. La tilosina también mostró propiedades como promotor del crecimiento en pollos y cerdos. El fosfato de tilosina esta disponible para estimular el crecimiento y mejorar la eficiencia de la alimentación en gallinas, pavos y cerdos. La tilosina también ha mostrado ser activo contra las especies *Clostridium* y las bacterias en forma de esporas.

La tilosina A es convertida en diferentes formas bajo condiciones ácidas, neutrales o alcalinas (Paesen et al., 1995a,b). La Tilosina es producida por fermentación y los productos formulados son una mezcla de tilosina A, tilosina B, tilosina C y tilosina D, la Tilosina A es el mayor componente.

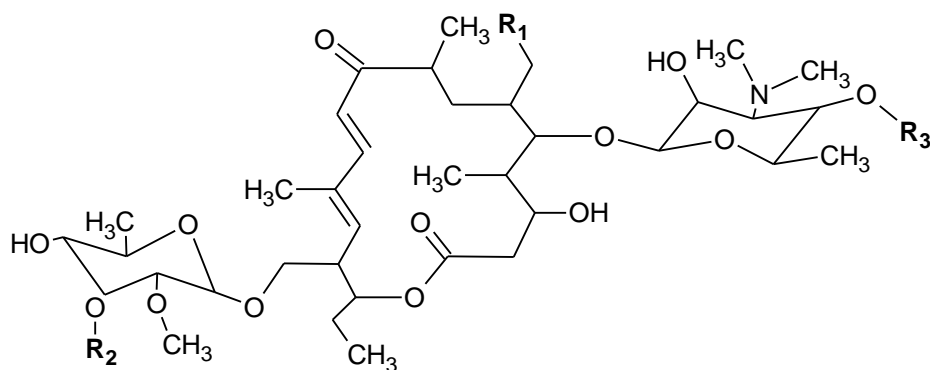


Figura 1 Estructura química de Tilosina

En los últimos diez años, la producción porcina se elevó un 28% en México. Los estados con mayor producción de ganado porcino son Sonora, Guanajuato, Michoacán y Jalisco (INEGI, 2009). En 2003 la producción de cerdos fue de 14,625,199 cabezas. Se estima que un cerdo produce 5.8 kg de efluente diariamente (excretas y orina) o un volumen de $0.27 \text{ m}^3 \cdot \text{animal}^{-1} \cdot \text{mes}^{-1}$ (Anónimo, 2006). En México la mayor parte del agua generada en las granjas porcinas es liberada al medio ambiente sin tratamiento previo. Cuando se cuenta con un sistema de tratamiento, por lo general éste se encuentra en condiciones deplorables, sin funcionamiento o sin cumplir con las normas de descarga aplicables para la industria porcina (NOM-001-SEMARNAT-1996 y Ley Federal de Derechos de 1991, aplicable para valores de DQO y SST de 300 y 30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en los efluentes de granjas porcinas) (Girón, 2009).

En México el tratamiento más común de los desechos biológicos de una granja porcina es como abono directo o en forma de composta (SAGARPA, 2004). Se estima que el 38% de las granjas porcinas vierten sus residuos en cuerpos receptores (De Victorica y Galván, 2005), lo que provoca contaminación en los mantos freáticos y en las aguas superficiales.

Muchas de las investigaciones actuales de manejo de agua residual proveniente de la industria porcícola, están enfocadas en la reducción de olor y la disposición apropiada del estiércol.

Es bien conocido que los cerdos reciben altas dosis de antibióticos para prevenir enfermedades y como precursores del crecimiento. Al respecto, se tiene muy poca información, a nivel mundial, sobre el efecto de estos antibióticos en los sistemas de tratamiento. Por lo que un área nueva que necesita mayor atención es la remoción de antibióticos veterinarios en los sistemas de tratamiento de agua residual porcina. Actualmente las investigaciones del destino de estos compuestos en los sistemas de manejo de estiércol y en el medio ambiente son limitadas.

Recientemente se han detectado concentraciones traza de fármacos veterinarios alrededor del mundo en suelos, aguas superficiales, aguas subterráneas y aguas residuales municipales e industriales. Aunque los impactos de algunos compuestos han sido muy investigados, muchas otras sustancias encontradas en el medio ambiente son menos estudiadas.

OBJETIVO

Desarrollar el proceso de validación del método analítico para la cuantificación de tilosina por HPLC –UV mediante extracción de fase sólida

METODOLOGÍA

Se desarrollo un método para la cuantificación de tilosina con elución isocrática por cromatografía de líquidos de fase reversa, con detección ultravioleta a 290 nm, mediante el método de adición de estándar. Se utilizó tartrato de tilosina como estándar interno. El método implica una extracción en fase sólida con cartuchos C18, la separación se realizó en una columna C18 en fase reversa y la fase móvil fue una mezcla de acetato de amonio (20mM): acetonitrilo (65:35 v/v) ajustado a pH 6.74 con

ácido acético concentrado. El método se validó en el rango de concentraciones de 5 a 50 µg/mL con adición de estándar de tilosina de 100 µg/mL.

Este estudio describe un método adecuado para la determinación de tilosina por HPLC-UV para su aplicación en estudios de agua potable y agua residual.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos. Tartrato de tilosina como estándar interno

Acetonitrilo (Mallinckodt), metanol y agua grado HPLC, el ácido acético glacial y acetato de amonio grado reactivo

Instrumentación y cromatografía

El estudio se hizo con un cromatógrafo de líquidos con un detector ultravioleta 290 nm, con arreglo de diodos, Columna Waters dC18 Atlantis de 250 X 4.6mm, 5 micras, balanza analítica (Ohaus), baño ultrasónico, Cartuchos Oasis Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) de 6 cm³. (Waters).

Sección experimental

Preparación de la solución patrón a partir de tartrato de tilosina

Se preparó una solución stock de tilosina a una concentración de 1260 µg/mL, pesando 12.6 mg de tilosina y llevándola a volumen con metanol en un matraz volumétrico de 10 mL.

Preparación de la solución de trabajo de tilosina

A partir de la solución stock de tilosina (1260 µg/mL) se preparó la solución estándar de calibración de 100 µg/mL, transfiriendo 320 µL de solución de tilosina a un vial de 4 mL y llevando a volumen con metanol.

Extracción por fase sólida (SPE)

Las columnas y los sorbentes se desarrollan a partir de la tecnología de extracción en fase sólida y permiten la extracción selectiva de analitos de complejos y muestras de gran volumen antes de pasar al análisis con HPLC.

La extracción por fase sólida (SPE) es un método de preparación rápida de las muestras mediante la cual se concentran y purifican los analitos buscados previamente antes de proceder a su análisis por técnicas cromatográficas (HPLC, GC-MS, LC-MS). Durante las últimas décadas la SPE ha aumentado firmemente su aceptación entre la comunidad analítica y ha reemplazado rápidamente a métodos tradicionales como la extracción líquido-líquido.

Acondicionamiento del cartucho de SPE

Los cartuchos de acondicionaron con 2 mL de agua HPLC y 2 mL de metanol HPLC (dos veces) sin dejar secar el cartucho.

Preparación de la fase móvil

La fase móvil fue preparada por la mezcla de acetato de amonio (20mM): Acetonitrilo HPLC (65:35 v/v) a pH 6.74 ajustado con ácido acético concentrado. La fase fue filtrada por membrana de 0.20 µm de tamaño de poro y desgasificada en el sonicador durante 15 minutos.

El flujo a través de la columna fue de 1 ml/min y el volumen de inyección de 30 µl

Tabla 1 Condiciones cromatográficas

Parámetros instrumentales	Condiciones
Modo de elución	Isocrático
Flujo fase móvil	1.0 ml/min
Volumen de inyección	30 µL
Longitud de onda de detección	265 nm
Columna	Atlantis Waters 150 X 4.6 mm de 5 µm
Temperatura de la columna	27° C
Modo de cuantificación	Estándar interno
Modo de calibración	Curva de calibración
Unidades de concentración	µg/mL
Tiempos de retención	Tilosina A
	Tilosina C
Tiempo de corrida	25 minutos

Resultados

La curva de calibración fue lineal en el rango de concentraciones 5 a 50 µg/mL, este método para determinar tilosina por HPLC-UV fue preciso y exacto.

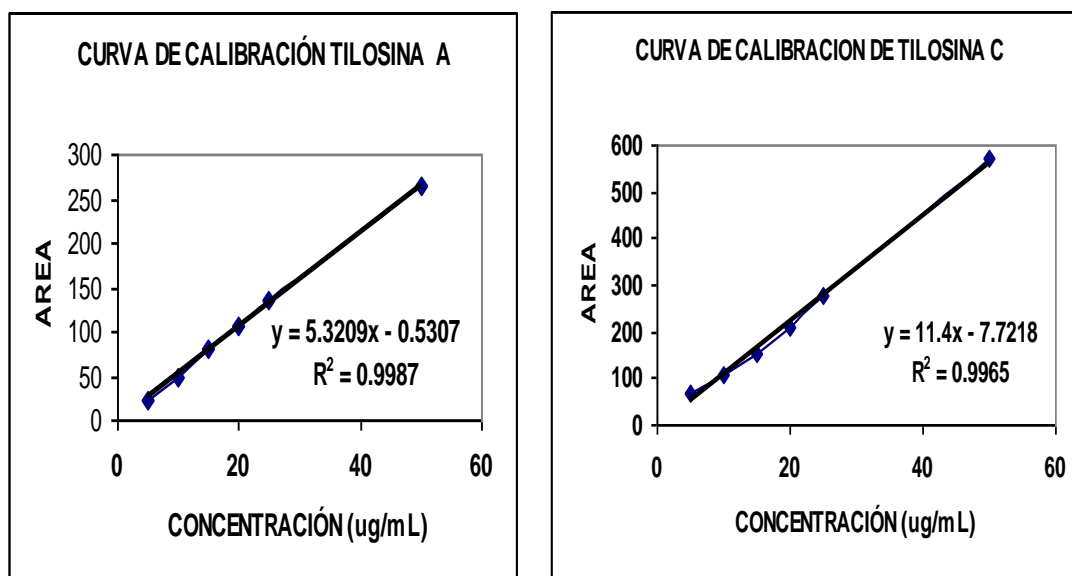


Figura 2 Curvas de calibración de Tilosina a y c

Validación del método. Para evaluar los parámetros de la validación del método; linealidad, precisión y exactitud del método, se siguió el procedimiento de calidad Pruebas de Desempeño clave CAGC7-06 del Laboratorio de Calidad del Agua.

Linealidad

La linealidad del método es la relación entre la respuesta del instrumento y las concentraciones conocidas de analito. La curva de calibración para tilosina se construyó con la relación de áreas de analito a estándar interno versus las concentraciones de analito.

Se realizó el análisis de regresión lineal para determinar la linealidad del método así como para generar la ecuación de la curva de calibración: $y = mx + b$, donde y es la relación de área, x la concentración, m la pendiente y b el intercepto.

LINEALIDAD Y RANGO

La linealidad de la respuesta se determinó, preparando soluciones con un contenido de 5, 10, 15, 20, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de tilosina a partir de una solución estándar de 100 $\mu\text{g/mL}$ de tilosina e inyectando cada una de ellas por duplicado en un sistema HPLC. Las áreas de pico medias obtenidas y los tiempos de retención se indican en la tabla 2. A partir de la pendiente de resultados se calcularon los coeficientes de intercepción y de correlación (r). Al aplicar el método propuesto, se siguió la linealidad en el rango de concentración de 5 a 50 $\mu\text{g/mL}$ y el coeficiente de correlación 0.99 indica una buena linealidad entre la concentración y el área pico (tabla 3). El valor de la pendiente indica la sensibilidad del método HPLC

Tabla 2 Areas promedio y tiempos de retención Tilosina c y A

Concentración Tilosina ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo retención	Area media Tilosina c	Tiempo retención	Area media Tilosina A
5	12,315	65,95	20,805	24,01
10	13,537	106,73	20,726	49,14
15	13,843	152,01	20,714	81,37
20	13,706	209,18	20,781	107,96
25	13,351	275,64	21,675	136,46
50	13,191	569,16	22,285	262,99

Tabla 3 Resultados de linealidad de Tilosina

Antibiótico	Pendiente Aprox. 1	Ordenada al origen	Coefficiente Correlación
Tilosina c	1.02	-0.4506	0.997
Tilosina A	1.00	-0.14199	0.998

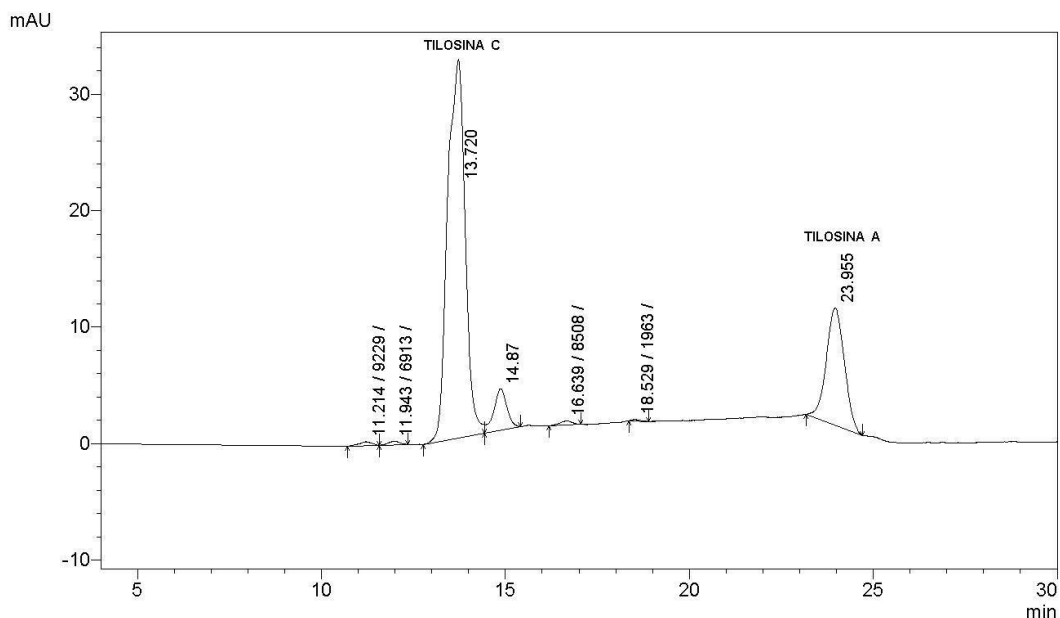


Figura 3 Cromatograma del estándar de Tilosina

Tabla 4 Resultados de precisión tilosina c

Concentración (µg/mL) Tilosina	Concentración (µg/mL) Tilosina c	Area del pico Tilosina c	% Recuperación
25	10.0718	122.54	40.29
25	9.9112	120.71	39.64
25	9.3832	114.69	37.53
25	9.8270	119.75	39.31
25	10.5893	128.44	42.36
25	10.3674	125.91	41.47
Promedio	10.02	122.01	40.10
Desv. estándar	0.42	4.84	1.70
Coef. Variación	4.19	3.97	4.24

Recuperación. La recuperación de un analito se refiere a la eficiencia de la extracción en un proceso analítico. Se informa como porcentaje de analito obtenido luego del proceso de extracción. Para su evaluación se prepararon por duplicado soluciones de tilosina a concentraciones de 25 µg/mL (tabla 4) y se analizaron según la metodología descrita. La eficiencia de la extracción se calculó mediante la comparación de las relaciones de área de las muestras extraídas y de los estándares no extraídos.

Los valores porcentuales de recuperación obtenidos se encuentran desde 37 a 42 %.

DISCUSION DE RESULTADOS

Un coeficiente de correlación mayor de 0.998 para la relación de áreas versus concentraciones, sugiere una fuerte relación entre la respuesta del instrumento y las concentraciones conocidas de tilosina. Un Coeficiente de variación menor del 10% indica que el instrumento es preciso bajo las condiciones del análisis establecidas. El coeficiente de variación promedio 3.98% muestra que el método es reproducible. El método de extracción alcanza un porcentaje promedio de recuperación del 40%. No se encontraron picos que interfirieran de manera significativa con la respuesta de tilosina.

CONCLUSIONES

Se desarrollo un método rápido y específico por HPLC-UV para la determinación de tilosina mediante extracción de fase sólida para analizar muestras de agua residual porcina.

REFERENCIAS

- Anónimo. (2006). AWMS methane recovery Project MX06-S-40, Puebla, México. UNFCCC Clean Development Mechanism Simplified Project Design Document for Small Scale Project Activity. Consulta a redes internacionales. Dirección electrónica: <http://cdm.unfccc.int/Projects/DB/TUEV-SUED1152289597.42/view>
- De Victorica A. J. y Galván G. M. (2005). Tratamiento y aprovechamiento de aguas residuales de granjas porcinas. Primera etapa. Consulta a redes internacionales. Dirección electrónica: http://proyectos.iingen.unam.mx/Proyectos_2005_2006/07/7.2.5.pdf
- Girón E. (2009). Porcicultura y Regulación Ecológica. Consulta a redes internacionales. Dirección electrónica: <http://www.sian.info.ve/porcinos/publicaciones/simposio/1este r.pdf>
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2009). Consulta a redes internacionales
- Ingerslev F. and Halling-Sorensen B. (2001). Biodegradability of metronidazole, olaquinox and tylosin and formation of tylosin degradation products in aerobic soil-manure slurries. *Ecotoxicology Environment Safety*. 48 (3): 311-320.
- Hirsch R., Ternes T. A., Haberer K. and Kratz K. L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*. 225: 109-118.
- Hu D., Fulton B., Henderson K. and Coats J. (2008). Identification of tylosin photoreaction products and comparison of ELISA and HPLC methods for their detection in water. *Environmental Science and Technology*. 42: 2982-2987.
- Liu H., Wang H. and Sunderland B. (2005). An isocratic ion exchange HPLC method for the simultaneous determination of flucloxacillin and amoxicillin in a pharmaceutical formulation for injection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 37: 395-398.
- Loke M., Ingerslev F., Halling-Sørensen B. and Tjørnelund J. (2000). Stability of Tylosin A in manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography. *Chemosphere*. 70: 759-765.
- Lotfin K. A., Henny C., Adams C. D., Surampali R. and Mormile M. R. (2005). Inhibition of microbial metabolism in anaerobic lagoons by selected sulfonamides, tetracyclines, lincomycin and tylosin tartrate. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24 (4): 782-788

A N E X O

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD
 MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

AREA: COMPUESTOS ORGANICOS

 TEMA: DETERMINACION DE TILOSINA EN
 MUESTRAS DE AGUA

1. OBJETIVO

Identificar y cuantificar tilosina en muestras de agua.

2. CAMPO DE APLICACIÓN

Este método cuantifica el fármaco tilosina en muestras de agua natural ya sea superficial, subterránea, agua potable, residual y residual tratada.

3. DEFINICIONES

Las definiciones de Blanco de vidriería, Blanco de método, Muestra sintética, Muestra duplicada y Muestra fortificada están en el procedimiento de control de calidad analítico CAQAC7-08.

4. FUNDAMENTO

La extracción en fase sólida es una forma de cromatografía digital (paso a paso) diseñado para extraer, distribuir, y/o adsorber uno o mas componentes de una fase líquida (muestra) dentro de una fase estacionaria (adsorbente o resina). Una sustancia adsorbente puede removerse del adsorbente paso a paso incrementando la fuerza de elución del eluyente (técnica de gradiente).

5. EQUIPO

 Cromatógrafo HPLC
 Sistema de extracción de fase sólida
 Concentrador de muestras
 Balanza analítica con sensibilidad de 0.0001 g

6. REACTIVOS y MATERIAL

 Estándar/tratado de tilosina
 Metanol grado HPLC
 Acetonitrilo grado HPLC
 Acetato de Amonio grado reactivo
 Nitrógeno
 Aire
 Acido
 Agua grado HPLC

Fecha de edición:	D	M	A	Elaboró a:	D	M	A	Revisión:	Clave:
	07	72	2010		07	72	2010	00	
Elaboró: M.C. MARINA ANALES FLORES				Revisó: M.C. MANUEL SANCHEZ GARZA				Aprobó: M. en C. ROSA RIVERA SALINAS	
								Hoja 1 de 5	

Forma CP-13

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD
 MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

AREA: COMPUESTOS ORGANICOS

 TEMA: DETERMINACIÓN DE TILOSINA EN
 MUESTRAS DE AGUA

MATERIAL

Columna Atlantis Waters 150x4.6 mm de 5 micras
 Cartuchos de extracción en fase sólida C18 ec 3mL/500 mg
 Viales ámbar de 1.8 mL
 Micro jeringas de 1000, 500, 100, 50, 25 μ L
 Papel aluminio

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES
6.1.1 Disolución madre de tartrato de tilosina

Pesar aproximadamente 100 mg de tartrato de tilosina en balanza analítica y colocarlo a un matraz volumétrico de 10 mL, aforar con metanol grado HPLC, guardar la disolución en un recipiente color ámbar a una temperatura de 4°C, para evitar su degradación.

6.1.1.1 Preparación de disoluciones para la curva de calibración

A partir de la disolución madre de tartrato de tilosina de aproximadamente 2160 μ g/mL, preparar las disoluciones para la curva de calibración de acuerdo al intervalo de trabajo necesario, por ejemplo concentraciones de 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 50 μ g/mL utilizando micro jeringas tomar los diferentes volúmenes y aforar con metanol grado HPLC.

6.1.1.2 Solución de acetato de amonio 20mM

Pesar aproximadamente 2.6818 g de acetato de amonio en balanza analítica, disolver con agua HPLC y aforar en matraz volumétrico de 1000 mL.

6.1.1.3 Fase Móvil (Acetato Amonio 20 mM Acetonitrilo 65%-35% v/v)

En un matraz volumétrico de 1000 mL colocar 650 mL de solución acetato de amonio 20 mM y 350 mL de acetonitrilo grado HPLC.

6.1.1.4 Acondicionamiento del cartucho de extracción en fase sólida C18.

Los cartuchos colocan en el dispositivo de extracción en fase sólida y se acondicionan con dos lavados de 2 mL de metanol HPLC y 2 mL agua HPLC. Posteriormente se pasa un litro de muestra utilizando una bomba de vacío y al terminar de pasarse lava con 2 mL

Fecha de edición:	D	M	A	Revisión:	D	M	A	Revisión:	Cabe:
	07	12	2010		07	12	2010	00	
Elabora:	Revise:			Aprueba:			Hoja 2 de 5		
NE. MARINA AVILES FLORES	NI. MANUEL SANCHEZ GARZA			M. en C. NEYRA RAHWEL SALINAS					

Form. CP-03

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD
 MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

AREA: COMPUESTOS ORGANICOS

 TEMA: DETERMINACIÓN DE TILOSINA EN
 MUESTRAS DE AGUA

De agua HPLC se deja secar el cartucho C18 con vacío por 30 minutos. Para la elución del antibiótico tilosina se agrega 1 mL de metanol grado HPLC y se colecta en viales ámbar de 1.8 mL, se inyecta al cromatógrafo de líquidos.

7. CONDICIONES DE LA MUESTRA

La muestra debe conservarse en frasco ámbar y refrigeración a 4 °C.

8. INTERFERENCIAS

Las interferencias se pueden agrupar en tres categorías:

1. Disolventes y/o reactivos
2. Material de laboratorio contaminado
3. Gas acarreador, columnas y/o detector contaminado

9. PRECAUCIONES
11 PROCEDIMIENTO

11.1 Establecer las condiciones de operación del equipo cromatógrafo de líquidos. (Temperatura ambiente 27°C)

11.2 A partir de la disolución madre detallada en la sección 6.1.1 preparar las disoluciones para la curva de calibración y leer mínimo tres lecturas.

11.3 En cada lote de 8 muestras incluir un blanco, duplicado de muestra, un estándar de concentración conocida de la disolución madre, una muestra fortificada.

11.4 Criterios de aceptación. El coeficiente de correlación de la curva debe tener un valor dentro del intervalo 0.98-0.99 y el porcentaje de variación entre duplicados no debe ser mayor del 10%.

11.5 Neutralizar con hidróxido de sodio concentrado grado industrial a pH \leq 7 todos los desechos que se generan entre inyección e inyección de cada una de las muestras de agua analizadas.

Fecha de edición:	D	M	A	Elabora:	D	M	A	Revisión:	Clave:	
	07	22	2020		07	22	2020	00		
Elabora: M.C. MARILYN ANILES FLORES				Revisó: M.C. MARQUEL SANCHEZ GARZA				Aprobó: M. C. E. NORAIA RAMIREZ SALINAS		Hojas de 5

Form. CP-03

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD
 MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

AREA: COMPUESTOS ORGANICOS

 TEMA: DETERMINACION DE TYLOSINA EN
 MUESTRAS DE AGUA

10. CÁLCULOS

- 10.1 Hacer la integración bajo la curva de las señales que coincidan en tiempo de retención con los estándares de tylosina.
- 10.2 Calcular del coeficiente de correlación estadísticamente y determinar la pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación.
- 10.3 Interpolan los valores de las áreas de los picos de las muestras en la curva de calibración de los estándares de tylosina
- 10.4 En caso de que alguna muestra presente analitos en concentraciones mayores a los ámbitos de la curva de calibración, se preparará una nueva curva de calibración que cubra el intervalo de concentración del analito en la muestra o se diluirá el extracto.

11. FORMATOS

No aplica.

12. BIBLIOGRAFIA

No aplica

13. REFERENCIAS

Hu D., Fulton B., Henderson K. and Coats J. (2008). Identification of tylosin photoreaction products and comparison of ELISA and HPLC methods for their detection in water. *Environmental Science and Technology*. 42: 2982-2987.

Liu H., Wang H. and Sunderland B. (2005). An isocratic ion exchange HPLC method for the simultaneous determination of flucloxacillin and amoxicillin in a pharmaceutical formulation for injection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 37: 395-398.

Loke M., Ingerslev F., Halling-Sørensen B. and Tjømelund J. (2000). Stability of Tylosin A in manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography. *Chemosphere*. 70: 769-765.

Fecha de edición:	D	M	A	Elaboró:	D	M	A	Revisión:	Cabe:
	07	12	2010		07	12	2010	03	
Elabora:	M.C. MARINA AVILES FLORES			Revisó:	M.C. MANUEL SANCHEZ ZAPATA			Aprobó:	M. en C. ROSA RAQUEL SALINAS
									Foja 4 de 5

Form. CP-03