

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Evaluación del desempeño de un método analítico para la determinación de fármacos en agua de consumo por cromatografía de líquidos con detección ultravioleta (HPLC-UV)

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Químicas con mención en Química Analítica

DAVID ALEJANDRO LEIVA ANDRADE

Quito, 2019

## CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas con Mención en Química Analítica, del señor David Alejandro Leiva Andrade ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

A handwritten signature in purple ink, appearing to be 'E. N. J. N.', written over a horizontal line.

M. Sc. Eliza Nait Jara Negrete

Directora de la Disertación

Quito, 12 de noviembre de 2019

*Detrás de cada éxito hay un esfuerzo. Detrás de un esfuerzo hay una pasión y detrás de una pasión hay personas con el coraje de intentarlo.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Madre Dolorosa por siempre ampararme en las situaciones difíciles y alegres de mi vida.

Agradezco a mi Madre por su perseverancia, su amor y apoyo en todas las etapas en mi vida universitaria. A mi Padre, por su ayuda económica y social, y en general a toda mi familia porque siempre estuvieron en todas las etapas de mi vida brindándome su apoyo y cariño incondicional en todo momento.

Agradezco a mis queridas profesoras Isabel Cipriani, Eliza Jara y Sofía Acosta por todo su apoyo en la parte experimental y escrita de mi tesis. Además de todas las valiosas observaciones y los excelentes conocimientos compartidos.

Agradecimiento especial a mi profesora Isabel Cipriani por haberme permitido trabajar en su proyecto de investigación, ya que con esto pude tener los recursos necesarios para realizar mi disertación. Además de las gestiones realizadas en la PUCE sede Nayón donde logré hacer gran parte de los experimentos.

Agradezco a mis amigos Nicole, Nicolay, Dome, Andrea, Denisse y Ricardo por su apoyo y amistad en toda la etapa de la universidad.

**TABLA DE CONTENIDOS**

LISTA DE TABLAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE ANEXOS .....	viii
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT .....	2
3. INTRODUCCIÓN .....	3
OBJETIVOS .....	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	9
4.1 SELECCIÓN DE LOS COMPUESTOS A ANALIZAR.....	9
4.2 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO .....	9
4.3 EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA POR SPE .....	11
4.4 EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL MÉTODO.....	11
4.5 MUESTREO EN IBARRA.....	13
4.6 ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	13
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
5.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO .....	15
5.2 EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL MÉTODO.....	17
5.3 ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	22
6. CONCLUSIONES .....	25
RECOMENDACIONES.....	26
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27
8. ANEXOS.....	31

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Estructura y propiedades de los compuestos emergentes estudiados
- Tabla 2. Condiciones cromatográficas para el análisis de Diclofenaco sódico y Sulfadiazina
- Tabla 3. Condiciones cromatográficas para el análisis de Acetaminofén y Cafeína
- Tabla 4. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) de los compuestos estudiados
- Tabla 5. Evaluación de la precisión y exactitud de los compuestos estudiados
- Tabla 6. Evaluación de la reproducibilidad del método en tres niveles de concentración
- Tabla 7. Resumen de los parámetros de desempeño de cada activo

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cromatogramas óptimos de los estándares de: A) acetaminofén y cafeína (100 ppm) B) diclofenaco sódico y sulfadiazina (50 ppm)

Figura 2. Curvas de calibración de la cafeína y del acetaminofén

Figura 3. Curvas de calibración del diclofenaco sódico y sulfadiazina

Figura 4. Cromatogramas de las muestras de agua de la ciudad de Ibarra obtenidas en los puntos 1 (A), 2 (B) y 3 (C)

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Clases de contaminantes emergentes y ejemplos de cada una

Anexo 2. Certificado del MSP de información de los medicamentos más consumidos en Ecuador

Anexo 3. Listado de los 30 medicamentos más consumidos a nivel nacional del año 2017

Anexo 4. Diagrama típico de un instrumento HPLC

Anexo 5. Puntos de muestreo de la ciudad de Ibarra

Anexo 6. Mediciones para la construcción de curvas de calibración durante la evaluación de linealidad del método

Anexo 7. Residuales de la regresión lineal (área vs concentración) de los compuestos estudiados

Anexo 8. Análisis de varianza de los residuales de la regresión lineal (área vs concentración) para determinar heterocedasticidad en los datos de los compuestos estudiados

## 1. RESUMEN

Las sustancias químicas presentes en las aguas residuales, como los productos farmacéuticos, pueden sobrevivir a los tratamientos de efluentes, y tienen el potencial de llegar a las aguas superficiales y subterráneas, fuentes esenciales de agua potable; los actuales procesos de potabilización no eliminan por completo este tipo de compuestos. Es importante analizar estos tipos de contaminantes porque no se tiene una información completa acerca de su distribución y/o concentración en las fuentes de agua que usa la población, además de los problemas de salud que estos pueden causar. En este trabajo, se realizó la evaluación de un método analítico a través de la estimación de cinco parámetros de desempeño (límite de detección y cuantificación, exactitud, precisión y linealidad). Se analizaron cuatro fármacos: acetaminofén, cafeína, diclofenaco sódico y sulfadiazina en el agua de consumo de la ciudad de Ibarra. Los fármacos fueron seleccionados de acuerdo con la revisión bibliográfica y la información de ventas anuales de fármacos del Ministerio De Salud Pública. Se utilizó la técnica de Cromatografía de líquidos de alto desempeño con detección ultravioleta (HPLC-UV, siglas en inglés), con la cual se obtuvieron valores de linealidad mayores de 0.995 para todos los activos; la precisión en los niveles bajos mostró la mayor variabilidad con coeficientes entre 2.66 y 10.0%, mientras que la exactitud en todos los niveles mostró valores de recuperación mayores a 93%. Los límites de detección y cuantificación estuvieron en orden de 0.02-0.04 y 0.05-0.13 mg/L, respectivamente, para todos los compuestos. Una vez comprobado el desempeño del método se analizaron tres muestras de agua potable de la ciudad de Ibarra las cuales fueron procesadas mediante Extracción en Fase Sólida (SPE siglas en inglés). Las muestras presentaron interferencias, evidenciando las limitaciones de la técnica y el método propuestos, por lo cual, se recomienda utilizar otra técnica más sensible y selectiva, para lograr analizar la alta diversidad de compuestos emergentes presentes en el agua.

**Palabras Claves:** HPLC-UV; SPE; Contaminantes emergentes, Compuestos farmacéuticos, Desempeño de métodos analíticos.

## 2. ABSTRACT

Chemical substances present in wastewater, such as pharmaceutical compounds, can survive effluent treatments, and have the potential to reach surface and groundwater, essential sources of drinking water; current potabilization processes do not completely eliminate these types of compounds either. It is important to analyze these types of pollutants because there is no complete information about their distribution and / or concentration in the sources of water used by the population, in addition to the health problems they may cause. In this study, the evaluation of an analytical method for this type of compounds was performed through the estimation of five performance parameters: limit of detection and quantification, accuracy, precision and linearity. Four pharmaceutical compounds (acetaminophen, caffeine, sodium diclofenac and sulfadiazine) were analyzed in drinking water from the city of Ibarra. Analytes were selected considering available information from literature and annual pharmaceuticals' sales report of the Ecuadorian Ministry of Public Health. High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection (HPLC-UV) was employed for analysis; linearity values were greater than 0.995 for all compounds. Precision at low concentrations showed the greatest variability, as coefficients between 2.66 and 10.0% were obtained, while accuracy at all levels showed recovery values greater than 93%. Detection and quantification limits were in the order of 0.02-0.04 and 0.05-0.13 mg/L, respectively, for all compounds. Once method performance was verified, three samples of drinking water from the city of Ibarra were analyzed, after undergoing a Solid Phase Extraction (SPE) procedure. Samples presented interferences, thus making evident the limitations of the proposed technique and method; therefore, it is recommended to use a more sensitive and selective technique, in order to analyze the high diversity of emerging compounds present in water.

**Keywords:** HPLC-UV; SPE; Emerging Pollutants, Pharmaceutical Compounds, Analytical Method Performance

### 3. INTRODUCCIÓN

Los compuestos emergentes son compuestos de origen natural o sintético que no son monitoreados comúnmente en el ambiente y tienen el potencial riesgo de ingresar al mismo y causar efectos adversos en la salud humana y animal (Naidu et al., 2016). Se los denomina contaminantes emergentes porque su presencia no se considera significativa en términos de distribución y/o concentración, por lo que pasan inadvertidos (Gil, Soto, Usma, & Gutiérrez, 2013). Una de las características de los compuestos emergentes es que no necesitan persistir en el ambiente para causar impactos negativos, ya que sus altas tasas de transformación u/o remoción se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente.

El estudio de los compuestos emergentes es de suma importancia, ya que su presencia puede aumentar la resistencia bacteriana y, considerando sus propiedades fisicoquímicas, como alta solubilidad en agua y baja biodegradabilidad, pueden representar un riesgo a la salud humana a través de la ingesta de agua de consumo (Gil, Soto, Usma, & Gutiérrez, 2013).

Según Rahman et al. (2009), existen varios tipos de contaminantes emergentes (Anexo 1) y sus fuentes principales son los hospitales, ganadería, industrias farmacéuticas, desechos domésticos y plantas de tratamiento de aguas residuales. Los productos farmacéuticos en sus diferentes variedades destacan como contaminantes emergentes. Su importancia en este ámbito ha sido señalada por la Organización Mundial de la Salud, que a través de una extensa revisión de literatura científica (Jelić et al., 2012) indica que muchos estudios han confirmado la presencia de productos farmacéuticos en aguas residuales y efluentes, y que éstas han sido identificadas como una fuente importante de productos farmacéuticos en el agua potable. Esto se debe a que las tecnologías actuales de potabilización no contemplan la eliminación de este tipo de sustancias, como lo demuestra Furlong et al. (2017) en un amplio estudio realizado en Estados Unidos por la Agencia de Protección Ambiental (EPA, siglas en inglés) y el Servicio Geológico (US-GS, siglas en inglés).

Cuando un fármaco es ingerido, ocurre el proceso LADME (liberación, absorción, administración, distribución, y metabolización) dentro del organismo. Los fármacos pueden ser administrados por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular o por vía oral. Independientemente de la forma farmacéutica del fármaco, este se distribuye en los líquidos intersticial e intracelular. El fármaco actúa de forma inmediata en los órganos como el hígado, riñones y encéfalo, mientras que la llegada a músculos, casi todas las vísceras, piel y grasa es mucho más lenta. El gasto

cardíaco, la corriente sanguínea regional y el volumen hístico son uno de los elementos que rigen la rapidez de llegada y la potencia cantidad de fármaco en los tejidos. Los fármacos, luego de su proceso en el organismo, se eliminan sin cambios o se transforman en sus metabolitos a través del proceso de extracción. Los fármacos son compuestos químicos de diferentes polaridades. Los compuestos polares son eliminados con mayor facilidad que las sustancias de gran liposolubilidad, es por este motivo que los medicamento liposolubles no son eliminados fácilmente, sino hasta que se metabolizan a compuestos más polares. Existen varias vías donde se excreta el fármaco. Si la excreción se da por los riñones quiere decir que la absorción en el organismo ha sido con totalidad, mientras que si son excretados por las heces quiere decir que no han sido han tenido una adecuada absorción. Otra vía de excreción es por la leche materna y puede causar posibles efectos farmacológicos no buscados en el lactante (Goodman et al., 2003).

En estudios del agua de consumo se han encontrado a niveles traza (ng/L) algunos fármacos como ibuprofeno, diclofenaco o carbamazepina. En el año 2013 se publicó un estudio realizado en China determinando productos farmacéuticos en el agua del grifo; se encontraron 17 fármacos en el 89% de las muestras tomadas; 13 muestras presentaron niveles de riesgos bajos, sin embargo, 4 muestras presentaron un cociente de riesgo alto para lactantes y niños (Leung, 2013). En los Estados Unidos la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y el Servicio Geológico (USGS), realizaron un estudio en el agua tratada y no tratada de las plantas de tratamiento de agua potable. El estudio fue dividido en dos fases: la primera fase se llevó a cabo en el año 2008 donde se analizaron 24 fármacos; de los 24 fármacos 11 fueron detectados. En la segunda fase se analizaron 118 fármacos en las mismas plantas de tratamiento. Se encontraron fármacos en los dos casos, aunque la cantidad y concentración de fármacos en el agua tratada fue menor. En la segunda fase se cuantificaron 37 productos farmacéuticos donde presentaron niveles de concentraciones medias inferiores a 113 ng/L (Furlong et al., 2017)

En América Latina se han realizado estudios puntuales en aguas residuales encontrando concentraciones altas de fármacos como cafeína, diclofenaco, ibuprofeno, atenolol y carbamazepina, entre otros (Marino, 2013). En el año 2013 se realizó un estudio en Ecuador, a lo largo de la cuenca hidrográfica de los ríos San Pedro-Guayllabamba-Esmeraldas y las principales corrientes de contaminación del agua durante el verano. Cabe mencionar que en estos ríos desembocan las aguas residuales de la ciudad de Quito, no obstante, el Esmeraldas es utilizado para suministrar agua potable a la provincia y ciudad del mismo nombre. Los contaminantes principales fueron carbamazepina y acesulfame; además, se encontraron otros

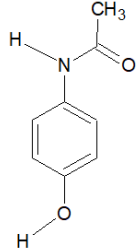
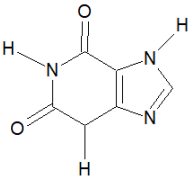
compuestos como cafeína, sulfametoxazol, venlafaxin, o-desmetilvenlafaxin y estrógenos esteroideos (Voloshenko-Rossin, 2015). Con base en estos resultados, se considera que es posible que existan otras ciudades con problemáticas de compuestos emergentes similares a la de Esmeraldas, donde se tienen claros indicios de contaminación de la fuente de agua que abastece a la ciudad.

Para el presente estudio se escogieron 4 compuestos de interés (Tabla 1) con base en la revisión bibliográfica y en las estadísticas de los productos de mayor consumo a nivel nacional proporcionadas por el Ministerio de Salud (Anexo 2).

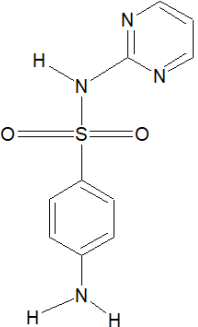
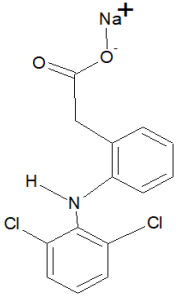
Considerando la limitada información que existe en el país acerca de los contaminantes emergentes y específicamente de los compuestos farmacéuticos, es importante iniciar con su análisis en toda fuente de agua, sobre todo en aguas de consumo, ya que si estas sustancias tienen contacto con otros compuestos emergentes, y si se produce el fenómeno de bioacumulación, se podría potenciar el peligro de estas sustancias (Leung et al., 2013). Es por ello que, en este estudio se plantea el desarrollo de un método analítico para la determinación de diclofenaco, acetaminofén, cafeína y sulfadiazina en muestras de agua potable y la evaluación de su aplicabilidad con muestras reales provenientes de la ciudad de Ibarra.

Ibarra cuenta con una planta de tratamiento de agua potable el cual suministra agua a la mayoría de la población. Esta planta se denomina Caranqui, igual que el río, el cual capta varios efluentes, entre ellos y el más importante, el proveniente de la Reserva Natural de Guaraczapas. El agua es tratada por aireación y cloración al llegar a la planta potabilizadora (Emapa, 2016). En el año 2002, el agua potable de Ibarra fue contaminada por aguas servidas. Mencionan que las aguas servidas se desbordaron y se mezclaron con el líquido tratado. Producto de esto existen casos de 1000 personas infectadas y 1 persona muerta por problemas intestinales provocadas por la bacteria *Shigella* que se propaga a través de las heces fecales (La Hora, 2002). Con este antecedente, y dado el limitado tratamiento que se brinda al agua cruda, hay la posibilidad de la presencia de compuestos farmacéuticos en el agua potable de la ciudad.

**Tabla 1. Estructura y propiedades de los compuestos emergentes estudiados**

Compuesto/ Nombre Genérico	Estructura Química	Nombre IUPAC	Nombres Comerciales	Usos	Metabolismo	Propiedades Fisicoquímicas
Acetaminofén / Paracetamol		4-hidroxí-acetanilida	Tilenol ® Tempra ® Tanadol ® FeverALL ® Finalín ®	Es un analgésico y antipirético para-aminofenólico que está indicado para el tratamiento a corto plazo del dolor moderado (Hiendrawan, 2016).	El paracetamol se metaboliza principalmente en el hígado y es eliminado por la orina, aproximadamente el 90% en 24 horas	Sólido cristalino. Solubilidad en agua de 14 mg/mL. Soluble en alcohol e insoluble en benceno y éter de petróleo.
Cafeína		1,3,7-trimetil-xantina	Finalín ® Analgilasa ® Cafiaspirina ®	Se utiliza en algunos medicamentos como psicoestimulante, analgésico y broncodilatador (Lozano et al., 2007)	Se absorbe por el tracto intestinal de forma rápida y completa, presentando una biodisponibilidad del 100%	Sólido blanco. La solubilidad en agua es de 2.2 mg/mL; solubilidad en alcohol de 1.2 mg/mL soluble en cloroformo y poco soluble en éter dietílico (Vuong et al., 2014)

**Tabla 1. Estructura y propiedades de los compuestos emergentes estudiados (continuación)**

Compuesto/ Nombre Genérico	Estructura Química	Nombre IUPAC	Nombres Comerciales	Usos	Metabolismo	Propiedades Fisicoquímicas
Sulfadiazina		4-amino-N- pirimida 2-il bencono- sulfonamida	Sulfadiazina ® Vannier ® Silvadene ®	Es usada para la prevención y el tratamiento de la fiebre reumática, la meningitis e infecciones como de las vías urinarias, malaria, ciertas infecciones de oído y toxoplasmosis (Goodman, 2003).	En cuanto a su absorción, en su mayoría, lo hacen rápidamente en el estómago e intestino, especialmente delgado. La fracción de absorción oscila entre el 70 y 90%	Sólido. Solubilidad en agua de 77 mg/L. Muy soluble en soluciones de amonio e insoluble en alcohol, cloroformo.
Diclofenaco Sódico		2-{2-[(2,6- diclorofenil) amino]fenil }acetato de sodio	Cataflan ® Voltaren ® Dolo-voltaren ® Dolo- neurobion ®	Su actividad es analgésica, antipirética y antiinflamatoria (Goodman, 2003).	Después de ser administrado, su absorción es rápida, se metaboliza en el hígado y es excretado por la bilis en un 35% y por la orina en un 65%	Polvo blanco. Solubilidad en agua de 0.00482 mg/mL (Drugbank, 2019). Fácilmente soluble en metanol, soluble en alcohol, prácticamente insoluble en éter E.E.U.U (2018).

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar un método analítico mediante la estimación de 5 parámetros de desempeño para la determinación de fármacos en agua de consumo de la ciudad de Ibarra.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Optimizar la separación cromatográfica mediante HPLC-UV para la cuantificación de fármacos en el agua de consumo
- Evaluar el desempeño del método analítico en términos de: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión y exactitud.
- Comprobar la utilidad del método mediante la determinación de compuestos farmacéuticos en muestras reales obtenidas en la ciudad de Ibarra.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 SELECCIÓN DE LOS COMPUESTOS A ANALIZAR

Los compuestos fueron seleccionados por 2 formas: revisión bibliográfica e información en el Ministerio de Salud Pública. Para la revisión bibliográfica, se verificó los más encontrados en agua potable y agua superficial y con la información obtenida del Ministerio de Salud Pública (Anexo 2), se verificó las estadísticas de los fármacos más consumidos en el país. Adicionalmente, se consideró la disponibilidad de estándares, con lo cual, los compuestos para estudio fueron los siguientes: paracetamol, cafeína, sulfadiazina y diclofenaco.

### 4.2 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

La cromatografía es una técnica de separación que consiste en procedimientos de “separación fraccional”, en donde mezclas complejas pueden ser separadas a pesar de tener componentes similares, debido a que se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra móvil (Robinson et al., 2014). Si la muestra contiene componentes de diferentes polaridades, y por la columna está circulando fase móvil de una determinada polaridad, un componente migrará por la columna más rápido que el otro. En el Anexo 3 se muestra un diagrama típico de un instrumento HPLC. La detección de los compuestos a medida que salen (eluyen) de la columna se puede realizar de varias formas, siendo una de las más comunes, la espectrofotometría ultravioleta-visible a través de los detectores UV-Vis o DAD (arreglo de diodos, siglas en inglés). En ese caso, se mide la cantidad de energía que absorbe o emite una sustancia química en función de su longitud de onda (Skoog et al., 2010).

Para la optimización del método cromatográfico se realizaron varias pruebas con los analitos propuestos variando la concentración y las condiciones cromatográficas para así tener señales estables y cuantificables. Se evaluó la proporción y concentración de la fase móvil, la longitud de onda, el flujo, el volumen de inyección, el tiempo de corrida.

Posteriormente, a partir de soluciones stock de 100 ppm en metanol (Merck, grado HPLC), preparadas por disolución del estándar, se elaboraron soluciones de trabajo de 0.2, 0.4, 0.5, 0.8 y 1 ppm para los estándares de Cafeína y Paracetamol, y de 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2 ppm para Sulfadiazina y Diclofenaco Sódico. Todas las soluciones fueron filtradas (Millipore Millex-GV PVDF 0.22 µm) previa colocación en viales (Waters 12x32 mm PTFE/SILICONA) para su análisis por HPLC-UV (Bomba Binaria Waters 1525; Detector UV-Vis Waters 2489; Autosampler Waters 2707) con una columna Atlantis dC18 (4.6 x150 mm; 5 µm). La fase móvil

fue filtrada (HV-Durapore EM PVDF 47 mm de diámetro; 0.45  $\mu\text{m}$ ) y desgasificada previamente. En las Tablas 2 y 3 se describen las condiciones cromatográficas empleadas para el análisis.

**Tabla 2. Condiciones cromatográficas para el análisis de Diclofenaco Sódico y Sulfadiazina**

Parámetros	Condiciones	
Fase Móvil	A	Ácido Acético 1% (25%)
	B	Metanol (75%)
Tiempo de retención	Diclofenaco Sódico	2.0 min
	Sulfadiazina	3.8 min
Flujo		1.0 mL/min
Volumen de inyección		25 $\mu\text{L}$
Tiempo de corrida		4.5 minutos
Longitud de onda		273 nm
Modo de elución		Isocrático

**Tabla 3. Condiciones cromatográficas para el análisis de Acetaminofén y Cafeína (Hernández, 2015)**

Parámetros	Condiciones	
Fase Móvil	A	Ácido Acético 4% (75%)
	B	Metanol (25%)
Tiempo de retención	Paracetamol	3.5 min
	Cafeína	5.5 min
Flujo		1.0 mL/min
Volumen de inyección		25 $\mu\text{L}$
Tiempo de corrida		6.0 minutos
Longitud de onda		254 nm
Modo de elución		Isocrático

### 4.3 EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA POR SPE

Para la extracción de los analitos por SPE, se utilizó una bomba al vacío (Millipore, WP6111560), un manifold (dimensiones 27 x 17 x 9.5 de cristal de alta calidad) y cartuchos Waters OASIS HLB de 6 mL con un flujo de 10 mL/min para todos los pasos de la extracción. Los cartuchos fueron acondicionados empleando 4 mL de metanol (Merck, grado HPLC) y 6 mL de agua tipo 1; posteriormente, se cargaron 500 mL de muestra, luego se dejó secar al vacío por 2 minutos, y finalmente se eluyó con 6 mL de metanol en un tubo de vidrio. El extracto se evaporó bajo un equipo de centrifugación (Thermoscientific, Speedvac DNA130) se concentró a sequedad y luego se aforaron con metanol a 0.5 mL, el cual fue filtrado y transferido a un vial para su análisis por cromatografía. Esta metodología se obtuvo de Schultz & Furlong (2008).

### 4.4 EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL MÉTODO

Esta etapa consiste en una confirmación del método analítico aplicado en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, para determinar los criterios de aceptación y rechazo orientados a la precisión y exactitud que se han obtenido. Si bien existen varios parámetros que se pueden tomar en cuenta, en este caso se consideraron los siguientes:

**Límites de detección y cuantificación:** se define como la menor cantidad de analito en una muestra que puede determinarse con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones del experimento establecidas, mientras que el límite de detección se define como la menor cantidad de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones del experimento indicadas.

Para determinar los límites de detección y cuantificación, se realizaron 10 lecturas con las concentraciones más bajas para cada fármaco; para la cafeína y paracetamol se usó un estándar de concentración de 0.1 ppm, mientras que, para el diclofenaco y la sulfadiazina, se usó un estándar de concentración de 0.2 ppm. Las concentraciones dichas anteriormente fueron establecidas por una serie de pruebas con diluciones sucesivas hasta llegar a una concentración donde ya no se podía integrar el pico, por lo tanto, ya no era posible su cuantificación. Posteriormente, se aplicaron las siguientes fórmulas (Dosal, 2008)

$$\text{Límite de Detección: } C_{LD} = 3 * \sigma \quad (1.1)$$

$$\text{Límite de Cuantificación: } C_{LQ} = 10 * \sigma \quad (1.2)$$

Donde:  $C_{LD}$  = Concentración del límite de detección (mg/mL)  
 $C_{LQ}$  = Concentración del límite de cuantificación (mg/mL)  
 $\sigma$  = desviación estándar de las mediciones

**Precisión:** la precisión se define como la concordancia entre un grupo de valores de una concentración dada, mientras que la exactitud es la concordancia existente con el valor verdadero o certificado. Se puede evaluar como reproducibilidad (dos variables) o repetibilidad (una variable), y se usa la siguiente ecuación:

$$\%RSD = \frac{\sigma}{x} * 100 \quad (1.3)$$

Donde:  $\%RSD$  = Desviación de estándar relativa  
 $X$  = Promedio de las repeticiones en cada nivel  
 $\sigma$  = desviación estándar de las repeticiones en cada nivel

**Exactitud:** la exactitud es la concordancia existente con el valor verdadero o certificado. Para determinar la exactitud de usó la siguiente ecuación:

$$\%Recuperación = \frac{x}{C.real} * 100 \quad (1.4)$$

Donde:  $\%Recuperación$  = % de recuperación de cada concentración  
 $X$  = Promedio de las repeticiones en cada nivel  
 $C.real$  = Concentración real de cada nivel

Para la exactitud y precisión se emplearon concentraciones de nivel bajo (0.1-0.2 ppm), medio (0.5 ppm) y alto (1-2 ppm). No se empleó SPE, es decir, las soluciones se midieron directamente en HPLC. Los criterios de aceptación se establecieron como: 90-110% de recuperación y  $\%RSD \leq 10$  respectivamente (Remache Tixe, 2013).

**Linealidad:** consiste en determinar el rango de concentración en el que el analito de interés va a ser cuantificado, considerando que se inicia con el límite de cuantificación inferior. Para determinar la concentración del analito se evalúa la linealidad de la curva de calibración por medio de estándares, cada patrón debe ser analizado al menos 3 veces (Harris, 2007). En la linealidad es importante comprobar el coeficiente de regresión ( $R^2$ ), que debe ser superior a

0.995, seguido de su respectiva regresión lineal (Díaz, 2002). La ecuación general de una línea recta viene dada de la siguiente manera:

$$y = mx + b \quad (1.4)$$

Donde:  $y$  = señal de respuesta

$m$  = pendiente

$x$  = concentración

$b$  = intercepto

Para este parámetro se realizaron 5 curvas de calibración a 5 niveles de concentración diferentes. Todas las soluciones, madre y diluciones, fueron preparadas en metanol (Merck, grado HPLC). Se utilizaron pipetas de volumen variable (Glassco) para la toma de alícuotas de cada estándar.

#### 4.5 MUESTREO EN IBARRA

Se llevó a cabo la toma de las muestras en diferentes zonas de Ibarra. Se realizó un muestreo aleatorio estratificado, tomando 3 muestras en cada una de las 5 diferentes zonas (Anexo 4), para obtener muestras representativas. Para esto, se dejó pasar agua por el suministro directo del agua potable (grifos, mangueras, entre otras), entre 5-10 segundos, luego con una probeta, se midió 500 mL de muestra y se trasvasó a una botella de 500 mL de color ámbar. A continuación, se determinaron algunos parámetros *in situ*: turbidez, cloro, pH, conductividad y temperatura. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas en una nevera portátil con hielo (4°C aproximadamente) hasta su posterior traslado al laboratorio y procesamiento.

Se tomaron un total de 15 muestras, pero se analizaron únicamente tres debido a que no existió una separación eficiente por las posibles interferencias (Figura 4).

#### 4.6 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para el análisis de resultados, se emplearon pruebas de significancia (t y F) para verificar el cumplimiento de los criterios de aceptación del método: ausencia de diferencias significativas entre los valores medidos en el mismo día y en diferentes días, además, se verificaron los criterios de aceptación de 0.995 en el coeficiente de correlación, 90-110% para la exactitud y desviación

estándar relativa menor del 10% para la precisión. Todos los cálculos se llevaron a cabo en el programa Microsoft Excel.

Adicionalmente, se efectuó un análisis de residuales para verificar la linealidad. Este análisis permite verificar si el modelo de regresión se cumple, es decir si la relación entre variables en el eje X y Y es lineal, a través de la evaluación del error en cada punto del modelo; si hay varianza constante (homocedasticidad), el modelo lineal es correcto. El análisis se puede realizar gráficamente o en forma analítica a través de pruebas de hipótesis (F O ANOVA) (Díaz, 2005).

En cuanto a los resultados de cromatografía, se realizaron inspecciones visuales para verificar la simetría y resolución de los picos. Cuando fue necesario, se realizó la estimación de la resolución a través de la ecuación 1.5 (Quiñones-García et al., 2015). Se consideró que valores iguales o mayores a 1.5 indicaban una resolución óptima para dos picos adyacentes.

$$R_s = \frac{2 (TrB) - (TrA)}{W_a + W_b} \quad (1.5)$$

Donde:  $R_s$  = Resolución

$TrB$  = Tiempo de retención del pico B, en minutos

$TrA$  = Tiempo de retención del pico A, en minutos

$W_a$  = Anchura del pico A en su base, en minutos

$W_b$  = Anchura del pico B en su base, en minutos

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

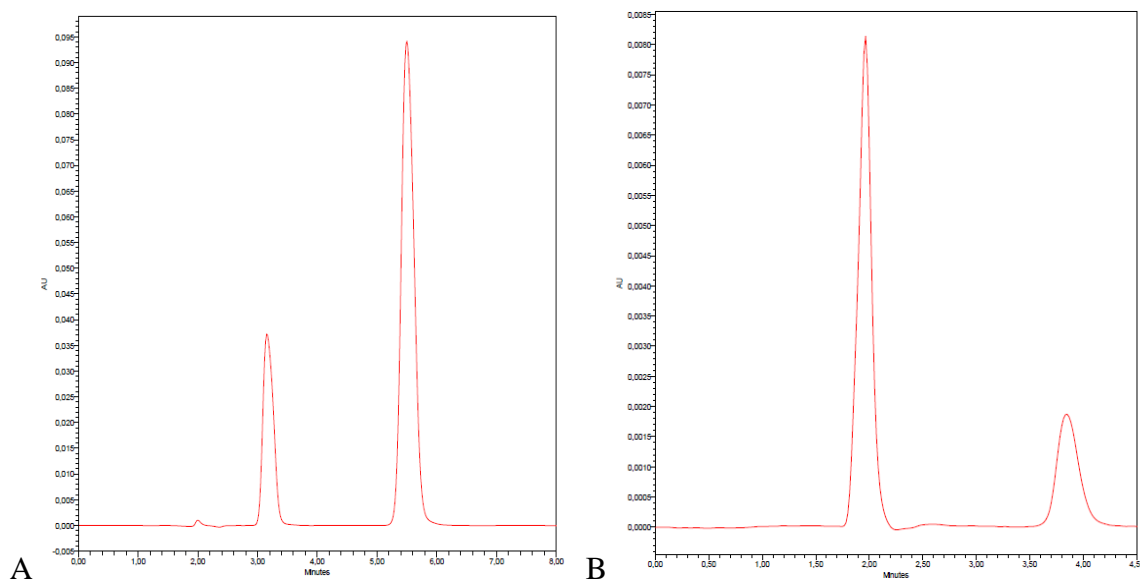
Para la optimización de los métodos cromatográficos, primeramente, se realizó una corrida en modo gradiente de los 4 fármacos durante 10 minutos en 2 longitudes de onda cambiando las proporciones de los solventes A-B en la fase móvil. En esta corrida, se observó que los picos coeluían a los 5 minutos y no se podía visualizar correctamente cada uno. La razón de la coelución es por la polaridad. Al tratarse de compuestos con una polaridad similar entre ellos, no va a haber mayor diferencia en el tiempo de retención por lo que no es factible analizar todos en una sola corrida.

Luego se decidió realizar 2 corridas diferentes, 2 fármacos en cada corrida, determinando así las condiciones adecuadas. La fase móvil para la corrida de la cafeína y acetaminofén fue de fase A: ácido acético 4% (75%); fase B: metanol (25%) y su longitud de onda fue de 254 nm. Mientras que la corrida de la sulfadiazina y diclofenaco sódico, se usó una fase A de ácido acético 1% (25%); fase B: metanol (75%) y su longitud de onda fue de 273 nm. Los demás parámetros se indican en las Tablas 2 y 3, con los cuales se obtuvo un programa de elución óptimo para los dos pares de compuestos, donde se observó una buena resolución. En el caso de la cafeína y el acetaminofén, los parámetros más influyentes fueron la concentración de fase móvil A y la longitud de onda; al aumentar la concentración de la fase móvil A, se podía visualizar de mejor manera los picos de cada fármaco y al variar la longitud de onda, se podía tener una señal adecuada de los picos y evitar valores negativos. Por otra parte, en el caso del diclofenaco sódico y la sulfadiazina, los parámetros más influyentes fueron: proporción de fase móvil y la longitud de onda. Al cambiar de proporción, se podían visualizar picos más resueltos y al variar la longitud de onda se tenían picos no negativos.

Como se ilustra en la Figura 1A, se obtuvieron picos resueltos y simétricos del acetaminofén y de la cafeína eluyendo en los minutos 3.5 y 5.5, respectivamente. Un pico resuelto es el resultado de una óptima separación definido por su área, altura y ancho en la línea base. Se puede establecer mediante una ecuación matemática (Ecuación 1.5) donde intervienen los tiempos de retención y los anchos correspondientes en las bases de los picos obtenidos extrapolando los lados relativamente rectos de los picos hasta la línea de base. Se obtuvo un valor de 2.86 calculando la resolución del cromatograma de la Figura 1A.

En la misma figura 1B, se muestran los picos de diclofenaco sódico y sulfadiazina, igualmente resueltos y simétricos, con tiempos de retención de 2.0 y 3.8 minutos, respectivamente. Se puede observar que únicamente el pico correspondiente al diclofenaco sódico tiene un ligero ensanchamiento, lo cual es indicativo de una dinámica de retención diferente a los otros compuestos, en particular a la sulfadiazina. La resolución del cromatograma 1B es de 2.84.

El orden de elución de los compuestos es el resultado de la interacción de la muestra con las fases estacionaria y móvil; se trabajó con una columna de fase reversa y una fase móvil de característica polar, por lo cual se dedujo que los compuestos que tengan una polaridad mayor van a salir antes que los compuestos que tengan una polaridad menor. Esto se puede evidenciar en la Figura 1, ya que el acetaminofén y diclofenaco sódico (índices Kovats: 1514 y 2495) son más polares que la cafeína y sulfadiazina (índices Kovats: 1795 y 2523), por lo cual eluyen primero en sus respectivos programas cromatográficos.



**Figura 1. Cromatogramas óptimos de los estándares de: A) acetaminofén y cafeína (100 ppm) B) diclofenaco sódico y sulfadiazina (50 ppm)**

Bajo las condiciones necesarias para la obtención de los cromatogramas de esta figura, se realizaron los ensayos de la evaluación de desempeño del método.

## 5.2 EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL MÉTODO

### 5.2.1 LINEALIDAD

Como se muestra en la Figuras 2 y 3, se tiene una relación lineal positiva fuerte para todos los activos. El coeficiente de correlación mostrado en las gráficas pertenece al promedio de las 5 curvas de calibración y se evidencia que cumple con el criterio de aceptación de la linealidad con valores  $\geq 0.995$ . Los valores de las áreas de cada compuesto se indican en el Anexo 5.

En la Figura 2, se puede observar que las mediciones son muy similares entre sí en el caso del acetaminofén, y en la cafeína existen algunos valores que se alejan de la línea de tendencia. Por otra parte, en la Figura 3, para las mediciones de diclofenaco sódico se tiene una mayor dispersión de las mediciones. Se observa que en los niveles 1 y 2 existe mayor dispersión que los demás niveles, lo cual indica que a concentraciones altas del compuesto de diclofenaco sódico el equipo tiende a hacer inestable.

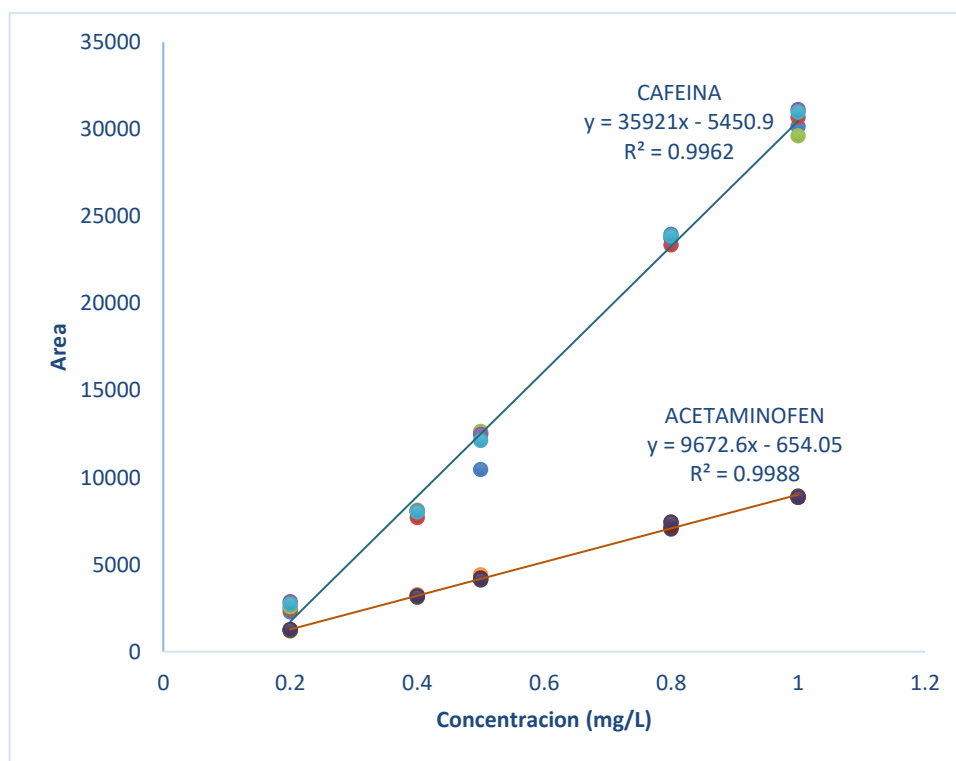
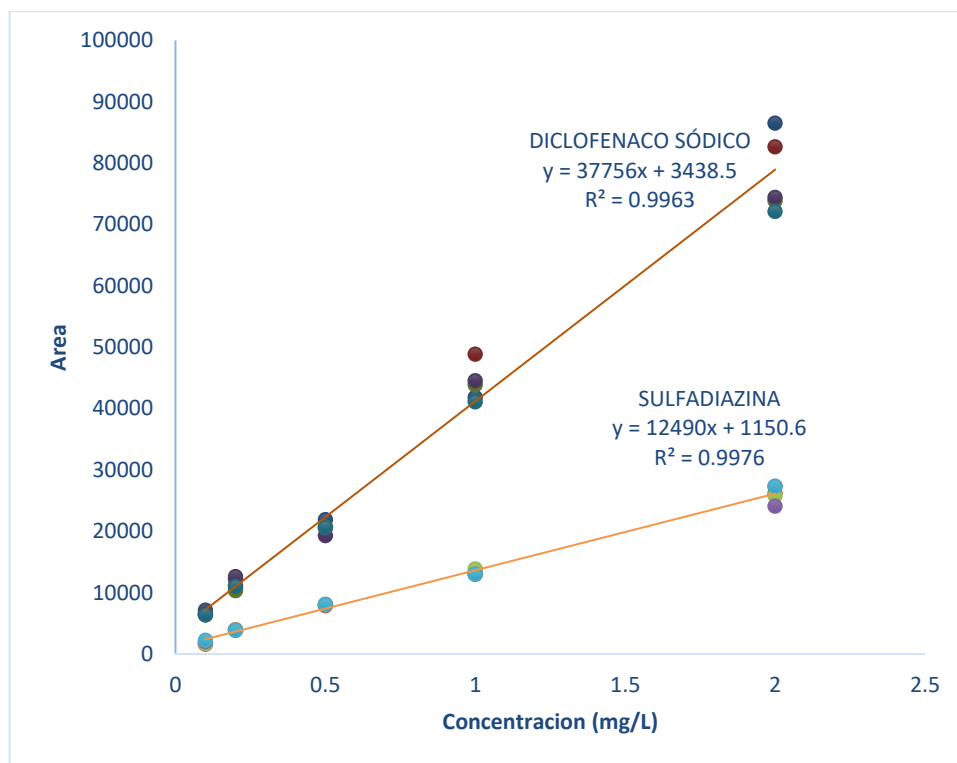


Figura 2. Curvas de calibración de la cafeína y del acetaminofén



**Figura 3. Curvas de calibración del diclofenaco sódico y sulfadiazina**

En razón de estas observaciones, se realizó un análisis de heterocedasticidad, para constatar que la variabilidad del error es constante en todo el rango lineal, y, por tanto, que la predicción de concentración (producto de la aplicación de la ecuación de regresión) es válida. Ellison, Barwick y Duguid (2009) establecen que, para este efecto, se debe verificar la linealidad del método mediante el análisis de residuales vía inspección gráfica y una prueba de hipótesis, como el ANOVA (análisis de varianza).

En los Anexos 7 y 8 se muestran los resultados del análisis de residuales efectuado para cada compuesto. Al comparar el valor de F calculado con el F crítico, se observa que no existe heterocedasticidad para ningún activo. Con este resultado, se demuestra que la variabilidad del error es constante en todo el rango lineal y que el modelo aplicado es válido en el rango escogido (puntos de concentración) para todos los activos.

## 5.2.2 LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

**Tabla 4. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) de los compuestos estudiados**

<b>Cafeína</b>	<b>Acetaminofén</b>	<b>Sulfadiazina</b>	<b>Diclofenaco Sódico</b>
Valor ensayado: 0.2 mg/L		Valor ensayado: 0.1 mg/L	
Valores medidos (mg/L)		Valores medidos (mg/L)	
0.19	0.19	0.09	0.11
0.19	0.20	0.12	0.10
0.20	0.20	0.10	0.10
0.19	0.19	0.09	0.10
0.20	0.20	0.09	0.11
0.20	0.20	0.10	0.11
0.19	0.20	0.09	0.11
0.20	0.20	0.11	0.10
0.20	0.22	0.10	0.11
0.19	0.23	0.10	0.11
<b>LC:0.05; LD: 0.02</b>	<b>LC: 0.13; LD: 0.04</b>	<b>LC:0.09; LD: 0.03</b>	<b>LC:0.05; LD: 0.02</b>

Como se muestra en la Tabla 4, se evaluaron los parámetros de límite de detección y cuantificación de los 4 activos. Se observa que todos los valores medidos son cercanos al valor real. Los compuestos cafeína y diclofenaco sódico son los que tienen los valores más bajos en los límites de detección y cuantificación. Esto se debe a que, para ambos activos los valores de las pendientes (sensibilidad) de las curvas de calibración, son mayores a las pendientes de los otros activos. Según Dosal (2008) la sensibilidad mide la capacidad para discriminar entre pequeñas diferencias la concentración del analito; es decir que, a mayor sensibilidad el instrumento puede diferenciar pequeños cambios y realizar las mediciones con mayor exactitud, por lo cual, es un parámetro directamente relacionado con los límites de detección y cuantificación.

## 5.2.3 PRECISIÓN Y EXACTITUD

Como se muestra en la Tabla 5, se evaluaron los parámetros de precisión y exactitud de todos los activos en los dos días. Se observa que la precisión, en los niveles inferiores es menor a los demás, representada por un coeficiente de variación (%RSD) mayor, lo que a su vez indica una variabilidad más alta entre mediciones; los niveles inferiores presentan valores mayores de %RSD porque estos presentan una concentración pequeña y, por ende, una mínima variación

afecta a la medición de forma proporcionalmente mayor. Esto se puede evidenciar en el nivel bajo, del día uno de la sulfadiazina que tiene un %RSD de 10. De igual manera, para la exactitud, en los niveles inferiores, se presentan valores más alejados al valor real. Sin embargo, en todos los casos se cumplieron los criterios de aceptación previamente establecidos.

**Tabla 5. Evaluación de la precisión y exactitud de los compuestos estudiados**

Parámetro	Concentración obtenida (mg/L)			Exactitud (% recuperación)			Precisión - Repetibilidad (%RSD)			
	Nivel	Alto	Medio	Bajo	Alto	Medio	Bajo	Alto	Medio	Bajo
Cafeína	Dia 1	1.00	0.52	0.22	100.3	104	108.3	0	0	2.66
		1.00	0.52	0.2						
		1.00	0.52	0.21						
	Dia 2	1.00	0.51	0.22	100.3	102.7	108.3	0.58	1.12	2.66
		1.01	0.51	0.22						
		1.00	0.52	0.21						
Acetaminofén	Dia 1	1.01	0.52	0.22	100.3	104.0	108.3	0.6	0.0	2.7
		1.00	0.52	0.22						
		1.00	0.52	0.21						
	Dia 2	1.00	0.51	0.22	100.3	102.7	108.3	0.6	1.1	2.7
		1.01	0.51	0.22						
		1.00	0.52	0.21						
Diclofenaco sódico	Dia 1	1.95	0.52	0.1	98.0	102.7	103.3	0.5	2.2	6.2
		1.96	0.52	0.1						
		1.97	0.5	0.11						
	Dia 2	1.93	0.5	0.1	97.3	101.3	93.3	0.8	1.1	6.2
		1.96	0.51	0.09						
		1.95	0.51	0.09						
Sulfadiazina	Dia 1	1.96	0.52	0.1	97.8	102.7	100.0	0.3	2.2	10.0
		1.96	0.52	0.11						
		1.95	0.5	0.09						
	Dia 2	1.96	0.5	0.1	98.0	99.3	103.3	0.0	1.2	5.6
		1.96	0.5	0.1						
		1.96	0.49	0.11						

%RSD: coeficiente de variación

Como se muestra en la Tabla 6, se realizaron las pruebas t y F para la comparación entre medias y varianzas respectivamente, empleando pruebas de 2 colas, con 95% de confianza y 2 grados de libertad, a lo cual corresponden los estadísticos 4,30 (prueba t) y 39 (prueba F) (Ellison

et al, 2009). Estas pruebas fueron determinadas mediante el análisis de las soluciones en los dos días. No existen diferencias significativas para todos los activos en todos los niveles.

**Tabla 6. Evaluación de la reproducibilidad del método en tres niveles de concentración**

Principio Activo	Concentración (mg/L)	t	F
Acetaminofén	0.2	NO	NO
	0.5	NO	NO
	1.0	NO	NO
Cafeína	0.2	NO	NO
	0.5	NO	NO
	1.0	NO	NO
Sulfadiazina	0.1	NO	NO
	0.5	NO	NO
	2.0	NO	NO
Diclofenaco sódico	0.1	NO	NO
	0.5	NO	NO
	2.0	NO	NO

**Tabla 7. Resumen de los parámetros de desempeño de cada activo.**

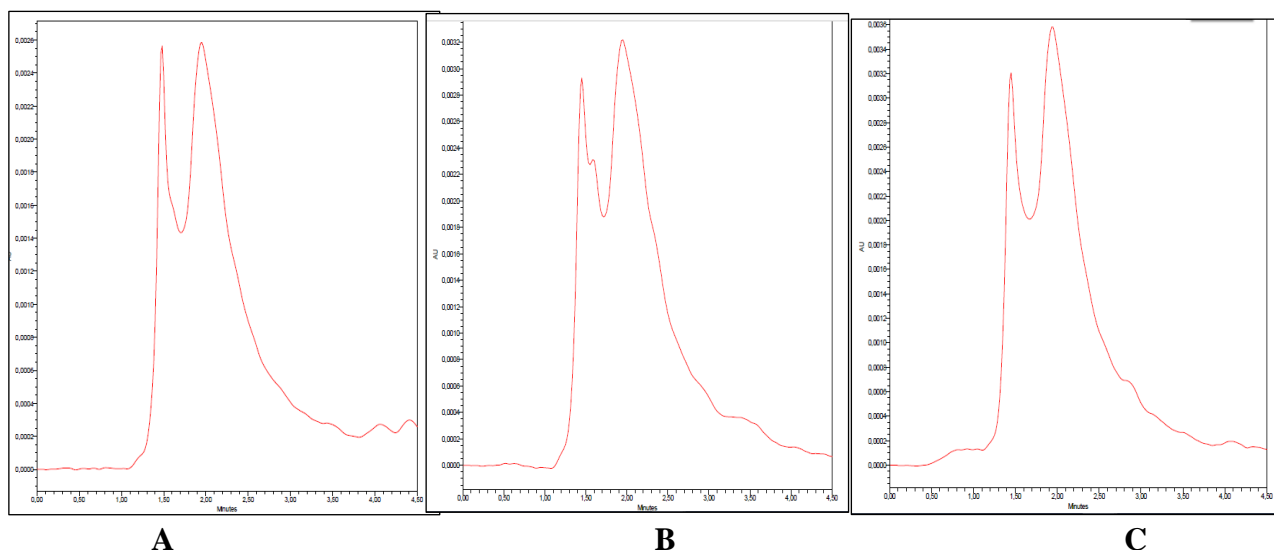
Parámetro	L.D (mg/L)	L.C (mg/L)	Precisión intermedia (%RSD) Nivel Bajo, Medio, Alto	Exactitud (%Recuperación) Nivel Bajo, Medio, Alto	Coefficiente de correlación (R <sup>2</sup> )
Acetaminofén	0.04	0.11	2.66	102.73	0.9984
			1.74	100.67	
			0.69	100.15	
Cafeína	0.02	0.05	3.55	107.17	0.9964
			0.68	103.39	
			0.41	100.33	
Sulfadiazina	0.03	0.10	4.98	103.33	0.9963
			1.33	99.52	
			0.61	97.75	
Diclofenaco sódico	0.02	0.05	5.97	98.33	0.9973
			1.62	98.37	
			0.45	97.67	

LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación

Todos los activos cumplen con los criterios de evaluación del método (Tabla 8). Para la exactitud, todas las concentraciones del nivel medio se acercan al valor real en comparación de los demás niveles. En cuanto a la precisión, los valores de desviación del nivel alto son menores a los demás niveles; esto quiere decir que el método puede medir de mejor manera niveles medios y altos, en comparación a los niveles bajos. El cumplimiento del coeficiente de correlación ( $R^2$ ), junto los demás parámetros de evaluación, indica el correcto funcionamiento del equipo y la pericia del analista, factores que se combinan para brindar un método apto para el uso propuesto.

### 5.3 ANÁLISIS DE MUESTRAS

Como se puede observar en la Figura 4, los cromatogramas de las muestras correspondientes a cada punto de muestreo en la ciudad de Ibarra contienen picos que no pueden ser cuantificados porque no están debidamente resueltos, no tienen buena simetría ni resolución. Esto pudo haber sucedido por no realizar pruebas de selectividad del método analítico. Según la Farmacopea 42 de los Estados Unidos Farmacopea de E.E.U.U (2008), la selectividad es la capacidad de evaluar en forma inequívoca al analito en presencia de los componentes cuya presencia cabría esperar, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. La inclusión de este parámetro permitiría tener resultados más confiables en términos de garantizar la identidad del analito, distinguir compuestos de estructura estrechamente relacionada, y obtener mayores valores de recuperación.



**Figura 4. Cromatogramas de las muestras de agua de la ciudad de Ibarra obtenidas en los puntos 1 (A), 2 (B) y 3 (C).**

Para realizar las pruebas de selectividad, se debió evaluar la extracción de la muestra por SPE. En una matriz como el agua, el analito pudo haber tenido interferencias, lo cual condujo a una deficiente separación. Para que la técnica de extracción por SPE sea útil, esta debe asegurar una extracción limpia, es decir, lograr aislamiento de componentes de la matriz de forma selectiva. En este sentido, se debió realizar fortificaciones de los compuestos sobre una matriz blanco, realizar el proceso de extracción y evaluar los porcentajes de recuperación de cada uno. De esta manera, se puede establecer la eficiencia de la extracción y determinar si la fase sólida es apta para la aplicación. Posteriormente, se pueden adicionar otros compuestos similares o que tengan una alta probabilidad de estar presentes en la matriz y evaluar si constituyen interferencias. Sin embargo, este último punto presenta dificultades, ya que, como se mencionó anteriormente, hay una alta diversidad de compuestos emergentes, e incluso entre fármacos, hay muchas estructuras similares, por lo que el ensayo individual de posibles interferencias tomaría mucho tiempo y recursos.

Por lo explicado, la técnica más útil para analizar estos tipos de analitos en la matriz de agua es un cromatógrafo de líquidos con acople a espectrometría de masas tándem. En la mayoría de la bibliografía recopilada (Leung et al., 2013; Naidu et al., 2016; Gil et al., 2013; Acosta, 2017) se menciona este tipo de técnica, por su sensibilidad, robustez y selectividad. Esta técnica es capaz de determinar los compuestos objetivo al nivel de nanogramos por litro y se aplica comúnmente para la detección de compuestos farmacéuticos en aguas y aguas residuales. El uso de una técnica híbrida como LC-MS/MS o LC-ESI-QTOF sería de gran aporte para la determinación de los activos en las aguas de consumo por sus amplias funciones. Estos tipos de técnicas generan una gran cantidad de información permitiendo un análisis discriminatorio con mayor exactitud y precisión. Se pueden obtener espectros de: el precursor sin fragmentar, fragmentos del precursor, transiciones entre precursor y fragmentos. Estas últimas permiten una identificación inequívoca del compuesto.

Por otra parte, se conoce que uno de los pasos más importantes de la extracción por SPE es la reconstitución de la muestra, ya que de esto dependerá la disolución de los analitos en el extracto final y la eficiencia de su ingreso al instrumento de medición. En el presente experimento, se presentaron inconvenientes con esta etapa, ya que al momento de secar el eluato de SPE se observó la presencia de agua, cuando se esperaba únicamente una fase metanólica; esto es indicativo de que no se dejó secar el cartucho completamente previo a la elución de los analitos retenidos en la fase sólida.

Existen varios estudios de compuestos similares a los detallados en este trabajo, tal es el caso del trabajo propuesto por Acosta (2017), en el cual analiza trimetropim, sulfadiazina, carbamazepina y diclofenaco sódico. A comparación de este estudio, existen varias diferencias de algunos parámetros, como por ejemplo los criterios de aceptación. Para la exactitud (evaluado como % recuperación), los valores de la sulfadiazina y el diclofenaco son de  $\pm 25$  y  $\pm 15$  y para la precisión (evaluado como % RSD) son de  $\leq 10$  y  $\leq 5$  respectivamente. Además, se realizó la determinación de la incertidumbre del método, obteniéndose 32% para la sulfadiazina y 4% para el diclofenaco. Otras diferencias son la longitud de onda (254 para diclofenaco y 280 para sulfadiazina respectivamente); volumen de inyección de 10  $\mu\text{L}$  para ambos activos. Además, se utilizó una columna C18 de dimensiones diferentes como el tamaño de partícula de 1.7  $\mu\text{m}$ . No menciona con qué solventes fueron disueltos los estándares. Las proporciones de fase móvil tanto para el diclofenaco como la sulfadiazina también fueron diferentes; se utilizó una proporción mayor de fase acuosa para la sulfadiazina y una proporción 1:1 para el diclofenaco. A diferencia de este trabajo, la proporción de la fase móvil fue mayor para el solvente en el que estaban disueltos los analitos. Es decir, si el analito estaba disuelto en metanol, la proporción de fase móvil fue mayor en metanol. Varias de estas diferencias, se deben a que la técnica empleada fue UPLC-DAD en lugar de HPLC-UV (usada en este trabajo); la diferencia radica en el tamaño de la partícula que se usa en las columnas cromatográficas. Al tener un menor tamaño de la partícula, el equipo va a necesitar de mayor presión para que el flujo pase por la columna, y esto hace que los compuestos eluyan con mayor rapidez. Otra ventaja es que al tratarse de un DAD (detector de arreglo de diodos) se podía realizar barridos en varias longitudes de onda y así encontrar la absorbancia donde podía ser analizado cada compuesto de interés.

Hernández Falcón (2015), analizó cafeína en medios acuosos a través de la validación de un método analítico. En este trabajo se realizaron estudios de selectividad sometiendo a la muestra a procesos de oxidación para así observar alguna degradación que pueda afectar al análisis. Los criterios de aceptación para la precisión (como %RSD) y la exactitud (como % recuperación) fueron de  $\leq 1.5$  y  $\pm 3.0$  respectivamente. A comparación del presente trabajo, se tuvieron mayor cantidad de parámetros de desempeño, incluyendo robustez, con los cuales asegura los datos y la estabilidad de la solución para ser medidos en diferentes periodos.

## 6. CONCLUSIONES

1. El método analítico para la determinación de acetaminofén, cafeína, sulfadiazina y diclofenaco por cromatografía de líquidos con detección ultravioleta cumplió con todos los criterios de evaluación de su desempeño en términos de: exactitud, precisión, límites de detección y cuantificación, y linealidad. Sin embargo, mostró serias deficiencias en cuanto a selectividad, además, los límites de detección no son lo suficientemente bajos lo cual impide su aplicabilidad en muestras de agua.

2. Para lograr una buena resolución de los cuatro compuestos, fue necesario aplicar dos programas cromatográficos diferentes: uno para acetaminofén y cafeína, y otro para sulfadiazina y diclofenaco. Con ello, se obtuvieron picos simétricos y resueltos en todos los casos, y en tiempos de análisis menores a 6 minutos.

3. Se obtuvieron valores de linealidad mayores de 0.995 para todos los activos. La precisión en los niveles bajos mostró la mayor variabilidad, con coeficientes de variación entre 2.66-10.0%. La exactitud en los niveles medios y altos se acercan más al valor real con valores de recuperación entre 97.3 y 104.0% para el diclofenaco y la cafeína y el acetaminofén, respectivamente. Los límites de detección y cuantificación estuvieron en el orden de (0.02-0.04) y (0.05-0.13), respectivamente.

4. El método utilizado no fue útil para la determinación de muestras reales. Los picos de los analitos no mostraron una separación eficiente por la presencia de interferencias que derivan de la técnica analítica en términos de sensibilidad y selectividad. Producto de esto, se considera que la selectividad es un parámetro fundamental en la evaluación de desempeño de métodos con técnicas cromatográficas no acopladas.

## RECOMENDACIONES

1. Para un análisis de fármacos en agua se sugiere emplear un cromatógrafo de líquidos acoplado a espectrometría de masas tándem, con la finalidad de analizar concentraciones en el rango de nanogramos o microgramos por litro, obtener una mayor selectividad e identificación inequívoca de compuestos, además de un alto poder de resolución aún en muestras con múltiples analitos.

2. Para la implementación de este tipo de métodos, se deberían evaluar varios parámetros de desempeño para obtener más confiabilidad en los resultados, por ejemplo: selectividad, robustez, recuperación de las etapas de extracción. Especialmente, se debe verificar la selectividad del método y la aplicación de la técnica para que no exista algún tipo de interferencias que afecten al análisis.

3. Considerando la importancia de los contaminantes emergentes, en particular de los compuestos farmacéuticos, sería importante analizar en ciudades como Guayaquil, Santo Domingo, Esmeraldas, otro tipo de principios activos y sus metabolitos, a destacar: ibuprofeno, omeprazol, losartán, cefalexina, amoxicilina, que se encuentran entre los fármacos más vendidos en Ecuador.

4. Para optimizar el tiempo de la extracción en fase sólida, se recomienda realizarla en equipos que tienen automatizada esta técnica, de tal manera que el tratamiento de la muestra tome menos tiempo y se reduzca la probabilidad de errores.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, S. (2017). *Determinación de principios activos de productos farmacéuticos en el agua de consumo de Quito y Ambato, efectos y posibles tratamientos*. (Tesis de Maestría), Universidad Central Del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Barreto, R. (2017). *Contaminantes Emergentes*. (Tesis de Pregrado), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
- Díaz, A. C. (2002). *Fundamentos de química analítica: equilibrio iónico y análisis químico*: Univ. Nacional de Colombia.
- Díaz, J. (2005). *Estadística con programación*: Univ. de Puerto Rico en Aguadilla
- Dosal, M. y M. Villanueva (2008). "Introducción a la Metrología Química: Curvas de calibración en los métodos analíticos." *Revista de la Universidad Nacional Autónoma de México: 1-9*.
- Drugbank (2019). *Diclofenac Sodium*. Recuperado de <https://www.drugbank.ca/salts/DBSALT000466>
- Ellison, S., Barwick, V. y Duguid, T. (2009). *Practical Statistics for the Analytical Scientist*. 2a. ed. *RSC Publishing*, Reino Unido.
- EMAPA – Empresa Pública Municipal de Agua Potable y Alcantarillado de Ibarra. (25 de agosto del 2016). Guaraczapas, fuente principal de agua de Ibarra. Recuperado de <http://emapaibarra.gob.ec/>.
- Farmacopea de los EE. UU. USP. XXXII & NF 37. (2008) *The United States Pharmacopeial Convention*, Rockville, MD.
- Furlong, E. T., Batt, A. L., Glassmeyer, S. T., Noriega, M. C., Kolpin, D. W., Mash, H., y Schenck, K. M. (2017). Nationwide reconnaissance of contaminants of emerging concern in source and

treated drinking waters of the United States: Pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*, 579, 1629-1642.

Gil, M. J., Soto, A. M., Usma, J. I., y Gutiérrez, O. D. (2013). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción+ limpia*, 7(2).

Goodman Gilman, A., Hardman, J. G., y Limbird, L. W. (2003). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*: McGraw-Hill.

Harris D, C. *Análisis químico cuantitativo*. Tercera edición (sexta edición original). Michelson Laboratory.

Hernández Falcón, D., Ledea O., Fernández L. y González E. (2015). Validación de un método cromatográfico para la determinación de cafeína en muestras acuosas de la Industria Farmacéutica. *Revista Cubana de Farmacia* 49(2): 219-231.

Hiendrawan, S., Veriansyah, B., Widjojokusumo, E., Soewandhi, S. N., Wikarsa, S., y Tjandrawinata, R. R. (2016). Physicochemical and mechanical properties of paracetamol, sulfadiazine, caffeine and diclofenac. *International journal of pharmaceutics*, 497(1-2), 106-113.

Jelić, A., Petrović, M., y Barceló, D. (2012). *Pharmaceuticals in drinking water Emerging organic contaminants and human health* (pp. 47-70): Springer.

La Hora. (8 de noviembre del 2002). Ibarra declarada en emergencia sanitaria. Diario La Hora (Ecuador). Recuperado de <https://www.lahora.com.ec/noticia/1000119236/home>

Leung, H. W., Jin, L., Wei, S., Tsui, M. M. P., Zhou, B., Jiao, L., Lam, P. K. S. (2013). Pharmaceuticals in tap water: human health risk assessment and proposed monitoring framework in China. *Environmental health perspectives*, 121(7), 839-846.

Lozano, R. P., García, Y. A., Tafalla, D. B., & Albaladejo, M. F. (2007). Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. *Adicciones*, 19(3), 225-238.

- Marino, D. J. G., Carriquiriborde, P., Ronco, A. E., & Elorriaga, Y. (2013). Contaminantes emergentes: productos farmacéuticos en el medio ambiente. *Paper presented at the VII Congreso de Medio Ambiente*. Recuperado de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/26491>
- Naidu, R., España, V. A. A., Liu, Y., y Jit, J. (2016). Emerging contaminants in the environment: risk-based analysis for better management. *Chemosphere*, 154, 350-357.
- Quiñones-García, Y. A., Calvo-Alonso, A., Caraballoso-Noa, I. y Alonso-Rodríguez, H. (2015). Validación de un método analítico para la determinación del contenido de monobromado en el Dermofural por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE), fase inversa. *Revista Cubana de Química* 27(2): 163-181.
- Rahman, M., Yanful, E., y Jasim, S. (2009). Endocrine disrupting compounds (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the aquatic environment: implications for the drinking water industry and global environmental health. *Journal of Water and Health*, 7(2), 224-243.
- Remache Tixe, A. M. (2013). *Validación de métodos para el análisis de metales en diferentes matrices por espectrofotometría de absorción atómica*. (Tesis de Pregrado), Universidad Central Del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Robinson, J. W., Frame, E., y Frame II, G. M. (2014). *Undergraduate instrumental analysis*: CRC press.
- Schultz, M. M., y Furlong, E. T. (2008). Trace analysis of antidepressant pharmaceuticals and their select degradates in aquatic matrixes by LC/ESI/MS/MS. *Analytical chemistry*, 80(5), 1756-1762.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., y Nieman, T. A. (2010). *Principios de análisis instrumental*: McGraw-Hill Interamericana de España.

Stashenko, E. y Martínez, J. (2011). Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica* 3(1): 25-49.

Voloshenko-Rossin, A., Gasser, G., Cohen, K., Gun, J., Cumbal-Flores, L., Parra-Morales, W., Lev, O. (2015). Emerging pollutants in the Esmeraldas watershed in Ecuador: discharge and attenuation of emerging organic pollutants along the San Pedro–Guayllabamba–Esmeraldas rivers. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17(1), 41-53

Vuong, Q. V. y P. D. Roach (2014). Caffeine in green tea: its removal and isolation. *Separation & Purification Reviews* 43(2): 155-174.

## 8. ANEXOS

### Anexo 1. Clases de contaminantes emergentes y ejemplos de cada una (Barreto, 2017)

Clase de contaminante	Ejemplo
Productos Farmacéuticos Antibióticos de uso médico y veterinario	Trimetoprima, eritromicina, lincomicina, sulfametoxazol.
Medicamentos analgésicos y antiinflamatorios.	Codeína, ibuprofeno, acetaminofén, ácido acetilsalicílico, diclofenaco.
Medicamentos psiquiátricos reguladores de lípidos.	Diazepam, fluoxetina, carbamazepina, Bezafibrato, ácido clofíbrico y fenofíbrico, atorvastatina.
Betabloqueadores	Metoprolol, propanolol, timolol, atenolol.
Medios de contraste de rayos X	Lopromide, iopamidol, diatrizoato.
Esteroides y hormonas (anticonceptivos)	Estradiol, estrona, estriol.
Productos de cuidado personal Perfumes Agentes de protección solar Repelentes de insectos Antisépticos	Fragancias, policíclicos y macrocíclicos. Benzofenona, metilbenzilidone. N, N-dietiltoluamida. Triclosan, clorofeno.
Detergentes, tensoactivos y sus metabolitos.	Alquifenoles etoxilados, alquifenoles (nonilfenol y octilfenol), alquifenoles carboxilados.
Retardadores de llama	Difenil éteres polibromados Tetrabromo bisfenol A, tris(2cloretil) Fosfato
Aditivos y agentes industriales Aditivos de gasolina	Agentes quelantes, sulfonados aromáticos. Dialquil éteres. Metil-t-bitil éter.
Subproductos de desinfección.	Yodo, trihalometanos, bromoacidos, bromoacetnitrilos, bromoaldehidos, bromato.

## Anexo 2. Certificado del MSP de información de los medicamentos más consumidos en Ecuador



MINISTERIO  
DE SALUD PÚBLICA  
Subsecretaría Nacional de Gobernanza de la Salud Pública  
Dirección Nacional de Medicamentos y Dispositivos Médicos

Oficio Nro. MSP-DNMDM-2018-0065-O

Quito, D.M., 31 de mayo de 2018

**Asunto:** Respuesta: datos obtenidos de las estadísticas más recientes (años 2016 y 2017) de los medicamentos más consumidos a nivel nacional y en las ciudades de Quito, Ibarra, Esmeraldas y Guayaquil.

MSc.  
Eva Isabel Cipriani Avila  
**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**  
Presente.-

De mi consideración:

En atención al Oficio S/N del 10 de mayo de 2018, mediante el cual solicita información sobre datos obtenidos de las estadísticas más recientes acerca de los medicamentos más consumidos en el Ecuador y en las ciudades de Quito, Ibarra, Esmeraldas y Guayaquil, información que servirá como insumo para la investigación de "Determinación de principios activos de productos farmacéuticos en el agua de consumo de Quito, Ibarra, Esmeraldas y Guayaquil, efectos y posibles tratamientos".

Al respecto, sírvase encontrar en adjunto la información de 150 medicamentos esenciales de mayor consumo que constan en el Cuadro Nacional de Medicamentos Básicos - CNMB 9na. revisión, emitido mediante Acuerdo Ministerial 4288 y publicado en el Segundo Suplemento del Registro Oficial Nro. 93 del 02 de octubre del 2013; y, su reforma emitida mediante Acuerdo Ministerial 4693 y publicada en el Registro Oficial Nro. 205 del 17 de marzo del 2014.

Es importante mencionar que la información proporcionada corresponde al consumo de medicamentos esenciales del periodo fiscal de los años 2016 y 2017 en los establecimientos de salud de este Portafolio.

Atentamente,

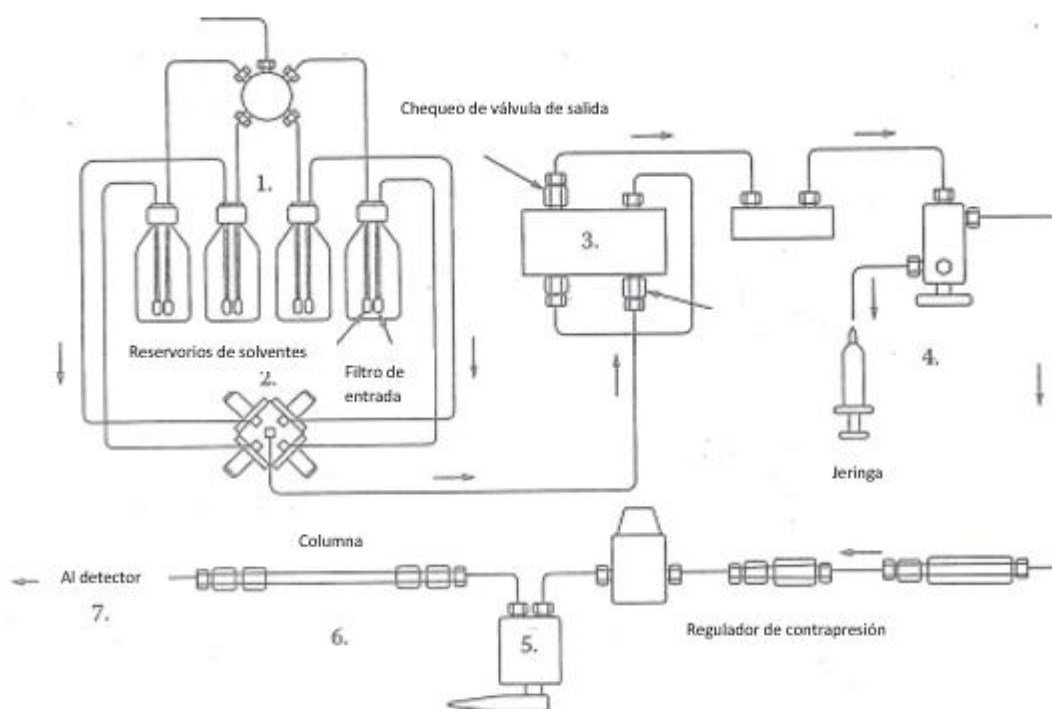
Espc. Silvia Yolanda Álvarez Freire  
**DIRECTORA NACIONAL DE MEDICAMENTOS Y DISPOSITIVOS MÉDICOS,**  
**ENCARGADA**

### Anexo 3. Listado de los 30 medicamentos más consumidos a nivel nacional del año 2017



**SUBSECRETARÍA DE GOBERNANZA DE LA SALUD PÚBLICA**  
**DIRECCIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS Y DISPOSITIVOS MÉDICOS**  
**CONSUMOS DE MEDICAMENTOS ESENCIALES**  
**NIVEL NACIONAL - AÑO 2017**

Nº	MEDICAMENTO	CONSUMO TOTAL
1	PARACETAMOL SÓLIDO ORAL 500 MG NR	53.561.073
2	IBUPROFENO SÓLIDO ORAL 400 MG NR	32.543.225
3	OMEPRAZOL SÓLIDO ORAL 20 MG NR	26.950.001
4	HIERRO EN COMBINACIÓN CON ÁCIDO FÓLICO SÓLIDO ORAL 60 MG + 400 MCG NR	18.679.997
5	LOSARTÁN SÓLIDO ORAL 50 MG NR	16.648.938
6	LOSARTÁN SÓLIDO ORAL 100 MG NR	15.066.575
7	CEFALEXINA SÓLIDO ORAL 500 MG NR	14.445.327
8	AMOXICILINA SÓLIDO ORAL 500 MG NR	13.276.509
9	DICLOFENACO SÓLIDO ORAL 50 MG NR	11.857.613
10	ENALAPRIL SÓLIDO ORAL 20 MG NR	11.517.879
11	HIERRO, MULTIVITAMINAS Y MINERALES SÓLIDO ORAL (POLVO) ND NR	10.892.166
12	ÁCIDO ACETILSALICÍLICO SÓLIDO ORAL 100 MG NR	10.374.599
13	METFORMINA SÓLIDO ORAL 500 MG NR	9.374.779
14	VITAMINA B1 + VITAMINA B6 Y B12 SÓLIDO ORAL ND NR	9.301.223
15	LORATADINA SÓLIDO ORAL 10 MG NR	9.134.095
16	AMLODIPINA SÓLIDO ORAL 10 MG NR	8.448.892
17	METFORMINA Y SULFONAMIDAS SÓLIDO ORAL 500 MG + 3 MG NR	8.281.153
18	CARBONATO DE CALCIO SÓLIDO ORAL 500 MG NR	8.274.823
19	ÁCIDO FÓLICO SÓLIDO ORAL 1 MG NR	6.916.239
20	METFORMINA SÓLIDO ORAL 850 MG NR	6.446.563
21	LEVONORGESTREL Y ESTRÓGENO SÓLIDO ORAL 150 MCG + 30 MCG NR	5.985.735
22	CIPROFLOXACINO SÓLIDO ORAL 500 MG NR	5.968.971
23	METRONIDAZOL SÓLIDO ORAL 500 MG NR	5.951.832
24	GLIBENCLAMIDA SÓLIDO ORAL 5 MG NR	5.830.859
25	DICLOXACILINA SÓLIDO ORAL 500 MG NR	5.730.572
26	AMOXICILINA E INHIBIDORES DE LA ENZIMA SÓLIDO ORAL 500 + 125 MG NR	5.231.632
27	ENALAPRIL SÓLIDO ORAL 10 MG NR	5.209.973
28	NITROFURANTOÍNA SÓLIDO ORAL 100 MG NR	4.725.628
29	CARBAMAZEPINA SÓLIDO ORAL 200 MG NR	3.872.030
30	CARBAMAZEPINA SÓLIDO ORAL (LIBERACIÓN CONTROLADA) 400 MG NR	3.801.510

**Anexo 4. Diagrama típico de un instrumento HPLC (Robinson et al., 2014)**

**Anexo 5. Puntos de muestreo de la ciudad de Ibarra**

**Anexo 6. Mediciones para la construcción de curvas de calibración durante la evaluación de linealidad del método**

Compuesto	Concentración (mg/L)	Área (por cada repetición)				
		1	2	3	4	5
Cafeína	0.2	2279.76	2452.04	2578.60	2874.71	2744.78
	0.4	8085.73	7700.56	8124.30	8074.50	8043.19
	0.5	10454.51	12545.36	12649.65	12476.13	12134.55
	0.8	23967.82	23368.17	23806.18	23754.99	23872.68
	1.0	30154.21	30692.30	29629.68	31137.35	30978.46
Acetaminofén	0.2	1225.07	1248.11	1238.58	1206.70	1274.22
	0.4	3283.09	3195.47	3147.54	3125.87	3178.90
	0.5	4420.20	4159.16	4240.63	4128.27	4142.95
	0.8	7161.92	7045.10	7163.45	7445.69	7425.77
	1.0	8871.31	8884.83	8941.28	8884.33	8863.60
Sulfadiazina	0.1	1632.69	1640.58	1676.16	2035.02	2248.53
	0.2	3898.15	3985.88	3978.78	3879.19	3844.39
	0.5	8076.19	7860.52	8035.32	8053.44	8076.19
	1.0	13045.33	13363.69	13884.18	13013.05	13045.33
	2.0	27333.26	26175.26	25838.34	24120.69	27333.26
Diclofenaco	0.1	7127.66	6395.35	6548.51	6547.69	6392.02
	0.2	12210.73	11089.21	10331.99	12642.26	10993.64
	0.5	21900.18	20641.26	20690.08	19305.47	20626.20
	1.0	41829.39	48895.12	43880.11	44540.41	41097.64
	2.0	86543.55	82690.72	73847.29	74422.60	72142.84

**Anexo 7. Residuales de la regresión lineal (área vs concentración) de los compuestos estudiados**

Concentración (mg/L)	Residuales		Concentración (mg/L)	Residuales	
	Cafeína	Acetaminofén		Diclofenaco	Sulfadiazina
0.2	546.513	-55.4057549	0.1	-545.8911845	576.606606
0.2	718.793	-32.3657549	0.1	-538.0011845	-155.703394
0.2	845.353	-41.8957549	0.1	-502.4211845	-2.54339398
0.2	1141.463	-73.7757549	0.1	-143.5611845	-3.36339398
0.2	1011.533	-6.2557549	0.1	69.94881552	-159.033394
0.4	-831.707	68.0848529	0.25	-175.436173	-67.6868431
0.4	-1216.88	-19.5351471	0.25	-87.70617303	-1189.20684
0.4	-793.137	-67.4651471	0.25	-94.80617303	-1946.42684
0.4	-842.937	-89.1351471	0.25	-194.396173	363.843157
0.4	-874.247	-36.1051471	0.25	-229.196173	-1284.77684
0.5	-2055.02	237.930157	0.5	844.2621794	76.1574084
0.5	35.82769	-23.1098431	0.5	628.5921794	-1182.76259
0.5	140.1177	58.3601569	0.5	803.3921794	-1133.94259
0.5	-33.4023	-53.9998431	0.5	821.5121794	-2518.55259
0.5	-374.982	-39.3198431	0.5	844.2621794	-1197.82259
0.8	682.0024	77.8560686	1	-503.2811158	914.155911
0.8	82.35236	-38.9639314	1	-184.9211158	7979.88591
0.8	520.3624	79.3860686	1	335.5688842	2964.87591
0.8	469.1724	361.626069	1	-535.5611158	3625.17591
0.8	586.8624	341.706069	1	-503.2811158	182.405911
1	-315.798	-147.283324	2	1151.282294	7445.89292
1	222.2921	-133.763324	2	-6.717706107	3593.06292
1	-840.328	-77.3133235	2	-343.6377061	-5250.36708
1	667.3421	-134.263324	2	-2061.287706	-4675.05708
1	508.4521	-154.993324	2	1151.282294	-6954.81708

**Anexo 8. Análisis de varianza de los residuales de la regresión lineal (área vs concentración) para determinar heterocedasticidad en los datos de los compuestos estudiados**

**ANOVA Cafeína**

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	4.205	1	4.205	1.31E-05	0.997125	4.0427
Within Groups	15384685	48	320514.3			
Total	15384689	49				

**ANOVA Acetaminofén**

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	4.205	1	4.205	0.0005	0.983082	4.0427
Within Groups	444217	48	9255			
Total	444221	49				

**ANOVA Diclofenaco Sódico**

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	7.4113	1	7.4113	2.9E-05	0.99570	4.043
Within Groups	12102322	48	252132			
Total	12102330	49				

**ANOVA Sulfadiazina**

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	7.4112	1	7.4112	1.32E-06	0.9991	4.043
Within Groups	270464222	48	5634671			
Total	270464230	49				