

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



***DETERMINACIÓN DE CEFEPIME
E IDENTIFICACIÓN DE N-METILPIRROLIDINA
EN MATRICES DE BIOSÓLIDO Y ORINA MEDIANTE
HPLC-DAD, GC- μ ECD Y AXION DSA-TOF-MS.***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster
en Química área de Especialización en Medio Ambiente y Memoria para
optar al Título de Químico por:

Álvaro Felipe Quiroz Gómez

Directora de tesis: Dra. Tatiana Garrido R.

Codirectora de tesis: Dra. Leslie Escobar O.

Santiago - CHILE

Octubre 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

ÁLVARO FELIPE QUIROZ GÓMEZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química, Área de Especialización: Medio Ambiente y Título de Químico, en el examen público rendido el día

Directora de Tesis:

Dra. Tatiana Garrido R. _____

Co-directora de Tesis:

Dra. Leslie Escobar O. _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Javier Morales V. _____

Dra. M^a Carolina Zúñiga L. _____

Dra. Verónica Arancibia M. _____

A mi madre...

“Sería bueno sentir menos curiosidad
por las personas y más por las ideas”

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecerle todo corazón a mi amiga y directora de tesis, la Dra. Tatiana Garrido, es increíble todo lo que he aprendido caminando a su lado, desde conocimientos del ámbito profesional hasta contribuir en mi desarrollo como persona. Gracias por estar ahí siempre con una palabra de cariño y con su apoyo incondicional, por acompañarme en mi proceso académico y por estar presente en los momentos de más dolor. Gracias también por hacernos parte de su familia. Al profe Jorge por tener una voluntad de oro con nosotros y guiarnos junto a la profe Tatiana.

A mi otra directora de tesis, Leslie, por tener una paciencia de oro y entregar una sonrisa y un buen comentario siempre que nos veíamos. Por el proyecto y por confiar en nosotros.

Agradecer a mi madre por creer en mí, por darme todos los días una palabra de amor, por enseñarme el valor de las cosas, la importancia de los sentimientos y ser el principal pilar de mi formación personal. Por apoyarme de manera incondicional y ser mi confidente. Mamá, espero poder retribuir todo lo que me has entregado, porque te mereces TODO. A mi tía Sandra, mi segunda madre, mi "yoyo", tú sabes lo importante que eres para mí, siempre estaré contigo cuando me necesites, así como tu estuviste para ayudarme cada vez que lo necesité. A mi padre, porque a pesar de que somos muy diferentes, me has ayudado. Espero te sientas orgulloso. A mis tíos y tías (Jorge, Johanna, Nelson, Lidia, Letty, Vita, Ricardo, Lorena, Nito) gracias por siempre estar presente en sus pensamientos y por quererme tanto. A mis primas Sole, Patty, Fanny y Yessenia, por ser un ejemplo y un modelo a seguir, son secas. A mi querida Ale Ojeda, por tus miles de consejos y apoyo en los momentos más oscuros. Te quiero prima postiza. Quiero agradecer también a Martín, mi sobrino, que a su

corta edad no deja de sorprenderme con su entusiasmo por aprender, gracias por darme la oportunidad de compartir contigo, por defenderme cuando escuchabas que decían algo de mí, aunque haya sido en broma. Te adoro pequeño.

En la vida me he encontrado con muchas personas que se han ganado un espacio en mi corazón, un espacio demasiado valioso. La primera de ellas es mi amiga y hermana Kathy, toda una vida juntos, tú sabes que hemos pasado por tantas cosas que atesoro y han sido fundamentales para ser quien soy hoy. Gracias por soportarme todos estos años y por darme la oportunidad de ser el padrino del Nachito. A la Kyo por ser una amiga de esas que es muy difícil encontrar, una incondicional y siempre dispuesta a ayudar. No sabes lo agradecido que estoy de tenerte. A Fernando por siempre tener una palabra de apoyo y estar en momentos en los que me vi en dificultades. A Belén por todo el cariño que entregas y que llena habitaciones enteras. A mis queridos Rodrigo, Alvaro, Ana y Javier porque son lo máximo y cada momento con ustedes está lleno de sonrisas y amor. Al Mati (M. C.), al Fabi (F. P.) y al Fabo (F. U.), ustedes aparecieron de diferentes formas y les juro que me siento muy agradecido de tenerlos en mi vida. Cada uno ha sido importantísimo este último tiempo y han estado presentes hasta en los momentos más feos.

A veces la vida nos pone a personas que nunca imaginaríamos que serían tan importantes para uno, tú eres una de esas personas Ricardo. No encuentro palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí. Has sido importantísimo en este camino, siempre alentándome a seguir adelante, a demostrarme a mí mismo de lo que soy capaz, a levantarme cada vez que me sentía cansado. Gracias por ser mi compañero, mi amigo y mi refugio. Gracias por creer en mí, por compartir mis orgullos y mis felicidades, por ser mi fortaleza en los momentos en que pensé que no podía, por acompañarme en el duro camino del cáncer, por escucharme, por aconsejarme, por dejarme ser parte de tu hermosa familia a los

cuales quiero demasiado (Tía Vero, Tío Fernando, Nano, Kika, Mati, Anais, Sofia, tus tías, tíos y prim@s) y por amarme tanto como yo te amo a ti.

En la universidad no todo es estudio, también fueron muchos los momentos donde reí y conocí personas maravillosas. La Yeya fue una de ellas, mi primera amiga en la universidad, nos conocimos el primer día cuando nos postularon a reyes de los mechones y hasta el día de hoy somos inseparables, gracias por tu cariño, siempre serás mi reina. También esta Margaret, mi siamesa, desde que comenzamos a trabajar juntos en el laboratorio nos convertimos en muy muy buenos amigos. Gracias Peggy por todos tus consejos, por aguantarme estresado y por siempre darme una palabra de apoyo, por esas escapadas inolvidables al mall (y otros lados) y por ser mi *partner in crime*. Mi querida Dani, mi farmacéutica de confianza, gracias por darme tantos momentos de risas y cariño, eres una persona muy especial en mi *kokoro*. Al resto de mis uzumakis: José, Domi, Barbara, Fabi y Fran, gracias por todos los momentos compartidos, de risas y llantos, de estrés y felicidad, todo fue más fácil con ustedes a mi lado. A mis amigos Dani Vargas y el Mati Sepu porque fuimos tan apañadores entre nosotros en muchos momentos y hasta el día de hoy y, a pesar de la gran distancia que nos separa con la Dani, están presentes con sus palabras de apoyo y su linda amistad. A mis amigos y compañeros de laboratorio Andrés, Pato y Diane por todos los buenos momentos y por haber estado presentes cuando más los necesité. A mis otros amigos y compañeros de carrera o facultad: Vale, Cata Uribe, Egao, Jenni, Ale, Belén, Elías, Cata Ugarte, entre otros, gracias por sus consejos, ayudas, ánimos y risas.

Agradecer también al tío Julio, la tía Roxy y la tía Anita por ser los mejores funcionarios de la facultad, por todo el cariño que nos entregaron y por siempre estar dispuesto a ayudarnos.

También quiero darle las gracias al profe Javier por su buena disposición, entrega y amabilidad al facilitarnos trabajar en el HPLC de su laboratorio y hacernos parte

de su equipo, tanto a Margaret como a mí. A los profes MC. Zuñiga, G. Günther, L. Ascar, P. Aguirre, I. Ahumada, A. Zanocco, E. Lemp, C. Olea, G. Zapata, E. Fuentes, C. Yañez, M. Baez, J. Pezoa, K. Valdes y P. Richter por sus aportes no solo en mi formación académica, sino también porque cada uno de los mencionados ha estado presente de una u otra forma en momentos difíciles. Gracias de todo corazón.

Finalmente, quiero agradecer al Álvaro del pasado, por mantener la cabeza en alto frente a todas las dificultades que enfrentó y por no dejar de creer en sí mismo. Nunca olvides todo lo que este último tiempo has vivido, sin dudas te ayudo a crecer. Sigue buscando tu felicidad y sé tú mismo.

Tabla de contenidos

| | |
|---|-----------|
| AGRADECIMIENTOS | 2 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 9 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 11 |
| ÍNDICE DE ECUACIONES | 12 |
| ÍNDICE DE TABLAS DE ANEXO | 13 |
| ABREVIATURAS | 15 |
| RESUMEN | 18 |
| SUMMARY | 20 |
| INTRODUCCIÓN | 22 |
| 1 INGRESO DE ANTIBIÓTICOS AL MEDIOAMBIENTE | 22 |
| 2 LOS BIOSÓLIDOS (GENERACIÓN Y COMPOSICIÓN)..... | 22 |
| 3 LA ORINA..... | 26 |
| 4 ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS..... | 27 |
| 5 ESTADO DEL ARTE | 29 |
| 6 FUNDAMENTO DEL TRABAJO..... | 34 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 35 |
| 1 HIPÓTESIS | 35 |
| 2 OBJETIVO GENERAL | 35 |
| 3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 35 |
| MATERIALES | 36 |
| 1 MATERIALES | 36 |
| 2 REACTIVOS | 36 |
| 3 EQUIPOS..... | 37 |
| 4 SOFTWARE | 38 |
| MÉTODOS | 39 |

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | CARACTERIZACIÓN DE LAS MATRICES | 39 |
| 1.1. | <i>Muestreo</i> | 39 |
| 1.2. | <i>Determinación del volumen de saturación del biosólido (Vs)</i> | 41 |
| 1.3. | <i>Determinación de pH</i> | 41 |
| 1.4. | <i>Determinación de carbono orgánico</i> | 41 |
| 1.5. | <i>Determinación de conductividad eléctrica (CE)</i> | 43 |
| 1.6. | <i>Determinación pseudo total de metales pesados</i> | 43 |
| 1.7. | <i>Muestras para extracción por agitación y ultrasonido</i> | 44 |
| 1.8. | <i>Muestras para la validación de las técnicas</i> | 44 |
| 2 | CUANTIFICACIÓN DE CEP POR HPLC-DAD, GC- μ ECD Y CONFIRMACIÓN POR DSA-TOF-MS 45 | |
| 2.1. | <i>Análisis por HPLC-DAD</i> | 45 |
| 2.1.1. | Optimización de las condiciones de trabajo para HPLC-DAD..... | 45 |
| 2.1.2. | Soluciones stock y curva de calibración para HPLC-DAD | 46 |
| 2.1.3. | Método de extracción de CEP en biosólido | 47 |
| 2.1.4. | Evaluación de la estabilidad de CEP en matriz acuosa por HPLC-DAD..... | 48 |
| 2.2. | <i>Análisis por GC-μECD</i> | 49 |
| 2.2.1. | Condiciones cromatográficas | 49 |
| 2.2.2. | Estudios de solubilidad | 51 |
| 2.2.3. | Curva de calibración para GC- μ ECD utilizando hexano como solvente | 51 |
| 2.2.4. | Cambio de matriz y modalidad de inyección..... | 51 |
| 2.2.5. | Muestras utilizadas para derivatización con MSTFA..... | 51 |
| 2.2.6. | extracción de CEP para análisis por GC- μ ECD | 53 |
| 2.3. | <i>Análisis por DSA-TOF-MS</i> | 55 |
| 2.3.1. | Condiciones de trabajo para DSA-TOF-MS | 55 |
| 2.3.2. | Soluciones utilizadas en el estudio con DSA-TOF-MS | 55 |
| 2.3.3. | Evaluación de la estabilidad de CEP por DSA-TOF-MS | 55 |
| 3 | PARÁMETROS DE VALIDACIÓN ANALÍTICA..... | 56 |
| 3.1. | <i>Sensibilidad</i> | 56 |
| 3.2. | <i>Límite de detección (LD)</i> | 56 |
| 3.3. | <i>Límite de cuantificación (LC)</i> | 57 |
| 3.4. | <i>Precisión</i> | 57 |
| 3.4.1. | Replicabilidad..... | 57 |
| 3.4.2. | Precisión intermedia..... | 58 |
| 3.5. | <i>Recuperación</i> | 58 |
| 3.6. | <i>Linealidad</i> | 59 |

| | |
|---|------------|
| RESULTADOS Y DISCUSIONES | 60 |
| 1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MATRICES | 60 |
| 2 ANÁLISIS PARA HPLC-DAD | 63 |
| 2.1. Optimización de la técnica HPLC-DAD..... | 63 |
| 2.2. Evaluación de la metodología de extracción de cep en biosólido | 68 |
| 2.3. Curva de calibración HPLC-DAD | 70 |
| 2.4. Curva de calibración en matriz..... | 71 |
| 2.5. Pruebas de estabilidad..... | 75 |
| 2.6. Límites de detección y cuantificación..... | 79 |
| 2.7. Precisión (HPLC-DAD)..... | 80 |
| | 81 |
| 2.8. Recuperación | 81 |
| 3 ANÁLISIS POR GC- μ ECD | 82 |
| 3.1. Estudios de solubilidad y primeras inyecciones en hexano | 82 |
| 3.2. cambio de matriz y modalidad de inyección | 83 |
| 3.3. Derivatización con MSTFA..... | 85 |
| 3.4. Precisión..... | 92 |
| 3.5. Límites de detección y cuantificación..... | 93 |
| 3.6. Recuperación | 93 |
| 4 ANÁLISIS POR DSA-TOF-MS | 94 |
| 4.1. Optimización..... | 94 |
| 4.2. HPLC-DAD y DSA-TOF-MS..... | 98 |
| 4.3. GC- μ ECD y DSA-TOF-MS..... | 104 |
| 4.4. Precisión..... | 108 |
| 4.5. Estabilidad | 109 |
| CONCLUSIONES | 111 |
| BIBLIOGRAFÍA | 113 |
| ANEXOS A: CARACTERIZACIÓN DE LAS MATRICES..... | 121 |
| ANEXOS B: HPLC-DAD | 126 |
| ANEXOS C: GC-μECD..... | 132 |
| ANEXOS D: DSA-TOF-MS..... | 135 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Gráfico de generación de biosólidos ($m^3/año$) en Chile, ESSAL, 2012* | 23 |
| Figura 2 Estructura química de cefepime | 28 |
| Figura 3 Estructura de N-metilpirrolidina (NMP) | 29 |
| Figura 4 Mapa de la ubicación de la PTAS “La Farfana” | 39 |
| Figura 5 Mapa de la ubicación de la PTAS “Melipilla” | 40 |
| Figura 6 Determinación de carbono orgánico. Antes y después de la oxidación del C en medio ácido | 42 |
| Figura 7 Diagrama de tratamiento a la muestra de orina | 46 |
| Figura 8 Extractos obtenidos de la extracción por ultrasonido de las muestras de biosólido de la Farfana y de Melipilla | 48 |
| Figura 9 Sistema de SPE con disco | 53 |
| Figura 10 Muestras de orina utilizadas en SPE | 53 |
| Figura 11 Estructura química de MSTFA | 54 |
| Figura 12 Reacción general de derivatización usando MSTFA | 54 |
| Figura 13 Cromatograma de CEP 50 y 100 $\mu g/mL$ en columna C8 de 10 cm. Por HPLC-DAD. 63 | |
| Figura 14 Cromatograma de CEP en concentración 50 y 100 $\mu g/mL$ utilizando fase móvil TFA/AcN, con columna C18 de 25 cm analizado por HPLC-DAD | 65 |
| Figura 15 Cromatograma de CEP en concentración de 50 $\mu g/mL$, usando distintos flujos de fase móvil CH_3COOH/AcN , con columna C18 de 25 cm analizado por HPLC-DAD | 66 |
| Figura 16 Curva de calibración de CEP en agua entre 0,5 y 50 $\mu g/mL$, análisis realizado por HPLC-DAD | 70 |
| Figura 17 Curva de calibración de CEP en Agua/ Orina/ BSM, 0,5 - 50 $\mu g/mL$, HPLC-DAD | 74 |
| Figura 18 Cromatogramas de CEP (7,9 min) en Orina. Por HPLC-DAD | 74 |
| Figura 19 Modelo Lineal Ln [CEP] vs Tiempo para degradación de CEP 4,98 $\mu g/mL$, HPLC-DAD | 75 |
| Figura 20 Disminución de [CEP] por días y nivel de concentración. Por HPLC-DAD | 77 |
| Figura 21 Cromatograma CEP en metanol inyectado en modo split. Por GC- μ ECD | 83 |
| Figura 22 Cromatograma de CEP en orina (azul) y orina re-fortificada con CEP sólido (rojo). Por GC- μ ECD en modo splitless. | 84 |

| | |
|--|-----|
| <i>Figura 23 Curva de calibración de CEP en acetato de etilo con EI, análisis por GC-μECD</i> | 86 |
| <i>Figura 24 Cromatogramas de CEP sin derivatizar en EtOAc con EI. Concentración de CEP: 20 μg/mL (Rojo) y 120 μg/mL (Azul), analizado por GC-μECD</i> | 88 |
| <i>Figura 25 Comparación de los ajustes lineales para CEP derivatizado y sin derivatizar. Por GC-μECD</i> | 89 |
| <i>Figura 26 Cromatograma de CEP derivatizado (9,87 min), análisis por GC-μECD</i> | 91 |
| <i>Figura 27 Malla del DSA cargada con muestras de CEP</i> | 94 |
| <i>Figura 28 NMP protonada (m/z 86)</i> | 95 |
| <i>Figura 29 Espectro de masas de CEP en agua (100 μg/mL). Por DSA-TOF-MS</i> | 96 |
| <i>Figura 30 Curva de calibración de CEP en agua entre 1 y 50 μg/mL. Por DSA-TOF-MS</i> | 97 |
| <i>Figura 31 Espectro de masas para muestras de CEP (50 μg/mL) en Orina y BSM. Por DSA-TOF-MS</i> | 99 |
| <i>Figura 32 Curva de calibración de CEP en orina entre 1 y 50 μg/mL proveniente de las mediciones para HPLC-DAD. Por DSA-TOF-MS</i> | 101 |
| <i>Figura 33 Curva de calibración de CEP en extracto BSM entre 1 y 100 μg/mL proveniente de las mediciones para HPLC-DAD. Por DSA-TOF-MS</i> | 101 |
| <i>Figura 34 BIC para la m/z 86 en muestras blanco (BCO) y fortificadas con cefepime (CEP) de biosólido de Farfana (BSF) y Melipilla (BSM) provenientes del proceso de extracción por ultrasonido (US) y por agitación (AGI)</i> | 102 |
| <i>Figura 35 Estructura química de Nicotina</i> | 103 |
| <i>Figura 36 Metabolización y posterior fragmentación de la Cotinina</i> | 103 |
| <i>Figura 37 BIC para la m/z 73, correspondiente al fragmento activo del MSTFA</i> | 105 |
| <i>Figura 38 CEP derivatizado e ionizado en positivo</i> | 105 |
| <i>Figura 39 Espectro de masas para CEP derivatizado. Por DSA-TOF-MS</i> | 106 |
| <i>Figura 40 BIC para m/z 574 correspondiente a CEP derivatizado. Por DSA-TOF-MS</i> | 107 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|-----------------|---|-----|
| <i>Tabla 1</i> | <i>Parámetros fisicoquímicos de cefepime*</i> | 29 |
| <i>Tabla 2</i> | <i>Metodologías de extracción y cuantificación de CEP para distintas matrices por HPLC30</i> | |
| <i>Tabla 3</i> | <i>Programa de horno microondas utilizado para la digestión ácida.</i> | 43 |
| <i>Tabla 4</i> | <i>Programas de temperatura del horno 1, 2 y 3 para análisis de CEP por GC-μECD.</i> | 50 |
| <i>Tabla 5</i> | <i>Resultados de la caracterización de matrices. N.A. = No Aplica; N.D.= No Determinado</i> | 60 |
| <i>Tabla 6</i> | <i>Composición de la fase móvil en gradiente</i> | 65 |
| <i>Tabla 7</i> | <i>Resultados extracción de CEP en BSM por medio de agitación y ultrasonido. ([CEP] experimental = \bar{x} [CEP] fortificado - \bar{x} [CEP] blanco) ([CEP]= μg CEP/g biosólido)</i> | 69 |
| <i>Tabla 8</i> | <i>Tabla ANOVA para carencia de ajuste de curva de calibración de CEP en agua</i> | 70 |
| <i>Tabla 9</i> | <i>Resultados obtenidos para el coeficiente de variación de factores de respuesta (f) en las condiciones nuevas del HPLC-DAD para agua, orina y BSM</i> | 73 |
| <i>Tabla 10</i> | <i>Análisis estadístico de los resultados para comparar medias y desviaciones estándar entre las muestras de CEP en solución acuosa a tiempo 0 y 36 días.</i> | 78 |
| <i>Tabla 11</i> | <i>Resultados de límites de detección (LD) y cuantificación (LC) para CEP en agua, orina y biosólido de Melipilla (BSM) por HPLC-DAD</i> | 79 |
| <i>Tabla 12</i> | <i>Resultados de precisión para otros estudios que consideran cefepime en diferentes matrices. (REP= repetibilidad) (P.I.= precisión intermedia)</i> | 81 |
| <i>Tabla 13</i> | <i>Análisis de varianza (ANOVA) para la precisión intermedia. (gl= grados de libertad) .</i> | 81 |
| <i>Tabla 14</i> | <i>Recuperación porcentual promedio (R) de CEP en agua, orina y BSM. Por HPLC-DAD</i> | 81 |
| <i>Tabla 15</i> | <i>Resultados de precisión para DSA-TOF-MS</i> | 108 |
| <i>Tabla 16</i> | <i>Resultados estudio de estabilidad de CEP en solución acuosa. Por DSA-TOF-MS .</i> | 109 |

ÍNDICE DE ECUACIONES

| | |
|---|----|
| <i>Ecuación 1 Degradación de la Urea</i> | 26 |
| <i>Ecuación 2 Cálculo de la respuesta del LD</i> | 56 |
| <i>Ecuación 3 Cálculo de la respuesta del LC</i> | 57 |
| <i>Ecuación 4 Porcentaje de recuperación</i> | 58 |
| <i>Ecuación 5 Coeficiente de correlación</i> | 59 |
| <i>Ecuación 6 Coeficiente de determinación</i> | 59 |
| <i>Ecuación 7 Coeficiente de variación de factores de respuesta</i> | 59 |
| <i>Ecuación 8 Número de platos teóricos</i> | 64 |
| <i>Ecuación 9 Ajuste lineal para Concentración de CEP vs Área, para matriz orina. Por HPLC-DAD</i> | 71 |
| <i>Ecuación 10 Ajuste lineal para Concentración de CEP vs Área, para matriz biosólido Melipilla.</i> <i>Por HPLC-DAD</i> | 71 |
| <i>Ecuación 11 Ecuación de Arrhenius</i> | 76 |
| <i>Ecuación 12 Ajuste lineal para Concentración de CEP vs Área, para matriz orina. Por DSA-TOF-MS</i> | 98 |
| <i>Ecuación 13 Ajuste lineal para Concentración de CEP vs Área, para matriz BSM. Por DSA-TOF-MS</i> | 98 |

ÍNDICE DE ANEXO

| | |
|--|------------|
| <i>Tabla A 1 Valores obtenidos de la determinación de pH para los biosólidos.....</i> | <i>121</i> |
| <i>Tabla A 2 Valores obtenidos de la determinación de pH para Orina</i> | <i>121</i> |
| <i>Tabla A 3 Resultados obtenidos para conductividad eléctrica (C.E.) de biosólidos (BS) y Orina</i> | <i>122</i> |
| <i>Tabla A 4 Curva de calibración de carbono orgánico (C.O.) para biosólidos. Por espectrofotometría UV-Vis.....</i> | <i>122</i> |
| <i>Tabla A 5 Curva de calibración de carbono orgánico (C.O.) para orina. Por espectrofotometría UV-Vis</i> | <i>122</i> |
| <i>Tabla A 6 Determinación de carbono orgánico (C.O.) en muestras de biosólido (BS). Por espectrofotometría UV-Vis. Abs= Absorbancia</i> | <i>123</i> |
| <i>Tabla A 7 Determinación de carbono orgánico (C.O.) en muestras de orina. Por espectrofotometría UV-Vis. Abs= Absorbancia</i> | <i>123</i> |
| <i>Tabla A 8 Determinación del volumen de saturación (Vs) de los biosólidos (BS).....</i> | <i>124</i> |
| <i>Tabla A 9 Pesos registrados para determinación de humedad (%) a 105 °C de los biosólidos (BS). V = Vaso</i> | <i>124</i> |
| <i>Tabla A 10 Pesos de las muestras de biosólido utilizadas para la cuantificación de metales pesados por Espectrometría de Absorción Atómica.....</i> | <i>124</i> |
| <i>Tabla A 11 Resultados para determinación de metales pesados en BSF y BSM por medio de Espectrometría de Absorción Atómica.....</i> | <i>125</i> |
| | |
| <i>Figura B 1 Curva de Van Deemter (Condiciones óptimas).....</i> | <i>126</i> |
| | |
| <i>Tabla B 1 Resultados de la curva de calibración de CEP en agua por HPLC-DAD</i> | <i>126</i> |
| <i>Tabla B 3 Resultados curvas de calibración de CEP en agua, orina y BSM entre 1 y 50 µg/mL. Por HPLC-DAD</i> | <i>127</i> |
| <i>Tabla B 2 Resultados de la primera curva de calibración de CEP en orina por HPLC-DAD</i> | <i>127</i> |
| <i>Tabla B 4 Resultados de estudio de estabilidad de CEP en agua a 4°C entre 0,5 y 6 µg/mL. Por HPLC-DAD.....</i> | <i>128</i> |
| <i>Tabla B 5 Resultados de estudio de estabilidad de CEP en orina (azul) y BSM (blanco) a 4°C por HPLC-DAD.....</i> | <i>128</i> |

| | |
|---|------------|
| <i>Tabla B 6 Resultados de LD y LC para la determinación de CEP en matrices agua, orina y BSM por medio de HPLC-DAD.....</i> | <i>129</i> |
| <i>Tabla B 7 Resultados de precisión a nivel de Repetibilidad (Rep) y Precisión Intermedia (P.I.) para la determinación de CEP en matriz acuosa por HPLC-DAD.....</i> | <i>130</i> |
| <i>Tabla B 8 Resultados de recuperación (%R) de CEP para la metodología HPLC-DAD descrita en este estudio.....</i> | <i>131</i> |
| | |
| <i>Tabla C 1 Resultados de curva de calibración de CEP en acetato de etilo por GC-μECD utilizando DDE como estándar interno</i> | <i>132</i> |
| <i>Tabla C 2 Resultados de curva de calibración de CEP derivatizado con MSTFA en acetato de etilo por GC-μECD</i> | <i>132</i> |
| <i>Tabla C 3 Resultados de precisión a nivel de Repetibilidad (Rep), Precisión Intermedia (P.I.), Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC) para la determinación de CEP derivatizado por GC-μECD</i> | <i>133</i> |
| <i>Tabla C 4 Resultados de recuperación (%R) de CEP derivatizado para la metodología GC-μECD descrita en este estudio.....</i> | <i>134</i> |
| | |
| <i>Tabla D 1 Resultados curva de calibración de CEP en agua por DSA-TOF-MS.....</i> | <i>135</i> |
| <i>Tabla D 2 Resultados curva de calibración proveniente de HPLC-DAD de CEP en orina por DSA-TOF-MS. m/z 86 = [NMP-H]⁺ ; m/z 114 = [Creatinina-H]⁺</i> | <i>135</i> |
| <i>Tabla D 3 Resultados curva de calibración proveniente de HPLC-DAD de CEP en extracto de BSM por DSA-TOF-MS. m/z 86 = [NMP-H]⁺; m/z 136 = fragmento de la matriz BSM.....</i> | <i>135</i> |
| <i>Tabla D 4 Resultados de análisis de varianza (ANOVA) para CEP en agua determinado por diferentes analistas. Por DSA-TOF-MS</i> | <i>136</i> |
| <i>Tabla D 5 Resultados de análisis de varianza (ANOVA) para CEP en orina determinado por diferentes analistas. Por DSA-TOF-MS</i> | <i>136</i> |
| <i>Tabla D 6 Resultados de análisis de varianza (ANOVA) para CEP en extracto de BSM determinado por diferentes analistas. Por DSA-TOF-MS.....</i> | <i>136</i> |

ABREVIATURAS

| Abreviatura | Significado | Abreviatura | Significado |
|--------------|---------------------------------|---------------------------|--|
| - | Menos | APCI | Atmospheric pressure chemical ionization |
| %R | Porcentaje de recuperación | B | Boro |
| %v/v | Porcentaje volumen/volumen | BIC | Background corrected total Ion Current chromatograms |
| [] | Concentración | BSF | Biosólido de La Farfana |
| + | Más | BSM | Biosólido de Melipilla |
| < | Menor que | C | carbono |
| = | Igual | C.O. | Carbono Orgánico |
| > | Mayor que | Ca | Calcio |
| ± | Más Menos | CEP | Cefepime |
| °C | Grados Celsius | CH₃COOH | Ácido Acético |
| μA | Micro Ampere | Cl | Cloro |
| μECD | Micro Electron Capture Detector | cm | Centímetro |
| μg/g | Microgramo por gramo | Co | Cobalto |
| μg/mL | microgramo por mililitro | Cu | Cobre |
| μL | Microlitro | CV | Coefficiente de Variación |
| μm | Micrómetro | DAD | Diode Array Detector |
| AcN | Acetonitrilo | DER | Desviación Estándar Relativa |
| Ag | Plata | DSA | Direct Sample Analysis |
| ANOVA | Analysis of Variance | EI | Estándar Interno |

| Abreviatura | Significado | Abreviatura | Significado |
|-----------------------------------|--|--------------------------|-------------------------------------|
| EtOAc | Acetato de etilo | M | Molar |
| Fe | Hierro | m/z | Razón masa-carga |
| FID | Flame Ionization Detector | m³/año | Metros cúbicos por año |
| g | Gramos | MeOH | Metanol |
| g/L | Gramos por Litro | mg | Miligramo |
| GC | Gas Chromatography | mg/Kg | miligramos por kilogramo |
| gl | Grados de libertad | mg/L | Miligramo por Litro |
| h | Horas | mg/mL | Miligramos por mililitro |
| H⁺ | Protón | mg C/mL | Miligramos de carbono por mililitro |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrogeno | min | Minuto |
| HLB | Hydrophilic Lipophilic Balance | mL | Mililitro |
| HNO₃ | Ácido Nítrico | mL/min | Mililitros por minuto |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography | mm | Milímetros |
| K | Potasio | Mn | Manganeso |
| Kow | Coefficiente de partición octanol/agua | Mo | Molibdeno |
| LC | Límite de Cuantificación | MS | Masa |
| LD | Límite de Detección | mS/cm | Mili siemens por centímetro |
| LLE | Liquid Liquid Extraction | N₂ | Nitrógeno Molecular |
| Ln | Logaritmo natural | NCh | Norma Chilena |

| Abreviatura | Significado | Abreviatura | Significado |
|--------------------|---|--------------------|-----------------------|
| nm | Nanómetro | Vs | Volumen de Saturación |
| NMP | N-metilpirrolidina | W | Watts |
| P.A. | Para Análisis | Zn | Zinc |
| P.I. | Precisión Intermedia | | |
| PCB | Polychlorinated biphenyl | | |
| pH | Potencial de Hidrogeno | | |
| pKa | Logaritmo negativo del coeficiente de disociación ácida | | |
| psi | Pounds-force per square inch | | |
| PTAS | Planta de Tratamiento de Aguas Servidas | | |
| Rep | Repetibilidad | | |
| rpm | Revoluciones Por Minuto | | |
| SPE | Solid Phase Extraction | | |
| ST | Sólidos Totales | | |
| SV | Sólidos Volátiles | | |
| TFA | Ácido trifluoroacético | | |
| TOF | Time of Flight | | |
| USP | United States Pharmacopeia | | |
| UV | Ultravioleta | | |
| Vis | Visible | | |

RESUMEN

En la actualidad, existe una gran cantidad de compuestos químicos considerados contaminantes emergentes que pueden ingresar al medio ambiente, y ejercer efectos negativos sobre éste, como es el caso de los antibióticos que pueden generar un aumento de las resistencias a los antimicrobianos. Cefepime es uno de los antibióticos más utilizados en atención hospitalaria, el cual corresponde a una cefalosporina de 4ta generación y de alto espectro utilizada para el tratamiento de diversas infecciones, entre ellas las causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Cefepime, al ser excretado principalmente por la orina, entra a las plantas de tratamiento de aguas servidas de origen domiciliario y hospitalario. Es posible encontrar este compuesto en los biosólidos, subproducto del tratamiento de las aguas servidas, los cuales pueden ser utilizados como enmienda orgánica en agricultura, lo que podría generar un aumento en la resistencia antimicrobiana en la biota circundante.

El objetivo de esta investigación fue desarrollar y validar una metodología analítica para la cuantificación de cefepime en matriz orina y biosólidos de la Región Metropolitana de Chile. Para la extracción del analito desde el biosólido se consideraron dos metodologías, agitación y ultrasonido. Para la cuantificación se utilizaron las técnicas de cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) y cromatografía de gases con detector de microcaptura electrónica (GC- μ ECD). La confirmación del analito en las matrices se llevó a cabo con la técnica de analizador de tiempo de vuelo acoplado a un detector de masa con análisis de muestra directa (DSA-TOF-MS), que permite el análisis de las muestras sin previo tratamiento. Para todas las técnicas utilizadas se evaluaron parámetros de validación como sensibilidad, precisión, recuperación y límites de detección y cuantificación.

Las condiciones de trabajo optimizadas para el análisis del analito en ambas matrices mediante HPLC- DAD, consideraron una columna C18 de fase reversa, fase móvil de 90% CH₃COOH 0,1M/ 10% Acetonitrilo. Para el análisis por GC- μ ECD se utilizó una columna HP-5, con un programa cromatográfico de 2 etapas, realizando la derivatización del analito con MSTFA.

Los resultados de la caracterización de los biosólidos usados en este estudio dieron cuenta que el contenido de carbono orgánico fue de un 72,9% para el de la Farfana y de un 48,3% para el de Melipilla. En relación a la metodología de extracción de cefepime desde biosólido, el ultrasonido resulta ser más eficiente con relación al tiempo de extracción necesario, obteniéndose porcentajes de recuperación cercanos al 100%, con una precisión menor a 0,75 %, expresada como la desviación estándar relativa. Para la cuantificación de cefepime, la técnica HPLC-DAD, demostró ser adecuada para ambas matrices, con una recuperación de 98,3% para orina y 96,3% para biosólido, con un tiempo de retención de 7,5 min, límites de detección y cuantificación menores a 0,13 y 0,31 μ g/mL, respectivamente. Por otro lado, se logró desarrollar una metodología para cuantificar cefepime derivatizado con MSTFA en acetato de etilo por GC- μ ECD obteniéndose un tiempo de retención de 9,87 minutos con una recuperación de 99,53%, una precisión menor a 5,23% y límites de detección y cuantificación de 0,46 y 1,56 μ g/mL, respectivamente. Finalmente se logró confirmar la presencia de cefepime utilizando DSA-TOF-MS en las muestras usadas previamente tanto en HPLC-DAD como en GC- μ ECD. Se identificó la razón m/z de 86, la cual pertenece al principal metabolito de cefepime, la N-metilpirrolidina.

Con este estudio se logró confirmar que el antibiótico cefepime ingresa a las plantas de tratamiento de aguas servidas a través de los afluentes de origen antrópico y puede estar presente en los biosólidos.

SUMMARY

Currently, there are a large number of chemical compounds considered emerging pollutants that can enter the environment, and exert negative effects on it, as is the case of antibiotics that can generate an increase in resistance to antimicrobials. Cefepime is one of the most widely used antibiotics in hospital care, which corresponds to a 4th-generation, high-spectrum cephalosporin used for the treatment of various infections, including those caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Cefepime, as it is excreted mainly in the urine, enters the wastewater treatment plants of home and hospital origin. It is possible to find this compound in biosolids, a by-product of sewage treatment, which can be used as an organic amendment in agriculture, which could generate an increase in antimicrobial resistance in the surrounding biota.

The objective of this research was to develop and validate an analytical methodology for the quantification of cefepime in urine matrix and biosolids from the Metropolitan Region of Chile. For the extraction of the analyte from the biosolid, two methodologies were considered, agitation and ultrasound. Liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) and gas chromatography with electron microcapture detector (GC- μ ECD) were used for quantification. The confirmation of the analyte in the matrices was carried out with the time-of-flight analyzer technique coupled to a mass detector with direct sample analysis (DSA-TOF-MS), which allows the analysis of the samples without prior treatment. Validation parameters such as sensitivity, precision, recovery and detection and quantification limits were evaluated for all the techniques used.

The optimized working conditions for the analysis of the analyte in both matrices by means of HPLC-DAD, considered a C18 column of reversed phase, mobile phase of 90% CH₃COOH 0.1M / 10% Acetonitrile. For the analysis by GC- μ ECD,

an HP-5 column was used, with a 2-stage chromatographic program, performing the derivatization of the analyte with MSTFA.

The results of the characterization of the biosolids used in this study showed that the organic carbon content was 72.9% for La Farfana and 48.3% for Melipilla. In relation to the extraction methodology of cefepime from biosolid, ultrasound turns out to be more efficient in relation to the necessary extraction time, obtaining recovery percentages close to 100%, with a precision of less than 0.75%, expressed as the standard deviation. relative. For the quantification of cefepime, the HPLC-DAD technique proved to be adequate for both matrices, with a recovery of 98.3% for urine and 96.3% for biosolids, with a retention time of 7.5 min, limits of detection and quantification less than 0.13 and 0.31 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectively. On the other hand, it was possible to develop a methodology to quantify MSTFA derivatized cefepime in ethyl acetate by GC- μ ECD, obtaining a retention time of 9.87 minutes with a recovery of 99.53%, a precision of less than 5.23%. and detection and quantification limits of 0.46 and 1.56 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectively. Finally, the presence of cefepime was confirmed using DSA-TOF-MS in the samples previously used in both HPLC-DAD and GC- μ ECD. The m / z ratio of 86 was identified, which belongs to the main metabolite of cefepime, N-methylpyrrolidine.

With this study, it was possible to confirm that the antibiotic cefepime enters sewage treatment plants through tributaries of anthropic origin and may be present in biosolids.

INTRODUCCIÓN

1 INGRESO DE ANTIBIÓTICOS AL MEDIOAMBIENTE

En la actualidad, una gran cantidad de sustancias químicas de origen antrópico ingresan al medioambiente, muchas de ellas consideradas contaminantes emergentes, las cuales pueden llegar a afectar a los distintos ecosistemas. Dentro de este grupo de contaminantes se encuentran los fármacos, que luego de ser administrados, se eliminan en fluidos biológicos. En particular los antibióticos, son de especial interés, ya que éstos se encuentran dentro de los 20 tipos de fármacos más utilizados a nivel nacional para tratar diversas patologías (Centro Nacional de Farmacoeconomía (CENAFAR), 2013).

Una vez administrados, numerosos antibióticos son excretados en su forma parental en mayor proporción. La principal ruta de excreción de los antibióticos es a través de la orina, la cual es eliminada principalmente en los efluentes líquidos de hospitales y viviendas (Tilló, 2010). Estos efluentes de origen domiciliario y hospitalario son procesados en las plantas de tratamientos de aguas servidas, generando como producto principal aguas con características fisicoquímicas y biológicas que permitan su incorporación a efluentes naturales, y como subproducto a los biosólidos o lodos estabilizados.

2 LOS BIOSÓLIDOS (GENERACIÓN Y COMPOSICIÓN)

Los biosólidos se caracterizan por ser sólidos con un alto contenido de carbono orgánico, macro y micronutrientes como nitrógeno, fósforo, entre otros. Debido a sus características este subproducto puede ser utilizado en agricultura, como enmienda o mejorador de suelos, ya que su

aplicación mejora la calidad de estos, aumentando su porosidad y capacidad de retención de agua, así como también promueve el crecimiento de los cultivos por el aporte de nutrientes (Wang, Shammass, & Hung, 2008).

A nivel internacional la tendencia apunta a reducir, reciclar y reutilizar los biosólidos en forma beneficiosa para el ambiente (ESSAL, 2012), además de disminuir los costos asociados a la disposición final de estos residuos. Es por esto, que ha ido incrementando el uso de este subproducto como enmienda orgánica en la agricultura (Bedoya-Urrego, Acevedo, Peláez, & Agudelo, 2013). En Chile, se generan aproximadamente 276,088 m³/año de biosólido, liderando la Región Metropolitana con 154,543 m³/año como muestra la Figura 1 (ESSAL, 2012).

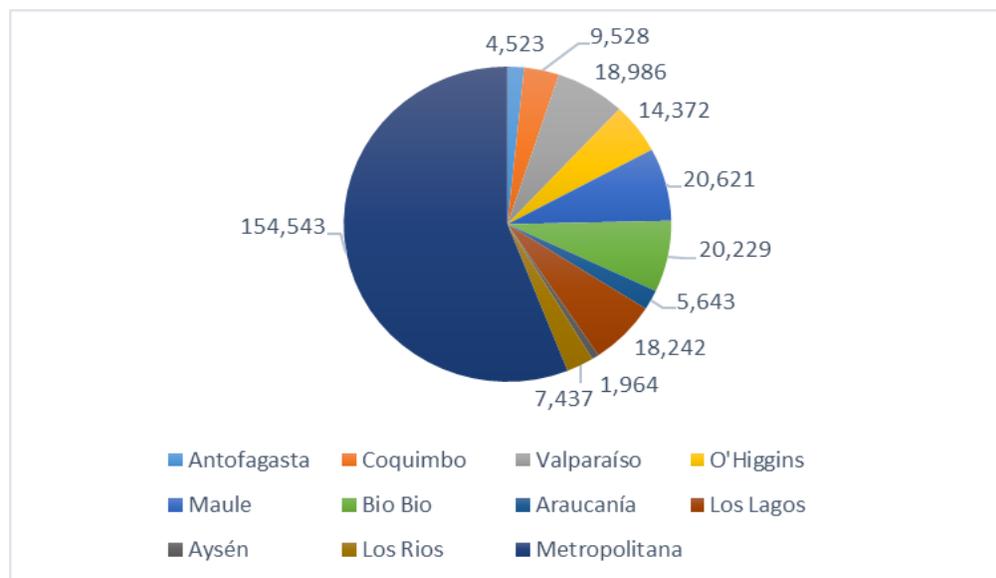


Figura 1 Gráfico de generación de biosólidos (m³/año) en Chile, ESSAL, 2012*

El proceso de producción de biosólido comienza con la eliminación de los componentes de mayor tamaño, granos, y/o escoria (material flotante) mediante un desarenador, el resto es destinado a un tanque de sedimentación donde se produce el lodo primario (principalmente sólidos

fecales). Posteriormente, se realizan diferentes procesos para cumplir con los criterios de la producción de biosólidos, dentro de los cuales encontramos: espesamiento, estabilización, acondicionamiento, desinfección, deshidratación, secado, reducción térmica y, por último, la evaluación final que permite clasificar el tipo de biosólido (Wijesekara, y otros, 2016). El sistema más utilizado en las plantas de tratamiento de aguas servidas corresponde a un sistema de aireación seguido de etapas de espesamiento, almacenamiento y finalmente un proceso de deshidratación (principalmente centrifugación), llegando a obtener una humedad final del lodo de a lo menos 60 a 70%, para cumplir con las resoluciones de calificación ambiental (Henriquez, 2011).

Los biosólidos se identifican como una matriz heterogénea compleja, con una composición química variable, que depende de factores tales como: la composición de las aguas servidas, el tipo de tratamiento, los métodos de estabilización y las condiciones ambientales, tales como temperatura y humedad (Wijesekara, y otros, 2016)

Existen dos parámetros que nos ayudan a describir el contenido de sólidos y de carbono orgánico de los biosólidos, éstos son los Sólidos Totales (ST) y los Sólidos Volátiles (SV). ST incluye a los sólidos suspendidos y también a los sólidos disueltos. Los biosólidos líquidos, deshidratados, y secos contienen entre 2-12%, 12-30% y 30-50% de ST, respectivamente. Por otro lado, los SV indican la disponibilidad de carbono orgánico de fácil descomposición, parámetro directamente relacionado con las emisiones de olor de los biosólidos (Wang, Shammass, & Hung, 2008).

Los biosólidos, por su composición, proporcionan nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas, dentro de los cuales encontramos nitrógeno, fosforo, potasio, calcio, magnesio, sodio, azufre, boro, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, y zinc, en concentraciones variables del

orden de mg/Kg de masa seca. También se puede encontrar elementos traza, como los metales pesados, los cuales son un riesgo para las plantas, los animales y el ser humano cuando se presentan en altas concentraciones (Wang, Shamma, & Hung, 2008).

En relación con el contenido de carbono orgánico en los biosólidos, estos poseen un porcentaje de aproximadamente un 50%. Se ha reportado que los ácidos grasos constituyen la fracción polar predominante, la que representa el 51% de los compuestos orgánicos, mientras que los compuestos esteroidales y alifáticos contribuyen en un 13% y 14%, respectivamente (Torri & Alberti, 2012). También se pueden encontrar en los biosólidos compuestos tales como, polisacáridos y proteínas no ligadas o en asociación con otros compuestos (glicoproteínas y lipopolisacáridos). Lípidos, ácidos nucleicos, y sustancias húmicas son otros de los mayores constituyentes de los biosólidos (García, Acosta, & Allen, 2010)

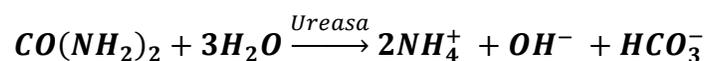
Es importante mencionar, que en los biosólidos es posible encontrar una gran variedad de fármacos, los cuales no son eliminados a través de los distintos tratamientos. Si estos biosólidos son utilizados como enmienda, es probable que estos fármacos ingresen a los suelos, lo que podría afectar de forma negativa al sector agrícola (Aguayo, Herrera, & Méndez, 2012).

Por otro lado, a los animales también se les administran diferentes antibióticos durante su desarrollo, no sólo para tratar enfermedades, sino para asegurar su crecimiento (Van de Vijver, Verwer, Smolders, Hospers-Brands, & Van Eekeren, 2016). Estos compuestos podrían ingresar a los suelos agrícolas directamente a través de la orina del ganado presente en los terrenos (Thiele-Bruhn, 2003).

3 LA ORINA

En relación con la orina humana, podemos mencionar que es un desecho líquido con un pH entre 4,5 y 8,2 aproximadamente, la cual es producida en los riñones por un proceso de filtración de la sangre y luego es excretada por la uretra. El contenido de carbono orgánico total en la orina fluctúa entre 3640 – 6740 mg/L, con una conductividad eléctrica entre 14,8 - 25,4 mS/cm y una densidad entre 1002 - 1030 g/L (Osagie, 2012). Al ser un desecho del cuerpo humano, la composición de la orina es variable entre personas y lugares geográficos, dependiendo de sus hábitos alimenticios, cantidad de agua consumida, actividad física, talla, y factores ambientales. La orina excretada diariamente contiene nitrógeno, fósforo y potasio, cuya distribución porcentual es de 88%, 67% y 73% de cada elemento respectivamente (Karak & Bhattacharyya, 2011). El nitrógeno excretado en la orina puede estar presente en diferentes formas químicas, siendo la urea la principal, seguido del ion amonio, creatinina, aminoácidos y ácido úrico. En presencia de ureasa, la urea es degradada a ion amonio, dióxido de carbono (Ecuación 1) e iones hidroxilos, los cuales causan un aumento del pH hasta 9 - 9,3. La urea y el ion amonio (urea degradada por acción de la ureasa) son dos de los componentes presentes en fertilizantes más utilizados en cultivos con alta demanda de nitrógeno, como las hortalizas (Jónsson, Richert, Vinneras, & Salomon, 2004). La orina también contiene elementos traza (B, Cu, Zn, Mo, Fe, Co y Mn) y diferentes concentraciones de metales pesados (Rodushkin & Ödman, 2001).

Ecuación 1 Degradación de la Urea



Finalmente podemos mencionar otra vía de ingreso de estos fármacos al medio ambiente, la cual es mediante la eliminación directa de medicamentos vencidos o remanentes de un tratamiento. Aunque el ministerio de salud de Chile (Minsal) advierta sobre la correcta eliminación de antibióticos, la realidad muestra que en la mayoría de los casos terminan en el desagüe o en las bolsas de basura domésticas que, a su vez, van a parar a los vertederos (Tilló, 2010) (MINSAL, 2012).

4 ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS

Como se ha descrito en ambas matrices, orina y biosólido, es posible encontrar antibióticos en diferentes concentraciones. Particularmente, los antibióticos betalactámicos son una gran familia que incluye a los derivados de penicilinas, cefalosporinas carbapenémicos y monobactámicos. Su mecanismo de acción es inhibir la última etapa de la síntesis de la pared bacteriana. Son el grupo más utilizado en Chile y en el mundo (Center for Disease Dynamics Economics & Policy, 2015), lo que se ha relacionado negativamente con el aumento de la resistencia bacteriana y reduciendo las alternativas terapéuticas para tratar infecciones. Cabe destacar que, a nivel hospitalario, la presencia de infecciones causadas por patógenos condiciona el antibiótico a utilizar y las dosis requeridas.

En este sentido, uno de los antibióticos de gran interés es el cefepime (CEP), debido a que posee un amplio espectro de acción contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, y principalmente, por tener cobertura sobre *Pseudomonas aeruginosa*, patógeno Gram negativo no fermentador responsable de complejas infecciones intrahospitalarias (El-Rabbat, Abdel-Wadood, Sayed, & Mousa, 2012).

CEP (Figura 2) es una cefalosporina de cuarta generación de uso intrahospitalario. Gracias a la presencia del radical metoxi-imino en C3, CEP se caracteriza por presentar una elevada estabilidad frente a betalactamasas, enzima que confiere resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos (El-Rabbat, Abdel-Wadood, Sayed, & Mousa, 2012).

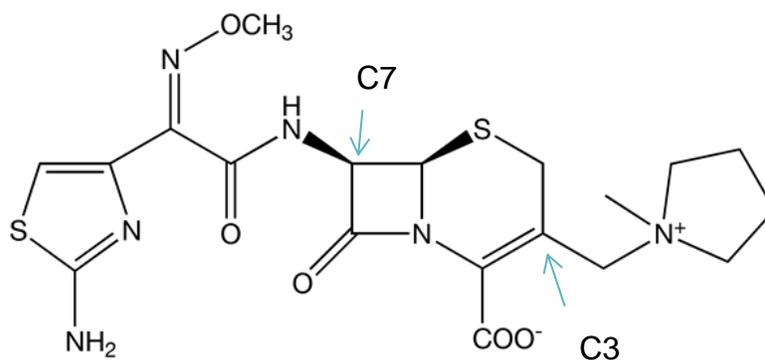


Figura 2 Estructura química de cefepime

Desde un punto de vista fisicoquímico, este antibiótico es una molécula polar, con un valor de log de P -0,37. Como se observa en la Tabla 1, tiene una solubilidad en agua de 0,0173 mg/L. Sus valores de pKa 3,25 y 4,06 corresponden al ácido fuerte presente en el anillo dihidrotiazina y centro básico en el aminotiazol (Evagelou, Tsantili-Kakiulidou, & Koupparis, 2003).

Luego de ser administrado, CEP es metabolizado en N-metilpirrolidina (NMP) (Figura 3) en baja cantidad, la cual es rápidamente convertida en N-óxido de N-metilpirrolidina (DrugBank, 2016).

CEP tiene la característica de ser un zwitterión, lo que significa que, a pesar de ser un compuesto eléctricamente neutro, posee cargas formales positiva y negativa sobre átomos distintos. Esta característica aumenta la

capacidad para penetrar en los canales de porinas en las paredes celulares de las bacterias Gram negativas.

CEP se excreta principalmente por la vía renal, donde es posible encontrar un 80% del fármaco administrado presente en la orina (DrugBank, 2016).

Tabla 1 Parámetros fisicoquímicos de cefepime*

| Parámetro | Valor |
|--------------------------------------|--------|
| Peso Molecular (g/mol) | 480.56 |
| log Kow | -0.37 |
| pKa (ácido fuerte) | 3.25 |
| pKa (base fuerte) | 4.06 |
| Solubilidad en agua (mg/mL) | 17.3 |
| Átomos aceptores de hidrogeno | 8 |
| Átomos dadores de hidrogeno | 2 |

*DrugBank, 2016

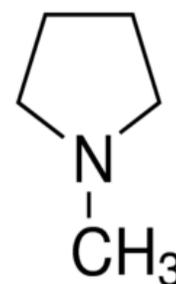


Figura 3 Estructura de N-metilpirrolidina (NMP)

5 ESTADO DEL ARTE

Se han realizado varios estudios donde se determinó CEP y otros antibióticos (betalactámicos y de otras familias) en matriz plasma y orina utilizando HPLC acoplado a diferentes detectores. En la tabla 2 se presenta un resumen de los estudios realizados en diversas matrices, en la mayoría de ellos se utiliza para la cuantificación del analito, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Ocaña, Jiménez, Callejón, & Barragán de la Rosa, 2004) (Ohmori, y otros, 2011) (Nemutlu, Kir, Katlan, & Beksac, 2009) (Cherti, Kinowski, Lefrant, & Bressolle, 2001).

Además, la columna cromatográfica del tipo C18 es la más usada en la técnica cromatográfica para la determinación de este antibiótico, ya que

presenta una polaridad intermedia, lo que permite una interacción lo suficientemente fuerte con la columna para una buena resolución, obteniéndose tiempos de elución menores a 10 min. En relación a la longitud de onda utilizada en los distintos estudios, en general se trabajó en un rango de longitudes de onda entre 220 y 300 nm. Usualmente, el flujo utilizado y el volumen de inyección reportados fueron similares, de 1 mL/min y 20 µL, respectivamente. Los parámetros descritos inciden en el volumen de solvente y muestra utilizada, lo cual es importante debido a que mientras menor es el volumen de solvente, menor es también la generación de residuos, factor a considerar para la elección de la metodología. Por otro lado, el tiempo necesario reportado para un análisis cromatográfico no superan los 13 min, lo cual es una ventaja y otra razón para la selección de la técnica de trabajo.

Tabla 2 Metodologías de extracción y cuantificación de CEP para distintas matrices por HPLC

| Matriz | Técnica | Extracción | Fase Móvil | Rango Lineal | Columna | LD/LC (µg/mL) | Referencia |
|--|------------|------------|---|------------------|---------|---------------|--|
| Orina | HPLC-UV | SPE- HLB | AcN Buffer fosfato 0,1M a pH 3 n-octilamina 0,1M | 10-200 µg/mL | C18 | 1,0/3,3 | Ocaña, J.; y otros, 2004 |
| Suero Humano | HPLC-MS/MS | SPE- HLB | Formiato de amonio ácido. 0,1M (0,1% ácido fórmico/ Metanol 0,1% ácido fórmico | 0,1-50 µg/mL | C18 | 0,05/0,01 | Ohmori, T.; y otros, 2011/ Nemutlu, E.; y otros, 2009 |
| Plasma Humano/ Orina/ Fluido de diálisis | HPLC-UV | LLE | AcN/ Acetato de amonio pH 4 | 0,5-100 µg/mL | C18 | 0,2/0,5 | Cherti, N.; y otros, 2001 |

Para el análisis de las muestras en las matrices orina y biosólido es necesario realizar una etapa de *clean-up* con el fin de reducir las interferencias producidas por la matriz, para esto, en la mayoría de los estudios reportados se utiliza extracción en fase sólida con *cartridges* HLB (*Hydrophilic Lipophilic Balance*), esta elección es debido a la polaridad intermedia que presenta la resina, afinidad que permite obtener altos porcentajes de recuperación.

Como última etapa de la optimización y validación de metodologías de análisis es necesario, confirmar la presencia de los analitos presentes en matrices complejas, como es el caso para esta investigación de la determinación de CEP presente en orina y biosólido. La utilización de TOF-MS (*Time Of Flight – Mass Spectrometer*) acoplado a un sistema DSA (*Direct Sample Analysis*) podría ser una buena opción. Esta técnica permite la medición de varias muestras, tanto sólidas como líquidas, en un corto tiempo de análisis y con la posibilidad de escanear un amplio rango de masas. Además, la utilización del DSA provee de una ventaja en cuanto a la facilidad de la metodología debido a que la muestra puede ser analizada de manera directa, sin un tratamiento previo, lo cual disminuye los errores asociados a éste. Por último, y asociado al uso del DSA, esta técnica no utiliza reactivos adicionales, lo cual disminuye considerablemente los costos asociados al análisis. En conclusión, DSA-TOF-MS proporciona una forma fácil, rápida y con una alta exactitud para la determinación de masas de interés en un amplio espectro sin o con muy poca preparación de la muestra.

En relación con la utilización de otra técnica para la determinación de antibióticos, como es la cromatografía de gases, no hay evidencia de estudios para CEP, debido a sus características fisicoquímicas resulta

necesario, por ejemplo, la derivatización de la muestra para la cuantificación del analito por esta técnica.

Se ha descrito la importancia de la determinación de la concentración de CEP en matriz biosólido y orina, y también la necesidad del desarrollo de nuevas metodologías de análisis que permitan evaluar la presencia de éste, y estudiar su estabilidad en ambas matrices.

Existen diferentes vías de degradación para los antibióticos, una de ellas es la hidrólisis, la cual es función de las condiciones ambientales, tales como la temperatura y el pH, en donde se ha determinado que la degradación de antibióticos betalactámicos sigue una cinética de primer orden (Li, Zheng, Machesky, Yates, & Katterhenry, 2011) (Mitchell, Ullman, Tell, & Watts, 2014) (Ho, Pauzi, Abdul, & Saari, 2013), lo cual significa que la velocidad de degradación del fármaco es proporcional a su concentración.

En relación a la estabilidad de CEP, se ha descrito que no es dependiente de la concentración en agua, sin embargo, se ha reportado que la estabilidad de CEP en plasma desproteinizado es inversamente proporcional a la concentración a 37°C. La degradación de CEP incluye la ruptura de la cadena lateral del C3 y abertura del anillo β -lactámico, produciendo 2- [[2-amino-4-tiazolil ((Z)-metoxiimino) acetil] amino] etanal y NMP (Baririan, Chanteux, Viaene, Servais, & Tulkens, 2003).

Por otro lado, se ha demostrado experimentalmente que la estabilidad de CEP en dextrosa estéril (5% en agua) a 37°C sigue una cinética de primer orden durante las primeras horas, posterior a esto existe una modificación de la cinética, esto se podría explicar porque la cantidad de CEP varía de manera proporcional al pH de la solución. Así, sugiere que al aumentar el pH (debido a la acumulación de productos de degradación de naturaleza

alcalina), aumenta también la velocidad de degradación (Sprauten, Beringer, Louie, Synold, & Gill, 2003).

Además, es importante mencionar que hay estudios que aseguran que existe una pérdida en la efectividad y un grado de toxicidad en pacientes que utilizan CEP inyectable con presencia de su metabolito NMP, el cual se genera por una ruptura de la cadena sustituyente del C3 (Chen, Liu, Qin, & Wang, 2003).

Con respecto a la presencia de los antibióticos en suelos, éstos son propensos a una biotransformación. Por ejemplo, algunos antibióticos como la familia de las sulfonamidas, al estar presentes en suelos, sus metabolitos podrían re-transformarse en el compuesto parental. La fotodegradación en suelos, como una vía alternativa de degradación farmacéutica, se ve limitada por la poca penetración de la luz. Existe la posibilidad de que los antibióticos lixivien a través del suelo hacia aguas profundas o que sean absorbidos por las plantas, donde las concentraciones observadas podrían ser suficientes para producir algún efecto fitotóxico que afecte su crecimiento. Además, existen interacciones entre los antibióticos y la fase sólida del suelo a través de reacciones de sorción y desorción, las cuales controlan no solo la movilidad y adsorción por las plantas, sino que también su biotransformación y efectos biológicos. Cabe destacar que estas reacciones pueden ser afectadas por la materia orgánica y otros nutrientes presentes en los suelos. Por último, es importante mencionar que la cinética de sorción, la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de los antibióticos disminuye a medida que aumenta el tiempo de contacto con el suelo debido a las reacciones de sorción secundarias y la difusión dentro de micro y nanoporos ("Secuestro"). Por lo tanto, reducen la toxicidad aguda, pero prolongan el tiempo de residencia de los antibióticos en el suelo proporcionando un

almacenamiento transitorio de estos compuestos en una forma que no es biodisponible (Jechalke, Heuer, Siemens, Amelung, & Smalla, 2014).

6 FUNDAMENTO DEL TRABAJO

En base a los antecedentes mencionados resulta de gran importancia contar con una metodología analítica que permita determinar la concentración de CEP en orina y biosólido, para lo cual es necesario realizar la optimización y validación de ésta, utilizando HPLC acoplado con un detector con arreglo de diodos (DAD), así como realizar la confirmación del analito presente en las matrices por medio de la utilización de DSA-TOF-MS. Con estas metodologías implementadas se podrá determinar la concentración del antibiótico en ambas matrices, en muestras fortificadas, e identificar los factores que promueven la degradación de este antibiótico, así como determinar cuáles son los productos de degradación generados.

La determinación en orina se basa en que esta es la principal vía de excreción de antibióticos y de ingreso al medio ambiente acuático a través de las aguas residuales (Dinh, Moreau-Guigon, Labadie, Alliot, & Teil, 2017). Esta información permitirá determinar qué cantidad de CEP es excretado en un tiempo determinado, información que, al complementarla con la concentración de antibiótico presente en el plasma, permitiría en una segunda etapa del proyecto evaluar la dosis en base a la velocidad de eliminación del fármaco en cada paciente.

Por otro lado, el biosólido, tiene un uso como enmienda de suelos utilizados para el cultivo de alimentos, y al estar presente CEP, existe una alta probabilidad de generar genes de resistencia en los microorganismos presentes en ellos, dependiendo de las características del suelo, dichos genes podrían ser traspasados a los cultivos, luego a los humanos y así generar un ciclo de resistencia.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1 HIPÓTESIS

El antibiótico cefepime ingresa a las plantas de tratamiento de aguas servidas domiciliarias a través de los desechos de orina, y puede estar presente en biosólidos, ya sea como el compuesto o bien como sus metabolitos.

2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la persistencia de cefepime en biosólido y orina.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar fisicoquímicamente la matriz biosólido y orina.
- b) Validar una metodología para la determinación de cefepime en las matrices en estudio usando para la cuantificación HPLC-DAD y, si es posible, GC- μ ECD.
- c) Validar una metodología para la determinación y confirmación de cefepime en las matrices en estudio usando DSA-TOF-MS.
- d) Evaluar la degradación del antibiótico en biosólido y orina.
- e) Realizar un análisis estadístico de los resultados.

MATERIALES

1 MATERIALES

- Frascos plásticos de distintos volúmenes.
- Agitador, Gel Rocket 50, Bhanu.
- Balanza granataria, precisa 160M, Swiss Quality.
- Balanza analítica, precisa 125A, Swiss Quality.
- Baño Termo-regulado, GLF.
- Cámara de vacío para extracción en fase sólida, Manifold.
- Handy Step, Brand.
- Material de vidrio.
- Cartridge C18, Sep-Pak, Waters.
- Filtros de jeringa, 0,45 μm , Millipore

2 REACTIVOS

- Dicromato de sodio, G.T., Heyn.
- Biosólido proveniente de tratamiento de aguas servidas domiciliarias de la región Metropolitana.
- Orina de voluntario que no consume CEP
- Sacarosa, P.A., Merck.
- N-hexano, Suprasolv para GC con detector ECD y FID, Merck.

- Metanol, Emsure, P.A., Merck.
- Acetonitrilo, Emsure, P.A., Merck
- Agua grado HPLC, Merck
- N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA), Merck
- Ácido acético glacial (CH_3COOH), Merck
- Cefepime hydrochloride USP Reference Standard (N° CAS 123171-59-5), Sigma-Aldrich

3 EQUIPOS

- Potenciómetro, PMX 3000, WTW.
- Conductímetro, LF 539, WTW.
- Estufa 300°C, WTC, Binder.
- Espectrofotómetro UV/Vis, Unicam.
- Baño ultrasonido Elmasonic S30H. 2.75 L. 230 V, Boeco
- Centrifuga, Z 383 K, Hermle.
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica, 3110 con llama, Perkin Elmer.
- HPLC, Shimadzu con detector de fotoarreglo de diodos (DAD).
- Cromatógrafo de gases, 7890A, Agilent Technologies con detector μ -ECD y FID.
- AxION DSA-TOF-MS, Perkin Elmer.

4 SOFTWARE

- Microsoft Office Excel 2010
- Lab Solution, Shimadzu
- Chem Station, Agilent
- TOF-MS Driver, Perkin Elmer
- STATGRAPHICS Centurion

MÉTODOS

1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MATRICES

1.1. MUESTREO

Para el estudio se consideraron dos matrices, orina de voluntarios sanos para el desarrollo de la metodología y biosólido proveniente de aguas servidas domiciliarias de la región Metropolitana.

En relación con la orina se recolectó la primera orina del día de cuatro voluntarios sanos. La recolección se llevó a cabo por micción de acuerdo con el protocolo mencionado en ISPCh (Instituto de Salud Pública de Chile, 2013). Para las muestras de biosólidos, se utilizaron dos de diferentes orígenes. El primero proveniente de la planta de tratamiento de aguas servidas (PTAS) “La Farfana” ubicada en la comuna de Maipú en la

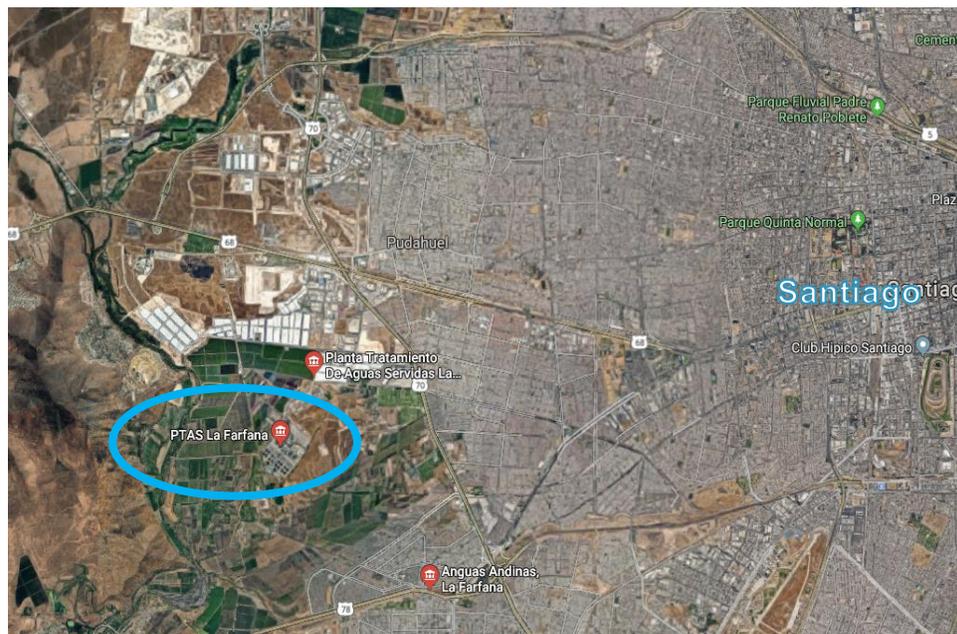


Figura 4 Mapa de la ubicación de la PTAS “La Farfana”

provincia de Santiago (Figura 4); y el segundo de PTAS “Melipilla” ubicada en las afueras de Melipilla (Figura 5).



Figura 5 Mapa de la ubicación de la PTAS “Melipilla”

1.2. DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE SATURACIÓN DEL BIOSÓLIDO (VS)

Para la determinación del volumen de saturación se pesó 1 g de biosólido en un vaso precipitado y se agregaron porciones de 100 μ L de agua y se agitó hasta lograr una pasta saturada homogénea. Ésta pasta brilla por reflejo de la luz y fluye ligeramente al inclinar el vaso. Se deja reposar 1 hora y si no se ha perdido el brillo, se registra el volumen ocupado (Plasencia, 2017).

1.3. DETERMINACIÓN DE PH

Para la determinación del pH de la orina se tomó una alícuota de 50 mL de orina diluida (relación 1:40 orina: agua) en un vaso precipitado.

En el caso del biosólido se pesaron 3 g en un tubo de plástico de 50 mL, se agregaron 30 mL de agua y se mantuvo en agitación durante 30 min en un agitador reciproco (Gel-Rocker-50) previo a la medición. La determinación se realizó en triplicado.

Para la determinación del pH se utilizó un potenciómetro PMX 3000 WTW equipado con un electrodo de Ag^+/AgCl .

1.4. DETERMINACIÓN DE CARBONO ORGÁNICO

Para la determinación de carbono orgánico en orina se preparó una solución de sacarosa de 10 mg C/mL, a partir de esta solución se prepararon cinco estándares de concentración 0.1; 0.25; 0.5; 1; y 1.5 mg C/mL. En un tubo de ensayo se agregaron 75 mg de dicromato de sodio y luego se adicionó 1 mL de estándar o muestra (orina diluida 1:10 con agua) y 1.5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Estas mezclas fueron calentadas en un baño termo-regulado (GLF), durante 1 hora a 80°C. Posteriormente, se adicionó 1 mL de agua destilada a cada tubo y se dejaron reposar por una noche (Figura 6).

Para la determinación de carbono orgánico en biosólido, se prepararon otros cinco estándares de sacarosa de concentración 2, 5, 10, 20, 30 mg C/mL a partir de una solución madre de 100 mg C/mL. Se agregaron 0,05 g de cada biosólido seco al aire o 0,5 mL de la serie de estándares de sacarosa a matraces Erlenmeyer de 100 mL. Se añadieron 5 mL de una solución de dicromato de sodio 0.5 M y 10 mL de ácido sulfúrico. Se agitó y se dejó reposar bajo campana durante 30 min. Luego se agregaron 35 mL de agua y se dejó reposar durante toda la noche.

Finalmente, la lectura de absorbancia de los extractos obtenidos tanto para las muestras de orina como de biosólido se realizó en un espectrofotómetro UV/Vis (Unicam), a una longitud de onda de 600 nm utilizando una cubeta de cuarzo de 1 mL de capacidad. A partir de los resultados obtenidos se calculó el contenido de carbono orgánico (Sadzawka, 2007).



Figura 6 Determinación de carbono orgánico. Antes y después de la oxidación del C en medio ácido.

1.5. DETERMINACIÓN DE CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (CE)

Para la determinación de la conductividad de la orina se colocó en un tubo de plástico de 50 mL una alícuota de 40 mL. En el caso del biosólido se pesaron 6 g en un tubo de plástico de 50 mL y se agregaron 30 mL de agua, esta suspensión se agitó por 30 min a velocidad media en un agitador reciproco y se filtró con papel filtro (100 g/m³). Se determinó conductividad eléctrica de las soluciones utilizando un Conductímetro Orion Star A212, Thermos con las siguientes condiciones de trabajo: Auto Range; k = 0,475; y una temperatura de referencia de 25°C.

1.6. DETERMINACIÓN PSEUDO TOTAL DE METALES PESADOS

Para las muestras de biosólido se cuantificaron cuatro metales: Cu, Ni, Zn, y Pb, utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica con llama (3110, Perkin Elmer). Para esto, se elaboró una curva de calibración multiestándar (entre 0,05 y 9 µg/mL) a partir de una solución Titrisol de 1000 µg/mL de cada metal.

Para el análisis de metales en biosólido, la muestra fue sometida a digestión ácida previa, para ello se pesaron aproximadamente 0,05 g de ambos biosólidos y se trasladaron a vasos de teflón para microondas, luego se le agregó 4 mL de HNO₃ (p.a.) y 4 mL de H₂O₂ al 30% v/v, posteriormente se digirieron en un horno microondas Milestone MLS 1200

Tabla 3 Programa de horno microondas utilizado para la digestión ácida.

| Etapa | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--------------|-----|---|-----|-----|-----|
| Potencia (W) | 125 | 0 | 250 | 400 | 600 |
| Tiempo (min) | 1 | 2 | 5 | 6 | 6 |

Mega usando un programa de cinco etapas (Tabla 3) Finalmente los extractos se llevaron a un volumen final de 20 mL con agua MilliQ, se filtraron por papel filtro y se guardaron en frascos de plástico para su análisis.

1.7. MUESTRAS PARA EXTRACCIÓN POR AGITACIÓN Y ULTRASONIDO

Para evaluar la metodología de extracción de CEP de la matriz biosólido, se trabajó con una muestra blanco y una muestra fortificada, tanto para biosólido de La Farfana como para el de Melipilla.

Las muestras de biosólido fueron fortificadas con CEP aproximadamente a una concentración de 5 µg/g de biosólido y llevadas a volumen de saturación, de igual manera fueron tratadas las muestras blanco. Posteriormente estas muestras fueron secadas a temperatura ambiente durante 24 h, se molieron y homogenizaron en un mortero de cerámica para luego ser almacenarlas en frascos plásticos.

1.8. MUESTRAS PARA LA VALIDACIÓN DE LAS TÉCNICAS

Para las muestras de orina, ésta fue diluida en agua grado HPLC en una razón orina:agua de 1:40 (Rossmann, 2014).

Para el caso de las muestras de biosólido se pesaron 10 g en balanza granataria ($\pm 0,01g$) de éste y se adicionó agua hasta alcanzar la saturación del biosólido. Posteriormente estas muestras fueron secadas durante 24 h, luego se molieron en mortero de cerámica, homogenizaron y finalmente fueron almacenadas en frascos plásticos.

2 CUANTIFICACIÓN DE CEP POR HPLC-DAD, GC- μ ECD Y CONFIRMACIÓN POR DSA-TOF-MS

2.1. ANÁLISIS POR HPLC-DAD

2.1.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE TRABAJO PARA HPLC-DAD

La cuantificación de CEP se realizó en un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia marca Shimadzu equipado de un detector de arreglo de diodos y una columna C18 (4,6 x 250mm x 5 μ m) de fase reversa a 25°C.

Se preparó una solución de 50 μ g/mL de CEP en agua y se utilizó durante toda la optimización. Se tomaron como base las condiciones de trabajo utilizadas en un estudio con antibióticos en orina [Wu, 2008] y se optimizaron para el trabajo con CEP en matriz acuosa. Para esto, se evaluaron los siguientes parámetros:

- Columna cromatográfica: C8 (4,6 x 100mm x 5 μ m) y C18 (4,6 x 250mm x 5 μ m).
- Flujo de la fase móvil: 0,8, 0,7 y 0,5 mL/min.
- Composición de la fase móvil:
 - Fase acuosa: Fase orgánica 85:15, 90:10
 - Ácido utilizado en la fase móvil: ácido acético (AcOH), ácido trifluoroacético (TFA).
- Tipo de elución de la fase móvil: isocrática o en gradiente.

Posteriormente, se probaron las condiciones elegidas para analizar CEP en las soluciones tanto en orina como en biosólido.

2.1.2. SOLUCIONES STOCK Y CURVA DE CALIBRACIÓN PARA HPLC-DAD

Se preparó una solución stock de CEP en agua grado HPLC de concentración 100 µg/mL de la cual se tomaron alícuotas para preparar los estándares de la curva de calibración. Se prepararon siete estándares en triplicado en un rango de concentración de 0,5 a 50 µg/mL en agua. Estas soluciones fueron utilizadas para la validación de las metodologías de análisis de CEP en ambas matrices.

Para el estudio en orina se preparó una curva de calibración en matriz entre 1 – 50 µg /mL, para lo cual se agregó igual volumen de orina sin diluir a un matraz de aforo y se fortificó con la solución stock de CEP, para luego completar el volumen con agua grado HPLC (orina:agua 1:40), tal como muestra la Figura 7.

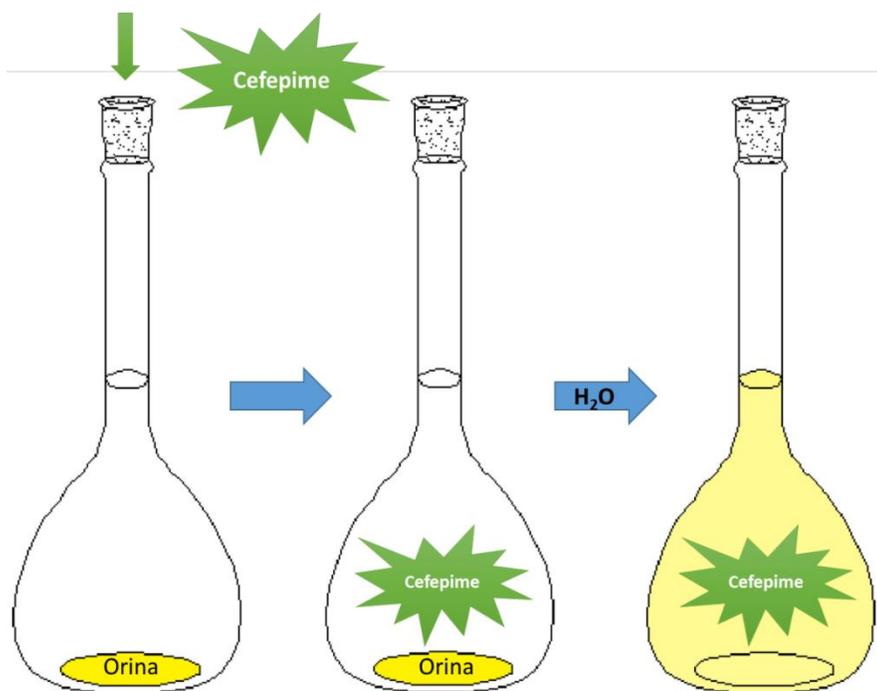


Figura 7 Diagrama de tratamiento a la muestra de orina

Por otro lado, se preparó una curva de calibración en extracto de biosólido para un rango de concentraciones en solución entre 1 – 50 µg /mL de CEP. Estos extractos fueron previamente sometidos al proceso de extracción.

Todas las soluciones en matriz orina y biosólido se filtraron con filtro de jeringa (membrana de 0,45 µm de poro) y se inyectaron en el HPLC.

2.1.3. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE CEP EN BIOSÓLIDO

Para la evaluación de la metodología de extracción de CEP en biosólido, se consideraron dos opciones: ultrasonido y agitación.

Se pesó 1 g del biosólido fortificado (corregido en relación a concentración en base seca) o blanco (1.2) en un tubo plástico de 15 mL por triplicado a los cuales se le agregaron 10 mL de agua grado HPLC. Para la metodología usando ultrasonido, los tubos se llevaron a un baño de ultrasonido por 30 min; y para la metodología usando agitación los tubos fueron agitados en agitador reciproco por 24 h.

Para la obtención de los extractos de ambas metodologías, los tubos fueron centrifugados por 30 min a 3000 rpm (Hermle), posteriormente se separó el sobrenadante por filtración simple y se almacenó en frascos plásticos (Figura 8).

De igual manera se realizó este proceso para los extractos utilizados en la curva de calibración de biosólido del apartado 2.1.2.

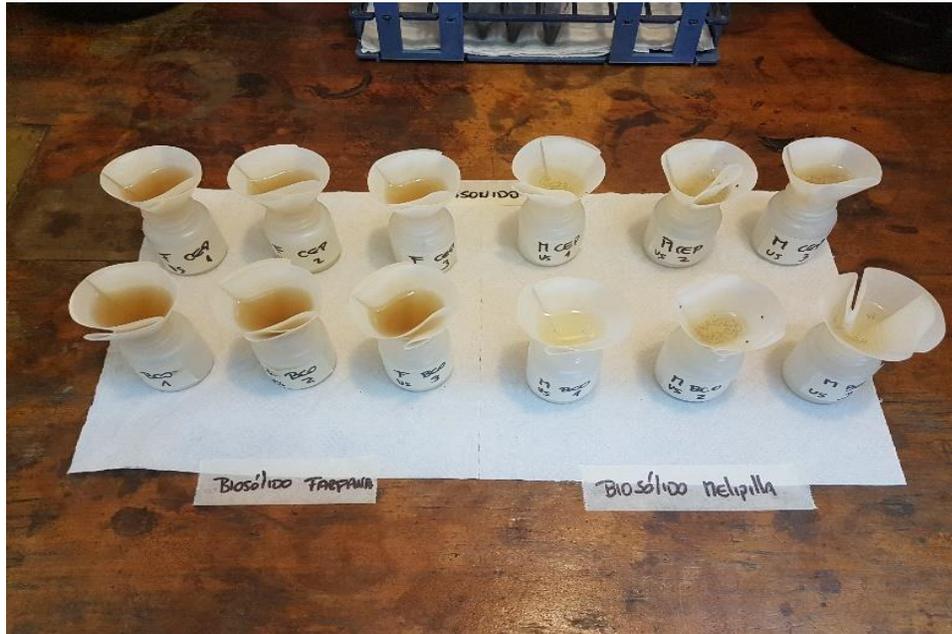


Figura 8 Extractos obtenidos de la extracción por ultrasonido de las muestras de biosólido de la Farfana y de Melipilla

2.1.4. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE CEP EN MATRIZ ACUOSA POR HPLC-DAD

Se prepararon soluciones de CEP en agua en un rango de concentraciones entre 0,5 y 6 μg CEP/mL en triplicado las cuales fueron almacenadas a 4°C y analizadas por HPLC-DAD a los 0, 8, 15 y 36 días. Posteriormente se prepararon soluciones de CEP en orina y biosólido a diferentes concentraciones en un rango de 1 a 50 μg CEP/mL en triplicado las cuales también fueron almacenadas a 4°C y se analizaron por HPLC-DAD a los 0, 7 y 14 días.

2.2. ANÁLISIS POR GC- μ ECD

2.2.1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

La cuantificación de CEP se realizó en un cromatógrafo de gases (Agilent, serie 7890A), equipado con un detector de microcaptura de electrones (μ -ECD) y una columna Agilent HP-5 (30m x 320 μ m x 0,25 μ m) usando nitrógeno como gas portador. Para la cuantificación se inyectaron 2 μ L de estándar o muestra al cromatógrafo utilizando los programas de temperatura del horno indicados en la tabla 4. Las condiciones cromatográficas utilizadas se presentan a continuación:

- Temperatura del inyector: 150°C
- Presión: 16,606 psi
- Flujo: 25,32 mL/min
- Flujo auxiliar: 20 mL/min
- Flujo de la columna: 2,314 mL/min.

Tabla 4 Programas de temperatura del horno 1, 2 y 3 para análisis de CEP por GC- μ ECD

| | Incremento de temperatura (°C/min) | Temperatura (°C) | Mantener (min) |
|-------------------|------------------------------------|------------------|----------------|
| <i>Programa 1</i> | | | |
| Inicial | | 150 | 1 |
| Rampa 1 | 85 | 250 | 2 |
| Rampa 2 | 50 | 300 | 6 |
| Tiempo total | | | 11 |
| <i>Programa 2</i> | | | |
| Inicial | | 150 | 1 |
| Rampa 1 | 85 | 250 | 2 |
| Rampa 2 | 50 | 300 | 8 |
| Rampa 3 | 5 | 310 | 2 |
| Tiempo total | | | 17 |
| <i>Programa 3</i> | | | |
| Inicial | | 100 | 1 |
| Rampa 1 | 25 | 130 | 2 |
| Rampa 2 | 42 | 300 | 2 |
| Tiempo total | | | 12 |

2.2.2. ESTUDIOS DE SOLUBILIDAD

Con el objetivo de elegir el solvente adecuado para la inyección de CEP en el cromatógrafo de gases, se evaluó la solubilidad de CEP en tres solventes de diferente polaridad. Para esto, se prepararon tres soluciones de 100 µg/mL de CEP en n-hexano, metanol y en acetato de etilo, se evaluó visualmente la solubilidad de CEP y se inyectaron al cromatógrafo de gases utilizando el programa de temperatura 1 de la tabla 4 con un tiempo total de análisis de 11 min.

2.2.3. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA GC-µECD UTILIZANDO HEXANO COMO SOLVENTE

Se prepararon soluciones de CEP en hexano con cinco niveles de concentración en un rango de entre 0,1 y 1000 µg/mL (SET 1). Se prepararon dos curvas de calibración, la primera curva consideró CEP en hexano y la segunda CEP con PCB 101 como estándar interno (EI) en el mismo solvente. Para la curva de calibración con EI, se modificó el programa de temperatura y se utilizó el programa 2 de la Tabla 4.

2.2.4. CAMBIO DE MATRIZ Y MODALIDAD DE INYECCIÓN

Se evaluó la cuantificación de CEP en matriz agua-orina por GC- µECD (SET 2), para esto se preparó una solución de CEP en agua de concentración 100 µg/mL que fue sometida a SPE y reconstituida en solvente orgánico (metanol). Posteriormente se inyectaron en el cromatógrafo de gases donde se evaluó la inyección en modo *split* (1:10) y *splitless*. En paralelo se prepararon muestras de orina fortificada con CEP en concentración 0,4 µg/mL y se les realizó el mismo procedimiento.

2.2.5. MUESTRAS UTILIZADAS PARA DERIVATIZACIÓN CON MSTFA

En una tercera etapa se preparó una solución de 200 µg/mL de CEP en agua (SET 3). De estas soluciones se tomaron alícuotas para preparar

estándares a tres niveles de concentración entre 0,5 y 140 µg/mL, en triplicado. Estas muestras fueron sometidas a SPE.

En otro experimento, se preparó una curva de calibración en hexano en un rango de concentración entre 20 y 140 µg/mL (SET 4), la cual fue sometida a SPE.

Por último, se preparó una solución de CEP en metanol de concentración 400 µg/mL (para los SET 5 y 6). Se tomaron cinco alícuotas de esta solución en triplicado (uno para el SET 5 y dos para el SET 6) y se llevaron a sequedad en atmosfera de N₂ a 30°C, las concentraciones se definieron en un rango entre 20 y 140 µg/mL con los volúmenes adicionados al momento de llevar a sequedad.

Resumen de soluciones:

SET 1: Soluciones en hexano con y sin EI. Programa de temperatura 1 de la tabla 4 (11 min)

SET 2: Soluciones en agua y orina para SPE. Reconstitución en metanol. Programa de temperatura 2 de la tabla 4 (17 min)

SET 3: Soluciones en agua de tres concentraciones utilizadas para SPE y posterior derivatización (hexano: MSTFA (99:1)). Programa de temperatura 3 de la tabla 4 (12 min).

SET 4: Soluciones de CEP en hexano: MSTFA (99:1) para posterior derivatización. Programa de temperatura 3 de la tabla 4 (12 min)

SET 5: Soluciones de CEP en metanol para reconstitución en hexano: MSTFA (99:1) y derivatización. Programa de temperatura 3 de la tabla 4 (12 min).

SET 6: Soluciones de CEP en metanol para reconstitución en acetato de etilo (+ DDE) y derivatización. Programa de temperatura 3 de la tabla 4 (12 min).

2.2.6. EXTRACCIÓN DE CEP PARA ANÁLISIS POR GC- μ ECD

- Extracción en fase sólida (SPE)

Para la evaluación de la SPE se usaron las soluciones del SET 2, 3 y 4, las cuales fueron sometidas a una extracción utilizando un disco con resina C18 (figura 9). Para esto se utilizaron 30 mL de metanol y 10 mL de agua para acondicionar la resina, luego se adicionaron 50 mL de la solución de CEP en agua u orina (figura 10). Posteriormente, se realizó una etapa de lavado con 20 mL de agua (en dos porciones) y finalmente, se eluyó con 10 mL de metanol. Las muestras fueron llevadas a sequedad a 45°C bajo atmosfera de nitrógeno.



Figura 9 Sistema de SPE con disco



Figura 10 Muestras de orina utilizadas en SPE

- Reconstitución en solvente orgánico - derivatización con MSTFA

Las muestras provenientes del SET 2 (SPE) se reconstituyeron en 1 mL de metanol y se inyectaron utilizando el programa de temperatura 2 de la Tabla 4.

Para la etapa de derivatización se usó N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) (figura 11), el cual se adicionó a las soluciones correspondientes al SET 3, 4 y 5, en proporción 99:1 de hexano: MSTFA.

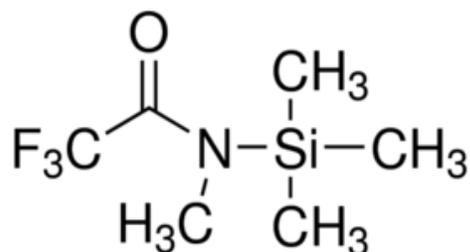


Figura 11 Estructura química de MSTFA

Las soluciones del SET 3, 4, 5 y 6 fueron derivatizadas (figura 12) calentándolas a 60°C por 1 hora. Se enfriaron a temperatura ambiente y se inyectaron en el cromatógrafo.

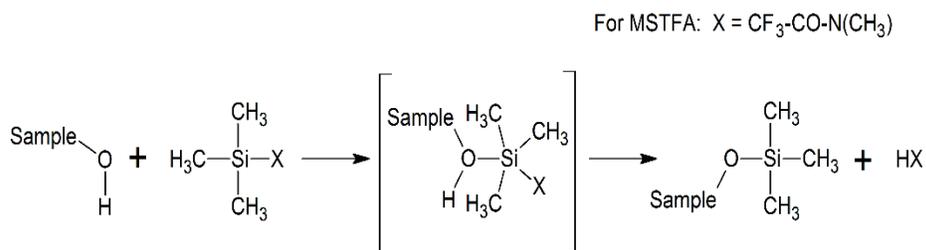


Figura 12 Reacción general de derivatización usando MSTFA

Por último, las soluciones correspondientes al SET 6 fueron reconstituidas en acetato de etilo y los duplicados en acetato de etilo y MSTFA en proporción 1:2. Luego de derivatizar, se inyectaron al cromatógrafo utilizando el programa de temperatura 3 de la tabla 4.

2.3. ANÁLISIS POR DSA-TOF-MS

2.3.1. CONDICIONES DE TRABAJO PARA DSA-TOF-MS

La confirmación de la presencia de CEP se realizó utilizando un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo acoplado a un análisis de muestra directa (DSA-TOF-MS), marca Perkin Elmer. Las condiciones del equipo fueron: Volumen de muestra: 10 μL ; Polaridad: Positiva; Corona: 3,0 μA ; *Drying gas Flow*: 3 mL/min; *APCI Heater*: 300 °C; Detector: 3800 Volts. Rango de m/z: 84 – 800.

El equipo fue calibrado utilizando una solución calibrante (APCI-L *Low Concentration Tuning Mix*) la cual se hace pasar constantemente en las mediciones. Esta solución contiene compuestos con m/z definidas: 121,0508; 322,0481; 622,0289; 922,0097; 1221,9906; 1521,9714; 1821,9523; 2121,9331.

2.3.2. SOLUCIONES UTILIZADAS EN EL ESTUDIO CON DSA-TOF-MS

En este estudio, se utilizaron las soluciones preparadas para las curvas de calibración para HPLC-DAD de CEP en agua, orina y biosólido mencionadas en el apartado 2.1.2. (curvas de calibración) y 2.1.4 (pruebas de estabilidad).

Además, se utilizaron las soluciones del SET 6 pertenecientes al análisis por GC- μECD .

2.3.3. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE CEP POR DSA-TOF-MS

Se evaluó la degradación de una solución de CEP en matriz acuosa recién preparada y conservada a temperatura ambiente (21°C). Para esto, se realizaron tres mediciones en un intervalo de 1 hora (0, 30, 60 min) utilizando el DSA-TOF-MS.

3 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN ANALÍTICA

3.1. SENSIBILIDAD

Una vez establecida la curva de calibración, se determinó la sensibilidad a partir de la pendiente de la curva, la cual corresponde a la sensibilidad de la técnica.

3.2. LÍMITE DE DETECCIÓN (LD)

Para la determinación del límite de detección se utilizó una solución de CEP con una concentración cercana al límite de detección estimado por bibliografía. En el caso del análisis por HPLC-DAD se utilizó una concentración de 1 µg CEP/mL. Por otro lado, en el caso del análisis por GC-µECD, se utilizó una concentración de 20 µg CEP/mL. Se tomaron 10 alícuotas de la muestra utilizada para evaluar el LD y se realizaron todas las etapas implicadas en el método analítico. A partir de los resultados obtenidos, se calculó la desviación estándar (σ) de las réplicas. Posteriormente se calculó la respuesta del LD (Y_{LD}) según la ecuación 2:

Ecuación 2 Cálculo de la respuesta del LD

$$Y_{LD} = 3\sigma \quad n \geq 10$$

Finalmente, se extrapoló el valor de Y_{LD} en la curva de calibración para obtener la concentración del LD.

3.3. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LC)

Para la determinación del límite de cuantificación se utilizó una solución de CEP con una concentración cercana al límite de detección estimado por bibliografía. En el caso del análisis por HPLC-DAD se utilizó una concentración de 1 µg CEP/mL. Por otro lado, en el caso del análisis por GC-µECD, se utilizó una concentración de 20 µg CEP/mL. Se tomaron 10 alícuotas de la muestra utilizada para evaluar el LC y se realizaron todas las etapas implicadas en el método analítico. A partir de los resultados obtenidos, se calculó la desviación estándar (σ) de las réplicas. Posteriormente se calculó la respuesta del LC (Y_{LC}) según la ecuación 3:

Ecuación 3 Cálculo de la respuesta del LC

$$Y_{LC} = 10\sigma \quad n \geq 10$$

Finalmente, se extrapoló el valor de Y_{LC} en la curva de calibración para obtener la concentración del LC.

3.4. PRECISIÓN

3.4.1. REPLICABILIDAD

Para la determinación de la replicabilidad se preparó una solución con concentración cercana al LC calculado del método, se tomaron 10 alícuotas de ésta y se les aplicó el método completo, respetando las siguientes condiciones: mismo analista, mismo instrumento y mismo día. Posteriormente, se determinó la concentración de CEP a partir de la curva de calibrado en las distintas matrices. La replicabilidad se expresó como la desviación estándar relativa (DER) o coeficiente de variación (CV) de las concentraciones.

3.4.2. PRECISIÓN INTERMEDIA

Para la determinación de la precisión intermedia se preparó una solución con concentración cercana al LC calculado del método, se tomaron 10 alícuotas de ésta y se les aplicó el método completo, cambiando una de las siguientes condiciones: el analista, el instrumento o el día. En este caso en particular, se cambió el día. Se evaluó también este parámetro para DSA-TOF-MS. En este caso, se cambió el analista. La precisión intermedia se expresó como la desviación estándar relativa (DER) o coeficiente de variación (CV) de las concentraciones.

3.5. RECUPERACIÓN

Para la determinación de la recuperación se compararon las concentraciones obtenidas de forma experimental a través de la interpolación de las áreas en la curva de calibración con la concentración teórica calculada. Se calculó la recuperación de acuerdo con la ecuación 4:

Ecuación 4 Porcentaje de recuperación

$$\%R = \frac{C_E}{C_T} * 100$$

C_E = Concentración experimental obtenida por la interpolación en la curva de calibración.

C_T = Concentración teórica obtenida a través de los cálculos matemáticos al momento de preparar la solución.

Se determinaron los parámetros analíticos tanto de la técnica como de la metodología utilizando HPLC-DAD, GC- μ ECD y DSA-TOF-MS.

3.6. LINEALIDAD

Se estudiaron las curvas de calibración de CEP en agua, orina y biosólido con el fin de comprobar la linealidad de estas. Con los resultados se preparó una tabla relacionando las concentraciones (x) y las respuestas (y). La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión, obtenida por un método de ajuste.

Se obtienen los valores del coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r^2) y coeficientes de variación de los factores de respuesta (f), según la ecuación 5, ecuación 6 y ecuación 7. Además, se realiza una prueba de carencia de ajuste.

Ecuación 5 Coeficiente de correlación

$$r = \frac{n(\sum y^2) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2) - \sqrt{(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}}$$

Ecuación 6 Coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(n(\sum y^2) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2) - (n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

Ecuación 7 Coeficiente de variación de factores de respuesta

$$f = \frac{y}{x}$$

RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MATRICES

Los resultados de la caracterización de las matrices, orina y biosólido se presentan a continuación en la tabla 5 y en Anexo (Tablas A1-A11):

Tabla 5 Resultados de la caracterización de matrices. N.A. = No Aplica; N.D.= No Determinado

| | Biosólido Farfana | Biosólido Melipilla | Orina |
|---------------------------------|-------------------|---------------------|--------------|
| pH | 6,56 ± 0,01 | 6,22 ± 0,01 | 5,75 ± 0,48 |
| C.E. (mScm⁻¹) | 5,77 ± 0,01 | 3,74 ± 0,02 | 29,26 ± 0,09 |
| C.O. | (%) | (%) | (mg/L) |
| | 72,9 ± 0,5 | 48,3 ± 0,3 | 8890 ± 685 |
| Vs (mL) | 0,94 | 1,15 | N.A. |
| Humedad (%) | 6,03 | 6,14 | N.A. |
| Metales | (mg/kg) | | |
| Cu | 436,9 ± 0,1 | 754,7 ± 0,1 | N.D. |
| Ni | 39,7 ± 0,1 | 27,81 ± 0,02 | N.D. |
| Zn | 1509,4 ± 0,1 | 834,2 ± 0,1 | N.D. |
| Pb | 95,33 ± 0,03 | 75,47 ± 0,02 | N.D. |

Tanto el biosólido correspondiente a La Farfana como el de Melipilla poseen un pH ligeramente ácido lo cual concuerda con estudios realizados en biosólidos en la región Metropolitana (Jachero, Ahumada, Fuentes, & Richter, 2016). La diferencia en el porcentaje de carbono orgánico se atribuye principalmente al tipo de tratamiento de obtención.

Los valores de conductividad eléctrica indican la presencia de mayor cantidad de sales y/o compuestos solubles en la orina, seguido del extracto de biosólido perteneciente a Farfana y, por último, extracto de biosólido de Melipilla. A mayor cantidad de iones presentes en la matriz, menor posibilidad de interacción del antibiótico con la materia orgánica debido a que se produce una competencia por los sitios activos de esta.

En el caso de la orina, el promedio del pH es ligeramente más ácido que el rango informado en (Randall & Naidoo, 2018), lo cual podría deberse a la dieta del voluntario ya que se ha descrito que dietas altas en consumo de carnes y alcohol producen una acidificación de la orina (Rose, Parker, Jefferson, & Cartmell, 2015). En todas las matrices el pH no es lo suficientemente ácido para cambiar la carga del analito ($pK_a = 3,25$ y $4,06$).

Con respecto a la concentración pseudo total de los metales pesados en las muestras de biosólido, se observa que todos los valores se encuentran dentro de la norma chilena NCh 2880 (Instituto Nacional de Normalización, 2003), siendo el biosólido de La Farfana el que presenta mayor concentración en todos la mayoría de los metales, lo cual se podría deber a la capacidad de tratamiento (volumen) de esta PTAS en comparación con la de Melipilla. Los resultados para metales pesados obtenidos en estos biosólidos son comparables en su mayoría con los que se presentan en el biosólido de la planta el Trebal, también ubicada en la región Metropolitana, donde el metal con mayor diferencia es el níquel que presenta casi cuatro veces mayor concentración que en el biosólido de la Farfana según (Camilla & Jordan, 2009).

Se realizó un análisis por medio del DSA-TOF-MS de los extractos de biosólidos y de la muestra de orina, los cuales se consideraron como blancos. Los resultados dieron cuenta de la presencia de una molécula de $m/z = 86$ en los blancos correspondientes a La Farfana. Esta molécula podría indicar la presencia de N-Metilpirrolidina protonado (NMP-H^+), el principal metabolito de CEP (Smith, Cox, Yudin, Reynolds, & Powell, 2015).

2 ANÁLISIS PARA HPLC-DAD

2.1. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA HPLC-DAD

Las condiciones cromatográficas utilizadas como base fueron las descritas por (Shih-Sheng, Chih-Yuan, & Yen-Hsia, 2008), con modificaciones como tipo de columna, composición y flujo de la fase móvil (Metodología 2.1.1)

A continuación, se presentan los cromatogramas correspondientes a las diferentes modificaciones realizadas a la metodología.

En la figura 13 podemos ver el cromatograma de tres muestras de CEP en agua, inyectadas en una columna C8 de 10 cm de largo, dos de ellas de concentración 50 µg/mL (roja y fucsia) y una de 100 µg/mL (azul). Para esta experiencia se utilizó un flujo de 1 mL/min y una composición de fase móvil isocrática de 70% CH₃COOH 0,1 M/ 30% AcN. Se observa una nula separación de los picos cromatográficos que podría deberse al efecto de la composición de la fase móvil, y además se observa un tiempo de retención de 1,5 min debido a la longitud de la columna sobre la señal cromatográfica.

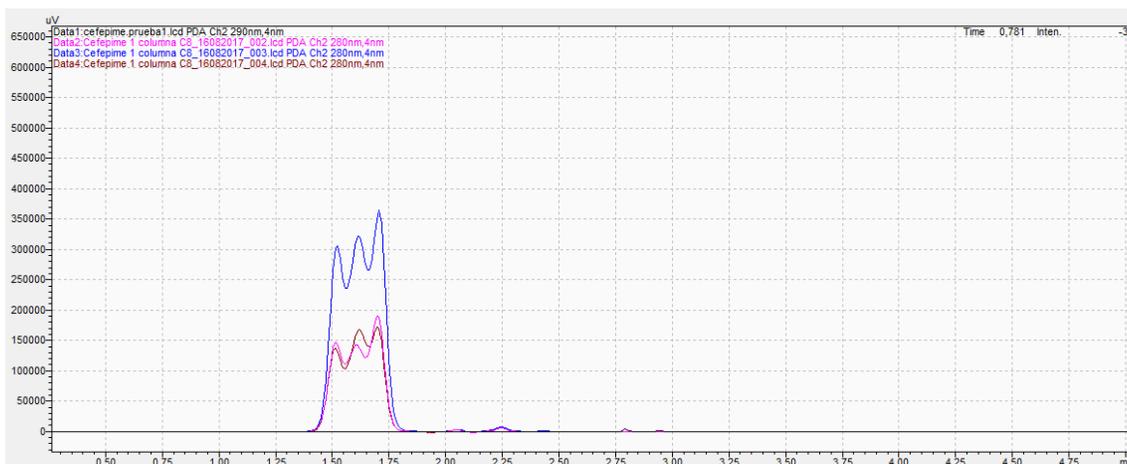


Figura 13 Cromatograma de CEP 50 y 100 µg/mL en columna C8 de 10 cm. Por HPLC-DAD

Si bien tanto en la columna C8 como en la C18 la fase estacionaria es alquílica, la cantidad de carbonos presentes en cada una marca una notoria diferencia en el tiempo de retención. C8 presenta una menor hidrofobicidad (menor porcentaje de carbono) (Merck, 2018) lo cual indicaría que es adecuada para un compuesto hidrofílico como el CEP. Sin embargo, el largo de la columna resulta desfavorable para una correcta resolución.

La eficiencia de una columna es directamente proporcional al número de platos teóricos (N), el cual a su vez es directamente proporcional con el largo de la columna (L) e inversamente proporcional al tamaño de partícula del relleno (d_p) (ecuación 8) (Harris, 2001).

Ecuación 8 Número de platos teóricos

$$N \approx \frac{3500L}{d_p}$$

Al calcular el número de platos teóricos para cada columna en condiciones óptimas, es decir en el mínimo de la curva de Van Deemter (Anexo Figura B1), la columna con resina C18 de 25 cm presenta un mayor número de estos (≈ 17.500) en comparación con la columna con resina C8 de 10 cm (≈ 7.000), lo cual indica que la primera columna presenta una mayor eficiencia en lo que respecta a la separación de los picos cromatográficos.

Debido a este resultado, se seleccionó para los análisis posteriores utilizar una columna C18 de 25 cm.

Se modificó el ácido utilizado para la preparación de la fase móvil a trifluoroacético (TFA) el cual, al ser un ácido fuerte, modifica el pH de la solución hasta valores más ácidos (cerca de 1), aumentando la interacción con la resina de la columna y generando asimetría en los picos.

En la Figura 14 se presentan cuatro cromatogramas correspondientes a las pruebas de variaciones en la relación ácido trifluoroacético/acetonitrilo (TFA/AcN) de la fase móvil. El cromatograma marrón de concentración de CEP de 100 µg/mL (isocrático 70%TFA/ 30%AcN), el azul de concentración de CEP de 50 µg/mL (isocrático 80%TFA/ 20%AcN) y, por último, los negro y rosa de igual concentración pero que se usaron en gradiente según la Tabla 6.

Tabla 6 Composición de la fase móvil en gradiente

| Negro | | Rosa | | Tiempo (min) |
|---------|---------|---------|---------|--------------|
| TFA (%) | AcN (%) | TFA (%) | AcN (%) | |
| 70 | 30 | 70 | 30 | 0-8 |
| 50 | 50 | 30 | 70 | 8-12 |
| 50 | 50 | 30 | 70 | 12-final |

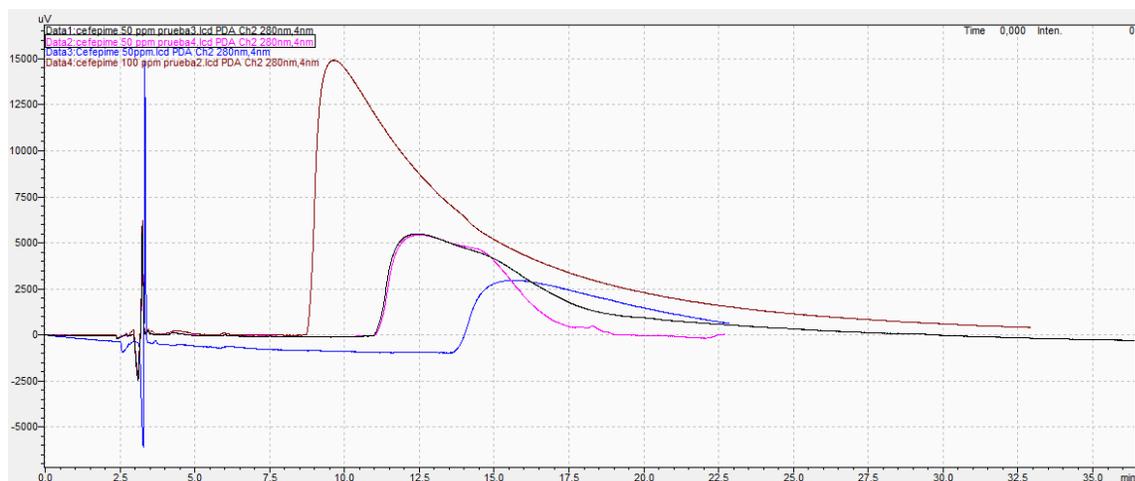


Figura 14 Cromatograma de CEP en concentración 50 y 100 µg/mL utilizando fase móvil TFA/AcN, con columna C18 de 25 cm analizado por HPLC-DAD

Los resultados obtenidos en el experimento anterior donde se modificó tanto la relación TFA/AcN como el tipo de elución (isocrática o en gradiente) no presentaron mejoras significativas. Es por esta razón que se decidió realizar una inyección adicional cambiando el TFA por ácido acético (CH_3COOH) en una proporción 90/10 de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{AcN}$ en elución isocrática (Shihn-Sheng, Chih-Yuan, & Yen-Hsia, 2008), obteniéndose buenos resultados en comparación a lo observado en la figura 14 con respecto a la resolución y a la simetría de los picos cromatográficos, razón por la cual, se decidió utilizar esta fase móvil para los análisis posteriores.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de los experimentos realizados para escoger el flujo de la fase móvil adecuado utilizando las condiciones elegidas en el experimento anterior respecto a la composición y tipo de elución de la fase móvil. En la Figura 15 se observan los cromatogramas correspondientes a tres flujos diferentes utilizando como fase móvil CH_3COOH 0,1M (90%) y AcN (10%): 0,5 mL/min (azul), 0,7 mL/min (rosa) y 1 mL/min (negro), todos en elución isocrática.

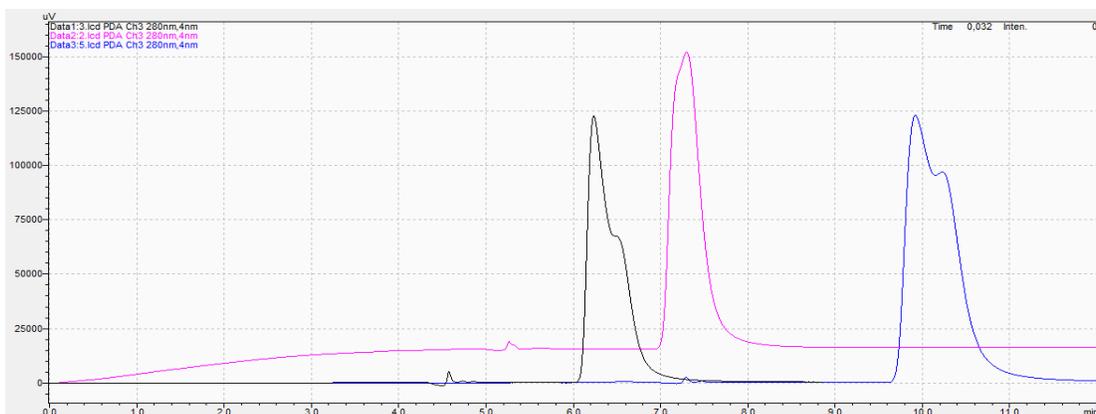


Figura 15 Cromatograma de CEP en concentración de $50 \mu\text{g}/\text{mL}$, usando distintos flujos de fase móvil $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{AcN}$, con columna C18 de 25 cm analizado por HPLC-DAD

En base a los resultados obtenidos se escogió el flujo de 0,7 mL/min para los análisis posteriores, debido a que se observa un pico más simétrico en comparación a los otros dos flujos y además se observa la separación del pico cromatográfico de CEP, de los picos correspondientes a los componentes presentes en cada matriz orina y biosólido, que eluyen a los 5,8 y 4,5 min, respectivamente.

Finalmente, las condiciones seleccionadas fueron: columna C18 de 25 cm, composición de fase móvil 90% CH₃COOH 0,1M/ 10% AcN y un flujo de 0,7 mL/min, las cuales permiten un tiempo de elución de CEP de aproximadamente 7,5 min, tiempo mayor, pero de la misma magnitud que lo reportado en otros estudios de CEP usando HPLC-UV (\approx 4 min) (Cherti, Kinowski, Lefrant, & Bressolle, 2001) (Ocaña, Jiménez, Callejón, & Barragán de la Rosa, 2004).

2.2. EVALUACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE CEP EN BIOSÓLIDO

Se evaluó la extracción de CEP de la matriz biosólido utilizando dos técnicas, agitación y ultrasonido. Para el estudio se consideró tanto el biosólido de Farfana (BSF) como el de Melipilla (BSM), los cuales fueron fortificados con una concentración de 1,9 y 2,4 μg CEP/g de biosólido, respectivamente. Sin embargo, en el caso del BSF, no fue posible la cuantificación por las dos técnicas, debido a que en el cromatograma había una señal de un interferente en el tiempo de retención de CEP (tiempo), la cual estaba presente tanto en el blanco como en la muestra de BSF fortificada.

En el caso de BSM la muestra, luego de ser fortificada, se llevó a saturación con agua se corrigió de acuerdo a la humedad. Finalmente, la concentración en base seca de CEP en BSM fortificado era de 2,4 μg CEP/g de biosólido.

Los resultados para el BSM se presentan en la Tabla 7. Donde para el caso de la metodología de extracción usando ultrasonido, presentó porcentajes de recuperación cercanos al 100% y una DER nueve veces menor con respecto a agitación. Además, ultrasonido requiere menor tiempo de extracción (30 min vs 12 h), siendo esta metodología elegida para el tratamiento de muestras posteriores. Considerando el porcentaje de recuperación (85,67%), se decidió usar los extractos del biosólido fortificados al final del proceso de extracción para las experiencias posteriores, como la validación de la metodología de HPLC-DAD y DSA-TOF-MS.

Tabla 7 Resultados extracción de CEP en BSM por medio de agitación y ultrasonido. ([CEP] experimental = \bar{x} [CEP] fortificado - \bar{x} [CEP] blanco) ([CEP]= μg CEP/g biosólido)

| Metodología | Muestra | ÁREA (mUA) | [CEP] interpolada | \bar{x} [CEP] | σ [CEP] | DER% | [CEP] experimental | Recuperación (%) |
|-------------|-------------------|---------------|----------------------|-----------------|----------------|--------|-----------------------|---------------------|
| AGITACIÓN | BSM Blanco 1 | 56641 | 0,574 | 0,574 | 0,003 | 0,565 | 3,779 | 155,390 |
| | BSM Blanco 2 | 56457 | 0,572 | | | | | |
| | BSM Blanco 3 | 57021 | 0,579 | | | | | |
| | BSM Fortificado 1 | 499814 | 5,576 | 4,354 | 1,059 | 24,317 | | |
| | BSM Fortificado 2 | 339614 | 3,768 | | | | | |
| | BSM Fortificado 3 | 335132 | 3,717 | | | | | |
| ULTRASONIDO | BSM Blanco 1 | 190200 | 2,082 | 2,217 | 0,119 | 5,371 | 2,081 | 85,678 |
| | BSM Blanco 2 | 210093 | 2,306 | | | | | |
| | BSM Blanco 3 | 206239 | 2,263 | | | | | |
| | BSM Fortificado 1 | 374388 | 4,160 | 4,298 | 0,119 | 2,776 | | |
| | BSM Fortificado 2 | 392882 | 4,369 | | | | | |
| | BSM Fortificado 3 | 392509 | 4,365 | | | | | |

2.3. CURVA DE CALIBRACIÓN HPLC-DAD

La preparación de las soluciones se realizó por pesada (Anexo Tabla B1). En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos de la curva de calibración de CEP en agua, realizada en triplicado entre 0,5 y 50 µg/mL.

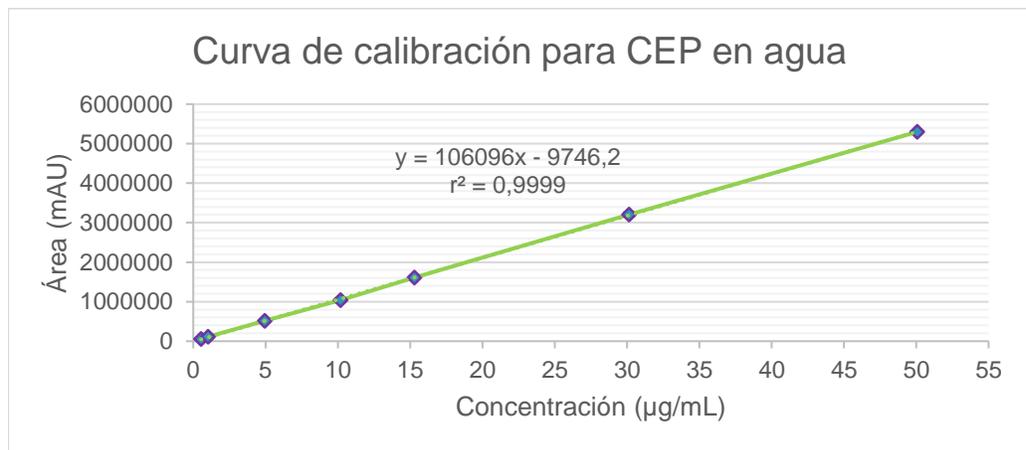


Figura 16 Curva de calibración de CEP en agua entre 0,5 y 50 µg/mL, análisis realizado por HPLC-DAD

Al realizar el análisis de datos se puede observar que posee un coeficiente de linealidad (r^2) de 0,999, lo que indica que el modelo estadístico lineal explica el 99,9% de los datos. Cabe destacar que la desviación estándar relativa es menor a 7,0% para todos los niveles de concentración.

Además, se realizó una prueba de carencia de ajuste con el fin de determinar si el modelo lineal es el adecuado para describir los datos observados (tabla 8). Puesto que el valor-P para el modelo en la tabla ANOVA es menor a 0,05 (0,0000) y que el valor- P para la carencia de ajuste en la tabla ANOVA (0,2575) es mucho mayor que 0,05, el modelo lineal describe adecuadamente la relación entre área y concentración de CEP con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 8 Tabla ANOVA para carencia de ajuste de curva de calibración de CEP en agua

| Fuente | Razón-F | Valor-P |
|--------------------|----------|---------------|
| Modelo | 78183,54 | 0,0000 |
| Carencia de Ajuste | 1,48 | 0,2575 |

2.4. CURVA DE CALIBRACIÓN EN MATRIZ

Para evaluar el efecto matriz sobre los resultados, se construyeron curvas de calibración en las matrices biosólido y orina, usando muestras fortificadas según 2.1.2, y en el caso del biosólido usando la metodología de extracción 2.1.3.

Los resultados del modelo estadístico lineal de las curvas de calibración de CEP tanto en orina como en extracto de biosólido se presentan en la ecuación 9 y ecuación 10 (Anexo Tablas B2 y B3).

Ecuación 9 Ajuste lineal para Concentración de CEP vs Área, para matriz orina. Por HPLC-DAD

$$\text{Orina: } \text{Área} = 105750[\text{CEP}] - 57794$$

Ecuación 10 Ajuste lineal para Concentración de CEP vs Área, para matriz biosólido Melipilla. Por HPLC-DAD

$$\text{BSM: } \text{Área} = 63658[\text{CEP}] - 32653$$

Se observa que en el caso de la orina la sensibilidad expresada como la pendiente de la curva de calibración que se muestra en la ecuación 9 es del mismo orden con respecto a la curva en agua (figura 16).

En el caso de los resultados obtenidos de la curva de calibración realizada en matriz BSM se puede observar una diferencia considerable en el valor de la pendiente, esta disminución fue producto de un problema con el equipo de HPLC, lo cual se verificó replicando la curva de calibración tanto en agua como en orina y comparando los resultados.

Tanto en la curva de CEP en agua como en la curva en orina se obtuvo una sensibilidad, expresada como la pendiente de la regresión lineal, un 40% menor a lo obtenido en las condiciones anteriores del equipo HPLC.

Finalmente se evaluaron nuevamente las tres curvas de calibración bajo las nuevas condiciones del equipo, los resultados se presentan en la Figura 17 (Anexo Tabla B3), donde se observa que las tres curvas de calibración de CEP en las diferentes matrices poseen igual sensibilidad. Se compararon las pendientes de las curvas de calibración en agua y en orina antes y después de la baja de sensibilidad en el equipo, determinándose que la disminución de las pendientes fue de 1,7 veces en ambos casos respecto a los valores obtenidos en las condiciones iniciales del equipo. Al aplicar este factor de corrección a la pendiente obtenida para la matriz BSM se obtiene un valor de 108218, el cual es del mismo orden que los obtenidos anteriormente para agua y orina. Esto permite que se puedan conservar los resultados obtenidos hasta el momento y sean comparables con los futuros resultados. En la Figura 18 se observa el cromatograma para CEP en matriz orina a varios niveles de concentración.

En general, los valores del coeficiente de correlación (r) y de determinación (r^2) tanto en este trabajo como en trabajos reportados anteriormente para la determinación de CEP en matrices orina, plasma y fluido de diálisis (Cherti, Kinowski, Lefrant, & Bressolle, 2001) (Ocaña, Jiménez, Callejón, & Barragán de la Rosa, 2004), fueron cercanos a 1 por medio de HPLC. Esto da cuenta de que el modelo lineal es el que más se ajusta a la respuesta obtenida del analito por esta técnica.

Por otro lado, los coeficientes de variación de factores de respuesta (f), considerados para determinar si los resultados se ajustan a un modelo lineal, se presentan en la tabla 8. Si bien en la matriz agua el valor de la DER de f obtenida es menor a un 2%, lo que se considera óptimo para un método cromatográfico (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, AEFI, 2001), los valores tanto para orina como para BSM no cumplen con este criterio.

Tabla 9 Resultados obtenidos para el coeficiente de variación de factores de respuesta (f) en las condiciones nuevas del HPLC-DAD para agua, orina y BSM

| | Agua | Orina | BSM |
|----------------|-------------|--------------|------------|
| $\bar{x} f$ | 60935,58 | 59265,93 | 56539,13 |
| σf | 599,35 | 3032,37 | 7873,48 |
| DER (%) | 0,98 | 5,12 | 13,93 |

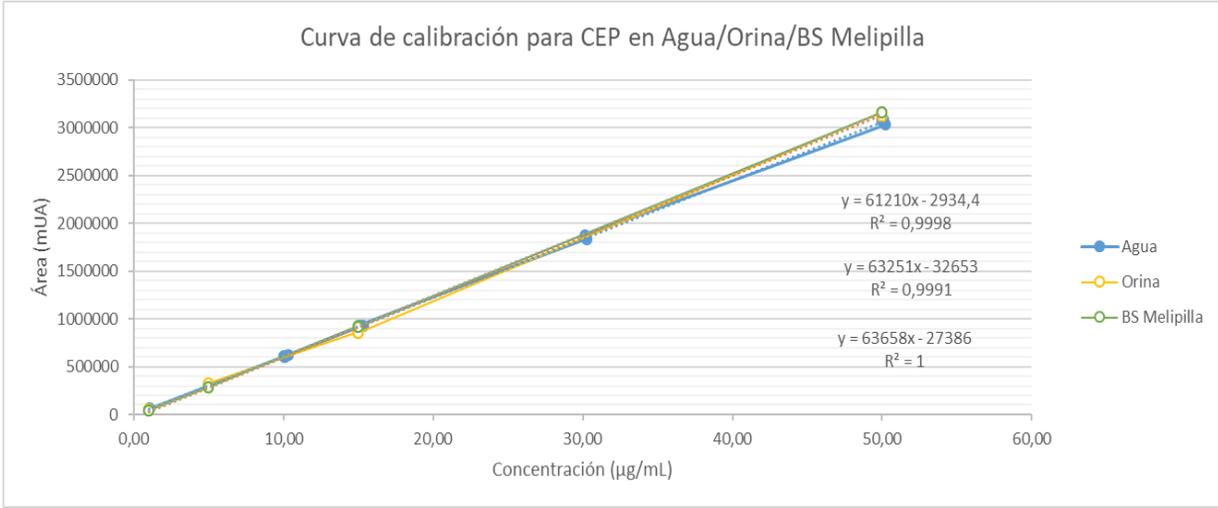


Figura 17 Curva de calibración de CEP en Agua/ Orina/ BSM, 0,5 - 50 µg/mL, HPLC-DAD

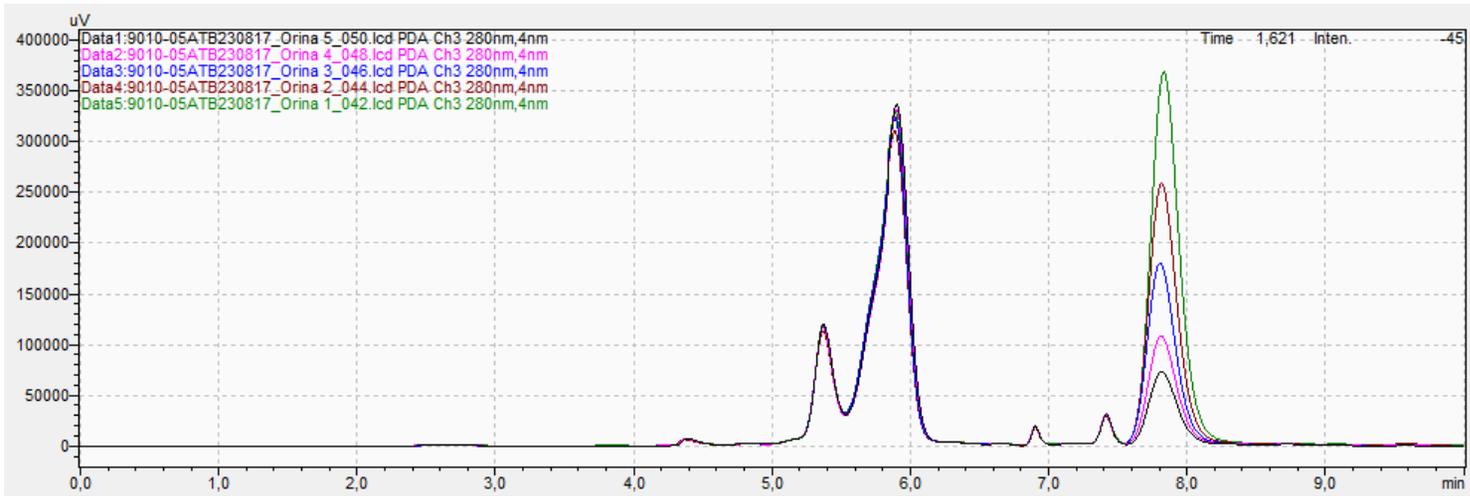


Figura 18 Cromatogramas de CEP (7,9 min) en Orina. Por HPLC-DAD

2.5. PRUEBAS DE ESTABILIDAD

Para las pruebas de estabilidad se consideraron las soluciones de CEP en agua, almacenadas a 4°C por 36 días en 6 niveles de concentración para un rango entre 0,5- 6,0 µg/mL, análisis realizado de acuerdo a la metodología 2.1.2, realizando la cuantificación del analito a los distintos tiempos por medio de HPLC-DAD, con las condiciones de trabajo optimizadas (según Resultados y Discusiones 2.1.).

Los resultados de la concentración obtenida versus el tiempo (Anexo Tabla B4) fueron utilizados para determinar el orden de la cinética de degradación de CEP, donde se pudo establecer que los resultados obtenidos siguen una cinética de degradación de primer orden (Figura 19 y Figura 20), lo que concuerda con estudios realizados en agua de una granja (Li, Zheng, Machesky, Yates, & Katterhenry, 2011), agua (Mitchell, Ullman, Tell, & Watts, 2014) y extracto de compostaje de estiércol (Ho, Pauzi, Abdul, & Saari, 2013).

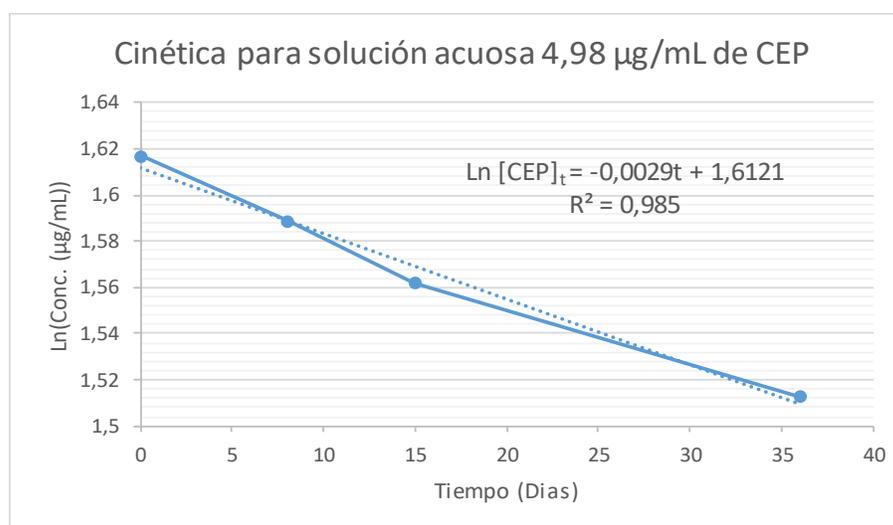


Figura 19 Modelo Lineal Ln [CEP] vs Tiempo para degradación de CEP 4,98 µg/mL, HPLC-DAD

A partir de la gráfica de Ln [CEP] versus el tiempo se determinó la constante de velocidad de reacción, la cual corresponde a la pendiente, obteniéndose un valor de $k=0,0029 \text{ días}^{-1}$, valor menor a lo reportado en (Mitchell, Ullman, Tell, & Watts, 2014) para dos cefalosporinas, Cefalotin ($0,133 \text{ días}^{-1}$ a 25°C) y Cefoxitin ($0,0712 \text{ días}^{-1}$ a 25°C), lo cual se explica por la temperatura a la que se está realizando el experimento. A mayor temperatura, mayor valor de la constante de velocidad (k). Esto según la ecuación de Arrhenius (ecuación 11) la cual describe la dependencia de k de una reacción química con respecto a la temperatura.

Ecuación 11 Ecuación de Arrhenius

$$k = A e^{\frac{-Ea}{RT}}$$

k = Constante de velocidad (días^{-1})

A = Factor de frecuencia (días^{-1})

Ea = Energía de activación (kJ/mol)

R = constante de gases ideales (kJ/mol)

T = temperatura ($^{\circ}\text{K}$)

Finalmente, la degradación de CEP en solución acuosa es de aproximadamente un 12% en 36 días, para un rango de concentración entre 0,5- 6,0 $\mu\text{g/mL}$.

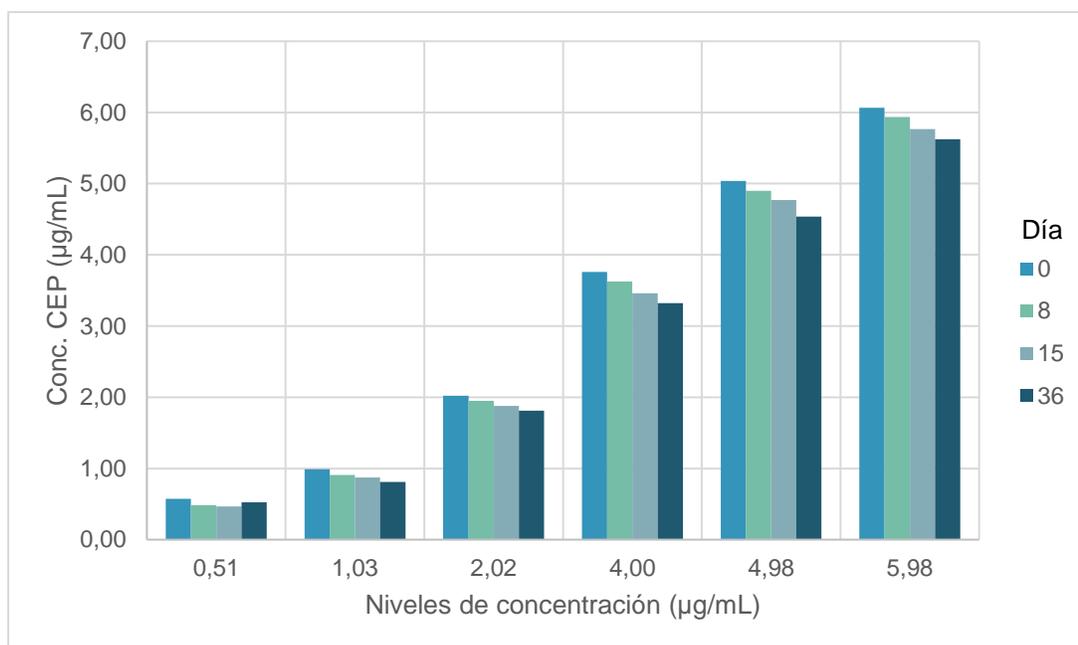


Figura 20 Disminución de [CEP] por días y nivel de concentración. Por HPLC-DAD

Se realizó una comparación por medio del software *Statgraphics* de las concentraciones de todas las muestras entre el día 0 y el día 36, con el objetivo de determinar si existían diferencias significativas en sus estadísticas. Se determinó que no existen diferencias significativas entre las medias y desviaciones estándar de las concentraciones de las muestras entre el día 0 y el día 36 con un 95% de confianza (tabla 10). Este resultado nos permite afirmar que se podría utilizar la misma curva de calibración en ese rango de tiempo almacenando las soluciones a 4°C.

Tabla 10 Análisis estadístico de los resultados para comparar medias y desviaciones estándar entre las muestras de CEP en solución acuosa a tiempo 0 y 36 días.

| Comparación | Hipótesis Nula | Hipótesis Alternativa | Intervalo de confianza ($\alpha = 0,05$) | Criterio | Resultado |
|------------------------------|-----------------------|------------------------------|--|-----------------|---------------------------------|
| Medias | = | < o > | [-1,38001; 1,92934] | Contener el 0 | No se rechaza la hipótesis nula |
| Desviaciones estándar | = | < o > | [0,38572; 3,4221] | Contener el 1 | No se rechaza la hipótesis nula |

Se realizó la misma prueba de estabilidad para las muestras de CEP en orina y biosólido, pero por 14 días (Anexo Tabla B5). Estas muestras presentan una menor degradación que en el caso anterior. En promedio para 4 niveles de concentración se encontró que en el caso de la orina hay una degradación de aproximadamente un 8,2% y en el caso del biosólido de un 3,2% en los 14 días. Esto puede deberse a la presencia de mayor contenido de carbono orgánico en estas matrices, el cual interaccionaría con el antibiótico (adsorción del antibiótico en la materia orgánica) evitando su degradación (Thiele-Bruhn, 2003).

2.6. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La determinación de los LD y LC de la metodología por HPLC-DAD se realizó analizando 10 alícuotas de CEP en cada matriz (agua, orina y biosólido), para luego realizar el cálculo según lo mencionado en la metodología (3.2 y 3.3).

Los resultados obtenidos de LD y LC se presentan en la tabla 11 (Anexo Tabla B6) , para el caso específico de LD y LC en matriz agua y orina los resultados obtenidos fueron 10 veces menores a lo descrito en un estudio que analizó CEP en orina humana, donde los valores de LD y LC estarían cercanos a 1 $\mu\text{g/mL}$ (Ocaña, Jiménez, Callejón, & Barragán de la Rosa, 2004),.

En el caso del BSM, los resultados de LD y LC fueron el doble de los obtenidos para matriz agua, lo cual concuerda con la complejidad de la matriz, permitiendo determinar concentraciones en el extracto de BSM desde 0,4 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 11 Resultados de límites de detección (LD) y cuantificación (LC) para CEP en agua, orina y biosólido de Melipilla (BSM) por HPLC-DAD

| | CEP Agua | CEP Orina | CEP BSM |
|---------------------|----------|-----------|---------|
| LD $\mu\text{g/mL}$ | 0,071 | 0,110 | 0,129 |
| LC $\mu\text{g/mL}$ | 0,126 | 0,255 | 0,318 |

2.7. PRECISIÓN (HPLC-DAD)

Se realizaron pruebas para determinar la precisión a nivel de repetibilidad y precisión intermedia de la metodología expresada como la desviación estándar relativa (DER). Para esto se consideraron 10 alícuotas de las muestras de CEP en agua, todas ellas preparadas según Metodología 2.1.2., usando las condiciones de HPLC descritas en el párrafo final de Resultados 2.1. y con una concentración de 1 µg/mL. El criterio usado para determinar la precisión a nivel de repetición intermedia fue medir en distintos días.

Los resultados para repetibilidad dan cuenta de una DER de 0,739 % lo cual indica que la técnica es precisa a nivel de repetibilidad, a un nivel 10 veces mejor a lo reportado en otros estudios que consideran CEP en otras matrices (tabla 12), donde el efecto matriz afecta negativamente los resultados. Cabe destacar que el equipo cuenta con *autosampler*, lo que facilita que la precisión sea adecuada. En el caso de la precisión intermedia se presenta una DER de 0,747%, valor que indica una alta precisión (Anexo Tabla B7). Por otro lado, el ANOVA (tabla 13) para la concentración por días nos entrega un valor de P de la razón F de 0,8332 lo cual al ser mayor a 0,05 nos indica que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las mediciones para ambos días.

Tabla 12 Resultados de precisión para otros estudios que consideran cefepime en diferentes matrices. (REP= repetibilidad) (P.I.= precisión intermedia)

| Analito | Matriz | Rep. (DER%) | P.I. (DER%) | Bibliografía |
|---------|--------|-------------|-------------|---|
| CEP | Orina | 3,6 | 4,0 | (Ocaña, Jiménez, Callejón, & Barragán de la Rosa, 2004) |
| CEP | Orina | 7,8 | 7,6 | (Cherti, Kinowski, Lefrant, & Bressolle, 2001) |
| CEP | Plasma | 1,4 | 1,8 | (Valassis, Parissi-Poulou, & Marcheras, 1999) |

Tabla 13 Análisis de varianza (ANOVA) para la precisión intermedia. (gl= grados de libertad)

| Fuente | Suma de Cuadrados | gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------------|
| Entre grupos | 0,000005 | 1 | 0,000005 | 0,05 | 0,8332 |
| Intra grupos | 0,00197 | 18 | 0,000109 | | |
| Total (Corr.) | 0,001975 | 19 | | | |

2.8. RECUPERACIÓN

Se evaluó la recuperación de CEP en agua, orina y en el extracto de BSM (obtenido por la metodología de extracción con ultrasonido) al cuantificar por medio de HPLC para estas matrices. Para esto se consideraron muestras para todo el rango de concentraciones de la curva de calibración (Anexo Tabla B8). En la tabla 14 se presentan los resultados promedios obtenidos en este estudio para cada matriz.

Tabla 14 Recuperación porcentual promedio (R) de CEP en agua, orina y BSM. Por HPLC-DAD

| Matriz | R (%) |
|--------|-------|
| Agua | 100.7 |
| Orina | 98.3 |
| BSM | 96.3 |

En general, los porcentajes de recuperación para las tres matrices son similares y muy cercanos al 100%. Se observa una tendencia a disminuir levemente al aumentar la complejidad de la matriz.

3 ANÁLISIS POR GC- μ ECD

En el caso de la cuantificación de CEP por medio de cromatografía de gases con detector de μ ECD, no se encuentra descrito en literatura. Lo cual nos lleva a no tener una metodología de base, motivo por el cual se realizaron pruebas preliminares con en el analito para determinar las condiciones de trabajo del equipo, entre las cuales están la selección de solvente, modificación de la matriz, modalidad de inyección.

3.1. ESTUDIOS DE SOLUBILIDAD Y PRIMERAS INYECCIONES EN HEXANO

Se probaron diferentes solventes con el objetivo de evaluar la solubilidad de CEP en estos y elegir el que se usaría para la inyección al cromatógrafo de gases. Los resultados muestran que CEP posee una solubilidad ascendente en el siguiente orden: n-hexano < acetato de etilo < metanol.

En primera instancia se eligió intentar trabajar con n-hexano debido a su alta afinidad con la fase estacionaria y a pesar de ser el solvente con menor afinidad a CEP. Los resultados de las pruebas con este solvente (SET 1) muestran una señal perteneciente a CEP en 6,7 min. Se decidió realizar una curva de calibración la cual presentaba una nula correlación en los datos inclusive usando estándar interno ($r^2= 0,0794$ y $r^2= 0,1139$, respectivamente). Es por este motivo que posteriormente se cambió el solvente utilizado a metanol, el cual es altamente polar y posee gran afinidad con CEP ($\log k_{ow}$ de -0,37) (DrugBank, 2016). Se utilizaron las muestras pertenecientes al SET 1 descritas en Metodología 2.2.3.

3.2. CAMBIO DE MATRIZ Y MODALIDAD DE INYECCIÓN

Con el objetivo de eliminar el problema de la solubilidad, se decidió comenzar solubilizando CEP en agua para, posteriormente, realizar una extracción en fase sólida (SPE) con reconstitución en metanol. En paralelo se realizó el mismo experimento, pero partiendo desde una muestra de orina fortificada con CEP con el fin de identificar señales pertenecientes a la matriz orina. Se utilizaron las muestras pertenecientes al SET 2 descritas en Metodología 2.2.4.

Los cromatogramas obtenidos de los extractos de SPE inyectados en modo *splitless* y utilizando el programa de temperatura 2 de la tabla 4, presentaron una señal de gran intensidad correspondiente a metanol en un tiempo de retención de 2,8 min. Por este motivo se utilizó el modo de inyección *split*.

En la figura 21 se presenta el cromatograma de una muestra de CEP 100 µg/mL en metanol inyectada en modo *split* con el fin de disminuir la señal perteneciente al frente de solvente. A pesar de que se logra este propósito, no se consigue distinguir una señal perteneciente a CEP, lo cual podría deberse a que en este modo de inyección el solvente que contiene el analito se libera, disminuyendo el transporte del CEP a través de la

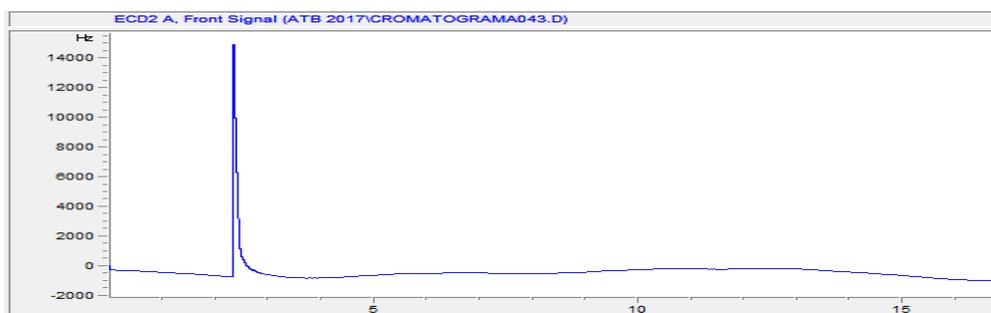


Figura 21 Cromatograma CEP en metanol inyectado en modo *split*. Por GC-µECD

columna cromatográfica. Por esta razón se descarta el uso del modo *split*, eligiendo el modo *splitless* para los experimentos posteriores.

En las condiciones de trabajo descritas en Metodología 2.2.1 y utilizando el programa de temperatura 2 de la tabla 4, se consiguió identificar una señal que podría corresponder a CEP, fortificando la muestra de concentración inicial 100 µg/mL con CEP sólido. Esto se realizó tanto en la solución patrón como en la muestra de orina. A continuación, se presentan los cromatogramas correspondientes a la muestra de orina sin fortificar (azul) y la misma muestra fortificada con CEP sólido (rojo) (figura 22).

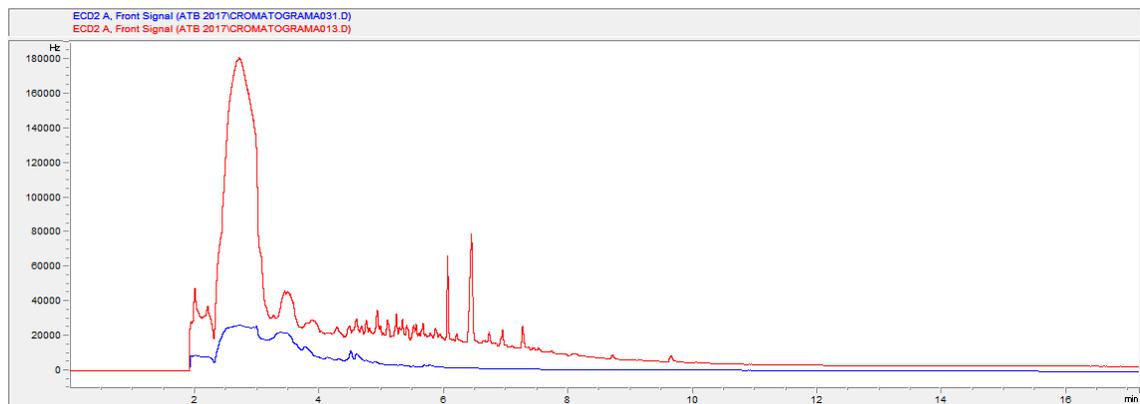


Figura 22 Cromatograma de CEP en orina (azul) y orina re-fortificada con CEP sólido (rojo). Por GC-µECD en modo *splitless*.

3.3. DERIVATIZACIÓN CON MSTFA

Finalmente, se realizó la derivatización del analito con MSTFA, el cual afecta los grupos con hidrógenos activos (-OH, -SH y -NH) (Sigma-Aldrich, 2019) por lo que se cambió el solvente de reconstitución de las muestras a uno que no interaccione con el MSTFA.

Los resultados del experimento con el SET 3 no se consideraron en el estudio.

Para este experimento se utilizó hexano como solvente para la preparación de la curva de calibración debido a la afinidad de este con la columna y el detector utilizados en el cromatógrafo (muestras pertenecientes al SET 4). En este caso y los posteriores se utilizó el programa de temperatura 3 de la tabla 4. Si bien se encontró una señal que podría corresponder a CEP, los datos no se correlacionaban entre sí, lo cual podría deberse, al igual que en el primer experimento para GC, a la solubilidad de CEP en hexano en la etapa de preparación de la curva de calibración.

Es por este motivo que se consideró realizar la curva de calibración en MeOH, secar la muestra en atmósfera de N₂ y posteriormente, reconstituir en una mezcla de hexano con MSTFA en una proporción de 99:1 para luego derivatizar (SET 5 igual que las muestras del SET 4). Los resultados de esta experiencia no fueron considerados debido a que no presentaban correlación entre sí.

Se decidió entonces utilizar acetato de etilo (EtOAc) como solvente para realizar la reconstitución de la muestra luego del secado (SET 6), debido a que presenta mayor polaridad y, por lo tanto, mejor afinidad con CEP. Además, EtOAc al ser un solvente orgánico neutral, solo disuelve el analito y no presenta interacción con el derivatizante. Existen autores que

describen el proceso de derivatización utilizando Piridina como solvente (Migowska, Caban, Stepnowski, & Kumirska, 2012), la cual, al ser una base de Lewis, activa los grupos ácidos, elimina los productos ácidos de la reacción y, por lo tanto, desplaza el equilibrio hacia la formación del producto de interés.

Los resultados de las primeras pruebas de CEP en EtOAc sin derivatizar utilizando DDE como estándar interno (EI), proporcionaron resultados favorables (Anexo Tabla C1). Como se observa en la figura 23, existe un buen ajuste de las razones de área de CEP y EI en el rango de concentraciones utilizado para la experiencia (20 a 140 µg/mL), al modelo lineal, presentando un r^2 de 0,9613.

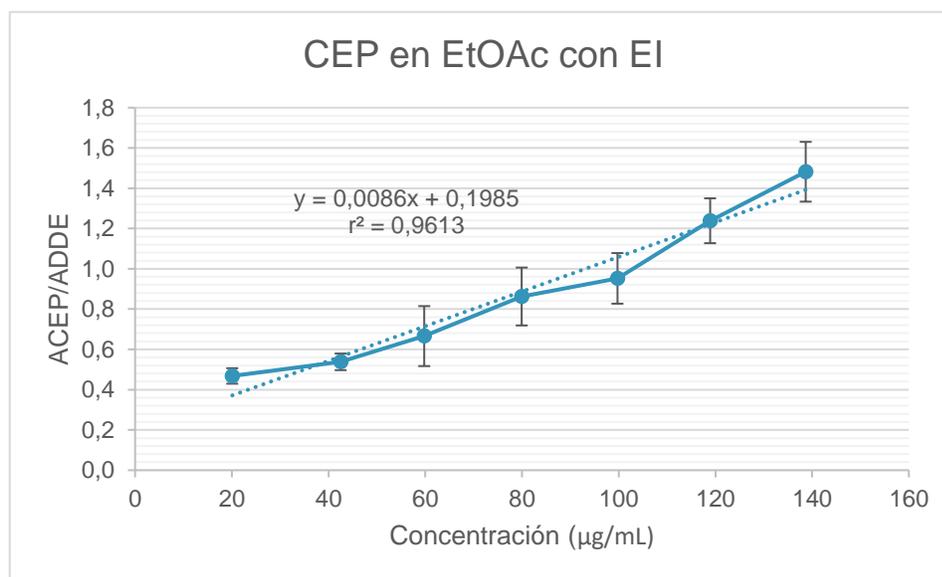


Figura 23 Curva de calibración de CEP en acetato de etilo con EI (DDE), análisis por GC-µECD

En la figura 24 se presenta el cromatograma obtenido de las pruebas de CEP en EtOAc utilizando EI. CEP presenta un tiempo de retención de 4,17 min siendo la primera señal integrada en el cromatograma. Por otro lado, EI presenta tres señales, probablemente correspondientes a productos de degradación, que se observan al final del cromatograma. Para la cuantificación se utilizó la última señal que presenta una mejor resolución y un tiempo de retención de 10,80 min.

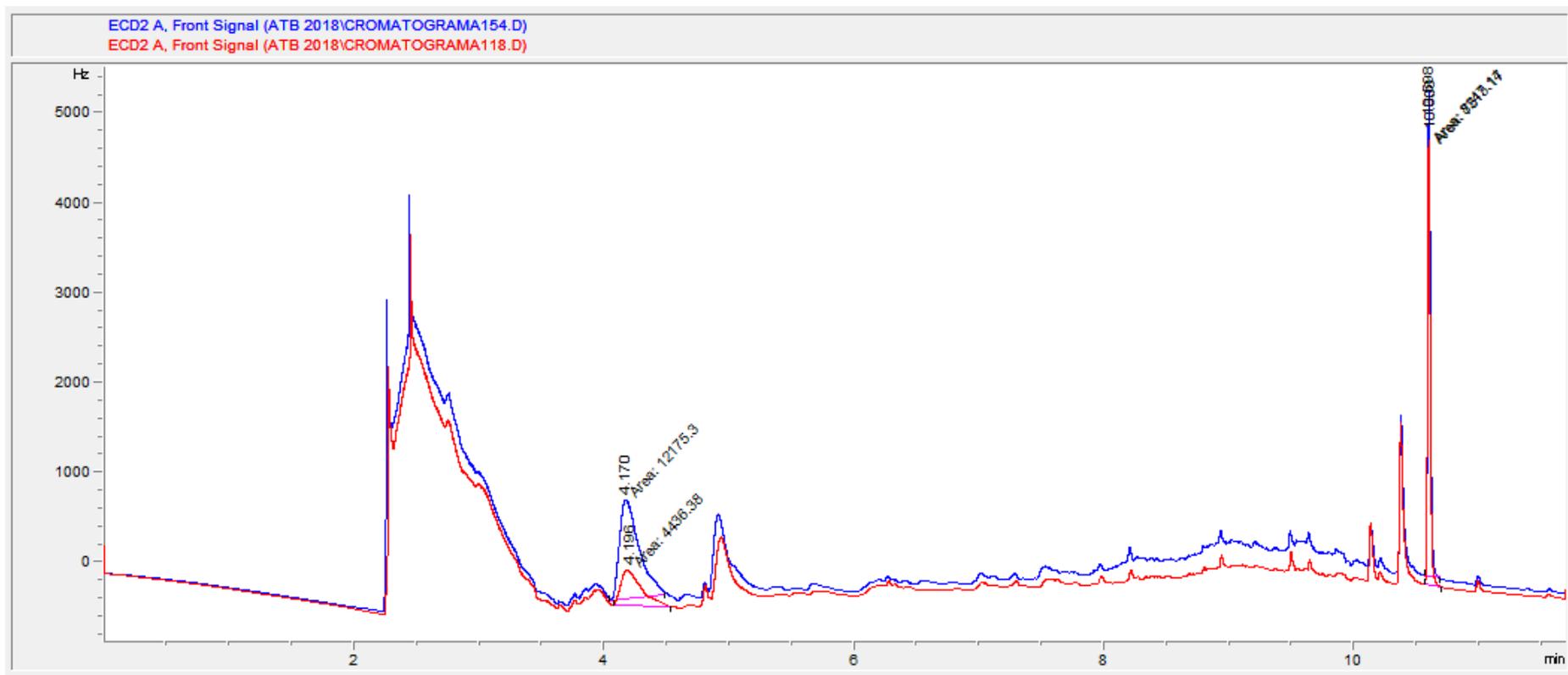


Figura 24 Cromatogramas de CEP sin derivatizar en EtOAc con EI. Concentración de CEP: 20 µg/mL (Rojo) y 120 µg/mL (Azul), analizado por GC-µECD

De manera paralela, se realizó la derivatización de las mismas soluciones y se cambió el solvente utilizado, así como también la proporción de la mezcla solvente: derivatizante, utilizando una proporción 1:2 (EtOAc:MSTFA). Al no utilizar piridina como catalizador de la reacción, se utilizó un exceso del derivatizante con el fin de desplazar el equilibrio hacia la formación de producto.

En la figura 25 se observa como el proceso de derivatización mejora considerablemente la correlación entre los datos (Anexo Tabla C2). Cabe destacar que, para la comparación, en la curva de calibración sin derivatizar se utilizó solo el área de CEP y no la relación de áreas con el objetivo de comparar las sensibilidades en una misma escala y, además, se eliminó el ultimo nivel de concentración. Asimismo, se realizó una prueba de carencia de ajuste que presentó un valor-P para el modelo en la tabla ANOVA menor a 0,05 (0,0000) y un valor-P para la carencia de ajuste en la tabla ANOVA (0,7832) mucho mayor que 0,05, lo cual indica que el modelo lineal se ajusta a los datos observados para CEP derivatizado con un nivel de confianza de 95%.

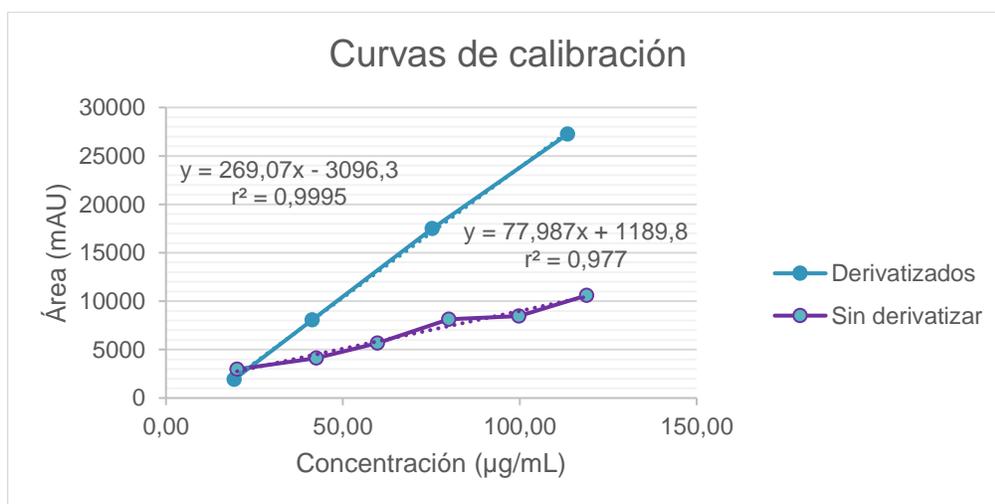


Figura 25 Comparación de los ajustes lineales para CEP derivatizado y sin derivatizar. Por GC-µECD

En la figura 26 se presenta el cromatograma obtenido de las pruebas de derivatización de CEP en EtOAc. En este caso, CEP presenta un tiempo de retención de 9,87 min, el cual es mayor al del experimento anterior debido a que la molécula derivatizada presenta menor polaridad y, por lo tanto, una mayor afinidad a la columna utilizada en la técnica.

Finalmente, la metodología seleccionada para la cuantificación de CEP en matriz acuosa por medio de GC- μ ECD fue aquella que consideró las condiciones cromatográficas descritas en Metodología 2.2.1. Para este análisis se disuelve CEP en MeOH, esta solución fue llevada a sequedad, y fue reconstituida en una mezcla de EtOAc y el agente derivatizante MSTFA (1:2). El proceso de derivatización consideró un tiempo de reacción de 1 hora a 60°C, para luego dejar enfriar a temperatura ambiente y por último ser inyectado en el cromatógrafo de gases utilizando el programa de temperatura 3 de la tabla 4, obteniéndose un tiempo de retención para CEP de 9,87 min.

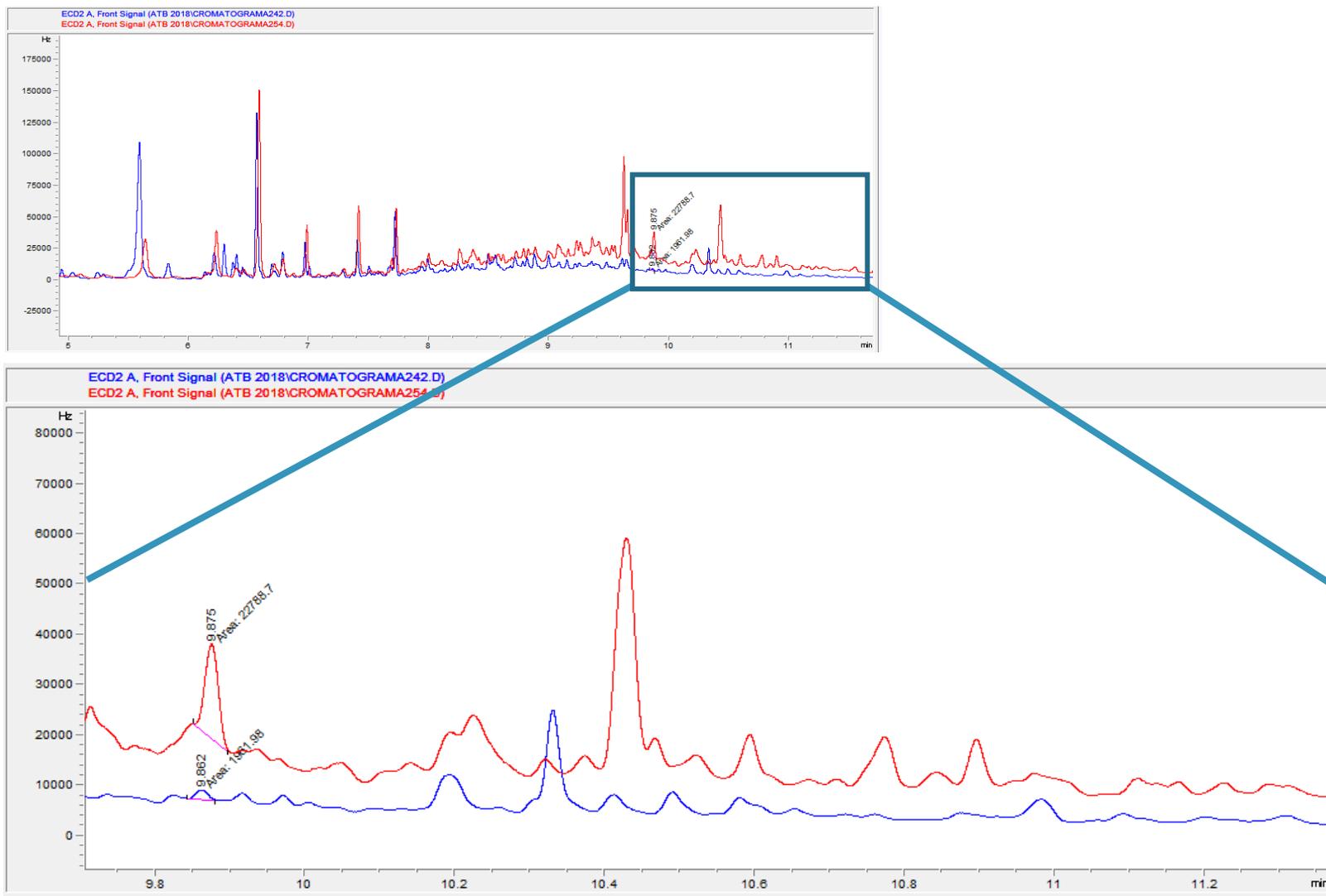


Figura 26 Cromatograma de CEP derivatizado (9,87 min), análise por GC- μ ECD

3.4. PRECISIÓN

Se evaluó la precisión de la metodología tanto a nivel de repetibilidad como de precisión intermedia (se utilizó como criterio las mediciones en diferentes días) expresada de manera porcentual como desviación estándar relativa (DER %) en los extremos de la curva de calibración.

Para las concentraciones de los extremos de la curva de calibración (20 y 120 ppm) se obtuvo un valor de DER de 0,83% y 3,54%, respectivamente. Lo cual indica que es una metodología precisa a nivel de repetibilidad para el análisis de CEP derivatizado por GC- μ ECD.

Por otro lado, los resultados de precisión intermedia obtenidos para estas dos concentraciones fueron 0,86% y 5,23%, respectivamente. Además, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor para comprobar si existían diferencias significativas entre los datos de ambos días (Anexo Tabla C3). Los resultados de este análisis presentan un valor P para la razón F de 0,0513, el cual al ser mayor a 0,05 indica que no existen diferencias significativas entre ambos días para la concentración más baja con un 95% de confianza. En el caso de la concentración más alta, presenta un valor P para la razón F de 0,0001, que al ser menor a 0,05 indica que existe una diferencia significativa entre los datos de ambos días con un 95% de confianza.

3.5. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Se evaluó LD y LC para CEP derivatizado y analizado por GC- μ ECD en solvente. Se inyectó 10 veces la muestra de la concentración más baja de la curva de calibración de CEP (20 $\mu\text{g/mL}$) y se interpolaron los resultados con la ecuación de CEP derivatizado. Se calcularon LD y LC según las ecuaciones tal como se menciona en el apartado 3.2. y 3.3.

Se determinó que los valores de LD y LC son 0,46 $\mu\text{g/mL}$ y 1,56 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Anexo Tabla C3), lo cual permite trabajar en un rango de concentración más amplio. Además, estos valores se asemejan a los resultados obtenidos para HPLC-DAD en este mismo estudio.

3.6. RECUPERACIÓN

Se evaluó también la recuperación de CEP al aplicar la metodología de derivatización con MSTFA. Para esto se consideraron muestras para todo el rango de concentraciones de la curva de calibración (20 – 120 $\mu\text{g/mL}$) y se calculó un promedio de recuperación.

El análisis de datos da cuenta de una recuperación promedio de CEP derivatizado en el rango antes mencionado de un 99,53%. (Anexo Tabla C4)

4 ANÁLISIS POR DSA-TOF-MS

4.1. OPTIMIZACIÓN

La confirmación del analito se realizó por medio de *Direct Sample Analysis- Time Of Flight- Mass Spectrometry* (DSA-TOF-MS), que permite analizar directamente la muestra o realizar el mínimo tratamiento de la ésta (figura 27). En el caso de DSA-TOF-MS, y al igual que con las otras técnicas, también se realizaron pruebas para identificar la m/z perteneciente a CEP. Para esto se tomaron como referencia los parámetros utilizados en otro estudio donde se determinó la huella dactilar de materia orgánica disuelta presente en agua de río (Garrido & Mendoza, 2016).



Figura 27 Malla del DSA cargada con muestras de CEP

En otros estudios que utilizaron espectrometría de masas para identificar CEP (Masoud, Ali, Ghareeb, & Nasr, 2016) se observa la presencia del ion molecular protonado de CEP con una m/z de 481, el cual es utilizado para la cuantificación. Sin embargo, esta m/z no logró ser identificada en las pruebas realizadas en este estudio usando DSA-TOF-MS, lo que sugería que la molécula era totalmente fraccionada en el equipo con los

parámetros utilizados y que, por lo tanto, era necesario buscar los fragmentos predominantes. Los resultados de las primeras pruebas de CEP en agua no presentaban linealidad en ninguna de las señales que podrían haber pertenecido a fragmentos de CEP.

Según (Smith, Cox, Yudin, Reynolds, & Powell, 2015), CEP al ser ionizado en polaridad positiva, produce dos iones principales: $[\text{CEP-H}]^+$ y $[\text{CEP-2H}]^{+2}$, los cuales son rápidamente fragmentados en la interfase del espectrómetro de masas por una disociación inducida por colisión (en inglés *collision-induced dissociation*, CID) formando N-Metil-Pirrolidina protonada ($[\text{NMP-H}]^+$) que posee una m/z de 86 (figura 28). La abundancia de este producto depende del voltaje ocupado en la interfase del espectrómetro de masas. Es por este motivo que se decidió aumentar el rango de masas en el cual se estaba midiendo desde m/z 84 hasta 800.

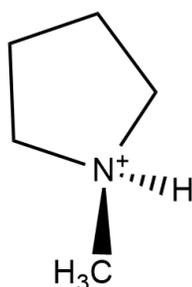


Figura 28 NMP
protonada (m/z 86)

A continuación, se presenta el espectro de masas obtenido de una muestra de agua fortificada con CEP (100 $\mu\text{g/mL}$) y sembrada en la malla del DSA (figura 29).

CEP in Water
RET (06.20058)

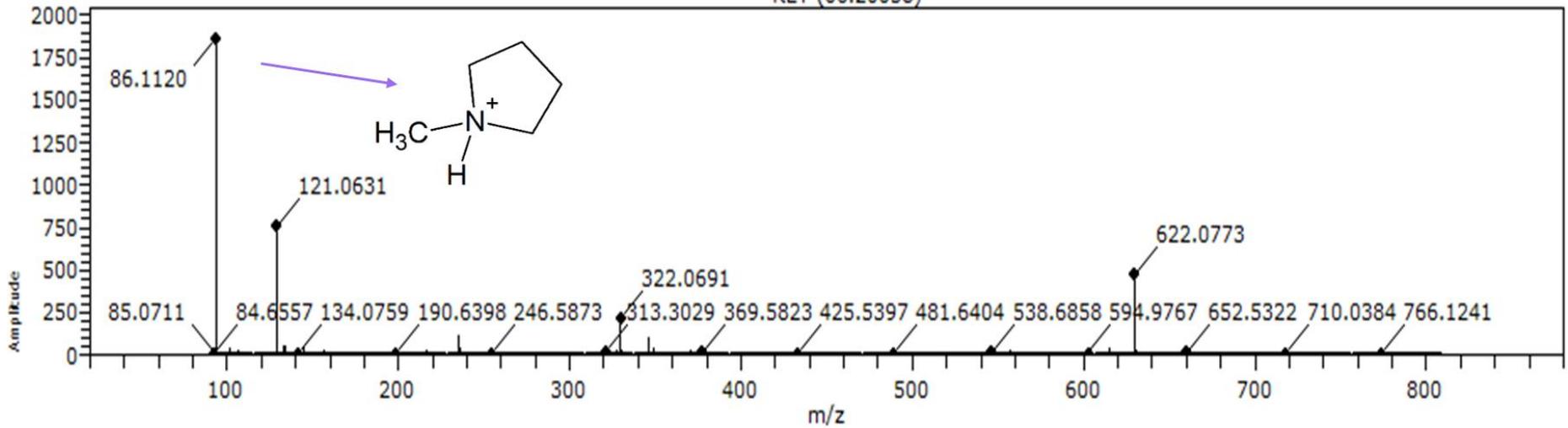


Figura 29 Espectro de masas de CEP en agua (100 µg/mL). Por DSA-TOF-MS

En el espectro obtenido (figura 29), se observa la m/z 86, comprobándose así, que CEP se fragmenta en la interfase del espectrómetro de masas produciendo la m/z correspondiente a $[NMP-H]^+$. Razón por la cual consideró la m/z $[NMP-H]^+$ como parámetro para identificar y cuantificar la presencia de CEP en las muestras.

En esta parte del estudio, se utilizaron las mismas soluciones utilizadas en las técnicas anteriores (HPLC-DAD y GC- μ ECD) para confirmar la presencia de CEP y ajustar un modelo con el objetivo de cuantificar si es posible.

Se observa la presencia de $[NMP-H]^+$ proveniente de CEP en todas las muestras pertenecientes a la curva de calibración en agua. Los resultados de la curva de calibración al usar la m/z 86 como ion de cuantificación presentan linealidad en el rango de concentración entre 1 y 50 $\mu\text{g/mL}$ (figura 30) (Anexo Tabla D1).

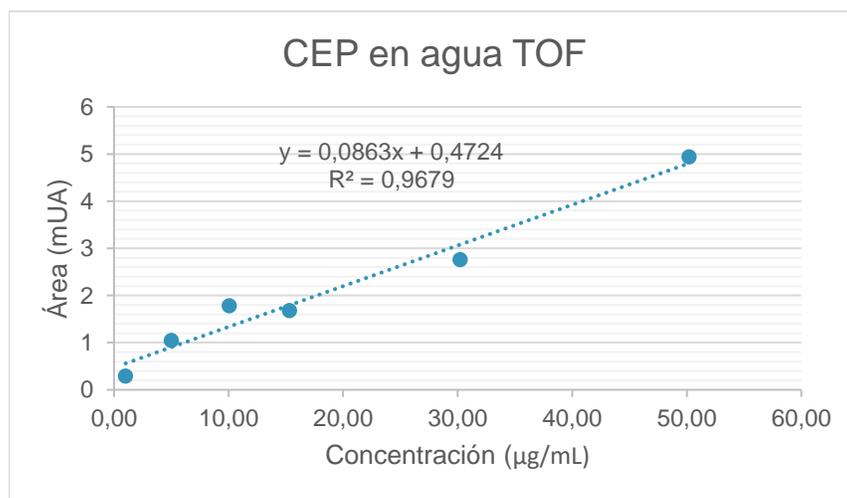


Figura 30 Curva de calibración de CEP en agua entre 1 y 50 $\mu\text{g/mL}$. Por DSA-TOF-MS

Se decidió entonces analizar las muestras usadas tanto en las mediciones por HPLC-DAD como por GC- μ ECD.

4.2. HPLC-DAD Y DSA-TOF-MS

Los espectros de masa obtenidos por DSA-TOF-MS de las muestras analizadas previamente por HPLC-DAD se presentan en la figura 31 donde se observa la presencia de $[NMP-H]^+$ (m/z 86) proveniente de CEP tanto en agua como en las matrices orina y extracto BSM.

Tanto para orina como para BSM, se seleccionó una señal de área constante correspondiente a la matriz con el objetivo de normalizar los resultados. En el caso de la orina se utilizó la m/z 114, la cual correspondería a la creatinina. Por otro lado, en el BSM se utilizó la m/z 136, perteneciente a la matriz de biosólido, pero sin identificar.

El análisis de los datos da cuenta de un ajuste lineal tanto para las muestras de CEP en Orina como en BSM. A continuación, en la ecuación 12 y ecuación 13, se presentan los resultados del ajuste lineal para ambas matrices (Anexo Tabla D2 y D3). Además, se presentan las gráficas de estos análisis en la figura 32 y figura 33.

Ecuación 12 Ajuste lineal para Concentración de CEP vs Área, para matriz orina. Por DSA-TOF-MS

$$\text{Orina: } \frac{\text{Área } [NMP - H]^+}{\text{Área Creatinina}} = 0,0005[\text{Concentración}] - 0,0092$$

Ecuación 13 Ajuste lineal para Concentración de CEP vs Área, para matriz BSM. Por DSA-TOF-MS

$$\text{BSM: } \frac{\text{Área } [NMP - H]^+}{\text{Área } m/z 136} = 0,0161[\text{Concentración}] - 0,3109$$

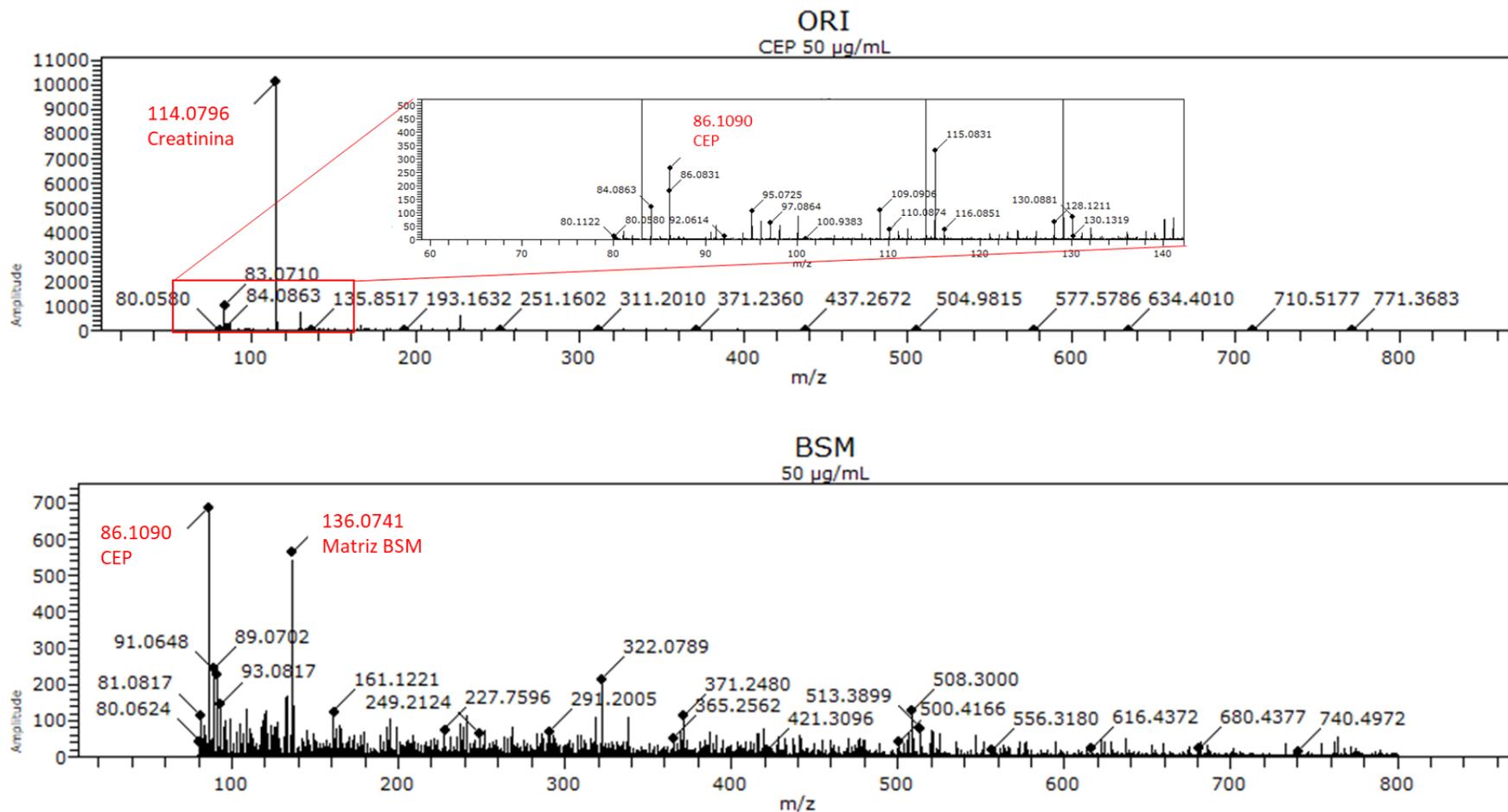


Figura 31 Espectro de masas para muestras de CEP (50 µg/mL) en Orina y BSM. Por DSA-TOF-MS

Por otro lado, el BSF que presentaba una dificultad para cuantificar CEP con la metodología planteada en HPLC-DAD fue también analizado por DSA-TOF-MS con el objetivo de dilucidar el origen del pico cromatográfico que aparece al tiempo de retención de CEP en las muestras blanco. Como se observa en la figura 34 que corresponde al cromatograma de corriente iónica total corregido por ruido de fondo, BIC por su sigla en inglés (*Background corrected total Ion Current chromatograms*), las muestras de BSF muestran una señal de una m/z 86 tanto en el biosólido fortificado como en el blanco, lo cual indicaría la posible presencia de $[NMP-H]^+$.

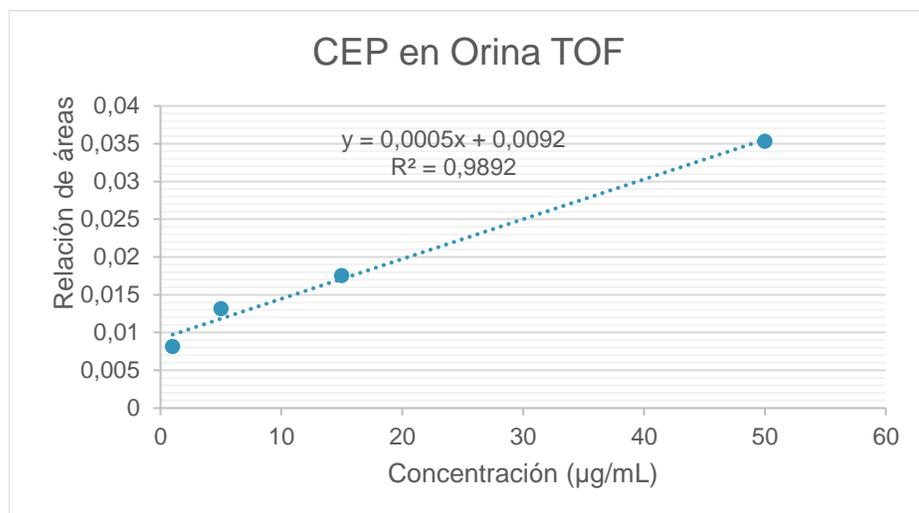


Figura 32 Curva de calibración de CEP en orina entre 1 y 50 µg/mL proveniente de las mediciones para HPLC-DAD. Por DSA-TOF-MS

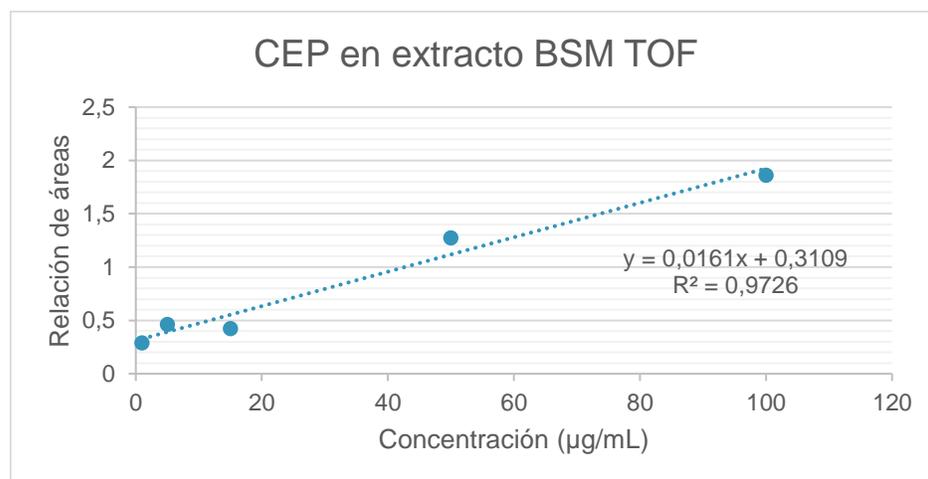


Figura 33 Curva de calibración de CEP en extracto BSM entre 1 y 100 µg/mL proveniente de las mediciones para HPLC-DAD. Por DSA-TOF-MS

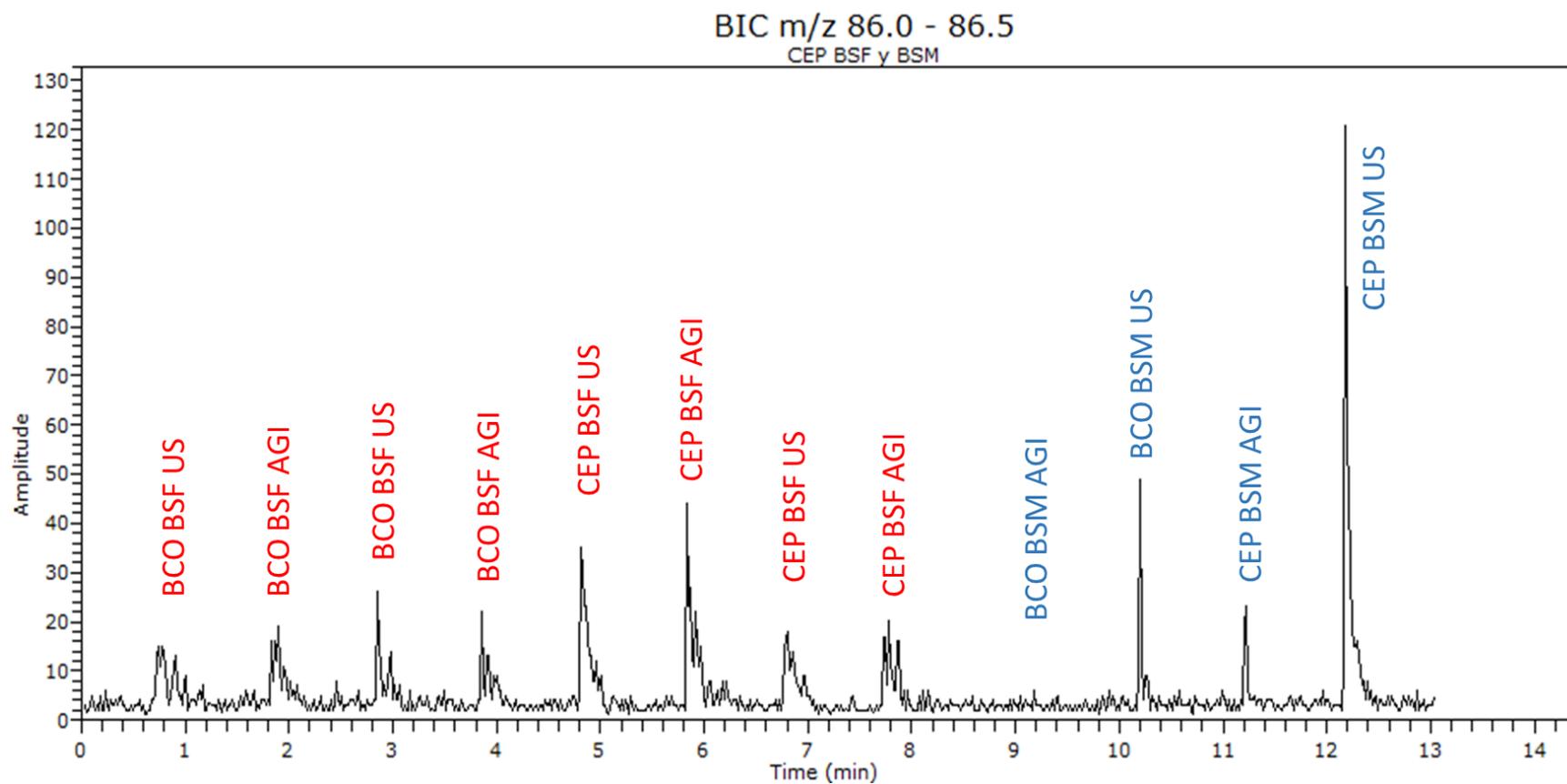


Figura 34 BIC para la m/z 86 en muestras blanco (BCO) y fortificadas con cefepime (CEP) de biosólido de Farfana (BSF) y Melipilla (BSM) provenientes del proceso de extracción por ultrasonido (US) y por agitación (AGI)

Según (Ai-dong & Chen-xiao, 2015), en el biosólido podemos encontrar nicotina (figura 35) en altas concentraciones. En humanos, la nicotina es metabolizada en Cotinina la cual a su vez es metabolizada y excretada en un 40% a través de la orina en forma de 3-hidroxicotinina (figura 36), orina que finalmente llega las PTAS.

Se podría pensar que aquella señal de m/z 86 presente en BSF podría provenir de otras moléculas orgánicas como la nicotina, debido a que uno de sus fragmentos de la 3-hidroxicotinina presenta una m/z de 86 (figura 36). Sin embargo, al analizar estos resultados con los obtenidos en HPLC-DAD donde se observa un pico cromatográfico en el tiempo de retención de CEP (7,5 min) y al no presentar solapamiento de señales en el espectro de absorción, se descarta esta hipótesis y confirman la presencia de CEP en el biosólido.

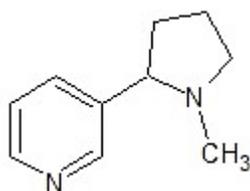


Figura 35 Estructura química de Nicotina

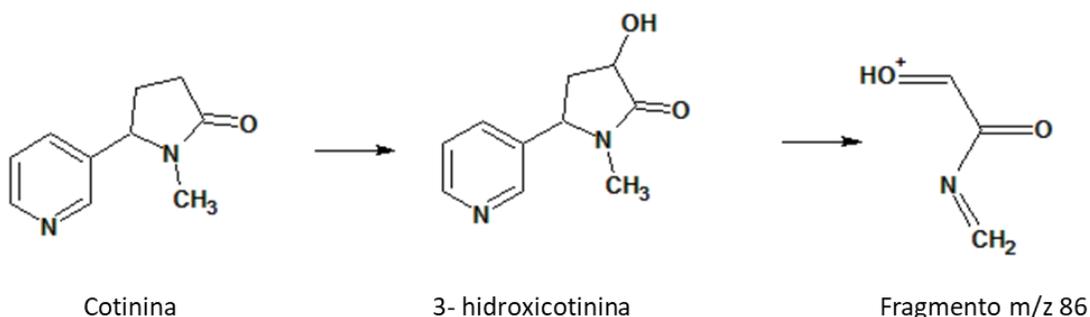


Figura 36 Metabolización y posterior fragmentación de la Cotinina

Para todas las muestras de CEP en matriz agua, orina y BSM utilizadas anteriormente en la técnica HPLC, se logró confirmar la presencia de este antibiótico utilizando DSA-TOF-MS. En particular, esta técnica fue de gran importancia para descartar la presencia de algún interferente, como la nicotina, en las muestras de BSM.

4.3. GC- μ ECD Y DSA-TOF-MS

Las muestras utilizadas en los experimentos de GC- μ ECD fueron también analizadas por DSA-TOF-MS. En esta experiencia, se utilizó MSTFA como agente derivatizante. Se midió en primera instancia un *batch* compuesto de una muestra blanco de orina derivatizada, una muestra de orina 45 $\mu\text{g/mL}$ de CEP sin derivatizar, MSTFA puro y una muestra de CEP derivatizada (20 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados nos permitieron identificar la masas correspondiente al fragmento trimetilsilil ($-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$) del derivatizante (m/z 73) que es el que reacciona con la molécula de CEP (figura 37).

Se logra ver la presencia de trimetilsilil desde el inicio, que corresponde a la muestra blanco de orina derivatizada. Posteriormente existe una cuenca que anuncia el cambio de muestra a la de orina que no contiene derivatizante (estrella azul). Sin embargo, la señal vuelve a aparecer aun en la muestra que no contiene derivatizante (orina 45 $\mu\text{g/mL}$ de CEP sin derivatizar). Esto se debe a que, al ser un compuesto altamente volátil, la temperatura del inyector está volatilizando la muestra siguiente que contiene derivatizante puro. Por último, se vuelve a observar un incremento en la amplitud a los 5.5 min que corresponde al comienzo de la inyección de una muestra derivatizada de CEP (20 $\mu\text{g/mL}$).

Una vez corroborada la m/z perteneciente al derivatizante, se procedió a analizar las posibles m/z para CEP derivatizado, llegando a la conclusión que la m/z 574 correspondería a la masa del analito de interés asociado a tres protones y una molécula de agua (figura 38).

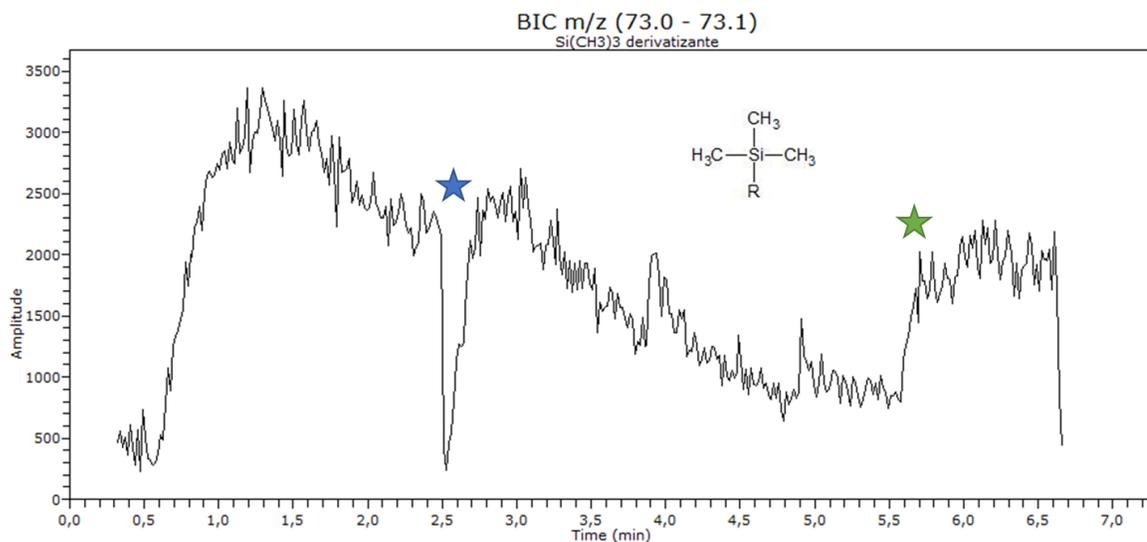


Figura 37 BIC para la m/z 73, correspondiente al fragmento activo del MSTFA

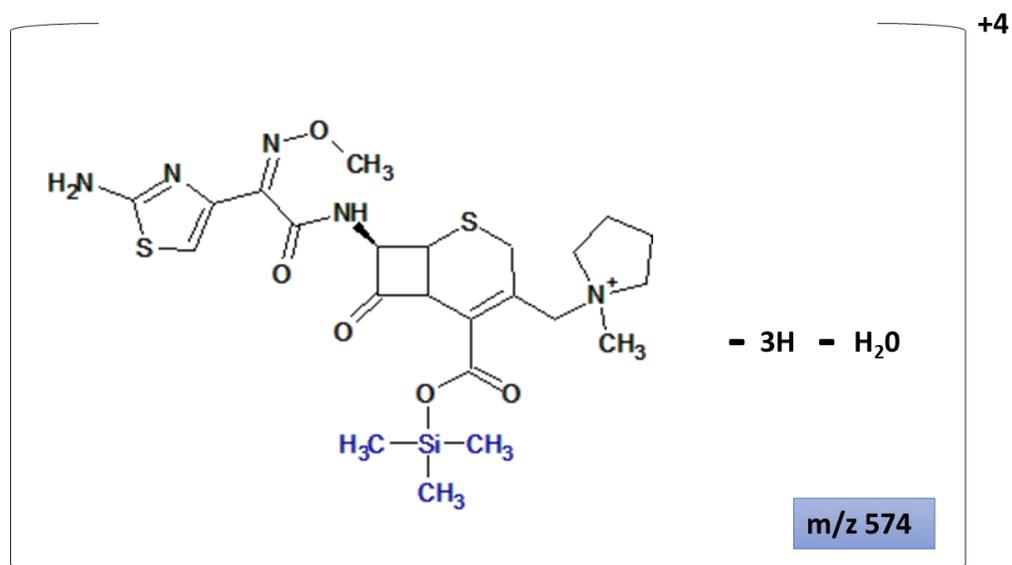


Figura 38 CEP derivatizado e ionizado en positivo

En un siguiente paso se inyectaron cuatro muestras de CEP derivatizado a distintos niveles de concentración en un intervalo entre 40 y 140 µg/mL. En la figura 39 se presenta espectro de masas para la concentración más alta (140 µg/mL) y en la figura 40 el BIC para la m/z 574, en esta última, se observan cuatro picos cromatográficos que coinciden con los tiempos de las cuatro muestras de CEP derivatizado. No se logró una adecuada correlación entre los datos, lo cual se explica por la volatilización de la muestra en el DSA debido a la temperatura alta en el inyector. Esto dificulta la posibilidad de realizar un análisis cuantitativo de los datos. Sin embargo, en todas las muestras se logra observar la presencia de la m/z correspondiente a CEP derivatizado, pudiendo ser útil para un análisis confirmatorio de las muestras.

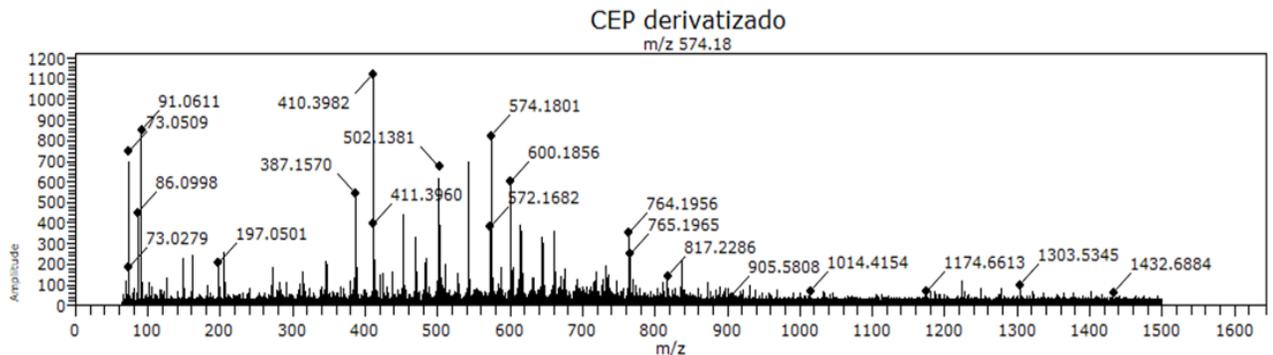


Figura 39 Espectro de masas para CEP derivatizado. Por DSA-TOF-MS

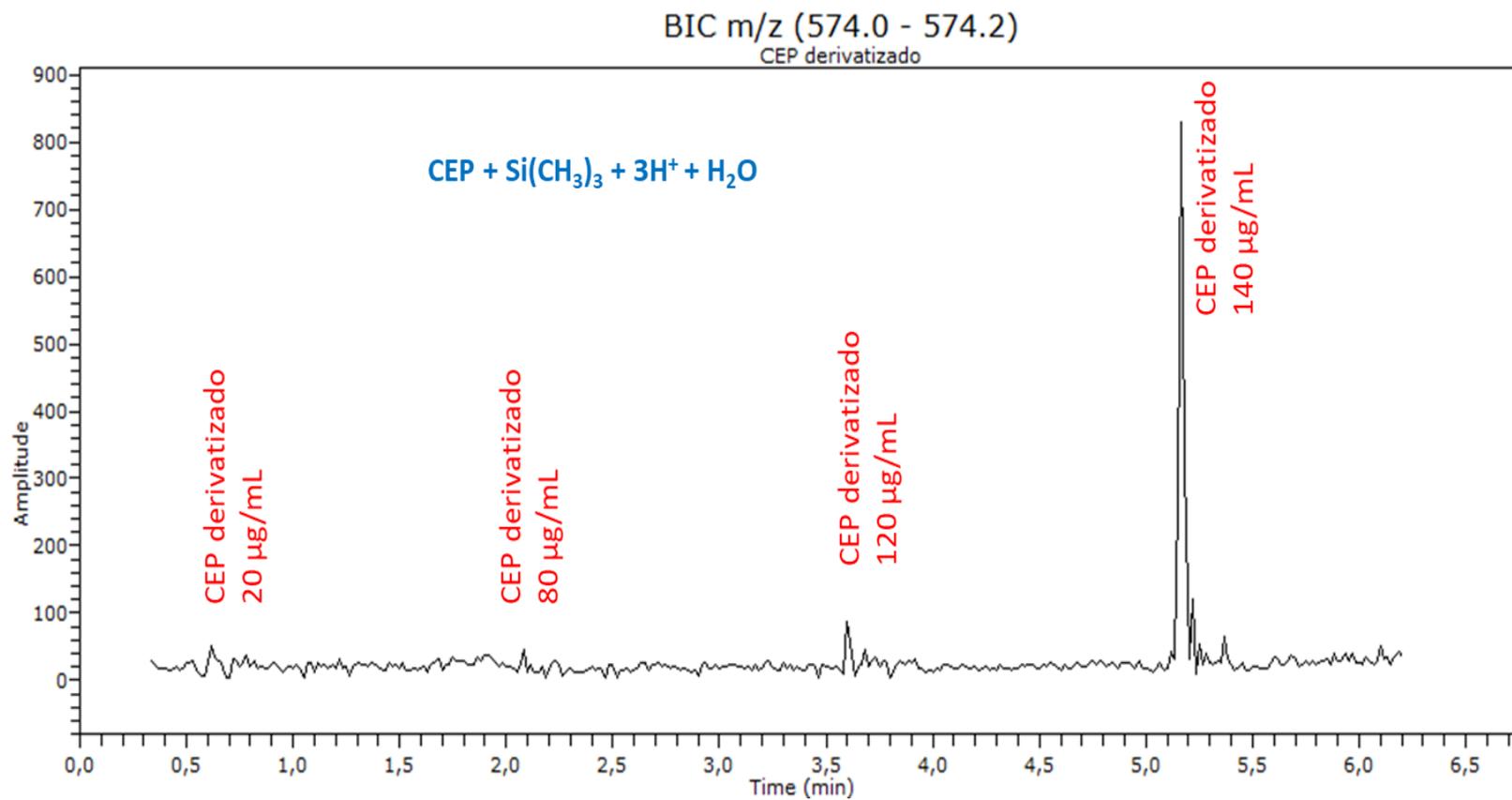


Figura 40 BIC para m/z 574 correspondiente a CEP derivatizado. Por DSA-TOF-MS

4.4. PRECISIÓN

Se realizaron pruebas para determinar la precisión a nivel de repetibilidad y precisión intermedia de la metodología expresada de manera porcentual como la desviación estándar relativa (DER %). Para esto las muestras de agua, orina y BSM (10 alícuotas de cada matriz), todas ellas preparadas según Metodología 2.1.2.(HPLC) y con una concentración de 1 µg/mL. El criterio usado para determinar la precisión a nivel de repetición intermedia fue usar diferente analista, debido a la variabilidad de los resultados del equipo al usarlo distintos días.

Los resultados de esta experiencia se presentan a continuación en la tabla 15.

Tabla 15 Resultados de precisión para DSA-TOF-MS

| | Agua | Orina | BSM |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|
| Repetibilidad DER (%) | 18,56 | 12,43 | 16,74 |
| Precisión intermedia DER (%) | 22,18 | 22,31 | 28,10 |

Los datos obtenidos en este estudio dan cuenta de valores de repetibilidad menores a 19%. Las muestras acuosas al no presentar un ión con una concentración constante con el cual se pueda normalizar el área de la señal m/z 86, como es el caso de la orina y el biosólido, evidentemente presentan una mayor DER (%), ésta puede ser causada por varios factores, como por ejemplo el proceso de “siembra” de la muestra en la malla. En el caso particular de la orina, la repetibilidad se acerca a la determinada por (Chiesa, y otros, 2015) (menor a 12%) en su estudio de antibióticos betalactámicos en orina de bovinos. Si bien los resultados de replicabilidad (P.I.) difieren en comparación con los resultados obtenidos en Smith (DER de 3%), (Smith, Cox, Yudin, Reynolds, & Powell, 2015), el

objetivo final del DSA-TOF-MS para este experimento es la confirmación y además, la muestra fue sometida a casi nulo tratamiento por lo tanto es aceptable una mayor DER. En el caso de las matrices de orina y biosólido, la DER es esperablemente mayor debido a la complejidad de las matrices. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor con el objetivo de comprobar si existían diferencias significativas entre las mediciones realizadas por los dos analistas. Los resultados de este análisis de datos presentan todos unos valores P mayores a 0.05 (Anexo tablas D4, D5 y D6), lo cual nos indica que tanto las muestras acuosas como para las muestras en matrices orina y biosólido no presentan diferencias estadísticamente significativas entre un analista y otro con un 95% de confianza.

4.5. ESTABILIDAD

Por otro lado, se estudió la estabilidad de las muestras en solución acuosa a 20°C durante 1 hora con intervalos de 30 min. En la tabla 16 se observa un incremento en el área de la m/z 86 conforme aumenta el tiempo. Este incremento en el área y por ende en la concentración de NMP en la solución indica una de degradación de CEP y concuerda con los resultados obtenidos en (Smith, Cox, Yudin, Reynolds, & Powell, 2015) y comprueba que CEP es poco estable en solución acuosa y a temperatura ambiente. Es por esto por lo que las soluciones preparadas fueron

Tabla 16 Resultados estudio de estabilidad de CEP en solución acuosa. Por DSA-TOF-MS

| Tiempo (min) | Área m/z 86 |
|--------------|-------------|
| 0 | 13,81 |
| 30 | 20,89 |
| 60 | 23,31 |

medidas inmediatamente después de ser preparadas y posteriormente se almacenaron bajo los 4°C.

CONCLUSIONES

Se logró caracterizar las matrices utilizadas en este estudio determinando que, el biosólido de La Farfana posee mayor contenido de carbono orgánico (72,9%) en comparación con el biosólido de Melipilla (48,3%).

El biosólido de La Farfana presentó mayor concentración de Ni, Zn y Pb que el biosólido de Melipilla, ambos biosólidos cumplen con los valores máximos permitidos para metales pesado de acuerdo a la NCh 2880 del Instituto Nacional de Normalización.

La metodología de extracción de cefepime con ultrasonido desde el biosólido de Melipilla presentó una recuperación de 86%, menor tiempo de extracción (30 min) y una precisión expresada como desviación estándar relativa menor a 2,7% en comparación con los obtenidos con extracción por agitación (24,3%), demostrando ser una mejor alternativa.

Fue posible determinar cefepime en agua, orina y biosólido por medio de HPLC-DAD utilizando una columna C18 de 25 cm, composición de fase móvil 90% CH₃COOH 0,1M/ 10% Acetonitrilo a un flujo de 0,7 mL/min y una longitud de onda de 280 nm, obteniendo un tiempo de retención para cefepime de 7,5 min.

La determinación de cefepime en agua, orina y biosólido con la metodología optimizada para HPLC-DAD presentó límites de detección menores a 0,129 µg/mL, límites de cuantificación menores a 0.318 µg/mL, una repetibilidad y precisión intermedia para cefepime en agua de 0,739% y 0,747%, respectivamente y una recuperación cercana al 100% en las tres matrices.

En relación a la degradación de cefepime se observa que la concentración disminuye en un 12% luego de 36 días en solución acuosa a 4°C; un 8,2% en orina y un 3,2% en biosólido, las últimas dos luego de 14 días a 4°C. En todos los casos no existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones iniciales y finales.

Es posible la cuantificación de cefepime derivatizado con metilsilil trifluoroacetamida en acetato de etilo por GC- μ ECD, utilizando una columna Agilent HP-5 (30m x 320 μ m x 0,25 μ m) y obteniendo un tiempo de retención de 9,87 min. Los parámetros de validación para esta metodología fueron: repetibilidad < 3,53%; precisión intermedia < 5,23%; recuperación promedio de 99,53%; límites de detección y cuantificación de 0,46 y 1,53 μ g/mL, respectivamente.

Es posible confirmar la presencia de cefepime en las muestras utilizadas en el estudio por HPLC-DAD utilizando DSA-TOF-MS, las cuales presentan una relación m/z de 86 correspondiente a N-metilpirrolidina, metabolito de cefepime.

La técnica DSA-TOF-MS permite la confirmación de la derivatización de cefepime con metilsilil trifluoroacético en las muestras utilizadas en GC- μ ECD presentando una relación m/z de 574.

Se confirmó la presencia de cefepime y su metabolito N-metilpirrolidina en el biosólido perteneciente a la planta de tratamiento de aguas servidas La Farfana por medio de DSA-TOF-MS.

Finalmente, se puede concluir a partir de los resultados que, el antibiótico cefepime ingresa a las plantas de tratamiento de aguas servidas a través de los afluentes de origen domiciliario y hospitalario, y puede estar presente en biosólidos, ya sea como el compuesto o bien como sus productos de degradación.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguayo, S., Herrera, S., & Méndez, J. (2012). Repercusión sanitaria en medio ambiente del consumo de antibióticos. *Seguridad y Medio Ambiente*, 127, 34-43.
- Ai-dong, R., & Chen-xiao, L. (2015). Analysis of effect of nicotine on microbial community structure in sediment using PCR-DGGE fingerprinting. *Water Science and Engineering*, 8(4), 309-314.
- Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, AEFI. (2001). *Validación de métodos analíticos*. Barcelona.
- Baririan, N., Chanteux, H., Viaene, E., Servais, H., & Tulkens, P. (2003). Stability and compatibility study of cefepime in comparison with ceftazidime for potential administration by continuous infusion under conditions pertinent to ambulatory treatment of cystic fibrosis patients and to administration in intensive care units. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 651-658.
- Bedoya-Urrego, K., Acevedo, J., Peláez, C., & Agudelo, S. (2013). Caracterización de biosólidos generados en la planta de tratamiento de agua residual San Fernando, Itagüí (Antioquia, Colombia). *Salud Pública*, 15(5), 778-790.
- Camilla, S., & Jordan, M. (2009). Electrical conductivity measurements in sewage sludge pellets: Innovative techniques for environmental management. *Journal of Hazardous Materials*, 168, 1260–1263.

- Center for Disease Dynamics Economics & Policy. (2015). The state of the world's antibiotic. En Center for Disease Dynamics Economics & Policy. Washington, D.C.
- Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. (2015). *Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie*. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Québec.
- Centro Nacional de Farmacoeconomía (CENAFAR). (2013). *Medicamentos en Chile: Revisión de la evidencia del mercado nacional de fármacos*. Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), Departamento de Asuntos Científicos. Recuperado el 14 de 12 de 2016, de www.ispch.cl/sites/default/files/EstudioMedicamentos-22012014A.pdf
- Chen, G., Liu, G., Qin, F., & Wang, Y. (2003). A simple and sensitive GC method for determination of N-methylpyrrolidine in cefepime and its preparation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33, 797-801.
- Cherti, N., Kinowski, J., Lefrant, J., & Bressolle, F. (2001). High-performance liquid chromatographic determination of cefepime in human plasma and in urine and dialysis fluid using a column-switching technique. *Journal of Chromatography B*, 754, 377-386.
- Chiesa, L., Nobile, M., Francesco Arioli, F., Britti, D., Trutic, N., & R., P. (2015). Determination of veterinary antibiotics in bovine urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 185, 7-15.
- Dinh, T., Moreau-Guigon, E., Labadie, P., Alliot, F., & Teil, M. (2017). Fate of antibiotics from hospital and domestic sources in a sewage network. *Science of the Total Environment*, 575, 758–766.

- DrugBank*. (2016). Recuperado el 20 de Diciembre de 2016, de <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01413>
- El-Rabbat, N., Abdel-Wadood, H., Sayed, M., & Mousa, H. (2012). Spectrophotometric analysis of cefepime through it's Hg(I) complex. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences (Assiut University)*, 35, 55-65.
- Environmental monitoring and support laboratory office of research and development U.S. Environmental Protection Agency. (1983). *Methods for chemical analysis of water and wastes*. Wahington, DC, USA. Obtenido de <https://www.epa.gov/homeland-security-research/reference-document-methods-chemical-analysis-water-and-waste-epa6004-0>
- ESSAL. (Mayo de 2012). *Uso Benefico de los Biosólidos Generados en las Plantas de Tratamiento de Aguas Servidas*. Recuperado el 21 de Noviembre de 2016, de http://www.mma.gob.cl/1304/articles-52250_pdf_1.pdf
- Evagelou, V., Tsantili-Kakiulidou, A., & Koupparis, M. (2003). Determination of the dissociation constants of the cephalosporins cefepime and cefpirome using UV spectrometry and pH potentiometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31, 1119-1128.
- García, F., Acosta, E., & Allen, D. (2010). Alkaline extraction of wastewater activated sludge biosolids. *Bioresource Technology*, 101, 6972-6989.
- Garrido, T., & Mendoza, J. (2016). Characterization of Dissolved Organic Matter in River Water by Conventional Methods and Direct Sample Analysis-Time of Flight-Mass Spectrometry. *Journal of Chemistry*. Obtenido de <https://www.hindawi.com/journals/jchem/2016/1537370/>
- Harris, D. (2001). El proceso cromatográfico. En D. Harris, *Análisis Químico Cuantitativo* (págs. 693-697). California: Reverté S.A.

- Henriquez, O. (2011). *Análisis y Criterios Mínimos para la Aplicación de Lodos Tratados Provenientes de Plantas de Tratamiento de Aguas Servidas en Agrosistemas de la Provincia de Melipilla, Región Metropolitana, Chile*. Tesis de Magister, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales y de la Conservación de la Naturaleza, Santiago.
- Ho, Y. (2012). Simultaneous determination of veterinary antibiotics and hormone in broiler manure, soil and manure compost by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1262, 160–168.
- Ho, Y., Pauzi, M., Abdul, P., & Saari, N. (2013). Degradation of veterinary antibiotics and hormone during broiler manure composting. *Bioresource Technology*, 131, 476-484.
- Instituto de Salud Publica de Chile. (14 de Enero de 2013). Recomendaciones para el análisis del sedimento urinario. Santiago de Chile, Chile.
- Instituto Nacional de Normalización. (2003). *NCh 2880 Compost- Clasificación y Requisitos*. INN, Santiago.
- Jachero, L., Ahumada, I., Fuentes, E., & Richter, P. (2016). Decreases in the bioconcentration of triclosan in wheat plants according to increasing amounts of biosolids added to soil. *Geoderma*, 276, 19-25.
- Jechalke, J., Heuer, H., Siemens, J., Amelung, W., & Smalla, K. (2014). Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends Microbiology*, 9, 536-545.
- Jónsson, H., Richert, A., Vinneras, B., & Salomon, E. (2004). Guidelines on the Use of Urine and Faeces in Crop Production.
- Karak, T., & Bhattacharyya, P. (2011). Human urine as a source of alternative natural fertilizer in agriculture: A flight of fancy or an achievable reality. *Resources, Conservation and Recycling*, 55, 400-408.

- Li, X., Zheng, W., Machesky, M., Yates, S., & Katterhenry, M. (2011). Degradation Kinetics and Mechanism of Antibiotic Ceftiofur in Recycled Water Derived from a Beef Farm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10176-10181.
- Masoud, M., Ali, A., Ghareeb, D., & Nasr, N. (2016). Synthesis, molecular spectroscopy and thermal analysis of some cefepime complexes. *Journal of Molecular Structure*, 1107, 189-201.
- Merck. (03 de 08 de 2018). *MerckMillipore*. Obtenido de https://www.merckmillipore.com/CL/es/products/analytcs-sample-prep/chromatography-for-analysis/analytical-hplc/lichrosorb-hplc-columns-and-sorbents/.tmb.qB.yEoAAAE_rOF3.Lxi,nav
- Migowska, N., Caban, M., Stepnowski, P., & Kumirska, J. (2012). Simultaneous analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs and estrogenic hormones in water and wastewater samples using gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography with electron capture detection. *Science of the Total Environment*, 441, 77-88.
- MINSAL. (15 de Noviembre de 2012). Circular N°35/38 Instrucciones para el adecuado proceso de eliminación de residuos de medicamentos en mal estado y vencidos generados de establecimientos de salud, así como los originados de farmacos decomisados de lugares no autorizados. Santiago de Chile.
- Mitchell, S., Ullman, J., Tell, A., & Watts, R. (2014). pH and temperature effects on the hydrolysis of three β -lactam antibiotics: Ampicillin, cefalotin and cefoxitin. *Science of the Total Environment*, 466, 547-555.
- Nemutlu, E., Kir, S., Katlan, D., & Beksac, M. (2009). Simultaneous multiresponse optimization of an HPLC method to separate seven cephalosporins in

plasma and amniotic fluid: Application to validation and quantification of cefepime, cefixime and cefoperazone. *Talanta*, 117-126.

Ocaña, J., Jiménez, F., Callejón, M., & Barragán de la Rosa, F. (2004). Simultaneous determination of cefepime and grepafloxacin in human urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36, 117-123.

Ohmori, T., Suzuki, A., Niwa, T., Ushikoshi, H., Shirai, K., Yoshida, S., . . . Itoh, Y. (2011). Simultaneous determination of eight betalactam antibiotics in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 879, 1038-1042.

Osagie, P. (2012). *The survival of mycobacteria in pure human urine*. Tesis Magister, University of Eastern Finland, Department of Environmental Science.

Plasencia, A. (2017). *Guía de estudio: "Análisis de suelos"*. Universidad Nacional de Tucumán, Cátedra de Edafología, Facultad de Agronomía y Zootecnia.

Randall, D., & Naidoo, V. (2018). Urine: The liquid gold of wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6, 2677-2635.

Rodushkin, I., & Ödman, F. (2001). Application of inductively coupled plasma sector field mass spectrometry for elemental analysis of urine. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 14, 241-247.

Rose, C., Parker, A., Jefferson, B., & Cartmell, E. (2015). The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced Treatment Technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45, 1827–1879.

- Rossmann, J. (2014). Simultaneous determination of most prescribed antibiotics in multiple urban wastewater by SPE-LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 969, 162–170.
- Sadzawka, A. (2007). *Protocolo de métodos de análisis para suelos y lodos*. Concepción, Chile.
- Shih-Sheng, W., Chih-Yuan, C., & Yen-Hsia, W. (2008). Analysis of Ciprofloxacin by a Simple. *Journal of Chromatographic Science*, 46, 490-495.
- Sigma-Aldrich. (2019). *Sigma-Aldrich*. Recuperado el 09 de 09 de 2019, de <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/migrationresource4/Derivatization%20Rgts%20brochure.pdf>
- Smith, R. W., Cox, L., Yudin, A., Reynolds, J., & Powell, M. (2015). Rapid determination of N-Methylpyrrolidine in Cefepime by combining ionisation-time-of-flight mass spectrometry with field asymmetric waveform ion mobility spectrometry. *Analytical Methods*, 7, 34-39.
- Sprauten, P., Beringer, P., Louie, S., Synold, T., & Gill, M. (2003). Stability and Antibacterial Activity of Cefepime during Continuous Infusion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(6), 1991–1994.
- Thiele-Bruhn, S. (2003). Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - a REVIEW. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 166, 145-167.
- Tilló, T. (2010). *Los medicamentos y su influencia en el medio ambiente*. Universidad de Barcelona, Dep. de Didáctica de las Ciencias Experimentales y de la Matemática.

- Torri, S., & Alberti, C. (2012). Characterization of organic compounds from biosolids of Buenos Aires city. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 12(1), 143-152.
- Valassis, I., Parissi-Poulou, M., & Marcheras, P. (1999). Quantitative determination of cefepime in plasma and vitreous fluid by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 249–255.
- Van de Vijver, L., Verwer, C., Smolders, G., Hospers-Brands, M., & Van Eekeren, N. (2016). *The cycle of veterinary antibiotics in the ecosystem*.
- Wang, L., Shamma, N., & Hung, Y. (2008). Biosolids Engineering and Management. En *Handbook of Environmental Engineering* (Vol. 7).
- Wijesekara, H., Bolan, N., Kumarathilaka, P., Geekiyanage, N., Kunhikrishnan, A., Seshadri, B., . . . Vithanage, M. (2016). Biosolids Enhance Mine Site Rehabilitation and Revegetation. En *Environmental Materials and Waste: Resource Recovery and Pollution Prevention* (págs. 45-71). Elsevier.

ANEXOS A: CARACTERIZACIÓN DE LAS MATRICES

Tabla A 1 Valores obtenidos de la determinación de pH para los biosólidos

| Muestra | Medición 1 | Medición 2 | Medición 3 | \bar{x} pH | σ pH | DER (%) |
|-----------|------------|------------|------------|--------------|-------------|---------|
| Melipilla | 6,22 | 6,21 | 6,23 | 6,22 | 0,01 | 0,16 |
| Farfana | 6,57 | 6,55 | 6,57 | 6,56 | 0,01 | 0,18 |

Tabla A 2 Valores obtenidos de la determinación de pH para Orina

| Muestra | pH |
|--------------|-------------|
| Medición 1 | 5,79 |
| Medición 2 | 6,74 |
| Medición 3 | 5,31 |
| Medición 4 | 5,51 |
| Medición 5 | 6,14 |
| Medición 6 | 5,64 |
| Medición 7 | 5,34 |
| Medición 8 | 5,55 |
| \bar{x} pH | 5,75 |
| σ pH | 0,48 |
| DER (%) | 8,28 |

Tabla A 3 Resultados obtenidos para conductividad eléctrica (C.E.) de biosólidos (BS) y Orina

| Muestra | Valor (mS/cm) | T° (°C) | K celda | \bar{x} C.E. | σ C.E. | DER (%) |
|----------------|---------------|---------|---------|----------------|---------------|---------|
| BS Melipilla 1 | 3,760 | 24,2 | 0,475 | 3,74 | 0,02 | 0,474 |
| BS Melipilla 2 | 3,744 | | | | | |
| BS Melipilla 3 | 3,723 | | | | | |
| BS Melipilla 4 | 3,724 | | | | | |
| BS Farfana 1 | 5,789 | 24,1 | 0,475 | 5,78 | 0,01 | 0,250 |
| BS Farfana 2 | 5,784 | | | | | |
| BS Farfana 3 | 5,770 | | | | | |
| BS Farfana 4 | 5,757 | | | | | |
| Orina 1 | 29,21 | 24,4 | 0,475 | 29,26 | 0,09 | 0,31 |
| Orina 2 | 29,38 | | | | | |
| Orina 3 | 29,28 | | | | | |
| Orina 4 | 29,17 | | | | | |

Tabla A 4 Curva de calibración de carbono orgánico (C.O.) para biosólidos. Por espectrofotometría UV-Vis

| [C.O.] teórico (mgC/mL) | Absorbancia |
|-------------------------|-------------|
| 0 | 0,003 |
| 2 | 0,046 |
| 5 | 0,110 |
| 10 | 0,222 |
| 20 | 0,429 |
| 30 | 0,611 |

$$Abs = 0,0204[C.O.] + 0,0087$$

$$r^2 = 0,9987$$

Tabla A 5 Curva de calibración de carbono orgánico (C.O.) para orina. Por espectrofotometría UV-Vis

| [C.O.] teórico (mgC/mL) | Absorbancia |
|-------------------------|-------------|
| 0,00 | 0,061 |
| 0,10 | 0,129 |
| 0,25 | 0,225 |
| 0,50 | 0,390 |
| 1,00 | 0,701 |
| 1,50 | 0,994 |

$$Abs = 0,6227[C.O.] + 0,0689$$

$$r^2 = 0,9995$$

Tabla A 6 Determinación de carbono orgánico (C.O.) en muestras de biosólido (BS). Por espectrofotometría UV-Vis. Abs= Absorbancia

| | BS Melipilla | | | | BS Farfana | |
|----------------|--------------|-------------|-------|-------|-------------|-------|
| Masa BS (mg) | 50,9 | 50,9 | 50,8 | 52,2 | 50,2 | 51,6 |
| Abs 1 | 0,394 | 0,395 | 0,399 | 0,613 | 0,584 | 0,610 |
| Abs 2 | 0,395 | 0,395 | 0,399 | 0,614 | 0,585 | 0,609 |
| Abs 3 | 0,397 | 0,395 | 0,398 | 0,613 | 0,586 | 0,610 |
| \bar{x} Abs | 0,395 | 0,395 | 0,399 | 0,613 | 0,585 | 0,610 |
| [C.O.] mgC/mL | 19,0 | 18,9 | 19,1 | 29,6 | 28,3 | 29,5 |
| C.O. (%) | 48,1 | 48,1 | 48,6 | 73,0 | 72,4 | 73,4 |
| \bar{x} C.O. | | 48,3 | | | 72,9 | |
| σ C.O. | | 0,3 | | | 0,5 | |
| DER (%) | | 0,6 | | | 0,7 | |

Tabla A 7 Determinación de carbono orgánico (C.O.) en muestras de orina. Por espectrofotometría UV-Vis. Abs= Absorbancia

| | Absorbancia |
|-----------------------------|-------------|
| Medición 1 | 0,656 |
| Medición 2 | 0,607 |
| Medición 3 | 0,630 |
| Medición 4 | 0,597 |
| \bar{x} Abs | 0,623 |
| σ Abs | 0,026 |
| DER (%) | 4,219 |
| [C.O.] (mgC/mL) en alícuota | 0,889 |
| [C.O.] (mgC/mL) en muestra | 8,890 |
| [C.O.] (mgC/L) | 8890 |

Tabla A 8 Determinación del volumen de saturación (Vs) de los biosólidos (BS)

| BS | Masa BS (g) | Agua Agregada (mL) | Vs (mL/g) |
|-----------|-------------|--------------------|-------------|
| Melipilla | 2,002 | 2,3 | 1,15 |
| Farfana | 2,021 | 1,9 | 0,94 |

Tabla A 9 Pesos registrados para determinación de humedad (%) a 105 °C de los biosólidos (BS). V = Vaso

| Muestra | V (g) | V + BS (g) | BS (g) | V + BS SECO (g) | BS SECO (g) | Humedad (%) |
|-----------|--------|------------|--------|-----------------|-------------|--------------|
| Melipilla | 31,512 | 32,514 | 1,002 | 32,456 | 1,002 | 6,144 |
| Farfana | 35,021 | 36,023 | 1,002 | 35,966 | 1,002 | 6,032 |

Tabla A 10 Pesos de las muestras de biosólido utilizadas para la cuantificación de metales pesados por Espectrometría de Absorción Atómica

| Muestra | Peso BSF (mg) | Peso BSM (mg) |
|-----------|---------------|---------------|
| 1 | 50,0 | 50,4 |
| 2 | 49,9 | 50,0 |
| 3 | 50,9 | 51,0 |
| 4 | 50,6 | 50,0 |
| \bar{x} | 50,3 | 50,3 |

Tabla A 11 Resultados para determinación de metales pesados en BSF y BSM por medio de Espectrometría de Absorción Atómica.

| Parámetro | Pb | | Cu | | Zn | | Ni | |
|--------------------------|-----------------------|------------|------------------------|------------|------------------------|------------|------------------------|------------|
| | Estándar (µg/mL) | Abs (U.A.) | Estándar (µg/mL) | Abs (U.A.) | Estándar (µg/mL) | Abs (U.A.) | Estándar (µg/mL) | Abs (U.A.) |
| Curva de calibración | 0,5 | 0,006 | 0,2 | 0,007 | 0,1 | 0,020 | 0,2 | 0,004 |
| | 1,0 | 0,012 | 0,5 | 0,018 | 0,2 | 0,036 | 0,5 | 0,011 |
| | 1,5 | 0,019 | 2,0 | 0,070 | 0,5 | 0,088 | 1,0 | 0,022 |
| | 4,0 | 0,053 | 4,0 | 0,139 | 1,0 | 0,173 | 2,0 | 0,043 |
| Ecuación de la recta | Abs=0,0135[Pb]-0,0012 | | Abs= 0,0347[Cu]+0,0004 | | Abs= 0,1705[Zn]+0,0025 | | Abs=0,0216[Ni]+0,00004 | |
| R ² | 0,9998 | | 0,9999 | | 0,9999 | | 0,9996 | |
| \bar{x} [Metal] blanco | 0,20 | | 0,07 | | 0,06 | | 0,09 | |
| \bar{x} Abs BSF | 0,005 | | 0,007 | | 0,078 | | 0,005 | |
| \bar{x} Abs BSM | 0,004 | | 0,010 | | 0,050 | | 0,004 | |
| F.D. | 1 | | 10 | | 10 | | 1 | |
| \bar{x} [Metal] BSF | 0,24 ± 0,03 | | 1,10 ± 0,10 | | 3,80 ± 0,10 | | 0,10 ± 0,00 | |
| \bar{x} [Metal] BSM | 0,19 ± 0,05 | | 1,90 ± 0,10 | | 0,07 ± 0,02 | | 0,07 ± 0,02 | |

Factor de dilución (F.D.).

[Metal] = µg/mL.

Absorbancia (Abs).

Unidad de absorbancia (U.A.).

ANEXOS B: HPLC-DAD

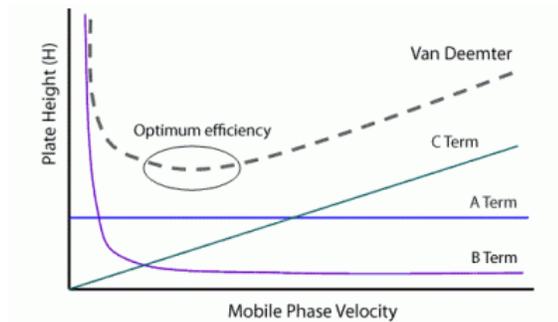


Figura B 1 Curva de Van Deemter donde se observa que existe una velocidad de flujo óptima para la cual la altura de plato se hace mínima y la eficacia es mayor (Condiciones óptimas)

Tabla B 1 Resultados de la curva de calibración de CEP en agua por HPLC-DAD

| [CEP] teórica (µg/mL) | Área (mUA) | [CEP] real (µg/mL) | \bar{x} área (mUA) | σ área (mUA) | DER (%) |
|-----------------------|------------|--------------------|----------------------|---------------------|---------|
| 0,5 | 50516 | 0,54 | | | |
| 0,5 | 66311 | 0,54 | 57402 | 8090 | 14,09 |
| 0,5 | 55378 | 0,54 | | | |
| 1 | 108797 | 1,02 | | | |
| 1 | 108770 | 1,02 | 110045 | 2186 | 1,99 |
| 1 | 112569 | 1,02 | | | |
| 5 | 516352 | 4,95 | | | |
| 5 | 519293 | 4,95 | 517883 | 1474 | 0,28 |
| 5 | 518003 | 4,95 | | | |
| 10 | 980644 | 10,18 | | | |
| 10 | 1067976 | 10,18 | 1035649 | 47879 | 4,62 |
| 10 | 1058326 | 10,18 | | | |
| 15 | 1612895 | 15,28 | | | |
| 15 | 1611982 | 15,28 | 1606711 | 9931 | 0,62 |
| 15 | 1595255 | 15,28 | | | |
| 30 | 3263245 | 30,14 | | | |
| 30 | 3195620 | 30,14 | 3207958 | 50267 | 1,57 |
| 30 | 3165009 | 30,14 | | | |
| 50 | 5309499 | 50,05 | | | |
| 50 | 5304177 | 50,05 | 5296601 | 17930 | 0,34 |
| 50 | 5276126 | 50,05 | | | |

Tabla B 3 Resultados de la primera curva de calibración de CEP en orina por HPLC-DAD

| [CEP] teórica (µg/mL) | Área (mUA) | [CEP] (µg/mL) | \bar{x} Área (mUA) | σ Área (mUA) | DER (%) |
|-----------------------|------------|---------------|----------------------|---------------------|---------|
| 10 | 1026877 | 9,77 | 1026580 | 420 | 0,04 |
| 10 | 1026283 | 9,77 | | | |
| 15 | 1520574 | 14,42 | 1520189 | 544 | 0,04 |
| 15 | 1519804 | 14,42 | | | |
| 25 | 2540132 | 24,03 | 2542232 | 2970 | 0,12 |
| 25 | 2544332 | 24,07 | | | |
| 35 | 3664206 | 34,63 | 3663974 | 329 | 0,01 |
| 35 | 3663741 | 34,62 | | | |
| 50 | 5232425 | 49,41 | 5234323 | 2683 | 0,05 |
| 50 | 5236220 | 49,45 | | | |

Tabla B 2 Resultados curvas de calibración de CEP en agua, orina y BSM entre 1 y 50 µg/mL. Por HPLC-DAD

| Agua | | Orina | | BS Melipilla | |
|---------------|---------|---------------|---------|---------------|---------|
| [CEP] (µg/mL) | Área | [CEP] (µg/mL) | Área | [CEP] (µg/mL) | Área |
| 1,02 | 62592 | 1,00 | 57451 | 1,00 | 46165 |
| 1,02 | 62731 | 1,00 | 57169 | 1,00 | 42685 |
| 1,02 | 62196 | 1,00 | 56237 | 1,00 | 43198 |
| 5,00 | 304822 | 5,00 | 287124 | 5,00 | 288459 |
| 4,98 | 305529 | 5,00 | 290673 | 5,00 | 289059 |
| 4,99 | 305506 | 5,00 | 322203 | 5,00 | 287160 |
| 10,06 | 605053 | 15,00 | 861456 | 15,00 | 923240 |
| 10,32 | 619247 | 15,00 | 856275 | 15,00 | 920991 |
| 10,03 | 606299 | 15,00 | 856670 | 15,00 | 916009 |
| 15,32 | 928361 | 50,00 | 3161836 | 50,00 | 3155802 |
| 15,20 | 922551 | 50,00 | 3153605 | 50,00 | 3162590 |
| 15,03 | 927027 | 50,00 | 3119931 | 50,00 | 3155107 |
| 30,22 | 1841070 | | | | |
| 30,26 | 1829188 | | | | |
| 30,17 | 1876304 | | | | |
| 50,20 | 3030504 | | | | |
| 49,98 | 3075781 | | | | |
| 50,09 | 3082797 | | | | |

Tabla B 4 Resultados de estudio de estabilidad de CEP en agua a 4°C entre 0,5 y 6 µg/mL. Por HPLC-DAD

| [CEP] teórica (µg/mL) | [CEP] real (µg/mL) | [CEP] interpolada promedio t= 0 días | [CEP] interpolada promedio t= 8 días | [CEP] interpolada promedio t= 15 días | [CEP] interpolada promedio t= 36 días |
|-----------------------|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 0,50 | 0,51 | | | | |
| 0,50 | 0,51 | 0,57 | 0,49 | 0,47 | 0,52 |
| 0,50 | 0,51 | | | | |
| 1,00 | 1,02 | | | | |
| 1,00 | 1,04 | 0,99 | 0,91 | 0,87 | 0,81 |
| 1,00 | 1,04 | | | | |
| 2,00 | 2,02 | | | | |
| 2,00 | 2,02 | 2,02 | 1,95 | 1,88 | 1,81 |
| 2,00 | 2,02 | | | | |
| 4,00 | 4,00 | | | | |
| 4,00 | 4,00 | 3,76 | 3,63 | 3,46 | 3,32 |
| 4,00 | 4,00 | | | | |
| 5,00 | 4,97 | | | | |
| 5,00 | 5,00 | 5,04 | 4,90 | 4,77 | 4,54 |
| 5,00 | 4,98 | | | | |
| 6,00 | 5,99 | | | | |
| 6,00 | 5,98 | 6,06 | 5,93 | 5,76 | 5,62 |
| 6,00 | 5,96 | | | | |

Tabla B 5 Resultados de estudio de estabilidad de CEP en orina (azul) y BSM (blanco) a 4°C por HPLC-DAD.

| [CEP] teórica (µg/mL) | [CEP] interpolada promedio t= 0 días | [CEP] interpolada promedio t= 7 días | [CEP] interpolada promedio t= 14 días | % degradación |
|-----------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------|
| 1 | 0,98 | 0,33 | 0,17 | 17,62 |
| | 0,77 | 0,78 | 0,70 | 90,53 |
| 5 | 4,95 | 4,59 | 4,21 | 85,05 |
| | 4,76 | 4,77 | 4,53 | 95,09 |
| 15 | 14,07 | 13,94 | 13,93 | 98,99 |
| | 15,08 | 15,06 | 14,76 | 97,89 |
| 50 | 51,43 | 50,10 | 46,55 | 90,51 |
| | 51,64 | 50,28 | 50,32 | 97,45 |
| Promedio | | | | 91,52 |
| | | | | 96,81 |

Tabla B 6 Resultados de LD y LC para la determinación de CEP en matrices agua, orina y BSM por medio de HPLC-DAD

| | Agua | Orina | BSM |
|---|--------------|--------------|--------------|
| Área (mUA) 1 | 61325 | 57451 | 46165 |
| Área (mUA) 2 | 61398 | 57169 | 42685 |
| Área (mUA) 3 | 61895 | 56237 | 43198 |
| Área (mUA) 4 | 61637 | 58551 | 45166 |
| Área (mUA) 5 | 61622 | 56952 | 41684 |
| Área (mUA) 6 | 62045 | 55336 | 43202 |
| Área (mUA) 7 | 61717 | 56351 | 43150 |
| Área (mUA) 8 | 62592 | 59170 | 44685 |
| Área (mUA) 9 | 62731 | 57138 | 46177 |
| Área (mUA) 10 | 62196 | 55168 | 46165 |
| \bar{x} Área (mUA) | 61916 | 56952 | 44228 |
| σ Área (mUA) | 476 | 1268 | 1651 |
| YLD | 1428 | 3804 | 4952 |
| YLC | 4759 | 12681 | 16506 |
| LD ($\mu\text{g/mL}$) | 0,071 | 0,110 | 0,129 |
| LC ($\mu\text{g/mL}$) | 0,126 | 0,255 | 0,318 |

Tabla B 7 Resultados de precisión a nivel de Repetibilidad (Rep) y Precisión Intermedia (P.I.) para la determinación de CEP en matriz acuosa por HPLC-DAD.

| | [CEP] teórica (µg/mL) | Área (mUA) | [CEP] real (µg/mL) |
|-------------------------|--|---|--------------------|
| Día 1 | 1,01 | 61350 | 1,04 |
| | 1,03 | 61399 | 1,04 |
| | 1,01 | 62040 | 1,06 |
| | 1,01 | 61504 | 1,05 |
| | 1,01 | 61333 | 1,04 |
| | 1,02 | 62255 | 1,06 |
| | 1,00 | 62156 | 1,06 |
| | 1,02 | 61320 | 1,04 |
| | 1,02 | 62730 | 1,07 |
| | 1,02 | 62197 | 1,06 |
| Día 2 | 1,01 | 61325 | 1,04 |
| | 1,03 | 61398 | 1,04 |
| | 1,01 | 61895 | 1,05 |
| | 1,01 | 61637 | 1,05 |
| | 1,01 | 61622 | 1,05 |
| | 1,02 | 62045 | 1,06 |
| | 1,00 | 61717 | 1,05 |
| | 1,02 | 62592 | 1,06 |
| | 1,02 | 62731 | 1,07 |
| | 1,02 | 62196 | 1,06 |
| Parámetro | \bar{x} [CEP] real (µg/mL) | σ [CEP] real (µg/mL) | DER (%) |
| Rep. (Día 2) | 1,05 | 0,01 | 0,747 |
| P.I. (Día 1 y 2) | 1,05 | 0,01 | 0,740 |

[CEP] real = [CEP] interpolada

Tabla B 8 Resultados de recuperación (%R) de CEP para la metodología HPLC-DAD descrita en este estudio.

| Matriz | Nivel de [CEP] (µg/mL) | %R | %R Promedio por matriz |
|---------------|-------------------------------|-----------|-------------------------------|
| Agua | 1 | 103,6 | 100,7 |
| | 5 | 100,9 | |
| | 10 | 98,9 | |
| | 15 | 100,1 | |
| | 30 | 100,3 | |
| | 50 | 100,2 | |
| Orina | 1 | 97,2 | 98,3 |
| | 5 | 99,0 | |
| | 15 | 93,9 | |
| | 50 | 103,1 | |
| BSM | 1 | 76,0 | 96,3 |
| | 5 | 95,2 | |
| | 15 | 100,7 | |
| | 50 | 103,5 | |
| | 100 | 106,0 | |

ANEXOS C: GC- μ ECD

Tabla C 1 Resultados de curva de calibración de CEP en acetato de etilo por GC- μ ECD utilizando DDE como estándar interno

| [CEP] $\mu\text{g/mL}$ | \bar{x} Área CEP (mUA) | \bar{x} Área CEP/DDE (mUA) | σ Área CEP/DDE (mUA)/2 | DER (%) |
|---------------------------|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------|
| 20,91 | 2964 | 0,468 | 0,038 | 16,44 |
| 42,50 | 4138 | 0,538 | 0,041 | 15,30 |
| 59,79 | 5680 | 0,666 | 0,149 | 44,74 |
| 79,94 | 8124 | 0,863 | 0,144 | 33,33 |
| 99,74 | 8469 | 0,953 | 0,126 | 26,36 |
| 118,90 | 10593 | 1,239 | 0,111 | 17,99 |
| 138,66 | 4852 | 1,482 | 0,148 | 20,04 |

Tabla C 2 Resultados de curva de calibración de CEP derivatizado con MSTFA en acetato de etilo por GC- μ ECD

| [CEP] $\mu\text{g/mL}$ | Área 1 | Área 2 | Área 3 | \bar{x} Área CEP (mUA) | σ Área CEP (mUA)/2 | DER (%) |
|---------------------------|--------|--------|--------|-----------------------------|------------------------------|---------|
| 19,25 | 1909 | 1912 | 1924 | 1915 | 4 | 0,42 |
| 41,33 | 6920 | 8901 | 8397 | 8072 | 515 | 12,75 |
| 75,27 | 17354 | 16925 | 18159 | 17479 | 313 | 3,58 |
| 113,54 | 25590 | 27267 | 28897 | 27252 | 827 | 6,07 |

Tabla C 3 Resultados de precisión a nivel de Repetibilidad (Rep), Precisión Intermedia (P.I.), Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC) para la determinación de CEP derivatizado por GC- μ ECD

| | Concentración más baja | | | Concentración más alta | | |
|------------------------------------|---|--|--|---|--|--|
| | Medición | Área (mUA) | σ [CEP] real ($\mu\text{g/mL}$) | Medición | Área (mUA) | σ [CEP] real ($\mu\text{g/mL}$) |
| Día 1 | 1 | 1908,71 | 18,60 | 1 | 19898,20 | 85,46 |
| | 2 | 1911,51 | 18,61 | 2 | 21975,40 | 93,18 |
| | 3 | 1923,88 | 18,66 | 3 | 21034,70 | 89,68 |
| | 4 | 1876,44 | 18,48 | 4 | 22024,70 | 93,36 |
| | 5 | 1929,12 | 18,68 | 5 | 21660,90 | 92,01 |
| | 6 | 2011,91 | 18,98 | 6 | 21915,30 | 92,96 |
| | 7 | 1964,69 | 18,81 | 7 | 22415,90 | 94,82 |
| | 8 | 1976,88 | 18,85 | 8 | 22446,60 | 94,93 |
| | 9 | 1954,23 | 18,77 | 9 | 22820,80 | 96,32 |
| | 10 | 1991,08 | 18,91 | 10 | 22789,50 | 96,21 |
| Día 2 | 1 | 1930,96 | 18,68 | 1 | 20634,90 | 88,20 |
| | 2 | 1969,70 | 18,83 | 2 | 20292,40 | 86,92 |
| | 3 | 1954,40 | 18,77 | 3 | 20507,90 | 87,73 |
| | 4 | 1961,35 | 18,80 | 4 | 19912,60 | 85,51 |
| | 5 | 2007,57 | 18,97 | 5 | 19581,60 | 84,28 |
| | 6 | 2008,80 | 18,97 | 6 | 20229,60 | 86,69 |
| | 7 | 1996,98 | 18,93 | 7 | 20835,80 | 88,94 |
| | 8 | 1962,03 | 18,80 | 8 | 19031,40 | 82,24 |
| | 9 | 1964,91 | 18,81 | 9 | 20324,50 | 87,04 |
| | 10 | 2064,05 | 19,18 | 10 | 18566,10 | 80,51 |
| Parámetro | \bar{x} [CEP] real ($\mu\text{g/mL}$) | σ [CEP] real ($\mu\text{g/mL}$) | DER (%) | \bar{x} [CEP] real ($\mu\text{g/mL}$) | σ [CEP] real ($\mu\text{g/mL}$) | DER (%) |
| Rep. (Día 1) | 18,74 | 0,16 | 0,83 | 92,89 | 3,29 | 3,54 |
| P.I. (Día 1 y 2) | 18,80 | 0,16 | 0,86 | 89,35 | 4,67 | 5,23 |
| LD ($3*\sigma$ [CEP] real día 1) | 0,47 | | | | | |
| LC ($10*\sigma$ [CEP] real día 1) | 1,56 | | | | | |

Tabla C 4 Resultados de recuperación (%R) de CEP derivatizado para la metodología GC- μ ECD descrita en este estudio.

| [CEP] teórica ($\mu\text{g/mL}$) | Área (mUA) | [CEP] real ($\mu\text{g/mL}$) | R (%) | R (%) [CEP] | R (%) promedio en rango |
|---------------------------------------|---------------|------------------------------------|--------|-------------|-------------------------------|
| 19,25 | 1908,71 | 18,60 | 96,65 | 96,76 | 99,53 |
| | 1911,51 | 18,61 | 96,70 | | |
| | 1923,88 | 18,66 | 96,94 | | |
| 41,33 | 6919,63 | 37,22 | 90,06 | 100,43 | |
| | 8900,66 | 44,59 | 107,87 | | |
| | 8396,87 | 42,71 | 103,34 | | |
| 75,27 | 17354,10 | 76,00 | 100,98 | 101,60 | |
| | 16925,30 | 74,41 | 98,86 | | |
| | 18159,00 | 79,00 | 104,95 | | |
| 113,54 | 25590,00 | 106,61 | 93,90 | 99,33 | |
| | 27267,40 | 112,85 | 99,39 | | |
| | 28897,40 | 118,91 | 104,72 | | |

ANEXOS D: DSA-TOF-MS

Tabla D 1 Resultados curva de calibración de CEP en agua por DSA-TOF-MS

| \bar{x} [CEP] ($\mu\text{g/mL}$) | \bar{x} Área (mUA) | σ Área (mUA) | DER (%) |
|--------------------------------------|----------------------|---------------------|---------|
| 1,017 | 0,285 | 0,025 | 8,77 |
| 4,991 | 1,043 | 0,312 | 29,92 |
| 10,139 | 1,780 | 0,694 | 38,99 |
| 15,182 | 1,680 | 0,285 | 16,95 |
| 30,217 | 2,757 | 1,572 | 57,04 |
| 50,088 | 4,937 | 1,556 | 31,51 |

Tabla D 2 Resultados curva de calibración proveniente de HPLC-DAD de CEP en orina por DSA-TOF-MS. m/z 86 = [NMP-H]⁺ ; m/z 114 = [Creatinina-H]⁺

| [CEP] ($\mu\text{g/mL}$) | \bar{x} Área m/z 86/ Área m/z 114 (mUA) | σ Áreas (mUA) | DER (%) |
|----------------------------|--|----------------------|---------|
| 1 | 0,0082 | 0,0003 | 3,15 |
| 5 | 0,0132 | 0,0010 | 7,63 |
| 15 | 0,0175 | 0,0013 | 7,65 |
| 50 | 0,0353 | 0,0157 | 44,36 |

Tabla D 3 Resultados curva de calibración proveniente de HPLC-DAD de CEP en extracto de BSM por DSA-TOF-MS. m/z 86 = [NMP-H]⁺; m/z 136 = fragmento de la matriz BSM

| [CEP] ($\mu\text{g/mL}$) | \bar{x} Área m/z 86/ Área m/z 136 (mUA) | σ Áreas (mUA) | DER (%) |
|----------------------------|--|----------------------|---------|
| 1 | 0,2909 | 0,0856 | 29,42 |
| 5 | 0,4618 | 0,1827 | 39,57 |
| 15 | 0,4253 | 0,0774 | 18,20 |
| 50 | 1,2736 | 0,4806 | 37,74 |

Tabla D 4 Resultados de análisis de varianza (ANOVA) para CEP en agua determinado por diferentes analistas. Por DSA-TOF-MS

| Fuente | Suma de Cuadrados | gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------------|
| Entre grupos | 0,00724286 | 1 | 0,00724 | 1,38 | 0,2935 |
| Intra grupos | 0,0263 | 5 | 0,00526 | | |
| Total (Corr.) | 0,0335429 | 6 | | | |

Tabla D 5 Resultados de análisis de varianza (ANOVA) para CEP en orina determinado por diferentes analistas. Por DSA-TOF-MS

| Fuente | Suma de Cuadrados | gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------------|
| Entre grupos | 2,4551E-06 | 1 | 2,4551E-06 | 2,05 | 0,2024 |
| Intra grupos | 7,193E-06 | 6 | 1,1988E-06 | | |
| Total (Corr.) | 9,648E-06 | 7 | | | |

Tabla D 6 Resultados de análisis de varianza (ANOVA) para CEP en extracto de BSM determinado por diferentes analistas. Por DSA-TOF-MS

| Fuente | Suma de Cuadrados | gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|--------------|
| Entre grupos | 0,123345 | 1 | 0,123345 | 1,9 | 0,217 |
| Intra grupos | 0,388931 | 6 | 0,064821 | | |
| Total (Corr.) | 0,512276 | 7 | | | |