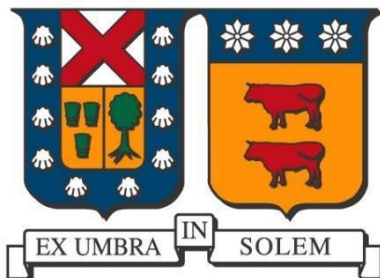


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
SANTIAGO, CHILE



**“DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA
IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE
COMPUESTOS FARMACÉUTICAMENTE ACTIVOS EN
MATRICES ACUOSAS UTILIZANDO EXTRACCIÓN EN
FASE SÓLIDA Y UHPLC/MS/MS”**

ALEXANDRA SCARLETT BACHMANN PEÑALOZA

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER
EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA QUÍMICA**

PROFESORA GUÍA: DRA. ANDREA CARVAJAL
PROFESORA CO-REFERENTE: DRA. CATHERINE TESSINI
PROFESORA EVALUADORA EXTERNA: DRA. CAROLYN PALMA

2026



CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

Tipo de monografía (marcar una opción): Memoria o trabajo de título Tesis de Postgrado

Título del trabajo: DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FARMACÉUTICAMENTE ACTIVOS EN MATRICES ACUOSAS UTILIZANDO EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y UHPLC/MS/MS

Nombre del candidato(a): Alexandra Scarlett Bachmann Peñaloza

Carrera / Grado: Magíster en Ciencias de la Ingeniería Química

Campus: Casa central, Valparaíso **Departamento:** Ingeniería Química y Ambiental

2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, Andrea Carvajal Guevara_, en mi calidad de profesor(a) guía/director(a) del trabajo académico mencionado anteriormente **DEJO CONSTANCIA** que:

- He revisado esta versión del documento y corresponde a la versión final aprobada del trabajo.
- El trabajo cumple con los requisitos académicos y de formato establecidos por la institución.

3.- EVALUACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD POR PROPIEDAD INDUSTRIAL (marcar una opción)

El trabajo **NO contiene** información que amerite confidencialidad y puede ser publicado de inmediato en repositorio con acceso abierto.

El trabajo **CONTIENE** información con potenciales implicancias de propiedad industrial o intelectual y requiere un periodo de confidencialidad (**embargo**) por (**marcar una opción**):

6 meses 12 meses 2 años 3 años 5 años 10 años

Fundamentación de la necesidad de confidencialidad (obligatorio si se solicita embargo):

4.- FIRMAS

Profesor(a) guía o director(a) de memoria o tesis:

Fecha: _____ 08/01/2026 _____ **Firma:** _____ 

Estudiante o Candidato(a):

Fecha: _____ 08/01/2026 _____ **Firma:** _____ 

Este formulario debe ser insertado como página 2 de la memoria o tesis, completado y firmado por estudiante y profesor(a) antes de la entrega en portal PRISMA de Biblioteca USM



Agradecimientos

En primera instancia quisiera agradecer profunda y verdaderamente a mi familia que me ha acompañado y soportado a lo largo de estos casi cuatro años de investigación; en especial a Ana, Lucio y Cristóbal por darme una razón y motivación continua en el transcurso de esta travesía que conlleva, sin lugar a duda, una gran motivación, perseverancia y real vocación.

Agradecer a mis amigos y cada persona que estuvo conmigo a lo largo de estos años, soportándome y dándome fuerzas y motivaciones para seguir. Gracias por recordarme mis inmensas capacidades, lo importante del proceso y lo crucial de los resultados entregados.

Un agradecimiento sincero a mi ángel guardián Belfor Aguayo, quien, aunque no me acompañe en vida, siempre está conmigo. Mi motor de ingeniería y mi más fiel admirador, que sin lugar a dudas ha estado a mi lado todo este camino.

Agradecer a la Universidad Técnica Federico Santa María que hizo posible la realización del estudio y su difusión a través de becas estudiantiles y para congresos.

Agradecer al proyecto FONDEQUIP-EQM190066 y ANID Proyecto FONDEF ID22I10011 que me permitió llevar a cabo esta investigación en el área de Química Analítica mediante la adquisición de un sistema de cromatografía líquida acoplado a un detector de masa de triple cuadrupolo LC/MS/MS.

Finalmente, agradecer a Jenifer y a mis profesoras a cargo Andrea, Carolyn y Catherine por apoyarme en todas las decisiones que se realizaron en la investigación, al departamento de química de la USM Campus Valparaíso por abrirme las puertas y recibirme como una más del área. Por ser mis compañeros y mi apoyo durante todos estos meses de arduo trabajo.

Finalmente, quiero agradecer y destacar a la gran docente y madre adoptiva Beatriz Vivanco, quien fue mi fiel compañera en todo este proceso. Sin su apoyo e involucramiento, nada de esto sería posible. Gracias por toda su paciencia, dedicación, escucha y recepción que tuvo para conmigo. Ambas sabemos que no fueron unos años fáciles; pero siempre estuvo disponible y con una sonrisa para atenderme, ayudarme y levantarme el ánimo en mis peores momentos investigativos. Las palabras de agradecimiento no son suficientes para poder retribuir el enorme esfuerzo que ha hecho por mí y esta gran investigación.



Resumen

La escasez hídrica en Chile está impulsando la reutilización de aguas residuales como fuente de agua dulce. El desafío principal del reúso debe considerar la ineficacia de remover Contaminantes Emergentes (CE) mediante tratamientos convencionales, como fármacos que persisten en concentraciones traza (ng/L a µg/L) en las aguas tratadas. Los CE conllevan riesgos ecológicos y de salud pública, por lo que es necesario y urgente desarrollar e integrar metodologías analíticas sensibles para el monitoreo de la calidad del agua dulce residual y tratada, proporcionando base empírica para establecer normativas ambientales y tecnologías avanzadas de tratamiento. El objetivo general de este trabajo fue desarrollar una técnica analítica con cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (UHPLC/MS/MS) para la identificación y cuantificación de diez fármacos en matrices acuosas de forma simultánea, elegidos según su tasa de consumo y detección en Chile. Estos medicamentos fueron: metformina, atenolol, paracetamol, cafeína, carbamazepina, claritromicina, ketoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno y naproxeno.

La investigación se basó en el uso de extracción en fase sólida (SPE) para limpiar y preconcentrar las muestras de una planta de depuración y una muestra de agua potable. Se establecieron curvas de calibración para determinar la linealidad, límites de detección y cuantificación, y, se evaluó el porcentaje de recuperación utilizando una matriz sintética. Los resultados obtenidos indicaron que el método posee una excelente linealidad (R^2 entre 0,98 y 0,99); sin embargo, la cuantificación precisa se vio comprometida por la matriz y las interacciones entre analitos, destacándose una recuperación muy baja para metformina (5,17%), claritromicina (5,74%) y diclofenaco (23,21%), donde se sugiere que la polaridad extrema o la ionización impidieron su retención. Asimismo, se reportó una sobre-recuperación de ibuprofeno (264,18%) en la mezcla sintética, lo que indica una potenciación iónica, invalidando la cuantificación para este compuesto bajo la metodología de mezcla aplicada. A pesar de lo anterior, se confirmó la ubicuidad y transferencia de los diez fármacos en el ciclo del agua, teniendo que las altas concentraciones de medicamentos en la entrada primaria validaron la descarga directa y constante de los mismos debido al alto consumo poblacional.

Por otra parte, se encontraron nueve fármacos activos en el agua potable, lo que subraya que



los tratamientos convencionales de potabilización son insuficientes, generando una exposición crónica a la población. Si bien los tratamientos biológicos fueron eficaces para la remoción de fármacos biodegradables (cafeína, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno), los medicamentos recalcitrantes como carbamazepina, diclofenaco, claritromicina, atenolol, metformina y ketoprofeno mostraron una eliminación limitada o inferior. Se observó un aumento aparente en la concentración de algunos compuestos a lo largo del tratamiento, lo que se atribuye a la desconjugación enzimática de sus metabolitos en el lodo activado, virviendo al fármaco activo original y reintroduciéndolo al efluente.

Así, se logró establecer una metodología para la detección cualitativa de los diez compuestos en niveles traza, pero la cuantificación exacta se vio comprometida por la falta de robustez en la extracción SPE y la complejidad de la matriz. La persistencia de nueve fármacos activos en el agua potable genera una alerta sanitaria crítica y confirma la necesidad urgente de acción regulatoria. Por lo anterior, se destaca la urgencia de implementar tecnologías de tratamiento terciario avanzado para degradar este tipo de contaminantes, definiendo rangos de remoción de descarga obligatorios con un objetivo de recuperación del 70-120% exigido por estándares internacionales. Esto, debe ser complementado con políticas de recuperación de fármacos no usados (farmacias y hospitales) para reducir la entrada masiva de contaminantes de alto consumo a la red de aguas residuales.

La relevancia técnica y el impacto socioambiental de esta investigación fueron distinguidos en el Congreso de Ingeniería Sanitaria y Ambiental de AIDIS como el mejor póster. Este reconocimiento subraya la importancia de los hallazgos obtenidos y posiciona este estudio como un referente crítico para la futura regulación de contaminantes emergentes en las aguas de Chile.



Índice de contenido

Resumen	4
Capítulo 1: Introducción.	13
1.1 Escasez Hídrica.	13
1.2 Utilización de agua residual como fuente de agua potable.	15
1.3 Productos farmacéuticos.	17
Capítulo 2: Pregunta de investigación, hipótesis y objetivos.	19
2.1 Objetivos.	19
2.2 Pregunta de investigación e hipótesis.	20
Capítulo 3: Estado del Arte	21
3.1 Fármacos con mayor prevalencia en el Chile.	21
3.2 Características de compuestos farmacológicos a evaluar.	28
3.3 Ecotoxicidad de medicamentos seleccionados.	32
3.4 Normativa vigente para control de medicamentos en matrices acuosas.	35
3.5 Metodología analítica para el análisis de los contaminantes elegidos.	36
3.5.1 Tratamiento de muestras.	37
3.5.2 Optimización del tratamiento de muestras.	42
3.5.3 Separación de medicamentos por cromatografía.	44
3.5.4 Cromatografía líquida de alta y ultra eficiencia (HPLC y UHPLC).	46
3.5.5 Espectrometría de masas (MS).	48
3.5.6 Validación de método analítico.	53
Capítulo 4: Metodología experimental.	59
4.1 Selección de compuestos farmacológicos.	59
4.2 Recolección y conservación de muestras.	59
4.3 Pre-tratamiento y extracción de muestras.	60



4.3 Desarrollo de técnica analítica.	62
4.4 Estandarización de metodología y criterios cuantitativos.	64
Capítulo 5: Resultados y discusión.	65
5.1 Optimización de condiciones de separación.	65
5.2 Problemas de repetibilidad y reproducibilidad del método.	80
5.3 Selección de condición final de operación en la separación.	85
5.4 Iones característicos de analitos farmacéuticos seleccionados por MS.	88
5.5 Curvas de calibración de medicamentos.	90
5.6 Límite de detección y cuantificación de fármacos seleccionados.	95
5.7 Análisis de muestras de agua sintética.	97
5.8 Análisis de muestras de agua.	101
Capítulo 6: Conclusiones y recomendaciones.	107
Capítulo 7: Referencias.	111
Anexos.	131

Índice de Anexos

Anexo A: Muestreo de métodos para la estandarización de la metodología.....	131
Anexo B: Variaciones de gradiente implementado.	138
Anexo C: Variaciones de energía de colisión aplicada en Q2.....	146
Anexo D: Curvas de calibración de compuestos seleccionados.....	147

Índice de figuras

Figura 1: Mecanismo de sorción de CE en una PTAS típica. Rout et al., 2021.....	16
Figura 2: Etapas de preparación de muestras. Almeida, 2021.....	37
Figura 3: Etapas de extracción en fase sólida. Qin et al., 2023.....	39
Figura 4: Separación cromatográfica en columna. CWS BROAD, 2023.	44
Figura 5: Equipo de UHPLC. Aryal, 2024.	47



Figura 6: Funcionamiento de un espectrómetro de masas. Camacho, 2018.....	49
Figura 7: Funcionamiento de ESI. Misal, 2008.....	51
Figura 8: Funcionamiento de un espectrómetro de masas tipo cuadrupolo. Harris, 2016. ..	52
Figura 9: Diagrama esquemático de triple cuadrupolo. Harris, 2016.....	53
Figura 10: Ejemplo de cromatograma. Harris, 2016.	54
Figura 11: Ejemplo de espectrómetro de masas. Harris, 2016.	55
Figura 12: Elución en modo positivo con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo.....	66
Figura 13: UV-VIS en modo negativo con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo.....	67
Figura 14: Nueva respuesta en positivo con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo.....	68
Figura 15: Elución en modo positivo con 90% de ácido fórmica al 0,1% y 10% metanol..	70
Figura 16: Elución en modo negativo con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de metanol.	71
Figura 17: Respuesta cromatográfica en separación de fármacos con variación temperatura.	73
Figura 18: Respuesta cromatográfica con variación de energía en ionización positiva.	74
Figura 19: Respuesta cromatográfica en modo negativo con 90% de agua y 10% de metanol.	76
Figura 20: Respuesta cromatográfica en modo negativo con 90% de agua y 10% de metanol.	77
Figura 21: Respuesta cromatográfica en modo negativo con 25% de agua y 75% de acetonitrilo.....	78
Figura 22: Respuesta con cambio de temperatura en modo negativo con 25% de agua y 75% de acetonitrilo.	79
Figura 23: Respuesta con cambio de energía de fuente en modo negativo con 25% de agua y 75% de acetonitrilo.....	80
Figura 24: Curva de calibración modo de ionización positiva.	91
Figura 25: Curva de calibración modo de ionización negativa.	91
Figura 26: Contaminación de columna para modo positivo (a) y negativo (b).....	92



Figura 27: Propuesta para evaluación de compatibilidad de cartucho SPE.	100
Figura 28: respuesta para tratamiento primario.....	102
Figura 29: Respuesta para entrada de tratamiento secundario.	102
Figura 31: Respuesta para agua potable.	103
Figura 32: Respuesta cromatográfica en modo positivo con método 1.....	140
Figura 33: Respuesta cromatográfica en modo positivo con método 2.....	141
Figura 34: Respuesta cromatográfica en modo positivo con método 3.....	142
Figura 35: Respuesta cromatográfica en modo positivo con método 4.....	143
Figura 36: Respuesta cromatográfica en modo positivo con método 5.....	144
Figura 37: Respuesta cromatográfica en modo positivo con método 6.....	145
Figura 38: Respuesta cromatográfica en modo positivo con método 7.....	146

Índice de tablas

Tabla 1: Características de fármacos.....	29
Tabla 2: Continuación de características de fármacos.....	30
Tabla 3: Efectos toxicológicos de fármacos seleccionados.....	33
Tabla 4: Continuación de efectos toxicológicos de fármacos seleccionados.	34
Tabla 5: Interacción con HLB de fármacos seleccionados.....	41
Tabla 6: Comparativa de técnicas cromatográficas para detección de medicamentos.	45
Tabla 7: Comparativa de fuentes de ionización para detección de medicamentos.	50
Tabla 8: concentraciones tomadas de cada compuesto farmacológico para matriz.	61
Tabla 9: Parámetros utilizado en el MS.....	64
Tabla 10: Resultados de primera metodología de separación.	66
Tabla 11: Nuevas condiciones de trabajo con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo.	69
Tabla 12: parámetros iniciales con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de metanol.	71
Tabla 13: Elución compuestos negativos con 90% de agua y 10% de metanol.....	75
Tabla 14: Variación de condiciones con 25% de agua y 75% de acetonitrilo.....	78
Tabla 15: Elución compuestos farmacológicos positivos con condición final.....	86
Tabla 16: Parámetros dispuestos en SIM.	88
Tabla 17: Parámetros dados por Product Ion Scan.....	89



Tabla 18: Parámetros finales por Producto Ion Scan.	90
Tabla 19: Valores de contaminación de columna.....	93
Tabla 20: Curva de calibración de medicamentos seleccionados.....	93
Tabla 21: Parámetros para límite de detección y cuantificación.	95
Tabla 22: Resultados de evaluación muestra sintética.	97
Tabla 23: Detección y cuantificación de medicamentos en muestras de agua.	103
Tabla 24: Elución de fármacos con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo para método 1.	139
Tabla 25: Elución de fármacos con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo para método 2.	140
Tabla 26: Elución de fármacos con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo para método 3.	141
Tabla 27: Elución de fármacos con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo para método 4.	142
Tabla 28: Elución de fármacos con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo para método 5.	143
Tabla 29: Elución de fármacos con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo para método 6.	144
Tabla 30: Elución de fármacos con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo para método 7.	145
Tabla 31: Variaciones de energía de colisión aplicadas para cada fármaco.....	146

Índice de gráficos

Gráfico 1: Fármacos reportados en matrices acuosas. Villa, 2012; Jachero et al., 2013; Manzo et al., 2014; Moncada, 2015; Becerra et al., 2015; Wilkinson et al., 2022; MacKeown et al., 2024; Inostroza et al., 2024; Soriano et al., 2024.	21
Gráfico 2: Cuenta de veces detectado por fármaco en aguas. Villa, 2012; Jachero et al., 2013; Manzo et al., 2014; Moncada, 2015; Becerra et al., 2015; Wilkinson et al., 2022; MacKeown et al., 2024; Inostroza et al., 2024; Soriano et al., 2024.....	22
Gráfico 3: Frecuencia de detección de fármacos. Wilkinson et al., 2022; MacKeown et al., 2024.	23
Gráfico 4: Promedio de concentración encontrada en rangos de 60.000-5.000 ng/L.	24
Gráfico 5: Promedio de concentración encontrada en rangos de 5.000-1.000 ng/L.	25



Gráfico 6: Promedio de concentración encontrada en rangos de 1.000-100 ng/L. Villa, 2012; Jachero et al., 2013; Manzo et al., 2014; Moncada, 2015; Becerra et al., 2015; Wilkinson et al., 2022; MacKeown et al., 2024; Inostroza et al., 2024; Soriano et al., 2024.	25
Gráfico 7: Promedio de concentración encontrada en rangos de 100-0 ng/L. Villa, 2012; Jachero et al., 2013; Manzo et al., 2014; Moncada, 2015; Becerra et al., 2015; Wilkinson et al., 2022; MacKeown et al., 2024; Inostroza et al., 2024; Soriano et al., 2024.....	26
Gráfico 8: Promedio de concentración encontrada en aguas residuales. MacKeown et al., 2024.	27
.....	76
Gráfico 9: curva baja de metformina.	147
Gráfico 10: Probabilidad normal de metformina baja.	148
Gráfico 11: Gráfico de residuales de metformina baja.	148
Gráfico 12: Curva de regresión ajustada de metformina baja.	148
Gráfico 13: Curva de calibración de metformina alta.	149
Gráfico 14: Probabilidad normal de metformina alta.	149
Gráfico 15: Gráfico de residuales de metformina alta.	149
Gráfico 16: Curva de regresión ajustada de metformina alta.	150
Gráfico 17: Curva de calibración de atenolol baja.	150
Gráfico 18: Probabilidad normal de atenolol baja.	151
Gráfico 19: Curva de regresión ajustada de atenolol baja.	151
Gráfico 20: Gráfico de residuales de atenolol baja.	151
Gráfico 21: Curva de calibración de atenolol alta.	152
Gráfico 22: Probabilidad normal de atenolol alta.	152
Gráfico 23: Curva de regresión ajustada de atenolol alta.	152
Gráfico 24: Gráfico de residuales de atenolol alta.	153
Gráfico 25: Curva de calibración de paracetamol bajo.	153
Gráfico 26: Probabilidad normal de paracetamol bajo.	153
Gráfico 27: Curva de regresión ajustada de paracetamol bajo.	154
Gráfico 28: Gráfico de residuales de paracetamol bajo.	154
Gráfico 29: Curva de calibración de paracetamol alta.	155
Gráfico 30: Probabilidad normal de paracetamol alta.	155
Gráfico 31: Gráfico de residuos de paracetamol alta.	155
Gráfico 32: Curva de calibración de paracetamol alta.	155
Gráfico 33: Curva de calibración de cafeína baja.	156
Gráfico 34: Probabilidad normal de cafeína baja.	156
Gráfico 35: Curva de regresión ajustada de cafeína baja.	157
Gráfico 36: Gráfico de residuales de cafeína baja.	157
Gráfico 37: Curva de calibración de cafeína alta.	158
Gráfico 38: Probabilidad normal de cafeína alta.	158
Gráfico 39: Curva de regresión ajustada de cafeína alta.	158
Gráfico 40: Gráfico de residuales de cafeína alta.	158
Gráfico 41: Curva de calibración de carbamazepina.	159
Gráfico 42: Probabilidad normal de carbamazepina.	159
Gráfico 43: Curva de regresión ajustada de carbamazepina.	159
Gráfico 44: Gráfico de residuales de carbamazepina.	160
Gráfico 45: Curva de calibración de claritromicina baja.	160



Gráfico 46: Probabilidad normal de claritromicina baja.	160
Gráfico 47: Curva de regresión ajustada de claritromicina baja.	161
Gráfico 48: Gráfico de residuales de claritromicina baja.	161
Gráfico 49: Curva de calibración de claritromicina alta.....	162
Gráfico 50: Probabilidad normal de claritromicina alta.	162
Gráfico 51: Curva de regresión ajustada de claritromicina alta.	162
Gráfico 52: Gráfico de residuales de claritromicina alta.....	163
Gráfico 53: Curva de calibración de ketoprofeno bajo.....	163
Gráfico 54: Probabilidad normal de ketoprofeno bajo.	163
Gráfico 55: Curva de regresión ajustada de ketoprofeno bajo.	164
Gráfico 56: Gráfico de residuales de ketoprofeno bajo.....	164
Gráfico 57: Curva de calibración de ketoprofeno alto.	164
Gráfico 58: Probabilidad normal de ketoprofeno alto.....	165
Gráfico 59: Curva de regresión ajustada de ketoprofeno alto.	165
Gráfico 60: Gráfico de residuales de ketoprofeno alto.....	165
Gráfico 61: Curva de calibración de diclofenaco bajo.	166
Gráfico 62: Probabilidad normal de diclofenaco bajo.....	166
Gráfico 63: Curva de regresión ajustada de diclofenaco bajo.	166
Gráfico 64: Gráfico de residuales de diclofenaco bajo.....	167
Gráfico 65: Curva de calibración de diclofenaco alto.	167
Gráfico 66: Probabilidad normal de diclofenaco alto.....	167
Gráfico 67: Curva de regresión ajustada de diclofenaco alto.	168
Gráfico 68: Gráfico de residuales de diclofenaco alto.	168
Gráfico 69: Curva de calibración de ibuprofeno bajo.	168
Gráfico 70: Probabilidad normal de ibuprofeno bajo.....	169
Gráfico 71: Curva de regresión ajustada de ibuprofeno bajo.	169
Gráfico 72: Gráfico de residuales de ibuprofeno bajo.....	169
Gráfico 73: Curva de calibración de ibuprofeno alto.	170
Gráfico 74: Probabilidad normal de ibuprofeno alto.....	170
Gráfico 75: Curva de regresión ajustada de ibuprofeno alto.....	170
Gráfico 76: Gráfico de residuales de ibuprofeno alto.....	171
Gráfico 77: Curva de calibración de naproxeno bajo.	171
Gráfico 78: Probabilidad normal de naproxeno bajo.....	171
Gráfico 79: Curva de regresión ajustada de naproxeno bajo.....	172
Gráfico 80: Gráfico de residuales de naproxeno bajo.	172
Gráfico 81: Curva de calibración de naproxeno alto.....	172
Gráfico 82: Probabilidad normal de naproxeno alto.	173
Gráfico 83: Curva de regresión ajustada de naproxeno alto.....	173
Gráfico 84: Gráfico de residuales de naproxeno alto.	173



Capítulo 1: Introducción.

1.1 Escasez Hídrica.

El agua representa el pilar fundamental de la vida y el desarrollo socioeconómico, esencial para la biósfera, la industria y el consumo humano. Sin embargo, producto del aumento de la población mundial, el avance tecnológico, y el incremento de procesos, suministros y artículos disponibles; existe una creciente escasez hídrica exacerbada por el cambio climático y la sobreexplotación del recurso (Morales, 2021) que mantiene al 25% de la población mundial con una demanda de consumo de agua que supera la oferta disponible (Naciones Unidas, 2018); proyectando que para el año 2025 la mitad de la población mundial se encontrará en zonas de escasez (Organización Mundial de Salud, 2017).

Específicamente, Chile figura dentro de los 20 países con mayor riesgo hídrico en el mundo, de acuerdo al Instituto Mundial de Recursos (WRI). Según el indicador de 2019, Chile se encuentra en la posición N°18 a nivel global (Morales, 2021), donde más del 50% de las comunas del país se encuentra bajo sequía, abarcando el 47,5 % de la población nacional (Núñez, 2022); teniendo como principales causas de brecha y riesgo hídrico el déficit de gestión del agua (44%), el aumento de la demanda del recurso (17%), la contaminación del agua (14%), la disminución de oferta de este (12%), el daño ambiental existente (6%) y el incremento en la frecuencia de los desastres naturales (5%) (Fundación Chile, 2022).

La gestión del agua se encuentra en un punto crítico, necesitando una estrategia de gestión e institucionalidad del agua a nivel global que permita la conservación y protección del ecosistema hídrico con uso eficiente del recurso y una migración e incorporación de nuevas fuentes de agua (Fundación Chile, 2022) que consideren la contaminación de las matrices acuosas de forma natural o antropogénica (Jakimska *et al.*, 2014), donde el residuo deje de ser visto como un desecho y pase a ser un activo.

Bajo esta premisa, la reutilización de aguas residuales para la producción de agua dulce (Rodríguez *et al.*, 2020) es una alternativa latente y comprometedora ya que cada año a nivel mundial se generan alrededor de 359 mil millones de metros cúbicos de aguas residuales, donde sólo el 11% de estas aguas generadas son reutilizadas; siendo alrededor del 48%



liberada al medio sin tratamiento (Jones, 2021), exacerbando la contaminación de matrices acuosas tanto por vías naturales como antropogénicas. Así, el Informe de los Objetivos de Desarrollo Sostenible publicado por las Naciones Unidas en el año 2023, expresa que en el 2030 se debe reducir a la mitad el agua no tratada debiendo disminuir su contaminación a través del control en la descarga de materiales y productos químicos peligrosos y la eliminación del vertimiento (Naciones Unidas, 2023);

En este escenario, Chile presenta una posición de liderazgo regional y mundial en infraestructura de saneamiento, pero con matices importantes entre lo urbano y lo rural. La cobertura de agua potable y alcantarillado en áreas urbanas alcanza niveles de 99,9% en agua potable y 97,5% en alcantarillado, teniendo que casi todas las aguas servidas recolectadas en las ciudades reciben tratamiento antes de ser devueltas al medio; no obstante, solo el 47% de los hogares rurales tiene acceso a agua potable por cañería, y menos del 5% cuenta con sistemas de alcantarillado adecuados (Baeza , 2025) .

A pesar de tratar gran parte de sus aguas, Chile enfrenta la paradoja de que solo el 4,4% de este recurso tratado es reutilizado (Andess Chile, 2024), siendo el resto descargado al mar a través de emisarios submarinos o devuelto a cauces sin un aprovechamiento secundario sistemático, debiendo apuntar en una estrategia nacional que permita el reúso de aguas grises y residuales para fines agrícolas, industriales o de recarga de acuíferos que permitan mitigar el estrés hídrico que afecta especialmente desde la región de Coquimbo hasta la Metropolitana, donde la escorrentía per cápita está bajo el umbral de escasez severa de 500 m³/persona/año (Baeza , 2025) .

Teniendo que el volumen de las aguas servidas tratadas en el año 2022 llegó a los 1.225 millones de m³ (Andess Chile, 2022), la institucionalidad chilena debe evolucionar para que el porcentaje de aguas tratadas no sea solo una estadística de saneamiento, sino una base de seguridad hídrica mediante el reúso a gran escala, cerrando la brecha de desigualdad que aún persiste en el mundo rural; pero ¿Qué son las aguas residuales y cuál es la efectividad del tratamiento de agua residual para su uso como fuente de agua potable?



1.2 Utilización de agua residual como fuente de agua potable.

Se define el agua residual como toda aquella agua que procede de viviendas, poblaciones o zonas industriales, que arrastra suciedades y detritus. Entre estas aguas se encuentran: efluentes domésticos procedentes de zonas de viviendas y servicios (excremento, orina, lodos fecales, aguas de lavado y de baño), agua de establecimientos comerciales e instituciones, incluidos hospitales; efluentes industriales, aguas pluviales y otras escorrentías urbanas, agrícola, hortícola y acuícola (UNESCO, 2017).

En la actualidad se llevan a cabo procesos de depuración de aguas residuales en los cuales se emplean métodos clásicos para limpiar el agua usada con el fin de ser devuelta al medio ambiente sin causar contaminación. En específico, se inicia el proceso con un pretratamiento encargado de eliminar sólidos grandes como trapos, plásticos, arena, grasas, aceites y otros; siendo posteriormente dirigidas a un proceso de sedimentación donde los sólidos suspendidos orgánicos e inorgánicos se asientan por gravedad; llevando la corriente de agua residual a un tratamiento biológico encargado de eliminar la materia orgánica que está disuelta y en suspensión en la matriz con el propósito de trasladar la corriente final a una última etapa previo a su liberación en el medio, que remueve contaminantes específicos residuales como nitrógeno, fósforo, sólidos finos, orgánicos, olores y otros (Salimul, 2025; Igere, *et al.*, 2020).

A pesar de lo anterior, se ha demostrado que estos métodos clásicos aplicados en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAS) no son capaces de remover una serie de contaminantes, conocidos como contaminantes emergentes (CE) (Herrera *et al.*, 2024); los cuales requieren una eliminación a escala micro en vez de macro (ng/L hasta ug/L); persistiendo en el recurso hídrico que es liberado al medio. Con ello, las aguas residuales se reconocen como fuentes de estos compuestos solubles que quedan retenidos en los suelos y/o sedimentos, producto de su ingreso por medio de aguas domésticas o industriales, residuos de plantas de tratamiento, efluentes hospitalarios, insumos aplicados a actividades ganaderas o agrícolas, vertederos y otros derivados (Rout *et al.*, 2021; Wilkinson *et al.*, 2022).

Los contaminantes emergentes se definen como aquellas sustancias químicas sintéticas o naturales de distinto origen que presentan una introducción continua en el medio ambiente sin control de su concentración bajo normativas ambientales, cuya presencia si bien no es

relativamente nueva; sí lo es los efectos adversos que pueden causar tanto el ecosistema como en la salud humana (Gil *et al.*, 2012). De este modo, la descarga de aguas residuales, incluso si han sido tratadas, puede introducir contaminantes como productos farmacéuticos, y estimulantes en el medio ambiente (MacKeown *et. al.*, 2024; Soriano *et. al.*, 2024); donde su concentración va a depender de la eficiencia de remoción del tratamiento usado; pues, ésta varía según la persistencia de los CE, sus propiedades fisicoquímicas, las tecnologías empleadas y las condiciones operativas/ambientales (Grujić *et. al.*, 2009). No obstante, existen rangos de eliminación características en cada etapa según la Figura 1 adjunta:

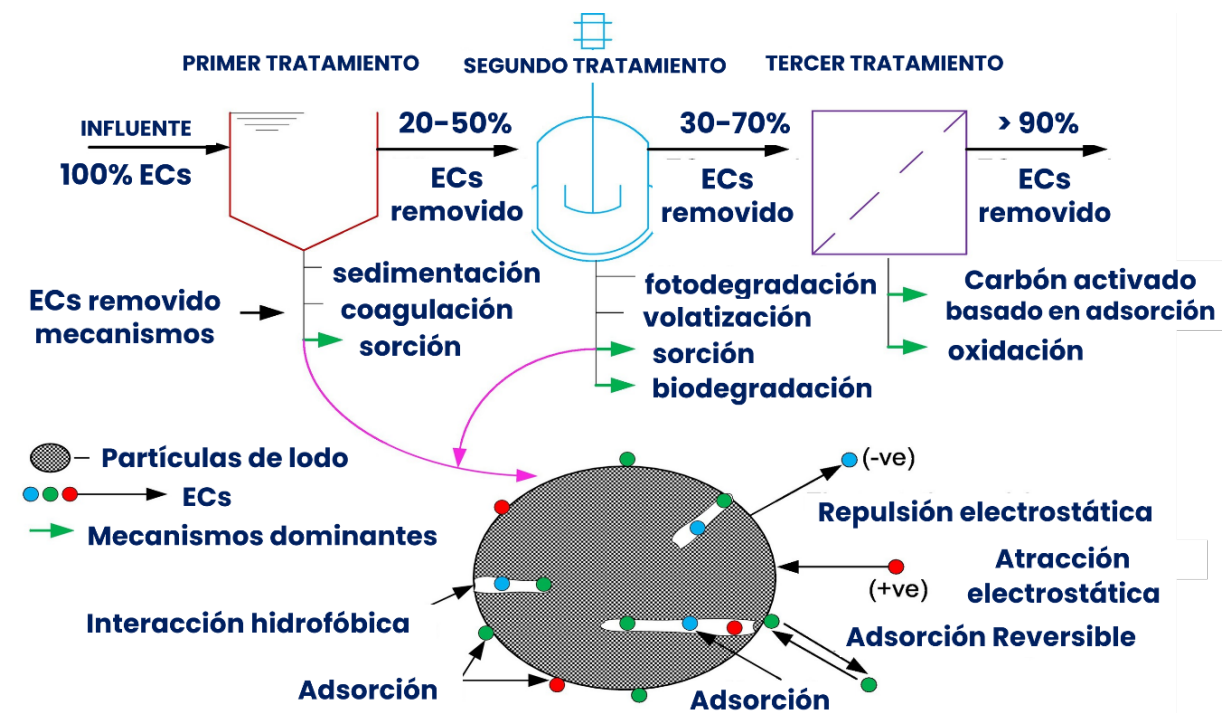


Figura 1: Mecanismo de sorción de CE en una PTAS típica. Rout *et al.*, 2021.

Según la Figura 1, la eficiencia de remoción de los CE en el tratamiento primario varía en un rango del 20-50% dado principalmente por la sorción (tanto absorción hidrofóbica en la fracción lipídica del lodo primario como adsorción electrostática en la superficie de las partículas de lodo). Asimismo, en el tratamiento secundario que incluye procesos biológicos, se logra una eliminación del 30-70% producto de la biodegradación y/o biotransformación generada con las enzimas. Por último, para los sistemas que utilizan una tercera parte del tratamiento se ha visto una remoción superior al 90%; llegando al 95% con procesos de lodos activados y desinfección con hipoclorito (Rout *et al.*, 2021).



A pesar de la alta eficiencia de los tratamientos existentes, una porción del principio activo persiste, liberándose continuamente al medio ambiente. Su acumulación e introducción continua en los seres vivos ha llevado consigo efectos adversos en los mismos, lo que subraya la necesidad primordial de identificar y estudiar los productos que pertenecen a este tipo de contaminantes (Wilkinson *et al.*, 2022).

Se tiene que el mayor porcentaje de CE viene dado por los medicamentos, donde su continuo aumento en demanda y consumo los ha posicionado como unos de los compuestos más estudiados dado el envejecimiento de la población, la prevalencia de enfermedades crónicas y tratamientos para el bienestar de la salud humana y animales; y, la innovación en el desarrollo de nuevos productos. Así, se emiten al medio ambiente durante su elaboración, sus desechos de productos vencidos o no utilizados por la industria, su uso agrícola y su consumo; en donde una parte del principio activo se metaboliza y el resto se elimina a través de la orina o las heces (Barrios *et al.*, 2018; Rout *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2022; Wilkinson *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2022).

1.3 Productos farmacéuticos.

Son compuestos de origen natural y/o sintético que tienen por objetivo principal el tratamiento o prevención de una enfermedad. Los medicamentos poseen principios activos diseñados para inducir una acción farmacológica, inmunológica o metabólica que busca restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas del organismo; pudiendo ser biológicamente activos incluso a bajas concentraciones con un potencial riesgo a generar efectos no deseados o adversos en los organismos más allá de su función original (Tejada *et al.*, 1014). Los productos farmacéuticos contienen diferentes propiedades fisicoquímicas que favorecen su persistencia en el medio ambiente; con estructuras y tiempos de degradación en función de su modo de acción y sus vías metabólicas (Bean *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2021; Giwa *et al.*, 2021).

Bajo este contexto, se prevé que los ingresos generados por el sector farmacéutico sigan creciendo a lo largo de los años, desde 1.099 billones de dólares en 2023 a 1.454 billones de dólares en 2029, lo cual corresponde a un aumento del 32% (Statista, 2025).



La venta de medicamentos en Chile está normada por las Leyes 20.724 y 21.331, que controlan su distribución según riesgos y uso. Esta regulación clasifica los fármacos en dos grandes grupos: prescripción médica como antibióticos, psicotrópicos, hormonas y tratamientos para enfermedades crónicas y; uso común como analgésicos, antigripales y medicamentos para trastornos digestivos, entre otros.

El mercado farmacéutico chileno generará ingresos de 2.570 millones de dólares en 2025. Los medicamentos oncológicos serán la clase con mayor volumen de uso, alcanzando una cifra de 460.70 millones de dólares este año. Además, se espera que la industria mantenga una tasa de crecimiento anual constante del 4,71% entre 2025 y 2029, lo que resultará en un volumen de mercado total de 3.090 millones de dólares para 2029 (Statista, 2024).

Debido a la gran diversidad de estos productos es imprescindible determinar los compuestos de mayor consumo para evaluar sus efectos toxicológicos y las estrategias de remoción (Parolini, 2020; Samal *et al.*, 2022). A pesar de esta necesidad, la información existente sobre la acumulación de estos productos en suelos y sus riesgos para especies terrestres es insuficiente y limitada (Biel *et al.*, 2018); por ende, se busca generar nuevas bases datos que puedan respaldar la implementación de futuras normativas y leyes orientadas a mitigar la constante interacción de estos compuestos con la salud de las personas y los ecosistemas.

Conocer los medicamentos con mayor consumo, detección y predominancia en las aguas residuales es de vital importancia para priorizar el monitoreo, evaluar su impacto ecológico y desarrollar tecnologías avanzadas de degradación o remoción. Al establecer una base de datos de estos compuestos y sus características, será posible fijar límites máximos permisibles en aguas, generar nuevas regulaciones sobre su eliminación y lanzar campañas de concientización, mejorando así la seguridad hídrica. Esta labor se vuelve más imperativa dada la creciente necesidad de reutilizar aguas residuales tratadas como fuente de agua potable. La ingestión constante de estas sustancias, incluso a bajas concentraciones, conlleva efectos adversos a largo plazo en la salud humana, la flora y la fauna. Por ello, es fundamental garantizar la seguridad del agua potable obtenida de esta fuente no convencional, lo que exige la introducción de nuevos equipos y metodologías analíticas más sensibles y selectivas para detectar y cuantificar los CE, superando los desafíos que imponen sus bajas concentraciones, la complejidad de la matriz del agua residual y la diversidad de compuestos.



Capítulo 2: Pregunta de investigación, hipótesis y objetivos.

Debido a que existe evidencia del efecto antropológico y la presencia de trazas de compuestos farmacéuticos en aguas residuales y naturales; donde la concentración y tipo de medicamentos encontrados variará según el alcance, la cultura y el consumo de los fármacos en cada nación, la presente investigación tiene como objetivo central identificar y cuantificar la prevalencia de diez fármacos en matrices acuosas, abordando el creciente problema de los contaminantes emergentes. Para ello, se seleccionaron los diez medicamentos de mayor consumo social, presencia y frecuencia de detección en diversos cuerpos de agua. Esta selección se complementa con una evaluación de los efectos toxicológicos que su continua liberación puede generar en el medio ambiente (flora y fauna) y en la salud humana.

Una vez definidos los compuestos de interés, se desarrolló un método analítico de alta precisión para su detección y cuantificación, empleando un sistema de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (UHPLC/MS/MS). Este método se aplicó para evaluar el estado actual de contaminación en muestras representativas de agua residual y agua potable; característica fundamental en el contexto de la legislación ambiental vigente y la imperiosa necesidad de garantizar la seguridad del agua reutilizada para el consumo humano.

La información derivada de esta investigación permitirá comprender el impacto real de la descarga de estos fármacos en los ecosistemas acuáticos, sirviendo como base científica para la futura regulación. Los resultados obtenidos serán esenciales para establecer límites permisibles y rigurosos que guíen el desarrollo de procesos de remoción eficientes en las plantas de tratamiento y, fundamentalmente, aseguren que el agua reutilizada sea segura para el consumo humano, cumpliendo con la doble misión de proteger la salud pública y el medio ambiente. Por lo anterior, es que se plantean los siguientes objetivos:

2.1 Objetivos.

Objetivo general

- Establecer una técnica de manejo de muestras acuosas chilenas que permita identificar y cuantificar compuestos farmacológicos en aguas chilenas a través de extracción y



concentración en fase sólida y cuantificación en UHPLC/MS/MS.

Objetivos específicos

- Analizar el estado de arte de la presencia, consumo y frecuencia de detección a nivel local de compuestos farmacológicos en aguas.
- Implementar una metodología analítica para la detección de analitos farmacológicos en aguas chilenas mediante UHPLC/MS/MS.
- Monitorizar los compuestos elegidos en aguas problema considerando los límites de detección y cuantificación detectados en la metodología analítica desarrollada.
- Reportar los desafíos enfrentados en el desarrollo de la técnica analítica para detectar fármacos en aguas y, basado en los resultados obtenidos, proponer políticas que mejoren la regulación ambiental.

2.2 Pregunta de investigación e hipótesis.

La investigación se centrará en responder la siguiente pregunta: ¿es factible diseñar y validar una técnica analítica que permita la determinación y cuantificación simultánea de los diez fármacos más prevalentes en consumo o detección en matrices acuosas a nivel nacional?

Con ello, la hipótesis a responder corresponderá a: si se implementa una técnica analítica integrada basada en la tecnología de Ultra-Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas en tándem (UHPLC/MS/MS), que considere los efectos de interacción de los compuestos, será posible la cuantificación simultánea de los diez compuestos farmacéuticos más consumidos y/o detectados en matrices acuosas chilenas.

Dicho esto, previo a la propuesta de desarrollo experimental, llevó a cabo un estudio bibliográfico exhaustivo para identificar los diez medicamentos a evaluar; y con ello, ver el efecto puede ocasionar en el medio ambiente a través de su monitoreo en matrices acuosas.



Capítulo 3: Estado del Arte

3.1 Fármacos con mayor prevalencia en el Chile.

El consumo de productos farmacéuticos experimenta un aumento significativo e incesante, impulsado por factores clave como la mejora del nivel de vida, el incremento de la inversión en el sector salud, los avances en investigación y desarrollo, la amplia disponibilidad de mercado y el envejecimiento de población (Hawash *et al.*, 2023). Lo anterior, repercute directamente en la presencia generalizada de medicamentos y sus metabolitos en el medio ambiente, lo cual es un desafío globalmente reconocido y evaluado en diversas matrices ambientales que incluyen agua, sedimentos y biota.

Para comprender la magnitud y especificidad del desafío que representan estos contaminantes en el contexto local, se procedió a un análisis de la literatura científica pertinente a través de la revisión de un total de nueve artículos que abordan los patrones de consumo, la detección y la prevalencia de estos compuestos en aguas chilenas. La literatura evaluada aborda un total de 714 medicamentos detectados en diferentes matrices acuosas chilenas según el Gráfico 1.

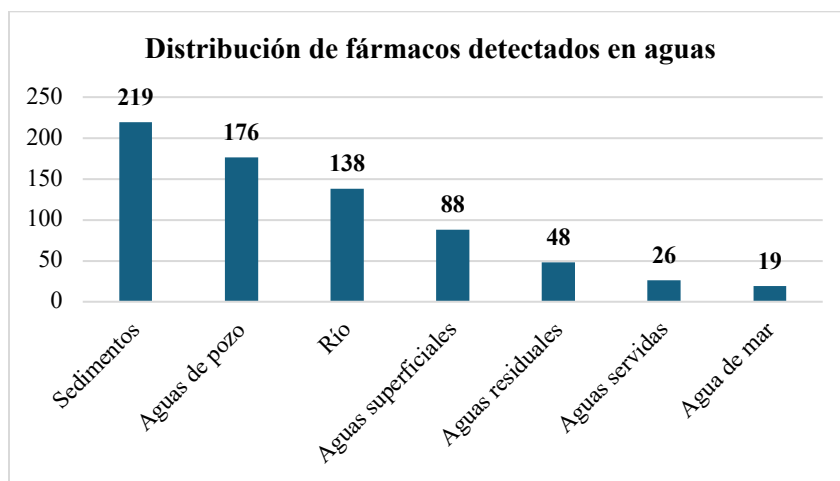


Gráfico 1: Fármacos reportados en matrices acuosas. Villa, 2012; Jachero *et al.*, 2013; Manzo *et al.*, 2014; Moncada, 2015; Becerra *et al.*, 2015; Wilkinson *et al.*, 2022; MacKeown *et al.*, 2024; Inostroza *et al.*, 2024; Soriano *et al.*, 2024.

El Gráfico 1 demuestra que la detección de fármacos en matrices acuosas se rige por su persistencia y dinámica ambiental. La alta frecuencia de detección en sedimentos y aguas de



pozo se debe a la lipofilidad de los compuestos que facilita su adsorción y acumulación en el material particulado y, a su lixiviación hacia los acuíferos subterráneos, respectivamente.

Aunque las aguas residuales y servidas son el punto de origen primario, registran las detecciones más bajas, exceptuando el agua de mar que representa la matriz más lejana y diluida del ciclo hídrico. Esto se explica por la descarga y dilución inmediata de los compuestos en matrices receptoras como ríos y aguas superficiales, así como por su rápida transformación o transferencia a los sedimentos. Por lo tanto, el bajo reporte en las aguas residuales no minimiza su importancia, sino que subraya su rol como gatillo que amplifica la contaminación en matrices ambientales más persistentes.

Complementando lo anterior se presentan los fármacos más detectados en aguas chilenas en cantidad en el Gráfico 2 y con mayor frecuencia de detección en el Gráfico 3.

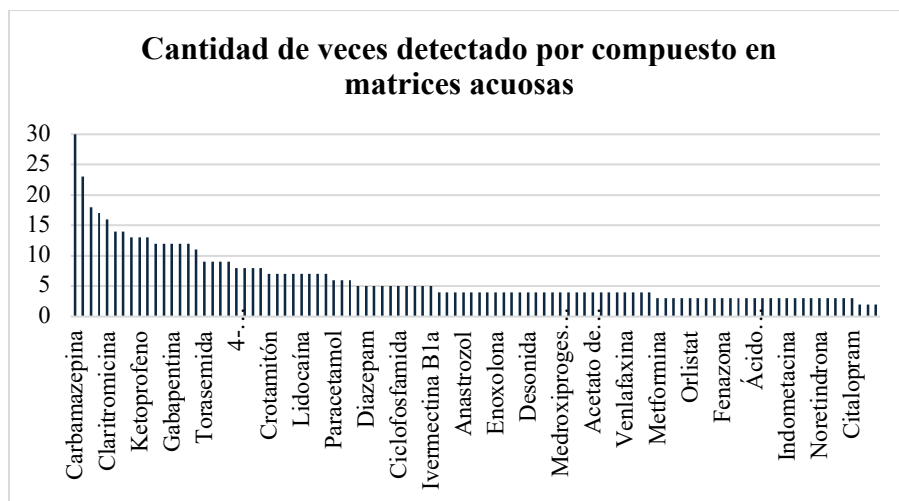


Gráfico 2: Cuenta de veces detectado por fármaco en aguas. Villa, 2012; Jachero et al., 2013; Manzo et al., 2014; Moncada, 2015; Becerra et al., 2015; Wilkinson et al., 2022; MacKeown et al., 2024; Inostroza et al., 2024; Soriano et al., 2024.

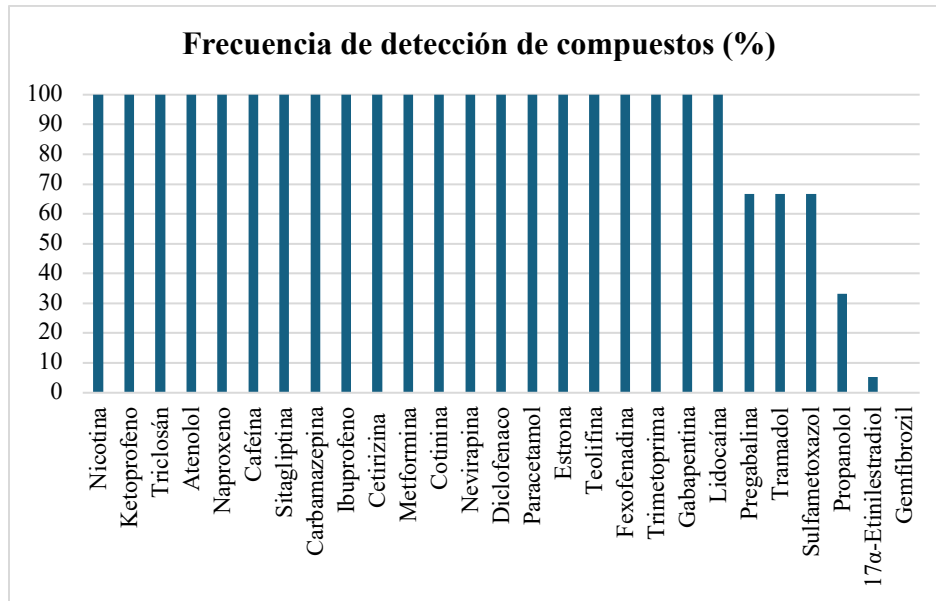


Gráfico 3: Frecuencia de detección de fármacos. Wilkinson et al., 2022; MacKeown et al., 2024.

Los dos gráficos ofrecen un análisis complementario respecto a la cantidad de veces que un fármaco es detectado y su persistencia con posterior detección en el medio. El gráfico 2 sitúa a la carbamazepina como el compuesto más reportado, una evidencia directa de su conocida resistencia a la biodegradación, lo que facilita su acumulación. Le siguen la claritromicina, un antibiótico cuya prevalencia y acumulación generan preocupación por su potencial impacto en la resistencia microbiana; y, el ketoprofeno que combina un elevado consumo como antiinflamatorio con una marcada persistencia en el medio.

Estas persistencias se ven plenamente confirmadas en el gráfico 3, el cual identifica un amplio grupo de contaminantes con una tasa de detección del 100%, donde se incluyen compuestos de consumo crónico masivo y persistente como ketoprofeno, carbamazepina, ibuprofeno, diclofenaco, metformina y paracetamol. Además, se suman sustancias como nicotina (y su metabolito cotinina), cafeína, reguladores cardiacos como atenolol y naproxeno, antidiabético sitagliptina, y antibacterianos como trimetoprima y nevirapina. Estos resultados son justificados por el aporte constante que tienen en el sistema hídrico debido a sus usos generalizados y sus capacidades para eludir o resistir eficientemente los procesos de degradación natural y el tratamiento en las plantas de depuración.

Ahora bien, la evaluación de los medicamentos en el agua requiere diferenciar entre la



frecuencia de detección y la concentración encontrada. La frecuencia de un compuesto determina qué tan extendida está la exposición en los ecosistemas; siendo crucial para dimensionar el problema de la persistencia y el potencial de exposición crónica en la biota y los humanos dada la ineficacia de los tratamientos utilizados en la depuración. Por su parte, la concentración medida en el agua es la métrica clave para definir el riesgo toxicológico real, ya que es la dosis la que define el impacto o los efectos toxicológicos que se producen; siendo un criterio crucial en la prioridad sanitaria y regulatoria que se debe tener en relación a este tipo de contaminantes.

Según lo expuesto, se presentan los promedios de las concentraciones encontradas en las distintas fuentes acuáticas de Chile por medio de los Gráficos 4,5 6 y 7.

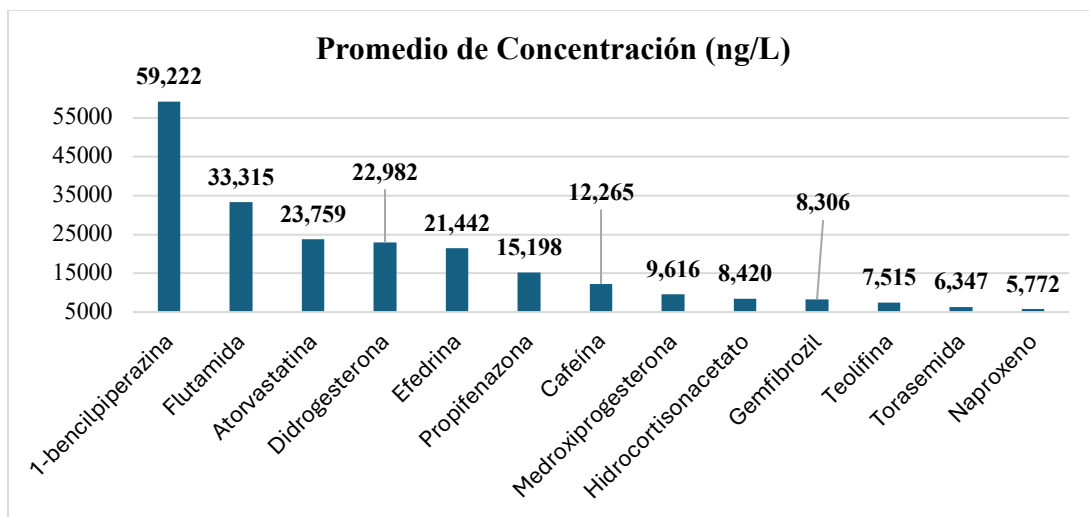


Gráfico 4: Promedio de concentración encontrada en rangos de 60.000-5.000 ng/L. Villa, 2012; Jachero et al., 2013; Manzo et al., 2014; Moncada, 2015; Becerra et al., 2015; Wilkinson et al., 2022; MacKeown et al., 2024; Inostroza et al., 2024; Soriano et al., 2024.

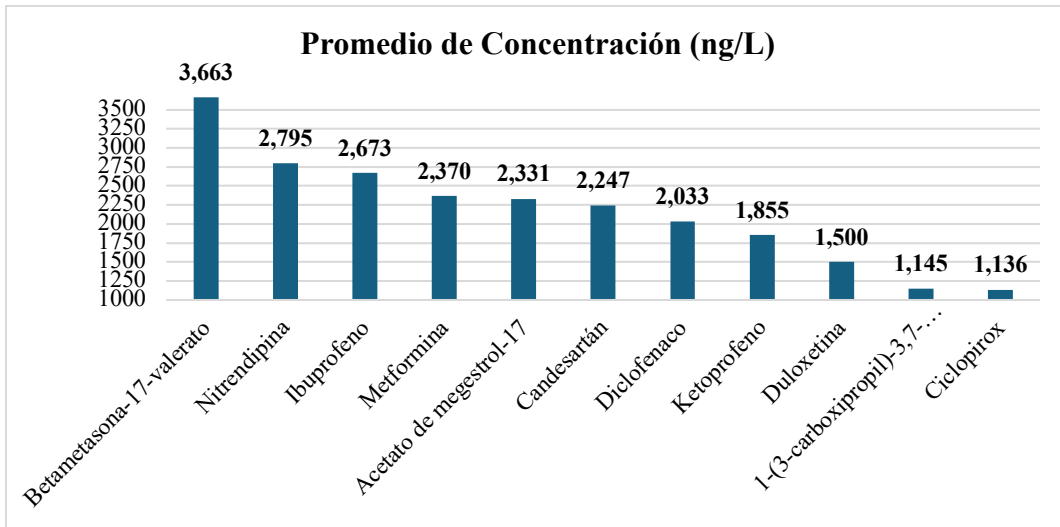


Gráfico 5: Promedio de concentración encontrada en rangos de 5.000-1.000 ng/L. Villa, 2012; Jachero et al., 2013; Manzo et al., 2014; Moncada, 2015; Becerra et al., 2015; Wilkinson et al., 2022; MacKeown et al., 2024; Inostroza et al., 2024; Soriano et al., 2024.

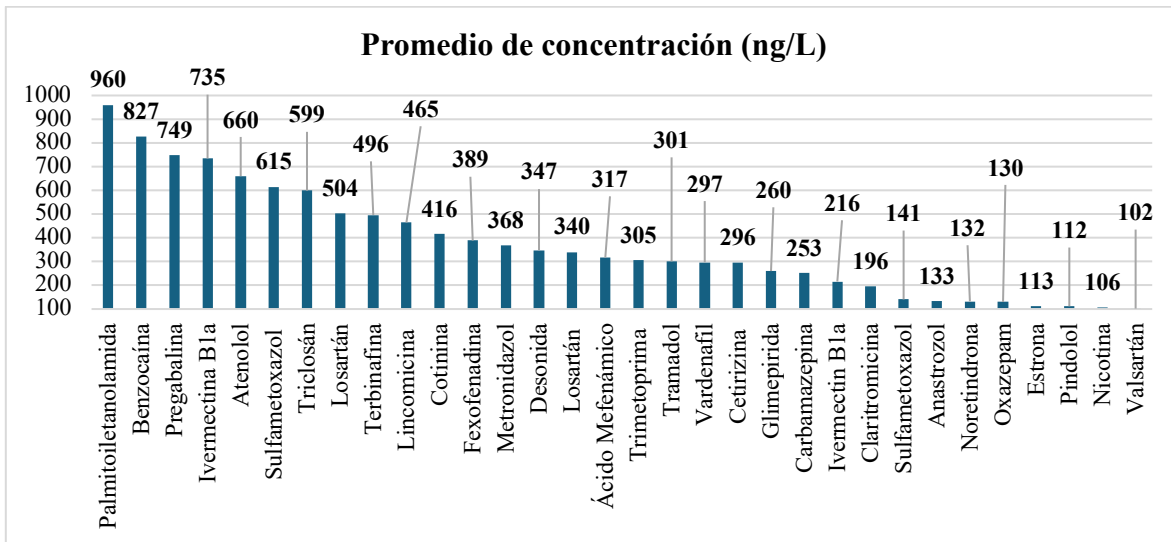


Gráfico 6: Promedio de concentración encontrada en rangos de 1.000-100 ng/L. Villa, 2012; Jachero et al., 2013; Manzo et al., 2014; Moncada, 2015; Becerra et al., 2015; Wilkinson et al., 2022; MacKeown et al., 2024; Inostroza et al., 2024; Soriano et al., 2024.

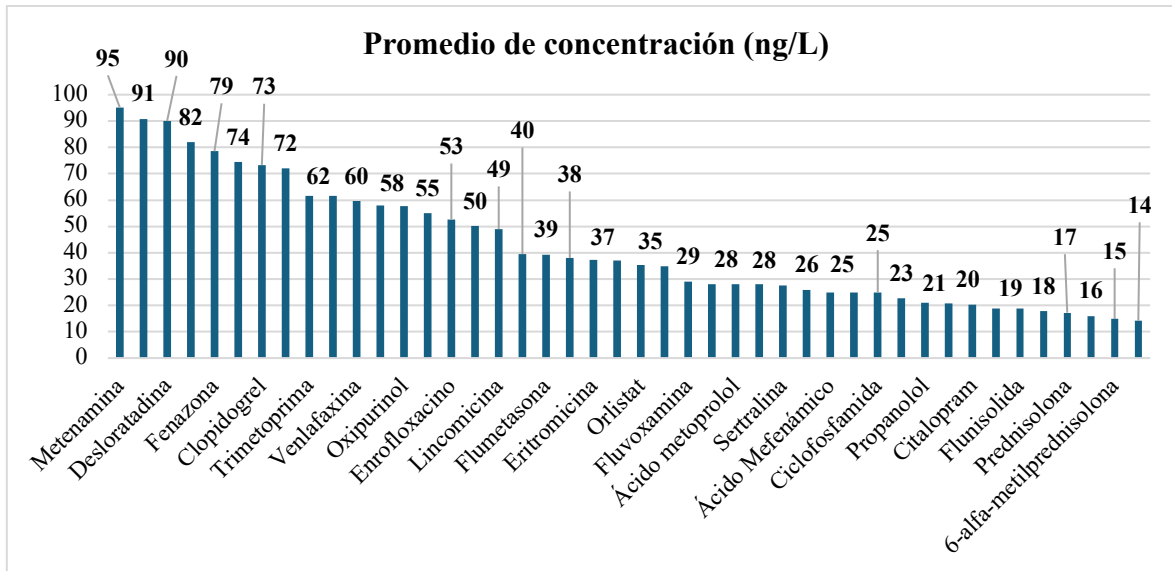


Gráfico 7: Promedio de concentración encontrada en rangos de 100-0 ng/L. Villa, 2012; Jachero et al., 2013; Manzo et al., 2014; Moncada, 2015; Becerra et al., 2015; Wilkinson et al., 2022; MacKeown et al., 2024; Inostroza et al., 2024; Soriano et al., 2024.

El análisis consolidado de todos los gráficos de promedio de concentración (ng/L) revela una carga de contaminantes estratificada y no uniforme en las matrices acuosas chilenas, con rangos que abarcan hasta cinco órdenes de magnitud. Los compuestos que lideran el riesgo toxicológico más crítico son psicoestimulantes (1-bencilpiperazina), antiandrógenos (flutamida) y estatinas (atorvastatina), cuyas concentraciones indican una resistencia extrema y un aporte masivo. A continuación, se encuentran los medicamentos de consumo poblacional masivo y generalizado que, debido a los altos volúmenes de excreción, dominan el siguiente rango de concentración. En este grupo se encuentran esteroides (betametasona-17-valerato), antiinflamatorios (ibuprofeno, ketoprofeno), antihipertensivos (nitrendipina) y anti-diabéticos (metformina). El resto de los compuestos se agrupan en rangos comunes de identificación de cientos y decenas de ng/L, como anestésicos (benzocaína), antiparasitarios (ivermectina), antibióticos (sulfametoxazol, enrofloxacina, eritromicina), betabloqueadores (atenolol), analgésicos (tramadol, paracetamol) y anti-convulsivos (carbamazepina). Adicionalmente se detectan otros de uso común como diuréticos (hidroclorotiazida) e inhibidores receptivos (citalopram, fluoxetina).

Es importante conocer cuáles de estos medicamentos son detectados específicamente en las



aguas residuales de Chile, especialmente cuando esta matriz se considera una fuente potencial para la reutilización en agua potable. Al representar la mayor carga inicial de estos contaminantes, el conocimiento preciso de su composición química es vital para diseñar e implementar tecnologías de tratamiento avanzado que garanticen la seguridad y eviten la exposición crónica de la población. Se visualiza la data encontrada en el agua residuales en el Gráfico 8.

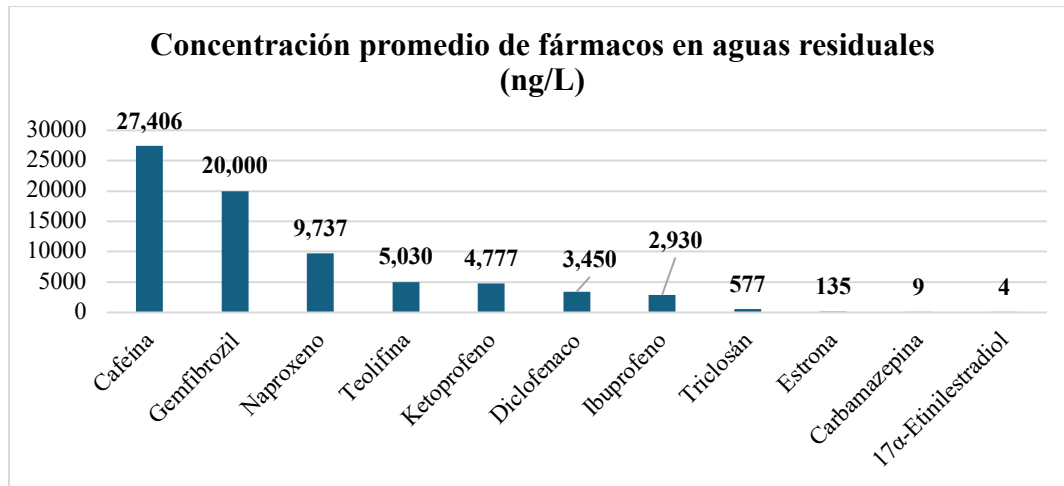


Gráfico 8: Promedio de concentración encontrada en aguas residuales. MacKeown *et al.*, 2024.

El gráfico confirma que las aguas residuales son un concentrador primario de contaminantes con procesos de depuración ineficientes que no permiten generar una matriz apta para el consumo humano (Reichert *et al.*, 2019), dominado por estimulantes como cafeína, reguladores como gemfibrozil y antiinflamatorios varios. El consumo de estos va ligado a la disponibilidad de medicamentos en el país, la cultura de automedicación o cuidado de la sociedad, enfermedades predominantes o tratamientos más propensos en la misma y el estilo de vida que tienen las personas que componen la nación.

Una encuesta nacional de salud de 2017 reveló que el 58% de los chilenos consume al menos un medicamento al día, significando un fuerte repunte en comparación con la medición de 2010, cuando la cifra llegaba 53% (Leiva & Sandoval., 2018). Adicionalmente, según un informe realizado en el año 2021, los fármacos más vendidos en unidades son: paracetamol (6.359.427), losartán (4.733.831), ibuprofeno (4.709.576), ketorolaco (4.313.806), anti-jaqueca compuesto por cafeína, ergotamina y metamizol sódico (4.003.226), zopiclona (2.890.661), ácido mefenámico (2.847.599), naproxeno (2.710.259), ketoprofeno



(2.710.139) y clorfenamina (2.489.255) (Instituto de Salud Pública, 2021).

El perfil de consumo de los compuestos farmacéuticos en Chile muestra una alta dependencia financiera, ya que hasta 2013, el 55% del gasto de bolsillo total en salud de las familias se destinaba a la adquisición de estos (CENAFAR, 2013). Las clases terapéuticas más consumidas en el país son: cardiovascular, tracto alimentario y metabolismo, sistema nervioso y, sangre y órganos hematopoyéticos (Ministerio de Asuntos Exteriores, 2024).

A partir de la información recopilada, se escogen diez compuestos a partir de su frecuencia de uso y cuantificación en aguas; privilegiando las principales familias de medicamentos estudiadas y encontradas. Estos corresponden a: metformina, atenolol, paracetamol, cafeína, carbamazepina, claritromicina, ketoprofeno, diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno.

El conocimiento de la solubilidad, estabilidad, polaridad y persistencia ambiental de los fármacos elegidos es crucial para anticipar sus comportamientos en el medio acuático, predecir sus remociones en las plantas de tratamiento y evaluar sus potenciales impactos. Además, el conocimiento de estas características es primordial en la selección de la técnica analítica más adecuada para la detección en mezclas complejas, permitiendo una correcta interpretación de las concentraciones obtenidas con miras al desarrollo de estrategias de mitigación y regulación ambiental.

3.2 Características de compuestos farmacológicos a evaluar.

Se reportan las características principales de cada compuesto elegido en la Tabla 1 y 2 (Sigma Aldrich, 2025; PubChem, 2025; Cole-Parmer, 2025).



Tabla 1: Características de fármacos.

Clase	Log P	Solubilidad en agua	PKa
Metformina (antidiabético) C ₄ H ₁₁ N ₅ y 129,15 g/mol	-1,3 (muy bajo)	Muy alta / soluble en agua, etanol y metanol. Hidrofilico.	12,4
Atenolol (betabloqueante) C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃ y 266,34 g/mol	0,57 (bajo)	Alta / soluble en agua, metanol, ácido acético y etanol. Hidrofilico.	9,6
Paracetamol (Analgésico/Anilida) C ₈ H ₉ NO ₂ y 151,16 g/mol	0,5 (bajo)	Media-Alta / soluble en alcohol, agua e hidróxido de sodio, con polaridad moderada.	9,5
Cafeína (estimulante) C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂ y 194,19 g/mol	-0,07 (muy bajo)	Alta / soluble en agua, etanol y metanol.	0,6-1,4
Carbamazepina (anticonvulsivante) C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O y 236,27 g/mol	2,5 (moderado)	Baja / soluble en alcohol, etanol y acetona.	>12
Claritromicina (antibiótico) C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃ y 747,95 g/mol	3,2 (alto)	Baja / soluble en acetona, metanol y etanol Hidrofóbico.	8,99
Ketoprofeno (antiinflamatorio) C ₁₆ H ₁₄ O ₃ y 254,3 g/mol	3,2 (alto)	Baja / soluble en cloroformo y metanol. Hidrofóbico.	3,98
Diclofenaco (antiinflamatorio) C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NN _a O ₂ y 296,15 g/mol	4,1 (muy alto)	Baja / soluble en metanol y etanol. Hidrofóbico.	4,15
Naproxeno (antiinflamatorio) C ₁₄ H ₁₃ O ₃ y 230,3 g/mol	3,3 (alto)	Bajo / soluble en etanol y metanol.	4,15
Ibuprofeno (antiinflamatorio) C ₁₃ H ₁₈ O ₂ y 206,28 g/mol	3,6 (alto)	Bajo / soluble en alcohol y etanol. Hidrofóbico.	4,91



Tabla 2: Continuación de características de fármacos.

Clase	Comportamiento ambiental	Excreción en medio
Metformina (antidiabético) $C_4H_{11}N_5$ y 129,15 g/mol	Alta Movilidad/ permanece en la fase acuosa con baja remoción por adsorción y tratamientos convencionales.	90% del fármaco sin cambios.
Atenolol (betabloqueante) $C_{14}H_{22}N_2O_3$ y 266,34 g/mol	Alta Movilidad/ baja remoción por adsorción y persistencia en el efluente.	Entre un 50% y 85% y 40% por orina del fármaco sin cambios.
Paracetamol (analgésico) $C_8H_9NO_2$ y 151,16 g/mol	Baja tendencia a la adsorción en agua; aunque es más susceptible a la degradación que el grupo hidrofóbico. Alta estabilidad ambiental.	5% del fármaco sin cambios.
Cafeína (estimulante) $C_8H_{10}N_4O_2$ y 194,19 g/mol	Uso Masivo: alta solubilidad y movilidad; su presencia es constante debido al consumo.	86% del fármaco sin cambios.
Carbamazepina (anticonvulsivante) $C_{15}H_{12}N_2O$ y 236,27 g/mol	Persistencia extrema: resistencia notoria a la biodegradación y fotodegradación. Adsorción parcial a sedimentos.	Entre 1% a 3% del fármaco sin cambios.
Claritromicina (antibiótico) $C_{38}H_{69}NO_{13}$ y 747,95 g/mol	Acumulación en sólidos: fuerte tendencia a adsorberse en la materia orgánica, lodos y sedimentos.	Entre 20% a 40% del fármaco sin cambios.
Ketoprofeno (antiinflamatorio) $C_{16}H_{14}O_3$ y 254,3 g/mol	Adsorción moderada: Compuesto lipofílico que se ioniza en aguas residuales (aumentando su solubilidad). Persiste y se adsorbe en la forma no ionizada.	Entre 50% a 90% del fármaco sin cambios.
Diclofenaco (antiinflamatorio) $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ y 296,15 g/mol	Máxima adsorción: lipofílico con fuerte tendencia a adsorberse a sedimentos y lodos. Alta resistencia a la degradación en ambientes acuosos turbios.	65% del fármaco sin cambios.
Naproxeno (antiinflamatorio) $C_{14}H_{13}O_3$ y 230,3 g/mol	Adsorción moderada: lipofílico con potencial de adsorción en el material sólido.	95% del fármaco sin cambios.
Ibuprofeno (antiinflamatorio) $C_{13}H_{18}O_2$ y 206,28 g/mol	Biodegradación inicial: Lipofílico con mayor remoción por biodegradación que otros, pero el remanente es altamente hidrofóbico y puede adsorberse.	Entre 45% a 80% del fármaco sin cambios.



Los medicamentos se agrupan en dos categorías principales según su relación polaridad/solubilidad y su comportamiento en el ambiente. Aquellos compuestos hidrofílicos y polares con $\text{Log } P < 1$ son persistentes en la fase acuosa; siendo difíciles de retener en las columnas cromatográficas y los sorbentes de extracción en fase sólida (SPE). En contraste, se tienen los fármacos hidrofóbicos y resistentes con $\text{Log } P \geq 2$, que muestran una tendencia a la adsorción en sedimentos y una alta resistencia a la degradación, lo que explica su alta documentación como contaminantes.

1. Compuestos hidrofílicos y polares (baja retención analítica).

- Metformina: representa el principal desafío analítico, puesto que su polaridad extrema hace que eluda rápidamente de los sorbentes C18 y HLB. Su alta excreción sin cambios (90%) y persistencia en el medio aseguran una carga constante en las aguas residuales.
- Atenolol: tiene una baja remoción y alta persistencia en el efluente. Al ser una base, su extracción mediante SPE se optimiza utilizando sorbentes de intercambio iónico catiónico o controlando el pH de la muestra para favorecer la forma neutra.
- Paracetamol: hidrofílico con una alta susceptibilidad a la degradación por biodegradación una vez liberado al ambiente. Analíticamente, es relativamente fácil de extraer con sorbentes HLB. Sin embargo, debido a su rápida degradación, la cuantificación precisa exige métodos con límites de detección muy bajos en muestras de agua superficial o efluentes tratados, donde las concentraciones suelen ser mínimas.
- Cafeína: a pesar de su polaridad, su uso masivo y su alta excreción sin cambios (88%) resultan en concentraciones que facilitan su detección con límites estándar.

2. Compuestos lipofílicos y moderados (buena retención analítica).

- Claritromicina: posee una fuerte tendencia a la acumulación y adsorción en sólidos como materia orgánica, lodos y sedimentos; por ende, para una cuantificación total se debe tener una extracción de la muestra que incluya una fase sólida.
- Carbamazepina: su Log de P favorece una extracción eficiente con C18 o HLB; no obstante, su estabilidad en la muestra y en el ambiente se traduce en concentraciones detectables y estables, facilitando su cuantificación.

3. Compuestos ionizables (ácidos) y lipofílicos (antiinflamatorios no esteroideos).

- Ketoprofeno: la muestra de agua debe ser acidificada antes de la SPE para asegurar que



la molécula se encuentre en su forma neutra y pueda ser retenida.

- Naproxeno: su elevada carga en el medio de 95% sin cambios facilita la detección. Sin embargo, requiere una acidificación de la muestra antes de la SPE para garantizar la retención por C18 y HLB.
- Ibuprofeno: presenta una significativa biodegradación inicial en las plantas de tratamiento; requiriendo una acidificación de la muestra. Su biodegradación implica que sus concentraciones en el efluente son generalmente menores que las de otros antiinflamatorios más persistentes, exigiendo mayor sensibilidad en la cuantificación.
- Diclofenaco: muestra la máxima adsorción a sedimentos y lodos. Esta alta lipofilia y su ionización a pH ambiental imponen un doble desafío: requiere la acidificación más estricta para la SPE y se debe considerar la extracción de la fracción adsorbida para reportar la concentración total en el medio; siendo altamente resistente a la degradación.

Pero ¿Qué efectos toxicológicos y riesgo real implica el contacto de estos medicamentos con el medio?

3.3 Ecotoxicidad de medicamentos seleccionados.

La interacción ambiental sostenida de los compuestos seleccionados provoca cuatro efectos principales: la manifestación de efectos tóxicos y carcinogénicos directos, la restricción en el aprovechamiento de recursos hídricos con fines recreativos, atribuible a los elevados niveles de trazas contaminantes; la merma en su aplicabilidad para los sectores industrial y agropecuario debido a la inducción de efectos adversos en la flora y fauna y, la afectación adversa a la cadena trófica marina, comprometiendo la producción y seguridad alimentaria (Maasz *et al.*, 2019). A continuación, se presentan en detalle los principales hallazgos toxicológicos encontrados en la Tabla 3 y 4.



Tabla 3: Efectos toxicológicos de fármacos seleccionados.

Nombre	Efecto	Referencia
Metformina	Inhibición del crecimiento en Microalga <i>P. subcapitata</i> y <i>V. fischeri</i> y baja de bioluminiscencia en bacterias. Provoca diarrea, náusea, malestar estomacal en humanos, entre varios.	(Cima, 2017; Jacob <i>et al.</i> , 2021)
Claritromicina	Inducir resistencia a los antibióticos, alteración de microbios, incremento en tasa de mortalidad de algas, bacterias y nematodos. Puede ocasionar diarrea, náuseas, acidez, dolor de cabeza, dolor de pecho, urticaria, entre varios.	(Yang <i>et al.</i> , 2008; Alvo <i>et al.</i> , 2016; Rout <i>et al.</i> , 2021; Cima, 2021)
Atenolol	Afecta la reproducción y crecimiento de peces, daña las branquias, inhibe o altera la reproducción las truchas. Genera depresión miocárdica, bradicardia, impotencia, cansancio, vértigo, diarrea, náusea, debilidad e hipotensión. Reduce el efecto antihipertensivo.	(Rodríguez, 2015; Rout <i>et al.</i> , 2021)
Cafeína	Favorece el desarrollo de trastornos de dependencia, necesidad del consumo de la sustancia y pérdida de capacidad para controlar el cuerpo. Aumenta la liberación de ácido en el estómago, la presión arterial e interfiere en la absorción de calcio en el cuerpo. En exceso puede generar crisis asmáticas, alteraciones cardiovasculares, convulsiones, úlceras, entre otros.	(Pardo <i>et al.</i> , 2007; Carnevali de Falke & Degrossi, 2017; Cima, 2020; OPS, 2023)
Naproxeno	Reducción en la reproducción y longitud corporal crustáceo <i>Daphnia magna</i> y Microcrustáceo <i>Moina macrocopa</i> . Paro cardíaco en humanos. Puede perjudicar la fertilidad o dañar al feto; junto con, ser nocivo en caso de ingestión.	(Cooperativa, 2017; Kwak <i>et al.</i> , 2018; Sigma-Aldrich, 2022)
Ketoprofeno	Puede generar edemas periféricos, dolor de cabeza, somnolencia, sensibilización de la piel, fotosensibilización en la piel, aumento enzimas hepáticas, vómitos, diarrea, úlceras, disfunción plaquetaria, asma, hemorragias, sudoración y urticaria.	(Carbone <i>et al.</i> , 2013)
Ibuprofeno	Alteraciones en sistema reproductivo femenino y masculino. Reducir el flujo de sangre en los riñones, úlceras, hemorragias e hipertensión arterial. Paro cardíaco en humanos. Úlceras, daño en branquias, gastrointestinales, enfermedades renales, y alteraciones en el crecimiento de la trucha arcoíris.	(Marco <i>et al.</i> , 2010; Sifakis <i>et al.</i> , 2017; Cooperativa, 2017; Khalil <i>et al.</i> , 2020; Rout <i>et al.</i> , 2021)
Paracetamol	Daño hepático y renal. Alteración de genes y producción de hormonas. Provoca náuseas, vómitos, dolor epigástrico, somnolencia, ictericia, anemia hemolítica, neumonitis, erupciones cutáneas, daño renal y daño hepático, y metahemoglobinemia.	(Gómez <i>et al.</i> , 2021)
Carbamazepina	Alteraciones al sistema reproductivo femenino y el sistema nervioso central. Contribuye a la pérdida de coordinación muscular y produce mareos, somnolencia, cambios de comportamiento, picor, entre otros.	(Jelic <i>et al.</i> , 2012; Rout <i>et al.</i> , 2021; Cima, 2021)



Tabla 4: Continuación de efectos toxicológicos de fármacos seleccionados.

Nombre	Efecto	Referencia
Diclofenaco	Úlceras gastrointestinales, insuficiencia renal, daño en branquias y alteraciones en el crecimiento de la trucha arcoíris. Disminución de población de buitres por acumulación del fármaco, provocando insuficiencia renal (5-86%). Citotoxicidad para el hígado, el riñón, las células branquiales. Paros cardíacos y daños hepáticos en humanos.	(Oaks <i>et al.</i> , 2004; Haap <i>et al.</i> , 2008; Marco <i>et al.</i> , 2010; Roscher <i>et al.</i> , 2016; Cooperativa, 2017; Rout <i>et al.</i> , 2021)
Carbamazepina y diclofenaco	Degeneración de las células epiteliales tubulares, estrés oxidativo, necrosis y nefritis intersticial en Trucha arcoíris.	(Schwaiger <i>et al.</i> , 2004; Triebkorn <i>et al.</i> , 2007; Li <i>et al.</i> , 2010)
Paracetamol y diclofenaco	Baja el sistema defensivo y disminuye los contenidos de clorofila de los macrófitos en plantas <i>Lemna minor</i> y <i>Lemna gibba</i>	(Alkimin <i>et al.</i> , 2019)

La información detallada en la Tabla 3 y 4 subraya que la exposición biológica continua de plantas, animales y humanos a estos compuestos farmacéuticos induce una variedad de efectos adversos. Estos incluyen: resistencia a antibióticos, alteraciones en el crecimiento, desarrollo, reproducción y comportamiento, variaciones en la expresión génica, la actividad enzimática y proteica; y, la manifestación de malformaciones, trastornos metabólicos, neurológicos, daños inmunológicos y disrupción de los sistemas endocrino-reproductivos (Barrios *et al.*, 2018; Patel *et al.*, 2019; Wilkinson *et al.*, 2022). Dada la severidad de esta evidencia, la contaminación del agua por este tipo de productos se transforma en un desafío global que demanda una gestión multisectorial para reducir, prevenir y gestionar la entrada de estos medicamentos al medio ambiente.

A pesar de que se existen una serie de tecnologías para el abatimiento de contaminantes convencionales como metales pesados, orgánicos, microorganismos, entre otros; éstas no han sido capaces de remover en su totalidad a los CE dados por concentraciones micro en vez de macro. Bajo esta premisa, el desarrollo de normas y directrices que regulen la presencia y remoción de CE es limitado por la falta de evidencias relacionas con la exposición prolongada de ellos en el medio (Patel *et al.*, 2019). Para entender cómo se enfrenta esta situación en la actualidad, es que a continuación se detallará la normativa vigente y las estrategias de control de medicamentos en fuentes de agua tanto en Chile como en el mundo.



3.4 Normativa vigente para control de medicamentos en matrices acuosas.

- **Iniciativas y marcos globales/internacionales.**

Se impulsó la creación del Panel Científico-Político Intergubernamental (SPP) en 2022 para fortalecer la protección ecosistémica mediante evaluaciones científicas (Schäffer *et al.*, 2023). Entre los países que han implementado estrategias de control y mitigación de estos contaminantes se tiene (Branchet *et al.*, 2021; Hawash *et al.*, 2023):

1. **Unión Europea:** lidera la regulación de medicamentos incluyendo una Lista de Vigilancia con ocho compuestos prioritarios (tres hormonas y cinco antibióticos, incluida la claritromicina). Además, cuentan con una Estrategia Marina (MSFD) que exige el monitoreo continuo de sustancias peligrosas para impulsar el desarrollo de fármacos más ecológicos, mejorar la gestión de residuos y aplicar tecnologías avanzadas de tratamiento.
2. **EE. UU. y China:** establecieron directrices nacionales para la detección y monitoreo de hormonas y antibióticos; junto con listas prioritarias de control en sistemas de agua.
3. **Reino Unido:** implementaron el Programa de Investigación Química (CIP) para estudiar contaminantes emergentes y reducir el uso de antibióticos en ganadería.
4. **Suiza y Alemania:** incluyeron políticas de reducción de consumos de medicamentos e invirtieron en tratamientos avanzados en las plantas depuradoras, teniendo por objetivo reducir la concentración del contaminante en la matriz.
5. **Malasia, Suecia, Países Bajos, Corea del Sur y Australia:** establecieron límites de concentración y medidas de control para la liberación de ingredientes farmacéuticos en instalaciones industriales y de agua potable.

- **Normativa vigente en Chile.**

En Chile se ha impulsado el cuidado del recurso hídrico por medio de la norma NCh 1.333 que establece criterios de calidad fisicoquímica y biológica del agua según su uso (Ministerio de Agricultura, 2023); y, la ISO 46.001 que rige la gestión eficiente y sostenible del agua (ESGinnova, 2019).



A pesar lo anterior, en contrataste con los estándares internacionales, aún no existe una normativa o programa de control específico para la contaminación por medicinas en matrices acuosas (Goldstein, 2021). Dicha ausencia subraya la urgencia de establecer procesos rigurosos que permitan identificar y cuantificar los fármacos presentes en el recurso hídrico con el fin de contribuir en el desarrollo de una normativa basada en evidencia científica con conocimiento de las concentraciones y tipos de medicamentos circulantes en el medio. Así, se podrá reducir la disparidad con las prácticas globales y, simultáneamente, salvaguardar la salud pública y el ecosistema.

3.5 Metodología analítica para el análisis de los contaminantes elegidos.

La determinación de medicamentos en aguas bajo técnicas analíticas es dificultosa por las bajas concentraciones que se presentan de los analitos en el medio, requiriendo equipos de alta sensibilidad y eficiencia. Por lo tanto, es crucial innovar en el desarrollo de estrategias, materiales y procedimientos que satisfagan las exigencias de selectividad, sensibilidad, repetitividad, rapidez en la entrega de resultados y viabilidad económica (Raza, *et al.*, 2017).

Inicialmente se lleva a cabo la aislación del analito de interés donde se elimina la materia sólida que pueda tener la muestra y se aumenta la concentración del compuesto de interés hasta lograr su visibilidad bajo dos etapas fundamentales: el tratamiento de la muestra y el análisis de esta con la identificación y cuantificación de contaminantes (Robles *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2019); no obstante, no existe un único método de análisis debido a la diversidad de fármacos existentes y las características inherentes de la matriz acuática; teniendo que desarrollarlos y validarlos según criterios definidos por el experimentador como eficiencia de extracción, repetitividad y límites de detección y cuantificación (Ruiz *et al.*, 2014).

El desarrollo de una técnica conlleva sus dificultades dadas por las concentraciones traza (ng/L o mg/L) y la complejidad y variabilidad de la matriz acuática; la cual puede interferir en la detección de los fármacos, suprimiendo la señal de los analitos o generando resultados falsos; por ende, necesita de procesos de preparación de muestra robustos y selectivos (Białk *et al.*, 2016; Barbosa *et al.*, 2023). Contaminantes como los medicamentos abarcan una amplia gama de propiedades fisicoquímicas: varían en polaridad, volatilidad, estabilidad térmica, tamaño molecular y grupos funcionales; por ende, generar un método para una



mezcla multicomponente puede ser un desafío considerable ya que las condiciones óptimas para un compuesto pueden inadecuadas para otro (Barbosa *et al.*, 2023).

A partir de las consideraciones expuestas, a continuación se detallan las diferentes etapas desarrolladas en una metodología de análisis para la detección y cuantificación de compuestos farmacéuticos en una matriz compleja.

3.5.1 Tratamiento de muestras.

La preparación de la muestra es un paso fundamental que precede al análisis instrumental. Sus etapas generales se describen en la Figura 2.

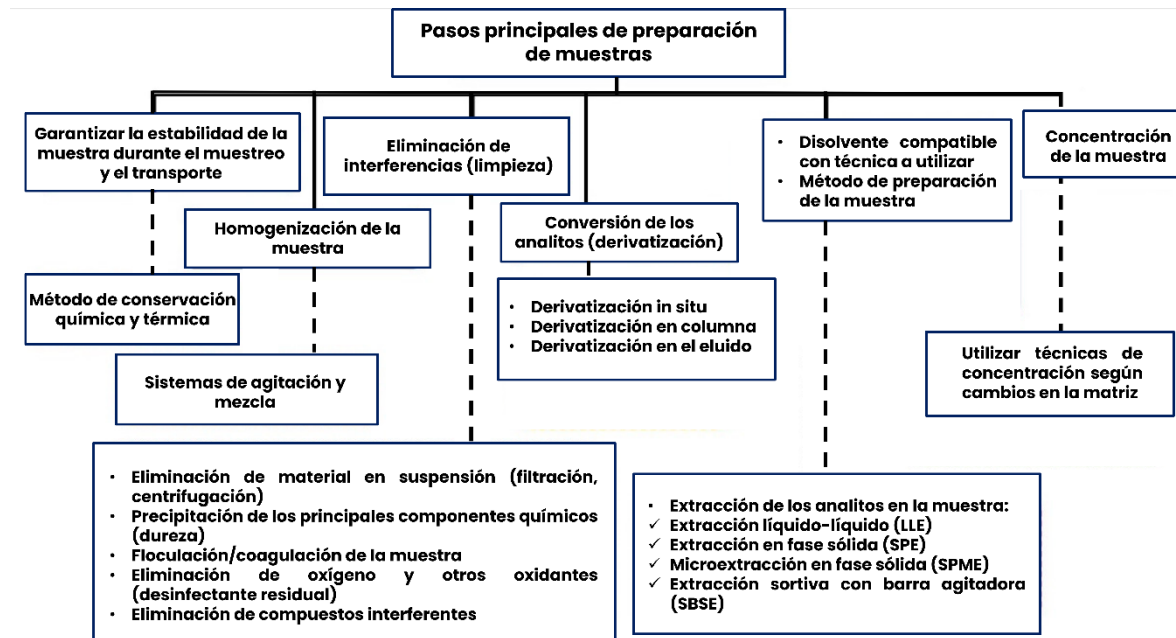


Figura 2: Etapas de preparación de muestras. Almeida, 2021.

El proceso comienza con la toma de la muestra, la cual implica seleccionar una porción representativa y homogénea del lote global, integrando varios puntos de recogida simultánea (para fuentes de agua extensas). Para asegurar la integridad del analito antes del análisis es crucial conservar las propiedades fisicoquímicas de la muestra para evitar la transformación o pérdida del analito por dilución, adsorción o reacción (Robles *et al.*, 2010).

Los aspectos fundamentales en la preservación de la muestra incluyen (Coquery *et al.*, 2005; Madrid & Pedrero, 2007; Harris, 2016):



- **Volumen:** debe ser lo suficientemente grande para permitir una medición precisa.
- **Limpieza:** se recomienda el uso de superficies limpias para minimizar partículas que puedan interferir con el analito.
- **Almacenamiento:** es fundamental que el recipiente y su cierre no alteren la composición. Las muestras se suelen almacenar en botellas de vidrio o viales ámbar a 4 °C hasta su análisis. A menudo se congelan durante el transporte y se envuelven en papel de aluminio (Batley, 1999; Pazdro *et al.*, 2016; MacKeown *et al.*, 2024).
- **Conservantes químicos:** se pueden añadir sustancias químicas para inhibir la descomposición, extraer el analito de matrices complejas, diluir la muestra o ajustar el pH con el propósito de aumentar la afinidad por un sorbente o mejorar la extracción (Batley, 1999; Śliwka *et al.*, 2003; Robles *et al.*, 2010; Harris, 2016).

Tras la conservación, se lleva a cabo la extracción y preconcentración del analito. A menudo se requiere aumentar la concentración del analito para facilitar su identificación en tecnologías analíticas de alta precisión.

La extracción consiste en la transferencia del analito a una matriz o condición compatible con el instrumento analítico; donde para muestras líquidas se emplean diversos procedimientos basados en la solubilización del analito mediante un disolvente, logrando la limpieza y preconcentración. Entre las técnicas más reportadas en la extracción de analitos y purificación de las matrices líquidas para los fármacos se incluye la extracción en fase sólida (SPE) (Zygler *et al.*, 2010; Płotka *et al.*, 2016; Harris, 2016; Archana *et al.*, 2017; Pérez *et al.*, 2017; Kovačević *et al.*, 2017; Qin *et al.*, 2023; MacKeown *et al.*, 2024).

- **Extracción en fase sólida (SPE).**

Es una técnica que permite la extracción de analitos polares o semipolares de una muestra líquida. Su objetivo es limpiar, concentrar y acondicionar la muestra mediante un cambio de disolvente antes del análisis cromatográfico, logrando el aislamiento del compuesto de interés a través de la retención o separación del analito en una fase estacionaria sólida; donde el material de relleno, usualmente contenido en un cartucho con formato de jeringa, actúa



como adsorbente (Robles *et al.*, 2010; Merck, 2023; MacKeown *et al.*, 2024).

Se destaca por su simple operación, gran rapidez, alta flexibilidad, alta selectividad y bajo consumo de reactivos (Sadutto & Picó, 2020); ofreciendo múltiples ventajas en el análisis químico (Arsenault, 2012):

1. **Simplificación y purificación:** simplifica la matriz compleja y purifica el compuesto de interés. Esto elimina interferencias de la muestra, traduciendo en una mejora en la exactitud de su posterior cuantificación.
2. **Mitigación de la supresión de iones:** reduce la supresión de iones generada por la interferencia de la matriz acuosa en la espectrometría de masas, minimizando la consecuente disminución de la señal.
3. **Fraccionamiento de muestras:** provee la capacidad de fraccionar los componentes de la muestra permitiendo su análisis en función de propiedades como la polaridad o afinidad.
4. **Enriquecimiento de trazas:** permite aumentar la concentración del compuesto cuando se encuentra en trazas.

Generalmente, el método SPE se compone de cuatro etapas que se ilustran en la Figura 3.

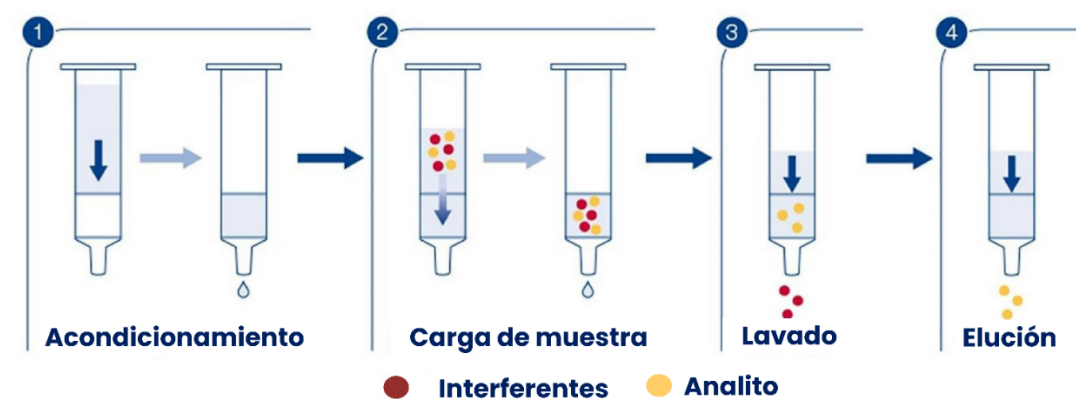


Figura 3: Etapas de extracción en fase sólida. Qin *et al.*, 2023.

El proceso se basa en la interacción selectiva del analito con un adsorbente sólido (sorbente), teniendo las siguientes etapas:



1. **Acondicionamiento:** usualmente se utiliza un solvente como metano seguido de agua ultrapura para activar el sorbente y asegurar que permanezca húmedo, eliminando el aire de la columna.
2. **Equilibrio:** se trata el sorbente con una solución que imita las condiciones de la matriz de la muestra (ajuste de pH, polaridad). Esto prepara el cartucho para una retención óptima del analito de la muestra acuosa.
3. **Carga y lavado:** se pasa la muestra a través del cartucho para retener selectivamente el analito en el sorbente. Posteriormente se lava con un solvente suave para eliminar las interferencias no deseadas de la matriz.
4. **Elución:** se utiliza un volumen de solvente orgánico fuerte como metanol para liberar el analito retenido, donde normalmente la capacidad de retención total de un cartucho o columna es aproximadamente el 5% del peso del adsorbente (Patel *et al.*, 2019; Scpscience, 2023). Aquí se logra la preconcentración al transferir el analito a un volumen final reducido.

Adicionalmente el eluato se somete a secado (evaporación) y reconstitución en un volumen muy pequeño (típicamente 0,5 mL o 1 mL) de un solvente compatible con el instrumento de análisis como la fase móvil de HPLC, usando comúnmente un flujo de nitrógeno o secado al vacío (Arsenault, 2012; Soriano et al., 2024; Inostroza *et al.*, 2024). El extracto reconstituido generalmente se filtra (por ejemplo, a través de filtros de PTFE de 0,2 μm o 45 μm) para eliminar partículas y mejorar la limpieza de la muestra (Herrera *et al.*, 2024).

La selección del adsorbente es fundamental y depende de las propiedades del analito, siendo los cartuchos HLB ampliamente utilizados en mezclas multicomponentes por su equilibrio de hidrófilo y propiedades lipofílicas para analitos ácidos, neutros y básicos en un amplio rango de pH entre 1-14 (Buszewski & Szultka, 2012; Patel *et al.*, 2019). El componente Divinilbenceno es hidrofóbico y proporciona un mecanismo de Fase Reversa (RP), similar al C18; garantizando la retención efectiva de medicamentos lipofílicos o no polares como los antiinflamatorios. Además, su composición con N-Vinilpirrolidona proporciona un carácter polar que permite la retención de fármacos como antibióticos o β -bloqueantes que se perderían fácilmente en un C18 simple.



Se ilustra cómo el cartucho HLB maneja los componentes de la investigación en la Tabla 5 (Afonso, 2013; Cañas *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2021; Munzhelele *et al.*, 2025):

Tabla 5: Interacción con HLB de fármacos seleccionados.

Fármaco	Ionizable	Interacción Principal con HLB	Retención / Condición Óptima
Metformina	Sí (Básico)	Polar/Hidrofílica débil. Muy baja retención hidrofóbica.	Débil. Retención baja si está cargada a pH bajo.
Atenolol	Sí (Básico)	Hidrofóbica y Polar. Propiedades balanceadas.	Moderada. Se retiene bien, mejor si está neutra a pH alto.
Paracetamol	Sí (Ácido)	Hidrofóbica y Polar. Propiedades balanceadas.	Moderada. Retención hidrofóbica óptima si está neutro a pH bajo.
Cafeína	Sí (Básico)	Polar/Hidrofílica (Puentes de H). Baja retención hidrofóbica.	Baja-Moderada. Se retiene principalmente por el grupo N-vinilpirrolidona del HLB.
Carbamazepina	No	Hidrofóbica (Dominante). Interacción polar complementaria.	Buena. Retención estable y fuerte, independiente del pH de la muestra.
Claritromicina	Sí (Básico)	Hidrofóbica (Dominante). Es un compuesto lipofílico.	Fuerte. Retención alta, maximizada si está neutra a pH alto.
Ketoprofeno	Sí (Ácido)	Hidrofóbica (Dominante). Es un compuesto lipofílico.	Fuerte. Retención alta, maximizada si está neutra a pH bajo.
Diclofenaco	Sí (Ácido)	Muy Hidrofóbica (Dominante). Es muy lipofílico.	Muy Fuerte. Retención muy alta, maximizada si está neutra a pH bajo.
Naproxeno	Sí (Ácido)	Hidrofóbica (Dominante). Es un compuesto lipofílico.	Fuerte. Retención alta, maximizada si está neutra a pH bajo.
Ibuprofeno	Sí (Ácido)	Hidrofóbica (Dominante). Es un compuesto lipofílico.	Fuerte. Retención alta, maximizada si está neutra a pH bajo.

El cartucho HLB es la solución ideal para extraer la compleja mezcla de fármacos (ácidos, bases y neutros) porque actúa como un adsorbente universal, donde a través de un único protocolo concentra y limpia toda la mezcla de contaminantes antes del análisis instrumental. Se recomienda:



- **Para Ácidos (Ketoprofeno, Diclofenaco, Naproxeno, Ibuprofeno):** cargar la muestra a un pH bajo (ej. pH 2-4) para asegurar que estén en su forma neutra (HA) y maximizar la retención por interacción hidrofóbica. $\text{pH} < \text{pKa}$
- **Para Bases (Metformina, Atenolol, Claritromicina):** cargar la muestra a un pH alto (ej. pH 10-12) para asegurar que estén en su forma neutra (B) y maximizar la retención hidrofóbica. $\text{pH} > \text{pKa}$

Aunque la SPE es la técnica más usada para preconcentrar medicamentos en muestras acuosas, es crucial considerar parámetros específicos para asegurar la optimización y el funcionamiento correcto de la extracción.

3.5.2 Optimización del tratamiento de muestras.

Existen diversas variables a controlar dentro del proceso de extracción en fase sólida como: tipo de fase sólida, tipo de eluyente, pH de la muestra, volumen del lecho, velocidad de carga de la muestra, porosidad de la fase sólida adsorbente y % de recuperación; detallándolos a continuación (Arsenault, 2012):

- **pH de la muestra:** controla el estado de ionización de los analitos, impactando directamente su interacción con la fase sólida. Su rango típico en los fármacos seleccionados es entre 2-7 (Cañas *et al.*, 2014; Munzhelele *et al.*, 2025).
- **Temperatura:** afecta la solubilidad y la cinética de difusión del analito (Bourdat *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2017; Munzhelele *et al.*, 2025):
 1. **Efecto en la elución:** un eluyente más caliente aumenta la solubilidad del analito facilitando su liberación y potencialmente, aumentando la recuperación.
 2. **Efecto en la carga:** una temperatura elevada puede acelerar la difusión, pero también podría aumentar la solubilidad del analito en la fase acuosa; debilitando así las interacciones de retención y reduciendo la eficiencia de extracción.
 3. **Práctica común:** la mayoría de los métodos de SPE para fármacos en aguas residuales se realizan a temperatura ambiente (20-25 °C), buscando un equilibrio práctico y óptimo entre retención eficiente y minimización de interferentes.



- **Volumen del lecho y velocidad de carga:** dos factores relacionados con la dinámica del proceso de extracción:
 1. **Volumen del lecho (masa de sorbente):** se refiere a la cantidad de sorbente. Un lecho más grande (de 60 mg a 200 mg para aguas residuales) ofrece mayor capacidad de carga, esencial cuando se procesan grandes volúmenes de muestra (100-1000 mL) con bajas concentraciones (Munzhelele *et al.*, 2025); sin embargo, requiere mayores volúmenes de elución, lo que podría disminuir el factor de preconcentración.
 2. **Velocidad de carga de la muestra:** una velocidad óptima asegura el equilibrio analito-sorbente y una alta eficiencia de retención.
 - i. Muy alta: reduce la eficiencia por tiempo de contacto insuficiente.
 - ii. Muy baja: prolonga innecesariamente el tiempo de preparación.
 - iii. Rango recomendado: generalmente entre 1-15 mL/min para obtener un flujo por goteo constante (Bourdat *et al.*, 2014; Lalović *et al.*, 2017; Miossec *et al.*, 2019).
- **Porcentaje de Recuperación (%Re).**

El porcentaje de recuperación es el parámetro de desempeño clave que determina la efectividad del método de SPE. Corresponde a la proporción del analito que se recupera después de la extracción, dada por la Ecuación 1:

$$\%Re = \frac{\text{masa recuperada}}{\text{masa cargada}} \cdot 100 \quad (1)$$

Se presenta un rango aceptable típico entre 70-120% (ICH, 2005).

Ya descritos los parámetros de acondicionamiento de la muestra, se requiere identificar y cuantificar los compuestos farmacéuticos; siendo la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS) la técnica analítica más utilizada. Esto debido a que permite la separación, determinación y cuantificación selectiva de analitos en mezclas multicomponentes (Willard *et al.*, 1991; Pérez *et al.*, 2019; Wilkinson *et al.*, 2022).

3.5.3 Separación de medicamentos por cromatografía.

La cromatografía es la técnica de reparto fundamental y más extendida para la separación analítica, destacada por su capacidad para aislar una amplia gama de compuestos, incluyendo macromoléculas, especies iónicas y sustancias de alto peso molecular o poliméricas. El principio de la técnica se basa en la interacción diferencial de las moléculas de la muestra entre dos medios inmiscibles: una fase móvil (líquida o gaseosa) que transporta los analitos, y una fase estacionaria (contenida en una columna cromatográfica). El fraccionamiento de la mezcla ocurre a medida que los componentes se reparten entre ambas fases, logrando la separación de los analitos de interés según la Figura 4 adjunta.

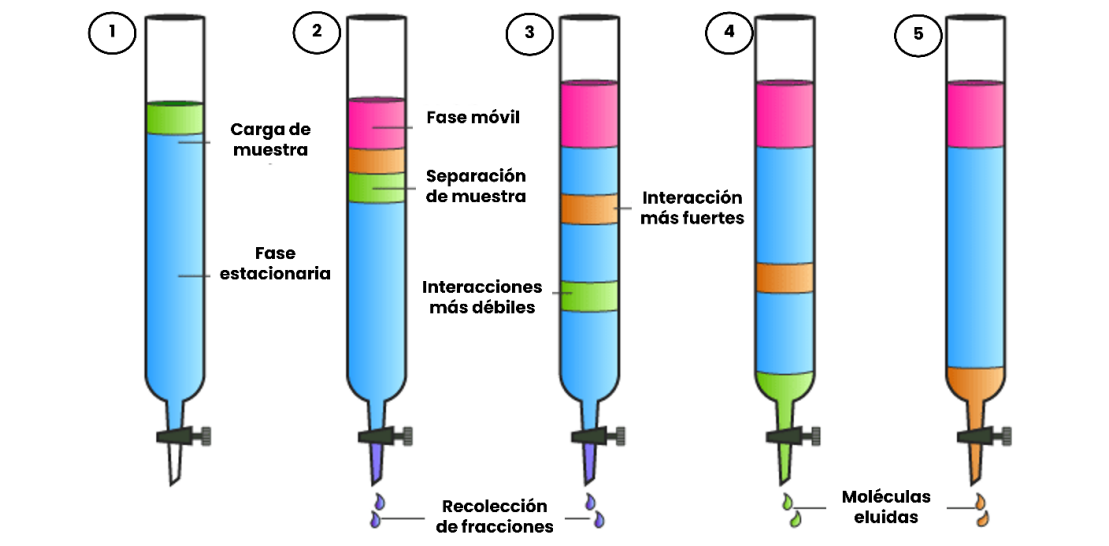


Figura 4: Separación cromatográfica en columna. CWS BROAD, 2023.

La operación cromatográfica comienza con la introducción de la mezcla en la entrada de la columna, la cual alberga la fase estacionaria. A continuación, se ingresa el flujo continuo de la fase móvil a través del lecho cromatográfico. A medida que la fase móvil transporta los componentes, aquellos analitos con menor afinidad por la fase estacionaria y mayor afinidad por la fase móvil migrarán a una mayor velocidad a lo largo de la columna. Inversamente, los analitos que presentan una mayor adsorción o afinidad por la fase estacionaria experimentarán una menor velocidad de progresión, incrementando su tiempo de residencia en esta fase y, por lo tanto, eluyendo más tarde (CWS BROAD, 2023).



El estado físico de la fase móvil es el factor determinante en la clasificación del sistema cromatográfico: si el solvente portador es un gas, el sistema se define como cromatografía de gases (GC); caso contrario, si el solvente es un líquido, se denomina cromatografía líquida (LC).

La elección de una técnica cromatográfica apropiada está determinada por las características fisicoquímicas de los analitos y la complejidad de la matriz de la muestra a evaluar. Para la identificación de fármacos, especialmente en matrices biológicas o complejas, es fundamental evaluar una serie de parámetros técnicos y de rendimiento; resumiendo las principales consideraciones en la Tabla 6 (Volonté & Quiroga, 2013; Farajzadeh *et al.*, 2014; Qin *et al.*, 2023).

Tabla 6: Comparativa de técnicas cromatográficas para detección de medicamentos.

Aspecto	Cromatografía de gases	Cromatografía Líquida
Características de fármacos	La mayoría de los antibióticos y fármacos neurológicos poseen fuerte polaridad, baja volatilidad e inestabilidad térmica.	Ideal para compuestos polares, no volátiles y termolábiles, sin necesidad de volatilización.
Preparación de la Muestra	Necesidad de derivatización con alquilación, sililación o amidación para transformar grupos polares en apolares y aumentar la volatilidad.	Requiere una mínima preparación química compleja, reduciendo el riesgo de contaminación o pérdida de la muestra.
Selectividad y Optimización	Selectividad inferior. Solo se puede modificar la temperatura del horno y la columna; la fase móvil (gas portador) es inalterable.	Mayor versatilidad y selectividad al poder variar la composición de la fase móvil (gradiente de elución) para optimizar la separación.
Recuperación de Analitos	No se pueden recuperar los componentes individuales de la muestra después del análisis.	Los componentes pueden ser recuperados para análisis posteriores o para purificación preparativa.
Aplicabilidad General	Solo aproximadamente el 20% de los compuestos pueden ser analizados eficazmente.	Aplicada en la gran mayoría de estudios desarrollados en laboratorios con análisis farmacéuticos, bioquímicos y químicos.

Según lo expuesto, la cromatografía líquida se posiciona como la herramienta analítica predilecta en el ámbito farmacéutico gracias a su capacidad inherente de manejar compuestos termolábiles y no volátiles sin necesidad de derivatización. A diferencia de la GC, la LC



permite una mayor versatilidad y control de la selectividad mediante la modificación de la fase móvil, lo cual es crucial para separar mezclas complejas y para la identificación de medicamentos en matrices acuosas.

3.5.4 Cromatografía líquida de alta y ultra eficiencia (HPLC y UHPLC).

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y su evolución, la cromatografía líquida de ultra eficiencia (UHPLC), emplean una fase móvil líquida impulsada a alta presión. Esta fase móvil requiere alta pureza, desgasificación meticulosa, baja viscosidad y, ser compatible con el detector; garantizando la integridad del sistema, la eficiencia en la separación y la estabilidad de la línea base. La separación ocurre en una columna empaquetada que contiene una fase estacionaria de partículas finas, típicamente sílica inerte con diámetros entre 3 y 10 μm (Harris, 2016).

Estas técnicas operan en dos configuraciones principales, siendo la fase inversa la más común. En este modo la fase móvil es polar (generalmente una mezcla acuosa con solvente orgánico) y la fase estacionaria es apolar (cadenas alquílicas como C18 o C8 ligadas a sílica). Bajo esta configuración, el orden de elución establece que los compuestos más polares eluyen inicialmente. Para facilitar la elución de los analitos de menor polaridad y mayor retención se suele emplear gradientes de fase, incrementando progresivamente la proporción del solvente orgánico para aumentar la fuerza eluyente (Harris, 2016).

Así, la UHPLC representa una mejora sustancial sobre la HPLC convencional. Utiliza partículas de fase estacionaria de tamaño sub-2 μm (frente a 3-5 μm) y opera a presiones significativamente mayores (15.000–20.000 psi vs a 6.000-8.000 psi). El avance confiere una resolución superior, una mayor eficiencia y una reducción drástica en el tiempo de análisis y consumo de solvente desde 40 minutos y 0,5–10 ml/min a 5-10 minutos y 0,001–5 ml/min (Farhan *et al.*, 2016; Cross, 2019; Dong 2019; Fabregat *et al.*, 2023; MacKeown *et al.*, 2024). Ofrece un amplio rango de aplicabilidad, manipulación sencilla y operación automatizada (Willard *et al.*, 1991; Volonté y Quiroga, 2013).



El sistema UHPLC consta de módulos interconectados observados en la Figura 5:

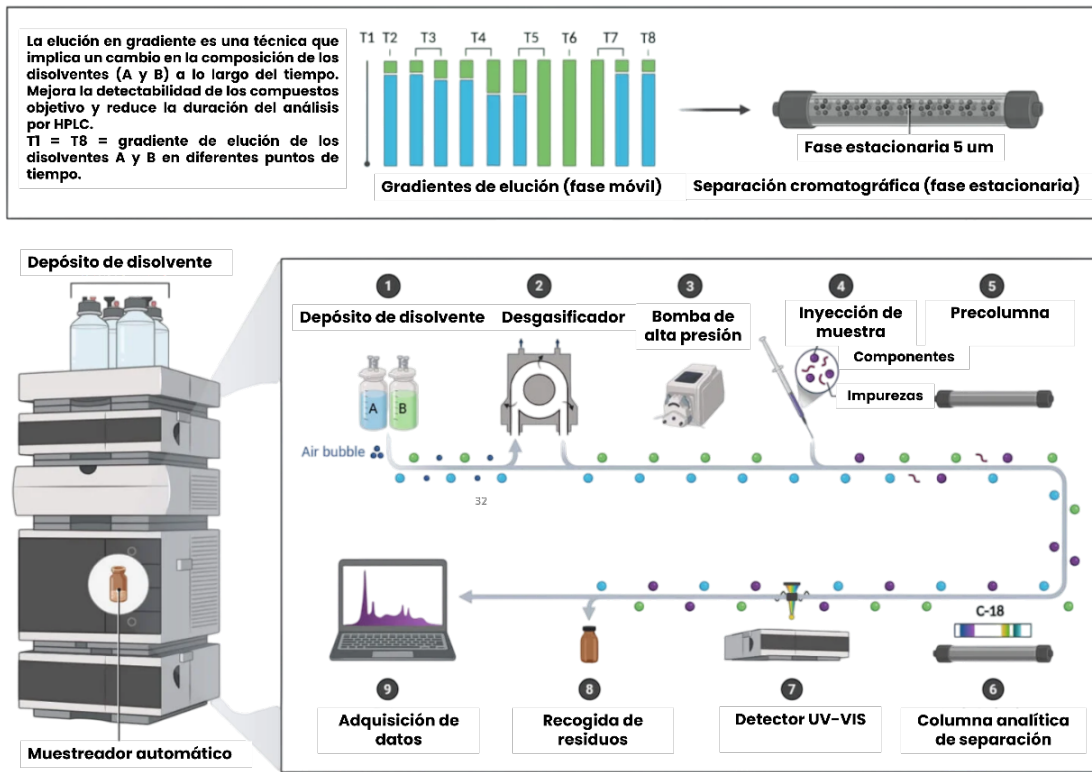


Figura 5: Equipo de UHPLC. Aryal, 2024.

Acorde a la Figura 5 el sistema de cromatografía está compuesto por varios módulos interconectados, cada uno con una función específica en el proceso analítico:

1. **Bomba de alta presión:** asegura un flujo uniforme, preciso y reproducible (isocrático o de gradiente) de la fase móvil, contrarrestando la alta contrapresión de la columna.
2. **Desgasificador:** elimina gases disueltos de la fase móvil para prevenir la formación de burbujas que desestabilicen el flujo y la detección.
3. **Válvula de inyección:** introduce un volumen exacto y definido de la muestra en el flujo de la fase móvil.
4. **Precolumna:** protege la columna analítica principal de impurezas y material particulado.
5. **Horno de columna:** mantiene una temperatura constante para garantizar la reproducibilidad de los tiempos de retención y optimizar la eficiencia.
6. **Columna cromatográfica:** contiene la fase estacionaria. Es el lugar donde ocurre la separación de los componentes de la muestra.



7. **Detector:** localiza y registra la posición de cada componente al salir de la columna, generando una señal proporcional a su concentración.
8. **Sistema de adquisición de datos:** registra, procesa y visualiza la señal del detector en forma de cromatograma, lo que permite el análisis cualitativo y cuantitativo.

Para la determinación precisa de compuestos en matrices complejas, se han puesto a la vanguardia las tecnologías acopladas (Parys *et al.*, 2022). La combinación de la cromatográfica líquida con la espectrometría de masas ofrece una alta sensibilidad, selectividad y robustez para la cuantificación de analitos farmacéuticos (Díaz & Barceló, 2005; Qin *et al.*, 2023).

El sistema de espectrometría es capaz de distinguir compuestos que coeluyen y presentan el mismo peso molecular mediante el análisis de sus iones de fragmentación. Específicamente, el espectrómetro de triple cuadrupolo es altamente valorado por su fuerte capacidad cualitativa, su sensibilidad cuantitativa y su excelente selectividad; convirtiéndolo en el instrumento más utilizado para el análisis de mezclas complejas (Gilart *et al.*, 2013; Farhan *et al.*, 2016; Belay *et al.*, 2022; Fabregat *et al.*, 2023), donde permite límites de detección cercanos a 10^{-2} g y 10^{-15} moles de un compuesto con peso molecular de 1000 dalton y concentraciones de una parte por billón (10^{12}) (González, 2010).

3.5.5 Espectrometría de masas (MS).

Determina la composición y estructura de materiales orgánicos e inorgánicos midiendo la relación masa-carga (m/z) de iones. El proceso implica la ionización de la molécula para generar iones característicos, los cuales son posteriormente identificados por su relación m/z y su abundancia relativa. Esto proporciona información cualitativa (peso molecular e iones fragmentarios) y cuantitativa de la muestra (Willard *et al.*, 1991; Harris, 2016; Merck, 2023).

Este proceso necesita de una fuente de iones, un analizador de masa y un detector según lo visualizado en la Figura 6.

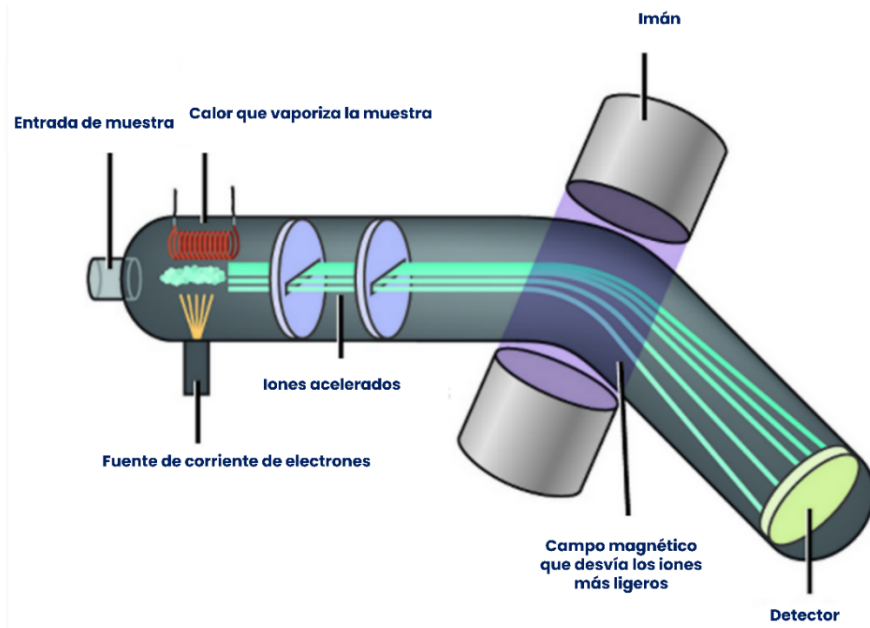


Figura 6: Funcionamiento de un espectrómetro de masas. Camacho, 2018.

El análisis comienza cuando la muestra, previamente separada por cromatografía, ingresa a la fuente de iones. Aquí, las moléculas neutras son ionizadas para generar especies cargadas. Seguidamente los iones son acelerados por un campo eléctrico y dirigidos hacia un analizador de masas que los separa en función de su relación masa-carga. Finalmente, los iones separados son registrados por un detector.

La ionización puede ser positiva (adición de un protón) o negativa (deprotonación). El ion molecular definido por el ion significativo de mayor m/z no atribuido al ruido de fondo, es clave para la identificación. La separación de los iones dentro del analizador depende de su momento, donde una menor masa resulta en una mayor velocidad; además de la aceleración que es proporcional a la carga del ión (Higson, 2007).

Principalmente, para el acoplamiento con sistemas cromatográficos y la detección de medicamentos se emplean dos fuentes de ionización suaves y a presión atmosférica dadas en la Tabla 7 (Hoffmann & Strooban, 2007; Pérez *et al.*, 2017):



Tabla 7: Comparativa de fuentes de ionización para detección de medicamentos.

Fuente de iones	Principio de funcionamiento	Características y aplicación
Ionización por electrospray (ESI)	Aplica un alto voltaje a la solución de analito para generar microgotas cargadas. La evaporación del solvente lleva a la desorción iónica a fase gaseosa.	Ideal para compuestos polares y térmicamente lábiles. Es la técnica más utilizada en el análisis farmacológico en matrices acuosas.
Ionización química a presión atmosférica (APCI)	Utiliza nebulización, calentamiento y una descarga corona para ionizar moléculas que ya están en fase gaseosa.	Adecuada para compuestos de polaridad media a baja. Es menos susceptible a los efectos de matriz que ESI, aunque presenta menor sensibilidad.

Se prefiere la ESI sobre la APCI en el análisis LC/MS por ser la técnica más adecuada para los fármacos, que son generalmente polares y termolábiles (sensibles al calor). Por su funcionamiento, la ESI permite ionizar compuestos polares y termolábiles sin necesidad de calor degradante; bajo una ionización suave que minimiza la fragmentación y preserva el ión molecular para una mejor identificación. Además, ofrece una sensibilidad cuantitativa superior, característica crucial para la detección de trazas.

Si bien la APCI puede ser menos susceptible a los efectos de matriz, su menor sensibilidad y el requerimiento de calor la hacen secundaria para la mayoría de las aplicaciones de rutina en farmacología con LC/MS/MS.

- **Ionización por electrospray (ESI).**

Técnica más usada para la identificación de compuestos farmacológicos en matrices acuosas. El eluyente de la LC se nebuliza a presión atmosférica mediante la aplicación de un campo eléctrico fuerte (entre 3-5 kV) y un gas de secado (nitrógeno); pudiendo ver su funcionamiento en la Figura 7.

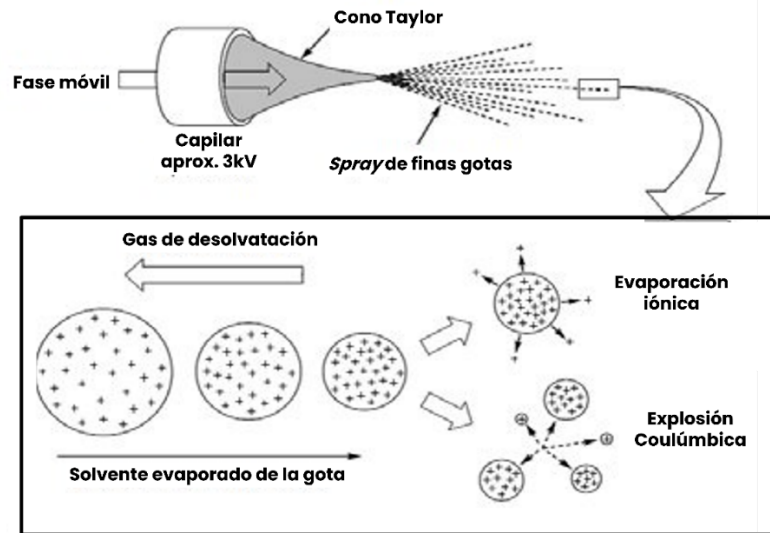


Figura 7: Funcionamiento de ESI. Misal, 2008.

Inicialmente se tiene un campo electrostático que genera gotas cargadas de solución analítica, donde posteriormente ocurre una desolvatación en la cual una corriente de gas de secado rodea el capilar y reduce el tamaño de las gotas evaporando el solvente. Las gotas disminuyen de tamaño hasta que las fuerzas de repulsión electrostática (Coulomb) superan las fuerzas de cohesión, liberando los analitos ionizados a la fase gaseosa. Una vez liberados los iones en las gotas, son transferidos al alto vacío del MS para analizar las masas encontradas (Hoffmann & Strooban, 2007; Harris, 2016).

El analizador se encarga de separar los iones según su relación m/z . Esta separación se basa en la variación de la velocidad del ion (menor masa implica mayor velocidad) o en su interacción con campos eléctricos/magnéticos. La resolución del analizador mide su capacidad para distinguir iones con valores de m/z muy cercanos (Harris, 2016).

El analizador másico de cuadrupolo (Q) es el más empleado debido a su robustez, costo-efectividad y fácil operación; donde se filtran iones aplicando campos eléctricos oscilantes.

Específicamente, se cuenta con un "triple cuadrupolo" (QQQ) como configuración en tándem que acopla dos analizadores cuadrupolares con una celda de colisión intermedia. Esto permite la selección y fragmentación controlada de iones precursores específicos, proporcionando una mayor selectividad y sensibilidad para el análisis de trazas en matrices complejas; por lo cual, es ideal para aplicaciones que requieren detectar y cuantificar medicamentos en aguas

bajo una cuantificación más robusta con alta capacidad de muestreo (Wille *et al.*, 2012; Watson & Sparkman, 2015; Harris, 2016; Pérez *et al.*, 2017).

- **Analizador de triple cuadrupolo.**

En el analizador cuadrupolar se combinan las capacidades de filtrado de tres cuadrupolos individuales en serie, donde se analizan los iones formados en la cámara de ionización, se fragmentan y se vuelven a analizar (Willard *et al.*, 1991). Su configuración se ilustra en la Figura 8:

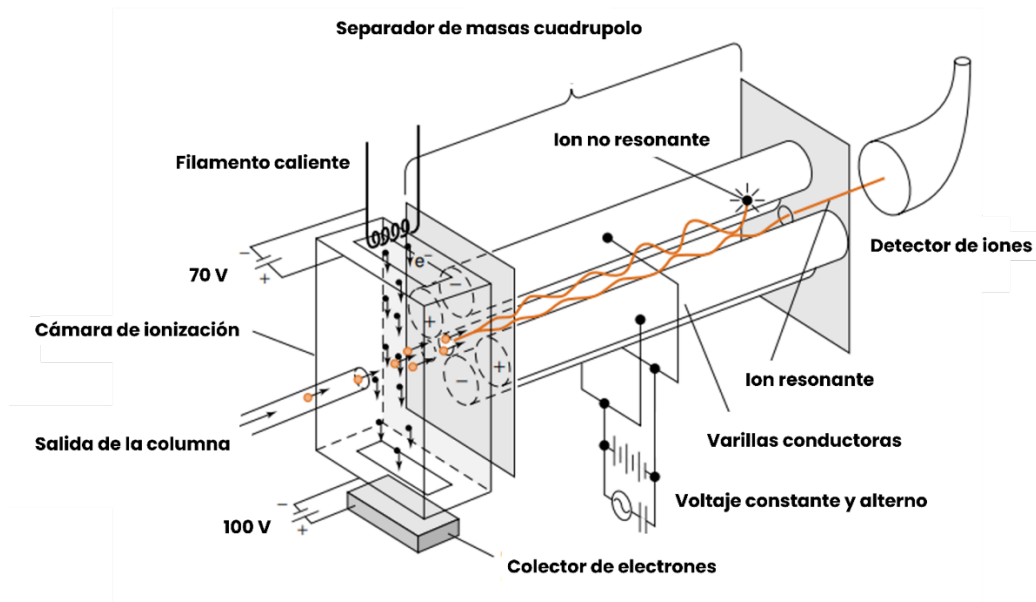


Figura 8: Funcionamiento de un espectrómetro de masas tipo cuadrupolo. Harris, 2016.

Se compone de cuatro varillas metálicas paralelas a las que se aplica una combinación de potencial de corriente continua y un voltaje de radiofrecuencia oscilante. Los iones inyectados longitudinalmente interactúan con este campo dinámico de manera tal que aquellos con una relación m/z específica logran atravesar el cuadrupolo hasta el detector; mientras el resto colisiona con las varillas y se neutraliza (Willard *et al.*, 1991; Hoffmann & Strooban, 2007; Harris, 2016).

La configuración opera con tres cuadrupolos en serie, cada uno con una función específica dada en la Figura 9:

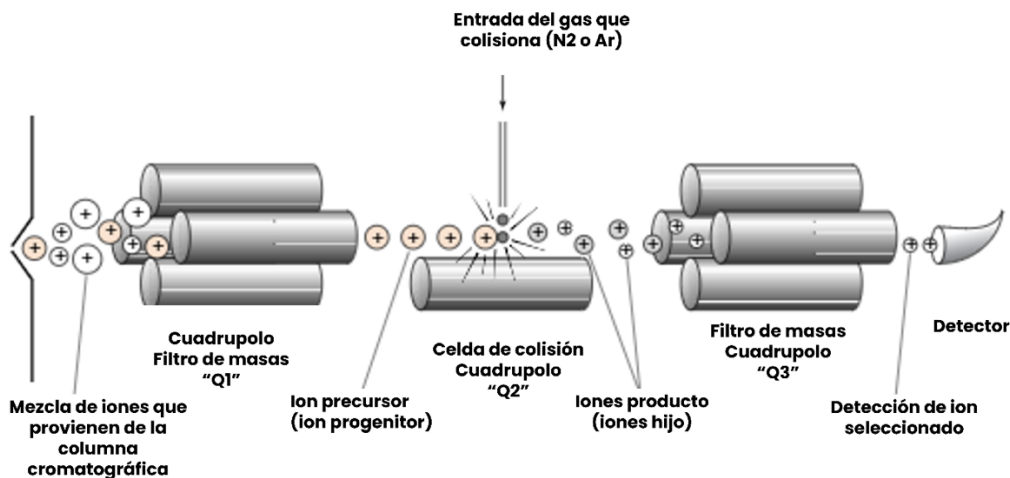


Figura 9: Diagrama esquemático de triple cuadrupolo. Harris, 2016.

El primer cuadrupolo (Q1) actúa como filtro de masas. Recibe todos los iones de la fuente y selecciona un único ion precursor (o padre) de interés con una m/z definida. Puede operar en modo de barrido (SCAN) para identificar todos los iones presentes o monitoreo de iones seleccionados (SIM) para detectar un ion específico con alta sensibilidad.

El segundo cuadrupolo (Q2) es una celda de colisión que contiene un gas inerte a baja presión. El ion precursor de Q1 choca con este gas, fragmentándose en iones más pequeños llamados iones producto (o hijos).

Por último, el tercer Cuadrupolo (Q3) vuelve a actuar como filtro de masas. Selecciona y aísla los iones producto específicos generados en Q2 para su detección utilizando el modo de monitoreo de reacciones múltiples (MRM).

A pesar de lo anterior, toda técnica analítica en desarrollo debe ser validada para garantizar la calidad, exactitud y confiabilidad de las mediciones de los analitos en matrices complejas.

3.5.6 Validación de método analítico.

La validación proporciona evidencia objetiva de que un método es apto para un uso o aplicación específica, estableciendo un procedimiento trazable (Ministerio de Economía, Fomento y Turismo, 2018). Para generar resultados fiables se evalúan características críticas como: selectividad, límites de detección y cuantificación, exactitud (veracidad y recuperación), precisión (repetibilidad y reproducibilidad), intervalo de trabajo y robustez.



La evaluación viene dada por la respuesta gráfica entregada por LC/MS/MS, siendo visualizada en dos formatos:

1. Cromatograma (respuesta del detector vs. tiempo).

La Figura 10 muestra la respuesta del detector en función del tiempo de elución del UHPLC:

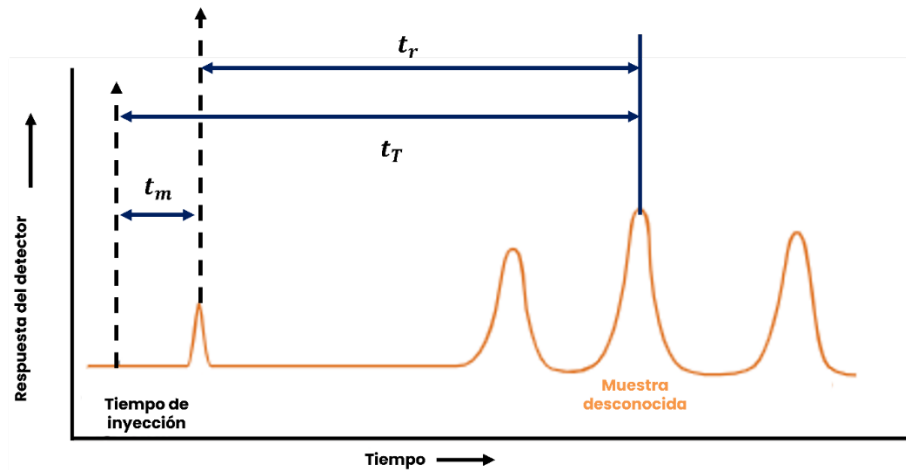


Figura 10: Ejemplo de cromatograma. Harris, 2016.

Cada "montaña" o pico representa un componente diferente de la mezcla que ha sido separado y detectado. La posición del pico en el eje X indica el tiempo de retención (t_r) definido como aquel que transcurre desde la inyección hasta que el analito llega al detector. Este parámetro es clave para la identificación cualitativa del compuesto.

La altura o el área bajo el pico es directamente proporcional a la concentración de ese compuesto en la muestra (cuantificación) (Harris, 2016).

2. Espectro de masas (abundancia vs. relación masa-carga).

Muestra la distribución de las relaciones masa-carga de los iones producidos a partir de la muestra. La representación típica viene dada por la Figura 11:

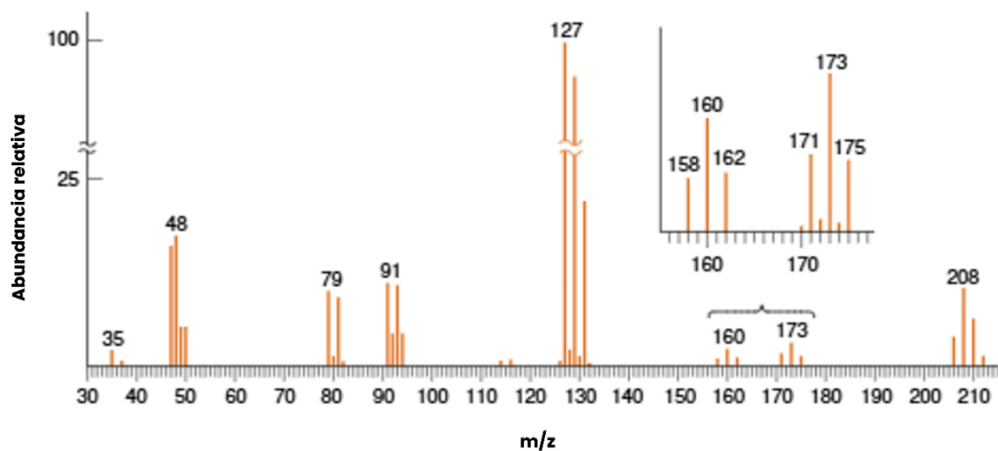


Figura 11: Ejemplo de espectrómetro de masas. Harris, 2016.

Cada línea vertical es un ion específico detectado, teniendo que el eje X representa la relación m/z de los mismos. Dado que la carga (z) es típicamente +1 (iones simples); este eje representa la masa del ion en unidades de masa atómica (Da).

De igual modo, el eje Y corresponde a la intensidad o abundancia de cada ion. El pico más intenso en todo el espectro se normaliza a un valor de 100% de abundancia relativa; configurándose como el pico base donde las demás intensidades se expresan como un porcentaje de este.

Ya habiendo presentado los conceptos básicos de cromatografía y espectrómetro de masas, se detallarán una serie de medidas y parámetros necesarios para la validación de un método analítico (Compañó & Ríos , 2002; Magnusson & Örnemark, 2014; Olivieri & Escandar, 2014; Ministerio de Economía, Fomento y Turismo, 2018):

1. Control de materiales y muestras.

- **Blanco:** evalúa la señal de fondo bajo:
 - **Blanco de reactivos:** utiliza todos los reactivos del proceso sin el analito.
 - **Blanco de matriz:** usa la matriz de la muestra sin el compuesto de interés.
- **Soluciones fortificadas:** soluciones a las que se ha añadido una cantidad conocida de



analito para evaluar la respuesta del sistema.

- **Patrones de medida:** sustancias de referencia con propiedades caracterizadas, utilizadas para identificación, calibración y trazabilidad metrológica.

2. Parámetros de rendimiento cuantitativo.

- **Linealidad del método:** capacidad de obtener una respuesta (señal) directamente proporcional a la concentración del analito dentro de un intervalo de trabajo definido (usualmente con un mínimo de 5 puntos de concentración).
- **Precisión:** grado de coincidencia entre resultados de mediciones individuales de una muestra homogénea, esencial para determinar la variabilidad.
 - **Repetibilidad:** mide la variación mínima de resultados obtenidos por el mismo analista, con el mismo equipo, en un corto periodo de tiempo.
 - **Reproducibilidad:** mide la variación máxima de resultados entre diferentes laboratorios.
- **Efecto Matriz (ME):** evaluación de cómo la presencia de otros componentes en la muestra afecta (disminuyendo o aumentando) la respuesta instrumental del analito.

Ocurre cuando componentes de la muestra que co-eluyen con los medicamentos interfiriendo en el proceso de ionización en la fuente. Estos componentes "compiten" por la carga o por el espacio en la superficie de la gota del spray, provocando la supresión de la señal o su incremento (Harris, 2016).

Para minimizar su efecto, la extracción en fase sólida es el primer paso fundamental debido a su objetivo de limpieza de la muestra. Para mezclas de fármacos en agua, el estándar es el HLB, un polímero universal que retiene compuestos polares y no polares, donde su uso se puede completar con medidas adicionales correspondientes a (Ternes, 2001; Matuszewski *et al.*, 2003; Wong & MacLeod, 2009; Wille *et al.*, 2012; Petrović *et al.*, 2016):

- Lavado selectivo: después de cargar la muestra, un paso de lavado con un bajo



porcentaje de solvente orgánico elimina sales, proteínas y ácidos húmicos que causan supresión, sin eluir los fármacos.

- Limpieza de muestra de agua: si la matriz está muy cargada como lo es el caso de las aguas residuales, los sitios activos del cartucho SPE pueden saturarse con interferentes, impidiendo que los compuestos farmacéuticos se retengan. Para disminuir aquello, se propone filtrar la muestra previo a su paso por el cartucho.
- Uso de estándares internos isotopizados: se añade a la muestra una versión del fármaco marcada con deuterio o carbono-13. Como el estándar marcado co-eluye exactamente igual que el fármaco natural, ambos sufren la misma supresión; por lo tanto, al calcular la relación de áreas, el efecto matriz se corrige automáticamente.
- Optimización cromatográfica: ajustar los tiempos de retención para que los analitos eluyan en zonas del cromatograma libres de interferentes evitando el "volumen muerto" o el final del gradiente.
- Calibración en matriz: en lugar de preparar la curva de calibración en solvente puro, se prepara en una "matriz blanca" (agua del mismo origen pero sin los medicamentos). Así, la curva ya compensa el error sistemático del efecto matriz, pudiendo realizar un control de calidad del método a través del porcentaje del efecto mediante la fórmula 1 (Matuszewski *et al.*, 2003):

$$ME = \left(\frac{\text{Área de la muestra fortificada post - extracción}}{\text{Área del estándar en solvente}} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

3. Límites de detección y cuantificación: definen los umbrales de sensibilidad del método:

- **Límite de Detección (LOD):** es la menor concentración de analito en la muestra que puede ser distinguida de manera confiable de la señal de fondo. Se calcula a partir de la señal del límite de detección usando la Ecuación 3 (Olivieri & Escandar, 2014):

$$Y_{LD} = Y_0 + 3 \cdot S_B \quad (3)$$



Donde Y_{LD} es la señal entregada por el límite de detección, Y_0 es el intercepto de la ecuación de la curva de calibración y S_B es el error típico entregado en el análisis de datos. La concentración correspondiente al valor de la señal entregada se calcula a partir de la recta de calibración, reemplazando el valor de Y_{LD} encontrado como lo indica la Ecuación 4:

$$LOD = 3 \cdot S_B/m \quad (4)$$

Siendo m la pendiente de la recta.

- **Límite de Cuantificación (LOQ):** es la concentración más baja de un analito que puede ser cuantificada (medida con una precisión y exactitud aceptables) de manera confiable por el instrumento. Se estima como:

$$LOQ = 10 \cdot \frac{S_B}{m} \quad (5)$$

4. Precisión: se define como el grado de concordancia entre una serie de mediciones individuales obtenidas a partir de múltiples muestreos de una misma muestra. Para la validación del método multirresidual se utiliza la desviación estándar en los controles para la verificación de un analito en la mezcla de interés, donde su valor debe ser inferior al 20 y 15 % para bajas y altas concentraciones, respectivamente (Naciones Unidas, 2010).

5. Confirmación de identificación de analito: para asegurar la detección se requieren al menos 4 puntos de identificación correspondientes a dos transiciones por analito, es decir, un ion precursor y dos iones hijo o producto. El tiempo de retención de los iones identificados no debe desviarse más de 2,5%, donde la desviación permitida de la intensidad relativa de los iones debe cumplir con (Commission, 2002):

- Q/q entre 1-2: $\pm 20\%$
- Q/q entre 2-5: $\pm 25\%$
- Q/q entre 5-10: $\pm 30\%$
- Q/q >10: $\pm 50\%$



Capítulo 4: Metodología experimental.

Se propuso una metodología que abarca desde la selección de los analitos de interés hasta la optimización de las condiciones de detección, cuantificación y el adecuado tratamiento de la muestra.

4.1 Selección de compuestos farmacológicos.

La selección de los medicamentos a estudiar se fundamentó en un análisis exhaustivo del estado del arte, priorizando criterios como el nivel de reporte, concentración y frecuencia de detección a nivel nacional. Se incluyeron fármacos que representan diversas familias terapéuticas, cubriendo usos frecuentes en la sociedad chilena, tales como el control de diabetes, hipertensión, alergias y, el uso de analgésicos, antiinflamatorios, antidepresivos y drogas psicoactivas.

Para esta investigación, se seleccionaron los siguientes diez compuestos farmacológicos: Paracetamol (PA) ($\geq 99\%$ de pureza), ibuprofeno (IBU) ($\geq 98\%$ de pureza), naproxeno (NAP) (98-100% de pureza), atenolol (ATE) ($\geq 99,3\%$ de pureza), metformina (MET) ($\geq 99,9\%$ de pureza), cafeína (CAF) ($\geq 99,96\%$ de pureza), carbamazepina (CARB) ($\geq 99,8\%$ de pureza), claritromicina (CLAR) ($\geq 98,7\%$ de pureza), ketoprofeno (KET) ($> 99\%$ de pureza) y diclofenaco (DICL) ($\leq 100\%$ de pureza).

4.2 Recolección y conservación de muestras.

La recolección de muestras se diseñó para obtener un volumen representativo que asegure la medición precisa de los fármacos en las diversas etapas de tratamiento de la planta de depuración. Se tomó 1L de cada muestra en tres puntos clave de una planta ubicada en la macrozona sur, proveniente de la región de Temuco:

- Entrada del Tratamiento Primario.
- Entrada del Tratamiento Secundario.
- Salida del Tratamiento Secundario (corriente previa a la cloración).



Para prevenir la descomposición de los analitos por radiación UV, actividad microbiana, o tiempo, se utilizó un protocolo de conservación: las muestras se almacenaron en botellas de vidrio ámbar con superficies limpias y se mantuvieron refrigeradas a 4°C durante el traslado y hasta el momento de su análisis en el laboratorio.

Adicionalmente, se evaluó 1L de agua potable de la zona central proveniente de la región de Valparaíso aplicando el mismo protocolo de conservación que las muestras de efluentes.

4.3 Pre-tratamiento y extracción de muestras.

Previo a la introducción en los equipos analíticos, las muestras de agua residual requieren un pre-tratamiento para eliminar sólidos suspendidos y posibles interferencias de la matriz. Este proceso se dividió en cinco etapas:

- **Filtrado de la muestra.**

Inicialmente las muestras se filtraron utilizando un embudo Buchner y papel filtro de 125 mm. Si era necesario, previamente se empleaba algodón para retener residuos sólidos más grandes y evitar la rápida saturación del papel filtro. Seguidamente, la muestra se pasó por un filtro de 0,45 μm asistido por una bomba de vacío.

- **Ajuste de pH.**

El pH de la muestra filtrada se ajustó a un valor cercano pH 2 mediante la adición de HCl concentrado.

- **Almacenamiento.**

Las muestras filtradas y con pH ajustado se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta el día de la extracción por SPE.

- **Extracción en fase sólida.**

Para el preconcentrado de la muestra se empleó la técnica de extracción en fase Sólida utilizando cartuchos CHROMABOND HBL (60 μm) con un volumen de 6 mL y peso de 200



mg de una resina adsorbente a base de poli (divinilbenzol-co-N-vinilpirrolidona y divinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona).

El procedimiento de SPE incluyó las siguientes etapas:

- 1. Acondicionamiento y equilibrio:** los cartuchos se acondicionaron con 5 mL de metanol y se equilibraron con 5 mL de agua pura.
 - 2. Carga de muestra:** cada muestra de 1 L se dividió en 4 porciones de 250 mL; pasando esta última cantidad por el cartucho a un flujo controlado de aproximadamente 20 mL/min. Así, se obtuvieron 4 réplicas de cada muestra de agua evaluada.
 - 3. Elución:** los analitos retenidos se eluyeron utilizando 5 mL de metanol.
 - 4. Secado y reconstitución:** el eluato recolectado se secó bajo un flujo suave de nitrógeno a 25 °C hasta sequedad; reconstituyendo el residuo en 1mL de fase móvil.
 - 5. Filtración final:** finalmente, la muestra reconstituida se filtró con filtros de jeringa de 0,45 y 0,22 μm antes de su inyección en el sistema UHPLC/MS/MS.
- **Matriz sintética.**

Con el fin de evaluar el porcentaje de recuperación en la extracción por SPE, se preparó un mix de muestra con las concentraciones tabuladas en la Tabla 8.

Tabla 8: concentraciones tomadas de cada compuesto farmacológico para matriz.

Fármaco	Concentración individual (ppb)	Concentración en patrón para calibrado (ppb)
Metformina	100	20
Atenolol	50	20
Paracetamol	200	20
Cafeína	50	20
Carbamazepina	500	200
Claritromicina	200	50
Ketoprofeno	200	50
Diclofenaco	50	50
Naproxeno	100	20
Ibuprofeno	100	20



Se destaca que para poder evaluar la efectiva interacción entre el cartucho y el analito de interés, se realizó el mismo proceso de extracción en fase sólida descrito, pero a pH 7.

4.3 Desarrollo de técnica analítica.

- **Cromatografía líquida en separación.**

Se seleccionó la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (UHPLC) como método de separación principal debido a su superior eficiencia y la reducción significativa del tiempo de análisis, logradas por el uso de partículas de fase estacionaria más pequeñas. Se implementó un sistema UHPLC *Thermo Scientific Dionex modelo UltiMate 3000*, controlado por el *software Thermo Scientific™ Dionex™ Chromeleon™ 7.0*, que integra la separación cromatográfica y la detección por espectrometría de masas (Thermo Scientific, 2023).

Para la separación de los fármacos se utilizó una Columna Kinetex Evo C18 de 1,7 μm 100 $^{\circ}\text{A}$ con dimensiones de 50 \times 2,1 mm (Polycompany, 2017). Las condiciones operacionales iniciales fueron:

- Flujo: 300 $\mu\text{L}/\text{min}$.
- Volumen de inyección: 5 μL .
- Temperatura de *autosampler*: 10 $^{\circ}\text{C}$

Basándose en la literatura previa referenciada en el Anexo A, para desarrollar el método analítico se llevó a cabo la optimización de los siguientes parámetros del UHPLC:

1. **Estándares de compuestos:** se prepararon stock de cada fármaco de 1.000 y 100 ppm en fase móvil y se almacenados en frascos ámbar. De ellos, se utilizaron concentraciones entre 1-10.000 ppb para el desarrollo de las curvas de calibración.
2. **Temperatura de columna:** el rango de evaluación fue entre 30-40 $^{\circ}\text{C}$.
3. **Fases móviles:** se probaron combinaciones de solventes: agua ultrapura (A), metanol hipergrado para LC-MS (Supelco, 2023) (B), acetonitrilo de grado HPLC (99,7%) (Sigma-Aldrich, 2023) (C) y ácido fórmico al 0,1%, (D) al 98-100% (Supelco, 2023).
4. **Gradiente de elución:** se usaron gradientes segmentados (0-100%) y zonas isocráticas.
5. **Energía de fuente (detector):** se varió la energía entre 2-4,5 kV para ionización negativa



y 3-5 kV para ionización positiva buscando la mejor relación señal/ruido.

6. Tiempo de análisis: se investigaron tiempos de corrida entre 10-25 minutos.

- **Espectrometría de masas de triple cuadrupolo (MS/MS) en identificación y cuantificación.**

Se seleccionó la espectrometría de masas (MS) como detector para el análisis de compuestos farmacéuticos en aguas residuales dada su inherente capacidad para proporcionar información cualitativa y cuantitativa de alta sensibilidad. Específicamente, se optó por un sistema de triple cuadrupolo (MS/MS) operando en modo de Monitoreo de Reacción Seleccionada (SRM). Esta configuración es crítica para el análisis en matrices complejas ya que aumenta la selectividad al monitorear la transición específica de un ion precursor a un ion producto, reduciendo drásticamente el ruido de fondo y las interferencias de la matriz. Además, es capaz de separar e identificar analitos que coeluyen (salen simultáneamente de la columna cromatográfica) pero que poseen iones de fragmentación únicos, aumentando la confianza en la identificación.

Se empleó una fuente de ionización por electropulverización calentada (HESI) para transformar eficientemente los iones de la solución en iones en fase gaseosa. Para maximizar la cobertura y la sensibilidad se evaluaron los modos de ionización positiva y negativa debido a que los fármacos con grupos funcionales básicos (aceptores de protones) se ionizan de manera más eficiente en modo positivo; mientras que, los medicamentos con grupos funcionales ácidos (donadores de protones) se ionizan de manera más eficiente en modo negativo. El objetivo fue determinar el modo de ionización que genera la señal más intensa y limpia (con menor ruido) para cada compuesto, garantizando la máxima sensibilidad del método.

A continuación, se presenta la Tabla 9 de condiciones específicas del MS utilizadas.



Tabla 9: Parámetros utilizado en el MS.

Parámetros	Valor
H-ESI	
<i>Sheath gas</i> (Arb)	60
<i>Aux gas</i> (Arb)	15
<i>Sweep gas</i> (Arb)	1
Temperatura de tubo de transferencia de iones (°C)	300
Temperatura de vaporización (°C)	375
SRM	
Tiempo de ciclo (s)	0,8
Resolución Q ₁ y Q ₃ (FWHM)	0,7
Gas de disociación inducida por colisión (mTorr)	2
Ancho del pico cromatográfico (s)	6

4.4 Estandarización de metodología y criterios cuantitativos.

Se establecieron los siguientes criterios analíticos para evaluar la efectividad, calidad, y robustez del método de detección y cuantificación de fármacos por UHPLC-MS/MS:

- **Límites de detección y cuantificación:** se calcularon a partir de las curvas de calibración, representando la mínima concentración detectable con una certeza razonable y cuantificada con precisión y exactitud.
- **% Recuperación:** para asegurar que efectivamente el método de extracción, separación y cuantificación es representativo y efectivo para el análisis de la matriz, se debe tener un valor aproximado de recuperación entre 70-120%.
- **Precisión:** se utilizó la desviación estándar en las réplicas de cada muestra de agua de interés, donde su valor debe ser inferior al 20% para bajas concentraciones para su validación.
- **Confirmación de analito:** para asegurar la identificación del analito de cada compuesto se detectó un ion precursor, un ion de cuantificación y un ion de confirmación. Además, se usó como criterio que el tiempo de retención de los iones identificados no variase más de 2,5%.



Capítulo 5: Resultados y discusión.

5.1 Optimización de condiciones de separación.

Para desarrollar un método analítico que permitiera la separación y cuantificación simultánea de una mezcla multicomponente que incluye metformina, atenolol, paracetamol, cafeína, carbamazepina, claritromicina, ketoprofeno, diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno, se ejecutó un proceso exhaustivo de optimización que requirió más de 500 inyecciones experimentales.

El objetivo primordial fue lograr una separación eficiente y resolutive de la totalidad (o la mayor parte) de los compuestos en una muestra compleja. Esto es crucial para dos fines principales:

1. **Evitar la coelución:** asegurar que cada analito presente su tiempo de retención característico debido a su interacción con la fase estacionaria.
2. **Caracterización inicial:** definir el modo de ionización óptimo, ion precursor y peso molecular de cada compuesto.

La experimentación se inició con la evaluación de la detección de cada analito utilizando diversas composiciones de fases móviles. La primera prueba consistió en una mezcla de 90% ácido fórmico al 0,1% (D) y 10% de acetonitrilo (C). Bajo las condiciones operacionales detalladas en la Tabla 10, esta composición permitió la detección inicial de 8 medicamentos en modo de ionización positiva, tal como se ilustra en el cromatograma de la Figura 12.

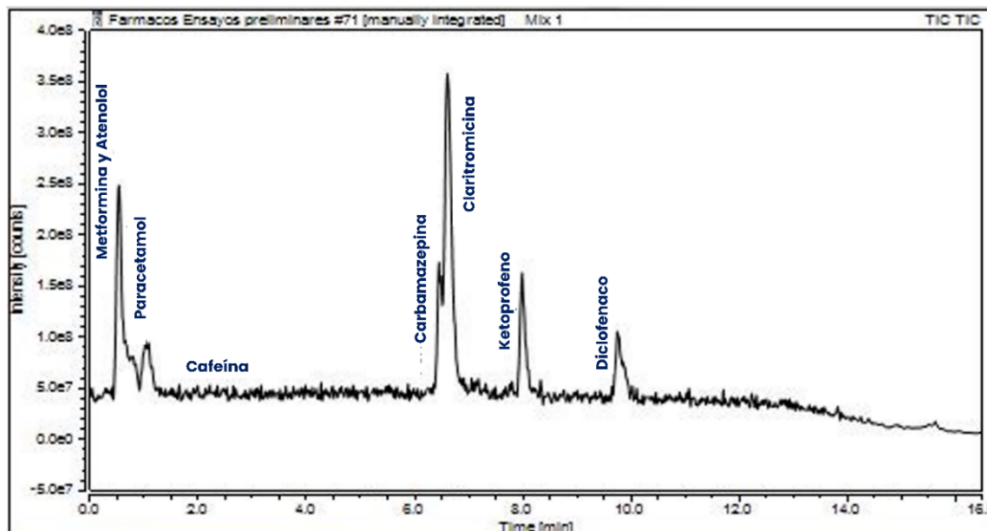


Figura 12: Elución en modo positivo con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo.

Tabla 10: Resultados de primera metodología de separación.

Fármaco	Ionización	Peso Molecular (Da)	Ion molecular	Tiempo de retención (min)
Metformina	+	129,15	130,17	0,54
Atenolol	+	266,34	267,23	0,54
Paracetamol	+	151,16	152,13	0,8
Cafeína	+	194,19	195,14	1,08
Carbamazepina	+	236,27	237,14	6,16
Claritromicina	+	747,95	748,59	6,25
Ketoprofeno	+	254,3	255,14	7,73
Diclofenaco	+	296,15	296,09	9,54

Condiciones de operación: 40°C / 3,5 kV positivo y 2,5 kV negativo.
 Gradiente: 90% D y 10% de C hasta 1 min, disminuyendo a 80% de D a 1,1 min; condición mantenida hasta 2 min; para posteriormente tener 40% de D a 6 min, 100% de C a 12 min y 90% de D a 15 min.

Los resultados iniciales revelaron una separación parcial pero incompleta de la mezcla multicomponente, lo que indica la necesidad de ajustar las condiciones cromatográficas. Se observó la presencia de picos individuales y distintos para seis de los analitos: paracetamol, cafeína, claritromicina, carbamazepina, ketoprofeno y diclofenaco. Este hecho confirma que las condiciones establecidas logran inducir una selectividad y retención diferencial basada en la afinidad de estos compuestos con la fase estacionaria y su interacción con la fase móvil.

Sin embargo, se identificaron limitaciones significativas donde las señales obtenidas se alejan



del comportamiento gaussiano ideal, indicando problemas en la eficiencia de la columna o en las interacciones cromatográficas.

Igualmente, no se logró una separación resolutive para todos los compuestos, destacando dos casos:

- **Metformina y atenolol:** ambos medicamentos eluyen simultáneamente (coeluyen), impidiendo su cuantificación individual. Esto sugiere una selectividad insuficiente para diferenciar sus propiedades fisicoquímicas; o bien, que la señal de la metformina esté solapando la señal del atenolol, especialmente si este último se encuentra cerca del ruido de fondo.
- **Carbamazepina-claritromicina y cafeína:** la separación entre la carbamazepina y claritromicina tampoco fue resolutive bajo esta condición. Además, la señal de la cafeína apenas se distingue del nivel de ruido.

Por otra parte, la detección de naproxeno e ibuprofeno requirió un modo de operación distinto. Estos compuestos fueron determinados en modo negativo o desionización del analito, confirmando su presencia con el sistema de arreglo de diodos (UV-Visible) del UHPLC, tal como se muestra en la Figura 13.

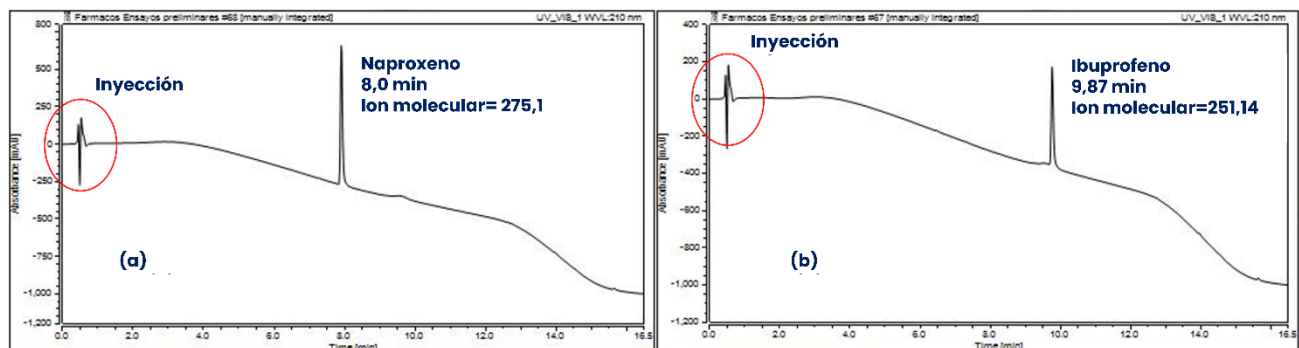


Figura 13: UV-VIS en modo negativo con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo.

En la Figura 13, se identifica una marca de "Inyección" (resaltada en rojo) al inicio de cada cromatograma. Esta señal es la respuesta característica del detector al solvente de inyección y/o a las variaciones de presión que ocurren durante la introducción de la muestra en el sistema UHPLC.

Un hallazgo importante fue que las masas detectadas en el detector UV del UHPLC no



coincidían con sus pesos moleculares esperados ni con los resultados de investigaciones previas; donde para el naproxeno se esperaban iones moleculares de aproximadamente 229 y para ibuprofeno 205. Este fenómeno se atribuyó a la interacción específica de estos compuestos con la fase móvil de ácido fórmico, considerando sus valores de pKa y la presencia de un grupo carboxilo (-COOH) en su estructura química.

El pH de la fase móvil (debido al ácido fórmico) es inferior al pKa de estos compuestos considerados ácidos débiles, generando que el equilibrio de disociación se desplace hacia la forma no ionizada (protonada) de sus grupos carboxilo (R-COOH) de carácter lipofílico; es decir, se suprime la formación del anión carboxilato (R-COO⁻) y con ello, al estar en un sistema de cromatografía de fase reversa donde la fase estacionaria es no polar, presentan una mayor retención en la columna cromatográfica.

Con base en los problemas de selectividad y retención observados se efectuaron cambios en el gradiente de elución para la separación de los compuestos con respuesta positiva buscando aumentar la polaridad de la fase móvil. Como resultado, se observó una mejora significativa en la separación cromatográfica, tal como se evidencia en la Figura 14 que presenta las nuevas condiciones especificadas en la Tabla 11.

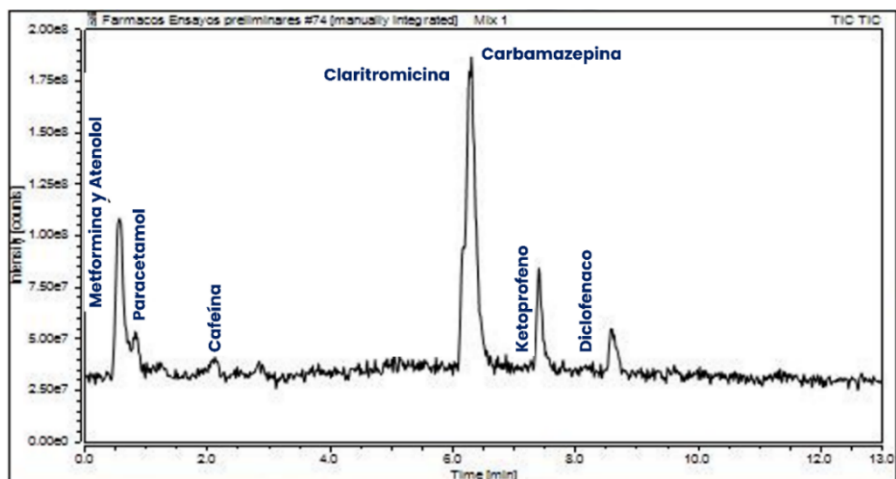


Figura 14: Nueva respuesta en positivo con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo.



Tabla 11: Nuevas condiciones de trabajo con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo.

Fármaco	Ionización	Peso Molecular (Da)	Ion molecular	Tiempo de detección (min)
Metformina	+	129,15	130,17	0,56
Atenolol	+	266,34	267,2	0,56
Paracetamol	+	151,16	152,12	1,23
Cafeína	+	194,19	195,13	2,85
Claritromicina	+	747,95	748,57	6,26
Carbamazepina	+	236,27	237,19	6,35
Ketoprofeno	+	254,3	255,16	7,39
Diclofenaco	+	296,15	296,06	8,58

Condiciones de operación: 40°C y, 3,5 kV positivo y 2,5 kV negativo.
 Gradiente: 95% D y 5% de C hasta 0 min, disminuyendo a 50% de D a 5 min; presentando 40% de D a 10 min; para posteriormente tener 100% de C a 12 min, finalizando con 95% de D a 13 min.

A pesar de la mejora cromatográfica observada, persistieron problemas críticos de resolución donde los picos de metformina y atenolol continuaron apareciendo como una única señal impidiendo su cuantificación individual. De manera similar, se mantuvo la coelución de carbamazepina y claritromicina; siendo un indicativo de que las modificaciones de gradiente no fueron suficientes para inducir una diferencia significativa en la interacción de estos pares de analitos, cuyas propiedades fisicoquímicas de polaridad y pKa son altamente similares bajo las condiciones de trabajo ensayadas.

Aunque se logró una mejora en la separación de paracetamol y resolución de cafeína, la baja sensibilidad de la señal captada en el cromatograma afectó su posterior cuantificación (área bajo la curva). Sumado a ello, se observó una ligera asimetría en la cola del pico de paracetamol, posiblemente por el solapamiento con el frente de solvente o la coelución de metformina y atenolol.

Producto de estas limitaciones, se utilizó una nueva fase móvil; llevando a cabo diversas modificaciones avanzadas en el gradiente de elución para la separación de los compuestos de iones positivos.

La nueva fase móvil estuvo compuesta por 90% de ácido fórmico al 0,1% (D) y 10% de metanol (B), sustituyendo el acetonitrilo anterior. El objetivo de este cambio fue mejorar la separación de los iones positivos y facilitar la identificación adecuada de los fármacos con iones negativos. Así, se realizaron eluciones en gradiente donde la fuerza eluyente se



incrementó progresivamente y se implementaron zonas isocráticas controladas para aumentar el tiempo de análisis y mejorar la resolución de los compuestos con tiempos de retención similares.

Mediante esta nueva estrategia se logró la determinación exitosa de los diez compuestos en la mezcla según:

- **Detección por MS/MS:** ocho de los compuestos fueron identificados mediante sus iones moleculares, los cuales concordaron con sus respectivos pesos moleculares.
- **Detección Auxiliar:** los dos compuestos restantes se identificaron a través de detección por UV-Visible.

Los cromatogramas que demuestran la separación lograda se ilustran en la Figura 15 (MS/MS) y Figura 16 (UV-Visible); donde los tiempos de retención finales y las condiciones de operación se resumen en la Tabla 12.

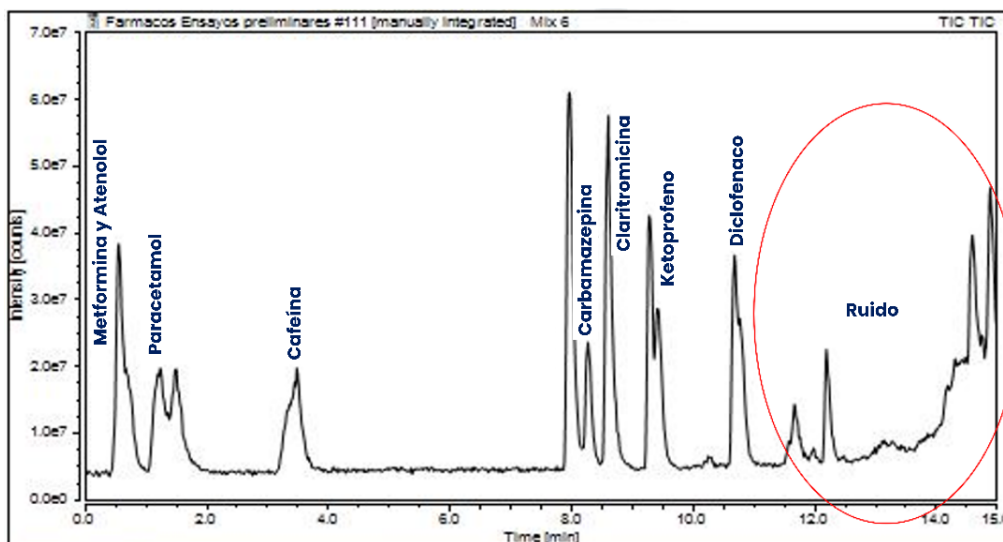


Figura 15: Elución en modo positivo con 90% de ácido fórmica al 0,1% y 10% metanol.

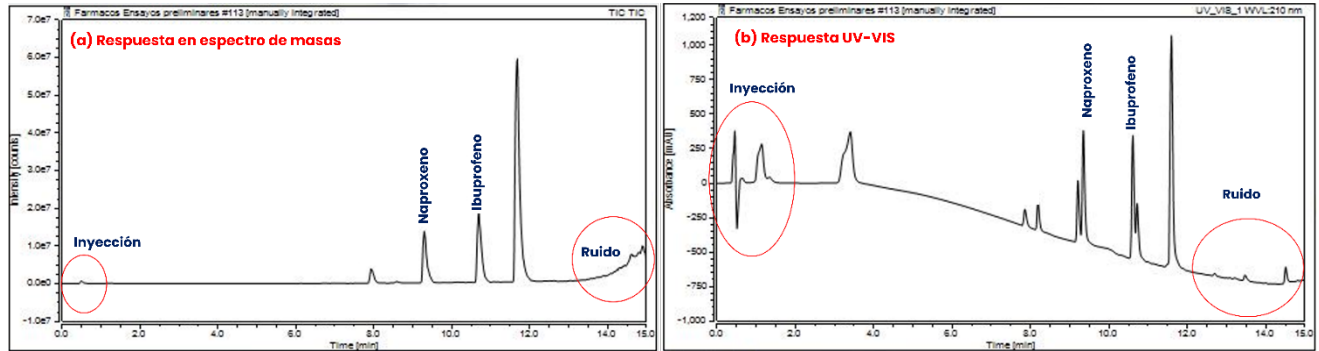


Figura 16: Elución en modo negativo con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de metanol.

Tabla 12: parámetros iniciales con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de metanol.

Fármaco	Ionización	Peso Molecular (Da)	Ion molecular	Tiempo de retención (min)
Metformina	+	129,15	130,19	0,54
Atenolol	+	266,34	267,24	0,54
Paracetamol	+	151,16	152,12	1,24
Cafeína	+	194,19	195,15	3,49
Carbamazepina	+	236,27	237,16	8,28
Claritromicina	+	747,95	748,58	8,61
Ketoprofeno	+	254,3	255,15	9,3
Diclofenaco	+	296,15	296,10	10,68
Naproxeno	-	230,3	275,19	9,32
Ibuprofeno	-	206,28	265,20	10,70

Condiciones de operación: 40°C y, 3,5 kV positivo y 2,5 kV negativo.
 Gradiente: 90% D y 10% de B hasta 1 min, disminuyendo a 80% de D a 1,1 min; condición mantenida hasta 2 min; para posteriormente tener 40% de D a 6 min, 100% de B a 12 min y 90% de D a 15 min.

El cambio a una fase móvil con metanol demostró mejoras significativas en la selectividad, donde la mayoría de los compuestos con ionización positiva mostraron picos discretos, bien resueltos y con formas aceptables (simétricas o ligeramente asimétricas).

A pesar de lo anterior, la separación de metformina y atenolol continuó siendo el principal desafío. La señal inicial se manifiesta como un pico único no resuelto, con solo una ligera indicación de hombro o base expandida para el atenolol. Esta resolución basal insuficiente impide la integración y cuantificación individual de ambos compuestos.

Se observó un deterioro de la línea base (ruido) en la elución tardía, manifestado como una "joroba" o picos anchos. Esto indica una posible contaminación del sistema o la elución tardía



y fuerte retención de componentes de la matriz de la muestra; afectando la detección y cuantificación fiable de analitos como naproxeno e ibuprofeno, a pesar de que su presencia fue confirmada en inyecciones individuales.

Finalmente, a partir de la respuesta generada por la espectrometría de masas, el ion molecular detectado para la mayoría de los compuestos positivos se mantuvo en concordancia con sus pesos moleculares y parámetros de la fase móvil anterior; no obstante, las masas identificadas para naproxeno e ibuprofeno nuevamente no concordaron con sus pesos moleculares, un fenómeno atribuido a la interacción con el ácido fórmico. A pesar de esto, se mantuvo la capacidad de identificación cualitativa de estos dos compuestos mediante el sistema de arreglo de diodos UV-Visible del UHPLC.

Según los resultados expuestos, se determinó que la fase móvil de 90% ácido fórmico al 0,1% y 10% metanol será la utilizada para la identificación de los fármacos en modo positivo debido a que el metanol, al ser más polar que el acetonitrilo y con mayor capacidad de formación de puentes de hidrógeno, permite una modulación más fina en la retención y posterior resolución al interactuar de manera distinta con los grupos funcionales ionizables de los analitos y la fase estacionaria. El cambio contribuyó a un menor ruido en la respuesta del cromatograma (excepto en elución tardía), lo que posibilita la obtención de límites de detección más bajos y cercanos a los ng/L (rango esperado en la literatura).

Dado que la coelución de metformina y atenolol persistió a pesar de la optimización de la fase móvil, se procedió a evaluar otros parámetros operacionales para la optimización del método.

Se inició la evaluación de la temperatura de la columna y la energía de ionización, buscando el impacto en la separación. Los resultados comparativos en la respuesta cromatográfica para la temperatura se visualizan en la Figura 17.

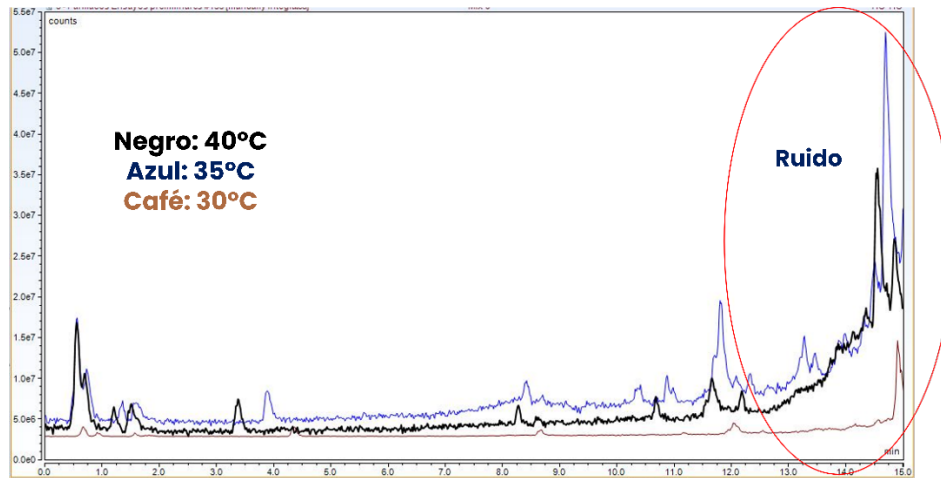


Figura 17: Respuesta cromatográfica en separación de fármacos con variación temperatura.

Manteniendo constantes la fase móvil, el gradiente y la energía de ionización, la evaluación de la temperatura de la columna a 30, 35 y 40°C se centró en lograr el mejor balance entre la eficiencia cromatográfica, la minimización del ruido de fondo y los tiempos de retención.

Se observa que la respuesta a 30°C presenta la línea base más limpia al mitigar la pérdida de material de la fase estacionaria y la elución de impurezas termolábiles; sin embargo, posee tiempos de retención más largos para todos los analitos. Por su parte, a 40°C se podría obtener tiempos de retención más cortos, pero con un nivel de ruido significativamente más altos, afectando la detección a baja concentración. Por tanto, se determinó que 35°C ofrece la mejor respuesta global para el método analítico, ya que genera un ruido menor respecto a los 40°C, mejorando la cinética de transferencia de masa; además de disminuir los tiempos de retención respecto a los 30°C.

La selección de 35°C ofrece ventajas analíticas con un nivel de ruido lo suficientemente bajo para ser aceptable en la detección de picos de baja concentración, permitiendo lograr límites de detección más pequeños. Si comparamos la correlación de la señal/ruido con la concentración detectada de cada analito, notamos que la temperatura de 35°C ofrece la alternativa con mejor balance ya que el ruido no alcanza a afectar la detección de la señal de cada analito.

Igualmente, a 35°C se mejora la cinética de transferencia de masa de los analitos, lo que se traduce en picos más estrechos y eficientes que facilitan la integración y posterior



cuantificación precisa del área bajo la curva; bajo una disminución de los tiempos de retención para todos los analitos sin comprometer significativamente la calidad de la señal.

Una vez definida la temperatura a utilizar, se evaluaron energías que fueran entre 3,0-5,0 kV, ilustrando la comparativa en la Figura 18.

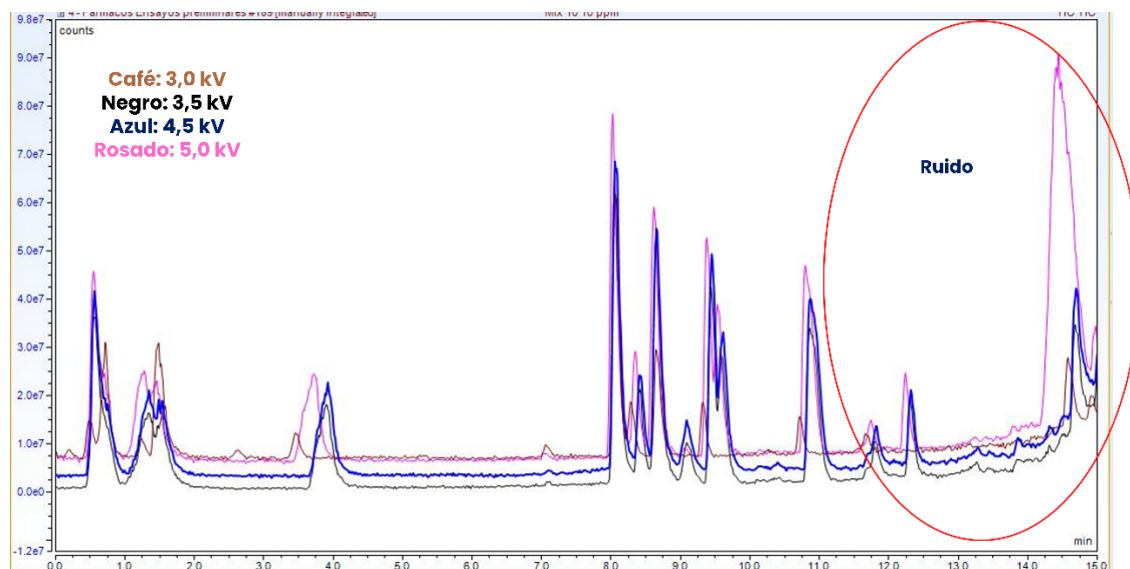


Figura 18: Respuesta cromatográfica con variación de energía en ionización positiva.

La evaluación de la energía de la fuente para la detección en modo de ionización positiva determinó que 3,0 kV establece el equilibrio óptimo para la eficiencia de ionización y la estabilidad del *spray* ESI. Este voltaje proporciona la mejor relación de señal/ ruido, siendo el parámetro fundamental para la sensibilidad y robustez de un método LC-MS. La línea de base es baja y el ruido en la zona final (círculo rojo) es mínimo en comparación con los voltajes más altos.

Aunque voltajes más altos como 5 kV pueden generar una mayor intensidad absoluta de iones para los analitos, el incremento desproporcionado del ruido de fondo a esos voltajes compromete la capacidad de cuantificar compuestos a bajas concentraciones; por ende, a 3,0 kV se maximiza la estabilidad de la línea base, se minimiza el ruido químico y el proceso de *electrospray* es más estable y reproducible; proporcionando un método con mayor fiabilidad y menores límites de detección y cuantificación.

Ya establecidos los parámetros de temperatura, gradiente y energía de fuente para el modo



positivo, se procedió a optimizar la detección de los compuestos con respuesta en modo negativo.

Se identificó que el ácido fórmico generaba una interferencia significativa en la detección de los iones moleculares de naproxeno e ibuprofeno. El pH ácido de la fase móvil suprime la ionización de estos ácidos débiles en el modo ESI, dificultando la formación del anión deseado y la detección en el MS. Para mitigar esta interferencia, se empleó una nueva fase móvil compuesta por 90% agua y 10% metanol.

Mediante esta nueva composición se logró la identificación exitosa de naproxeno e ibuprofeno a través de sus iones característicos, los cuales concordaron con sus pesos moleculares tabulados en la Tabla 13. El orden de elución de estos analitos se presenta gráficamente en la Figura 19.

Tabla 13: Elución compuestos negativos con 90% de agua y 10% de metanol.

Fármaco	Ionización	Peso Molecular (Da)	Ion molecular	Tiempo de retención (min)
Naproxeno	-	230,3	229,13	10,85
Ibuprofeno	-	206,28	205,03	12,41

Condiciones de operación: 35°C y, 3,0 kV positivo y 2,0 kV negativo.
Gradiente: 90% A y 10% de B hasta 1 min, disminuyendo a 80% de A a 1,1 min; condición mantenida hasta 2 min; para posteriormente tener 40% de A a 6 min, 100% de B a 12 min y 90% de A a 15 min.

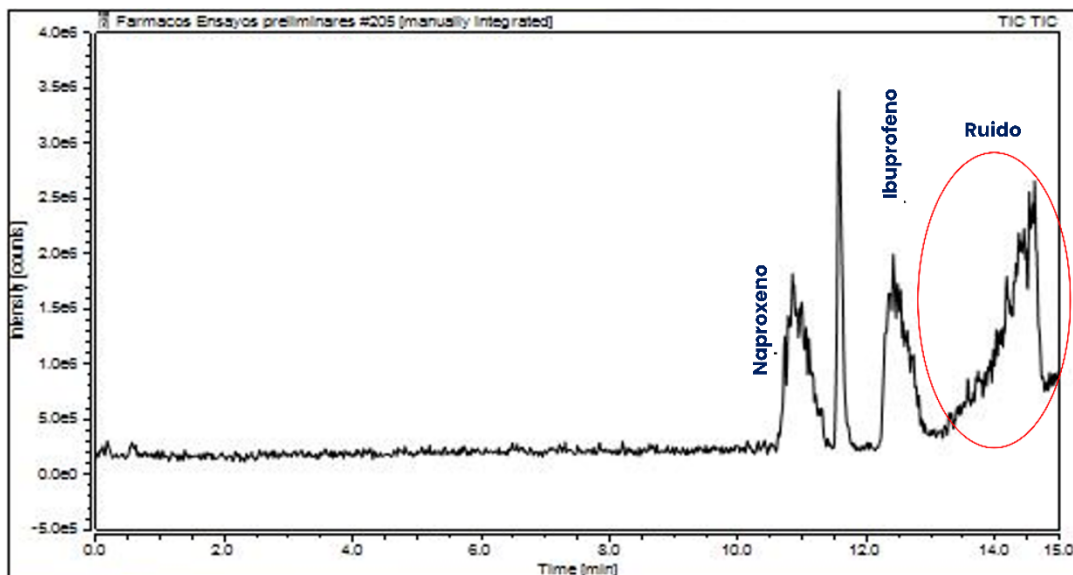


Figura 19: Respuesta cromatográfica en modo negativo con 90% de agua y 10% de metanol.

Se encontraron iones moleculares consecuentes con sus pesos moleculares esperados, observando variaciones en los tiempos de retención de estos compuestos; un efecto directo del cambio a la nueva fase móvil. Dado que naproxeno e ibuprofeno son ácidos carboxílicos débiles y relativamente lipofílicos; la fase móvil, al contener un 90% de agua (altamente polar), induce una retención alta en la columna cromatográfica de fase reversa.

Aunque se incrementa la retención, se visualizan ventajas significativas para la detección por MS debido a su compatibilidad con el proceso de *electrospray* y su potencial para minimizar el ruido de fondo. Esto permite una detección sensible, siempre que el pH de la fase móvil sea el adecuado para la formación del ion deseado ($[M-H]^-$ en modo negativo).

Para verificar la reproducibilidad y fiabilidad de la detección por UHPLC-MS se procedió a repetir la experimentación para la detección de naproxeno e ibuprofeno en triplicado. Los cromatogramas resultantes se visualizan en la Figura 20.

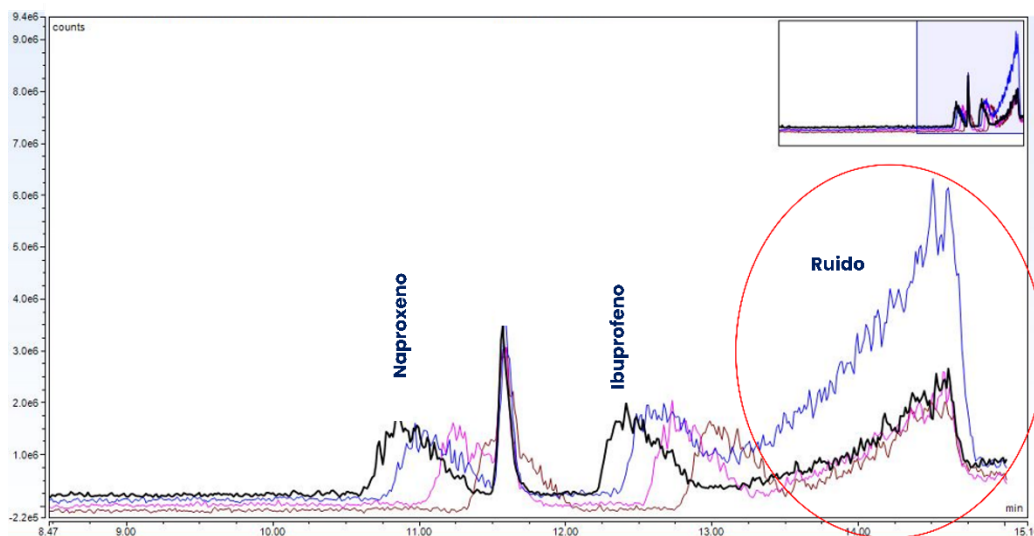


Figura 20: Respuesta cromatográfica en modo negativo con 90% de agua y 10% de metanol.

La verificación en triplicado de la detección de naproxeno e ibuprofeno confirmó la alta resolución alcanzada bajo las condiciones de fase móvil 90% agua y 10% metanol, demostrando la eficacia de la separación. Sin embargo, reveló una falta de robustez en el método con un marcado desplazamiento (*drift*) en los tiempos de retención, indicando una falta de reproducibilidad.

El naproxeno presentó un rango de elución de 10,85 a 11,59 minutos y el ibuprofeno de 12,41 a 13,24 minutos. Esta variación de aproximadamente 1 minuto se atribuye a una posible evaporación del solvente orgánico (metanol) a lo largo del tiempo y/o ligeros cambios en el pH que alteran la ionización de los ácidos débiles y, por ende, su patrón de retención.

A consecuencia de esta inestabilidad, no fue factible evaluar los límites de detección y cuantificación de naproxeno e ibuprofeno en una muestra compleja debido a la ausencia de un tiempo de elución suficientemente característico y reproducible que garantice la detección exclusiva de cada analito, comprometiendo la fiabilidad cuantitativa. En consecuencia, para solucionar la falta de robustez, se procedió a realizar un último cambio de fase móvil, optando por una mezcla de 25% de acetonitrilo y 75% de agua.

Este ajuste condujo a los resultados ilustrados en la Tabla 14 y Figura 21, donde se establecieron las condiciones definitivas para la cuantificación en modo negativo.



Tabla 14: Variación de condiciones con 25% de agua y 75% de acetonitrilo.

Fármaco	Ionización	Peso Molecular (Da)	Ion molecular	Tiempo de retención (min)
Naproxeno	-	230,3	229,11	4,68
Ibuprofeno	-	206,28	205,13	5,97

Condiciones de operación: 30°C y, 4,0 kV negativo.
Gradiente: 75% A y 25% de C hasta 1 min, disminuyendo a 5% de A a 5 min; condición mantenida hasta 9 min; para posteriormente tener 75% de A a 9,2 min, hasta a 15 min.

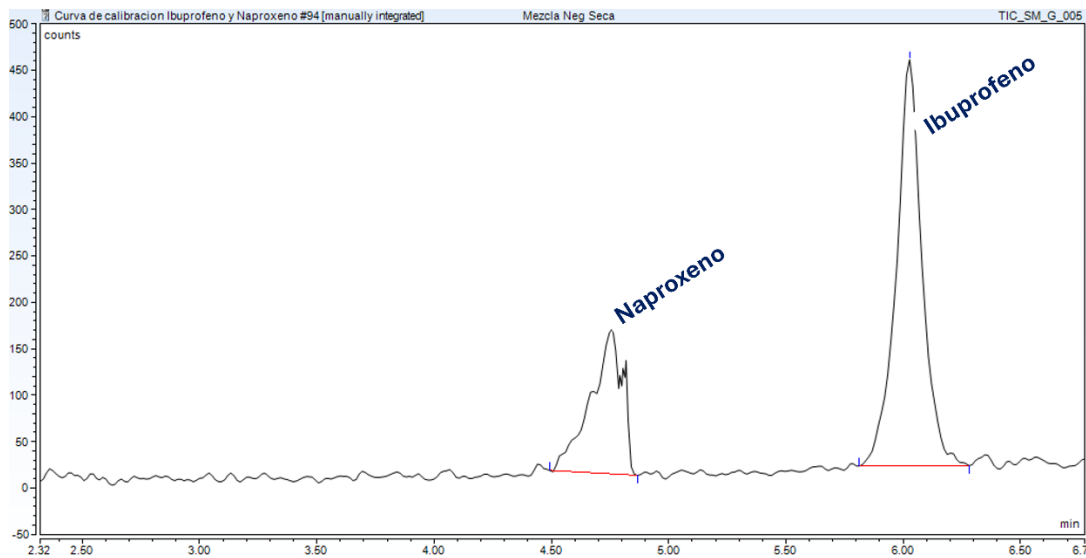


Figura 21: Respuesta cromatográfica en modo negativo con 25% de agua y 75% de acetonitrilo.

Los analitos lipofílicos (naproxeno e ibuprofeno) experimentaron una fuerte interacción hidrofóbica con la fase estacionaria, resultando en una alta retención. Se visualiza una buena resolución cromatográfica donde los picos están completamente separados hasta la línea base, permitiendo la integración y cuantificación individual.

Análogo a la situación con modo de ionización positiva, se evaluó la respuesta de la matriz bajo distintas condiciones de temperatura, teniendo la Figura 22 ilustrada a continuación.

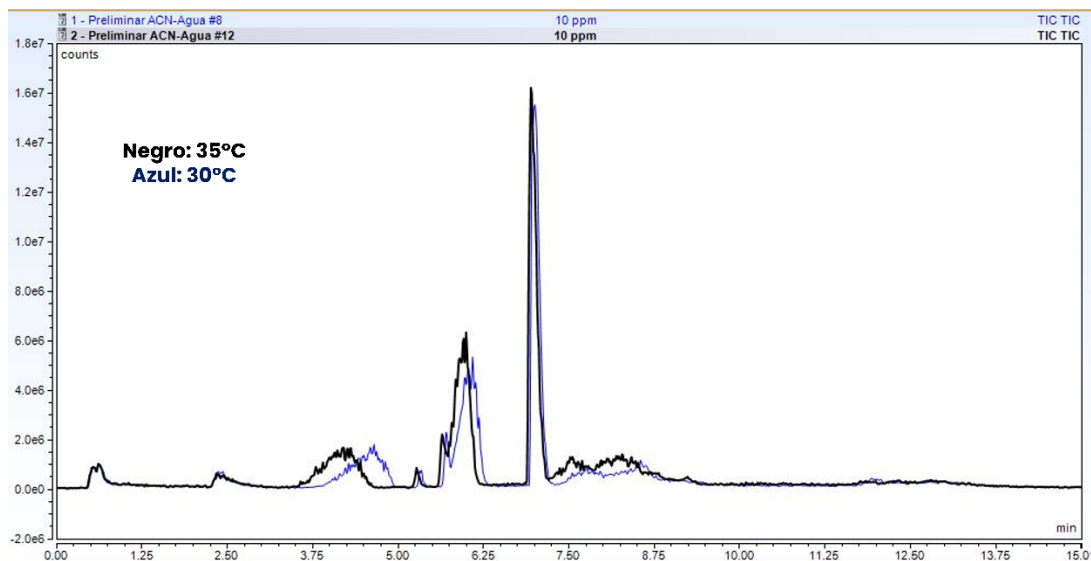


Figura 22: Respuesta con cambio de temperatura en modo negativo con 25% de agua y 75% de acetonitrilo.

Al comparar las respuestas cromatográficas se determinó que 30°C es la temperatura de operación más adecuada para la columna, a pesar de que 35°C ofrece tiempos de retención marginalmente menores. La principal ventaja de operar a 30°C es la mayor estabilidad de la línea base, lo que resulta en una maximización de la relación señal/ruido al minimizar la interferencia química de fondo. Además, se destaca que el uso de 35°C genera un desplazamiento en el primer pico detectado correspondiente a naproxeno, lo que dificulta su posterior detección al requerir una ventana mayor para el tiempo de retención.

Una menor temperatura contribuye a una mayor estabilidad general de las interacciones cromatográficas, reduciendo fluctuaciones sutiles en la afinidad de los analitos por la fase estacionaria. Esto ayuda a mitigar variaciones en los tiempos de retención y en la forma del pico. Dado que la diferencia en la respuesta cromatográfica entre 30 y 35°C no es significativa, se opta por 30°C como mejor alternativa para reducir el tiempo implementado en la puesta en marcha y estabilización del equipo, mejorando la eficiencia del laboratorio.

Con las condiciones de separación cromatográfica ya establecidas, se procedió a la optimización de la energía de fuente implementada para la detección en modo de ionización negativa. La respuesta del cromatograma a diferentes energías se presenta en la Figura 23.

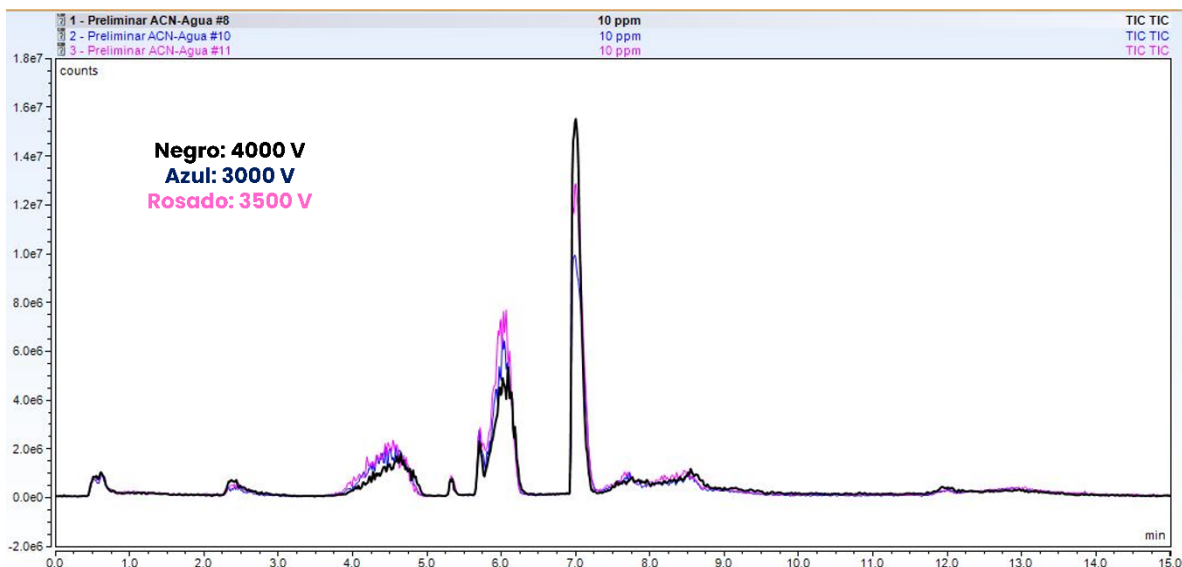


Figura 23: Respuesta con cambio de energía de fuente en modo negativo con 25% de agua y 75% de acetonitrilo.

Al comparar los resultados obtenidos se determinó que 4.000 V es la condición óptima ya que permite maximizar la intensidad de señal para los analitos de interés (naproxeno e ibuprofeno) sin agregar ruido significativo a la línea base. Dado que la relación de señal/ruido es el parámetro más crítico en LC-MS, esta condición mejora directamente la capacidad del método para detectar y cuantificar analitos a bajas concentraciones.

La optimización resulta en una mejora de los límites de detección y cuantificación, garantizando una mayor robustez del método de detección sin introducir inestabilidades significativas en el proceso de electrospray. Los 3.000 V ilustraron las intensidades de pico más bajas, indicando que el voltaje se encontraba por debajo del punto óptimo para la eficiencia de ionización y la formación de iones en fase gaseosa en ESI.

La creación y validación de una técnica cromatográfica para la separación de fármacos en mezclas complejas es un proceso inherentemente iterativo que requiere de experimentación, prueba, error y un tiempo considerable de trabajo.

5.2 Problemas de repetibilidad y reproducibilidad del método.

Durante el desarrollo la técnica se enfrentaron múltiples desafíos técnicos. A continuación, se detallan los principales problemas observados durante la optimización del método:



1. Inestabilidad y variabilidad.

La necesidad de identificar y cuantificar analitos en concentraciones extremadamente bajas de ng/L o µg/L hizo que el método fuera sensible a cualquier fluctuación en la preparación y composición de la fase móvil:

- **Fuentes de variabilidad:** pequeñas diferencias en el pesaje o volumen de los componentes, variaciones de temperatura ambiental, presencia de burbujas de aire, impurezas en los solventes y la evaporación de componentes volátiles comprometieron la estabilidad de la fase móvil a largo plazo.

Esta variabilidad dificultó el mantenimiento de resultados consistentes (tiempos de retención, áreas de pico y resolución) tanto en términos de repetibilidad (mismo analista, mismo día) como de reproducibilidad (diferentes analistas, diferentes días).

- **Contaminación de la columna:** la presencia de contaminantes (como impurezas de la fase móvil, material de la muestra, o residuos de inyecciones anteriores) genera iones no deseados que llegan al espectrómetro de masas. Esto se traduce en un aumento del ruido de fondo y una disminución de la relación señal-ruido. Si la señal del fármaco es baja, la contaminación puede hacer que la señal del analito sea indistinguible del ruido, lo que lleva a un incremento en los límites de detección y cuantificación.

Sumado a lo anterior, los contaminantes pueden adsorberse a la fase estacionaria de la columna, alterando las propiedades superficiales de la columna. Esto provoca cambios o inestabilidad en el tiempo de retención del fármaco, dificultando su identificación confiable, tal como se demostró anteriormente en el desarrollo del método analítico.

Por último, la acumulación de impurezas puede causar ensanchamiento (ancho de pico) o colapso de picos. Una mala forma del pico dificulta la integración y, por lo tanto, la cuantificación, además de indicar una separación deficiente.

- **Problemas adicionales:** se sumó la degradación de los analitos y la tasa de error intrínseca de los equipos.



2. Inconsistencias en la elución y falta de robustez temporal.

- **Contaminación cruzada:** si los contaminantes (o el propio analito de una muestra concentrada) se adhieren a la columna y se liberan lentamente en inyecciones posteriores, pueden aparecer como una señal fantasma en blancos o muestras de baja concentración, disminuyendo la precisión de la cuantificación de estas muestras.

A pesar de usar los mismos parámetros operacionales, se observaron inconsistencias notables en la elución de los fármacos a lo largo de diferentes fechas de análisis.

Los tiempos de retención y la forma de los picos se desplazaron o alteraron significativamente entre corridas. Este fenómeno puede ser atribuido al deterioro gradual o contaminación de la columna, la acumulación de contaminantes dentro del sistema cromatográfico o cambios no controlados en las condiciones ambientales; generando la necesidad constante de realizar ajustes en el sistema o recalibraciones para mantener la validez del método.

3. Dificultades en la separación multicomponente (coelución).

El desarrollo del método fue desafiado por la dificultad para alcanzar una resolución adecuada entre todos los componentes, lo que resultó en picos solapados (coelución).

La fase estacionaria y la fase móvil seleccionadas carecían de la capacidad de interactuar diferencialmente con todos los analitos de propiedades fisicoquímicas similares, impidiendo su separación efectiva bajo una única condición.

4. Alteración química y factores ambientales externos.

Se identificaron factores que comprometieron la integridad de los analitos y la estabilidad:

- **Degradación del analito:** se observó la potencial alteración química de los fármacos (o sus metabolitos) durante el proceso analítico (en muestra, fase móvil, o columna) por inestabilidad inherente (sensibilidad a la luz, oxígeno, termo-degradación) o hidrólisis causada por pH extremos de la fase móvil. Esto puede generar degradación (nuevos picos) o disminución de la señal del analito original.



- **Influencia externa:** factores ambientales no controlados en el laboratorio, como la temperatura ambiente o la humedad, afectaron la temperatura de la fase móvil antes de entrar al horno de columna. Estas fluctuaciones influyeron en la eficiencia de la separación y el detector, causando variaciones sutiles en los tiempos de retención y la señal.

5. Efecto matriz: es uno de los desafíos más críticos en el desarrollo de la metodología presentada, ya que los componentes de la matriz compitieron con los fármacos por la carga eléctrica o el espacio en la superficie de las gotas del aerosol en la fuente de electropulverización (ESI), provocando que la señal de los analitos fuese mucho más bajas de lo esperado, elevando artificialmente los límites de detección. De igual modo, debido al extenso tiempo de experimentación y la cantidad de inyecciones realizadas, la matriz acumulada en la columna pudo eluir en corridas posteriores, generando picos que no corresponden a la muestra actual. Para mitigar estos problemas, la técnica requirió del uso de gradientes que alcanzan el 100% de fase orgánica (B o C) al final de la corrida con el fin de asegurar que los componentes más retenidos de la matriz sean expulsados de la columna antes de la siguiente inyección; complementado con limpiezas recurrentes del equipo.

6. Cambio en las condiciones de las metodologías referencias en Anexo A.

El desarrollo del método optimizado representa un desafío analítico significativo frente a las metodologías preexistentes debido a la heterogeneidad química de los fármacos analizados.

- **Temperatura:** a diferencia de estudios como los de Albergamo *et al.*, 2018; Wilkinson *et al.*, 2022 y Angeles *et al.*, 2023, que estandarizan la temperatura de columna a 40°C para mejorar la transferencia de masa y reducir la viscosidad, el método propuesto identifica que temperaturas ligeramente inferiores son críticas para preservar la resolución de analitos que eluyen tempranamente, como metformina y atenolol.
- **Separación y selectividad:** la principal dificultad radica en la coexistencia de compuestos con polaridades extremas y comportamientos de ionización opuestos, ya que mientras que métodos como el de Ashfaq *et al.*, 2017 o Archana *et al.*, 2017 utilizan eluciones isocráticas simples, la técnica desarrollada requiere un gradiente complejo que alterna entre ácido fórmico y metanol para el modo positivo, permitiendo separar la



carbamazepina de la claritromicina en una misma corrida. Sumado a ello, a diferencia de Sun *et al.*, 2015 y Alygizakis *et al.*, 2020 que dependen fuertemente del acetonitrilo para la elución de compuestos neutros, este método integra ácido fórmico y metanol de manera estratégica para maximizar la intensidad de señal de analitos difíciles como el ketoprofeno y diclofenaco.

- **Voltaje de fuente:** el uso de 3,0 kV en modo positivo contrasta con los 4,5 kV sugeridos por Grujić *et al.*, 2009 o Jacob *et al.*, 2021 ya que dispara el ruido químico al final de la corrida para la ionización positiva, comprometiendo la detección de compuestos como claritromicina y diclofenaco. Por otro lado, para el modo negativo, en contraste con Matuszak *et al.*, 2016, quienes utilizan solo 2,0 kV, se plantea la necesidad de subir a 4,0 kV por la baja eficiencia de ionización intrínseca del naproxeno e ibuprofeno. Además, el uso de 2,0 kV podría limitar la detección de concentraciones bajas si el analito no se ioniza eficientemente.
- **Desarrollo de técnica:** el desarrollo enfrentó obstáculos críticos que no se detallan en métodos simplificados como el de Guan *et al.*, 2016 o Tiong *et al.*, 2020, donde al trabajar con fases móviles de agua y metanol, se debe equilibrar la fuerza eluyente para evitar que las sales de la muestra en aguas residuales eluyan junto con los primeros fármacos, apagando su señal.
- **Heterogeneidad de los analitos:** la técnica debe procesar una ventana de pesos moleculares sumamente amplia, desde la metformina (129,15 Da) hasta la claritromicina (747,95 Da); por lo cual, la decisión de operar a 35°C y 3,0 kV para el modo positivo, y 30°C con 4,0 kV para el negativo, rompe con la tendencia de "método único" observada en la literatura.
- **Limitaciones de técnicas analíticas presentadas:** desarrollar esta técnica a partir de los métodos de Castiglioni *et al.*, 2018 o Hermes *et al.*, 2018 presenta como dificultad el efecto matriz, teniendo que, en las muestras reales de agua residual, la alta concentración de sales y materia orgánica compite por la carga en la fuente ESI. El método optimizado mitiga esto mediante un reequilibrio final, limpiando la columna para la siguiente inyección.

Desarrollar esta técnica a partir de los métodos mencionados fue una tarea de "micro-ajuste".



5.3 Selección de condición final de operación en la separación.

A partir del proceso de optimización que incluyó la evaluación de fases móviles, temperatura de columna y energía de fuente, se lograron establecer dos metodologías analíticas distintas: una en modo positivo y otra en modo negativo. Esta segregación fue necesaria para maximizar la sensibilidad y selectividad en función de la naturaleza iónica de los medicamentos. Los parámetros encontrados se detallan a continuación.

El método se desarrolló utilizando una columna de UHPLC de 50 cm de longitud, 2,1 mm de diámetro y 1,7 μm de tamaño de partícula. Estas dimensiones confieren una alta eficiencia y resolución al sistema al facilitar un flujo uniforme, minimizar los caminos múltiples y maximizar el número de sitios de intercambio analito/fase, promoviendo el equilibrio de reparto de los analitos presentes en la muestra.

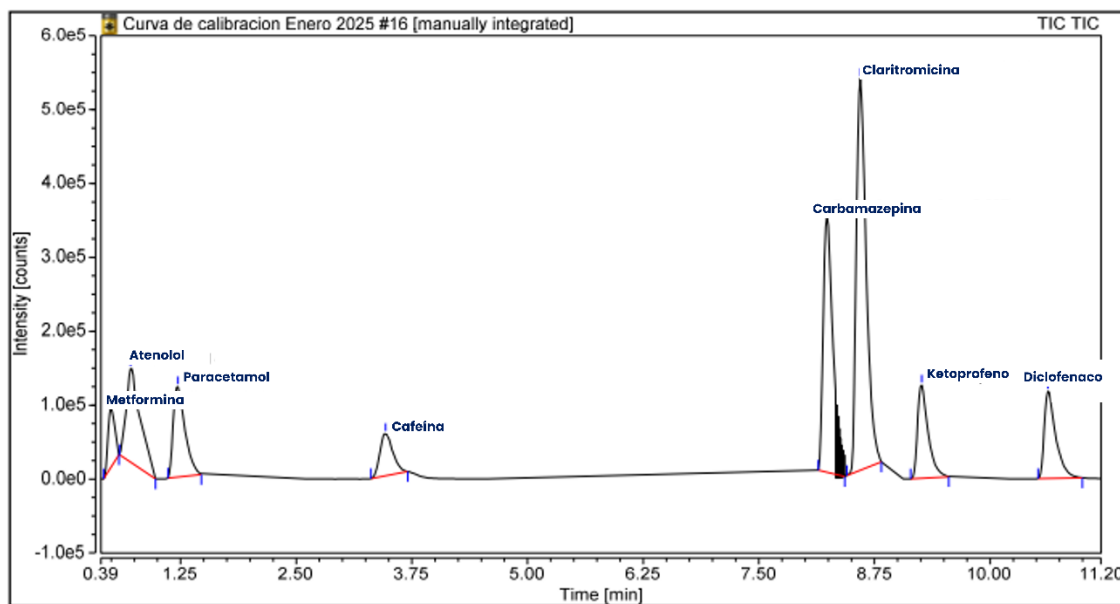


Figura 24: Respuesta en modo positivo con separación optimizada.



Tabla 15: Elución compuestos farmacológicos positivos con condición final.

Fármaco	Ionización	Peso Molecular (Da)	Ion molecular	Tiempo de retención (min)
Metformina	+	129,15	130,18	0,49
Atenolol	+	266,34	267,23	0,67
Paracetamol	+	151,16	152,14	1,23
Cafeína	+	194,19	195,16	3,6
Carbamazepina	+	236,27	237,17	8,28
Claritromicina	+	747,95	748,61	8,58
Ketoprofeno	+	254,3	255,16	9,31
Diclofenaco	+	296,15	296,10	10,71
Naproxeno	-	230,4	229,11	3,57
Ibuprofeno	-	206,38	205,13	5,78

Condiciones de operación: 35°C y 3,0 kV positivo. 30°C y 4,0 kV negativo.
 Gradiente positivo: 90% D y 10% de B hasta 1 min, disminuyendo a 80% de D a 1,1 min; condición mantenida hasta 2 min; para posteriormente tener 40% de D a 6 min, 100% de B a 12 min y 90% de D a 15 min.
 Gradiente negativo: 25% C y 75% de A hasta 1 min, aumentando a 95% de C a 5 min; condición mantenida hasta 9 min; para posteriormente tener 25% de C a 9,2 min, hasta 15 min.

Si evaluamos la respuesta entregada para el modo de ionización positiva, se tiene una metodología con una alta capacidad de separación para la mayoría de los componentes de la mezcla, alcanzando una resolución satisfactoria. El único desafío persistente es la coelución de metformina y atenolol, en la cual se logró la separación; pero, la resolución basal sigue siendo insuficiente para una cuantificación individual satisfactoria.

Los picos presentan formas agudas, estrechas y de simetría resolutive, características que indican una alta eficiencia cromatográfica que permite una integración de área más fiable y una mejor resolución de picos adyacentes bajo una cuantificación precisa.

Por su parte, la ausencia de ruido y la estabilidad de la línea base representan un logro metodológico crucial, mejorando significativamente la relación señal/ruido y reduciendo problemas como: degradación y contaminación de la columna, impurezas en la fase móvil o los efectos de la matriz en eluciones tardías.

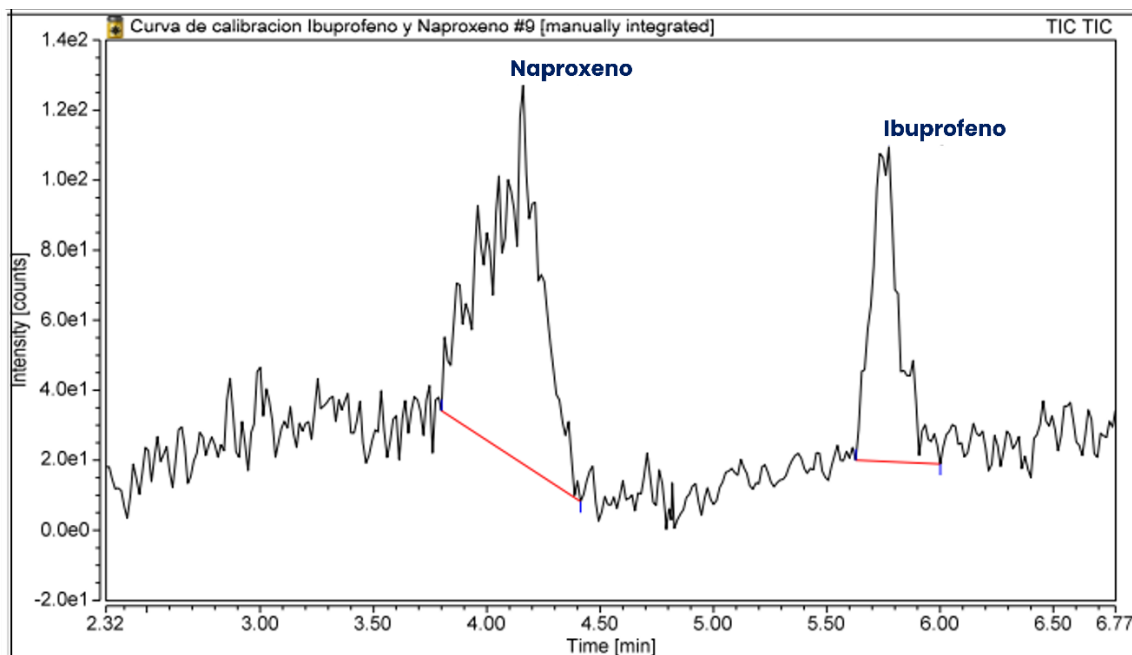


Figura 25: Respuesta en modo negativo con separación optimizada.

Se observa una clara resolución basal de naproxeno e ibuprofeno, demostrando la capacidad del método para separar estos dos compuestos de estructura química similar. No obstante, los picos, aunque resueltos, presentan una forma relativamente ancha y algo asimétrica, con una base dispersa; sugiriendo una eficiencia de columna mejorable o la existencia de interacciones secundarias no deseadas con la fase estacionaria; pudiendo afectar la precisión de la integración de área.

La línea base es ruidosa y elevada, especialmente antes y entre los picos. Este alto nivel de ruido de fondo compromete la sensibilidad para estos analitos. Una baja relación dificulta la determinación precisa de los límites de detección y cuantificación, pudiendo resultar en valores que superen las concentraciones encontradas típicamente en aguas residuales.

Los resultados demuestran un progreso sustancial al establecer dos metodologías cromatográficas específicas. Mientras que el método general para la mayoría de los fármacos ha alcanzado un nivel de madurez y calidad cromatográfica notable (excelente separación y línea base); la metodología para naproxeno e ibuprofeno, a pesar de lograr la separación, aún puede seguir mejorando para alcanzar una mayor sensibilidad y reducción del ruido.



5.4 Iones característicos de analitos farmacéuticos seleccionados por MS.

Para determinar el ion precursor de cada compuesto se empleó el método de Monitoreo de Iones Seleccionados (SIM). Este método requirió establecer el tiempo de retención característico del analito, una ventana de tiempo definida, el centro de masa del ion molecular identificado y una ventana de escaneo de la relación masa/carga (m/z). Tras la detección individual de cada analito, se definieron dos secuencias de SIM separadas: una para el modo de ionización positiva y otra para el modo de ionización negativa. La Tabla 16 muestra las condiciones específicas de cada secuencia SIM y los iones resultantes.

Tabla 16: Parámetros dispuestos en SIM.

Fármaco	Tiempo de retención (min)	Ventana de tiempo (min)	Centro de masa (m/z)	Ventana de escaneo (m/z)	Ion precursor
Modo de ionización positiva					
Metformina	0,49	0,2	130,18	10	130,18
Atenolol	0,67	0,2	267,23	10	267,23
Paracetamol	1,23	0,5	152,14	10	152,13
Cafeína	3,6	2,0	195,15	10	195,15
Carbamazepina	8,28	0,3	237,17	10	237,17
Claritromicina	8,58	0,5	748,62	10	748,60
Ketoprofeno	9,31	0,5	255,16	10	255,16
Diclofenaco	10,71	1,0	296,1	10	296,08
Modo de ionización negativa					
Naproxeno	3,57	2,5	229,17	10	229,11
Ibuprofeno	5,78	2,0	205,18	10	205,13

Tras establecer los iones moleculares de cada compuesto, se determinaron sus iones producto mediante un barrido de iones con el método Product Ion Scan. Este proceso utilizó el sistema de triple cuadrupolo (Q1: barrido de iones; Q2: fragmentación; Q3: análisis de iones) para identificar los iones característicos de cuantificación y confirmación. Se optimizó la energía de colisión (CE) de fragmentación aplicada en Q2, variándola según lo descrito en el Anexo C; encontrando la condición óptima en la Tabla 17.



Tabla 17: Parámetros dados por Product Ion Scan.

Fármaco	Energía de colisión (V)	Ion de cuantificación	Ion de confirmación	Parámetros de ion de bibliografía consultada
Modo de ionización positiva				
Metformina	20	71,09	60,09	71,3 /60,3/ 60,1/ 71
Atenolol	22	145,12	190,1	190/ 145/ 145,2/190,2
Paracetamol	20	110,07	93,13	110,1/93,1/93/ 64,8
Cafeína	25	138,11	110,13	137,9/ 110/ 138/138,2/110,2
Carbamazepina	30	194,14	192,12	194,1/192,1/194/ 192/194,3
Claritromicina	25	158,17	590,44	590,4/158,1/158/ 590/158,4
Ketoprofeno	20	209,12	105,08	209/104,9/209,2/ 105,1
Diclofenaco	15	215,08	250,02	214/250
Modo de ionización negativa				
Naproxeno	10	185,1	170,08	184,9/170/153,1/185,1
Ibuprofeno	10	161,1	161,1	161,2/ 161,13/ 162,14

La detección de fármacos por medio de la espectrometría de masas depende de la energía de colisión, el ion de cuantificación y el ion de confirmación de cada analito. Particularmente, la energía de colisión fragmenta el ion precursor en iones producto, lo que afecta directamente la sensibilidad del método (mayor abundancia de iones producto) y la selectividad al generar fragmentos únicos.

El ion de cuantificación es el ion producto más abundante y selectivo elegido para la medición. Es el utilizado en la construcción de las curvas de calibración, permitiendo alcanzar límites de detección y cuantificación bajos cuando existe alta interferencia. En paralelo, el ion de confirmación proporciona evidencia adicional de la identidad del analito; donde al monitorearse junto al ion de cuantificación, aporta fiabilidad cualitativa y reduce los falsos positivos en matrices complejas. Es el encargado de verificar la presencia del analito mediante la concordancia de las relaciones iónicas y los tiempos de retención.

Los iones obtenidos para cada compuesto farmacéutico concuerdan con los parámetros



reportados en investigaciones previas, teniendo que la energía de colisión final seleccionada fue aquella que produjo la mayor señal cromatográfica. De este modo, una vez definido el tiempo de retención, ion precursor, ion de cuantificación e ion de confirmación, se puede establecer la curva de calibración, y con ello, determinar los límites de detección y de cuantificación de cada compuesto para su posterior evaluación en muestras complejas.

5.5 Curvas de calibración de medicamentos.

La calibración se llevó a cabo utilizando el método de Monitoreo de Reacciones Múltiples (SRM). Esta técnica permitió el monitoreo selectivo de cada transición iónica dentro de ventanas de tiempo de retención específicas, registrando la respuesta en el cromatograma mediante un barrido completo en el detector. Las condiciones experimentales se encuentran resumidas en la Tabla 18.

Tabla 18: Parámetros finales por Producto Ion Scan.

Fármaco	Energía de colisión (V)	Ion de cuantificación	Ion de confirmación	Tiempo de retención (min)	Variación en tiempo (min)
Metformina	20	71,09	60,09	0,49	0,2
Atenolol	22	145,12	190,1	0,67	0,2
Paracetamol	20	110,07	93,13	1,23	0,5
Cafeína	25	138,11	110,13	3,6	2,0
Carbamazepina	30	194,14	192,12	8,28	0,3
Claritromicina	25	158,17	590,44	8,58	0,5
Ketoprofeno	20	209,12	105,08	9,31	0,5
Diclofenaco	15	215,08	250,02	10,71	1,0
Naproxeno	10	185,1	170,08	3,57	2,5
Ibuprofeno	10	161,1	161,1	5,78	2,0

Condiciones de operación: 35°C y 3,0 kV positivo. 30°C y 4,0 kV negativo.

Gradiente positivo: 90% D y 10% de B hasta 1 min, disminuyendo a 80% de D a 1,1 min; condición mantenida hasta 2 min; para posteriormente tener 40% de D a 6 min, 100% de B a 12 min y 90% de D a 15 min.

Gradiente negativo: 25% C y 75% de A hasta 1 min, aumentando a 95% de C a 5 min; condición mantenida hasta 9 min; para posteriormente tener 25% de C a 9,2 min, hasta 15 min.

Condiciones SRM: tiempo de ciclo 0,8 s, resolución de 0,7 FWHM en Q₁ y Q₃, CID gas de 2 mTorr, picos cromatográficos de 6 s.



Se realizan curvas de calibración considerando concentraciones entre 8-8.000 ppb presentando la respuesta cromatográfica en modo de ionización positiva y negativa en la Figura 24 y 25, respectivamente.

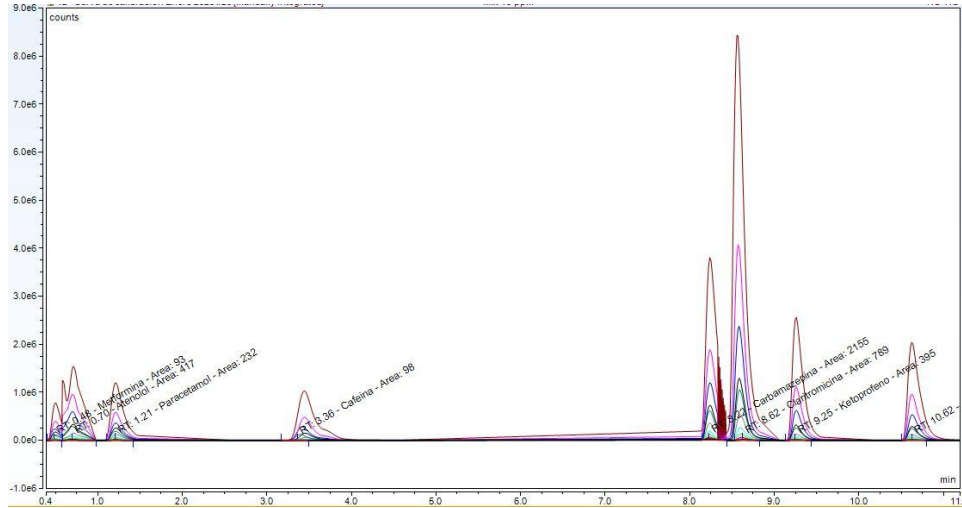


Figura 24: Curva de calibración modo de ionización positiva.

A medida que las concentraciones se incrementan, el área del pico y la altura aumentan progresivamente. Esto es un indicador de que el método está funcionando y tiene una respuesta lineal a lo largo del rango de calibración. Los picos de los analitos clave son estrechos y simétricos, lo que facilita la integración precisa del área y la cuantificación. Además, el nivel de ruido de fondo es muy bajo, lo cual contribuye a una alta relación señal/ruido y a límites de detección (LOD) bajos.

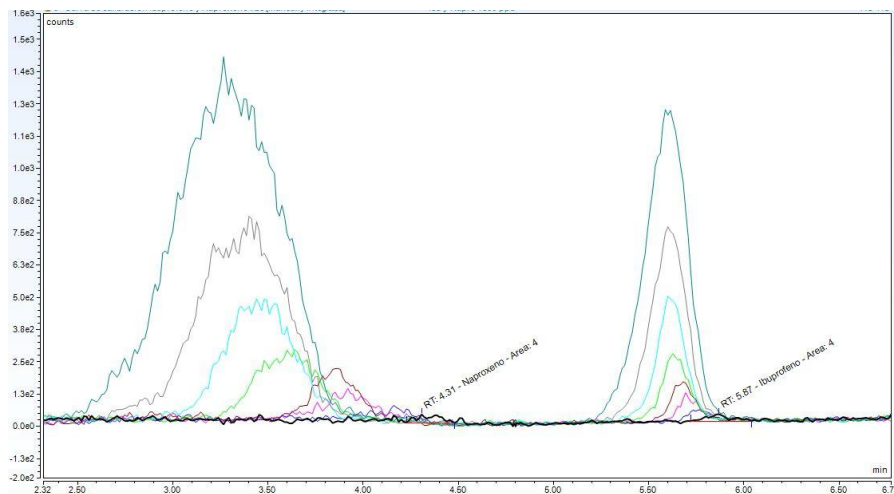


Figura 25: Curva de calibración modo de ionización negativa.

Ambos picos muestran una buena forma cromatográfica, son simétricos y estrechos,



indicando una buena eficiencia de la columna y ausencia de *tailing* significativo.

Al igual que en el modo positivo, se observa una respuesta progresiva de la señal (área/altura) con el aumento de la concentración para ambos fármacos. Esto confirma que tienen un rango de calibración lineal adecuado.

Se observa un grupo de picos anchos e irregulares entre 2,50 y 4,00 minutos en la elución del naproxeno. La forma y la altura de los picos sugieren que podría haber interferentes de matriz o contaminantes coeluyentes que no se separaron adecuadamente en la columna; no obstante, la ventana de tiempo implementada en el naproxeno logra su identificación exitosa en la muestra.

Con el objetivo de descartar una posible contaminación en la columna que pudiera afectar las áreas de los picos de interés, se procedió a inyectar únicamente la fase móvil. El resultado de esta inyección de blanco se presenta en la Figura 26.

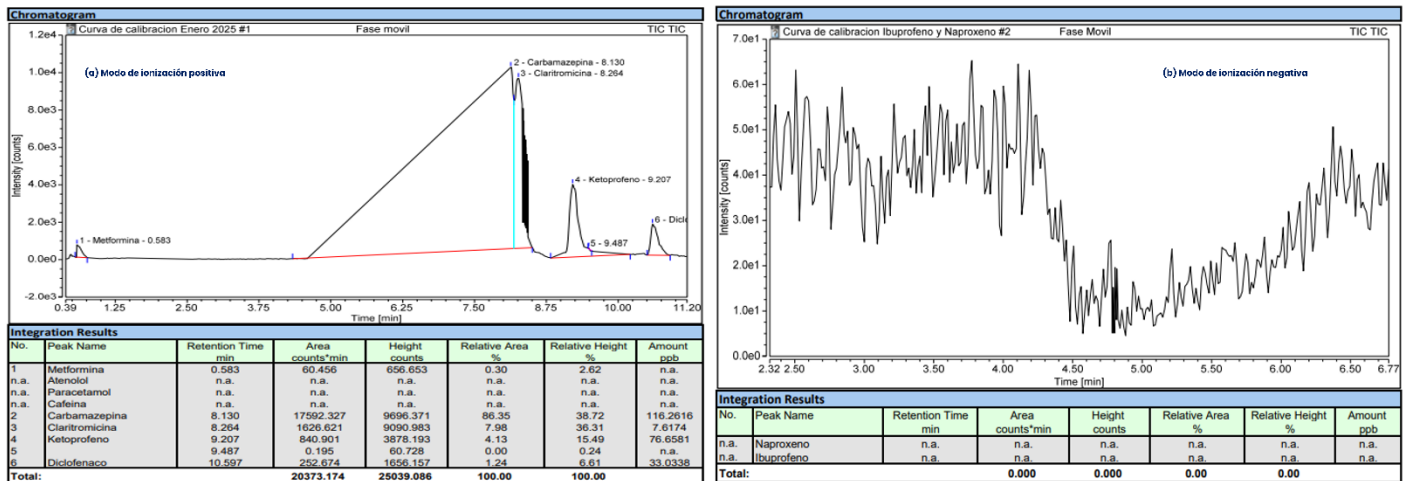


Figura 26: Contaminación de columna para modo positivo (a) y negativo (b).

El análisis del blanco de fase móvil reveló una contaminación basal en la columna con metformina, carbamazepina, claritromicina, ketoprofeno y diclofenaco. Para asegurar la exactitud de la cuantificación, las áreas de estos picos de interferencia deben ser sustraídas de las áreas obtenidas en las curvas de calibración, por tanto, se consideró un rango de calibración que no involucra la contaminación. La Tabla 19 presenta los valores de área de pico que serán utilizados para la corrección de cada analito de interés.



Tabla 19: Valores de contaminación de columna.

Fármaco	Área de pico (cuentas·min)
Metformina	60,456
Carbamazepina	17592,327
Claritromicina	1626,621
Ketoprofeno	840,901
Diclofenaco	252,674

Sucesivamente, se aplicó un análisis de regresión lineal a estos datos con el fin de evaluar la correlación existente entre la concentración del analito y su respuesta del detector. La ecuación de la curva de calibración, su respectivo ajuste y el análisis de datos completo se presentan en la Tabla 20.

Tabla 20: Curva de calibración de medicamentos seleccionados.

Curva de calibración y (área)= m· x(concentración)+n		Coef. (R ²)	Error típico	Fisher (F)	Valor crítico de F	Rango de concentración (ppb)
Metformina bajo	$y = 20,26 \cdot m - 73,40$	0,9989	26,35	7.129,02	4,32E-13	5-100
Metformina alto	$y = 4,76 \cdot m + 5351,15$	0,9806	2.347,14	605,47	1,23E-11	200-10.000
Atenolol bajo	$y = 63,67 \cdot m - 144,87$	0,9948	113,60	1.156,02	4,31E-08	8-64
Atenolol alto	$y = 49,81 \cdot m + 1738,66$	0,9969	1.958,85	3.200,33	7,23E-14	100-2.000
Paracetamol bajo	$y = 45,0 \cdot m - 137,58$	0,9926	279,64	1.348,92	5,33E-12	8-200
Paracetamol alto	$y = 21,76 \cdot m + 10690,7$	0,9937	5.009,41	1.586,67	2,38E-12	400-8.000
Cafeína bajo	$y = 19,26 \cdot m - 77,10$	0,9969	26,54	1.937,16	9,21E-09	8-64
Cafeína alto	$y = 30,70 \cdot m - 6010,5$	0,9930	7.021,72	1.981,29	1,76E-16	100-8.000
Carbamazepina	$y = 59,79 \cdot m + 2274,86$	0,9969	9.429,05	3.812,96	2,15E-16	200-8.000
Claritromicina bajo	$y = 167,7 \cdot m - 3507,22$	0,9959	787,06	1.445,16	2,21E-08	32-200
Claritromicina alto	$y = 148,31 \cdot m + 291,17$	0,9969	23.988,3	3.215,42	7,06E-14	400-8.000
Ketoprofeno bajo	$y = 42,08 \cdot m - 990,14$	0,9933	252,01	887,64	9,48E-08	32-200
Ketoprofeno alto	$y = 45,08 \cdot m - 8075,93$	0,9931	11.004,4	1.444,44	3,79E-12	400-8.000
Diclofenaco bajo	$y = 34,15 \cdot m - 127,46$	0,9956	55,91	1.373,05	2,58E-08	8-64
Diclofenaco alto	$y = 41,87 \cdot m - 2221,41$	0,9958	7.366,30	3.348,61	4,55E-18	100-8.000
Naproxeno baja	$y = 0,63 \cdot m - 4,13$	0,9986	0,92	4.332,41	8,27E-10	10-100
Naproxeno alto	$y = 0,55 \cdot m - 13,87$	0,9977	16,36	2.561,31	3,99E-09	200-1.600
Ibuprofeno baja	$y = 0,26 \cdot m + 1,32$	0,9847	1,26	385,02	1,14E-06	10-100
Ibuprofeno alto	$y = 0,20 \cdot m + 5,24$	0,9999	1,40	46.643,9	6,65E-13	200-1.600

La unidad de “cuentas” implementada en el área es una medida de la intensidad de los *peaks* en el tiempo.

Analizando los datos de la curva de calibración proporcionados, se evalúa la idoneidad del método analítico para la detección de medicamentos en aguas desde una perspectiva técnica,



considerando un intervalo del 95% de confianza:

- **Coefficiente de Determinación (R^2).**

Todos los valores de R^2 son altos, oscilando entre 0,98 y 0,99. Un R^2 cercano a 1 indica que el modelo de regresión lineal es representativo para poder modelar la relación entre la concentración del analito y la respuesta del detector (área de pico) dentro del rango de calibración evaluado.

- **Error Típico (Standard Error).**

Los valores varían, pero son relativamente bajos en relación con la magnitud de las áreas de pico. El error típico mide la dispersión promedio de los puntos de datos alrededor de la línea de regresión, donde un valor bajo indica que los puntos de calibración se ajustan a la línea recta.

Los compuestos como claritromicina, ketoprofeno y carbamazepina tienen valores de error típico muy altos. Esto sugiere que la medición de la señal (área) es más variable e imprecisa a altas concentraciones. En tanto, los errores típicos en los rangos bajos como naproxeno e ibuprofeno indica una mayor precisión a bajas concentraciones.

- **Fisher (F) y Valor Crítico de Fisher (F).**

El Test F de Fisher confirma la significancia estadística global de todos los modelos de regresión lineal. Dado que los valores F calculados superan ampliamente a los valores F críticos, se concluye que la relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica es altamente significativa y no se debe al azar.

Esta evidencia confiere una alta confianza en la validez del modelo lineal, demostrando que la metodología presenta una excelente linealidad y una elevada robustez estadística para la cuantificación de todos los compuestos.

A pesar de la robustez del modelo, se identifican oportunidades de mejora relacionadas con la sensibilidad del método para el naproxeno y el ibuprofeno. Sus pendientes (sensibilidades) bajas indican que, aunque la relación es lineal, la señal generada por estos compuestos es



débil. Esta baja sensibilidad podría dificultar la consecución de los bajos límites de detección y cuantificación requeridos para la detección de trazas en matrices complejas como las aguas residuales, lo que refuerza la necesidad de optimizar las condiciones analíticas estos dos compuestos.

Una vez validadas las curvas de calibración para cada analito, se procedió a determinar el límite de detección y, posteriormente, el límite de cuantificación. Estos valores son fundamentales para definir el rango útil de la metodología analítica implementada.

5.6 Límite de detección y cuantificación de fármacos seleccionados.

A partir de las ecuaciones tabuladas en el estado del arte, se obtuvieron los valores de límite de detección y cuantificación de cada medicamento, tabulando los datos encontrados en la Tabla 21.

Tabla 21: Parámetros para límite de detección y cuantificación.

Curva de calibración y (área)= m · x(concentración)+n		Error típico	Yld (señal entregada)	Instrumental		Metodología	
				LOD (ppb)	LOQ (ppb)	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
Metformina bajo	$y = 20,26 \cdot m - 73,40$	26,35	79,05	3,90	13,01	0,016	0,052
Metformina alto	$y = 4,76 \cdot m + 5351,15$	2.347,14	7.041,43	1.477,94	4.926,47	5,912	19,706
Atenolol bajo	$y = 63,67 \cdot m - 144,87$	113,60	63,67	5,35	17,84	0,021	0,071
Atenolol alto	$y = 49,81 \cdot m + 1738,66$	1.958,85	49,81	117,98	393,28	0,472	1,573
Paracetamol bajo	$y = 45,0 \cdot m - 137,58$	279,64	838,91	18,64	62,14	0,075	0,249
Paracetamol alto	$y = 21,76 \cdot m + 10690,7$	5.009,41	15.028,2	690,76	2.302,54	2,763	9,210
Cafeína bajo	$y = 19,26 \cdot m - 77,10$	26,54	21.065,2	4,13	13,78	0,017	0,055
Cafeína alto	$y = 30,70 \cdot m - 6010,5$	7.021,72	21.065,16	686,13	2.287,10	2,745	9,148
Carbamazepina	$y = 59,79 \cdot m + 2274,86$	9.429,05	28.287,15	473,12	1.577,07	1,892	6,308
Claritromicina bajo	$y = 167,7 \cdot m - 3507,22$	787,06	2.361,18	14,08	46,93	0,056	0,188
Claritromicina alto	$y = 148,31 \cdot m + 291,17$	23.988,3	71.965,01	485,24	1.617,45	1,941	6,470
Ketoprofeno bajo	$y = 42,08 \cdot m - 990,14$	252,01	756,03	17,97	59,88	0,072	0,240
Ketoprofeno alto	$y = 45,08 \cdot m - 8075,93$	11.004,4	33.013,44	723,97	2.413,24	2,896	9,653
Diclofenaco bajo	$y = 34,15 \cdot m - 127,46$	55,91	167,72	4,91	16,37	0,020	0,065
Diclofenaco alto	$y = 41,87 \cdot m - 2221,41$	7.366,30	22.098,90	527,77	1.759,24	2,111	7,037
Naproxeno baja	$y = 0,63 \cdot m - 4,13$	0,92	2,77	4,40	14,68	0,018	0,059
Naproxeno alto	$y = 0,55 \cdot m - 13,87$	16,36	49,08	89,90	299,66	0,360	1,199
Ibuprofeno baja	$y = 0,26 \cdot m + 1,32$	1,26	3,78	14,77	49,25	0,059	0,197
Ibuprofeno alto	$y = 0,20 \cdot m + 5,24$	1,40	0,60	21,07	70,22	0,084	0,04

El análisis de los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) presentados en la Tabla



21 revela una diferencia drástica entre la capacidad nominal del equipo (instrumental) y la sensibilidad real del método optimizado (metodología). Esta mejora se debe a la sintonía de las condiciones de operación detalladas en la Tabla 15, como el uso de temperaturas moderadas (30-35°C) y voltajes de fuente específicos (3,0-4,0 kV) para minimizar el ruido.

Para la mayoría de los fármacos en su rango de concentración bajo, la metodología logra límites en el orden de ppb muy bajos, superando por órdenes de magnitud al ruido instrumental. La metformina es uno de los analitos más sensibles, con un LOD metodológico de 0,016 ppb, lo que representa una mejora masiva frente a los 3,90 ppb instrumentales. Seguidamente, viene la cafeína con el segundo límite más bajo (0,017 ppb), validando la eficacia del gradiente positivo de ácido fórmico y metanol para compuestos de baja masa.

Existen fármacos que, debido a su estructura química o tiempo de elución, presentan límites levemente superiores, pero aún altamente competitivos frente a la literatura, como lo son el caso de claritromicina, ibuprofeno, ketoprofeno y paracetamol.

La carbamazepina y los rangos altos de calibración muestran límites superiores, lo que indica una mayor variabilidad o saturación en la respuesta del detector para estas concentraciones. Igualmente, estos valores son más elevados debido a la contaminación existente de estos medicamentos en el sistema cromatográfico.

La superioridad de los límites metodológicos sobre los instrumentales se explica por la optimización de los voltajes y temperaturas utilizados que, como se demostró en las gráficas de ruido, previenen la saturación del detector y mantienen la línea de base plana. Esto permite que la Señal Entregada (Yld) sea distinguible incluso a concentraciones mínimas, facilitando la cuantificación de trazas en matrices complejas.

Una vez establecidos y confirmados los límites de detección y límites de cuantificación, se procedió a evaluar la matriz sintética con el fin de validar la metodología analítica y establecer para cada compuesto el factor de ajuste en la curva de calibración previo al análisis de muestras reales.



5.7 Análisis de muestras de agua sintética.

Para validar la metodología analítica en la matriz, se realizó una muestra sintética. El propósito fue evidenciar la eficacia del proceso de extracción por solvente implementado, viendo la compatibilidad del cartucho elegido con cada una de los analitos y la mezcla multicomponente. Los resultados de esta prueba se detallan en la Tabla 22.

Tabla 22: Resultados de evaluación muestra sintética.

Fármaco	Concentración individual (ppb)		Concentración en mezcla (ppb)		Porcentaje de recuperación (%)		Factor de ajuste
	Reportada	Conocida	Reportada	Conocida	Individual	Mezcla	
Metformina	5,17	100	N/D	100	5,17	N/D	1,07
Atenolol	53,22	50	42,15	50	106,44	84,31	1,79
Paracetamol	185,43	200	197,48	200	92,72	98,74	1,69
Cafeína	65,89	50	47,20	50	131,77	94,40	2,43
Carbamazepina	595,39	500	327,33	500	119,08	65,47	1,37
Claritromicina	11,48	200	22,60	200	5,74	11,30	N/A
Ketoprofeno	200,83	200	183,55	200	100,42	91,78	1,90
Diclofenaco	11,60	50	8,41	50	23,21	16,83	1,11
Naproxeno	116,45	100	80,46	100	116,45	80,46	1,67
Ibuprofeno	81,83	100	264,18	100	81,83	264,18	1,31

N/D: no detectado por el método; N/A: no identificado en la muestra patrón.

El porcentaje de recuperación es un indicador directo de la exactitud del método analítico, indicando qué tan cercano es la medida en comparación a la acondiciona.

La tabla de resultados revela que, si bien el diseño multi-modo del HLB funciona para muchos analitos, el método falla en robustez y precisión para los extremos químicos de la mezcla.

El cartucho HLB es un copolímero de divinilbenceno (DVB) y N-vinilpirrolidona (NVP), lo que le confiere una retención dual:

- **Retención hidrofóbica (DVB):** retiene compuestos no polares como carbamazepina, ibuprofeno, naproxeno y ketoprofeno, lo cual se confirma por sus buenas recuperaciones individuales iniciales.
- **Retención polar (NVP):** el grupo carbonilo de la NVP permite la interacción por enlaces



de hidrógeno y dipolo-dipolo con compuestos polares que son donadores/aceptores de enlaces de hidrógeno como paracetamol y cafeína, justificando también su cuantificación individual efectiva.

La baja recuperación en la muestra individual para compuestos con porcentajes menores al 70% indica un sesgo negativo debido a una interacción fallida del analito con el sistema (antes de la competencia en mezcla). Particularmente, se tiene:

1. **Metformina (5,17%):** bajo las condiciones abordadas demuestra una polaridad extrema al encontrarse totalmente ionizada con carga catiónica, haciendo que la afinidad hidrofóbica del HLB sea demasiado débil para retener el compuesto. Esto radica en una pérdida por no retención, donde el analito es arrastrado prematuramente en la etapa de lavado.
2. **Claritromicina (5,74%):** al ser un macrólido de molécula grande y con propiedades básicas, puede adsorberse en el sistema cromatográfico (líneas de transferencia, viales de inyección, superficie de la columna LC), reduciendo la señal sin ser detectado en el LC/MS. También, en caso de ser retenido en el HLB, el solvente de elución no fue lo suficientemente básico para romper el fuerte enlace con el DVB.

Sumado a lo anterior, la muestra patrón fue preparada y almacenada por un tiempo; por ende, pudo haberse degradado antes de la inyección.

3. **Diclofenaco (23,21%):** se logró una recuperación muy baja tanto en formato individual como en mezcla atribuido a que se encuentra completamente ionizado (deprotonado) como un anión (carga negativa); logrando la pérdida prematura del analito. La matriz de la muestra o el sorbente pueden tener sitios con carga negativa (o ser demasiado polares), lo que resulta en una repulsión iónica que puede permitir el arrastre y pérdida del compuesto durante la etapa de lavado.

Por otro lado, al comparar los porcentajes individuales con los de la mezcla, se presentan dos fenómenos asociados a una sobresaturación del ibuprofeno y una competencia y/o fuga del naproxeno, atenolol y carbamazepina:

1. **Sobre-recuperación del ibuprofeno (264,18%):** este valor es un error de



sobreestimación y no una recuperación real. Se justifica por la potenciación iónica en el LC/MS (componentes de la matriz amplifican desproporcionadamente la señal del ibuprofeno).

El ibuprofeno es un compuesto de carácter ácido. Al emplear un pH neutro (7,0) durante la extracción, el analito se encuentra predominantemente en su forma ionizada (como carboxilato con carga negativa, siendo su retención menos estable que en condiciones ácidas.

La ecuación del ibuprofeno bajo tiene la pendiente más baja de toda la tabla. Esto significa que pequeñas variaciones en el área causadas por interferencias de otros fármacos en la mezcla sintética provocan cambios desproporcionados en la concentración calculada. Con una señal analítica de 3,78, el ibuprofeno es el analito con menor respuesta instrumental en modo negativo. En una mezcla sintética, el ruido de fondo generado por el uso de 4,0 kV (necesarios para detectarlo) se suma a la señal de los otros compuestos, inflando el área del pico y resultando en la recuperación exacerbada de 264%.

Mientras que el ibuprofeno individual reporta una recuperación de 81,83% (subestimación por falta de retención a pH neutro), al estar en mezcla sintética salta al 264,18%. Esto confirma que el problema es la interferencia por mejora de señal causada por los otros fármacos que eluyen cerca de él o afectan la química de la fuente de iones.

2. Competencia y fuga de atenolol, carbamazepina y naproxeno (disminución del 100%): la saturación de los sitios de retención por múltiples analitos hace que los compuestos con afinidad ligeramente menor sean desplazados y/o perdidos durante el lavado y la elución; por ende, no se puede extrapolar la afinidad del cartucho de forma individual y en mezcla debido a este fenómeno de competencia, porque la saturación y la competencia son fenómenos exclusivos y dependientes de los medicamentos utilizados, concentraciones y características de la matriz.

Compuestos con recuperaciones entre 70-120% poseen un rango aceptable solo para ciertos métodos de trazas o impurezas en el extremo inferior del rango, en el cual se presenta una pérdida menor o moderada debido a una extracción subóptima, pérdida durante la concentración o leve adsorción. Estos porcentajes, permiten la medición principal de la dosis del fármaco



presentes a bajos niveles cercanos del límite de cuantificación. Por lo anterior, se plantea en la Figura 27 pasos a seguir en un futura optimización y desarrollo de método:

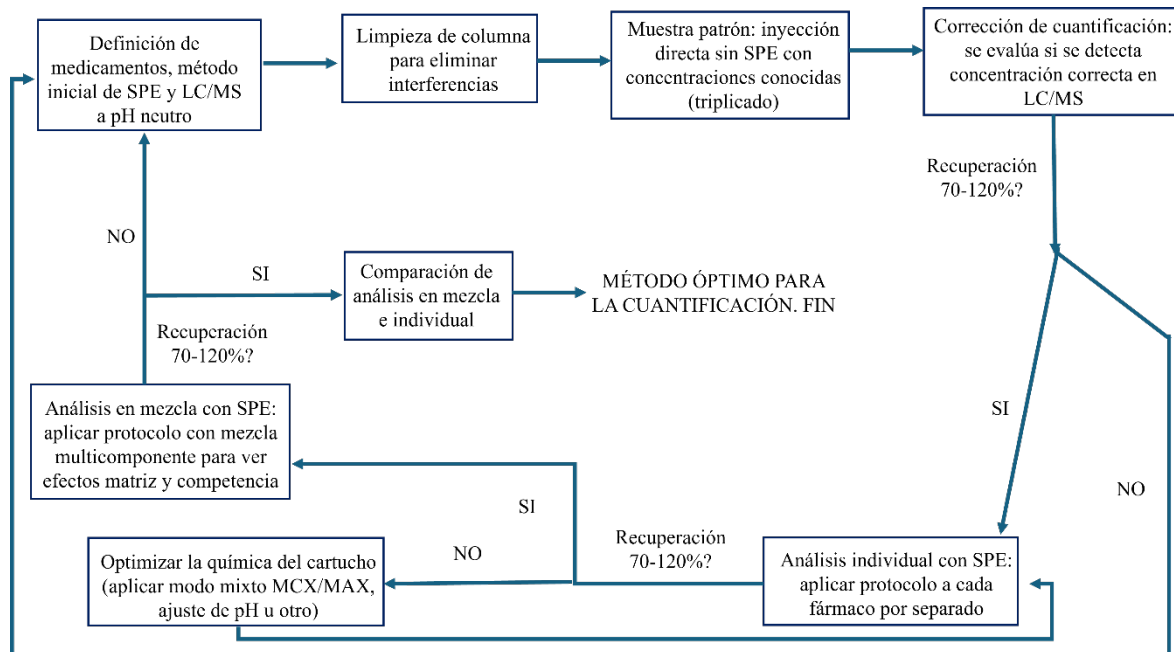


Figura 27: Propuesta para evaluación de compatibilidad de cartucho SPE.

El método de extracción con el cartucho HLB demuestra una marcada falta de robustez, evidenciando que no se puede extrapolar la afinidad de los fármacos de forma individual a la mezcla. Este fallo se debe a la competencia por los sitios de retención, lo que conduce a pérdidas de analito y subestima la concentración. De manera crítica, la evaluación de la recuperación de la mezcla no va a ser un valor certero cuando hay sobre-recuperación porque puede haber otros compuestos que hagan ruido (potenciación iónica) en el detector, invalidando el resultado. Por lo tanto, en ningún caso se puede definir un límite de eluyente basado en datos erróneos, siendo fundamental aplicar el proceso detallado en la Figura 27.

Para cumplir con el estándar internacional de validación entre el 70-120%, el método debe ser rediseñado y obligatoriamente corregirse con muestra patrón, idealmente utilizando un triplicado que mida parámetros de curva al inicio, al medio y al final de la curva; procurando un lavado previo de la columna. Sumado a ello, se recomienda incorporar patrones de medicamentos con calidad masa y no hplc, con el fin de disminuir el ruido de fondo; además de estándares internos para compensar la variabilidad introducida por la competencia y los efectos de matriz. Igualmente, se debe evaluar tanto la recuperación individual como en



multicomponente con el fin de asegurar la confiabilidad de concentración detectada en una futura muestra real.

Para reducir el efecto matriz en el análisis de fármacos, especialmente considerando los desafíos observados en muestras sintéticas y complejas con el uso de cartuchos HLB, se deben implementar estrategias que mejoren tanto la selectividad de la extracción como la limpieza de la ionización.

Preparar los estándares de la curva de calibración en una matriz similar a la muestra real ayuda a que el error sistemático sea el mismo en los estándares y en las muestras, compensando la supresión o mejora de señal. Asimismo, fortificar la muestra real con concentraciones conocidas del analito para determinar la respuesta exacta bajo la influencia de sus propios interferentes; o bien, si la sensibilidad del equipo lo permite, diluir la muestra antes de la inyección es la forma más sencilla de reducir la concentración de interferentes de la matriz sin perder la señal del analito.

Si bien la detección inequívoca de un analito confirma su presencia en la muestra, la cuantificación precisa de su concentración absoluta es inherentemente desafiante. No es posible determinar la cantidad exacta del analito con un alto grado de certeza sin una validación rigurosa. La respuesta del sistema de detección no solo depende de la cantidad del analito de interés, sino también de la composición de la matriz, las interacciones fisicoquímicas entre los analitos presentes (competencia en la extracción o potenciación iónica) y la eficiencia variable del proceso de preparación de la muestra. Por lo tanto, el resultado es una concentración reportada, no una certeza analítica, hasta que se demuestre la robustez del método mediante el uso de estándares internos marcados isotópicamente que compensen estas variaciones sistemáticas.

5.8 Análisis de muestras de agua.

A continuación, se visualizan los resultados obtenidos para los diferentes puntos de medición en la planta de depuración y agua potable en la Figura 28,29, 30 y 31; bajo los parámetros



tabulados en la Tabla 23.

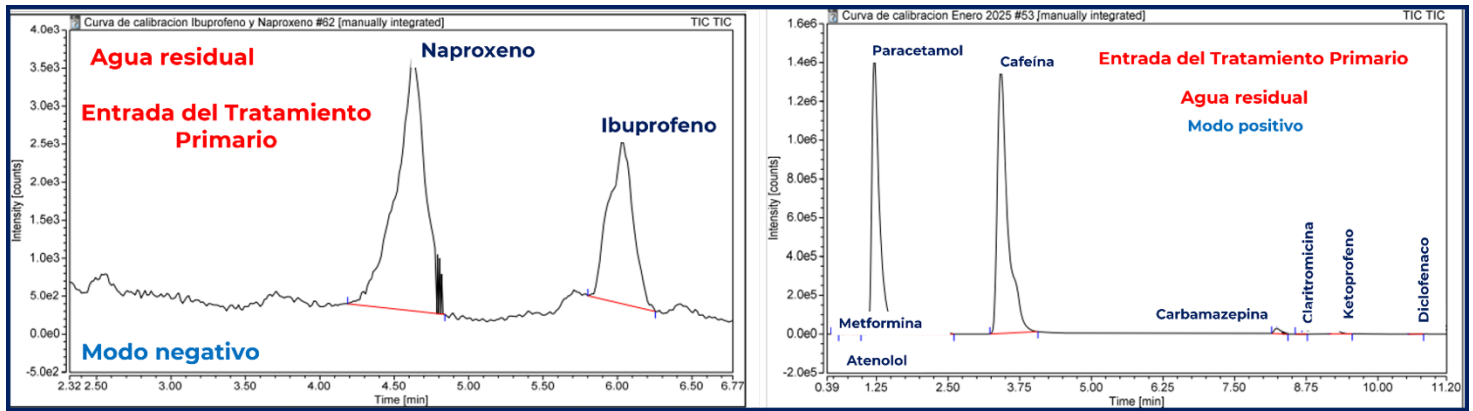


Figura 28: respuesta para tratamiento primario.

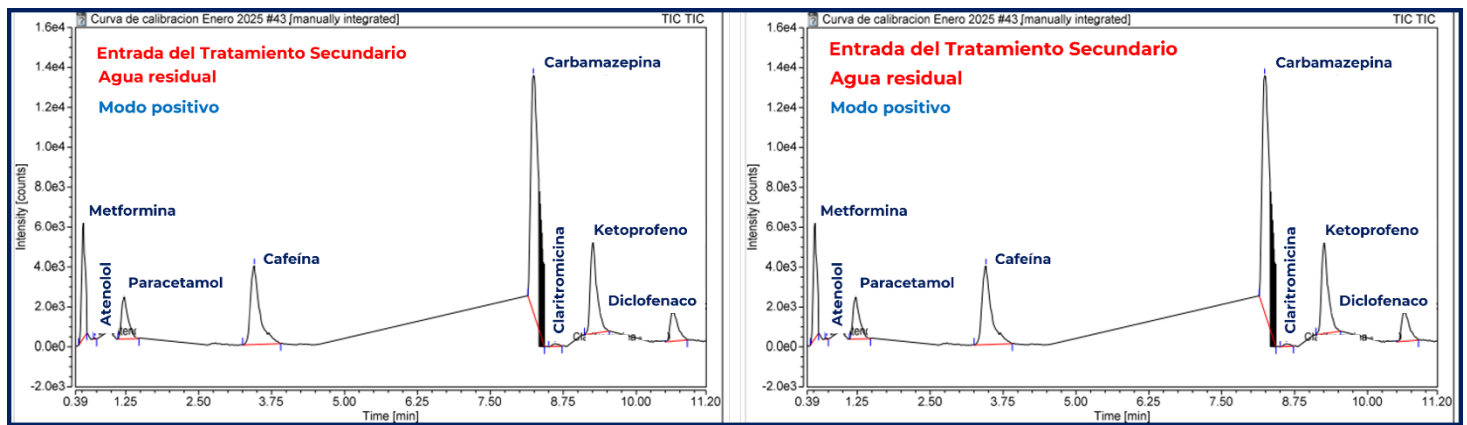


Figura 29: Respuesta para entrada de tratamiento secundario.

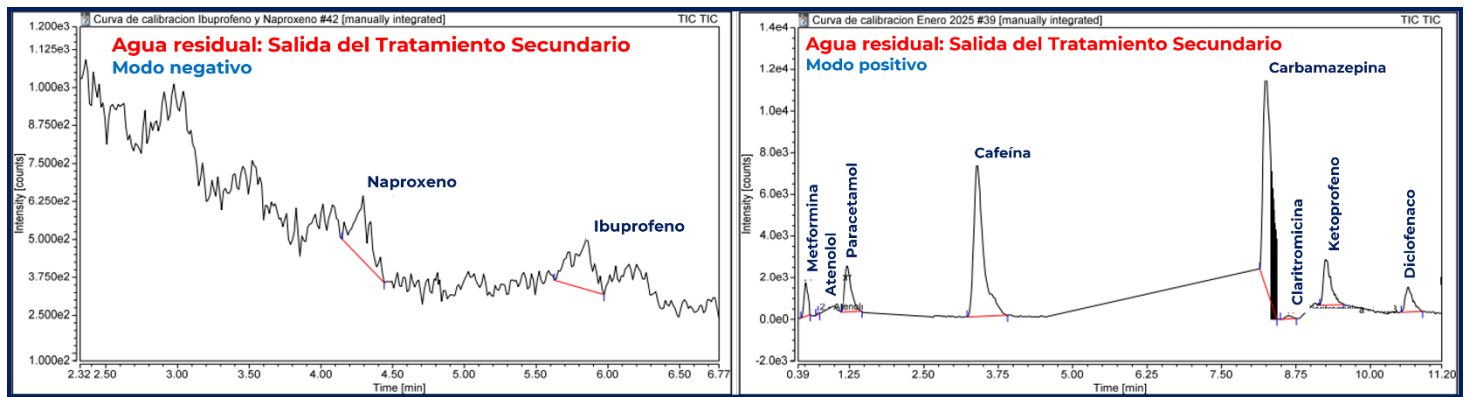


Figura 30: Respuesta para salida de tratamiento secundario.

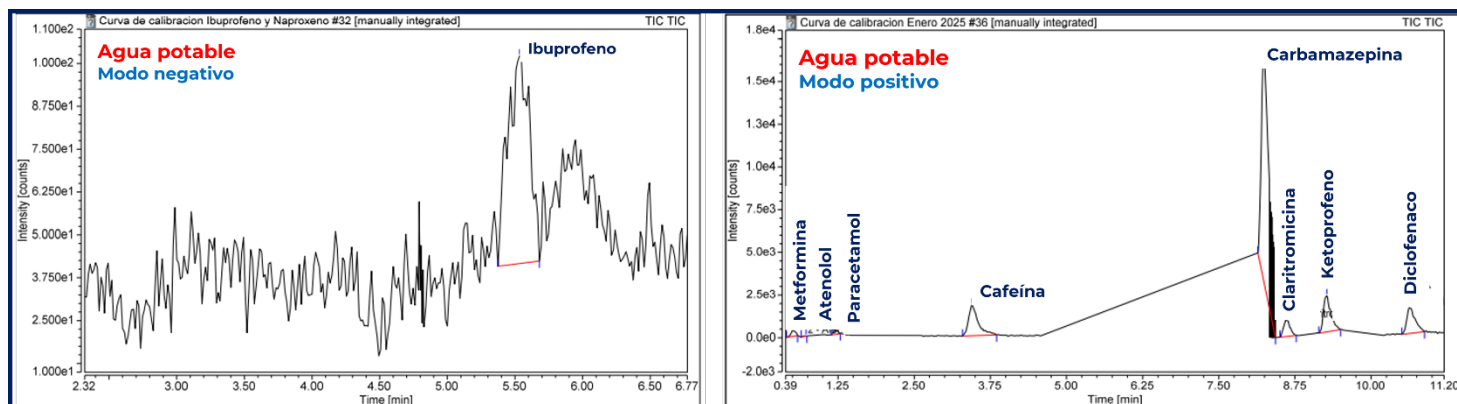


Figura 31: Respuesta para agua potable.

Tabla 23: Detección y cuantificación de medicamentos en muestras de agua.

Fármacos	Agua potable (ppb)	Porcentaje de desviación (%)	Entrada primaria (ppb)	Porcentaje de desviación (%)	Entrada secundaria (ppb)	Porcentaje de desviación (%)	Salida secundaria (ppb)	Porcentaje de desviación (%)
Metformina	0,02	$\pm 7,41 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 3,51\%$)	0,29	$\pm 2,51 \cdot 10^{-2}$ ($\pm 8,52\%$)	0,06	$\pm 3,49 \cdot 10^{-2}$ ($\pm 59,05\%$)	0,03	$\pm 5,23 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 15,30\%$)
Atenolol	0,01	$\pm 4,89 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 0,53\%$)	0,02	$\pm 8,12 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 43,34\%$)	0,06	$\pm 8,11 \cdot 10^{-2}$ ($\pm 144,43\%$)	0,01	$\pm 1,35 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 1,43\%$)
Paracetamol	0,02	$\pm 2,20 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 13,76\%$)	25,21	$\pm 1,17$ ($\pm 4,64\%$)	0,03	$\pm 3,42 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 10,17\%$)	0,03	$\pm 1,06 \cdot 10^{-2}$ ($\pm 39,55\%$)
Cafeína	0,06	$\pm 2,05 \cdot 10^{-2}$ ($\pm 32,72\%$)	58,33	$\pm 2,87$ ($\pm 4,93\%$)	0,17	$\pm 3,12 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 1,86\%$)	0,26	$\pm 3,51 \cdot 10^{-2}$ ($\pm 13,33\%$)
Carbamazepina	<LOD	N/A	0,07	$\pm 1,42 \cdot 10^{-2}$ ($\pm 19,73\%$)	<LOD	N/A	<LOD	N/A
Claritromicina	0,09	$\pm 3,92 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 0,46\%$)	0,08	$\pm 2,74 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 0,03\%$)	0,08	$\pm 5,08 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 0,06\%$)	0,08	$\pm 6,49 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 0,08\%$)
Ketoprofeno	0,12	$\pm 1,16 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 0,96\%$)	0,45	$\pm 1,09 \cdot 10^{-2}$ ($\pm 2,41\%$)	0,16	$\pm 5,14 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 3,26\%$)	0,12	$\pm 2,76 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 2,26\%$)
Diclofenaco	0,04	$\pm 9,95 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 2,37\%$)	0,03	$\pm 4,10 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 13,36\%$)	0,04	$\pm 3,95 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 8,82\%$)	0,04	$\pm 2,83 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 7,32\%$)
Naproxeno	N/D	N/A	6,32	$\pm 1,45$ ($\pm 22,87\%$)	0,76	$\pm 5,48 \cdot 10^{-1}$ ($\pm 72,40\%$)	0,38	$\pm 1,42 \cdot 10^{-1}$ ($\pm 37,26\%$)
Ibuprofeno	0,13	$\pm 3,71 \cdot 10^{-2}$ ($\pm 29,05\%$)	8,90	$\pm 3,95$ ($\pm 44,36\%$)	0,25	$\pm 5,02 \cdot 10^{-2}$ ($\pm 20,10\%$)	0,43	$\pm 5,25 \cdot 10^{-2}$ ($\pm 12,24\%$)
<LOD: Menor al límite de detección, N/D: No detectado, N/A: No aplica.								

El estudio expone resultados críticos sobre la presencia de diez fármacos esenciales en el ciclo del agua. La investigación no solo se limita a la cuantificación, sino que evalúa la confiabilidad del método analítico, concluyendo con un 95% de certeza la ubicuidad de estos contaminantes. Una premisa fundamental es que, si bien las concentraciones exactas pueden



ser difíciles de fijar debido a la complejidad de las muestras, es innegable el ingreso constante de estas sustancias al medio ambiente sin un marco regulatorio eficaz.

Un hallazgo clave fue la influencia del efecto matriz en la validez de los resultados. Este fenómeno ocurre cuando los componentes co-extraídos de la muestra (materia orgánica, sales, proteínas, lípidos) interfieren en la ionización de los analitos durante el análisis cromatográfico, provocando supresiones y aumento artificiales de señal; explicando el por qué en etapas de alta complejidad orgánica (como la entrada secundaria), las desviaciones estándar superan los límites permitidos, restando exactitud a los valores en ppb. A medida que la matriz es más "sucia" (mayor carga de sólidos y materia orgánica), el efecto matriz se intensifica, lo que dificulta discernir entre la concentración real del fármaco y la interferencia química.

A continuación, se detalla un análisis por etapa de muestreo:

- **Entrada del tratamiento primario:** se confirmó la presencia de los diez compuestos. Las altas concentraciones de cafeína, paracetamol, naproxeno e ibuprofeno actúan como trazadores de la actividad humana, confirmando la excreción directa al alcantarillado como la fuente principal debido a su uso masivo en la sociedad.

Aunque es una etapa de carga alta, la mayoría de los compuestos son validables, excepto el atenolol (43,34%), naproxeno (22,87%) e ibuprofeno (44,36%), cuyas desviaciones sugieren que el efecto matriz ya está presente desde el inicio del muestreo. Si bien no se puede validar a ciencia cierta la concentración real de los medicamentos; sí se puede confirmar su presencia en el medio.

- **Entrada del tratamiento secundario:** esta es la etapa más problemática para el método analítico. Las desviaciones escalan drásticamente para atenolol (144,43%), naproxeno (72,40%) y metformina (59,05%). El efecto matriz en esta fase hace que la presencia de atenolol no pueda corroborarse con fiabilidad científica. Los procesos de decantación pueden haber liberado interferentes solubles que bloquean la detección precisa de estos compuestos específicos.

La mayor remoción de medicamentos se obtuvo en la etapa inicial, teniendo que gran parte



de los compuestos queda retenido en el sólido. Esto se debe principalmente a la adsorción del fármaco en las partículas de materia orgánica suspendida y a su eliminación física radicada por su posterior sedimentación en los decantadores primarios.

- **Salida del tratamiento secundario:** esta etapa revela la ineficacia del sistema convencional para degradar moléculas complejas. Particularmente, se observa un aumento en la concentración de cafeína e ibuprofeno respecto a etapa anterior, causado por las condiciones enzimáticas y de pH en los lodos activados que hidrolizan o "desconjugan" los metabolitos (formas inactivas excretadas), revirtiéndolos a su forma farmacológicamente activa y detectable o bien, puede ser debido a su propia desorción, donde aquellos medicamentos que estaban "atrapados" en los sólidos del tratamiento primario se liberan nuevamente a la fase acuosa durante el proceso biológico.

El efluente se convierte en un foco de descarga de medicamentos activos y refractarios al medio receptor, confirmando la presencia de todos los compuestos con rangos de desviación aceptables que aseguren su correcta detección. Para el caso de naproxeno y paracetamol, se puede decir que hay medicamento, pero sin confirmar su cantidad exacta en la muestra.

- **Agua potable:** casi todos los compuestos están validados bajo el criterio del 20%, con excepciones menores en cafeína (32,72%) e ibuprofeno (29,05%).

La detección de 9 de los 10 fármacos (todos excepto el naproxeno) subraya que los tratamientos de potabilización actuales no son suficientes y efectivos ante estos microcontaminantes, generando un riesgo sanitario por exposición crónica.

A partir de los resultados obtenidos surge la necesidad de reconocer la importancia de un tratamiento de lodos para evitar un re-contaminación en el medio con medicamentos.

La oxidación avanzada es una alternativa para destruir estructuras químicas con biodegradación controlada por medio de digestión anaerobia o biorreactores de membrana (MBR). También, es factible incorporar tratamientos térmicos de incineración o pirólisis, extracción química con cambios de pH o uso de solventes; y, tratamientos biológicos para mineralizar moléculas biodegradables como cafeína, paracetamol, ibuprofeno y naproxeno.



Por otro lado, la comparación entre las etapas del tratamiento revela la persistencia de medicamentos como atenolol, claritromicina, metformina y diclofenaco en la matriz acuática. Muestran cero remociones en algunas etapas, indicando que son altamente refractarios a la biodegradación, teniendo una eliminación limitada por el tratamiento convencional que genera su persistencia en el medio ambiente si el efluente se descarga directamente.

Aunque la carbamazepina es conocida por ser persistente, su baja concentración inicial (<LOD en salida) sugiere que la carga es mínima o que la dilución es un factor importante a considerar, por ende, no se puede dar indicios concretos de su efectiva remoción en el proceso de depuración.

Finalmente, el estudio demuestra que en las concentraciones trazas encontradas y con una acción combinada de múltiples fármacos, estos compuestos ejercen una presión en los ecosistemas que puede desencadenar efectos adversos sinérgicos o aditivos a largo plazo como:

- **Resistencia antimicrobiana:** compuestos como la claritromicina y el diclofenaco son vectores de presión selectiva, favoreciendo el desarrollo de bacterias resistentes.
- **Toxicidad en flora acuática:** el ibuprofeno y naproxeno generan estrés oxidativo y toxicidad en microalgas.
- **Daño en peces:** el diclofenaco causa daños histopatológicos en riñones y branquias, afectando la supervivencia.
- **Fototoxicidad:** el ketoprofeno presenta un riesgo único: bajo la luz solar, se transforma en metabolitos con mayor toxicidad que la molécula madre.
- **Efectos neuroactivos y endocrinos:** la metformina, atenolol y carbamazepina alteran el metabolismo, el sistema cardiovascular y el comportamiento de organismos no objetivo.

Si bien, no se puede establecer las concentraciones exactas de los medicamentos en aguas, sí se puede asegurar que existe cierta cantidad del fármaco que ingresa al medio ambiente sin control regulatorio.



Capítulo 6: Conclusiones y recomendaciones.

Se logró implementar una metodología UHPLC/MS/MS para la detección cualitativa de compuestos farmacéuticos en niveles trazas. No obstante, la cuantificación precisa se ve comprometida por las interacciones complejas de los analitos en la mezcla y la matriz. Se destaca que este estudio presenta el primer acercamiento y base para seguir mejorando la identificación de analitos como metformina, carbamazepina, ibuprofeno y naproxeno en la separación; además de optimización necesaria en el proceso de extracción en fase sólida para la cuantificación donde los resultados demostraron que la afinidad del cartucho no es extrapolable de compuestos individuales a mezclas complejas en matrices reales. La divergencia en la recuperación sugiere que, para asegurar la cantidad exacta del analito, es necesario evaluar no solo la compatibilidad química de cada compuesto con el cartucho SPE, sino también su interacción específica con una mezcla compleja y la matriz de agua real; por ende, se establecieron las bases críticas para el monitoreo de contaminantes emergentes en el contexto hídrico chileno. A continuación, se detallan los hallazgos en relación con los objetivos propuestos:

La revisión sistemática permitió identificar una brecha crítica entre el consumo masivo de fármacos y la capacidad de detección local. Se corroboró que compuestos de alto consumo en Chile, como la metformina, paracetamol, naproxeno e ibuprofeno, presentan una ubicuidad alarmante en las matrices acuosas. La literatura y el posterior análisis local confirman que los diez compuestos elegidos no solo son consumidos con alta frecuencia, sino que poseen una persistencia química (especialmente los recalcitrantes como claritromicina y diclofenaco) que los convierte en marcadores antropogénicos ideales para evaluar la eficiencia de los sistemas de saneamiento chilenos.

Si bien la implementación de la metodología analítica desarrollada considerando los límites de detección y cuantificación fue exitosa para la detección cualitativa de compuestos farmacéuticos en niveles traza, el proceso reveló desafíos técnicos de alta complejidad dadas por la heterogeneidad química de los analitos (pesos moleculares desde 129,15 Da hasta 747,95 Da), debiendo romper la tendencia de "método único" ilustradas en investigaciones anteriores. Así, se determinó que operar con fases móviles diferentes con gradientes y zonas



isocráticas a 35°C y 3,0 kV para modo positivo, y 30°C con 4,0 kV para modo negativo era esencial para balancear la ionización y la resolución sin comprometer la señal analítica de los compuestos. Sin embargo, la cuantificación precisa se vio comprometida por la coelución y el efecto matriz. La competencia por carga en la fuente ESI elevó artificialmente los límites de detección. Además, la falta de validación de los puntos de identificación (4 puntos requeridos: 1 precursor y 2 iones producto) con las desviaciones permitidas de la intensidad relativa, indican que el método actual es una base robusta para identificación, pero requiere optimización adicional para una cuantificación normativa estricta.

La metodología analítica confirmó la ubicuidad y transferencia de diez fármacos a lo largo del ciclo integral del agua, donde el análisis de la entrada primaria validó una descarga directa y constante al sistema, evidenciada por la detección de altas concentraciones de cafeína, paracetamol, naproxeno e ibuprofeno. A la vez, el hallazgo de nueve fármacos activos en el agua potable es un resultado crítico que genera una alerta para la salud pública. Esto demuestra que los tratamientos de potabilización existentes son insuficientes para eliminar completamente estos contaminantes traza, siendo el uso de aguas residuales como fuente de agua potable, bajo estas condiciones de remoción ineficaz, un riesgo para la ciudadanía debido a la exposición crónica a estos contaminantes en niveles detectables.

El monitoreo de las distintas etapas diferenció la eficiencia de remoción según la naturaleza química de los compuestos, teniendo los biodegradables como cafeína, paracetamol, ibuprofeno y naproxeno con una remoción superior, haciéndolos sustratos viables para la comunidad microbiana de los lodos activados. Por el contrario, los fármacos recalcitrantes como carbamazepina, diclofenaco, claritromicina, atenolol, metformina y ketoprofeno mostraron una eliminación limitada o inferior, demostrando la ineficiencia del tratamiento secundario convencional para la completa eliminación de esta categoría de contaminantes y su persistencia en el medio. Finalmente, el monitoreo del proceso de depuración reveló un aumento en las concentraciones obtenidas de cafeína e ibuprofeno sugiriendo una desconjugación enzimática de sus metabolitos conjugados en el tratamiento biológico, liberando el fármaco activo original y reintroduciéndolo al efluente, lo que compromete la eficiencia de remoción aparente.

El monitoreo confirmó la transferencia de diez fármacos a través de todo el ciclo integral del



agua, donde se observó que compuestos biodegradables (cafeína, paracetamol, ibuprofeno y naproxeno) tienen una remoción superior en lodos activados; sin embargo, fármacos recalcitrantes como diclofenaco y claritromicina mostraron una eliminación limitada por los tratamientos convencionales, persistiendo en el efluente. Ahora bien, el hallazgo de nueve fármacos activos en agua potable es un resultado crítico. Esto demuestra que los tratamientos de potabilización actuales son insuficientes frente a contaminantes traza, exponiendo a la población a una ingesta crónica cuyos efectos sinérgicos asociados a la toxicidad de mezcla aún no están regulados.

La investigación identifica que el principal desafío es la inestabilidad y falta de robustez temporal del método ante concentraciones de ng/L. Las fluctuaciones en la fase móvil y la contaminación de la columna generan ruido químico que opaca la señal del analito, teniendo que ajustar las condiciones operacionales hasta lograr una respuesta resolutive y confiable que permita límites de detección y cuantificación en concentraciones traza. Basado en esto, se concluye que es urgente transitar hacia una regulación que no solo considere compuestos individuales, sino límites de descarga basados en la persistencia y la reintroducción de fármacos activos por desconjugación. A la luz de los resultados y las dificultades técnicas enfrentadas, se proponen las siguientes acciones para el fortalecimiento de futuras investigaciones y marcos regulatorios:

- **Refinamiento de la SPE:** es imperativo mejorar la selectividad del cartucho para reducir recuperaciones anómalas superiores al 120%, evaluando las recuperaciones no solo de la muestra individual sino también en mezcla. Se recomienda realizar pruebas de "spiking" (fortificación) tanto en matriz sintética como real para calcular factores de corrección por efecto matriz específicos para cada punto de muestreo.
- **Reducción de contaminación:** implementar limpiezas de matriz más rigurosas para reducir la contaminación del equipo.
- **Preservación de muestras:** se propone sustituir la refrigeración simple por la congelación inmediata de las muestras. Esto es crucial para detener la actividad microbiana que facilita la desconjugación de metabolitos y para mantener un pH neutro constante que evite cambios en el estado de ionización de analitos sensibles.
- **Análisis de metabolitos:** desarrollar metodologías que permitan la cuantificación



simultánea de fármacos y sus principales metabolitos conjugados. Esto permitirá realizar balances de masa reales y entender si una baja concentración se debe a remoción efectiva o simplemente a una transformación temporal del compuesto.

- **Aseguramiento de calidad:** implementar estrictamente el uso de estándares internos isotópicamente marcados para corregir las pérdidas durante la SPE y la supresión de iones en la fuente ESI, asegurando que se cumplan los 4 puntos de identificación normativa que verifiquen el cumplimiento de desviación normado en las relaciones de intensidad relativa.
- **Implementación de tratamientos terciarios:** ante la ineficacia de los lodos activados para eliminar compuestos recalcitrantes, se recomienda evaluar la viabilidad de procesos de oxidación avanzada o adsorción en carbón activado granular en las plantas de tratamiento de aguas servidas.
- **Gestión en la fuente:** crear políticas de tratamiento y devolución para medicamentos vencidos o no usados en farmacias y hospitales. Reducir la carga de entrada al sistema de alcantarillado es más costo-efectivo que tratar de remover trazas de ng/L al final del proceso, atacando el problema desde su origen.
- **Establecimiento de rangos para límites máximos permitidos:** proponer a la autoridad ambiental la creación de una norma secundaria de calidad ambiental que establezca rangos de remoción obligatorios para fármacos de alto riesgo sanitario en efluentes. La cantidad de compuesto encontrada dependerá de su interacción con la matriz evaluada y su respectiva caracterización.
- **Vigilancia de "puntos calientes":** declarar las plantas de tratamiento de aguas servidas como zonas de vigilancia especial para la generación de resistencia antimicrobiana, integrando el monitoreo de antibióticos (como la claritromicina) en los planes de manejo de riesgos de las sanitarias.

La relevancia y solidez técnica de esta investigación como primer acercamiento de la metodología fueron validadas mediante su selección y presentación como el mejor póster en el Congreso de la Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (AIDIS), uno de los foros más prestigiosos del sector a nivel regional. Este reconocimiento destaca la complejidad del desafío analítico enfrentado al cuantificar contaminantes en niveles de traza y la urgencia de los hallazgos reportados sobre la presencia de fármacos en agua potable



chilena. La distinción por parte de AIDIS subraya el valor estratégico de este estudio como un pilar científico para la actualización de normativas ambientales y la implementación de tecnologías de tratamiento avanzado, posicionando esta metodología como una referencia necesaria para la gestión hídrica y la protección de la salud pública en el país.

Capítulo 7: Referencias.

- Afonso, C. (2013). *Optimización de un método basado en SPE-LC-MS/MS para la determinación de multiresiduos de compuestos farmacéuticos en aguas depuradas*. Facultad de Ciencias del Mar, Química. Obtenido de <https://accedacris.ulpgc.es/handle/10553/10572>
- Albergamo, V., Helmus, R., & de Voogt, P. (28 de Septiembre de 2018). Direct injection analysis of polar micropollutants in natural drinking water sources with biphenyl liquid chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1569, 53-61. doi:10.1016/j.chroma.2018.07.036
- Alkimin, G., Daniel, D., Frankenbach, S., Serôdio, J., Soares, A., Barata, C., & Nunes, B. (20 de Marzo de 2019). Evaluation of pharmaceutical toxic effects of non-standard endpoints on the macrophyte species *Lemna minor* and *Lemna gibba*. *Science of The Total Environment*, 657, 926-937. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.12.002
- Almeida, C. (9 de febrero de 2021). Overview of Sample Preparation and Chromatographic Methods to Analysis Pharmaceutical Active Compounds in Waters Matrices. *Separations*, 8. doi:10.3390/separations8020016
- Alvo, Á., Téllez, V., Sedano, C., & Fica, A. (2016). Conceptos básicos para el uso racional de antibióticos en otorrinolaringología. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 76(1), 136-147. doi:10.4067/S0718-48162016000100019
- Alygizakis, N., Urík, J., Beretsou, V., Kampouris, I., Galani, A., Oswaldova, M., . . . Fattakassinos, D. (Mayo de 2020). Evaluation of chemical and biological contaminants of emerging concern in treated wastewater intended for agricultural reuse. *Environment International*, 158. doi:10.1016/j.envint.2020.105597
- Andess Chile. (2022). *Estadísticas*. Obtenido de Andess Chile: Empresas de agua y saneamiento: <https://www.andess.cl/estadisticas/>



- Andess Chile. (2024). *Reporte de indicadores de la industria 2024*. Obtenido de Andess Chile: Empresas de agua y saneamiento: https://www.infraestructurapublica.cl/wp-content/uploads/2025/05/Reporte_Andess-VF-ok.pdf
- Angeles, G., León, R., Guzmán, S., & Robledo, T. (2023). Pharmaceutical active compounds in sewage sludge: Degradation improvement and conversion into an organic amendment by bioaugmentation-composting processes. *Waste Management*, *168*, 167-178. doi:10.1016/j.wasman.2023.05.055
- Archana, G., Dhodapkar, R., & Kumar, A. (10 de Agosto de 2017). Ecotoxicological risk assessment and seasonal variation of some pharmaceuticals and personal care products in the sewage treatment plant and surface water bodies (lakes). *Environ Monit Assess*, *189*. doi:10.1007/s10661-017-6148-3
- Arsenault, J. (2012). *Beginner's Guide to SPE (Solid-Phase Extraction)*. Waters Corporation.
- Aryal, S. (24 de mayo de 2024). *HPLC: Principle, Parts, Types, Uses, Diagram*. Obtenido de Microbe Notes: <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>
- Ashfaq, M., Nawaz, K., Saif Ur Rehman , M., Mustafa, G., Faizan, M., Sun, Q., . . . Yu, C. (Febrero de 2017). Ecological risk assessment of pharmaceuticals in the receiving environment of pharmaceutical wastewater in Pakistan. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 31-39. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.10.029
- Aydin, S., Ulvi, A., Bedük, F., & Aydin,, M. (15 de Abril de 2022). Pharmaceutical residues in digested sewage sludge: Occurrence, seasonal variation and risk assessment for soil. *Science of The Total Environment*, *817*. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.152864
- Baeza , E. (abril de 2025). *Situación actual de los servicios sanitarios de agua potable y alcantarillado en zonas urbanas y rurales en Chile*. Obtenido de Biblioteca del Congreso Nacional de Chile: https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/37115/1/Minuta_situacion_SS_Chile_F.pdf
- Barbosa, A., de Melo Vieira, A., & Machado, J. (julio de 2023). Trends and challenges in analytical chemistry for multi-analysis of illicit drugs employing wastewater-based epidemiology. *Anal Bioanal Chem.*, *415*, 3749-3758. doi:10.1007/s00216-023-04644-4



- Barrios, C., Rostro, M., Muñoz, B., Iqbal, H., Kannan, S., & Parra, R. (2018). Emergent contaminants: Endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation – A review. *Science of The Total Environment*, *612*, 1516-1531. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.013
- Batley, G. (1999). Quality Assurance in Environmental Monitoring. *Mar. Pollut. Bull.*, *39*, 23–31. doi:10.1016/S0025-326X(99)00016-8
- Bean, T., Rattner, B., Lazarus, R., Day, D., Burket, S., Brooks, B., . . . Bowerman, W. (2018). Pharmaceuticals in water, fish and osprey nestlings in Delaware River and Bay. *Environmental Pollution*, *232*, 533-545. doi:10.1016/j.envpol.2017.09.083
- Becerra, M., Honda, L., & Richter, P. (Diciembre de 2015). Ultra-high-performance liquid chromatography—Time-of-flight high resolution mass spectrometry to quantify acidic drugs in wastewater. *Journal of Chromatography A*, *1423*, 96-103. doi:10.1016/j.chroma.2015.10.071
- Belay, M., Precht, U., Mortensen, P., Marengo, E., & Robotti, E. (23 de Febrero de 2022). A Fully Automated Online SPE-LC-MS/MS Method for the Determination of 10 Pharmaceuticals in Wastewater Samples. *Toxics*, *10*. doi:10.3390/toxics10030103
- Biel, M., Corada, C., & Lara, P. (2018). Monitoring the occurrence of pharmaceuticals in soils irrigated with reclaimed wastewater. *Environmental Pollution*, *235*, 312-321. doi:10.1016/j.envpol.2017.12.085
- BIOFIL. (24 de Diciembre de 2021). *13 mm, MCE membrane, 0,22 um*. Obtenido de www.jetbiofil.com:
<http://jetbiofil.com/uploadfiles/2022/03/20220331153623649.pdf>
- Bourdat, M., Leang, S., Bernet, N., Jacques, J., & Nélieu, S. (4 de julio de 2014). Multi-residue analysis of pharmaceuticals in aqueous environmental samples by online solid-phase extraction-ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: optimisation and matrix effects reduction by quick, easy, cheap, effective. *J Chromatogr A*, 11-23. doi:10.1016/j.chroma.2014.05.006
- Branchet, P., Arpin-Pont, L., Piram, A., Boissery, P., Wong-Wah-Chung, P., & Doumenq, P. (2021). Pharmaceuticals in the marine environment: What are the present challenges in their monitoring? *Science of the Total Environment*, *766*. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142644



- Buszewski, B., & Szultka, M. (13 de Junio de 2012). Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42, 198-213. doi:10.1080/07373937.2011.645413
- Camacho, A. (31 de Mayo de 2018). *Espectrometría De Masas (MS); Fundamento Y Equipos*. Obtenido de Analitek: <https://blog.analitek.com/espectrometria-de-masas-ms-fundamento-y-equipos-0-1>
- Campos, M., Plaza, P., Sánchez, J., Malato, S., & Agüera, A. (21 de Julio de 2017). Fast determination of pesticides and other contaminants of emerging concern in treated wastewater using direct injection coupled to highly sensitive ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 84-94. doi:10.1016/j.chroma.2017.05.053
- Cañas, A., Valdebenito, S., & Richter, P. (2014). A new rotating-disk sorptive extraction mode, with a copolymer of divinylbenzene and N-vinylpyrrolidone trapped in the cavity of the disk, used for determination of florfenicol residues in porcine plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry volume*, 406, 2205–2210. doi:10.1007/s00216-014-7628-8
- Cao, S.-S., Duan, Y.-P., Tu, Y.-J., Tang, Y., Liu, J., Zhi, W.-D., & Dai, C. (2020). Pharmaceuticals and personal care products in a drinking water resource of Yangtze River Delta Ecology and Greenery Integration Development Demonstration Zone in China: Occurrence and human health risk assessment. *Science of The Total Environment*, 271. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137624
- Carbone , C., Rende, P., Comberinati, P., Carnovale, D., Mammí, M., & De Sarro, G. (4 de Diciembre de 2013). La seguridad del ketoprofeno en diferentes edades. *J Pharmacol Pharmacother*, 99 –103. doi:10.4103/0976-500X.120967
- Carnevali de Falke, S., & Degrossi, M. (2017). Consumo excesivo de cafeína y eventuales poblaciones de riesgo. *Acta toxicológica argentina*. *Acta toxicológica argentina*, 25(3), 67-79. Obtenido de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-37432017000300001&lng=es&tlng=es.
- Castiglioni, S., Davoli, E., Riva, F., Palmiotto, M., Camporini, P., Manen, A., & Zuccato, E. (Abril de 2018). Data on occurrence and fate of emerging contaminants in a urbanised



- area. *Data in Brief*, 18, 533-543. doi:10.1016/j.dib.2018.01.029
- CENAFAR. (2013). *Medicamentos en Chile: Revisión de la evidencia del mercado nacional de fármacos*. Obtenido de Centro Nacional de Farmacoeconomía: <https://www.ispch.cl/sites/default/files/EstudioMedicamentos-22012014A.pdf>
- Cima. (Abril de 2017). *Metformina Pharmakern 850 mg comprimidos recubiertos con película EFG*. Obtenido de Agencia Española de medicamentos y productos sanitarios: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/67066/67066_ft.pdf
- Cima. (Diciembre de 2020). *Cinfamar cafeína 50 mg/50 mg comprimidos recubiertos*. Obtenido de Agencia Española de medicamentos y productos sanitarios: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/69197/FT_69197.pdf
- Cima. (Diciembre de 2021). *Carbamazepina NORMON 200 mg comprimidos EFG*. Obtenido de Agencia Española de medicamentos y productos sanitarios: https://cima.aemps.es/cima/dohtml/p/62620/P_62620.html
- Cima. (Marzo de 2021). *Claritromicina Normon 250 mg comprimidos recubiertos EFG*. Obtenido de Agencia Española de medicamentos y productos sanitarios: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/64825/FT_64825.pdf
- Cole-Parmer. (enero de 2025). *Cole-Parmer*. Obtenido de Chemical Compatibility Database: <https://www.coleparmer.com/chemical-resistance>
- Commission. (12 de agosto de 2002). Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Journal of the European Communities*. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Compañó , R., & Ríos , Á. (2002). *Garantía de la Calidad en Los Laboratorios Analíticos*. SINTESIS.
- Cooperativa. (18 de Marzo de 2017). *Ibuprofeno, diclofenaco o naproxeno:Cuál es el antiinflamatorio más seguro*. Obtenido de Cooperativa.cl: <https://cooperativa.cl/noticias/sociedad/salud/medicamentos/ibuprofeno-diclofenaco-o-naproxeno-cual-es-el-antiinflamatorio-mas/2017-03-18/094204.html>
- Coquery, M., Morin, A., Bécue, A., & Lepot, B. (2005). Priority substances of the European Water Framework Directive: analytical challenges in monitoring water quality. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24, 117-127. doi:10.1016/j.trac.2004.11.004



- Cross, T. (4 de marzo de 2019). *HPLC or UHPLC?* Obtenido de Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/blog/analyteguru/hplc-or-uhplc/#:~:text=Differences%20between%20HPLC%20and%20UHPLC&text=Particle%20s>
- CWS BROAD. (14 de agosto de 2023). *¿Qué es la cromatografía en columna?* Obtenido de CWS BROAD: <https://cwsabroad.com/es/que-es-la-cromatografia-en-columna/>
- Díaz, M., & Barceló, D. (2005). LC–MS/MS trace analysis of antimicrobials in water, sediment and soil. *Trends in Analytical Chemistry*, 24, 645-657. doi:10.1016/j.trac.2005.05.005
- Dong, M. (julio de 2019). *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists 2nd Edition*. Wiley. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/344397502_HPLC_and_UHPLC_for_Practicing_Scientists_2nd_Edition
- ESGinnova. (25 de Noviembre de 2019). *ISO 46001*. Obtenido de Grupo ESGinnova: <https://www.nueva-iso-14001.com/2019/11/nueva-norma-iso-460012019-sobre-la-gestion-de-la-eficiencia-del-agua/>
- Fabregat, D., Gracia, E., Ibáñez, M., Pitarch, E., & Hernández, F. (2023). Analytical key issues and challenges in the LC-MS/MS determination of antibiotics in wastewater. *Analytica Chimica Acta*, 1239. doi:10.1016/j.aca.2022.340739
- Farajzadeh, M., Nouri, N., & Khorram, P. (2014). Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 55, 14-23. doi:10.1016/j.trac.2013.11.006
- Fundación Chile. (14 de Noviembre de 2022). *Escenarios Hídricos 2030*. Obtenido de Fundación Chile (FCh): <https://fch.cl/iniciativa/escenarios-hidricos-2030/>
- Gil, M., Soto, A., Usma, J., & Gutiérrez, O. (Diciembre de 2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia*, VII(2), págs. 52-73. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/pml/v7n2/v7n2a05.pdf>
- Gilart, N., Miralles, N., Marcé, R., Borrull, F., & Fontanals, N. (24 de Abril de 2013). Novel coatings for stir bar sorptive extraction to determine pharmaceuticals and personal care products in environmental waters by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 774, 51-60. doi:10.1016/j.aca.2013.03.010



- Giwa, A., Yusuf, A., Balogun, H., Sambudi, N., Bilad, M., Adeyemi, I., . . . Curcio, S. (2021). Recent advances in advanced oxidation processes for removal of contaminants from water: A comprehensive review. *Process Safety and Environmental Protection*, 146, 220-256. doi:10.1016/j.psep.2020.08.015
- Goldstein, E. (abril de 2021). *Análisis de la implementación de la Ley CENABAST pasado 2 años desde su entrada en vigencia*. Obtenido de Biblioteca del Congreso Nacional de Chile (BCN): https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/33158/1/BCN_Implementacion_Ley_CENABAST.pdf
- Gómez, A., Peñas, M., Belver, C., Rodríguez, J., & Bedia, J. (1 de Diciembre de 2021). Equilibrium, kinetics and breakthrough curves of acetaminophen adsorption onto activated carbons from microwave-assisted FeCl₃-activation of lignin. *Separation and Purification Technology*, 278. doi:10.1016/j.seppur.2021.119654
- Gros, M., Petrović, M., Ginebreda, A., & Barceló, D. (Enero de 2010). Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environment International*, 36, 15-26. Obtenido de 10.1016/j.envint.2009.09.002
- Grujić, S., Vasiljević, T., & Laušević, M. (19 de Junio de 2009). Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography–ion trap–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 4989-5000. doi:10.1016/j.chroma.2009.04.059
- Guan, J., Zhang, C., Wang, Y., Guo, Y., Huang, P., & Zhao, L. (2016). Simultaneous determination of 12 pharmaceuticals in water samples by ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.*, 408, 8099–8109. doi:10.1007/s00216-016-9913-1
- Haap, T., Triebkorn, R., & Köhler, H.-R. (3 de Septiembre de 2008). Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: Immobilisation and hsp70-induction. *Chemosphere*, 253-259. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.05.062
- Harris, D. (2016). *Análisis químico cuantitativo* (Tercera ed.). Barcelona, España: Reverté.
- Hawash, H., Moneer, A., Galhoum, A., Elgarahy, A., Mohamed, W., Samy, M., . . . Attia, N.



- (abril de 2023). Occurrence and spatial distribution of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the aquatic environment, their characteristics, and adopted legislations. *Journal of Water Process Engineering*, 52. doi:10.1016/j.jwpe.2023.103490
- Hermes, N., Jewell, K., Wick, A., & Ternes, T. (5 de Enero de 2018). Quantification of more than 150 micropollutants including transformation products in aqueous samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using scheduled multiple reaction monitoring. *Journal of Chromatography A*, 1531, 64-73. doi:10.1016/j.chroma.2017.11.020
- Hernández, R., Guzmán, J., Hinojosa, L., Ramos, N., & Hernández, A. (4 de junio de 2021). Determination of Pharmaceuticals Discharged in Wastewater from a Public Hospital Using LC-MS/MS Technique. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 65, 94-108. Obtenido de <https://doi.org/10.29356/jmcs.v65i1.1439>
- Herrera, J., Ibáñez, M., Calzadilla, W., Cabrera, A., García, V., Salazar, R., . . . Miralles, S. (1 de diciembre de 2024). Assessment of contaminants of emerging concern and antibiotic resistance genes in the Mapocho River (Chile): A comprehensive study on water quality and municipal wastewater impact. *Science of The Total Environment*, 954. doi:10.1016/j.scitotenv.2024.176198
- Higson, S. (2007). *Química Analítica* (Primera ed.). Mc Graw Hill.
- Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications* (Tercera ed.). Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd. Obtenido de <https://www.usp.br/massa/2014/qfl2144/pdf/MassSpectrometry.pdf>
- Huang, L., Shen, R., & Shuai, Q. (2021). Adsorptive removal of pharmaceuticals from water using metal-organic frameworks: A review. *Journal of Environmental Management*, 277. doi:10.1016/j.jenvman.2020.111389
- ICH. (noviembre de 2005). *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (RI)*. Obtenido de International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
- Igere, B., Okoh, A., & Nwodo, U. (2020). Wastewater treatment plants and release: The vase of Odin for emerging bacterial contaminants, resistance and determinant of



- environmental wellness. *Emerging Contaminants*, 6, 212-224. doi:10.1016/j.emcon.2020.05.003
- Inostroza, P., Soriano, Y., Carmona, E., Krauss, M., Brack, W., Backhaus, T., & Quiñones, R. (agosto de 2024). Preliminary dataset of emerging contaminants in surface water, bottom water, porewater, and sediment: Urban and aquaculture impacts in Coliumo bay and Caucahue Channel in the central and southern coast of Chile. *Data in Brief*, 55. doi:10.1016/j.dib.2024.110593
- Instituto de Salud Pública. (27 de Diciembre de 2021). *Instituto de Salud Pública*. Obtenido de ISP informa sobre los medicamentos más vendidos durante el año 2021: <https://www.ispch.gob.cl/noticia/isp-informa-sobre-los-medicamentos-mas-vendidos-durante-el-ano-2021/>
- Jachero, L., Sepúlveda, B., Ahumada, I., Fuentes, E., & Richter, P. (2013). Rotating disk sorptive extraction of triclosan and methyl-triclosan from water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 7711–7716. doi:10.1007/s00216-012-6679-y
- Jacob, R., Araújo, C., de Souza Santos, L., Rezende Moreira, V., Rocha Lebron, Y., & Lange, L. (2021). The environmental risks of pharmaceuticals beyond traditional toxic effects: Chemical differences that can repel or entrap aquatic organisms. *Environmental Pollution*, 268. doi:10.1016/j.envpol.2020.115902
- Jakimska, A., Kot-Wasik, A., & Namieśnik, J. (2014). *he Current State-of-the-Art in the Determination of Pharmaceutical Residues in Environmental Matrices Using Hyphenated Techniques*, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. doi:10.1080/10408347.2013.835244
- Jelic , A., Cruz, C., Marco, E., Sarrà, M., Perez, S., Vicent, T., . . . Barcelo, D. (15 de Marzo de 2012). Degradation of carbamazepine by *Trametes versicolor* in an air pulsed fluidized bed bioreactor and identification of intermediates. *Water Research*, 46, 955-964. doi:10.1016/j.watres.2011.11.063
- Jeong, Y., Schaeffer, A., & Smith, K. (enero de 2017). Equilibrium partitioning of organic compounds to OASIS HLB® as a function of compound concentration, pH, temperature and salinity. *Chemosphere*, 174. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.01.116
- Jones, E. (08 de Febrero de 2021). *Según una investigación, el tratamiento de aguas*



- residuales en el mundo aumenta al 50%*. Obtenido de iagua: <https://www.iagua.es/noticias/europa-press/segun-investigacion-tratamiento-aguas-residuales-mundo-aumenta-al-50#:~:text=%22A%20nivel%20mundial%2C%20cada%20a%C3%B1o,y%20autor%20principal%20del%20estudio>.
- Khalil, A., Memon, F., Tabish, T., Salmon, D., Zhang, S., & Butler, D. (2020). Nanostructured porous graphene for efficient removal of emerging contaminants (pharmaceuticals) from water. *Chemical Engineering Journal*, 398. doi:10.1016/j.cej.2020.125440
- Kovačević, S., Radišić, M., Laušević, M., & Dimkić, M. (2017). Occurrence and behavior of selected pharmaceuticals during riverbank filtration in The Republic of Serbia. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 2075–2088. doi:10.1007/s11356-016-7959-4
- Kumar, V., Agrawal, S., Ahmad Bhat, S., Pinê Américo-Pinheiro, J., Kumar Shahi, S., & Kumar, S. (Mayo de 2022). Environmental impact, health hazards, and plant-microbes synergism in. *Cleaner Chemical Engineering*. doi:10.1016/j.clce.2022.100030
- Kwak, K., Ji, K., Kho, Y., Kim, P., Lee, J., Ryu, J., & Choi, K. (Agosto de 2018). Chronic toxicity and endocrine disruption of naproxen in freshwater waterfleas and fish, and steroidogenic alteration using H295R cell assay. *Chemosphere*, 204, 156-162. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.04.035
- Lalović, B., Đurkić, T., Vukčević, M., Janković-Častvan, I., Kalijadis, A., Laušević, Z., & Laušević, M. (24 de septiembre de 2017). Solid-phase extraction of multi-class pharmaceuticals from environmental water samples onto modified multi-walled carbon nanotubes followed by LC-MS/MS. *Environ Sci Pollut Res Int.*, 25. doi:10.1007/s11356-017-9748-0
- Leiva, L., & Sandoval, G. (23 de diciembre de 2018). *Encuesta Nacional de Salud revela aumento en uso de medicamentos*. Obtenido de La Tercera: <https://www.latercera.com/nacional/noticia/encuesta-nacional-salud-revela-aumento-uso-medicamentos/458621/>
- Li, D., Yu, T., Zhang, Y., Yang, M., Li, Z., Liu, M., & Qi, R. (Junio de 2010). Antibiotic



- Resistance Characteristics of Environmental Bacteria from an Oxytetracycline Production Wastewater Treatment Plant and the Receiving River. *Appl Environ Microbiol.* , 76, 3444–3451. doi:10.1128/AEM.02964-09
- Maasz, G., Mayer, M., Zrinyi, Z., Molnar, E., Kuzma, M., Fodor, I., . . . Takács, P. (10 de Agosto de 2019). Spatiotemporal variations of pharmacologically active compounds in surface waters of a summer holiday destination. *Science of The Total Environment*, 677, 545-555. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.04.286
- MacKeown, H., Scapuzzi, C., Baglietto, M., Benedetti, B., Di Carro, M., & Magi, E. (15 de mayo de 2024). Wastewater and seawater monitoring in Antarctica: Passive sampling as a powerful strategy to evaluate emerging pollution. *Science of The Total Environment*, 925. doi:10.1016/j.scitotenv.2024.171755
- Madrid, Y., & Pedrero, Z. (2007). Water sampling: Traditional methods and new approaches in water sampling strategy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26, 293-299. doi:10.1016/j.trac.2007.01.002
- Magnusson, B., & Örnemark, U. (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (Segunda ed.). Obtenido de www.eurachem.org
- Manzo, V., Honda, L., Navarro, O., Ascar, L., & Richter, P. (Octubre de 2014). Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from waste water samples by rotating-disk sorptive extraction. *Talanta*, 128, 486-492. doi:10.1016/j.talanta.2014.06.003
- Marco, E., Pérez, M., Cruz, C., Caminal, G., & Vicent, T. (15 de Abril de 2010). Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. *Journal of Hazardous Materials*, 176, 836-842. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.11.112
- Matuszewski, B., Constanzer, M., & Chavez-Eng, C. (4 de junio de 2003). Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75, 3019–3030. doi:10.1021/ac020361s
- Merck. (2023). *Extracción en fase sólida (SPE)*. Obtenido de www.sigmaaldrich.com: <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/applications/analytical-chemistry/sample-preparation/solid-phase-extraction>



- Ministerio de Agricultura. (20 de Noviembre de 2023). *Calidad de Aguas*. Obtenido de Ministerio de Agricultura: <https://www.cnr.gob.cl/temas-transversales/calidad-de-aguas/>
- Ministerio de Asuntos Exteriores. (marzo de 2024). *Encuesta del mercado farmacéutico*. Obtenido de Pharmexcil: https://pharmexcil.com/uploads/files/CHILE_PHARMACEUTICAL_MARKET_REPORT.pdf
- Ministerio de Economía, Fomento y Turismo. (Febrero de 2018). *Guía de validación de métodos analíticos*. (Serna Pesca, Ed.) Obtenido de Ministerio de Economía, Fomento y Turismo.
- Miossec, C., Lancelleur, L., & Monperrus, M. (abril de 2019). Multi-residue analysis of 44 pharmaceutical compounds in environmental water samples by solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 42, 1853-1866. doi:10.1002/jssc.201801214
- Misal, L. (2008). *Síntesis vía microondas del proligando bidentado ácido N-bencil-2-amino-1-ciclopentenditiocarboxílico y estudio de su química de coordinación frente a: Cobalto(II), Níquel(II), Cobre(II) y Paladio(II)*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/273321368_Sintesis_via_microondas_del_proligando_bidentado_acido_N-bencil-2-amino-1-ciclopentenditiocarboxilico_y_estudio_de_su_quimica_de_coordinacion_frente_a_CobaltoII_NiquelII_CobreII_y_PaladioII
- Moncada, M. (2015). *Evaluación de los efectos de efluentes de plantas tratamiento de aguas servidas sobre *Oncorhynchus mykiss* mediante el uso de experimentos de laboratorio y erreno en la cuenca del río Biobío*. Universidad de Concepción. doi:http://repositorio.udec.cl/jspui/bitstream/11594/1860/1/Tesis_Evaluacion_de_los_efectos_de_efluentes.pdf
- Morales, E. (12 de Abril de 2021). *Biblioteca del Congreso Nacional de Chile*. Obtenido de Escasez hídrica en Chile y las proyecciones del recurso: <https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/32023/3/Escasez%20hi%CC%81drica%20en%20Chile%20y%20las%20proyecciones%20del%20recurso.pdf>



- Munzhelele, E., Ayinde, W., Gitari, W., & Mudzielwana, R. (2025). Optimization of solid phase extraction for simultaneous quantification of efavirenz and levonorgestrel in wastewater using HPLC. *Frontiers in Environmental Science*, 13. doi:10.3389/fenvs.2025.1539932
- Naciones Unidas. (2010). *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*. Obtenido de UNODC: Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito: https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf
- Naciones Unidas. (2018). *Progress on level of water stress, Global baseline for SDG indicator 6.4.2*. Obtenido de <http://www.unwater.org/app/uploads/2018/08/642-progress-on-level-of-water-stress-2018.pdf>
- Naciones Unidas. (2023). *Informe de los Objetivos de Desarrollo Sostenible: Edición Especial*. Recuperado el 14 de Noviembre de 2023, de https://unstats.un.org/sdgs/report/2023/The-Sustainable-Development-Goals-Report-2023_Spanish.pdf?_gl=1*_harjc7*_ga*ODk2NDU3ODY3LjE2OTk5MzQ5MTg.*_ga_TK9BQL5X7Z*MTY5OTkzNDkxNy4xLjAuMTY5OTkzNDkxNy4wLjAuMA.
- Núñez, C. (11 de Marzo de 2022). *Escasez Hídrica para el 47,5% de la población*. Obtenido de Dirección General de Aguas : <https://dga.mop.gob.cl/escasez-hidrica-para-el-475-de-la-poblacion/>
- Oaks, J., Gilbert, M., Virani, M., Watson, R., Rideout, B., Shivaprasad, H., . . . Khan, A. (2004). Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*, 427, 630-633. doi:10.1038/nature02317
- Olivieri, A., & Escandar, G. (2014). Capítulo 6 Analytical Figures of Merit. En A. Olivieri, & G. M. Escandar, *Practical Three-Way Calibration*. Elsevier Inc.
- OPS. (2023). *Abuso de sustancias*. Recuperado el 25 de Mayo de 2023, de Organización Panamericana de la Salud: <https://www.paho.org/es/temas/abuso-sustancias>
- Organización Mundial de Salud. (22 de Marzo de 2017). *Agua y Salud*. Obtenido de OSPAT:



- <https://www.ospat.com.ar/blog/medio-ambiente/en-2025-la-mitad-de-la-poblacion-mundial-vivira-en-zonas-con-escasez-de-agua/>
- Pardo, R., Alvarez, Y., Barral, D., & Farré, M. (2007). Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. *Adicciones*, 19(3), 225-238. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=289122084002>
- Parolini, M. (20 de Octubre de 2020). Toxicity of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: A review. *Science of The Total Environment*.
doi:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969720335634?via%3Dihub>
- Parys, W., Dołowy, M., & Pyka-Pajak, A. (17 de Enero de 2022). Significance of Chromatographic Techniques in Pharmaceutical Analysis. *Processes*, 10. doi:10.3390/pr10010172
- Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman, C., & Moh, D. (2019). Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. *Chemical Reviews*, 119, 3510-3673. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00299
- Pazdro, K., Borecka, M., Siedlewicz, G., Bia.k-Bieli.ska, A., & Stepnowski, P. (2016). Analysis of the Residues of Pharmaceuticals in Marine Environment: State-of-the-art, Analytical Problems and Challenges. *Current Analytical Chemistry*, 12, 202-226. doi:10.2174/1573411012666151009193536
- Pérez, V., Mainero, L., Tomai, P., Fanali, S., & Gentili, A. (29 de Agosto de 2017). Recent advancements and future trends in environmental analysis: Sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 983, 9-41. doi:10.1016/j.aca.2017.06.029
- Petrović, M., Sabater, S., & Elosegi, A. (2016). Emerging Contaminants in River Ecosystems. En D. Barceló, & A. Kostianoy (Edits.), *The Handbook of Environmental Chemistry* (Vol. 46). Springer.
- Polycompany. (2017). *These Phases ROCK Your LC Laboratory*. Obtenido de Phenomenex: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/1e99d9c6-6cfc-407a-bca0->



- 234a51d9d647.pdf?_gl=1*7c0a5d*_ga*ODM5MTE1OTk1LjE2NTUzNjY0MzE.*
_ga_X15MFH3TKC*MTY1NTk3MDMyMy40LjEuMTY1NTk3NDA1NS40MA..
- PubChem. (Enero de 2025). *National Library of Medicine*. Obtenido de PubChem:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Qin, H., Liu, H., Liu, Y., Di, S., Bao, Y., Zhai, Y., & Zhu, S. (24 de Mayo de 2023). Recent advances in sample preparation and chromatographic analysis of pharmaceuticals and personal care products in environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. doi:10.1016/j.trac.2023.117112
- Raza, M., AlOthman, Z., & Rahman, N. (2017). Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1409-S1421. doi:10.1016/j.arabjc.2013.04.016
- Reichert, G., Hilgert, S., Fuchs, S., & Rodrigues, J. (diciembre de 2019). Emerging contaminants and antibiotic resistance in the different environmental matrices of Latin America. *Environmental Pollution*, 255. doi:10.1016/j.envpol.2019.113140
- Rephile. (2023). *RephiDuo S Pack 1, reemplaza SIMPAK0R1*. Obtenido de www.rephile.com: <https://rephile.com/rephiduo-s-pack-1-replace-simpak-1/>
- Robles, J., García, J., Molina, A., Rodríguez, A., Agüera, A., Gómez, M., . . . Herrera, S. (2010). *Protocolo de técnicas de muestreo y técnicas analíticas de contaminantes emergentes y prioritarios*.
- Rodríguez, D., Serrano, H., Delgado, A., Nolasco, D., & Saltiel, G. (2020). *From Waste to Resource : Shifting Paradigms for Smarter Wastewater Interventions in Latin America and the Caribbean*. Washington, DC.: World Bank. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10986/33436>
- Rodríguez, L. (2015). Atenolol: Antianginosos • Antihipertensivos • Antiadrenérgicos. En M. Hill, *En Vademécum Académico de Medicamentos*. Obtenido de McGraw Hill: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1552§ionid=90367443>
- Roscher, J., Vogel, M., & Karst, U. (29 de Julio de 2016). Identification of ultraviolet transformation products of diclofenac by means of liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1457, 59-65. doi:10.1016/j.chroma.2016.06.027



- Rout, P., Zhang, T., Bhunia, P., & Surampalli, R. (20 de Enero de 2021). Treatment technologies for emerging contaminants in wastewater treatment plants: A review. *Science of The Total Environment*, 753. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141990
- Ruiz, M., García, M., Berthod, A., & Carda, S. (1 de Agosto de 2014). Are analysts doing method validation in liquid chromatography? *J Chromatogr A*. doi:10.1016/j.chroma.2014.05.052
- Sadutto, D., & Picó, Y. (2020). Sample Preparation to Determine Pharmaceutical and Personal Care Products in an All-Water Matrix: Solid Phase Extraction. *Molecules*, 25. doi:10.3390/molecules25215204
- Samal, K., Mahapatra, S., & Md Hibzur, A. (16 de Junio de 2022). Pharmaceutical wastewater as Emerging Contaminants (EC): Treatment technologies, impact on environment and human health. *Energy Nexus*, 6. doi:10.1016/j.nexus.2022.100076
- Schäffer, A., Groh, K., Sigmund, G., Backhaus, T., Bertram, M., Carney, B., . . . Scheringer, M. (2023). Conflicts of Interest in the Assessment of Chemicals, Waste, and Pollution. *Environmental Science & Technology*, 57, 19066-19077. doi:10.1021/acs.est.3c04213
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., & Wintermayr, H. (10 de Junio de 2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat Toxicol*, 68(2), 141-50. doi:10.1016/j.aquatox.2004.03.014
- Sharma, B., Bečanová, J., Scheringer, M., Sharma, A., Bharat, G., Whitehead, P., . . . Nizzetto, L. (1 de Enero de 2019). Health and ecological risk assessment of emerging contaminants (pharmaceuticals, personal care products, and artificial sweeteners) in surface and groundwater (drinking water) in the Ganges River Basin, India. *Science of The Total Environment*, 646, 1459-1467. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.07.235
- Sifakis, S., Androutsopoulos, V., Tsatsakis, A., & Spandidos, D. (Abril de 2017). Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 51, 56-70. doi:10.1016/j.etap.2017.02.024
- Sigma Aldrich. (enero de 2025). *Merck*. Obtenido de Ficha de datos de seguridad: <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es>



- Sigma-Aldrich. (09 de Noviembre de 2022). *Ficha de datos de seguridad: Acetaminophen*.
Obtenido de www.sigmaaldrich.com:
<https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/sds/sial/a3035>
- Sigma-Aldrich. (09 de Noviembre de 2022). *Ficha de datos de seguridad: Carbamazepina*.
Obtenido de www.sigmaaldrich.com:
<https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/sds/sigma/c4024>
- Sigma-Aldrich. (09 de Noviembre de 2022). *Ficha de datos de seguridad: Diclofenaco sódico*.
Obtenido de www.sigmaaldrich.com:
<https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/sds/sigma/d6899>
- Sigma-Aldrich. (11 de Noviembre de 2022). *Ficha de datos de seguridad: Ibuprofeno*.
Obtenido de www.sigmaaldrich.com:
<https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/sds/sigma/i4883>
- Sigma-Aldrich. (09 de Noviembre de 2022). *Ficha de datos de seguridad: Naproxen sodium*.
Obtenido de www.sigmaaldrich.com:
<https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/sds/sigma/m1275>
- Sigma-Aldrich. (21 de Marzo de 2023). *Ficha de datos de seguridad: Acetonitrilo*. Obtenido de www.sigmaaldrich.com: <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/sds/sigald/34851>
- Singh , S., Agarwal, A., Gupta, T., & Maliyekkal, S. (2022). *New Trends in Emerging Environmental Contaminants*. India: Springer Nature. doi:10.1007/978-981-16-8367-1
- Soriano, Y., Carmona, E., Renovell, J., Picó, Y., Brack, W., Krauss, M., . . . Inostroza, P. (1 de diciembre de 2024). Co-occurrence and spatial distribution of organic micropollutants in surface waters of the River Aconcagua and Maipo basins in Central Chile. *Science of The Total Environment*, 954. doi:10.1016/j.scitotenv.2024.176314
- Statista. (Junio de 2024). *Productos farmacéuticos*. Obtenido de Statista:
<https://www.statista.com/outlook/hmo/pharmaceuticals/worldwide>
- Statista. (2025). *Pharmaceuticals - Worldwide*. Obtenido de Statista:
<https://www.statista.com/outlook/hmo/pharmaceuticals/worldwide#global-comparison>
- Sun, J., Luo, Q., Wang, D., & Wang, Z. (2015). Occurrences of pharmaceuticals in drinking



- water sources of major river watersheds, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 117, 132-140. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.03.032
- Supelco. (11 de Noviembre de 2022). *Ficha de datos de seguridad: 1,1-Dimetilbiguanida, clorhidrato*. Obtenido de www.sigmaaldrich.com: <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/sds/sial/phr1084>
- Supelco. (09 de Noviembre de 2022). *Ficha de datos de seguridad: Atenolol*. Obtenido de www.sigmaaldrich.com: <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/sds/sial/phr1909>
- Supelco. (09 de Noviembre de 2022). *Ficha de datos de seguridad: Claritromicina*. Obtenido de www.sigmaaldrich.com: <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/sds/sial/phr1038>
- Supelco. (09 de Septiembre de 2022). *Ficha de datos de seguridad: Ketoprofeno*. Obtenido de www.sigmaaldrich.com: <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/sds/sial/phr1375>
- Supelco. (11 de Noviembre de 2022). *Ficha de datos de seguridad: Caffeine*. Obtenido de www.sigmaaldrich.com: <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/sds/sial/phr1009>
- Supelco. (28 de Marzo de 2023). *Ficha de datos de seguridad: Ácido fórmico 98-100% p.a. EMSURE®*. Obtenido de www.sigmaaldrich.com: <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/sds/mm/1.00264>
- Supelco. (28 de Marzo de 2023). *Ficha de datos de seguridad: Metanol hypergrade para cromatografía en fase líquida (LC/MS) LiChrosolv®*. Obtenido de www.sigmaaldrich.com: <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/sds/mm/1.06035>
- Supelco. (28 de Marzo de 2023). *Ficha de datos de seguridad: Metanol para cromatografía en fase líquida*. Obtenido de www.sigmaaldrich.com: <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/sds/mm/1.06018>
- Tejada, C., Quiñonez, E., & Peña, M. (2014). Contaminantes Emergentes en Aguas: Metabolitos de Fármacos. Una Revisión. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, 10, 80-101. doi:10.18359/rfcb.341
- Ternes, T. (agosto de 2001). Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 20(8), 419-434. doi:10.1016/S0165-9936(01)00078-4
- Thermo Scientific. (2019). *TSQ Fortis triple quadrupole mass spectrometer*. Obtenido de www.anchem.pl: <https://www.anchem.pl/wp-content/uploads/2021/07/PS-65187-TSQ-Fortis-PS65187-EN.pdf>



- Thermo Scientific. (2023). *Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Standard Systems*. Obtenido de www.thermofisher.com: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/brochures/BR-70154-LC-UltiMate-3000-Standard-BR70154-EN.pdf>
- Tiong, K., Rapp, H., Egli, M., Hartmann, A., Steele, J., Sosa, J., . . . Barron, L. (Noviembre de 2020). High-throughput multi-residue quantification of contaminants of emerging concern in wastewaters enabled using direct injection liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Hazardous Materials*, 398. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.122933
- Triebkorn, R., Casper, H., Scheil, V., & Schwaiger, J. (Febrero de 2007). Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibric acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Anal Bioanal Chem*, 387(4), 1405-1416. doi:10.1007/s00216-006-1033-x
- UNESCO. (2017). *Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2017. Aguas residuales: El recurso desaprovechado*. Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura, WWAP (Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas), París.
- Villa, D. (2012). *Presencia de contaminantes emergentes en aguas y su impacto en el ecosistema. Estudio de caso: productos farmacéuticos en la cuenca del río biobío, Región del BioBío, Chile*. Universidad de Chile.
- Volonté, M., & Quiroga, P. (2013). *Análisis Farmacéutico* (Primera ed.). (U. N. Plata, Ed.) Buenos Aires, Argentina: Editorial de la Universidad de la Plata.
- Watson, T., & Sparkman, D. (2015). *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation* (4 ed.). Wiley.
- Wilkinson, J., Boxall, A., Koplín, D., & Teta, C. (14 de Febrero de 2022). Contaminación farmacéutica de los ríos del mundo. *PNAS*, 119(8). doi:10.1073/pnas.2113947119
- Wilkinson, J., Boxall, A., & Koplín, D. (2019). A Novel Method to Characterise Levels of Pharmaceutical Pollution in Large-Scale Aquatic Monitoring Campaigns. *applied sciences*. doi:10.3390/app9071368
- Willard, H., Merritt, L., Dean, J., & Settle, F. (1991). *Métodos Instrumentales de Análisis*. California: Grupo Editorial Iberoamericana.



- Wille, K., Brabander, H., Vanhaecke, L., Wulf, E., Van Caeter, P., & Janssen, C. (2012). Coupled chromatographic and mass-spectrometric techniques for the analysis of emerging pollutants in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 35, 87-108. doi:10.1016/j.trac.2011.12.003
- Wille, K., De Brabander, H., Vanhaecke, L., De Wulf, E., Van Caeter, P., & Janssen, C. (mayo de 2012). Coupled chromatographic and mass-spectrometric techniques for the analysis of emerging pollutants in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 87-108. doi:10.1016/j.trac.2011.12.003
- Wong, C., & MacLeodb , S. (2009). JEM Spotlight: Recent advances in analysis of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Environmental Monitoring*, 923-936. doi:10.1039/b819464e
- Yang, L., Yu, L., & Ray, M. (Julio de 2008). Degradation of paracetamol in aqueous solutions by TiO₂ photocatalysis. *Water Res*, 42(13), 3480-3488. doi:10.1016/j.watres.2008.04.023
- Zygler , A., Wasik, A., & Namieśnik, J. (15 de Octubre de 2010). Retention behaviour of some high-intensity sweeteners on different SPE sorbents. *Talanta*, 82, 1742-1748. doi:10.1016/j.talanta.2010.07.070



Anexos.

Anexo A: Muestreo de métodos para la estandarización de la metodología.

- Angeles *et al.*, analizaron concentraciones de carbamazepina y diclofenaco en lodos de depuración por medio de un sistema de SPE con detección UHPLC/MS/MS con fuente de ionización por electropulverización electrospray. En ella, se utilizó una columna Waters® ACQUITY UHPLCC® HSS T3 C18 (100 mm × 2,1 mm, DI., tamaño de partícula de 1,8 µm), inyectando 10 µL a 40°C, a través de una fase móvil de acetonitrilo (A) y acetato de amonio 5mM con ácido fórmico al 0,1% (B). Se aplicó un gradiente con estructura: 5% de A hasta 0,3 min, 30% de A en 10 min, 65% de A en 13,3 min hasta 100% de A entre 15,5 y 17,3 min (Angeles *et al.*, 2023).
- Fabregat et al., encontró claritromicina en aguas residuales con UHPLC acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo de ionización por electropulverización. Así, se llevó a cabo la experimentación en una columna Atlantis T3 (3,0 × 150 mm, DI., 3 µm) a 40°C, un caudal de 0,4 mL/min y un volumen de inyección de 100 µL. Se usó una energía de fuente de 1kV y fases móviles de agua (A) y metanol (B), ambas con 2 mM de acetato de amonio y ácido fórmico al 0,1 %. El gradiente de fase móvil fue: 10% de B inicial, 99% de B desde 6 min a 8 min y 10% de B a 8,1 min; condición mantenida hasta 10 min (Fabregat et al., 2023).
- Wilkinson *et al.*, lleva a cabo la experimentación con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo y una columna Phenomenex Zorbax Eclipse C18 Plus con fase móvil agua de grado LCMS (A) con ácido fórmico 0,01 M y formiato de amonio 0,01 M; y, metanol al 100% (B). Se implementa una temperatura de 40°C y un gradiente inicial de 90% A, que a 5 min disminuye a 60%. Seguidamente, se redujo a 40% de A en 10 min hasta dejar un 100% de B desde 15 hasta 23 min, volviendo a la condición inicial a 23,1 min para un



período de reequilibrio de 10 min. Se distinguen cafeína, paracetamol, atenolol, carbamazepina, metformina y naproxeno (Wilkinson *et al.*, 2022).

- Aydin *et al.*, logró la identificación de ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, ketoprofeno paracetamol, claritromicina y carbamazepina en aguas de planta de tratamiento por medio de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo. En ella, se utilizó una columna Poroshell 120 EC-C18 (100 mm × DI 3 mm, tamaño de partícula 2,7 µm), con un caudal de 0,5 mL/min y una temperatura de 35 °C. El volumen de inyección fue de 2 µL, realizando una elución en gradiente con ácido fórmico al 0,5% y formiato de amonio 2mM (A) y metanol (B) para ionización positiva. En paralelo, la ionización negativa incluye como fase móvil acetato de amonio 10 mM (A) y metanol (B) (Aydin *et al.*, 2022).
- Cao *et al.*, hace uso de una columna de fase reversa Shim-pack GIST C18 (50 mm × 2,1 mm, DI., 2,0 µm), con un caudal de 400 µL/min, una temperatura de columna de 30 °C y un volumen de inyección 10 µL. Además, implementa una fase móvil de metanol (A) y agua ultrapura con ácido acético al 0,1 % (v/v) (B). El gradiente se mantuvo al 20% de A por 2 min y se incrementó al 70% de A en 0,5 min manteniéndolo por 5 min. Posterior a ello, se reestableció a las condiciones iniciales de 20% A durante 1,5 min. Se distingue diclofenaco, ketoprofeno, ibuprofeno y naproxeno (Cao *et al.*, 2020).
- Alygizakis *et al.*, logró detectar ibuprofeno, carbamazepina, claritromicina, paracetamol y diclofenaco a través de una columna Atlantis T3 C18 (100 mm × 2,1 mm, DI., 3 µm) con un modo de ionización positiva que presenta una fase móvil A de agua y metanol en 90:10 con 5mM de formiato de amonio y ácido fórmico al 0,01 % y, fase B de metanol con 5mM de formiato de amonio y ácido fórmico al 0,01%. El gradiente implementado es inicialmente de 1% de B por 1 min; luego 39% de B a 3 min hasta 14 min en donde se tiene 99,9% de B de forma isocrática hasta 6 min. En 16,1 min se vuelve a la condición inicial hasta 20 min. Para el modo negativo, se tiene una fase móvil de agua y metanol en 90:10 con 5mM de acetato de amonio (A) y B con metanol y 5 mM de acetato de amonio. Éste, utiliza el mismo gradiente que el anterior (Alygizakis *et al.*, 2020).
- Tiong *et al.*, detectaron claritromicina, carbamazepina y diclofenaco en aguas residuales



haciendo uso de cromatografía líquida con columna ($5,0 \times 3,0$ mm, DI., $2,7 \mu\text{m}$), acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo con fuente de ionización por electrospray. Se inyectó $10 \mu\text{L}$ de muestra a $0,5 \text{ mL}/\text{min}$. Las fases móviles usadas son $0,1 \%$ de ácido fórmico (A) y ácido fórmico al $0,1 \%$ en acetonitrilo:metanol ($1:1$, v/v) (B). Del mismo modo, se implementó un gradiente inicial con 10% durante $0,2$ minutos, seguido de una elución isocrática con 60% de B desde $0,2$ minutos a 3 minutos, finalizando con 100% de B a 3 minutos; manteniéndolo por 1 minuto (Tiong *et al.*, 2020).

- Jacob *et al.*, identificó metformina en un HPLC acoplado a un espectrómetro de masas con ionización por electrospray. Se aplicó una inyección de 20 mL en una columna C18 de fase inversa $50 \times 2,1$ mm (columna Shimpack XR-ODS). La fase móvil contenía ácido fórmico (A) y metanol (B). La composición del solvente comenzó con 10% de B para luego aumentar a 70% de B en 3 min, a 95% a 6 min, manteniéndolo hasta 7 min. Después, se redujo a 10% de B en 10 min, siendo una elución isocrática hasta 25 min. Con ello, se presenta una temperatura de 25°C y una energía de fuente de $4,5 \text{ kV}$ (Jacob *et al.*, 2021).
- Wilkinson *et al.*, determinó atenolol, cafeína, naproxeno, paracetamol, metformina, claritromicina y carbamazepina mediante un HPLC acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo mediante una ionización electrospray. En ella, se utiliza una columna ZORBAX Eclipse Plus C18 ($3,0 \times 100$ mm, DI., $1,8 \mu\text{m}$), una fase móvil de $0,01 \text{ M}$ de ácido fórmico y formiato de amonio (A) y, metanol (B), un caudal de $0,45 \text{ mL}/\text{min}$. El gradiente comenzó con 10% de B, aumentándolo a 40% a 5 min, 60% a 10 min, y 100% a 15 min, donde permaneció constante hasta 23 min y luego se redujo al 10% a $23,1$ min. La temperatura de la columna fue de 40°C (Wilkinson *et al.*, 2019).
- Sharma *et al.*, estimó paracetamol, atenolol, cafeína, carbamazepina, diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno y naproxeno en las muestras de río y agua subterráneas en una columna UHPLC C18 ($100 \times 2,1$ mm, DI., $1,7 \mu\text{m}$) con fases móviles con metanol (A) y agua (B), ambos con ácido fórmico al $0,01\%$ y acetato de amonio $0,1 \text{ M}$ para los primeros 5 componentes. Se generó una elución en gradiente con un contenido inicial de 10% de B, alcanzando una condición de 90% de B a 5 minutos. Así, se inyectó un volumen de $10 \mu\text{L}$ con un caudal de $0,4 \text{ mL}/\text{min}$. Seguidamente, los siguientes 4 compuestos son



determinados con metanol (A) y agua (B), ambos con ácido fórmico al 0,01% y acetato de amonio 0,1 M en una columna Xterra C18 (100 × 2,1 mm, DI., 3,5 μm) se utilizó agua con 0,1 de ácido acético y 0,1% de acetato de amonio (A); y, metanol con acetonitrilo (50:50) (B). Se llevó a cabo una condición inicial de 40:60 orgánico:agua, incrementado la fase orgánica en 100% a los 10 minutos durante 2 min. Para ello, se usó un caudal de 0,2 mL/min y un volumen de inyección de 10 μL (Sharma *et al.*, 2019).

- Castiglioni *et al.*, utilizó una columna C8 de (50 mm × 2 mm, DI., de 3 μm Phenomenex y un XTerra MS C18, 100 × 2,1 mm, DI., 3,5 μm). Para modo positivo, el eluyente A fue ácido fórmico al 0,1 % en agua y el eluyente B de acetonitrilo. La elución se inició con el 100% del eluyente A, bajado por un gradiente lineal de 10 min al 100% del eluyente B, teniendo una elución isocrática de 2 min y un gradiente lineal de 2 min al 100 % del eluyente A, que se mantuvo durante 6 min. En paralelo, el análisis en el modo de iones negativos con 0,05% en agua como eluyente A y acetonitrilo como eluyente B, se desarrolló con 100 % de eluyente A, seguido de un gradiente de 6 min al 70 % de eluyente A y 30% de eluyente B y un gradiente de 7 min al 100% de eluyente B, mantenido durante 2 min y luego de vuelta a la condición inicial por 1 min. El caudal fue de 200 L/min, donde la columna se mantuvo a temperatura ambiente. Se detecta claritromicina, diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, paracetamol, atenolol, carbamazepina, y cafeína (Castiglioni *et al.*, 2018).
- Hermes *et al.*, registra la presencia de naproxeno, ibuprofeno, atenolol, claritromicina, carbamazepina, cafeína y diclofenaco en muestras acuosas bajo HPLC acoplado a un espectrómetro de masas en tándem. Se utilizó una precolumna Zorbax EclipseXDB-C8 (2,1 × 12,5 mm, DI., 5 μm) para ionización positiva y negativa. La primera, posee una fase móvil de ácido fórmico al 0,1 % (A) y acetonitrilo (B), en la cual se ejecuta un gradiente inicial con 100 % de A durante 1 min, el cual se reduce al 80 % de A durante 1 min y luego disminuye a 0% de A a 14,5 min; condición mantenida por 5,5 min. Transcurrido 0,1 min, se incrementó el porcentaje de A a 100% hasta 25 min. Por su parte, en negativo se emplea ácido acético al 0,1 % (A) y acetonitrilo (B) como fases móviles. El gradiente comenzó en 98% A, manteniendo la elución dada por el método positivo (Hermes *et al.*, 2018).



- Albergamo *et al.*, investigó la presencia de cafeína, ibuprofeno, paracetamol, diclofenaco y carbamazepina en aguas residuales bajo un UHPLC acoplado a un espectrómetro de masas con ESI. Se separaron los analitos en una columna de fase inversa C18 (100 × 2,1 mm, DI., 2,6 μm) con fases móviles de agua (A) y metanol (B). El gradiente implementado se inició con 0% de B, variando a 50% de B a los 2,5 min; en donde se incrementa el solvente a 100% de B desde 5 min hasta 7 min, volviendo a 0% de B hasta los 11 min. Esto, se acompañó de un caudal de 0,3 mL/min y una temperatura de 40°C (Albergamo *et al.*, 2018).
- Campos *et al.*, implementó un sistema UHPLC acoplado a un analizador de masas híbrido para determinar paracetamol, atenolol, ketoprofeno, claritromicina, carbamazepina, cafeína, y naproxeno en una columna analítica ZORBAX Eclipse XDB C18 (50 mm × 4,6 mm, DI., 1,8 μm), en el cual se utilizó como fases móviles ácido fórmico al 0,1% en agua (A) y acetonitrilo (B); aplicando un gradiente lineal que inicia con 10% B por 4 min, disminuyendo al 50% a 10 min, al 99 % a 14 min por 0,1 min; volviendo a la condición inicial a los 18 min. El volumen de inyección fue de 10 L, con un caudal de 0,4 mL/min (Campos *et al.*, 2017).
- Ashfaq *et al.*, reportó en el año 2017 una recolección de las muestras de aguas residuales mediante una extracción líquido-líquido con cloformo en botellas de vidrio de color ámbar refrigerados a 4°C, donde se utilizan dos HPLC con una columna Discovery C18 (250×4,6 mm, DI., 5 μm) como fase estacionaria a temperatura ambiente. Para determinar paracetamol, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno se utilizó una fase móvil de acetonitrilo y acetato de amonio al 0,1 M en relación de 50:50 v/v. La detección se llevó a cabo a 254nm de forma isocrática a una velocidad de flujo de 1mL/min de fase móvil (Ashfaq *et al.*, 2017).
- Archana *et al.*, tomaron muestras de lagos y aguas residuales en botellas de vidrio ámbar de 5 L, evaluando paracetamol y cafeína en un HPLC modelo 2.545, equipado con una bomba de módulo de gradiente cuaternario y un detector de diodos. Así, se hace uso de una columna C18 sunfire™ 5 μm, (4,6 × 250 mm) y, se implementa una extracción en fase sólida que utiliza un colector de vacío de Supelco, Visiprep™. Con ello, se



implementó una elución isocrática a 1 mL haciendo uso de una fase móvil compuesta por metanol/ácido acético al 1% 80:20 (v/v) durante 15 min (Archana *et al.*, 2017).

- Kovačević *et al.*, determinó concentraciones de carbamazepina y diclofenaco por medio de estándares individuales preparados en metanol a una concentración de 100 mg/L, siendo conservadas a 4°C. De este modo, se lleva a cabo la detección en un HPLC que presenta una columna Zorbax Eclipse® XDB-C18 de fase inversa (75 mm × 4,6 mm, DI., 3,5 µm) y una precolumna (12,5 mm × 4,6 mm, DI., 5 µm); junto con una espectrometría de masas que utiliza una configuración de ionización positiva e ionización por electropulverización. Para ello, se usó una fase móvil compuesta por metanol (A), agua desionizada (B) y ácido acético al 10 % (C) y un gradiente con la siguiente estructura: 0 min 30 % de B y 2% de C durante 5 min; a 30 min 80 % de B y 2% de C y, a 30,01 min 98% de B y 2 % de C siendo isocrático hasta 33 min. El caudal de la fase móvil fue de 0,3 mL/min, teniendo un volumen de inyección de 10 µL; con lo cual se encuentra carbamazepina y diclofenaco (Kovačević *et al.*, 2017).
- Alygizakis *et al.*, cuantificó cafeína, naproxeno, carbamazepina, claritromicina, diclofenaco y paracetamol en aguas de mar basada en una extracción en fase sólida con UHPLC/MS/MS de triple cuadrupolo con ionización electrospray, la cual se llevó a cabo en una columna Atlantis T3 C18 (100 mm × 2,1 mm, DI., 3 µm) bajo un caudal de 100 µL/min. La fase móvil para modo positivo es de ácido fórmico al 0,01% (A) y metanol (B), con un gradiente inicial de 2% de B hasta 3 min, 100% de B desde 20 a 29 min y, 2% de B a 30 min bajo una condición isocrática hasta los 40 minutos, con una energía de fuente de 3,5 kV. Análogamente, en modo negativo se plantea una fase móvil de formato de amonio de 1mM (A), metanol (B) y acetonitrilo (C) constante al 5%. Así, se utiliza un voltaje de 2,5 kV y un gradiente inicia de 25% de B, 95% de B isocrático desde 10 min a 23 min; volviendo a la condición inicial a 24 min; manteniéndola hasta 37 min (Alygizakis *et al.*, 2016).
- Guan *et al.*, distingue ketoprofeno y naproxeno en una Waters ACQUITY UPLC® BEH Fenilo (50 mm × 2,1 mm, DI., 1,7 µm) protegido por un prefiltro de columna de alta presión (2 µm). La fase consistía en ácido fórmico al 0,1 % en agua (A) y acetonitrilo



(B), con un gradiente de elución de 35% a 65 % B desde 0 a 4 min, manteniendo esta última condición por 1 min. Así, se disminuye B a 35% a 7 min, finalizando el gradiente a 9 min. El volumen de inyección fue de 5 μ L, con una temperatura de columna de 35°C, un voltaje de 3,0 kV y un caudal de 0,3 mL/min (Guan *et al.*, 2016).

- Matuszak *et al.*, identificó naproxeno, ibuprofeno y atenolol en aguas bajo un sistema de cromatografía líquida acoplado a un triple cuadrupolo de masas en un Thermo Scientific™ EQuan MAX Plus™ C18 polar (2,1 mm \times 100 mm, DI., 2,6 μ m y 2,1 \times 100 mm, DI., 3,0 μ m para iones positivos y negativos, respectivamente). Se efectuó un voltaje de 3,0 kV y 2,0 kV para iones positivos y negativos, respectivamente, con caudal de 0,4 mL/min y fases móviles de: ácido fórmico al 0,1% en agua (A) y ácido fórmico al 0,1 % en metanol (B) para positivos; y, hidróxido de amonio al 0,1 % en agua (A) e hidróxido de amonio al 0,1 % en metanol (B) para negativos. Ambos métodos implementaron un tiempo de retención de 8,5 min, con gradientes de elución dados por: 100% de A durante 1 min, 0% de A isocrático desde 5 min a 6,5 min; volviendo a la condición inicial a 6,6 min para modo positivo. En relación al modo negativo, se ejecuta 90% de A hasta 1 min, 0% de A desde 3,5 min hasta los 6,5 min; manteniendo 90% de A contando desde 6,6 min (Matuszak *et al.*, 2016).
- Oliveira *et al.*, determinó paracetamol, atenolol, caféina, naproxeno, ketoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno, carbamazepina y claritromicina en aguas residuales usando LC/MS/MS con 40°C, 0,3 mL/min, 3,5 kV (Oliveira *et al.*, 2015).
- Sun *et al.*, efectuó la determinación de ibuprofeno, naproxeno, paracetamol, carbamazepina y claritromicina en ríos con UHPLC acoplado a un espectrómetro de masas en tándem de triple cuadrupolo por electrospray. Lo anterior, se llevó a cabo en una C18 de fase inversa (100 \times 2,1 mm, DI., 1,7 μ m), en donde los análisis positivos utilizaron formiato de amonio 4 mM (A) y acetonitrilo (B) a un caudal de 0,2 mL/min y un gradiente de elución inicial con 5% de B hasta 0,5 min, aumentado a 25% de B a 4 min, 32% de B a 8 min, 60% de B a 11 min y 100% de B a 18,5 min teniendo un tiempo total de 20 min. Por otra parte, los iones negativos fueron analizados con una fase móvil de acetato de amonio 4mM (A) y acetonitrilo (B), un caudal de 0,25 mL/min y un tiempo de análisis de 6 min. El gradiente implementado fue de 30% inicial de B, cambiando a



80% de B a 4,5 min y 100% de B a 5 min (Sun *et al.*, 2015).

- Gros *et al.*, detectó atenolol, ketoprofeno, naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco y paracetamol haciendo uso de una Purospher Star RP-18 endcapped columna (125 mm × 2,0 mm, DI., 5 µm) precedida por un protector C18 columna (4×4, 5 µm). Existía una fase móvil de acetonitrilo y metanol al 1:1 (v/v) (A) y agua de grado HPLC o bien, agua de grado HPLC con ácido fórmico al 0,1% (B). Se suministra un caudal de 0,2 mL/min y un gradiente inicial con 10 % de B que aumentó a 40 % a 5 min, 60 % a 10 min, y 100 % a 15 min, donde permaneció hasta 23 min y luego se redujo al 10 % a 23,1 min antes de un tiempo de reequilibrio de 10 min. La temperatura de columna fue 40°C (Gros *et al.*, 2010).
- Grujić *et al.*, investigó la aparición de carbamazepina, ibuprofeno, paracetamol y diclofenaco en aguas subterráneas y superficiales mediante estándares individuales conservados a 4°C. Se realiza una ionización por electrospray y espectrómetro de masas con trampa de iones de cuadrupolo, en modo de ionización positiva y negativa, probando concentraciones de 10, 25, 50, 100 y 250 ng/mL en una columna de fase inversa Zorbax Eclipse® XDB-C18 (4,6 mm × 75 mm, DI., 3,5 µm) y una precolumna (4,6 mm × 12,5 mm, DI., y 5 µm). La fase móvil implementada corresponde a agua (A), metanol (B) y ácido acético al 10% (C), cambiando el gradiente de trabajo bajo la siguiente configuración: 0 min, 33% de B y 2% de C; 12 min, 98% de B y 2% de C siendo isocrático hasta 15 min, reestableciendo las condiciones iniciales y, manteniéndolas durante 15 min. Cuando el análisis se realizó en el modo de ionización negativa, la fase móvil consistió en agua (A) y metanol (B), cambiando la fase móvil según: 0 min, 40% de B; 7 min, 100% de B hasta 10 min, reestableciendo las condiciones iniciales y manteniéndolas durante 15 min. Se utiliza un flujo de 0,6 mL/min bajo un volumen de 10 L y una tensión de la fuente de 4,5 kV (Grujić *et al.*, 2009).

Anexo B: Variaciones de gradiente implementado.

Resultados de algunas combinaciones de gradiente y zonas isocráticas aplicadas al estudio.



- Método 1

Tabla 24: Elución de fármacos con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo para método 1.

Fármaco	Ionización	Peso Molecular (Da)	Ion molecular	Tiempo de detección (min)
Metformina	+	129,15	130,17	0,57
Atenolol	+	266,34	267,21	0,57
Paracetamol	+	151,16	152,11	0,81
Cafeína	+	194,19	195,04	1,04
Carbamazepina	+	236,27	237,13	8,37
Claritromicina	+	747,95	748,55	8,59
Ketoprofeno	+	254,3	255,15	9,97
Diclofenaco	+	296,15	296,06	11,53

Condiciones de operación: 40°C y, 3,5 kV positivo y 2,5 kV negativo.

Mezcla: 50 mg/L de paracetamol, cafeína, ketoprofeno y atenolol; y, 100 mg/L de diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno.

Gradiente: 90% D y 10% de C hasta 2 min, disminuyendo a 60% de D a 7 min; presentando 40% de D a 10 min; para posteriormente tener 100% de C desde 12 min hasta 16 min, finalizando con 90% de D a 16,1 min; con un tiempo total de análisis de 16,5 min.

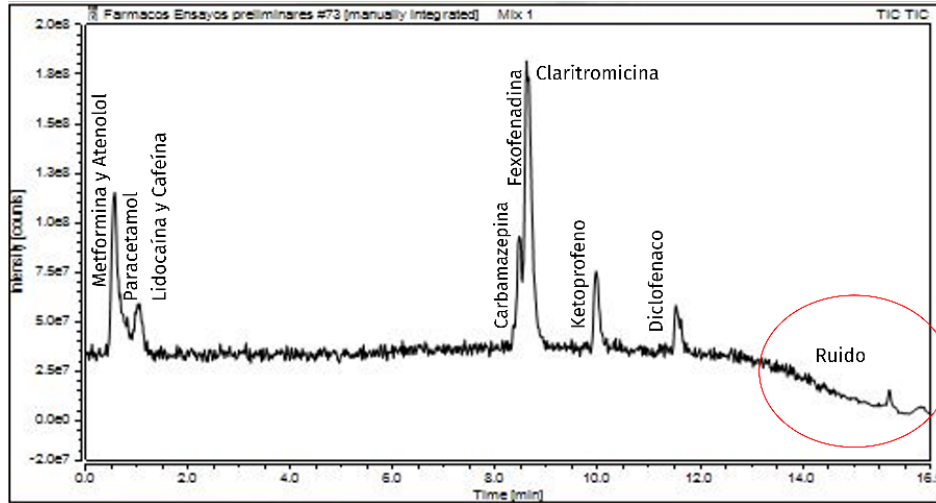


Figura 32: Respuesta cromatográfica en modo positivo con método 1.

- Método 2

Tabla 25: Elución de fármacos con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo para método 2.

Fármaco	Ionización	Peso Molecular (Da)	Ion molecular	Tiempo de detección (min)
Metformina	+	129,15	130,17	0,56
Atenolol	+	266,34	267,2	0,56
Paracetamol	+	151,16	152,12	1,23
Cafeína	+	194,19	195,13	2,85
Claritromicina	+	747,95	748,57	6,26
Carbamazepina	+	236,27	237,19	6,35
Ketoprofeno	+	254,3	255,16	7,39
Diclofenaco	+	296,15	296,06	8,58

Condiciones de operación: 40°C y, 3,5 kV positivo y 2,5 kV negativo.

Mezcla: 50 mg/L de paracetamol, cafeína, ketoprofeno y atenolol; y, 100 mg/L de diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno.

Gradiente: 95% D y 5% de C hasta 0 min, disminuyendo a 50% de D a 5 min; presentando 40% de D a 10 min; para posteriormente tener 100% de C a 12 min, finalizando con 95% de D a 13 min.

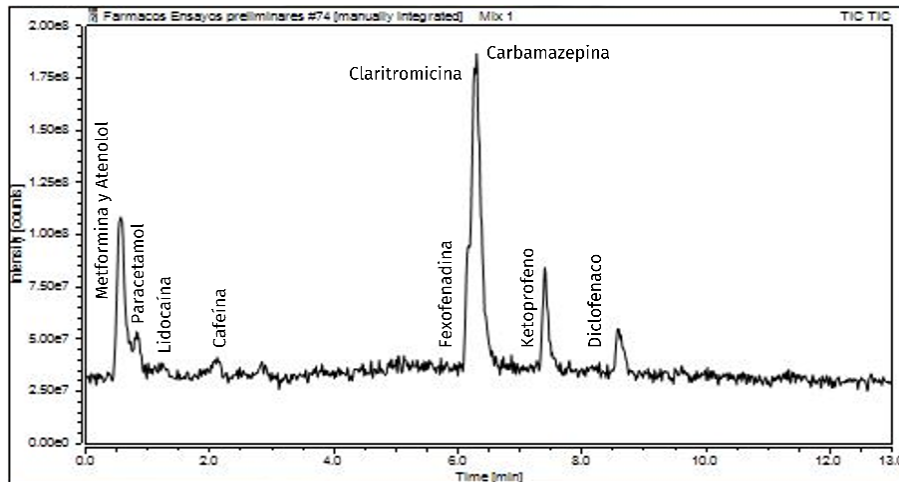


Figura 33: Respuesta cromatográfica en modo positivo con método 2.

- Método 3

Tabla 26: Elución de fármacos con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo para método 3.

Fármaco	Ionización	Peso Molecular (Da)	Ion molecular	Tiempo de detección (min)
Metformina	+	129,15	130,17	0,56
Atenolol	+	266,34	267,2	0,56
Cafeína	+	194,19	195,13	2,85
Carbamazepina	+	236,27	237,19	6,35
Ketoprofeno	+	254,3	255,16	7,39
Diclofenaco	+	296,15	296,06	8,58

Condiciones de operación: 40°C y, 3,5 kV positivo y 2,5 kV negativo.
 Mezcla: 50 mg/L de paracetamol, cafeína, ketoprofeno y atenolol; y, 100 mg/L de diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno.
 Gradiente: 80% D y 20% de C a 0 min, disminuyendo a 60% de D a 5 min; presentando 40% de D a 10 min; para posteriormente tener 100% de C a 12 min, finalizando con 95% de D a 13 min.

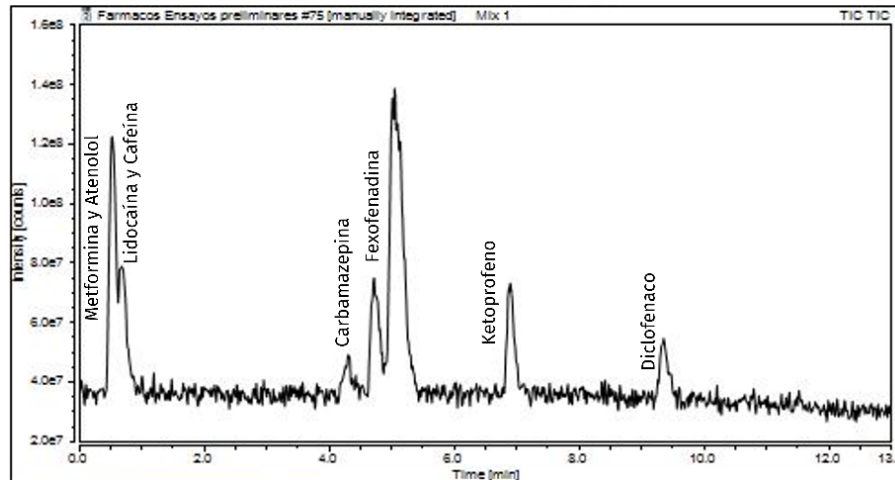


Figura 34: Respuesta cromatográfica en modo positivo con método 3.

- Método 4

Tabla 27: Elución de fármacos con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo para método 4.

Fármaco	Ionización	Peso Molecular (Da)	Ion molecular	Tiempo de detección (min)
Metformina	+	129,15	130,16	0,54
Atenolol	+	266,34	267,21	0,54
Paracetamol	+	151,16	152,12	0,81
Cafeína	+	194,19	195,13	1,02
Carbamazepina	+	236,27	237,15	5,97
Claritromicina	+	747,95	748,57	6,16
Ketoprofeno	+	254,3	255,15	7,67
Diclofenaco	+	296,15	296,08	9,58

Condiciones de operación: 40°C y, 3,5 kV positivo y 2,5 kV negativo.

Mezcla: 50 mg/L de paracetamol, cafeína, ketoprofeno y atenolol; y, 100 mg/L de diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno.

Gradiente: 90% D y 10% de C a 0 min, disminuyendo a 80% de D a 1 min; presentando 60% de D a 5 min; para posteriormente tener 40% de D a 10 min hasta llegar a 0% de D a 12 min; finalizando con 90% de D a 13 min.

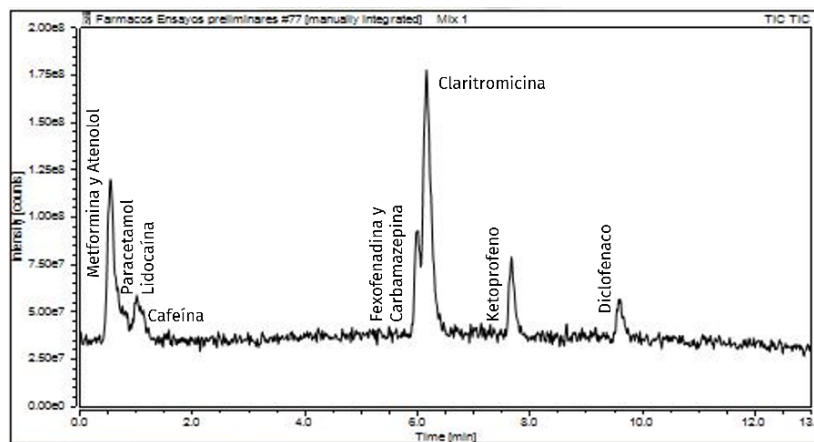


Figura 35: Respuesta cromatográfica en modo positivo con método 4.

- Método 5

Tabla 28: Elución de fármacos con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo para método 5.

Fármaco	Ionización	Peso Molecular (Da)	Ion molecular	Tiempo de detección (min)
Metformina	+	129,15	130,17	0,55
Atenolol	+	266,34	267,22	0,55
Paracetamol	+	151,16	152,12	0,81
Cafeína	+	194,19	195,14	1,17
Carbamazepina	+	236,27	237,16	5,81
Claritromicina	+	747,95	748,56	6,01
Ketoprofeno	+	254,3	255,15	7,68
Diclofenaco	+	296,15	296,08	9,86

Condiciones de operación: 40°C y, 3,5 kV positivo y 2,5 kV negativo.
 Mezcla: 50 mg/L de paracetamol, cafeína, ketoprofeno y atenolol; y, 100 mg/L de diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno.
 Gradiente: 90% D y 10% de C a 0 min, disminuyendo a 80% de D a 0,5 min; presentando 60% de D a 5,5 min; para posteriormente tener 40% de D a 10 min hasta llegar a 0% de D a 12 min; finalizando con 90% de D a 13 min.

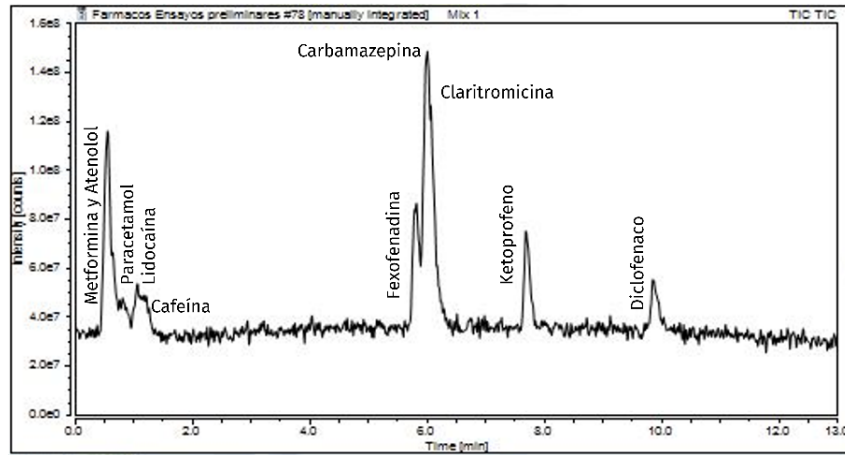


Figura 36: Respuesta cromatográfica en modo positivo con método 5.

- Método 6

Tabla 29: Elución de fármacos con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo para método 6.

Fármaco	Ionización	Peso Molecular (Da)	Ion molecular	Tiempo de detección (min)
Metformina	+	129,15	130,17	0,55
Atenolol	+	266,34	267,23	0,55
Paracetamol	+	151,16	152,14	0,82
Cafeína	+	194,19	195,13	1,16
Carbamazepina	+	236,27	237,16	6,01
Claritromicina	+	747,95	748,56	6,16
Ketoprofeno	+	254,3	255,16	7,3
Diclofenaco	+	296,15	296,06	8,71

Condiciones de operación: 40°C y, 3,5 kV positivo y 2,5 kV negativo.
 Mezcla: 50 mg/L de paracetamol, cafeína, ketoprofeno y atenolol; y, 100 mg/L de diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno.
 Gradiente: 90% D y 10% de C a 0 min, disminuyendo a 85% de D a 0,5 min; presentando 50% de D a 5,5 min; para posteriormente tener 40% de D a 10 min hasta llegar a 0% de D a 12 min; finalizando con 90% de D a 13 min.

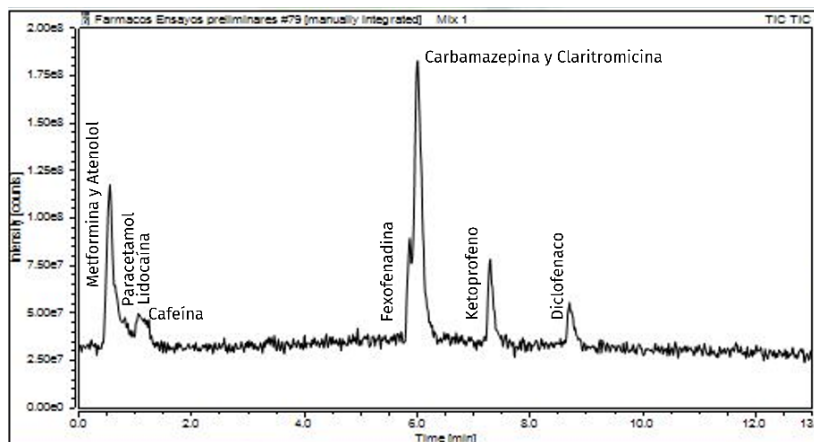


Figura 37: Respuesta cromatográfica en modo positivo con método 6.

- Método 7

Tabla 30: Elución de fármacos con 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% de acetonitrilo para método 7.

Fármaco	Ionización	Peso Molecular (Da)	Ion molecular	Tiempo de detección (min)
Metformina	+	129,15	130,18	0,55
Atenolol	+	266,34	267,2	0,55
Paracetamol	+	151,16	152,14	0,83
Cafeína	+	194,19	195,14	1,17
Carbamazepina	+	236,27	237,15	6,25
Claritromicina	+	747,95	748,57	6,48
Ketoprofeno	+	254,3	255,13	8,19
Diclofenaco	+	296,15	296,06	10,38

Condiciones de operación: 40°C y, 3,5 kV positivo y 2,5 kV negativo.
 Mezcla: 50 mg/L de paracetamol, cafeína, ketoprofeno y atenolol; y, 100 mg/L de diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno.
 Gradiente: 90% D y 10% de C a 0 min, disminuyendo a 80% de D a 1 min; presentando 60% de D a 6 min; para posteriormente tener 0% de D a 12 min; finalizando con 90% de D a 13 min.

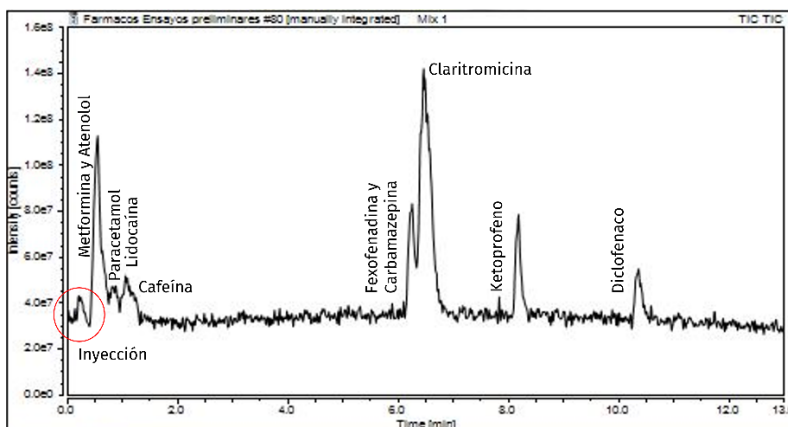


Figura 38: Respuesta cromatográfica en modo positivo con método 7.

Anexo C: Variaciones de energía de colisión aplicada en Q2.

Para la variación de energías de colisión se utilizan estándares individuales de cada analito a una concentración de 10 mg/L disueltos en fase móvil de 90% de ácido fórmico al 0,1% y 10% metanol para los medicamentos en modo positivo y, 100% de metanol para modo negativo.

Se evalúa la aparición del ion precursor, ion de cuantificación e ion de confirmación. La visualización de los mismos viene dada por un *ticket* (✓); mientras que, si no se reconoce, se postula una “x”.

El identificar el ion precursor en algunas de inyecciones implica que la energía de colisión aplicada no es suficiente para lograr fragmentar completamente el ion.

Se privilegian las señales más altas presentadas para la elección de energía de colisión, probando mínimo dos energías de colisión.

Tabla 31: Variaciones de energía de colisión aplicadas para cada fármaco.

Fármaco	Voltaje (V)	Visualización ion precursor	Visualización ion de cuantificación	Visualización ion de confirmación
Modo de ionización positivo				
Metformina	10	✓	X	✓
Metformina	20	X	✓	✓
Atenolol	20	✓	✓	✓
Atenolol	22	✓	✓	✓
Atenolol	25	✓	✓	✓
Atenolol	30	X	✓	X
Atenolol	40	X	✓	X



Paracetamol	10	✓	✓	X
Paracetamol	20	X	✓	✓
Cafeína	20	✓	✓	✓
Cafeína	25	X	✓	✓
Cafeína	30	X	✓	✓
Carbamazepina	20	X	✓	✓
Carbamazepina	30	X	✓	✓
Claritromicina	20	✓	✓	✓
Claritromicina	25	✓	✓	✓
Claritromicina	30	✓	✓	✓
Ketoprofeno	10	✓	✓	✓
Ketoprofeno	20	✓	✓	✓
Diclofenaco	10	✓	✓	✓
Diclofenaco	15	X	✓	✓
Diclofenaco	20	X	✓	✓
Modo de ionización negativo				
Naproxeno	10	X	✓	✓
Ibuprofeno	5	✓	✓	✓
Ibuprofeno	6	✓	✓	✓
Ibuprofeno	8	✓	✓	✓
Ibuprofeno	10	X	✓	✓

Anexo D: Curvas de calibración de compuestos seleccionados.

- Curvas de calibración de medicamentos.
- Metformina curva baja:

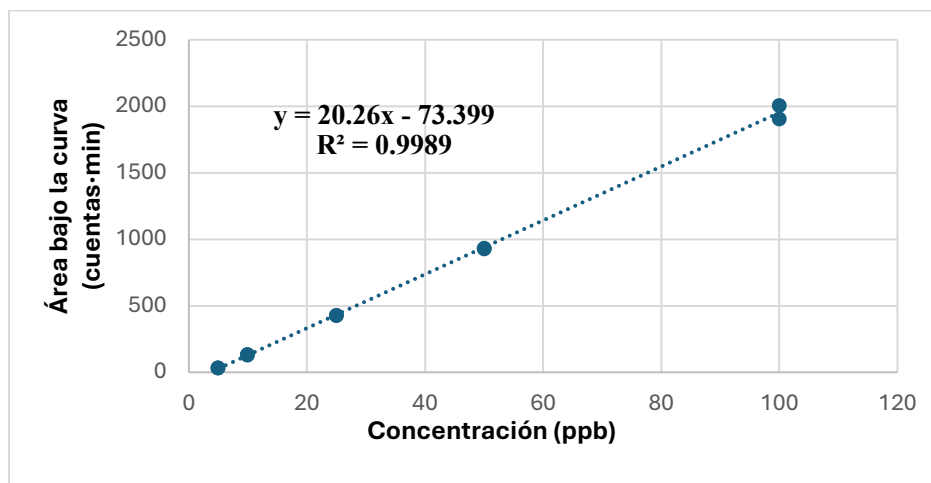


Gráfico 9: curva baja de metformina.

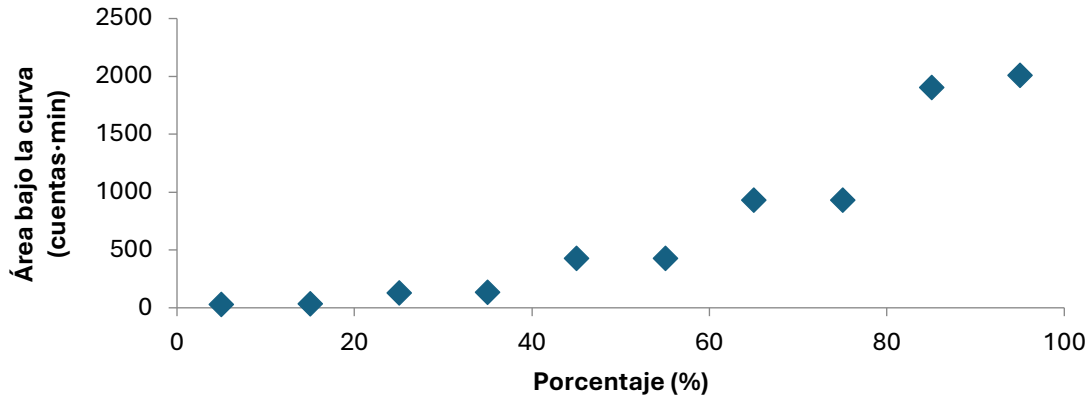


Gráfico 10: Probabilidad normal de metformina baja.

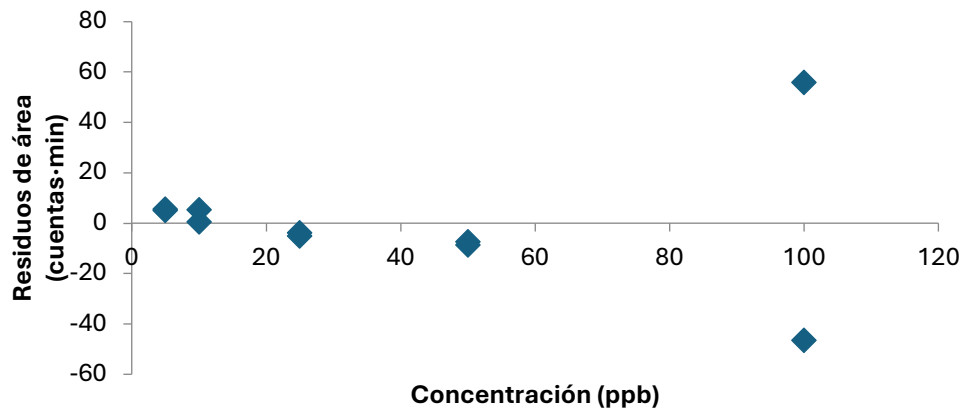


Gráfico 11: Gráfico de residuales de metformina baja.

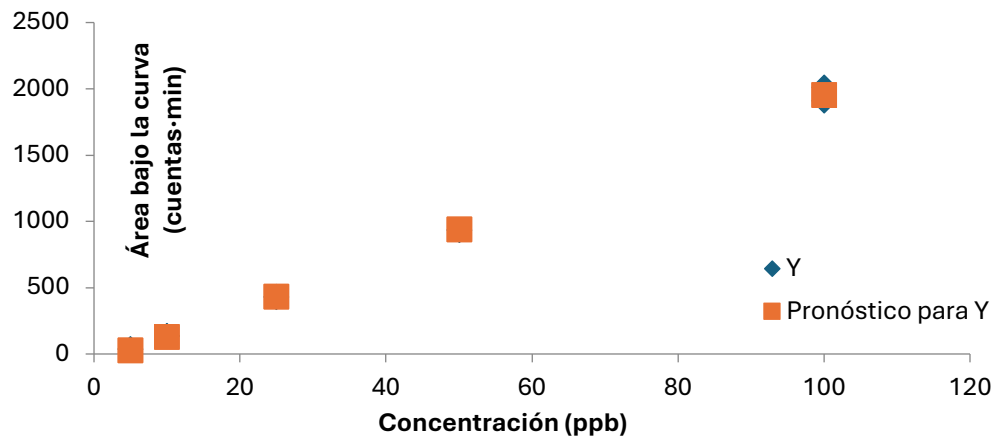


Gráfico 12: Curva de regresión ajustada de metformina baja.

- **Metformina curva alta:**

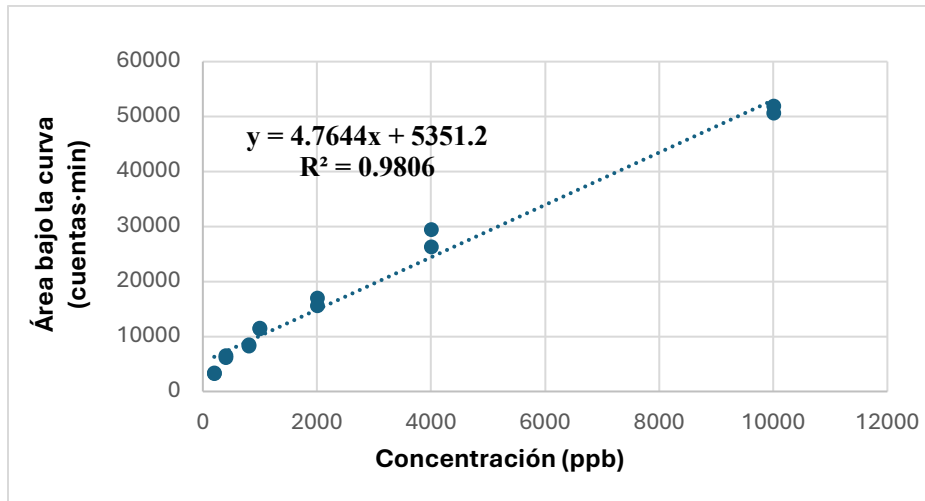


Gráfico 13: Curva de calibración de metformina alta.

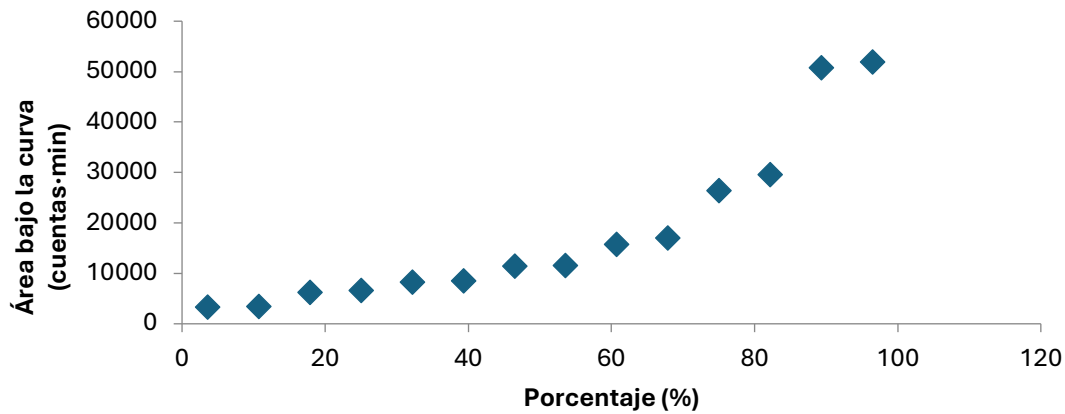


Gráfico 14: Probabilidad normal de metformina alta.

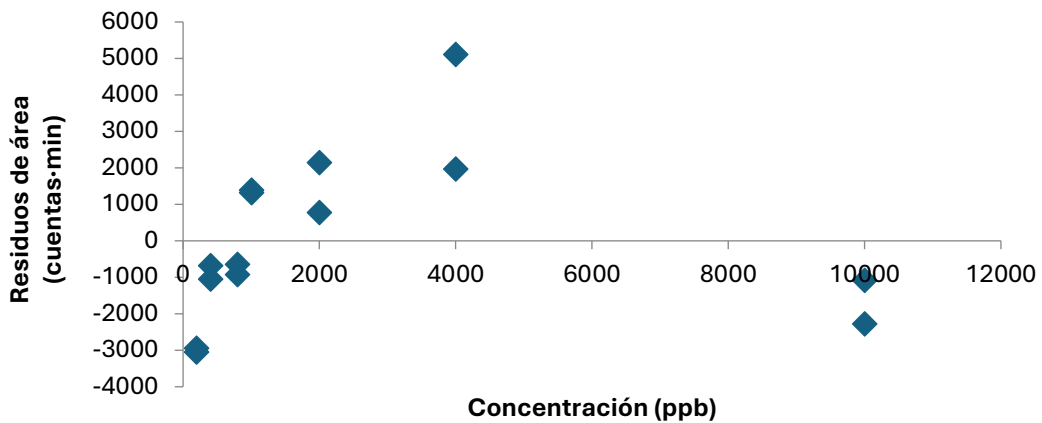


Gráfico 15: Gráfico de residuales de metformina alta.

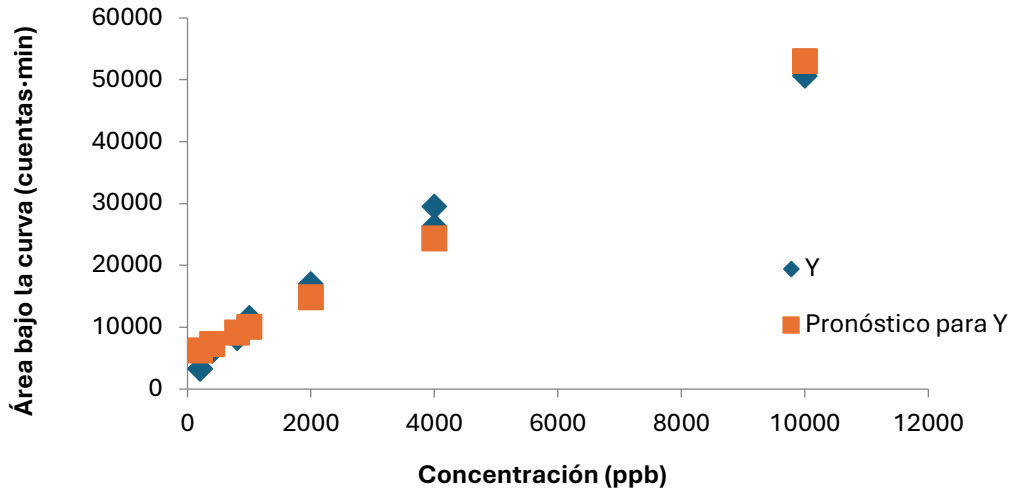


Gráfico 16: Curva de regresión ajustada de metformina alta.

○ **Atenolol curva baja:**

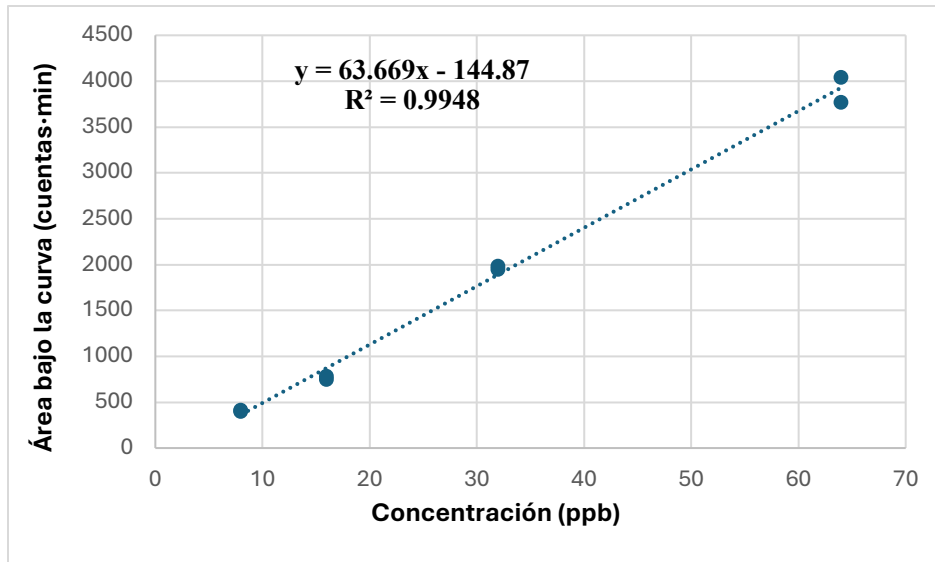


Gráfico 17: Curva de calibración de atenolol baja.

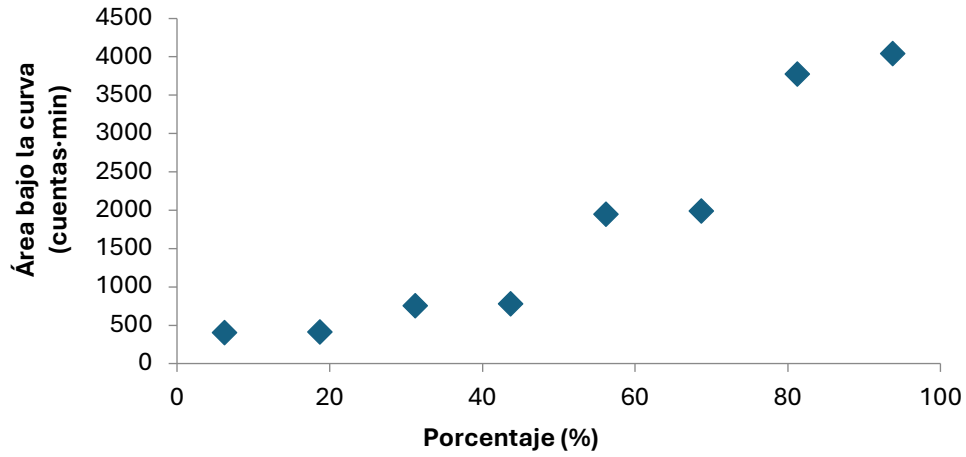


Gráfico 18: Probabilidad normal de atenolol baja.

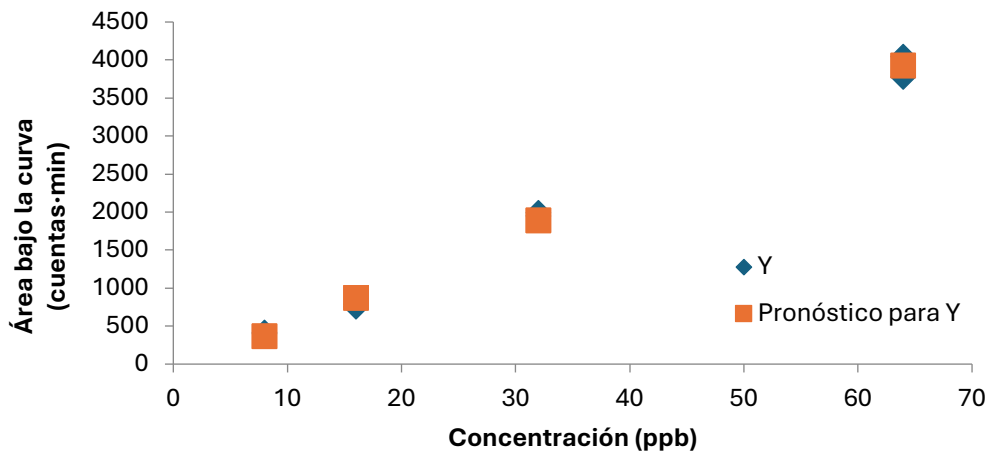


Gráfico 19: Curva de regresión ajustada de atenolol baja.

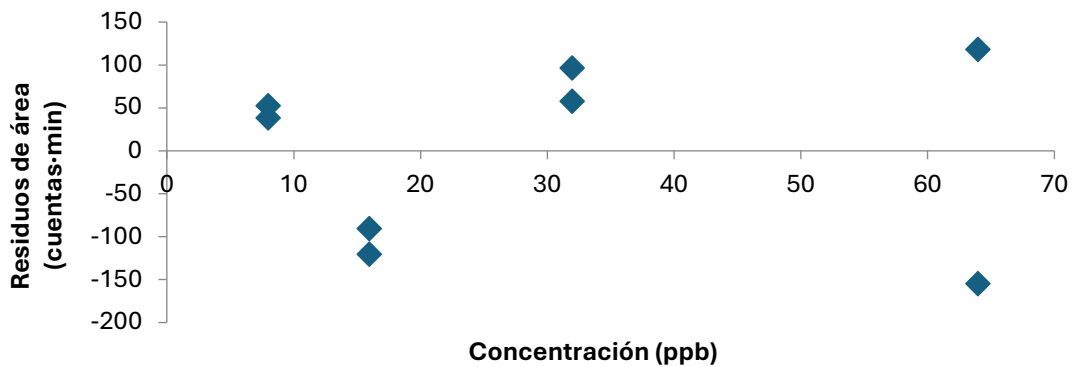


Gráfico 20: Gráfico de residuales de atenolol baja.

- **Atenolol curva alta:**

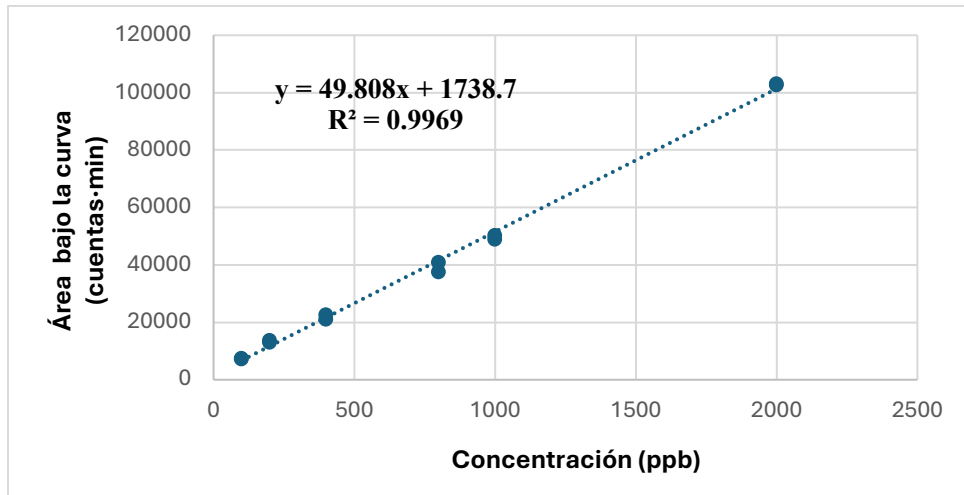


Gráfico 21: Curva de calibración de atenolol alta.

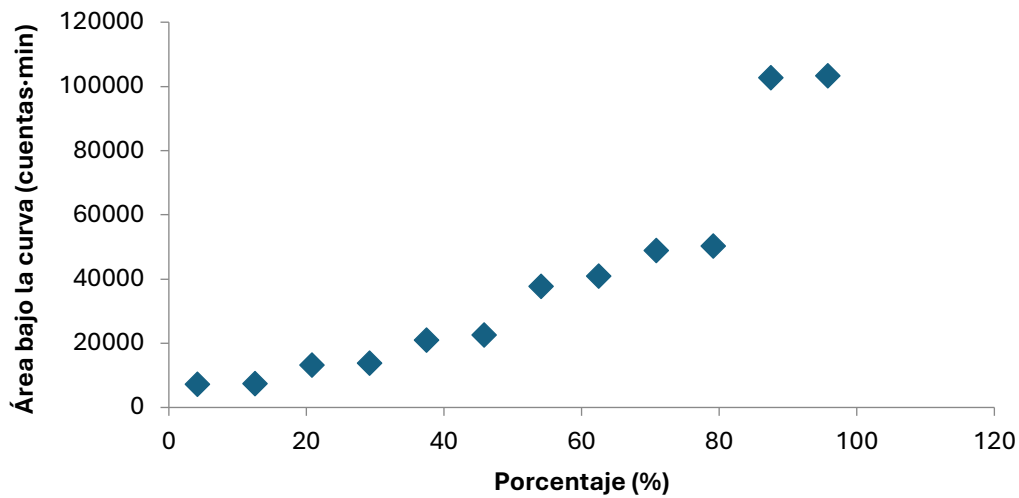


Gráfico 22: Probabilidad normal de atenolol alta.

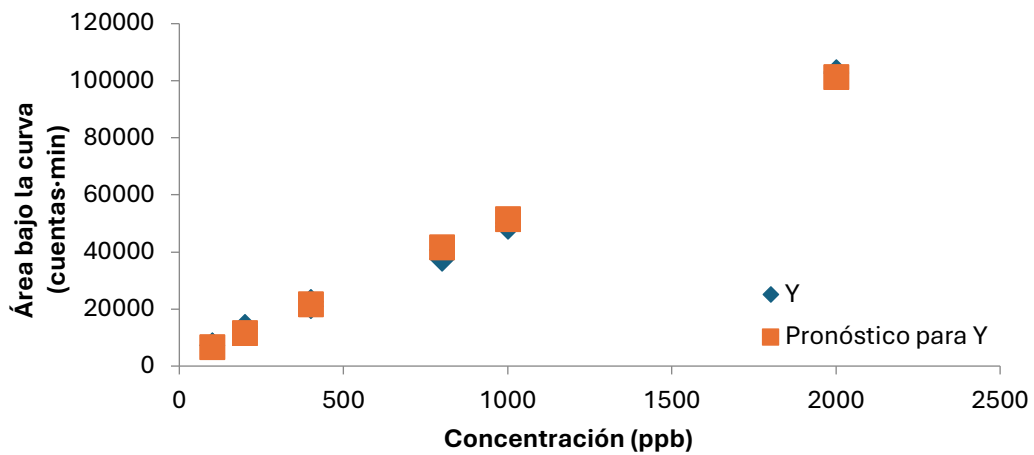


Gráfico 23: Curva de regresión ajustada de atenolol alta.

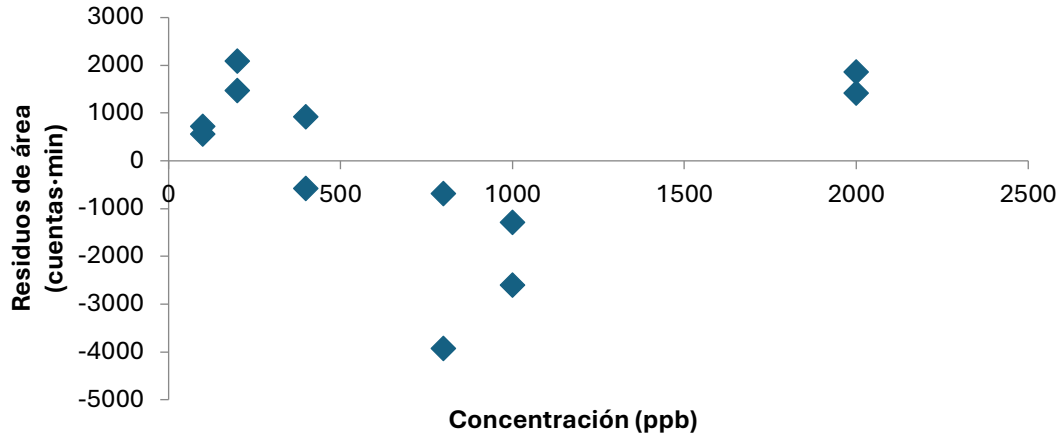


Gráfico 24: Gráfico de residuales de atenolol alta.

○ Paracetamol curva baja:

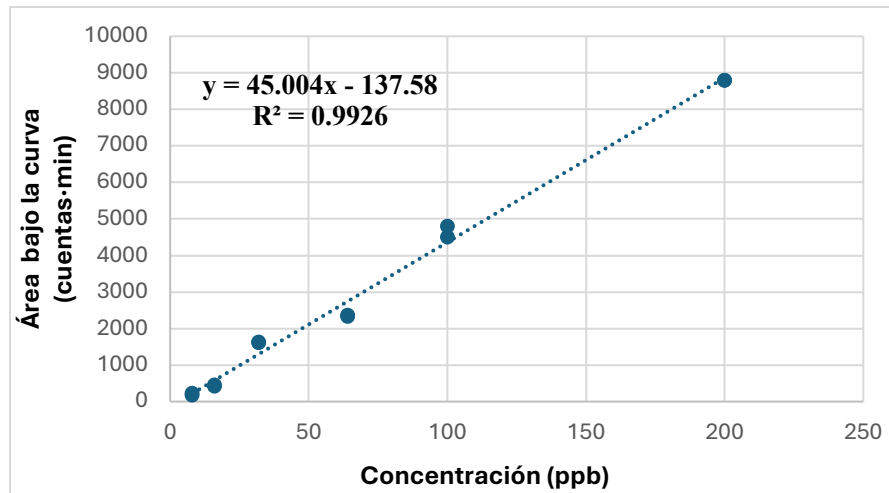


Gráfico 25: Curva de calibración de paracetamol bajo.

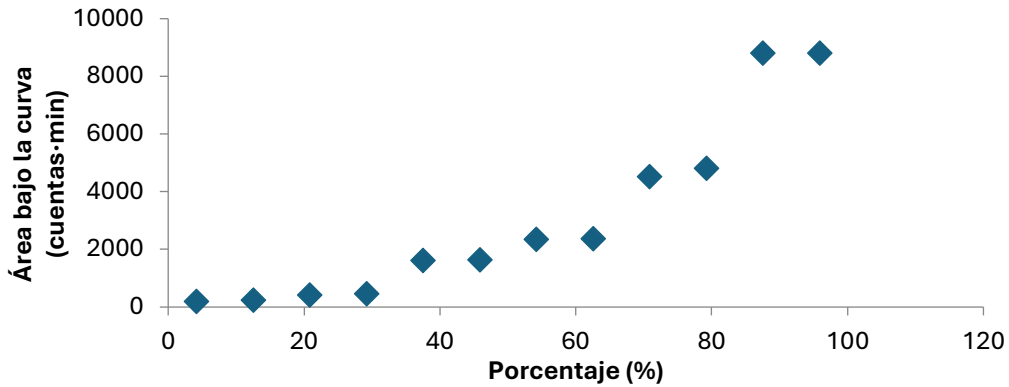


Gráfico 26: Probabilidad normal de paracetamol bajo.

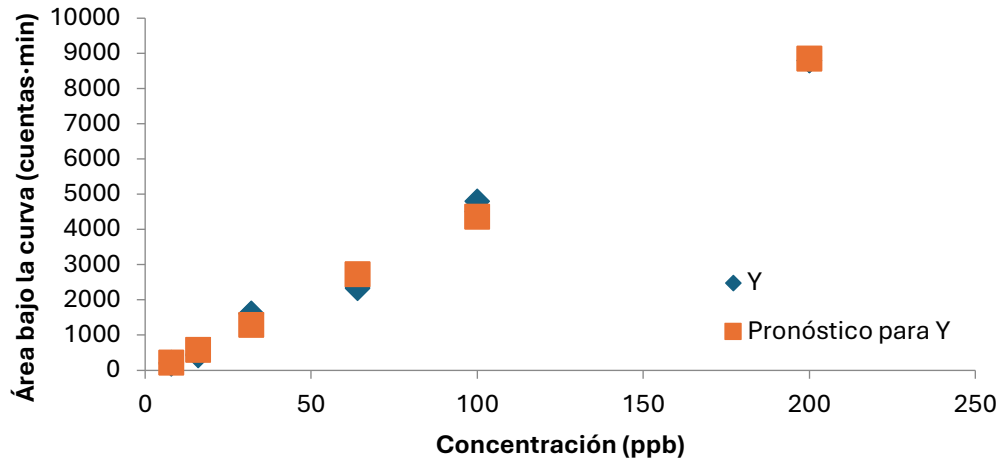


Gráfico 27: Curva de regresión ajustada de paracetamol bajo.

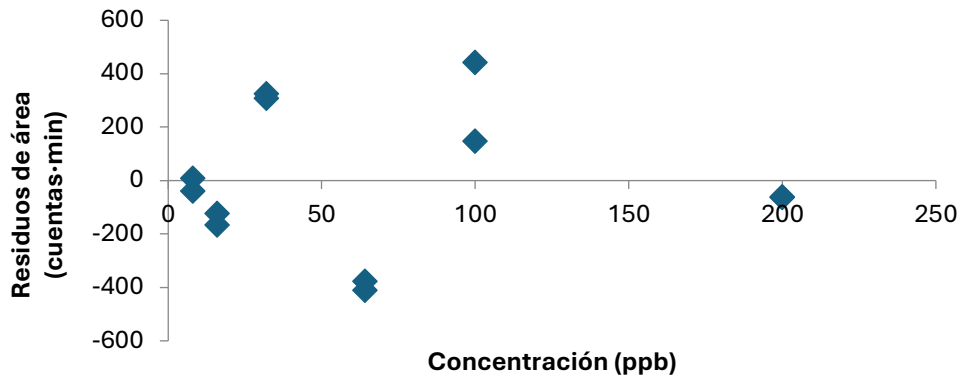


Gráfico 28: Gráfico de residuales de paracetamol bajo.

○ Paracetamol curva alta:

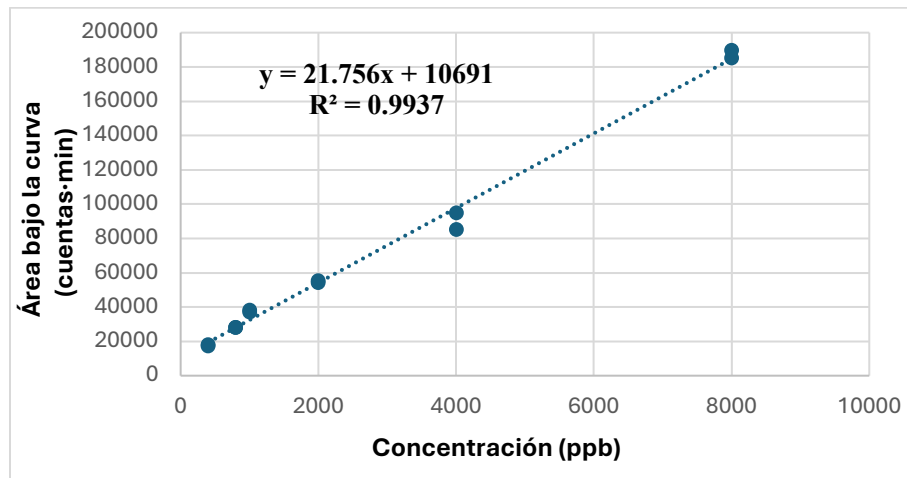




Gráfico 29: Curva de calibración de paracetamol alta.

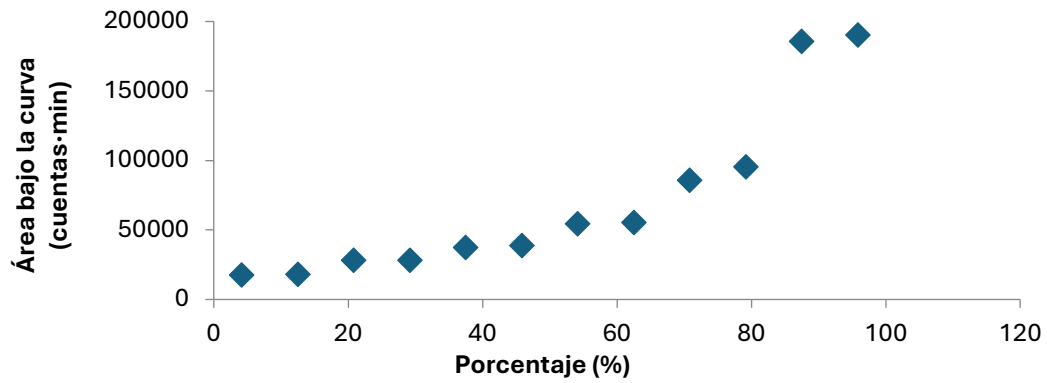


Gráfico 30: Probabilidad normal de paracetamol alta.

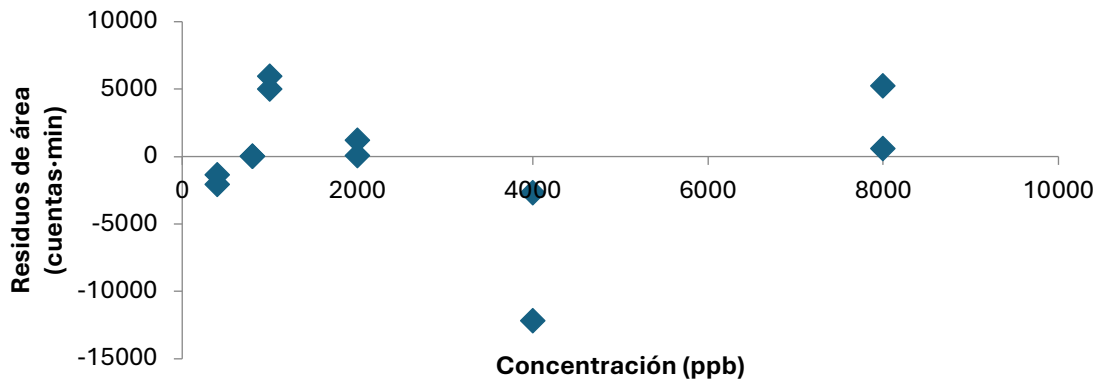


Gráfico 31: Gráfico de residuos de paracetamol alta.

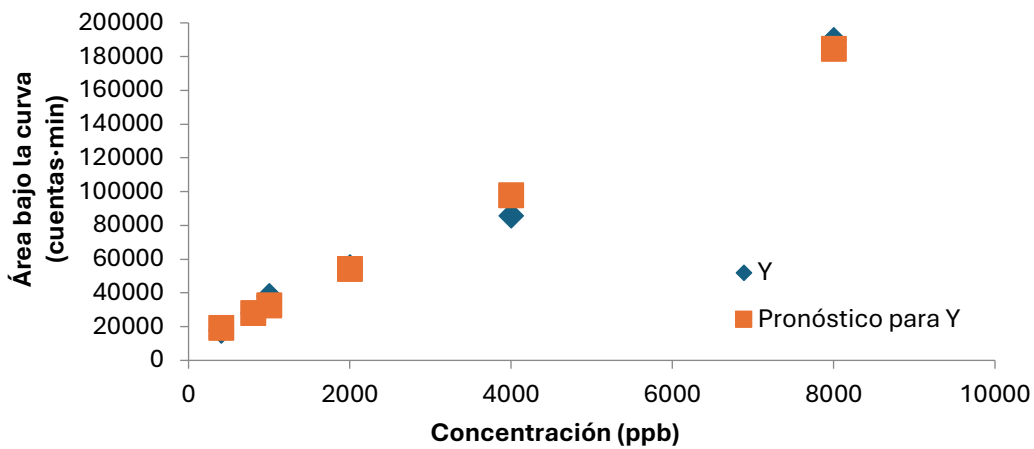


Gráfico 32: Curva de calibración de paracetamol alta.

○ **Cafeína curva baja:**

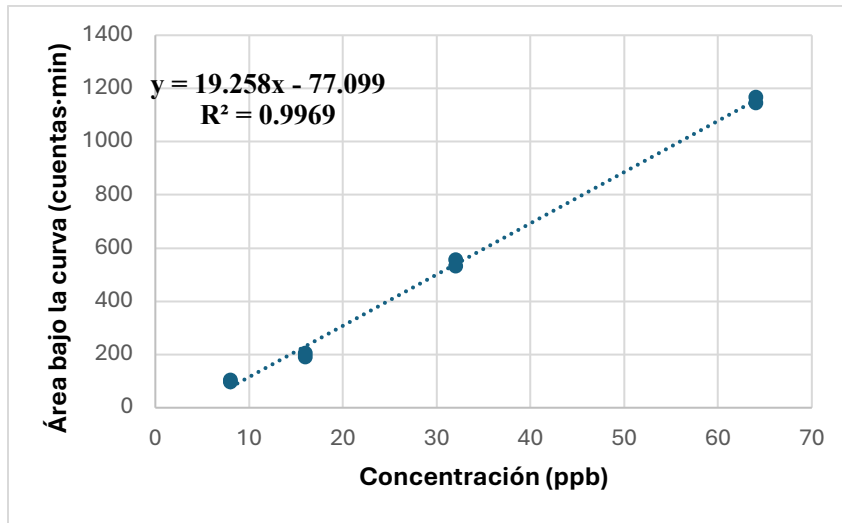


Gráfico 33: Curva de calibración de cafeína baja.

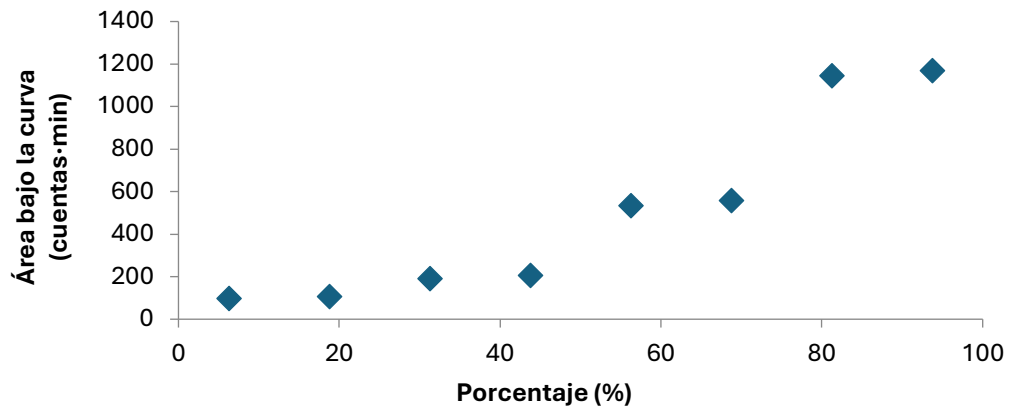


Gráfico 34: Probabilidad normal de cafeína baja.

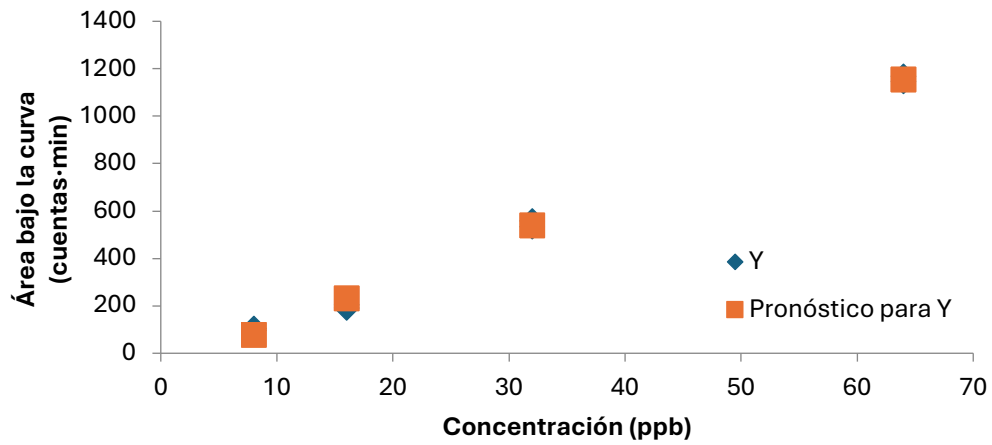




Gráfico 35: Curva de regresión ajustada de cafeína baja.

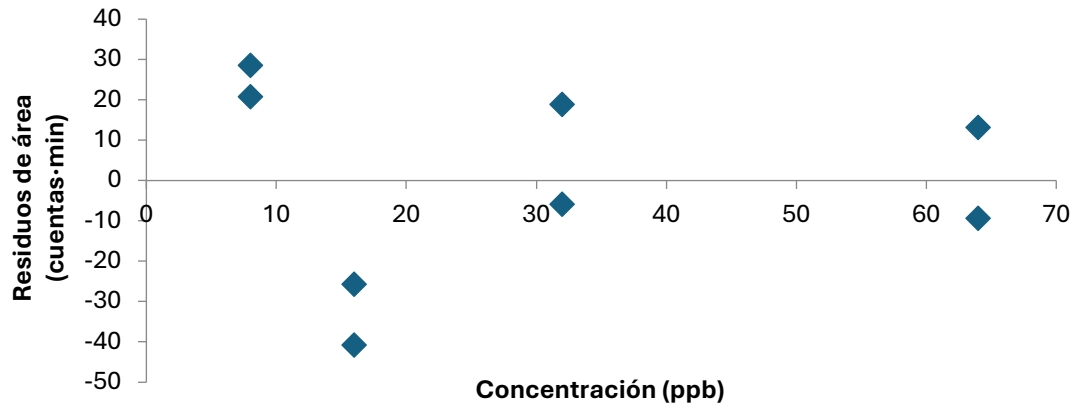


Gráfico 36: Gráfico de residuales de cafeína baja.

○ **Cafeína curva alta:**

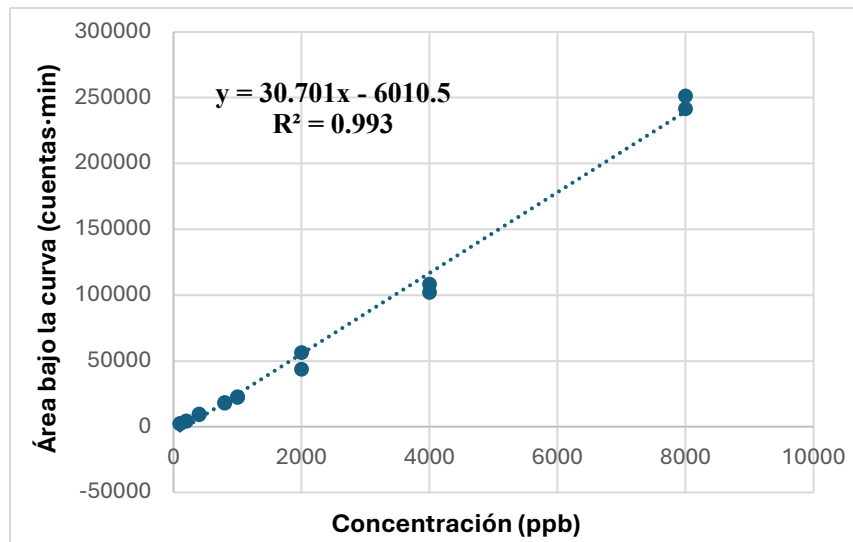




Gráfico 37: Curva de calibración de cafeína alta.

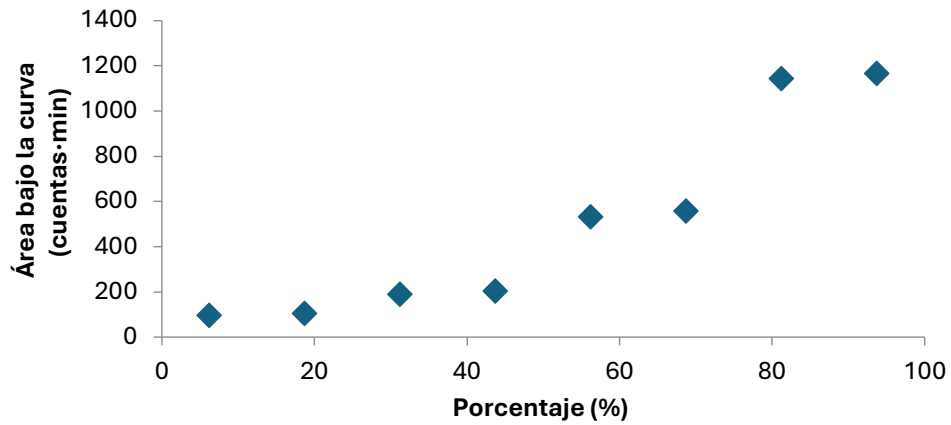


Gráfico 38: Probabilidad normal de cafeína alta.

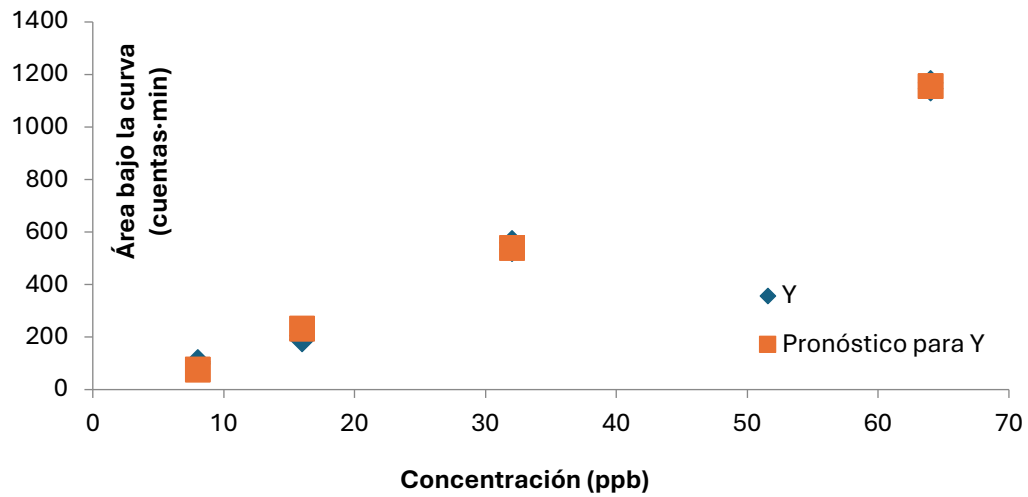


Gráfico 39: Curva de regresión ajustada de cafeína alta.

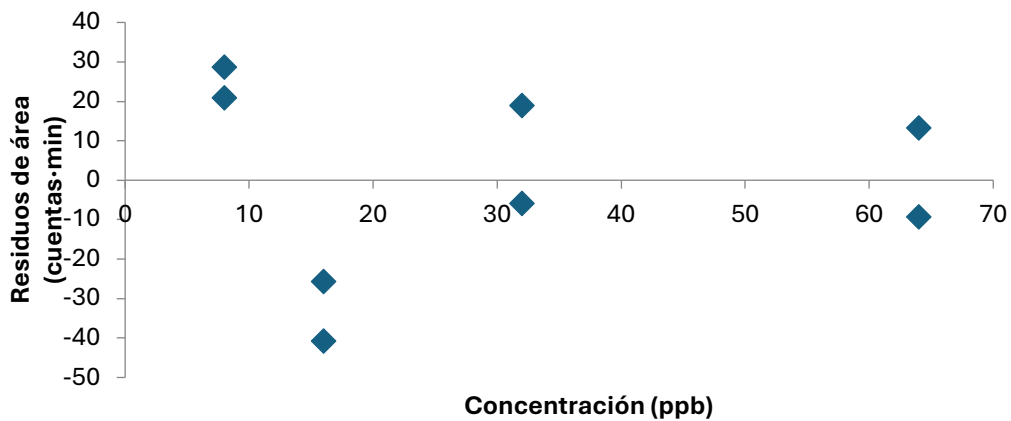


Gráfico 40: Gráfico de residuales de cafeína alta.

○ **Carbamazepina:**

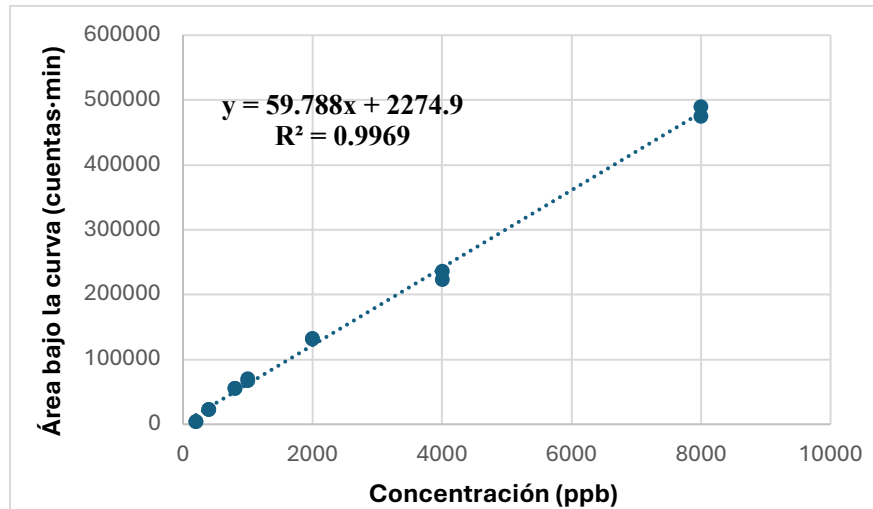


Gráfico 41: Curva de calibración de carbamazepina.

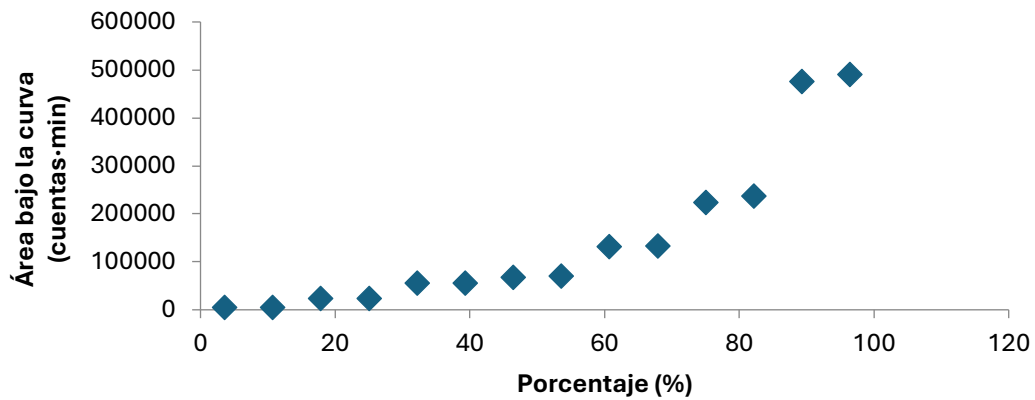


Gráfico 42: Probabilidad normal de carbamazepina.

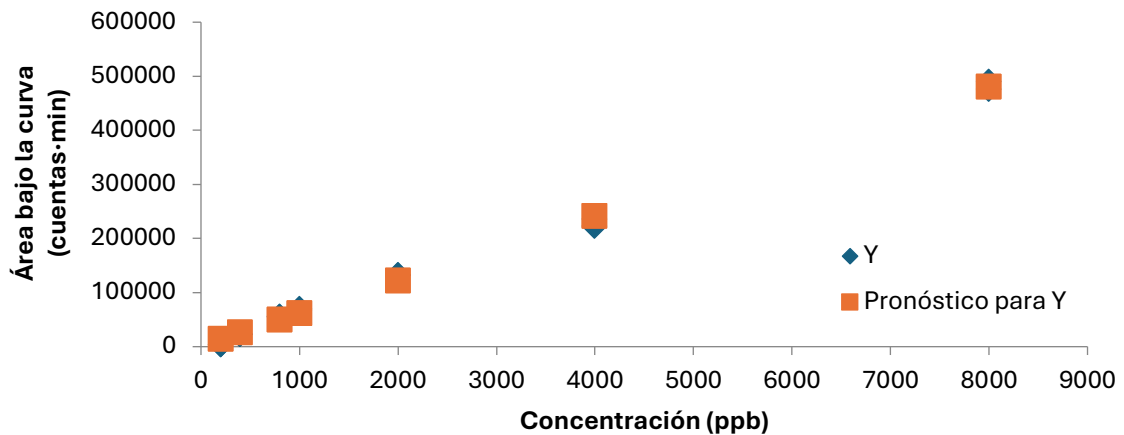


Gráfico 43: Curva de regresión ajustada de carbamazepina.

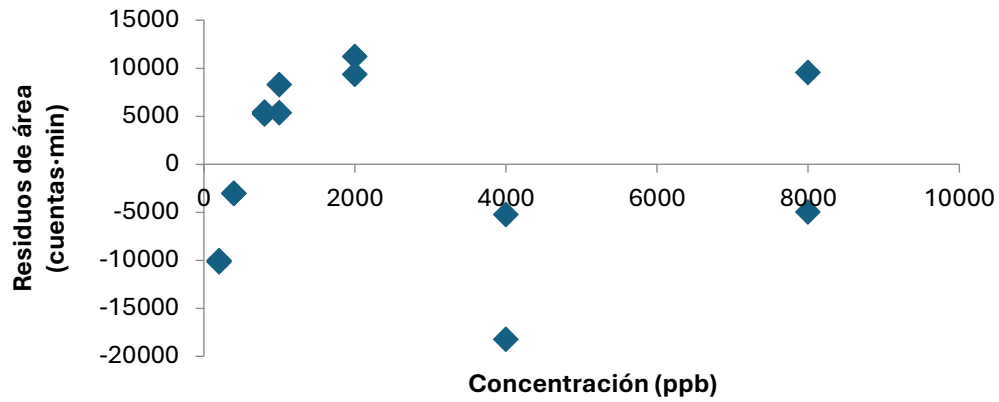


Gráfico 44: Gráfico de residuales de carbamazepina.

○ Claritromicina curva baja:

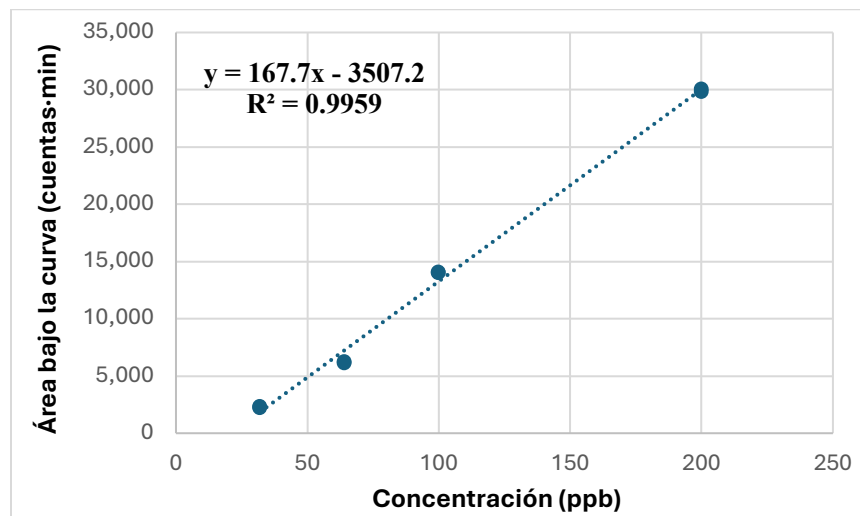


Gráfico 45: Curva de calibración de claritromicina baja.

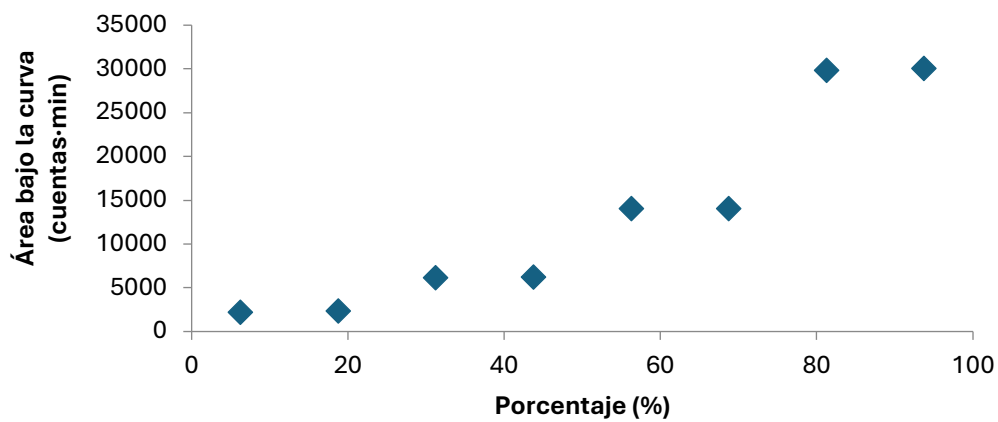


Gráfico 46: Probabilidad normal de claritromicina baja.

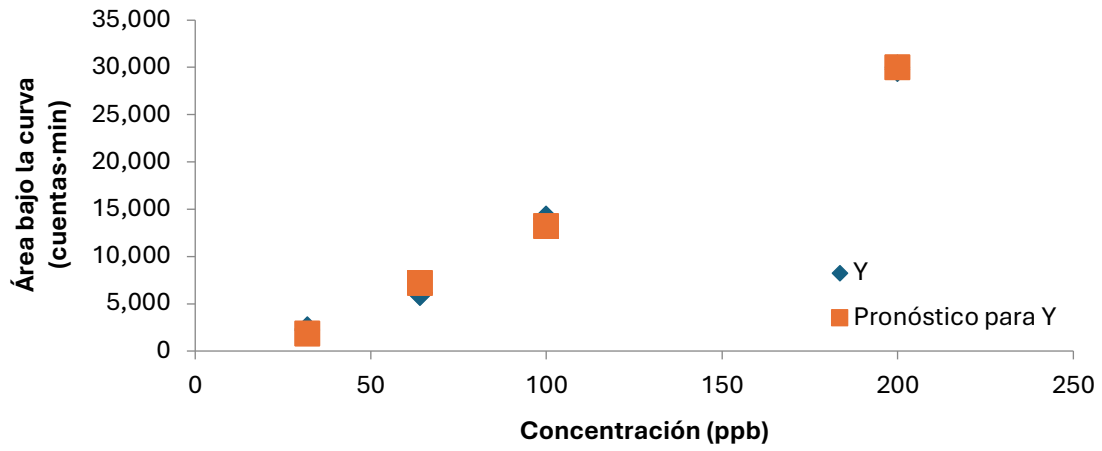


Gráfico 47: Curva de regresión ajustada de claritromicina baja.

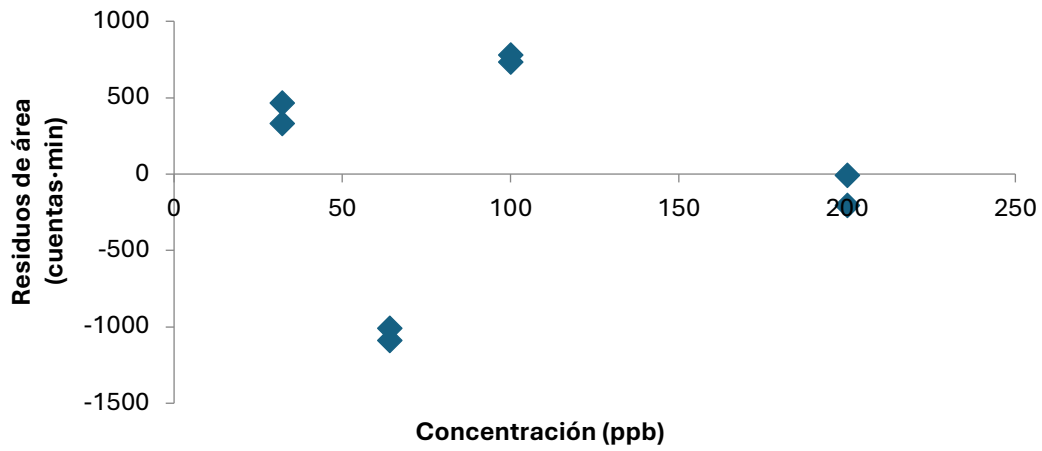


Gráfico 48: Gráfico de residuales de claritromicina baja.

- Claritromicina curva alta:

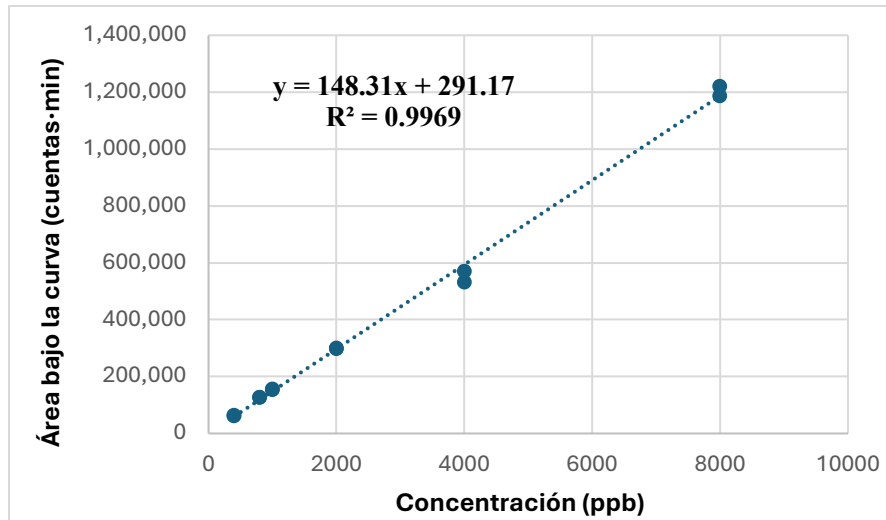


Gráfico 49: Curva de calibración de claritromicina alta.

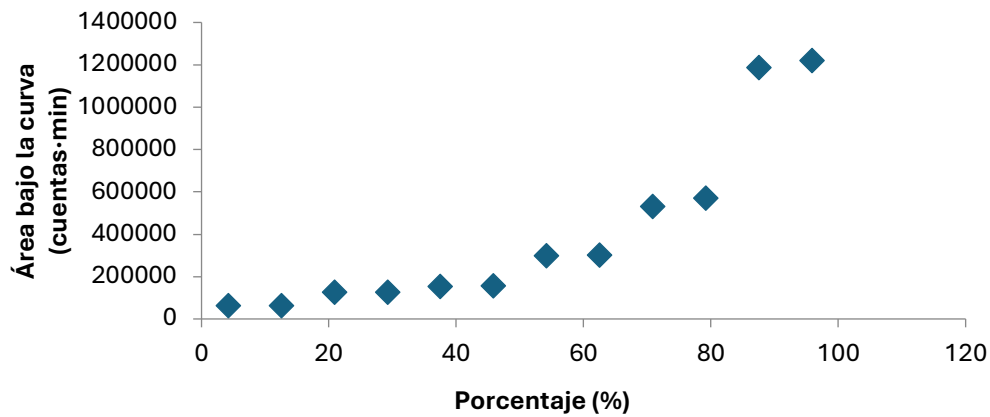


Gráfico 50: Probabilidad normal de claritromicina alta.

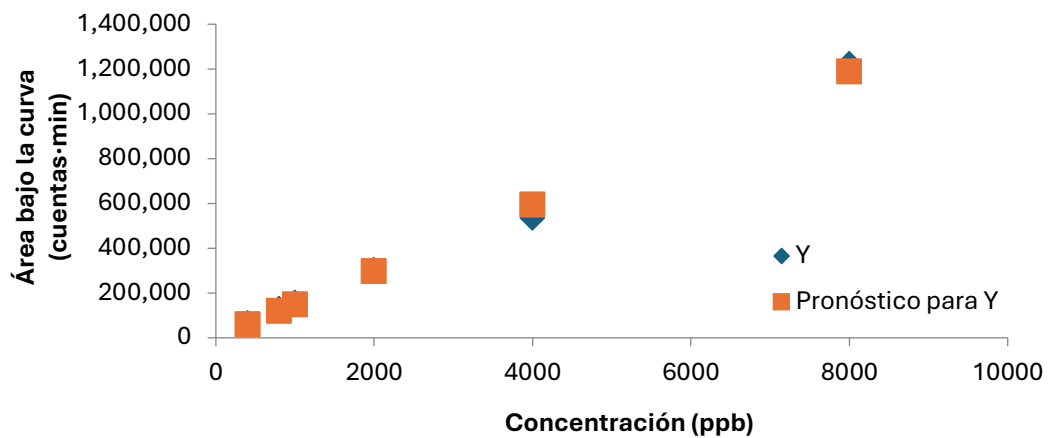


Gráfico 51: Curva de regresión ajustada de claritromicina alta.

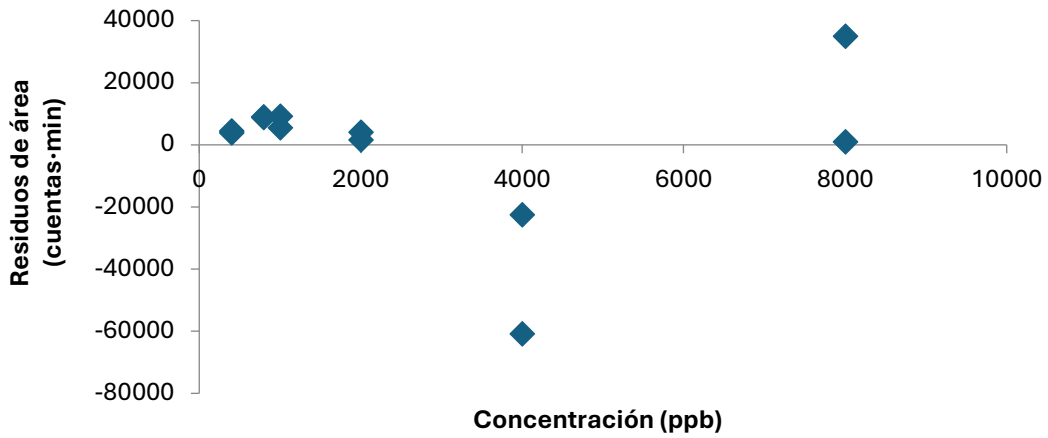


Gráfico 52: Gráfico de residuales de claritromicina alta.

○ **Ketoprofeno curva baja:**

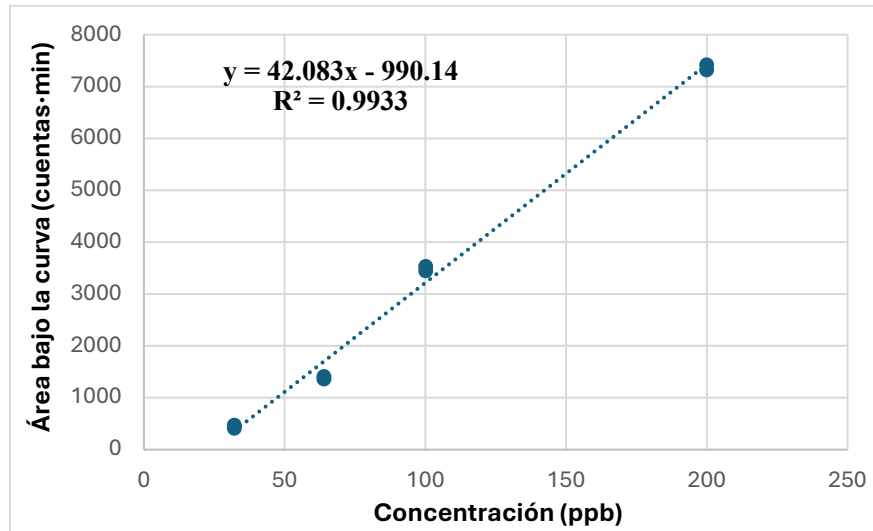


Gráfico 53: Curva de calibración de ketoprofeno bajo.

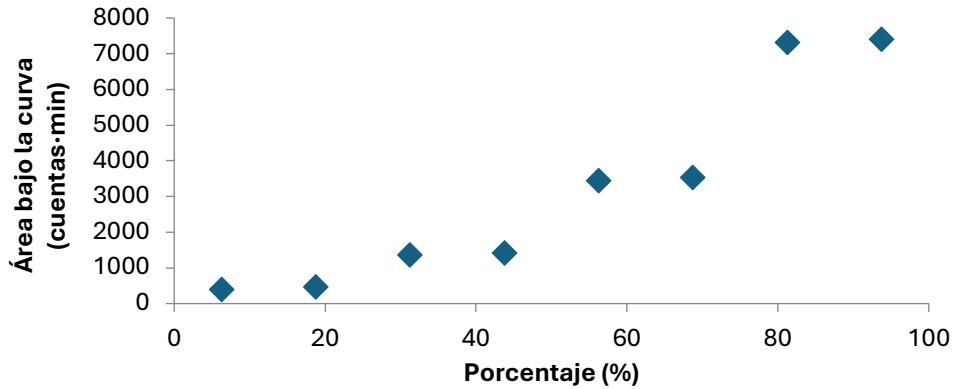


Gráfico 54: Probabilidad normal de ketoprofeno bajo.

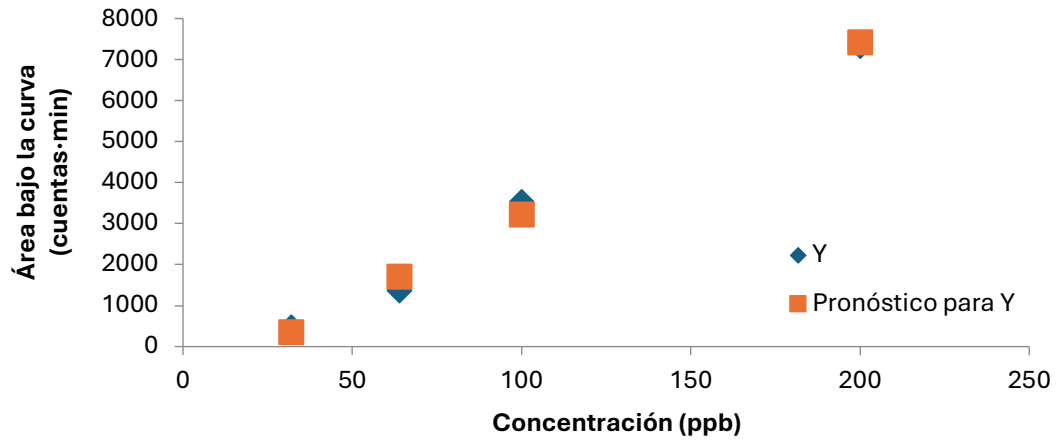


Gráfico 55: Curva de regresión ajustada de ketoprofeno bajo.

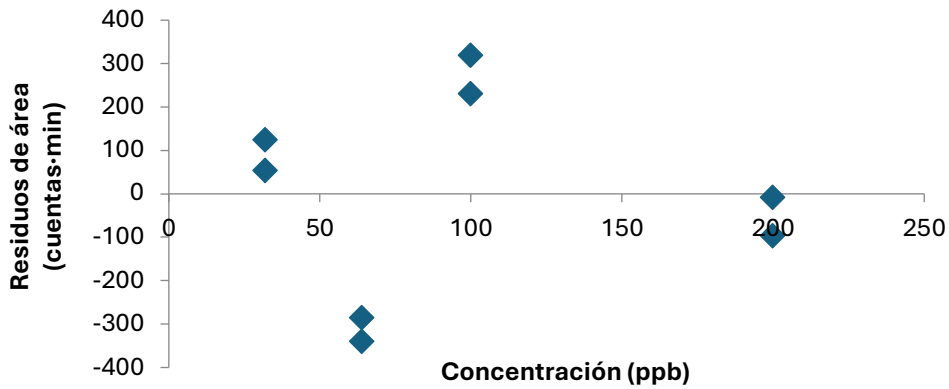


Gráfico 56: Gráfico de residuales de ketoprofeno bajo.

○ **Ketoprofeno curva alta:**

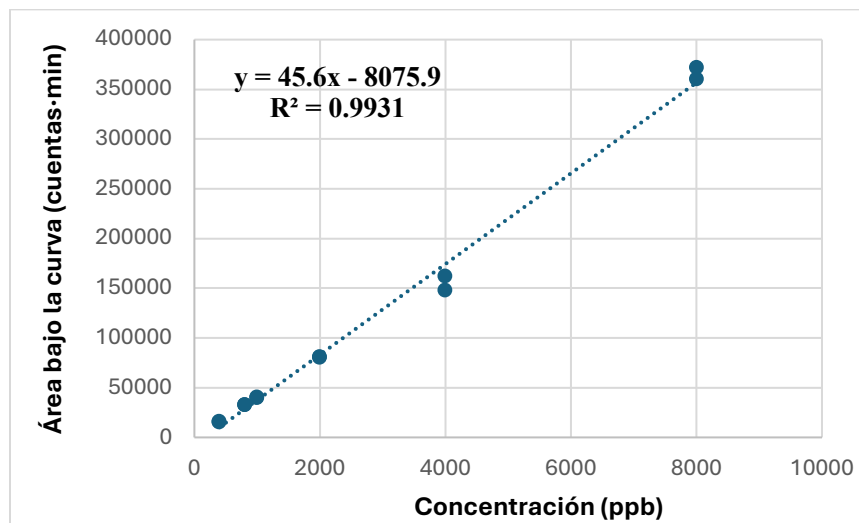


Gráfico 57: Curva de calibración de ketoprofeno alto.

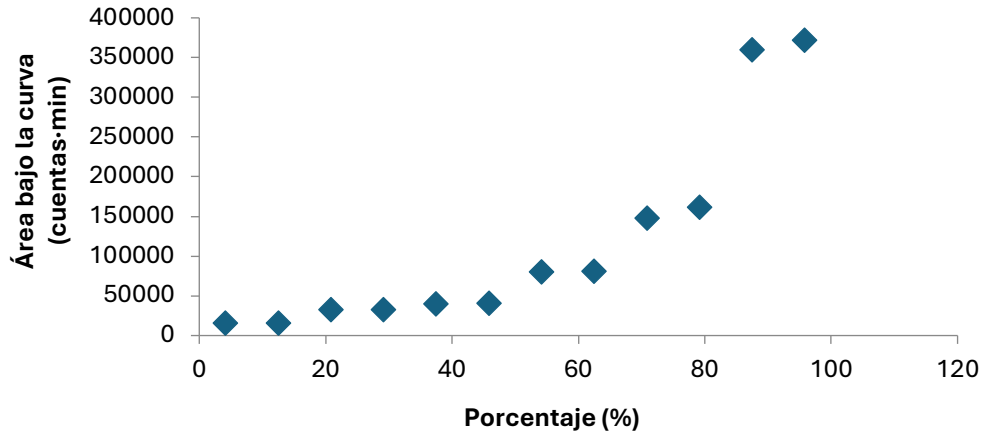


Gráfico 58: Probabilidad normal de ketoprofeno alto.

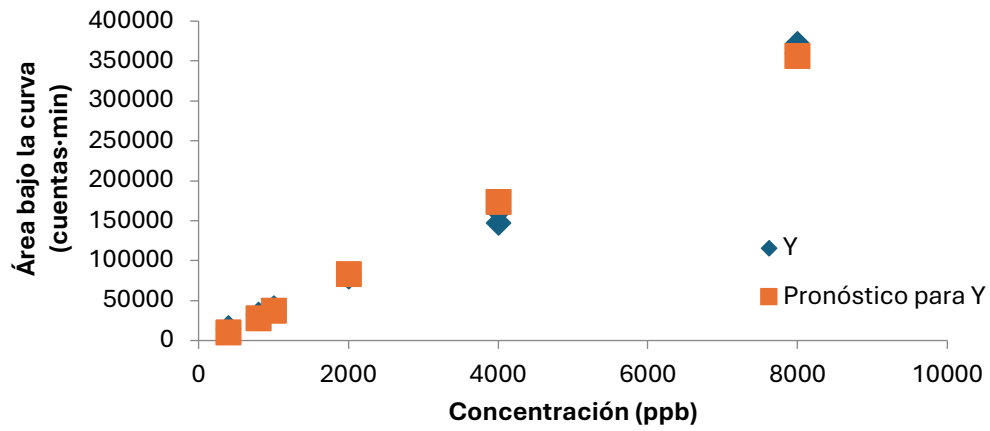


Gráfico 59: Curva de regresión ajustada de ketoprofeno alto.

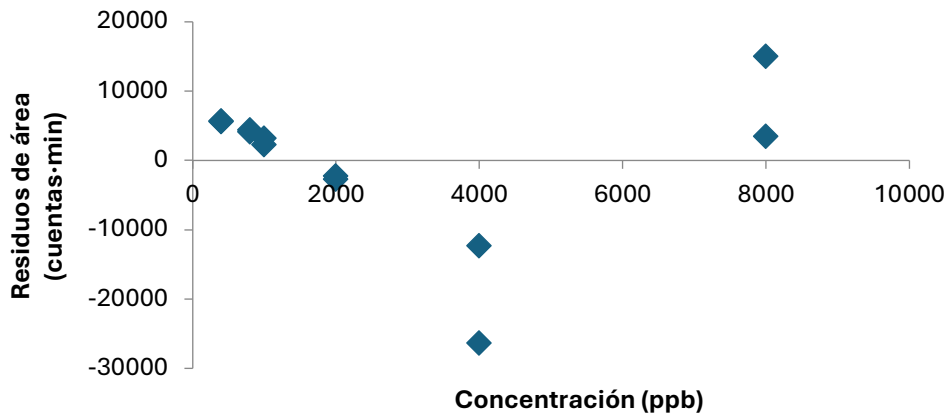


Gráfico 60: Gráfico de residuales de ketoprofeno alto.



○ **Diclofenaco curva baja:**

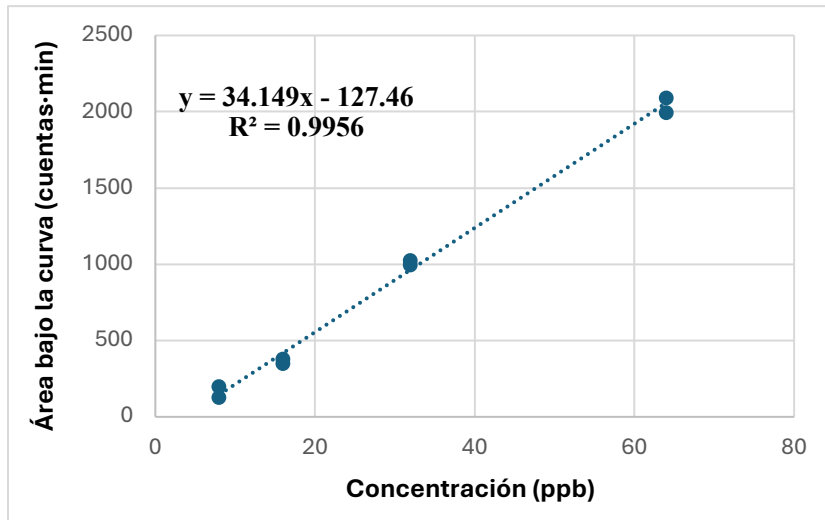


Gráfico 61: Curva de calibración de diclofenaco bajo.

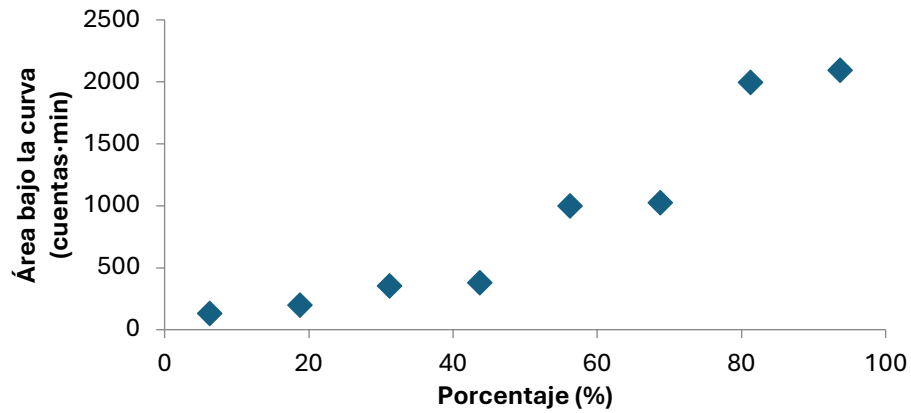


Gráfico 62: Probabilidad normal de diclofenaco bajo.

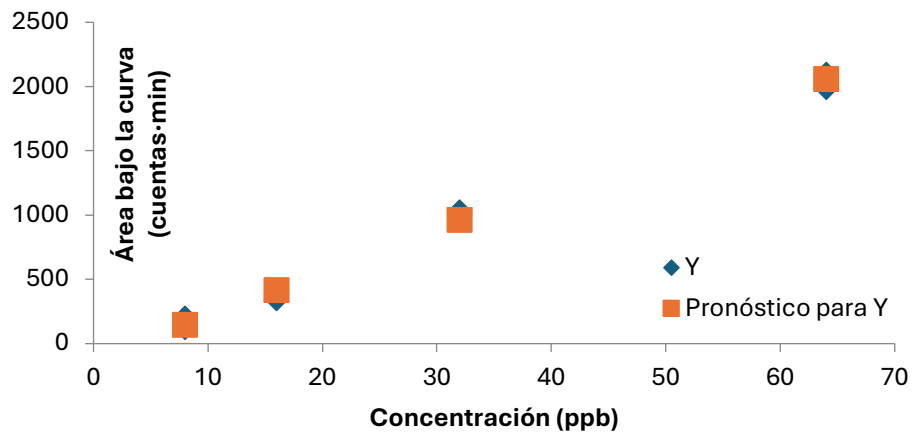


Gráfico 63: Curva de regresión ajustada de diclofenaco bajo.

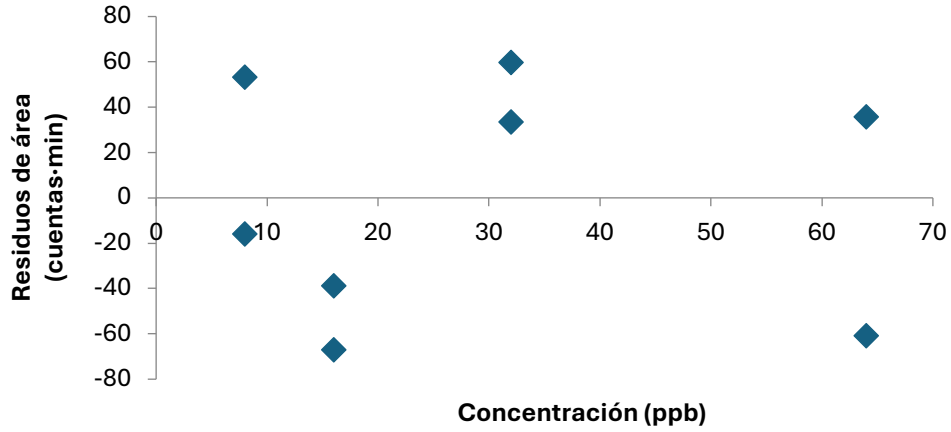


Gráfico 64: Gráfico de residuales de diclofenaco bajo.

○ **Diclofenaco curva alta:**

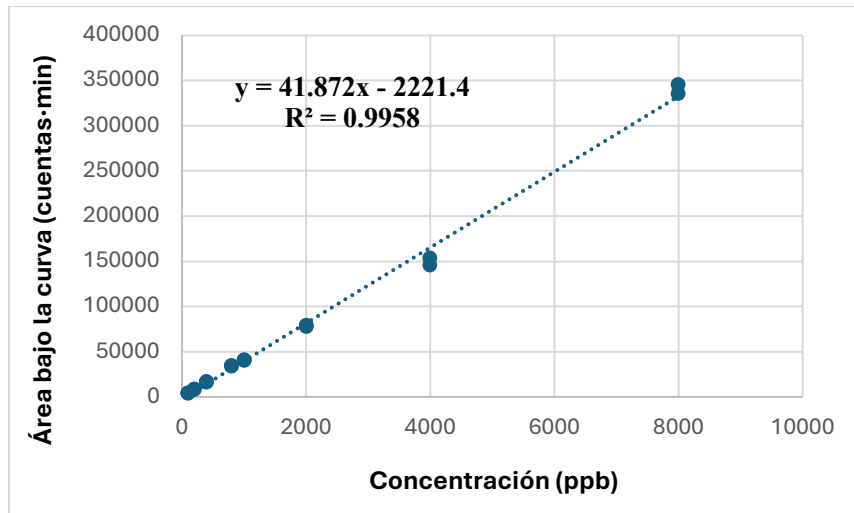


Gráfico 65: Curva de calibración de diclofenaco alto.

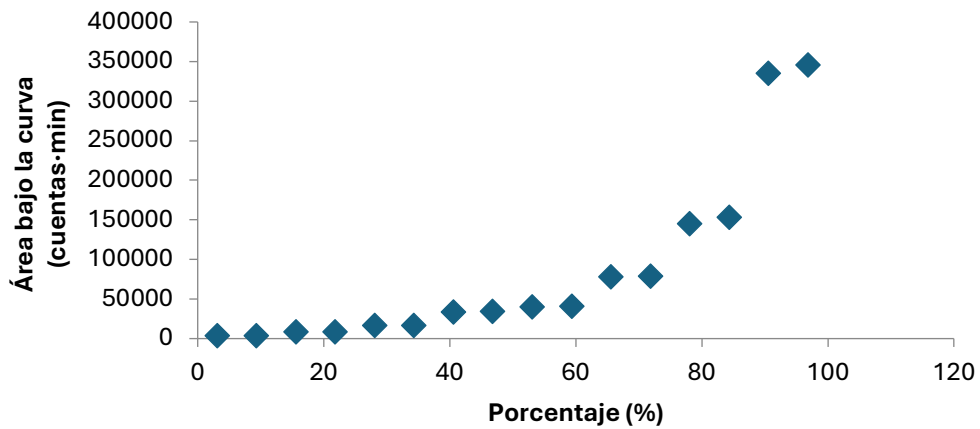


Gráfico 66: Probabilidad normal de diclofenaco alto.

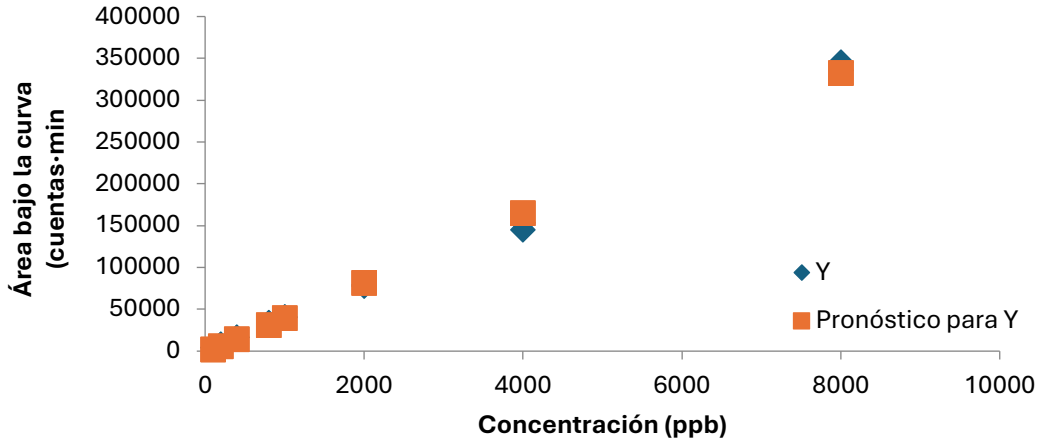


Gráfico 67: Curva de regresión ajustada de diclofenaco alto.

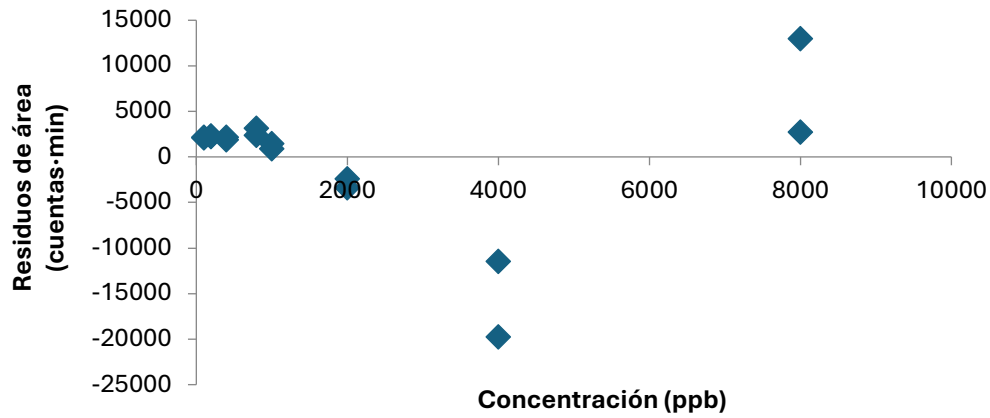


Gráfico 68: Gráfico de residuales de diclofenaco alto.

○ **Ibuprofeno curva baja:**

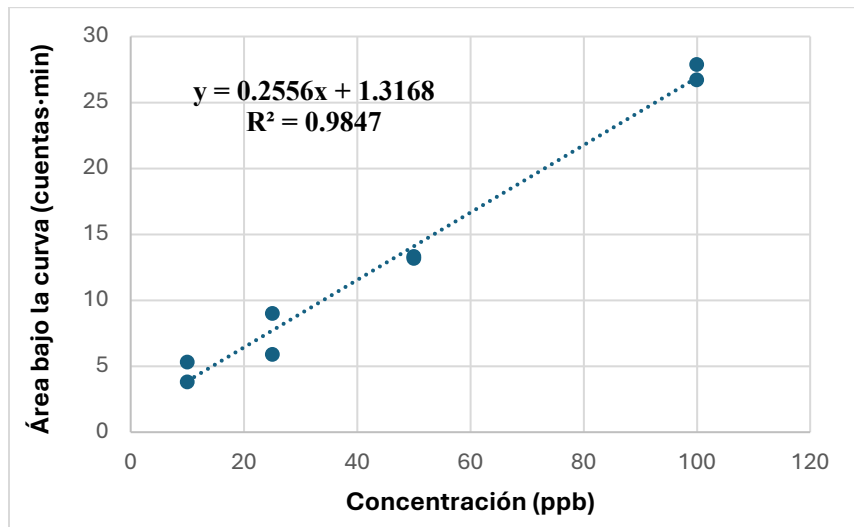


Gráfico 69: Curva de calibración de ibuprofeno bajo.

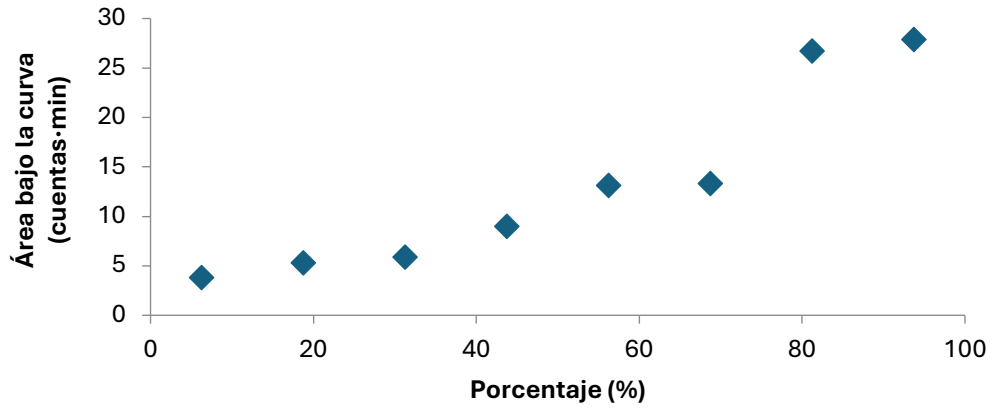


Gráfico 70: Probabilidad normal de ibuprofeno bajo.

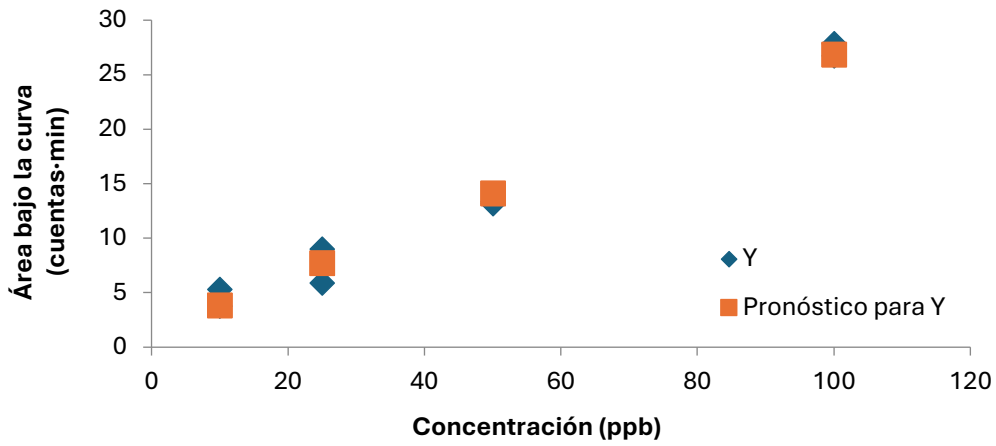


Gráfico 71: Curva de regresión ajustada de ibuprofeno bajo.

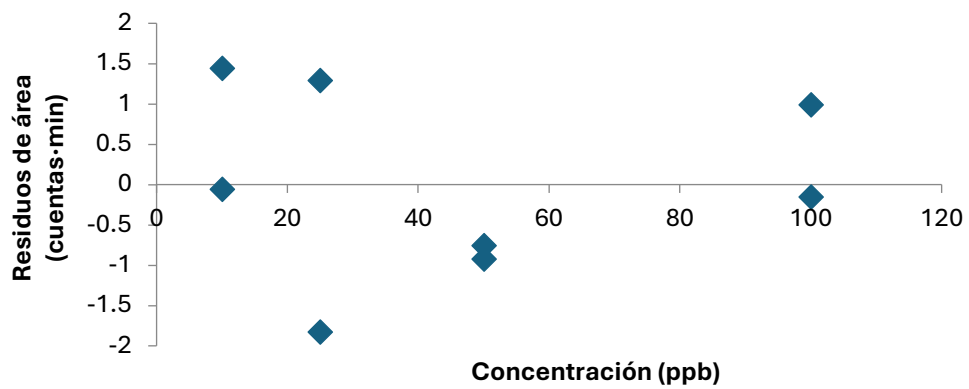


Gráfico 72: Gráfico de residuales de ibuprofeno bajo.



○ **Ibuprofeno curva alta:**

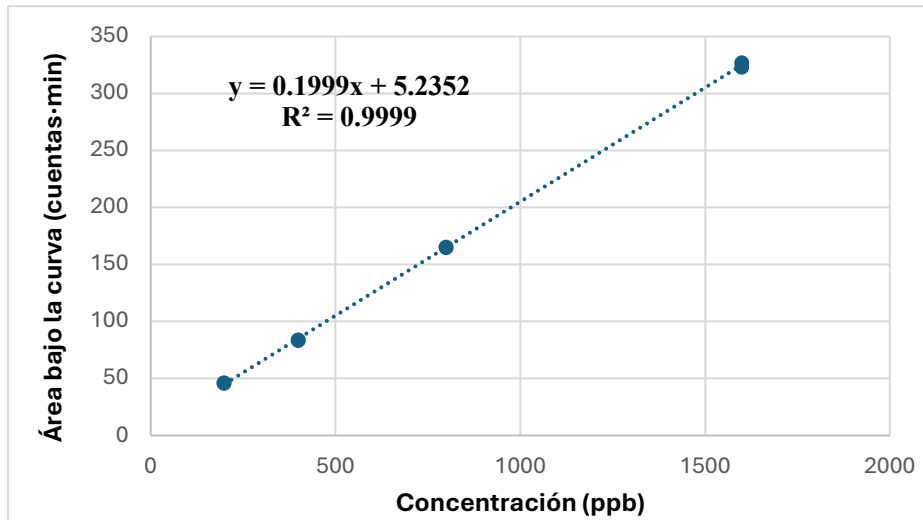


Gráfico 73: Curva de calibración de ibuprofeno alto.

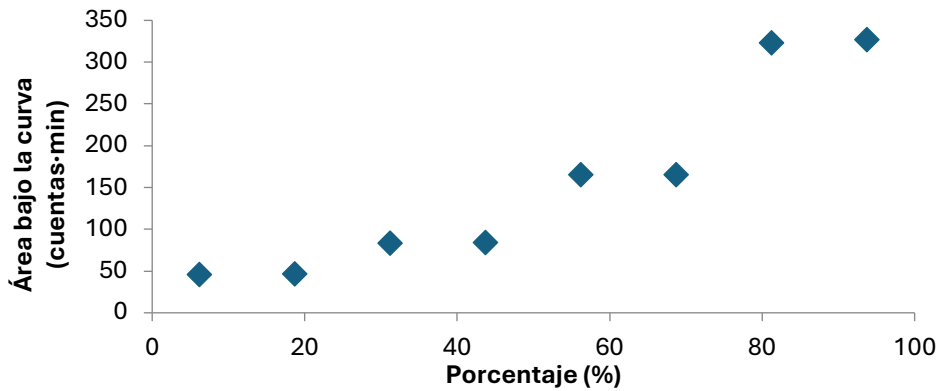


Gráfico 74: Probabilidad normal de ibuprofeno alto.

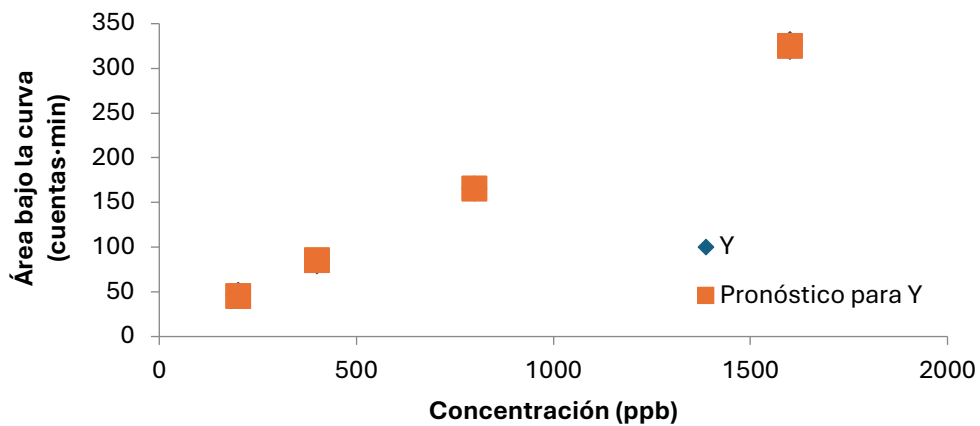


Gráfico 75: Curva de regresión ajustada de ibuprofeno alto.

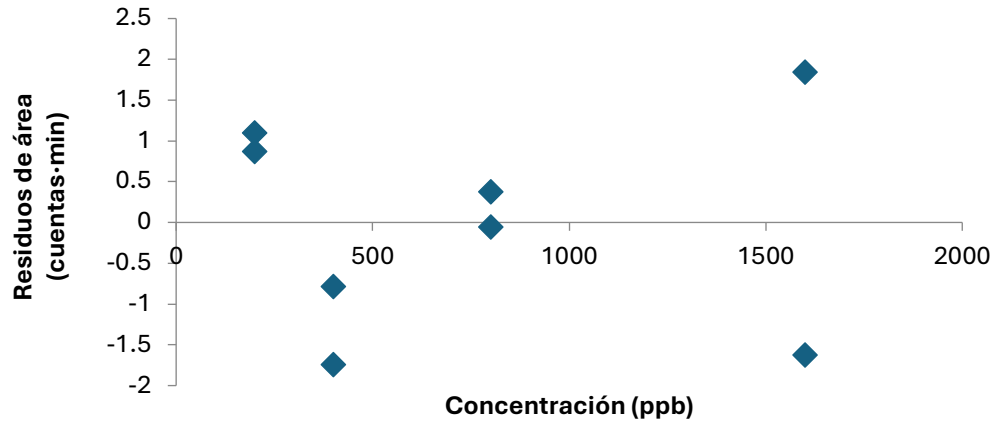


Gráfico 76: Gráfico de residuales de ibuprofeno alto.

○ Naproxeno curva baja:

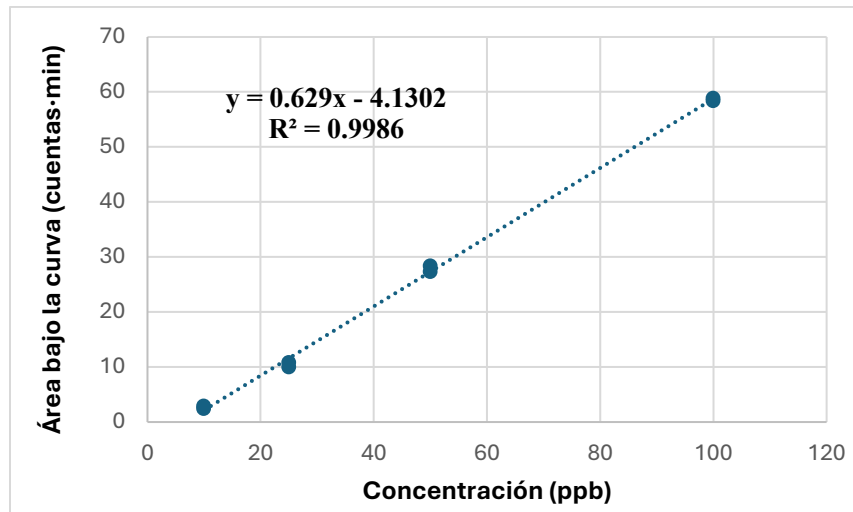


Gráfico 77: Curva de calibración de naproxeno bajo.

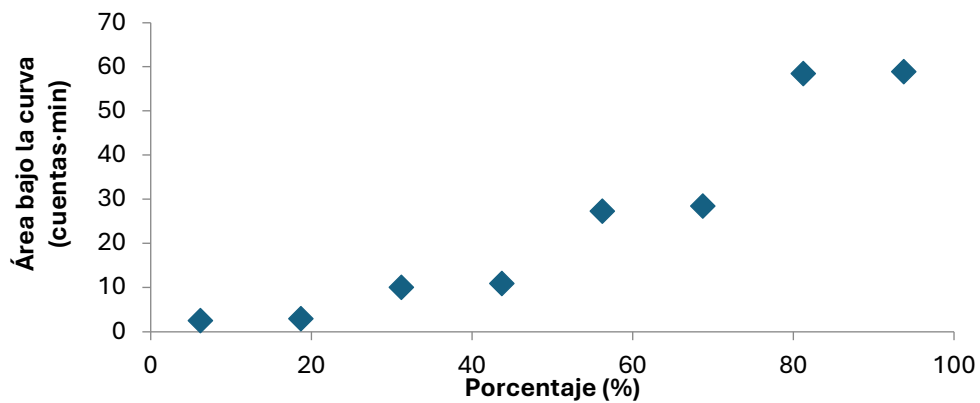


Gráfico 78: Probabilidad normal de naproxeno bajo.

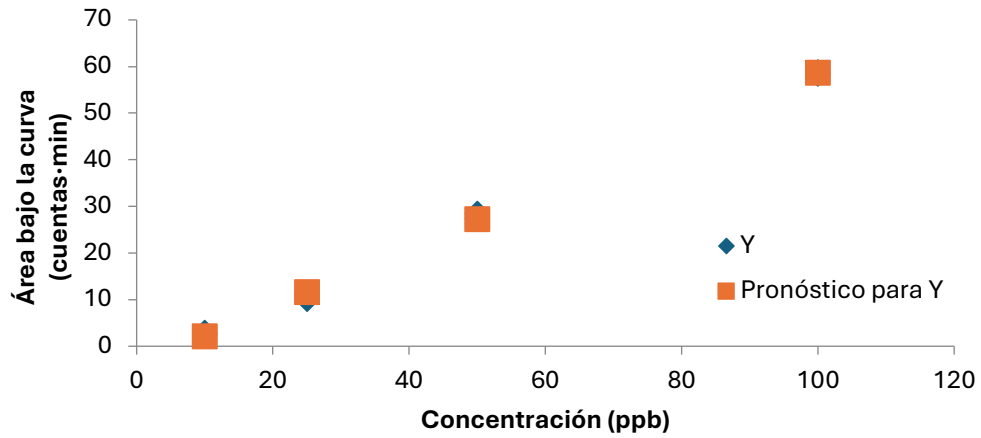


Gráfico 79: Curva de regresión ajustada de naproxeno bajo.

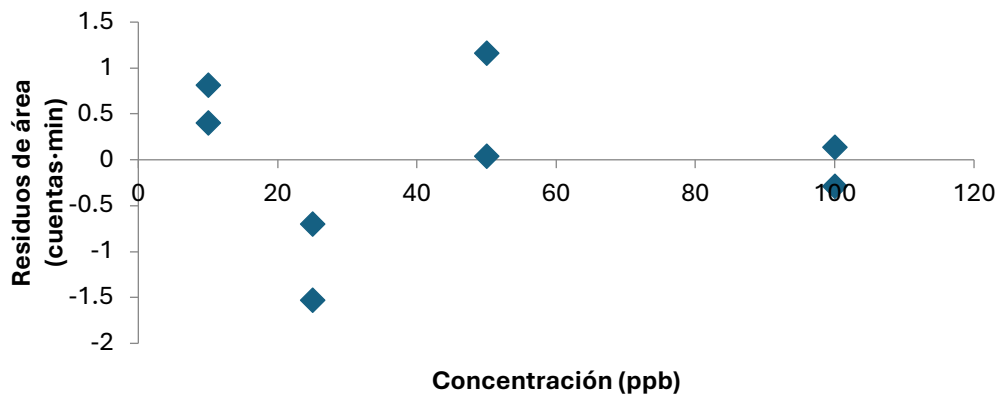


Gráfico 80: Gráfico de residuales de naproxeno bajo.

○ **Naproxeno curva alta:**

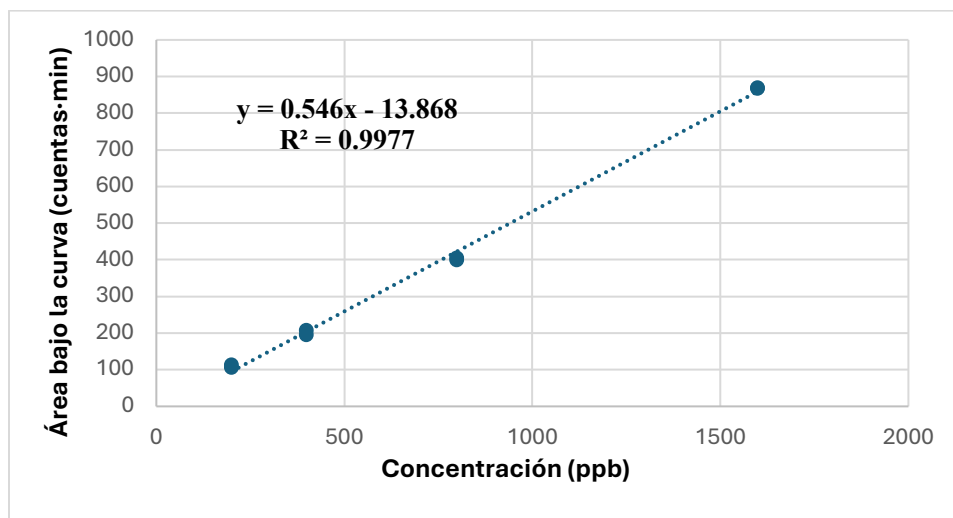


Gráfico 81: Curva de calibración de naproxeno alto.

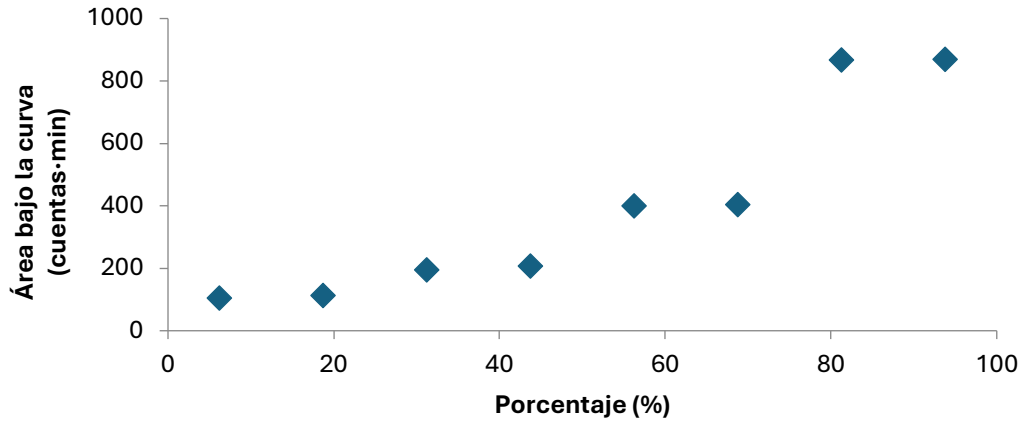


Gráfico 82: Probabilidad normal de naproxeno alto.

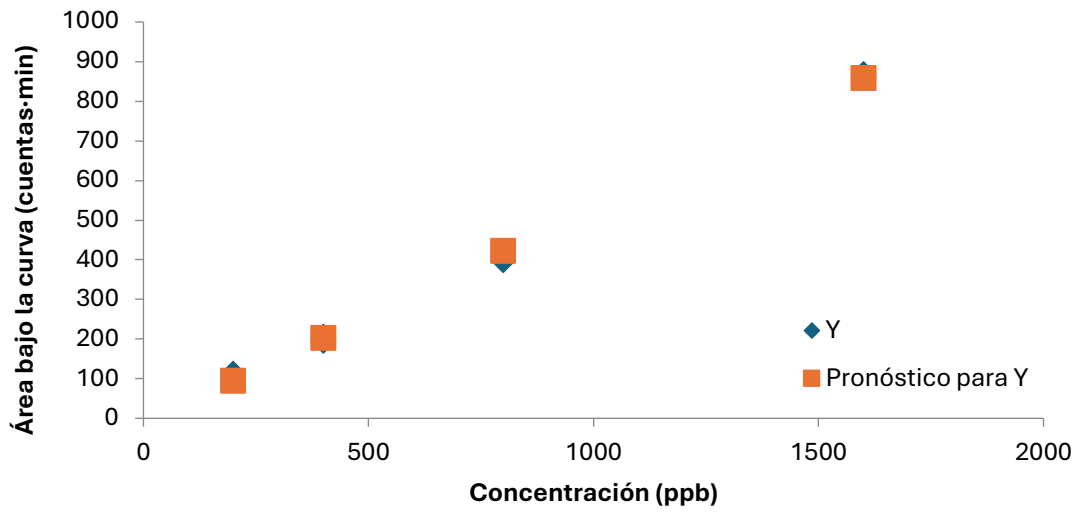


Gráfico 83: Curva de regresión ajustada de naproxeno alto.

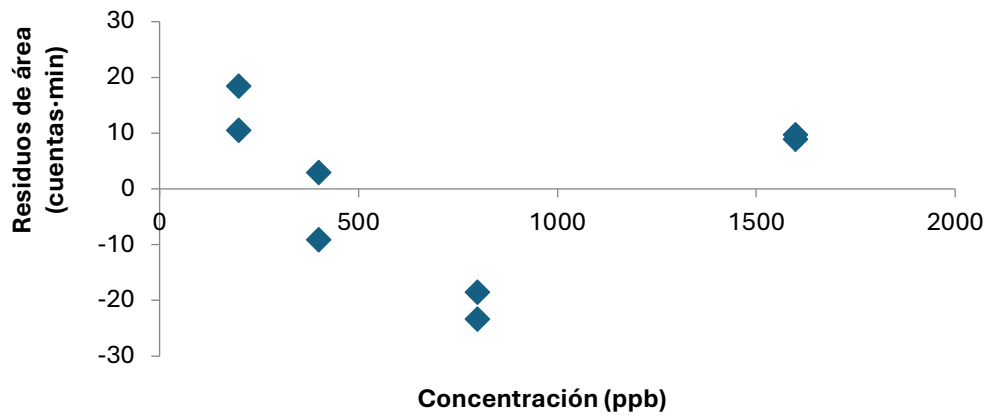


Gráfico 84: Gráfico de residuales de naproxeno alto.