

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
MAESTRÍA EN QUÍMICA AMBIENTAL



**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTIBIÓTICOS DE
AMPLIO ESPECTRO EN EFLUENTES DE UN HOSPITAL
PÚBLICO DE SAN LORENZO.**

Fátima Judit Báez Vázquez

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de
Asunción, como requisito para la obtención del grado de Magister en Química Ambiental.
Departamento de Fitoquímica

SAN LORENZO – PARAGUAY

Diciembre – 2021

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTIBIÓTICOS DE AMPLIO ESPECTRO EN EFLUENTES DE UN HOSPITAL PÚBLICO DE SAN LORENZO.



FÁTIMA JUDIT BÁEZ VÁZQUEZ

Tutor: Prof. Dr. Nelson Alvarenga

Cotutora: Prof. Dra. Valeria Amé.

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del grado de Magister en Química Ambiental. Departamento de Fitoquímica

San Lorenzo – Paraguay

Diciembre - 2021

**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE
ANTIBIÓTICOS DE AMPLIO ESPECTRO EN
EFLUENTES DE UN HOSPITAL PÚBLICO DE SAN
LORENZO.**

FÁTIMA JUDIT BÁEZ VÁZQUEZ

Aprobado en fecha de diciembre de 2021

Tribunal examinador:

Prof. Dr. Esteban Ferro
Prof. Dra. Olga Heinichen
Prof. Dra. Silvia Caballero
Prof. Dr. Fernando L. Fertonani

FCQ/UNA
FCQ/UNA
FCQ/UNA
IBILCE/UNESP

Prof. Dr. Nelson Alvarenga
Tutor

Prof. Dra. Valeria Amé
Cotutora

Prof. Dra. Fátima Yubero
Directora de Postgrado

Dedicatoria

A mi padre; Pedro

A mi hija; Luján Isabel

A Alvarenga, Fertoni, Amé

A Raquel, Luis Fernando, Eliana

A Mirla, Celeste, Fede, Edgar

A Dai, Ronald, Juan Carlos y Patricia.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca (Contract N° 005/2018) para la Maestría en Química Ambiental (CONACYT – POSG-17-105).

Al laboratorio de Fitoquímica, de la FCQ – UNA, en cuyas instalaciones se realizaron los ensayos referentes al estudio.

A los profesores Dr. Julio Bécker y BC. Rogelio Gonzalez, por las orientaciones referentes al uso de antibióticos en centros hospitalarios.

A las Coordinaciones de Laboratorio de Materias Básicas y Área industrial de la FCQ – UNA, por el apoyo en el uso de los materiales requeridos.

A la dra. Valeria Amé, por las sugerencias realizadas con respecto al análisis de datos.

A los profesores Fátima Yubero de Servián, Nelson Alvarenga y Fernando Fertonani por su apoyo en los momentos difíciles, pero por sobretodo su paciencia, apoyo y confianza

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN	5
2.	JUSTIFICACIÓN	7
3.	OBJETIVOS	9
3.1.	Objetivo General	9
3.2.	Objetivos Específicos.....	9
4.	MARCO TEÓRICO.....	10
4.1.	Contaminantes emergentes.....	10
4.2.	Antibióticos	14
4.2.1	Clasificación de los antibióticos	15
4.2.1.1.	Según su acción sobre las bacterias	15
4.2.1.2.	Según su mecanismo de acción.....	15
4.2.1.3.	Por su estructura química	16
4.3	Tetraciclinas	17
4.4	Ciprofloxacinas	19
4.5	Antecedentes	19
4.6	Normativa vigente.....	21
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1	Puntos de muestreo	24

5.2	Muestreo.....	27
5.3	Pretratamiento de la muestra.....	29
5.4	Tratamiento de la muestra y Extracción en fase sólida.....	30
5.5	Curvas de calibración.....	31
5.6	Método cromatográfico.....	32
6.	RESULTADOS.....	34
6.1	Cuantificación y validación del método.....	34
6.2	Curvas de calibración por el método de mínimos cuadrados.....	36
6.3	Curvas de calibración por el método de regresión ponderada	38
6.4	Detección de analitos en las muestras analizadas	41
7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	44
8.	CONCLUSIONES	48
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

1. INTRODUCCIÓN

La presencia de fármacos en unidades ambientales debido a actividades antropogénicas, es un problema de salud pública, debido a la poca difusión que se tiene sobre sus efectos acumulativos sobre los seres vivos y su entorno. Los fármacos más relevantes dentro de las investigaciones son analgésicos, antihipertensivos y antibióticos, debido a las grandes cantidades descargadas al sistema cloacal por su alto consumo en la población (Gros, Rodríguez-Mozaz, & Barceló, 2013).

Uno de los grupos que genera mayor preocupación, son los antibióticos, debido a factores como su uso desmedido desde hace varios años, principalmente en la época de invierno; así como su acumulación e incluso persistencia, manifestándose tanto en reservorios de aguas como en suelos. Otro resultado de dicha persistencia es el desarrollo de resistencia por microorganismos presentes en diversos compartimientos ambientales.

Se ha estudiado la presencia de contaminantes emergentes en aguas residuales urbanas, en aguas residuales de establecimientos ganaderos, hospitalarios e incluso en aguas de consumo, para evaluar el nivel de alteración que pueden generar en efluentes y cauces hídricos (Watkinson, Murby, Kolpin, & Costanzo, 2009).

También es importante mencionar que los métodos convencionales de tratamiento de efluentes domiciliarios son insuficientes para realizar la remoción completa de dichos contaminantes, lo cual ha motivado diversas líneas de investigación para atenuar el riesgo que representan para la población. Estos tratamientos están relacionados con procesos fisicoquímicos, empleo de membranas para ultrafiltración, procesos oxidantes con cloro u ozono, tratamientos biológicos a través de tecnologías de biorreactores, e incluso la combinación de las técnicas previamente mencionadas. (Janet et al., 2012).

Los efluentes hospitalarios son una de las fuentes más comunes de residuos de fármacos, por lo que su monitoreo es muy importante para evaluar la persistencia tanto de microorganismos resistentes como de trazas de dichos productos y principalmente identificar la presencia de antibióticos, cuyo uso va en constante aumento (Peña-Álvarez & Castillo-Alanís, 2015).

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la presencia de fármacos, como sus productos de degradación y los efectos de éstos compuestos sobre los sistemas ecológicos son cada vez más estudiados, debido a la forma en la que alteran los diversos ecosistemas acuáticos y por sobre todo, los organismos que habitan en ellos, ya que, a pesar de estar presentes en pequeñas cantidades, y ser excretados como metabolitos más simples en algunos casos, son altamente consumidos por los seres humanos por lo que son continuamente introducidos en los sistemas acuáticos, causando cambios en las actividades metabólicas de los seres vivientes presentes en estos.

Dentro de estos contaminantes emergentes, la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno complejo y creciente, a tal punto de ser declarado mundialmente un problema de salud pública.

En nuestro país, el control del expendio de antibióticos se ha dado a partir del año 2018, sin embargo, no existen registros acerca de la presencia o incluso la persistencia de residuos de medicamentos en cauces hídricos, y sus potenciales riesgos para la población y los seres vivos presentes en dichos ecosistemas.

Por todo lo expuesto anteriormente, la presente investigación tiene como objetivo principal generar datos certeros relacionados a la problemática de la presencia de trazas de antibióticos de amplio espectro dentro de efluentes hospitalarios. Las muestras fueron extraídas de un hospital público de la ciudad de San Lorenzo con la finalidad de identificar y cuantificar los antibióticos tetraciclina y ciprofloxacina, de la clasificación antes mencionada, ambos presentes en la Lista de medicamentos permitidos por el Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. (Comité Técnico Nacional para la Elaboración de la Lista de Medicamentos Esenciales., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Identificar y cuantificar dos antibióticos de amplio espectro en aguas residuales extraídas de un hospital público de San Lorenzo.

3.2 Objetivos específicos

- a. Establecer un sistema de muestreo de efluentes de un hospital público ubicado en la ciudad de San Lorenzo.
- b. Identificar la presencia de tetraciclina por medio de cromatografía líquida acoplada a espectroscopía de masas en tándem (LC-MS/MS).
- c. Identificar la presencia de ciprofloxacina, por medio de cromatografía líquida acoplada a espectroscopía de masas en tándem (LC-MS/MS).
- c. Evaluar la variación de las cantidades de analitos detectados en las muestras en función del tiempo.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Contaminantes Emergentes

El término “contaminantes emergentes” se refiere a aquellos previamente desconocidos o no reconocidos como tales cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva pero sí la preocupación por las posibles consecuencias de la misma. Los contaminantes emergentes son compuestos de los cuales se sabe relativamente poco o nada acerca de su presencia e impacto en los distintos compartimentos ambientales, debido en parte a que no hayan sido regulados, y de que la disponibilidad de métodos para su análisis sea poca (Damiá Barceló, 2007). Los tipos de contaminantes emergentes son variados, entre estos se encuentran los antibióticos, cuyo uso se ha extendido con el tiempo, principalmente en la época de invierno, que pueden generar residuos potencialmente dañinos para el medio ambiente, debido a su persistencia y su acumulación en suelos y matrices de aguas. (Lázaro-Bengoa, De Abajo Iglesias, López-Navas, & Fernández-Cortizo, 2010)

La lista de contaminantes emergentes incluye una amplia variedad de productos de uso diario con aplicaciones tanto industriales como domésticas. Algunos de ellos, a raíz de las intensas investigaciones llevadas a cabo en los últimos años, han sido incluidos en la

lista de sustancias prioritarias en el agua (Damiá Barceló, 2007). Factores como la demanda, la frecuencia de administración, la automedicación, el consumo ilícito de drogas y los procesos fisiológicos determinan la carga y la persistencia de sus principios activos en aguas (Jiménez, 2011).

De acuerdo con las numerosas revisiones bibliográficas realizadas en los últimos años, entre las clases de contaminantes emergentes que demandan una mayor y más urgente atención, se encuentran los retardantes de llama bromados, los cloroalcanos, los pesticidas polares, los compuestos perfluorados, los fármacos, las drogas de abuso y los metabolitos y/o productos de degradación de las clases de sustancias anteriores (Damiá Barceló, 2007). El riesgo radica en la escasez de datos ambientales y ecotoxicológicos, así como de métodos para su análisis, y a las posibles consecuencias de su presencia en el medio ambiente.

Los efectos de estas sustancias aún no son comprendidos en su totalidad, sin embargo, muchos de estos modulan el sistema endocrino y el sistema inmune de animales, indicando su potencialidad sobre la homeostasis de los organismos acuáticos (Jiménez, 2011).

Entre los motivos mencionados anteriormente, los productos farmacéuticos generan preocupación ya que han sido detectados en aguas superficiales y subterráneas. (Janet et al., 2012). Las vías principales de ingreso de productos farmacéuticos al medio ambiente son a través de la excreción humana, la eliminación de los productos no utilizados y por el uso agrícola.

Entre los fármacos más prescritos en medicina humana destacan los analgésicos/antiinflamatorios como el ibuprofeno y el diclofenac, los antiepilépticos como la carbamazepina, antibióticos como la amoxicilina y el sulfametoxazol, y los β -bloqueantes como el metoprolol. Los fármacos que se han detectado en el medio ambiente acuático, ya sea directamente o sus metabolitos, incluyen analgésicos/antiinflamatorios, antibióticos, antiepilépticos, β -bloqueantes, reguladores de lípidos, medios de contraste de rayos X, anticonceptivos orales, esteroides y otros, como broncodilatadores, sedantes, etc. (Damiá Barceló, 2007). Sin embargo, el uso de los antibióticos puede extenderse a actividades como la acuicultura, la ganadería, y la avicultura, y éstos pueden tener el mismo efecto residual que los utilizados en seres humanos, con el agravante de ser despachados a los cauces hídricos sin tratamiento previo.

Según las propiedades físico-químicas de los fármacos y sus metabolitos y productos de degradación, y las características de los suelos, estas sustancias pueden llegar a alcanzar las aguas subterráneas y contaminar los acuíferos o bien quedar retenidas en el suelo y acumularse pudiendo afectar al ecosistema y a los humanos a través de la cadena trófica.

En consecuencia, para una evaluación realista del medio acuático es recomendable realizar un estudio integrado agua subterránea-suelo/sedimento-agua superficial- suelo.

Los medicamentos más relevantes dentro de las investigaciones son analgésicos, antihipertensivos y antibióticos, (Janet et al., 2012) debido a las grandes cantidades descargadas al sistema cloacal por su alto consumo en la población. Estos residuos farmacéuticos son transportados al ciclo del agua por diferentes rutas: las plantas de tratamiento de aguas residuales actúan como una puerta de entrada de estos productos a los cuerpos de agua, porque muchos de estos compuestos no son realmente retenidos en sus procesos de tratamiento y, además, porque muchos residuos farmacéuticos veterinarios son descargados directamente al ecosistema. Y lo que representa mayor riesgo es que, en algunos casos, estos residuos han sido detectados en aguas potables (Janet et al., 2012).

Un aspecto preocupante de la presencia de antibióticos en cauces hídricos, es que su presencia, incluso en bajas concentraciones (a nivel de ng/L o µg/L) puede tener efectos adversos en organismos vivos presentes en estos sistemas: plantas acuáticas, peces, algas, bacterias u otros. Estos efectos pueden evidenciarse como reacciones alérgicas en individuos susceptibles presentes en dichos medios, pero el efecto más preocupante es la presencia y persistencia de cepas bacterianas resistentes a antibióticos.

4.2 Antibióticos

Los antibióticos son fármacos de amplio uso en el mundo; su efecto contra microorganismos patógenos en animales y humanos, así como su uso para la preservación de alimentos y piensos, ha incrementado su producción y consumo, como resultado permitiendo grandes descargas sobre los cuerpos de agua con manifestaciones de resistencia microbiana en diversas zonas de estudio. (Watkinson et al., 2009)

Gran parte de los antibióticos acaban en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) debido a una mala gestión en su eliminación y a una estructura química que les permite, a la mayoría, ser activos durante largos periodos de tiempo.

4.2.1. Clasificación de los antibióticos

4.2.1.1 Según su acción sobre las bacterias

Cuando un antibiótico bloquea el desarrollo y la multiplicación de bacterias recibe el nombre de bacteriostático. Sin embargo, al ser retirado, se revierte dicho efecto.

Cuando un antibiótico provoca la muerte bacteriana en un proceso irreversible, incluso al ser retirado, el mismo es llamado bactericida.

Esta clasificación puede variar según la existencia de factores como el tipo de microorganismo, el crecimiento celular, la concentración del antibiótico, las condiciones del medio y el tiempo de contacto, entre otros. (Cué, 1985)

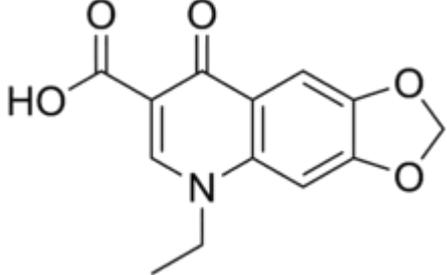
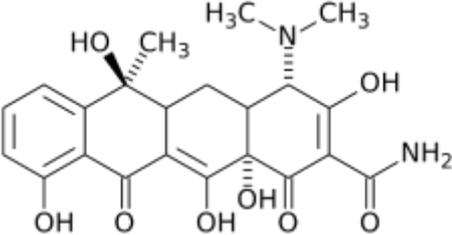
4.2.1.2 Según su mecanismo de acción

En general, los antibióticos actúan:

- a) Previniendo la síntesis de compuestos de la pared celular bacteriana (penicilinas)
- b) Dañando la membrana citoplasmática bacteriana.
- c) Interfiriendo con la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Alvarado, 2015)

4.2.1.3 Por su estructura química

Esta clasificación es más utilizada en la literatura científica; los miembros del mismo grupo tienen estructuras similares, actúan por mecanismos similares y por lo tanto, tienen un comportamiento similar en un ecosistema dado. De acuerdo a Alvarado (Alvarado, 2015), la clasificación de los antibióticos mencionados en la siguiente tabla, son los más importantes debido en medicina humana como veterinaria:

Clasificación de antibióticos	Estructura	Ejemplos
Quinolonas		Norfloxacin Esfarfloxacina Ciprofloxacina
Tetraciclinas		Doxiciclina Tetraciclina

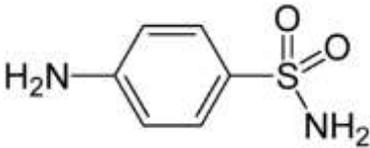
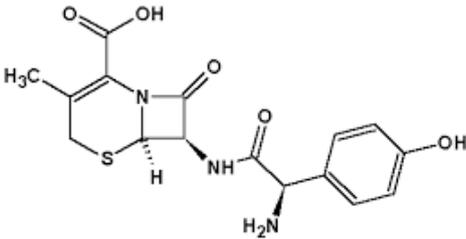
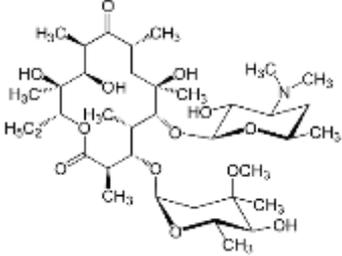
Sulfonamidas		Sulfametoxazol Sulfadimetoxina
β -Lactámicos		Amoxicilina Ampiciclina
Macrólidos		Azitromicina Claritromicina

Tabla 1: Clasificación de antibióticos de acuerdo a su estructura química. Fuente: Alvarado, 2015.

4.3 Tetraciclinas

Las tetraciclinas son un grupo de fármacos con estructura química básica que comprende un núcleo común de octahidronaftaceno, que contiene cuatro anillos fusionados. Son compuestos anfóteros, tienen tres diferentes valores de pKa de aproximadamente 3, 7 y 9, lo cual hace que las tetraciclinas presenten carga en todo el rango de pH. Debido a esto, el ajuste del pH es una etapa muy importante en el análisis de las tetraciclinas. Las tetraciclinas también tienden a formar complejos con metales iónicos divalentes.

(Lorenzo, P., A Moreno, I Lizasoain, J.C. Leza, M.A Moro, 2008)

Las tetraciclinas ejercen su acción a nivel de ribosoma de las bacterias Gram negativas, para esto se requiere que penetren a la célula del microorganismo por mecanismos de difusión pasiva a través de canales hidrófilos (porinas) y por procesos de transporte activo dependiente de energía. Una vez dentro de la célula, las tetraciclinas se unen de manera reversible a los receptores en la subunidad 30s del ribosoma bacteriano y de esta manera bloquean la fijación del aminoacil-tRNA al sitio aceptor en el complejo mRNA-ribosoma, esto evita la incorporación de nuevos aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento, inhibiendo así la síntesis de proteínas. Es importante mencionar que la selectividad de las tetraciclinas para inhibir la síntesis de proteínas en las bacterias es debido a que las células de mamífero carecen del sistema de transporte activo de las bacterias y además, las características del ribosoma bacteriano son diferentes a las del ribosoma de mamíferos (Lorenzo, P., A Moreno, I Lizasoain, J.C. Leza, M.A Moro, 2008).

4.4 Ciprofloxacina

Es un antibiótico que pertenece a la familia de las quinolonas, de segunda generación (grupo de las fluoroquinolonas), utilizado para tratar el ántrax, la peste, el cólera, la meningitis bacteriana, infecciones urinarias y muchas otras infecciones graves. Este

grupo de antibióticos se caracteriza por su rápida acción, pues tiene una alta capacidad de penetración en las células y tejidos de mamíferos, tienen gran capacidad para inducir resistencia bacteriana. Su modo de acción predominante es la inhibición de la replicación del ADN y el crecimiento celular al unirse con una enzima llamada ADN girasa que queda bloqueada, probablemente este mecanismo es el responsable de la acción bacteriostática de las quinolonas. (Feican Guerrero, 2018)

4.5 Antecedentes

La preocupación a nivel mundial por identificar posibles fuentes de contaminación no contempladas ha llevado a desarrollar técnicas más eficaces para la detección de productos farmacéuticos tanto en efluentes como en cauces hídricos y aguas de consumo (Gros et al., 2013; Hirsch et al., 1998; Qualls, Agouridis, & Kulshrestha, 2017).

En otros países de Latinoamérica como Argentina, Ecuador, Brasil, México se han realizado ensayos para determinar la presencia de antibióticos en cauces hídricos relacionados con actividades antropogénicas.

Se ha estudiado la presencia de contaminantes emergentes en aguas residuales urbanas y hospitalarias e incluso en aguas de consumo., Stumpf, M. *et al* (1999) han determinado

la presencia de algunos contaminantes emergentes en efluentes de ríos del estado de Río de Janeiro. La presencia de estos contaminantes en los cuerpos hídricos contribuye a la resistencia de bacterias a los antibióticos. (Bertomeu Bartual, 2017), (Nuñez et al., 2016).

Actualmente no existen publicaciones realizadas en Paraguay sobre la detección de antibióticos en cauces hídricos, sin embargo, se han realizado trabajos sobre los efectos de estos debido a su uso no controlado. Lara y colaboradores, buscaron describir el panorama actual referente a la presencia de los mismos en diversos compartimientos ambientales y los factores genéticos responsables de la evolución de la resistencia microbiana en los mismos (Lara, Torres, Baez, & Albertini, 2019). Así también Mendoza y colaboradores, han publicado sobre el riesgo que representan los residuos de antibióticos de uso animal mediante la cuantificación de los mismos en diferentes muestras de leche fluida de vaca expandidas en el país. (Mendoza et al., 2020)

4.6 Normativa vigente

A nivel nacional, se ha implementado la resolución N° 576 y su ampliatoria N° 608 en el año 2018, que condiciona a adquirir antibióticos con receta médica, tras años de ser expedidos libremente y promoviendo la práctica de la automedicación en la población.

Es necesario mencionar que el 29 de mayo de 2019, el Ministerio de Salud de nuestro

país lanza un Plan Nacional de Resistencia Microbiana – Paraguay 2019-2023, con el objetivo de vigilar, contener y controlar de forma integrada la resistencia a los antimicrobianos en el territorio nacional.

La normativa vigente que regula los límites permitidos en efluentes y su posterior uso luego del tratamiento de los mismos, es la Resolución N° 222/02 del Ministerio del Ambiente y Desarrollo Sostenible (SEAM, 2002), sin embargo, dicho documento no contempla niveles de contaminación relacionados a fármacos.

Es importante mencionar que a nivel internacional, existen regulaciones referente al contenido de ciertos residuos de fármacos dentro de productos alimenticios, como la Resolución 37/2010 de la Unión Europea, que establece límites permitidos de ciertos principios activos de medicamentos en productos alimenticios de origen animal (European Comission, 2010). Sin embargo, no se registra este tipo de documentaciones para establecer parámetros o límites permitidos dentro de efluentes tanto urbanos como hospitalarios.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos de análisis fueron realizados en el Departamento de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas. El enfoque de la investigación fue de carácter exploratorio y descriptivo; puesto que la finalidad de este fue identificar la presencia de dos antibióticos de amplio espectro en efluentes hospitalarios, así como la cuantificación de dichos analitos detectados.

Es importante mencionar las limitaciones relacionadas con la pandemia COVID-19, ya que los ensayos se desarrollaron en uno de los puntos más críticos de la misma. Esto impactó tanto en la selección de los puntos de muestreo como en la disponibilidad de tanto de estándares para las curvas de calibración como los cartuchos para el proceso de extracción en fase sólida.

Los antibióticos elegidos para el estudio fueron tetraciclina y ciprofloxacina, debido a su uso como antibióticos de amplio espectro y también por estar ambos mencionados como analitos en diferentes trabajos consultados (Melendez-Marmolejo et al., 2020) (Locatelli, Sodré, & Jardim, 2011) (Jank, Hoff, da Costa, & Pizzolato, 2014). En el caso de la tetraciclina, es importante mencionar que, si bien su uso en medicina humana ha sido cada vez más reducido, sigue siendo un componente de formulaciones utilizadas en medicina

veterinaria. Considerando que en el país no se cuentan con mayores datos publicados respecto a la cantidad estimada de este antibiótico en efluentes, se lo incluyó dentro de este estudio. Por último, debido a los problemas de importación relacionados con la pandemia SARS-COV2, el estándar de este analito era uno de los pocos disponibles para la realización de las curvas de calibración.

5.1 Punto de muestreo

Considerando la pandemia COVID-19, que impactó durante el desarrollo de los ensayos analíticos, se eligió trabajar con un solo punto de muestreo para reducir riesgos de contagio, pero trabajando con muestras extraídas a intervalos de tiempo de una hora, para evaluar si había alguna variación entre la concentración de analito en dichos intervalos.

El hospital seleccionado como fuente de las muestras a analizar se encuentra en la ciudad de San Lorenzo, con coordenadas -25.322518826935067, -57.5240965600947. El mismo es un hospital de referencia, dependiente administrativamente de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Asunción, e incluye Escuelas de enfermería, Instrumentación Quirúrgica, Kinesiología y Fisioterapia (Facultad de Ciencias Médicas UNA, 2019b).

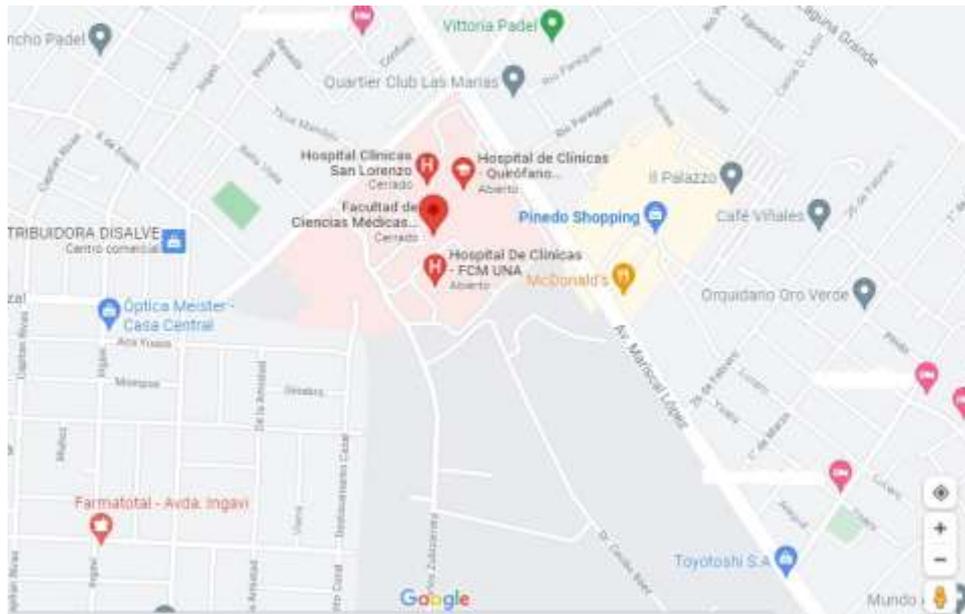


Figura 1: Referencia del punto de muestreo. Fuente: Google Maps.

La cantidad de pacientes que recibe dicho nosocomio aumenta anualmente, más aun considerando la pandemia del COVID-19. En el año 2019 los consultorios externos han atendido aproximadamente 500.000 pacientes y la mencionada pandemia ha colaborado a incrementar el número de camas disponibles en el área de terapia intensiva (Facultad de Ciencias Médicas UNA, 2019a).



Figura 2: Canal de desembocadura de efluentes del hospital.



Figura 3: Tubería presente en el sistema de transporte de efluentes del hospital, del cual fueron extraídas las muestras a analizar.

El punto de toma de muestra corresponde a una tubería que conduce los efluentes emitidos por el hospital a un canal abierto, el cual desemboca en el arroyo San Lorenzo.

5.2 Muestreo

Se decidió tomar muestras a intervalos de una hora, tomando en total cinco muestras en un día, en horario diurno, desde las ocho de la mañana hasta las doce del mediodía, coincidiendo con la mayor afluencia de pacientes al hospital y con la intención de evaluar si el contenido de analito podía variar en este intervalo de tiempo. Es importante mencionar que, debido a la cantidad limitada de cartuchos de extracción, y con el fin de que el trabajo tenga datos relevantes a nivel estadístico, se decidió extraer una cantidad máxima de veinticinco muestras.

En total se extrajeron cinco muestras en el mes de mayo con el fin de tener una idea de la cantidad de analito que podía estar presente en ellas y estimar los valores de concentración a utilizar para la curva de calibración. Durante el mes de julio, fue extraído el resto, eligiendo el primer día laboral disponible para sacar las cinco muestras correspondientes a cada semana del mes, completando de esta manera veinte muestras y por consiguiente, la cantidad de cartuchos disponibles.

Horario de toma de muestras	Fechas de muestreo				
	25 de mayo	8 de julio	14 de julio	22 de julio	29 de julio
	08:00	08:00	08:00	08:00	08:00
	09:00	09:00	09:00	09:00	09:00
	10:00	10:00	10:00	10:00	10:00
	11:00	11:00	11:00	11:00	11:00
	12:00	12:00	12:00	12:00	12:00

Tabla 2: Cronograma de toma de muestras

Se seleccionaron botellas color ámbar de capacidad de un litro, las cuales fueron previamente limpiadas con agua destilada y posteriormente enjuagadas con etanol, para eliminar restos de sustancias orgánicas que puedan interferir con los ensayos, de acuerdo con la Norma Mexicana 014-SSA1-1993 “Procedimientos básicos para el muestreo de agua para uso y consumo humano en sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados”. (Perez Duarte, 2002). Así también, las mismas recibieron 1 mL de formaldehído al 40% para inhibir el crecimiento de microorganismos que puedan facilitar la descomposición de la muestra, así como 5 mL de solución al 5% p/v de EDTA disódico, el cual se utiliza para eliminar la posibilidad de que los analitos puedan formar complejos con los iones calcio y magnesio que puedan estar presentes en las fuentes de muestra.

Ambos tratamientos están mencionados en la metodología sugerida por Tong y colaboradores. (Tong, Li, Wang, & Zhu, 2009)

Se extrajo un litro de muestra en cada botella, las cuales fueron conservadas en frío hasta su remisión al laboratorio para tratamiento. Al ser muestras extraídas de efluentes hospitalarios, se realizó la desinfección de la superficie externa de las botellas con alcohol 70° previo a su almacenamiento y conservación de las mismas en el laboratorio, el cual se realizó a una temperatura de 4°C y su tratamiento se realizó antes de que la muestra cumpla 24 horas de recolección.

5.3 Pretratamiento de la muestra

Considerando que la muestra corresponde a efluentes hospitalarios, se realizó la filtración de estas usando una membrana de Nylon de 0,45 μ de diámetro de poro, para eliminar partículas de tamaño considerable como ramas u hojas, así como flóculos que pudieron caer accidentalmente durante el muestreo. Fue realizado un segundo proceso de filtración con membranas de 0,22 μ para reducir el riesgo referente a microorganismos que pudiesen estar presentes en las muestras, así como para evitar que partículas extrañas puedan ingresar en el sistema analítico a utilizar posteriormente.

5.4 Tratamiento de la muestra y Extracción en Fase Sólida

Se realizó la medición inicial del pH de la muestra y posteriormente el ajuste hasta llegar a pH 4, utilizando ácido clorhídrico 0,1 M. (Tong et al., 2009)

La extracción de los analitos para su detección y cuantificación se realizó por el método de extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés), con cartuchos de extracción Phenomenex Strata C18-E (55um, 70A) 500mg/6mL, Teflon® (Torrance, CA, EEUU).

Nuevamente se mencionan las limitaciones referentes a la disponibilidad de insumos importados durante el desarrollo de los ensayos, lo que impidió la posibilidad de repetir los mismos.

Para el procedimiento de extracción en fase sólida, se realizó el acondicionamiento de los cartuchos realizando lavados con 3 mL de metil ter-butil éter (MTBE por sus siglas en inglés), 3 mL de metanol (Merck, Alemania) y 3 mL de agua ultrapura (Merck, Alemania).

Posteriormente, se utilizó 250 ml de muestra en cada cartucho, y luego un lavado con 3 mL de solución al 5% de metanol. Posteriormente se procedió al reposo por 30 minutos

y por último su elución con solución 1:9 de metanol:MTBE. La solución extraída fue almacenada en frascos ámbar hasta su posterior tratamiento.

El extracto fue llevado a rotavapor y evaporado hasta casi sequedad. Posteriormente se añadió 2 mL de metanol y se llevó nuevamente a evaporación por aproximadamente 10 minutos o hasta casi sequedad. Luego fueron añadidos 500 μ L de solución 9:1 de metanol – agua ultrapura (dicha mezcla también utilizada para la preparación de las soluciones referentes a la curva de calibración) y por último el extracto fue filtrado y llevado a viales ámbar para su lectura en el cromatógrafo.

5.5 Curvas de calibración

Para realizar la curva de calibración se trabajaron con soluciones de concentración de 10, 30, 60, 80 y 100 μ g L⁻¹ de tetraciclina y ciprofloxacina realizadas con patrones secundarios. La selección de estas concentraciones es debido a que los ensayos preliminares realizados durante el mes de mayo no arrojaron valor alguno de analitos, por lo que en ese momento no podía estimarse que cantidad podía estar presente en muestras analizadas con posterioridad. Además, no había estudios previos al respecto hechos en Paraguay.

Como diluyente se utilizó una mezcla 9:1 de metanol – agua ultrapura, debido a la dificultad de dilución de la tetraciclina en metanol, a pesar de que la metodología sugerida por Tong y colaboradores menciona únicamente metanol como diluyente (Tong et al., 2009). Las mediciones fueron realizadas por triplicado, siendo tres preparaciones independientes unas de otras.

5.6 Método Cromatográfico

Los análisis se llevaron a cabo en un cromatógrafo Waters (Milford, MA, EE.UU.) Acquity UPLC acoplado con un espectrómetro de masas Xevo TQD QqQ-MS (Milford, MA, EE.UU.) como detector y además un detector de arreglo de diodos Acquity PDA (Milford, MA, EE.UU.) conectados en tándem. Para la separación de los compuestos, se utilizó una columna Phenomenex KINETEX Core-Shell EVO-C18 (Torrance, CA, EEUU) (2,1 mm x 100 mm, 1,7 μ m). La temperatura de la columna fue de 40 grados Celsius. El volumen de inyección fue de 10 μ L. La fase móvil fue una mezcla de agua con 0,1% de ácido fórmico (Merck, Alemania) como aditivo (A) y acetonitrilo (B) (Merck, Alemania). Se realizó elución en gradiente a un flujo de 0,2 mL/minuto con el siguiente programa: Inicial 95% A, manteniendo esas condiciones durante 5 minutos,

luego se aumentó A para llegar al 50% a los 20 minutos, pasando luego a 95% de A a los 20,1 minutos, manteniendo esa concentración hasta el final de la corrida (26 minutos).

El detector de arreglo de diodos se programó para barrer el espectro UV/Vis de 200 a 500 nm, monitoreando el efluente de la columna a 254 nm.

Se utilizó el modo MRM usando ionización por electrospray (ESI) en modo positivo para la detección de los antibióticos ciprofloxacina y tetraciclina de acuerdo con la siguiente tabla:

Antibiótico	Precursor (m/z)	Hijos (m/z)	Tiempo de residencia (s)	Voltaje del Cono (V)	Energía de Colisión (V)
Ciprofloxacina HCl	332.2042	231.2068 (cuantificador)	0.025	88	38
Ciprofloxacina HCl	332.2042	245.2680	0.025	88	24
Ciprofloxacina HCl	332.2042	288.3601	0.025	88	18
Tetraciclina HCl	445.2404	410.4029 (cuantificador)	0.025	4	18
Tetraciclina HCl	445.2404	154.2331	0.025	4	28
Tetraciclina HCl	445.2404	427.5159	0.025	4	14

Tabla 3: Condiciones de ionización para la realización de las curvas de calibración de ciprofloxacina y tetraciclina.

Se seleccionaron 3 iones hijos característicos de cada uno de los antibióticos, actuando el más intenso como cuantificador y los demás como confirmatorios. Para considerar la detección de los compuestos en estudio los picos debían presentar los 3 iones.

6. RESULTADOS

6.1 Cuantificación y validación del método

Al ser un método previamente validado, se ha realizado la verificación del método.

Si bien, existen metodologías validadas que requieren el uso de estándares marcados isotópicamente (USEPA, 2007), al momento de la realización de los ensayos no era posible adquirir los mismos para los ensayos, por las limitaciones logísticas relacionadas con la pandemia SARS-COV2, por lo que los límites de detección (LOD) y de cuantificación del instrumento (LOQ) para ambos analitos fueron determinados usando estándares secundarios. Tanto el límite de detección como el de cuantificación se determinaron con la concentración más baja utilizada para la curva de calibración de cada analito, la cual fue de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Dicha concentración fue medida por triplicado. El límite de detección fue calculado usando una relación de señal/ruido de 3, de acuerdo a lo mencionado por Tong y colaboradores (Tong et al., 2009). Obteniéndose un valor de $7,2 \cdot 10^{-5} \mu\text{g L}^{-1}$ para la ciprofloxacina y $3,2 \cdot 10^{-4} \mu\text{g L}^{-1}$ para tetraciclina.

El límite de cuantificación para el equipo fue utilizado usando una relación de señal/ruido de 10. Para tetraciclina se obtuvo como valor de $1,1 \cdot 10^{-3} \mu\text{g L}^{-1}$, y para ciprofloxacina $2,0 \cdot 10^{-4} \mu\text{g L}^{-1}$.

Es importante mencionar que los valores referentes a los límites de detección y cuantificación fueron ajustados, debido a la cantidad de volumen utilizado para reconstituir el extracto obtenido (500 μ L), así como del volumen de muestra utilizada para la extracción (250 mL).

Para evaluar la linealidad se realizó un análisis de regresión lineal. El valor de r^2 para la curva correspondiente a tetraciclina es de 0,9966 y para la curva de ciprofloxacina es de 0,9987. La comparación de estos datos con los valores obtenidos con la metodología de referencia será mencionada en el apartado “Discusión de resultados”.

Para evaluar el ajuste del modelo analítico seleccionado, aparte del valor de r^2 , se utiliza el estadístico F, el cual arrojó valores de 889,7 para tetraciclina y 2335 para ciprofloxacina. Considerando un valor de $p < 0,0001$, el ajuste del modelo se considera adecuado.

El coeficiente de variación (CV) está relacionado con la repetibilidad del método, por lo que fue calculado, obteniéndose como resultados 0,71% para ciprofloxacina, y 2,84% para tetraciclina. La comparación de estos datos con los otros estudios será mencionada en el apartado “Discusión de resultados”.

6. 2 Curvas de calibración por el método de mínimos cuadrados

Los siguientes gráficos fueron obtenidos a partir de la lectura de los estándares.

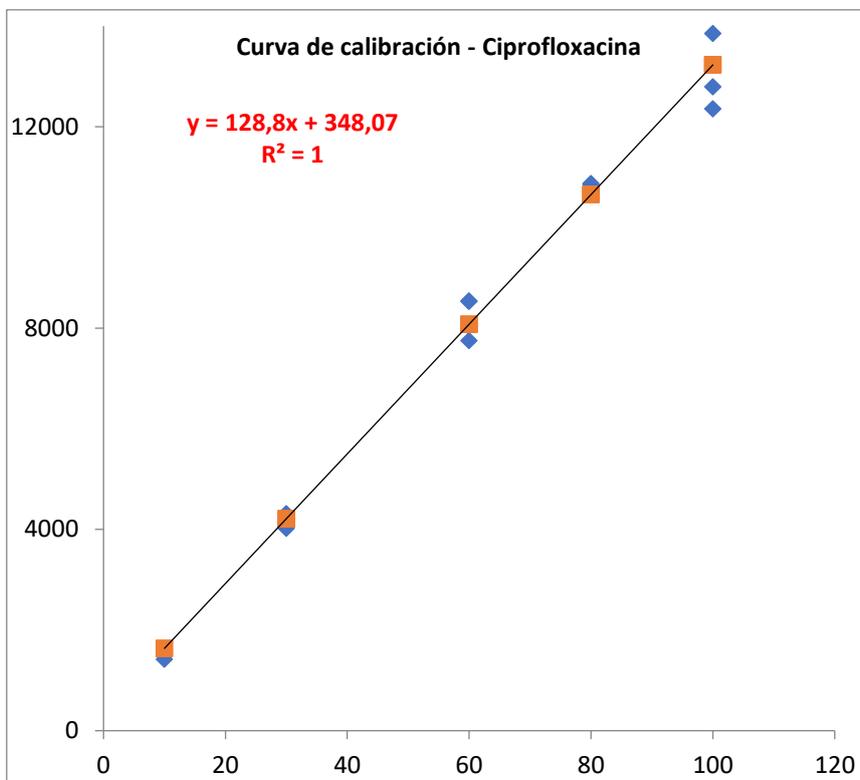


Gráfico 1: Curva de calibración para ciprofloxacina. Las barras indican la desviación estándar.

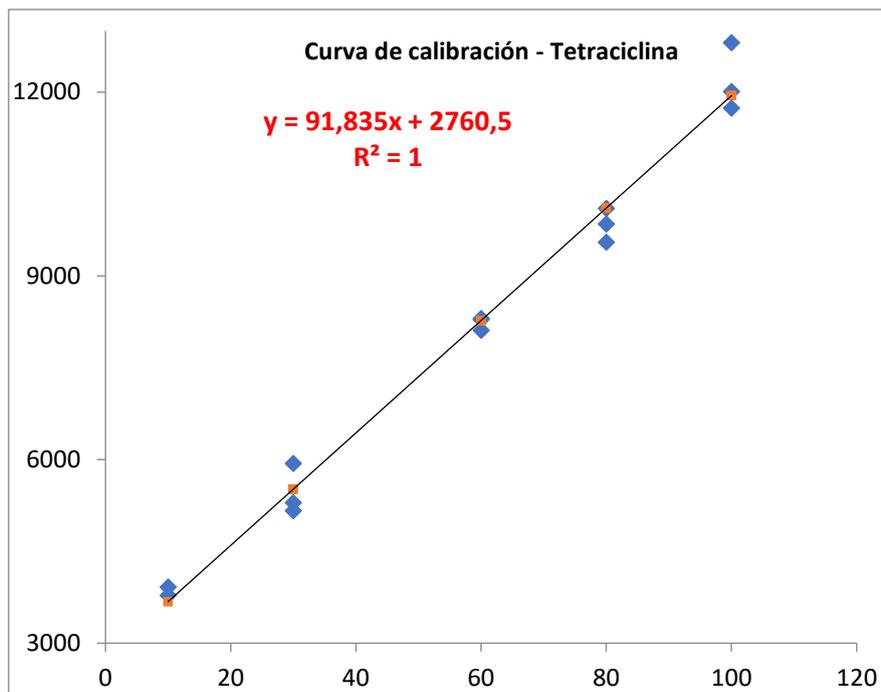


Gráfico 2: Curva de calibración para tetraciclina. Las barras indican la desviación estándar.

Analizando los residuos de ambos gráficos, se observa un comportamiento heterocedástico para la ciprofloxacina a partir de concentraciones mayores a $50 \mu\text{gL}^{-1}$, como se observa abajo, por lo que el modelo matemático de mínimos cuadrados aparenta no ser el más correcto para el tratamiento de datos.

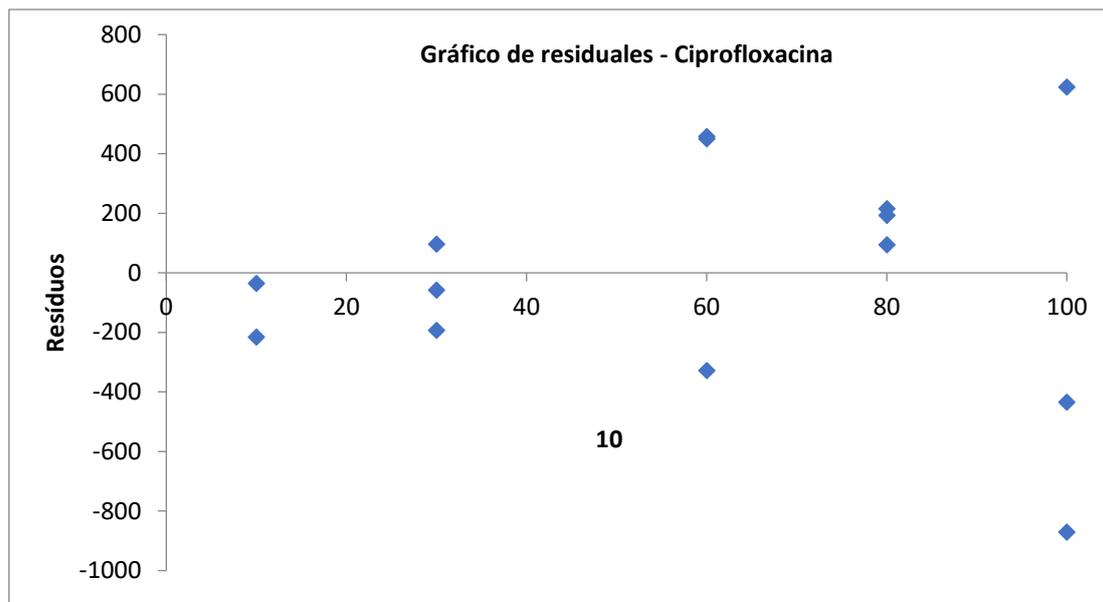


Gráfico 3: Gráfico de residuales para la curva de calibración de Ciprofloxacina.

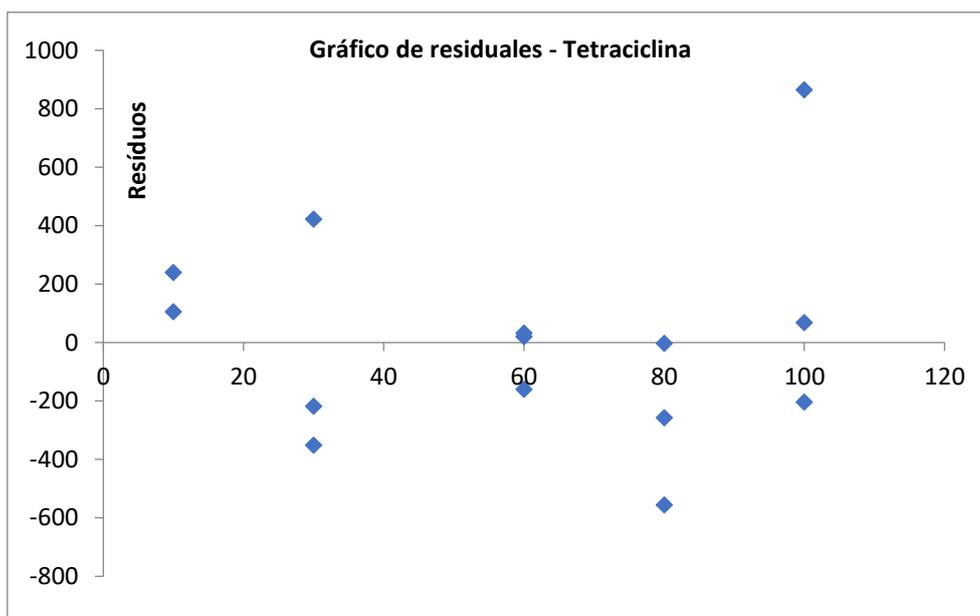


Gráfico 4: Gráfico de residuales para la curva de calibración de Tetraciclina

6.3 Curvas de calibración según el modelo de regresión ponderada.

Aplicándose el modelo de regresión ponderada, y comparando con las curvas obtenidas

mediante el método de mínimos cuadrados, se observa la siguiente tendencia:

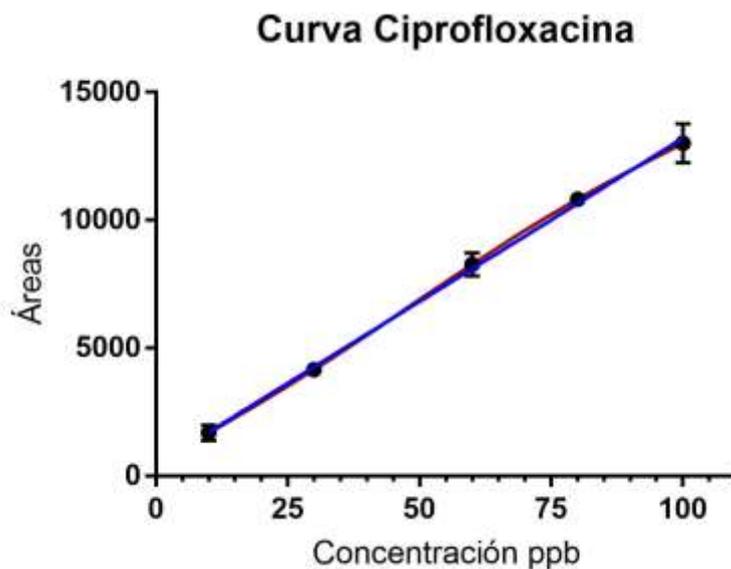


Gráfico 5: Comparación entre la Curva de calibración para Ciprofloxacina, según el modelo matemático de regresión ponderada (en rojo) y la curva obtenida con el modelo de mínimos cuadrados (en azul).

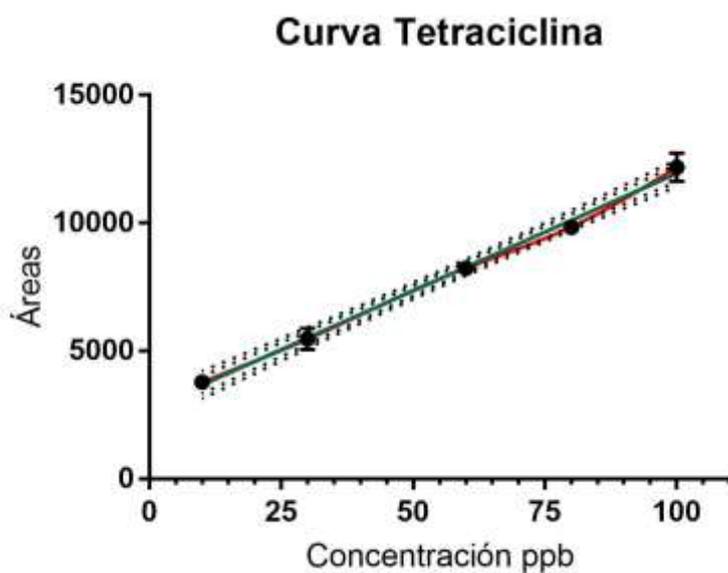


Gráfico 6: Comparación entre la curva de calibración para Tetraciclina, según el modelo matemático de regresión ponderada (en rojo) y la obtenida con el método de mínimos cuadrados (verde)..

De acuerdo con lo observado en estas curvas, la linealidad de los datos es buena hasta la concentración correspondiente a $60 \mu\text{gL}^{-1}$. Posterior a esta concentración existen desviaciones en la tendencia, a pesar de que en el caso de ciprofloxacina esas desviaciones

son mínimas, como se observa por la superposición de la línea de color rojo sobre la recta ideal en azul.

Considerando que se prepararon muestras individuales para las repeticiones de cada una de las concentraciones de la curva, lo más probable que dichas variaciones puedan deberse a errores durante la preparación de las mismas.

Es importante mencionar también la sensibilidad de los estándares utilizados a la luz. La acción de esta fuente de error fue reducida por medio de la utilización de vidriería color ámbar durante la preparación de los estándares, pero no se puede descartar totalmente su contribución.

6.4 Detección de analitos en las muestras analizadas

En los cromatogramas obtenidos del sucesivo análisis a intervalos regulares no se detectó la presencia de tetraciclina en las muestras extraídas.

Sin embargo, de todas las muestras tomadas en el mes de julio, fue posible detectar cantidades de ciprofloxacina por encima del límite de cuantificación en dos fechas, de acuerdo con lo detallado en la siguiente tabla:

Hora de muestreo	Fechas de muestreo				
	25 de mayo	8 de julio	14 de julio	22 de julio	29 de julio
08:00	<LOD	<LOD	2,2.10⁻³	<LOD	<LOD
09:00	<LOD	<LOD	<LOD	5,3.10⁻³	<LOD
10:00	<LOD	<LOD	<LOD	2,8. 10⁻³	<LOD
11:00	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
12:00	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Tabla 4: Valores de ciprofloxacina obtenidos expresados en $\mu\text{g L}^{-1}$, presentes en el volumen de extracción de 250 mL. Considerar el límite de detección en la muestra como: $7,2.10^{-5} \mu\text{g L}^{-1}$ en la muestra. Fuente: Elaboración propia.

El primer pico corresponde a la primera muestra tomada durante el día 14 de julio y no se detectaron picos en los siguientes cromatogramas correspondientes a ese día de trabajo.

Se obtuvo una concentración de $2,18.10^{-3} \mu\text{g L}^{-1}$.

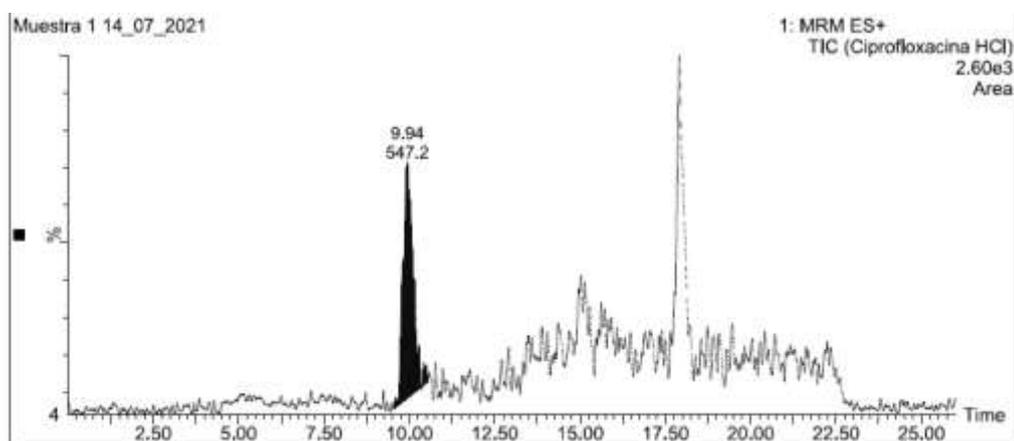


Figura 4: Cromatograma correspondiente a ciprofloxacina en la muestra 1 del 14 de julio.

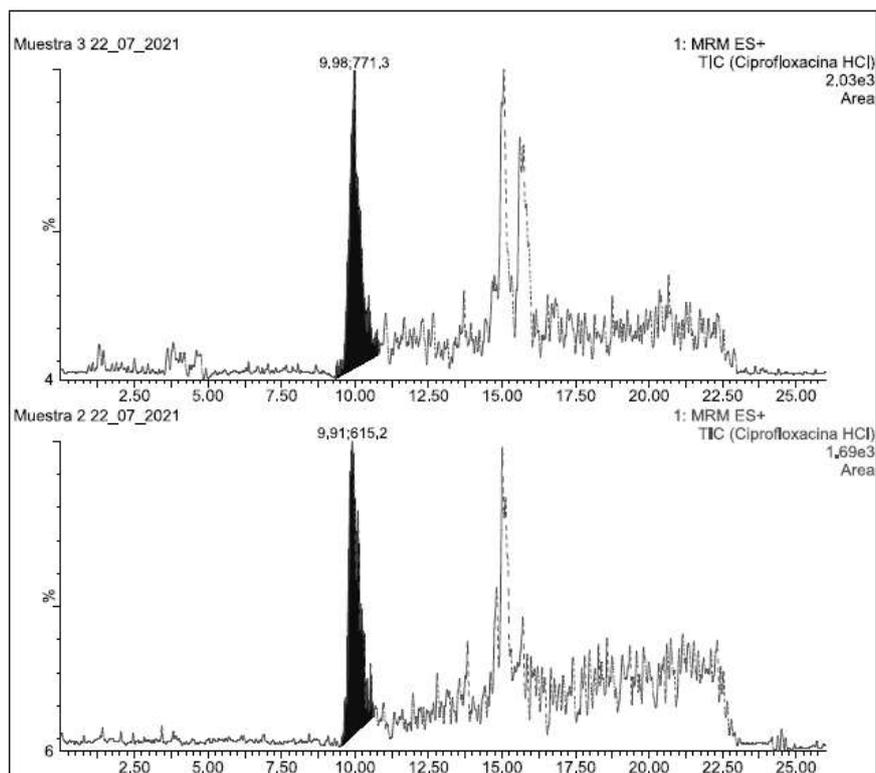


Figura 5: Cromatogramas correspondientes a picos de ciprofloxacina cuyo muestreo fue realizado el 22 de julio, a intervalos diferentes de tiempo.

Así también, dos cromatogramas, correspondientes a las muestras 2 y 3 del día 22 de julio presentaron ciprofloxacina, y su concentración corresponde a $5,28 \cdot 10^{-3}$ y $2,82 \cdot 10^{-3} \mu\text{gL}^{-1}$ respectivamente.

7. DISCUSION DE RESULTADOS

Con respecto a los valores de r^2 obtenidos de las curvas de calibración, y comparando dichos valores con los presentes en el trabajo de Tong y colaboradores, donde 0,9932 fue el valor para ciprofloxacina y 0,9972 para tetraciclina, es posible afirmar que los datos de dichas curvas presentan una mejor correlación que en el trabajo original.

Para la evaluación de los coeficientes de variación (CV) obtenido a través de los cálculos, se han comparado estos valores con el trabajo de Horwitz y colaboradores, el mismo establece los coeficientes de variación en porcentaje para métodos analíticos aplicados en la detección de trazas de contaminantes, arrojando un límite de 32% para niveles de $\mu\text{g L}^{-1}$ por lo que los resultados obtenidos son satisfactorios (Horwitz, Kamps, & Boyer, 1980).

En el caso de la falta de señal de tetraciclina en los cromatogramas es posible que pueda deberse a ser la poca prescripción del antibiótico en el hospital estudiado. Otro motivo puede deberse a la poca estabilidad de la sustancia tanto en solución como cuando es expuesta a la luz.

Debido a la falta de una normativa oficial, tanto nacional como internacional relacionada con los rangos o límites permitidos de los antibióticos analizados en este estudio (Correia

& Marcano, 2015), se han realizado comparaciones con datos obtenidos en la recopilación realizada por Ferrando y colaboradores (Ferrando-climent & Rodri, n.d.), en donde mencionan rangos de concentración de diversos contaminantes a nivel mundial, de acuerdo a la siguiente tabla:

Antibiótico	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ubicación	Referencia
Ciprofloxacina	2,18.10 ⁻³ 5,28.10 ⁻³ 2,82.10 ⁻³	Paraguay	Este estudio
	46,2 – 30,6	Francia	(Chonova, Keck, Labanowski, & Montuelle, 2016)
	0,6 – 40,2	Vietnam	(Lien et al., 2016)
	8,30–13,78	España	(Gros et al., 2013)
	0,26–1,53	India	(Tamhankar, Diwan, & Sta, 2013)
	1,40–2,60	Italia	(Verlicchi, Aukidy, Galletti, Petrovic, & Barceló, 2012)

Tabla 5: Comparacion de concentraciones de ciprofloxacina medidos en diferentes estudios a nivel mundial.

Es importante destacar que las cantidades detectadas en las diferentes muestras de ciprofloxacina son menores al rango mencionado por el trabajo de Ferrando. Son varios factores que pueden influir en esto, como el porcentaje de recuperación durante el procedimiento de extracción, así como la degradación del mismo analito durante los

sucesivos procesos de filtración. También es posible que, durante el momento del estudio, la ciprofloxacina no haya sido tan utilizada como otros antibióticos.

Esto evidencia la dificultad que tienen los sistemas comunes de tratamiento de efluentes para eliminar totalmente estos contaminantes. Sin embargo, al no detectarse en todas las muestras indica que puede suceder que el sistema de tratamiento se sature y pequeñas cantidades se viertan en los cursos de agua cuando la cantidad a procesar es elevada. Sin embargo, esto requiere estudios posteriores que escapen al alcance del presente trabajo.

. Las muestras de ciprofloxacina se detectaron a las 8 de la mañana del 14 de julio, a las 9 de la mañana del 22 de julio y a las 10 de la mañana del 22 de julio, observándose una ligera disminución en la concentración de analito en las muestras del día 22 lo que podría deberse a la degradación del analito en los efluentes hospitalarios con el paso del tiempo o a la disminución de la descarga de desechos en el sistema de pretratamiento. Sin embargo, al tener solo tres valores positivos con relación a la cantidad de muestras tomadas, es difícil aplicar herramientas estadísticas para arrojar hipótesis referentes a la relación entre el horario de la toma de muestra y los resultados obtenidos. Además de ello, el número limitado de cartuchos de extracción (25) y los inconvenientes debidos a la pandemia por el SARS CoV-2 influyeron en la cantidad de muestras analizadas.

Aparentemente, en horas de la mañana se producen ocasionalmente descargas grandes de desechos, que el sistema de pretratamiento no puede eliminar en su totalidad. Sin embargo, se deberían realizar muestreos en horas de la tarde, para confirmar este hecho.

8. CONCLUSIONES

La metodología seleccionada permitió tanto la identificación como la cuantificación de ciprofloxacina, obteniéndose tres mediciones de $2,18 \cdot 10^{-3}$, $5,28 \cdot 10^{-3}$ y $2,82 \cdot 10^{-3} \mu\text{g L}^{-1}$ en muestras tomadas en diferentes días e incluso en horarios diferentes. Dichos valores se encuentran debajo de los rangos mencionados en diferentes fuentes bibliográficas. Cabe destacar que tanto a nivel nacional como internacional no existen referencias de límites permitidos de estos fármacos en efluentes, tanto hospitalarios como urbanos.

No fue posible la detección de tetraciclina. Sin embargo, el uso de este antibiótico ha disminuido bastante, y además se debe considerar su fácil degradación en solución. De acuerdo con los resultados, la mayor cantidad de residuos que el sistema de pretratamiento no puede procesar aparecen en horas de la mañana. Se deben hacer muestreos en horas de la tarde, para confirmar este supuesto.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado, I. F. C. (2015). Determinación de Antibióticos en fuentes de abastecimiento de agua superficial del área metropolitana, por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección UV-F. *CNR-ISTI Technical Report*, 3(2), 356–369. Retrieved from https://www.metis2020.com/wp-content/uploads/METIS_D1.4_v3.pdf<https://www.metis2020.com/documents/deliverables/index.html><https://www.metis2020.com/metis-deliverables-d1-4-d2-4-d3-3-d4-3-d6-5-and-d7-3-were-completed-in-february-2015/index.html>
- Bertomeu Bartual, A. (2017). Detección de resistencias a antibióticos en efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales de la provincia de Valencia. *Proyecto Final de Grado - UPV, 1*, 40. Retrieved from <https://riunet.upv.es/handle/10251/86689>
- Chonova, T., Keck, F., Labanowski, J., & Montuelle, B. (2016). Science of the Total Environment Separate treatment of hospital and urban wastewaters : A real scale comparison of effluents and their effect on microbial communities. *Science of the Total Environment*, 542, 965–975. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.161>
- Commission, T. E. (2010). *Commission Regulation (EU) N° 37/2010 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin.* (2377).
- Comité Técnico Nacional para la Elaboración de la Lista de Medicamentos Esenciales. (2011). *Lista de medicamentos esenciales.*
- Correia, A., & Marcano, L. (2015). *Presencia y eliminación de compuestos farmacéuticos en plantas de tratamientos de aguas residuales. Revisión a nivel mundial y perspectiva nacional.* *LV(1)*, 1–18.
- Cué, M. B. ; M. M. G. (1985). Antibacterianos de acción sistémica. Parte I . Antibióticos betalactámicos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 14(4), 347–361.
- Damiá Barceló, L. M. J. L. de A. (2007). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. *Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales - CSIC (Barcelona)*, 26. <https://doi.org/10.1109/TGRS.2011.2120615>
- Facultad de Ciencias Médicas UNA. (2019a). Hospital de Clínicas amplía la Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos en ocho camas más. Retrieved November 29, 2021, from <https://www.med.una.py/index.php/hospital-hc/noticias-del-hospital/2416-hospital-de-clínicas-amplia-la-unidad-de-cuidados-intensivos-de-adultos-en-ocho-camas-más>
- Facultad de Ciencias Médicas UNA. (2019b). Reseña histórica. Retrieved November 29, 2021, from <https://www.med.una.py/index.php/facultad/resena-historica>
- Feican Guerrero, M. S. (2018). *Efecto Fitotóxico De Soluciones Con Diferentes Concentraciones De Antibióticos (Amoxicilina, Ciprofloxacina Y Sulfametoxazol) Sobre El Desarrollo De Semillas De Especies Nativas De Amaranto, Ataco Y Quinoa Trabajo De Titul.*

- Ferrando-climent, L., & Rodri, S. (n.d.). *Occurrence and Risks of Contrast Agents , Cytostatics , and Antibiotics in Hospital Effluents*. <https://doi.org/10.1007/698>
- Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., & Barceló, D. (2013). Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1292, 173–188. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.072>
- Hirsch, R., Ternes, T. A., Haberer, K., Mehlich, A., Ballwanz, F., & Kratz, K. L. (1998). Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 815(2), 213–223. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00335-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00335-5)
- Horwitz, W., Kamps, L. A. V. R., & Boyer, K. W. (1980). *Quality Assurance in the Analysis of Foods for Trace Constituents*. 63(6), 1344–1354.
- Janet, M., Adriana, G., Soto, M., Iván, J., Omar, U., & Gutiérrez, D. (2012). *Contaminantes emergentes en aguas , efectos y posibles tratamientos*. 7(2), 52–74.
- Jank, L., Hoff, R. B., da Costa, F. J., & Pizzolato, T. M. (2014). Simultaneous determination of eight antibiotics from distinct classes in surface and wastewater samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 94(10), 1013–1037. <https://doi.org/10.1080/03067319.2014.914184>
- Jiménez, C. (2011). Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: Productos farmacéuticos. *Revista Lasallista de Investigacion*, 8(2), 143–153.
- Lara, M., Torres, M., Baez, M., & Albertini, S. (2019). General Aspects of Antimicrobials Use and Their Interaction With the Environment: an Emerging Problem. *Compendio de Ciencias Veterinarias*, 9(2), 24–37. <https://doi.org/10.18004/compend.cienc.vet.2019.09.02.24-37>
- Lázaro-Bengoá, E., De Abajo Iglesias, F. J., López-Navas, A., & Fernández-Cortizo, M. J. (2010). Uso de antibióticos en España y marco regulador para su desarrollo clínico en la Unión Europea. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(SUPPL. 4), 10–16. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70036-7](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70036-7)
- Lien, L. T. Q., Hoa, N. Q., Chuc, N. T. K., Thoa, N. T. M., Phuc, H. D., Diwan, V., ... Lundborg, C. S. (2016). Antibiotics in wastewater of a rural and an urban hospital before and after wastewater treatment, and the relationship with antibiotic use—a one year study from Vietnam. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(6), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijerph13060588>
- Locatelli, M. A. F., Sodr , F. F., & Jardim, W. F. (2011). Determination of antibiotics in brazilian surface waters using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(3), 385–393. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9550-1>
- Lorenzo, P., A Moreno, I Lizasoain, J.C. Leza, M.A Moro, y A. P. V. (2008). *Farmacología B sica y Clínica*. Buenos Aires: Medical Panamericana S.A.

- Melendez-Marmolejo, J., Garcia-Saavedra, Y., Galvan-Romero, V., de Leon-Martinez, L., Vargas-Berrones, K., Mejia-Saavedra, J., & Flores Ramirez, R. (2020). 14 Emerging contaminants. Environmental problems associated with antibiotic use. New detection and remediation techniques and legislative perspectives in Latin America. *Revista De Salud Ambiental*, 20(1), 53–61. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7535526>
- Mendoza, L., Gonzales, L., Idoyaga, H., Echeverría, P., Giménez, E., Nidia, M., ... Pizarro, F. (2020). Detección de residuos de antibióticos y micotoxinas en leche vacuna fluida pasteurizada comercializada en Paraguay. *Instituto de Nutrición y Tecnología de Los Alimentos (INTA), Santiago, Chile*, 10(2)(2), 1–7. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.18004/rspp.2020.diciembre.23>
- Núñez, L., Tornello, C., Puentes, N., Espigares, E., Moreno, E., Espigares, M., & Moretton, J. (2016). Hospital effluent constitutes a source of vancomycin-resistant enterococci. *Ars Pharmaceutica*, 57(3), 121–126. <https://doi.org/10.4321/S2340-98942016000300003>
- Peña-Álvarez, A., & Castillo-Alanís, A. (2015). Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM). *Tip*, 18(1), 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.05.003>
- Perez Duarte, F. (2002). *Normas Oficiales Mexicanas SSA1*. 1–5.
- Qualls, T., Agouridis, C., & Kulshrestha, M. (2017). Development of a Methodology to Determine Antibiotic Concentrations in Water Samples Using High-Pressure Liquid Chromatography. *Journal of Young Investigators*, 33(1), 19. <https://doi.org/10.22186/jyi.33.1.19-27>
- SEAM. (2002). *Resolución por la cual se establece el padrón de calidad de las aguas en el territorio Nacional* (p. 6). p. 6.
- Tamhankar, A. J., Diwan, V., & Sta, C. (2013). *Seasonal and Temporal Variation in Release of Antibiotics in Hospital Wastewater : Estimation Using Continuous and Grab Sampling*. 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068715>
- Tong, L., Li, P., Wang, Y., & Zhu, K. (2009). Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere*, 74(8), 1090–1097. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.051>
- USEPA. (2007). Method 1694 : Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water , Soil , Sediment , and Biosolids by HPLC / MS / MS. *EPA Method*, (December), 77.
- Verlicchi, P., Aukidy, M. Al, Galletti, A., Petrovic, M., & Barceló, D. (2012). Science of the Total Environment Hospital effluent : Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, The, 430, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.055>
- Watkinson, A. J., Murby, E. J., Kolpin, D. W., & Costanzo, S. D. (2009). The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of The Total Environment*, 407(8), 2711–2723.

<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2008.11.059>