

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

**VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN
SIMULTÁNEA DE TETRACICLINAS Y BETALACTÁMICOS DE ESPECTRO
EXTENDIDO EN LAS AGUAS SUPERFICIALES DE LA MICROCUENCA
DEL RÍO DURAZNO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA
ALTA RESOLUCIÓN CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM
(UHPLC-MS/MS)**

Trabajo final de graduación presentado como requisito parcial para
optar al grado de Licenciatura en Química

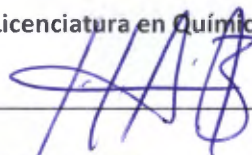
DOUGLAS ALBERTO VENEGAS GONZÁLEZ

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2022

Este Trabajo Final de Graduación fue aceptado en la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de:

Licenciatura en Química



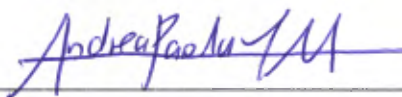
Juan José Araya Barrantes, Ph. D

Director de la Escuela de Química



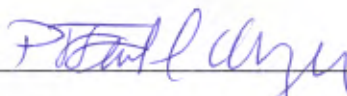
Rosaura Romero Chacón, Ph. D

Decana Facultad de Ciencias



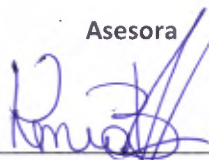
Andrea Paola Irías Mata, Ph. D

Directora



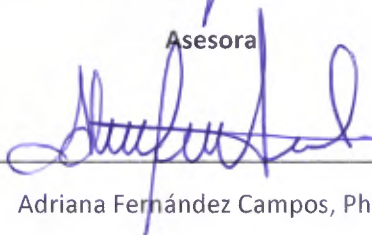
Paola Fuentes Sweicher, M.Sc.

Asesora



Kenia Barrantes Jiménez, M.Sc.

Asesora



Adriana Fernández Campos, Ph. D

Miembro del Tribunal



Douglas Alberto Venegas González

Postulante

Dedicatoria

A Egan y toda mi familia.

*Gracias por ser fuente de inspiración
y por enseñarme que no importa la situación,
con esfuerzo se puede salir adelante.*

Los amo.

Agradecimientos

A mi familia, por todo el inmenso sacrificio hecho para que yo pudiera concluir mis estudios, por ser mi soporte durante todos estos años y por creer siempre en mí.

A Andrea Irías, por todas las enseñanzas que fueron más allá de la química, por sus consejos en investigación, por su paciencia y dedicación. Gracias por abrirme las puertas del CIGRAS, por aceptar ser mi directora de TFG y por convertirse en una amiga. Además, a todo el personal del CIGRAS por la ayuda durante el desarrollo del proyecto.

A Paola Fuentes, por toda la confianza que ha tenido en mí, por todas las sugerencias a lo largo del trabajo y por ser una referencia para siempre intentar mejorar.

Kenia Barrantes, por el esfuerzo y la investigación en esta área de estudio y por darnos un espacio a los estudiantes para aportar en los mismos y por guiarme y aconsejarme en temas microbiológicos.

Además, a Eric Morales y Eddy Gómez, por todo el apoyo con los muestreos y la información generada en trabajos previos que fue de gran ayuda en este.

A LASA por ser una parte fundamental en mi desarrollo académico, en especial a Adrián González, a quién le debo gran parte de este. Gracias por desinteresadamente confiar en mí y ayudarme una y otra vez, por no cansarse de mis preguntas, por intentar sacar lo mejor de mí y por animarme a siempre a mejorar.

A los profesores de la sección de química analítica de la Escuela de Química porque de una u otra manera me han ayudado a lo largo de los años, principalmente a Adriana Fernández por sus valiosas enseñanzas y acompañamiento en los últimos años, por no dudar al dar un consejo, por ayudarme a mejorar y confiar en mí.

Finalmente, a mis amigos más cercanos que me han acompañado en el camino, a Fernanda Salas y su familia, por ser un segundo hogar.

Índice General

Dedicatoria	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice General.....	v
Índice de cuadros.....	viii
Resumen	xvi
Introducción	xviii
Capítulo I.....	17
Antibióticos.....	17
Historia y clasificación.	17
Propiedades fisicoquímicas y usos de los antibióticos en estudio.	18
Tetraciclinas.....	18
Betalactámicos	21
Resistencia antimicrobiana	22
Definición y mecanismos de acción.....	24
Causas de la resistencia antimicrobiana	25
Contaminación de los ecosistemas acuáticos.	29
Efecto Sobre la Biota Acuática.	32
Medidas de acción y recomendaciones	33
Situación en Costa Rica.....	35
Río Durazno	36
Calidad del agua	39
Capítulo II	45
Técnicas analíticas para la cuantificación de antibióticos en matrices ambientales.	45
Preparación de la muestra	45
Extracción en fase sólida (SPE)	46
Cuantificación de antibióticos.....	48
UHPLC- MS/MS	49
Efecto de Matriz	52
Estándar Interno.....	52
Comparación con otras técnicas	53
Degradación de los antibióticos	54
Validación	55
Objetivos.....	56

Objetivo general:	56
Objetivos secundarios:	56
Capítulo III	57
Metodología	57
Materiales y métodos	57
Instrumentos	57
Materiales, reactivos y disolventes	58
Preparación de disoluciones analíticas	59
Librería de iones	59
Optimización de las condiciones cromatográficas	59
Validación	61
Muestreo	63
Preparación de la muestra	64
Calidad del agua superficial de la microcuenca del Río Durazno	65
Parámetros fisicoquímicos	65
Nutrientes	66
Índice holandés	66
Parámetros microbiológicos	68
Condiciones climáticas	69
Capítulo IV	70
Resultados y discusión	70
Resultados experimentales	70
Librería de iones	70
Condiciones cromatográficas	71
Extracción fase sólida (SPE)	73
Validación	75
Aplicación a muestras de aguas superficiales	85
Condiciones climáticas	88
Calidad del agua de la microcuenca del río Durazno	88
Caracterización de la calidad del agua de la microcuenca del río Durazno	88
Nutrientes	90
Índice holandés	91
Análisis elemental	92
Análisis microbiológicos	93

Capítulo V	95
Conclusiones	95
Residuos generados	97
Referencias bibliográficas	98
Anexos	107

Índice de cuadros

Cuadro I. Valores de pKa y pesos moleculares de la tetraciclina, doxiciclina y oxitetraciclina.	20
Cuadro II. Usos de la oxitetraciclina, tetraciclina y doxiciclina.....	20
Cuadro III. Parámetros fisicoquímicos analizados para evaluar y clasificar las aguas superficiales	39
Cuadro IV. Parámetros microbiológicos analizados para evaluar la contaminación en las aguas superficiales y sus límites máximos aceptados.	42
Cuadro V. Nutrientes analizados para evaluar la eutrofización en las aguas superficiales y sus límites máximos aceptados	42
Cuadro VI. Metales analizados en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno y sus límites máximos aceptados.	43
Cuadro VII. Concentraciones de antibióticos determinadas a partir de HPLC-MS/MS y UHPLC-MS/MS alrededor del mundo	52
Cuadro VIII. Métodos alternativos a UHPLC-MS/MS para la determinación de antibióticos en matrices ambientales.....	54
Cuadro IX. Rangos de trabajo de las curvas de calibración de los antibióticos en estudio.	59
Cuadro X. Optimización del gradiente de la corrida cromatográfica para la cuantificación de antibióticos en aguas superficiales de río.	60
Cuadro XI. Parámetros de desempeño evaluados para la validación del método analítico para la determinación simultánea de tetraciclinas y betalactámicos de espectro extendido en aguas superficiales de río por UHPLC-MS/MS.	61
Cuadro XII. Metodologías utilizadas para el análisis de parámetros fisicoquímicos de las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno.	65
Cuadro XIII. Puntajes según sistema holandés de valoración de la calidad fisicoquímica del agua para cuerpos receptores.	66
Cuadro XIV. Clases de calidad del agua según sistema holandés, basado en valores de PSO, DBO y nitrógeno amoniacal	67
Cuadro XV. Determinación de la concentración de metales en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno.	68
Cuadro XVI. Resumen de las condiciones óptimas de trabajo del detector MS/MS para la fragmentación de los antibióticos de interés.	70
Cuadro XVII. Caracterización estructural de las fragmentaciones más importantes obtenidas en el análisis de los antibióticos de interés.....	71
Cuadro XVIII. Condiciones cromatográficas y de cuantificación óptimas para la cuantificación de los antibióticos en estudio.....	72
Cuadro XIX. Parámetros evaluados de la curva de calibración para la cuantificación de los antibióticos en estudio.	76
Cuadro XX. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) del método analítico para los antibióticos en estudio.	77
Cuadro XXI. Resumen de resultados de los parámetros de desempeño evaluados en la validación del método.	84
Cuadro XXII. Concentraciones de nutrientes en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno.....	91
Cuadro XXIII. Resultados del índice holandés en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno.....	91

Cuadro XXIV. Curvas de calibración de cada antibiótico en estudio para determinar la linealidad correspondiente.....	107
Cuadro XXV. Áreas teóricas de cada antibiótico en estudio para determinar el error máximo correspondiente.....	107
Cuadro XXVI. Señales de blancos obtenidas en diferentes días para determinar los LD y LC de cada curva de calibración de los antibióticos en estudio.....	107
Cuadro XXVII. Evaluación diaria de la curva de calibración para determinar la precisión y veracidad de los resultados de los antibióticos en estudio.	112
Cuadro XXVIII. Resultados de ensayos realizados para determinar el porcentaje de recuperación de los enriquecimientos.....	112
Cuadro XXIX. Resultados ensayos para determinar el efecto de matriz en el análisis de los antibióticos en estudio.	113
Cuadro XXX. Áreas promedio de los análisis de antibióticos en la microcuenca del río Durazno.	113
Cuadro XXXI. Resumen de datos de lluvia total y temperatura promedio para los días de muestreo para el análisis de antibióticos en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno.	115

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de la Tetraciclina, Doxiciclina y de la Oxitetraciclina.	19
Figura 2. Estructura química de la cefotaxima.	22
Figura 3. Representación del inicio de la resistencia a los antibióticos frente al tiempo para desarrollar la resistencia a los antibióticos. Traducido de una publicación previa	23
Figura 4. Consumo mundial de antibióticos entre el 2000-2015 por clasificación de ingresos de los países.	26
Figura 5. Consumo aproximado de antibióticos en el sector agrícola en los EEUU entre 1950 y 2017.	27
Figura 6. Cantidad de antibióticos desarrollados entre 1980-2014	29
Figura 8. Correlaciones entre las concentraciones de antibióticos y sus correspondientes genes de RAM.	32
Figura 9. Mapa de distribución de altitud de la microcuenca del río Durazno	37
Figura 10. Mapa de distribución del índice de vegetación de la microcuenca del río Durazno	38
Figura 11. Mapa de uso de suelo de la microcuenca del río Durazno	38
Figura 12. Estructura química de los cartuchos de SPE HLB (Hydrophilic-lipophilic-balance).	47
Figura 13. Etapas involucradas en la SPE con cartuchos de extracción.	47
Figura 14. Diagrama de equipo utilizado en la técnica de HPLC/UHPLC	50
Figura 15. Diagrama de un analizador de masa cuadrupolo.	51
Figura 16. Cromatograma de disoluciones patrón de tetraciclina, doxiciclina, cefotaxima y oxitetraciclina ($\approx 400 \mu\text{g L}^{-1}$) eluidas en un tiempo de análisis total de 10 minutos.	72
Figura 17. Método de SPE optimizado para la extracción de los analitos en estudio.	75
Figura 18. Curvas de calibración de los antibióticos en estudio.	76
Figura 19. Comparación de las áreas de las señales analíticas de un blanco, en color verde, (posterior a las corridas de la curva de calibración) y la disolución patrón a $0.78 \mu\text{g L}^{-1}$ de cefotaxima, en color azul.	78
Figura 20. Coeficientes de variación máximos de las señales analíticas de la curva de calibración para cada antibiótico de corridas independientes, en un mismo día y en diferentes días.	79
Figura 21. Curva de calibración de cefotaxima medidas en tres días diferentes.	80
Figura 22. Porcentajes de recuperación para tres niveles de concentración de cada antibiótico en estudio. DC: Doxiciclina, CT: Cefotaxima, OC: Oxitetraciclina y TC: Tetraciclina.	81
Figura 23. Supresión de la señal por efecto matriz, utilizando metaciclina como estándar interno.	82
Figura 24. Comparación en los tiempos de retención de la cefotaxima como patrón individual a $50 \mu\text{g L}^{-1}$, presente como un patrón de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de la curva de calibración (en conjunto con los otros antibióticos) y en una muestra de agua superficial.	83
Figura 25. Efecto de la metaciclina como estándar interno (EI) en la linealidad de las curvas de calibración de cefotaxima y doxiciclina.	84
Figura 26. Concentraciones de los antibióticos encontrados en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno, por punto y fecha de muestreo. Las barras representan el error estándar de la media (n=3).	85
Figura 27. Señal de cefotaxima de muestra M1P2R1.C3 sobrepuesta sobre la señal de un blanco.	86
Figura 28. Prueba Kruskal-Wallis para el análisis de varianza de los antibióticos analizados en las muestras del agua superficial de la microcuenca del río Durazno.	87
Figura 29. Lluvia total (A) y temperatura (B) en las semanas de muestreo en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno en las dos fechas de muestreo (18.03 y 04.06.21, respectivamente) .	88

Figura 30. Parámetros fisicoquímicos evaluados en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno.....	90
Figura 31. Concentraciones de elementos presentes en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno.	92
Figura 32. Parámetros microbiológicos analizados en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno.....	93
Figura 33. Comparación de los cromatogramas de una muestra de agua superficial y el patrón más concentrado de la curva de calibración.....	113
Figura 34. Pruebas de Shapiro-Wilks y de Levene para probar normalidad de los resultados obtenidos en el análisis de antibióticos en el agua superficial de la microcuenca del río Durazno.	114
Figura 35. Análisis de varianza de los antibióticos analizados en las muestras del agua superficial de la microcuenca del río Durazno.	114

Lista de abreviaciones y siglas

ACN: Acetonitrilo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ASHP: La Sociedad Estadounidense de Farmacéuticos del Sistema de Salud (Por sus siglas en inglés American Society of Health System Pharmacist)

BL: Betalactámicos

CDC: Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (Por sus siglas en inglés, Center for Disease Control and Prevention)

CE: Electroforesis Capilar (Por sus siglas en inglés, Capillary Electrophoresis)

CELEQ: Centro de Investigación en Electroquímica y Energía Química

Chal α : Clorofila- α

CIA: Centro de Investigaciones Agronómicas

CICA: Centro de Investigación en Contaminación Ambiental

CIGRAS: Centro para Investigaciones en Granos y Semillas

CIMAR: Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología

CMC: Concentración Micelar Crítica

CL: Cromatografía Líquida

CT: Cefotaxima

CV: Coeficiente de variación

CVM: Centro de Medicina Veterinaria de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (Por sus siglas en inglés, U.S. Food and Drug Administration's Center for Veterinary Medicine)

DAD: Detector de Arreglo de Diodos

DC: Doxiciclina

DDD: Dosis Diarias Definidas

DLLME: Microextracción dispersiva líquido-líquido (Por sus siglas en inglés, Dispersive liquid-liquid microextraction)

EC: Electroforesis Capilar

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético (Por sus siglas en inglés, ethylenediaminetetraacetic acid)

EEUU: Estados Unidos de América

ELISA: Inmunoensayo Ligado a Enzimas (Por sus siglas, Enzyme-Linked Immunoassay)

EM: Efecto Matriz

EPA: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Por sus siglas en inglés, U.S. Environmental Protection Agency)

ESI: Ionización por Electrospray (Por sus siglas en inglés, Electrospray Ionization)

E. coli: *Escherichia coli*

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Por sus siglas en inglés, Food and Agriculture Organization)

FCR: Kilogramo total de alimento utilizado por engorde por kilogramo total de peso vivo por engorde

FDA: La Administración de Medicamentos y Alimentos (Por sus siglas en inglés, The Food and Drug Administration)

FL: Fluorescencia

GC: Cromatografía de Gases (Por sus siglas en inglés, Gas Chromatography)

GLASS: Sistema mundial de vigilancia del uso y la resistencia a los antimicrobianos (Por sus siglas en inglés, Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System)

HBL: Equilibrio hidrofílico-lipofílico (Por sus siglas en inglés, Hydrophilic-lipophilic-balanced)

HCl: Ácido clorhídrico

HCOOH: Ácido fórmico

HDPE: Polietileno de alta densidad (Por sus siglas en inglés, High Density Polyethylene)

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (Por sus siglas en inglés, High Performance Liquid Chromatography)

IMN: Instituto Meteorológico Nacional

INISA: Instituto de Investigaciones en Salud

IS: Estándar Interno (Por sus siglas en inglés, Internal Standard)

Kg: Kilogramo

LLE: Extracción líquido-líquido (Por sus siglas en inglés, Liquid-Liquid Extraction)

LC: Límite de cuantificación

LD: Límite de detección

LogK_{ow}: Coeficiente de partición n-Octanol/Agua

Min: Minutos

m²: Metros cuadrados

mg kg⁻¹: Miligramo por kilogramo

MS: Detector de Masas

MS1: Analizador de Masas 1

MS2: Analizador de Masas 2

m/z: Relación Masa-Carga

n: Número de réplicas

OC: Oxitetraciclina

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal, anteriormente Oficina Internacional de Epizootias (Por sus siglas en francés, Office International des Epizooties)

OMS: Organización Mundial de la Salud

pH: Potencial de Hidrógeno

pKa: Constante de disociación ácida

PTAR: Plantas de Tratamiento de Agua Residual

PTEF: Politetrafluoretileno

Q o q: Cuadrupolo (Por sus siglas en inglés, Quadrupole)

QqQ: Triple cuadrupolo

Q-TOF: Cuadrupolo-tiempo de vuelo (Por sus siglas en inglés, Quadrupole time of flight)

QuEChERS: Rápido, Fácil, Económico, Eficaz, Robusto y confiable (De su acrónimo en inglés, Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged & Safe)

RAM: Resistencia a los antimicrobianos

r²: Coeficiente de determinación

S/R: Relación Señal-Ruido

SBSE: Extracción Sortiva en Barra Magnética (Por sus siglas en inglés, Stir Bar Sortive Extraction)

SPE: Extracción en fase sólida (Por sus siglas en inglés, Solid-Phase Extraction)

SPME: Microextracción en Fase sólida (Por sus siglas en inglés, Solid Phase Microextraction)

SRM: Monitoreo de Reacción Seleccionada (Por sus siglas en inglés, Selected reaction monitoring)

TC: Tetraciclina

TCs: Tetraciclinas

TOF: Tiempo de vuelo (Por sus siglas en inglés, Time of Flight)

t_R : Tiempo de Retención

UE: Unión Europea

Uma: Unidad de Masa Atómica

UHPLC-MS/MS: Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución acoplado a espectrometría de masas en tándem (Por sus siglas en inglés, Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled to tandem mass spectrometry)

UV: Ultravioleta

V: Volts

XIC: Cromatograma de ion extraído (Por sus siglas en inglés, Extracted Ion Chromatogram)

$\mu\text{g L}^{-1}$: Microgramo por litro

Resumen

El aumento en el uso de los antibióticos conlleva a un incremento en la presencia de sus residuos en el ambiente, lo que genera una presión selectiva sobre las bacterias, favoreciendo el desarrollo de resistencia hacia los mismos. Esto es un problema para la salud humana y animal y para el medio ambiente, severo y costoso a nivel mundial, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Unión Europea (UE) y el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) establecen la necesidad de realizar una mayor vigilancia e investigación sobre este tema. El agua residual en Costa Rica proveniente de casas, hospitales, y de las actividades agrícolas y ganaderas suele ser descargada constantemente en ecosistemas acuáticos como los ríos, que se convierten en una fuente importante de contaminantes emergentes como los antibióticos, genes y bacterias resistentes a antibióticos. Entre los grupos de antibióticos, las tetraciclinas (TCs) y los betalactámicos (BL) de espectro extendido son muy utilizados a nivel clínico y agropecuario. Con el fin de monitorear estos contaminantes emergentes como herramienta para controlar la resistencia antimicrobiana (RAM) y generar información de importancia que evidencie el problema de la contaminación ambiental y la generación de la RAM en nuestro país, se adaptó y validó una metodología analítica que permite la determinación de estos antibióticos en aguas superficiales de río, mediante la técnica de cromatografía líquida de ultra alta resolución con detector de masas en tándem (UHPLC-MS/M). Para esto se realizó una extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) con cartuchos de extracción de estireno-divinilbenceno Oasis HLB 200 mg con capacidad para 6 cm³, acondicionados con metanol y una disolución de ácido fórmico a 1 mL L⁻¹ con EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético, por sus siglas en inglés) a 1 mL L⁻¹, se utilizaron como solventes para eluir acetonitrilo(ACN):metanol (1:1) y metanol:diclorometano (1: 1). Los resultados de recuperaciones a niveles de 10, 50 y 100 µg L⁻¹ estuvieron entre 89-216%, los límites de detección y cuantificación del método están entre 0.14-0.54 y 0.46-1.79 µg L⁻¹, respectivamente, y los coeficientes de determinación (r^2) son superiores a 0.99, además, el efecto de matriz fue de 21.1%. El método validado fue aplicado en 6 muestras de agua en diferentes épocas y puntos de la microcuenca del río Durazno en los que los resultados evidenciaron la presencia de doxiciclina (DC) y cefotaxima (CT) (entre 2.13-11.74 ng L⁻¹ y 0.68-1.20 ng L⁻¹, respectivamente). El método validado se considera adecuado para la cuantificación

de estos dos fármacos y puede ser utilizado en análisis de rutina debido a su eficacia, confiabilidad y simplicidad.

Finalmente, a partir de análisis fisicoquímicos, elementales y de nutrientes se establece que las aguas superficiales de esta microcuenca presentan una contaminación incipiente y no se evidencia eutrofización, sin embargo, los parámetros microbiológicos evaluados muestran una contaminación muy severa, esto refleja la necesidad de mejorar el sistema nacional utilizado para evaluar la calidad de los cuerpos de agua superficial integrando indicadores de calidad microbiológicos.

Introducción

La RAM se ha documentado desde los años 40, sin embargo, evidencia indica que el sobre uso de antibióticos, tanto a nivel clínico, veterinario, así como en el sector agropecuario, incrementa la probabilidad de un mal manejo de estos por parte de la población en general. Además, estudios muestran que la presencia de estos compuestos en el ambiente genera una presión selectiva sobre los microorganismos, facilitando la generación y diseminación de la resistencia a los antibióticos. Esto converge en una afectación negativa al ambiente y la salud humana y animal. Sumado a la poca disponibilidad de nuevos compuestos que puedan sustituir a los antibióticos de uso masivo, intensificando el problema y haciéndolo cada vez más complejo, lo que causa anualmente miles de muertes y un costo económico de millones de dólares alrededor del mundo.

Debido a esto, la OMS, la UE, el CDC, y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés), han definido esta situación como uno de los principales problemas del siglo XXI y han establecido protocolos de acción en contra de la RAM que implican su vigilancia en el ambiente.

Los ecosistemas acuáticos, como los ríos, suelen ser afectados por descargas de aguas residuales que son una de las principales fuentes de grupos de bacterias que poseen genes de resistencia a antibióticos, como las TCs y los BL de espectro extendido, los cuales, pertenecen a los tipos más utilizados a nivel agrícola y clínico, respectivamente. Además, los tratamientos de aguas no suelen ser eficientes, en consecuencia, estos contaminantes no son removidos del ambiente y se han reportado a niveles de $\mu\text{g L}^{-1}$ - ng L^{-1} en diferentes matrices ambientales. Así, zonas de alta densidad poblacional y de elevados niveles de contaminación son más propensas a ser reservorios ambientales de antibióticos.

Por lo anterior, el contar con metodologías altamente sensibles para la detección y cuantificación efectiva de estos antibióticos en muestras de agua superficial, como la UHPLC-MS/MS, permitirá su monitoreo y vigilancia en ecosistemas acuáticos.

En este contexto, el presente estudio adoptó y validó una metodología para la cuantificación de TCs y BL de espectro extendido, mediante una SPE y un análisis por UHPLC-MS/MS en las

aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno, la cual se usa como captación superficial para la planta de tratamiento de agua para consumo humano en el cantón de Goicoechea y que, además, muestra distintos tipos de impactos debido al constante vertido de contaminantes ambientales. Además, se evaluó el nivel de contaminación de este cuerpo de agua mediante el análisis de diferentes indicadores fisicoquímicos de contaminación.

Capítulo I

Antibióticos

Historia y clasificación.

La era de los antibióticos comenzó con el descubrimiento de la penicilina (del grupo de los BL) por Sir Alexander Fleming en 1928. Desde entonces se han convertido en la primera opción en el tratamiento de infecciones bacterianas de todo tipo¹, son uno de los grupos de fármacos más importantes a nivel humano y veterinario² y existen alrededor de 250 compuestos registrados para estos usos¹.

Un antibiótico es un agente quimioterapéutico que inhibe o anula el crecimiento de microorganismos, como bacterias, hongos o protozoos, pueden ser bactericidas (matan al microorganismo) o bacteriostáticos (evita la reproducción del microorganismo)³. Los primeros eran de origen natural, una clase de metabolitos secundarios producidos por microorganismos, por ejemplo, las penicilinas producidas por hongos del género *Penicillium*. Sin embargo, en la actualidad se obtienen principalmente por síntesis química o por modificación química de compuestos de origen natural y en general son moléculas pequeñas, con un peso molecular de menos de 1000 Da^{1,4}, además, comprenden una variedad importante de estructuras químicas de polaridad y carga eléctrica, tal que bajo diferentes condiciones de pH, pueden ser neutros, catiónicos, aniónicos y zwitteriónicos^{4,5}.

De forma general, se pueden clasificar en dos grandes grupos según su espectro de aplicación en diversas enfermedades. Los de espectro reducido se dirigen a tipos específicos de microorganismos mientras que los de amplio espectro se dirigen a una amplia gama⁶. De forma más específica se pueden agrupar por su estructura química o mecanismo de acción, los cuales son por inhibición de síntesis de proteínas, de ácidos nucleicos, de la síntesis de pared celular o por la inhibición de ácidos micólicos; y según esto se pueden dividir en diferentes subgrupos como BL, quinolonas, TCs, macrólidos, sulfonamidas y otros^{4,6,7}.

Su descubrimiento ha sido uno de los más grandes logros en la medicina humana para el control de la mayoría de las enfermedades infecciosas, principalmente de bacterias⁸, de hecho su uso clínico comenzó con la aplicación terapéutica de las sulfonamidas en la década de los

años 30 y a inicios de los 40 la penicilina se volvió disponible en casi todo el mundo⁸, estos han supuesto una revolución total en esta área y han ayudado a salvar millones de vidas⁹ y a aumentar la esperanza de vida de la población^{10,11}.

También, son muy utilizados a nivel del agro como promotores de crecimiento y en la mejora de la salud general, para prevenir infecciones microbianas respiratorias, infecciones dérmicas e infecciones entéricas¹², produciendo así mayores rendimientos y un producto de mayor calidad^{1,5,13,14} y en ciertos cultivos como maíz, lechuga y papa¹⁵ para tratar ciertas infecciones y para que actúen como pesticidas.

Propiedades fisicoquímicas y usos de los antibióticos en estudio.

Tetraciclinas

Las TCs son antibióticos de amplio espectro, productos de fermentación que pueden tener origen natural o sintético, y exhiben actividad antibiótica contra infecciones causadas por microorganismos.¹⁶ Se han utilizado para el tratamiento de diferentes tipos de infecciones, especialmente infecciones respiratorias³, y para combatir bacterias Gram (+) y Gram (-), así como micoplasmas, *Clamidias*, *Rickettsias* y protozoarios parásitos^{17,18} e interfieren con la capacidad de las bacterias para producir proteínas³. Las TCs constituyen unos de los pocos tratamientos disponibles para tratar ciertas infecciones bacterianas graves en humanos¹⁹.

Son compuestos que se caracterizan por una estructura policíclica que consiste en un naftaceno altamente funcionalizado y poco reducido²⁰, son anfóteros, tienen tres valores de pKa diferentes y aunque su asignación exacta sigue siendo controvertida, están en el rango de pH de 3-9¹⁶. Debido a los grupos funcionales presentes las TCs se cargan en todo el rango de pH, alcanzando el estado neutro solo como iones híbridos cuando el pH se mueve entre su primera y segunda constante de disociación ácida (pK_{a1} y pK_{a2})²¹. Por lo tanto, se prevé que en el rango de pH de interés ambiental (pH 4-8), las TCs estarían dominados por la especie zwitteriónica. Estos compuestos son estables en medios ácidos, pero no en condiciones alcalinas, y forman sales en ambos medios¹⁵. Además, tienden a unirse a iones metálicos como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} ¹⁶, grupos silanólicos y proteínas, como resultado de la presencia de dos grupos de cetonas en su estructura molecular.¹⁸ Y si bien presentan bajos $\log K_{ow}$ (-1.5-0.1), se ha reportado su presencia en suelos, sedimentos y sólidos en suspensión, indicando un reparto

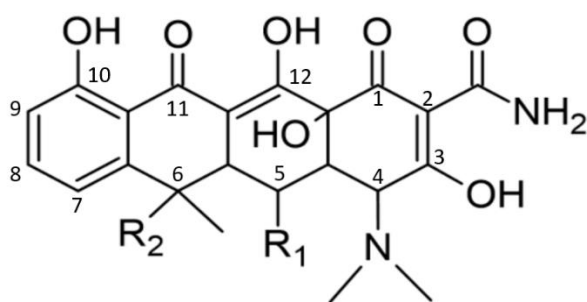
ambiental más complejo que involucra otros más factores además de interacciones hidrofóbicas¹⁶.

Debido a que en la actualidad es una de las clases de antibióticos más económicas y a su gran actividad antimicrobiana, ocupan el segundo lugar en la producción y el uso de antibióticos en todo el mundo³. Se utilizan sobre todo con fines veterinarios, y en el sector agrícola como aditivos alimentarios para promover el crecimiento de animales como bovinos, porcinos, ovinos y aves de corral, entre otros, en muchos países^{22,23}.

Existen más de 20 TCs disponibles; sin embargo, la tetraciclina (TC), la oxitetraciclina (OC) y la DC constituyen los más utilizados en la producción animal según reportes de la OIE^{12,16}. Incluso en pequeñas cantidades, pueden desencadenar posibles efectos secundarios adversos en los seres humanos, como reacciones alérgicas en personas hipersensibles y a largo plazo pueden ser potencialmente cancerígenos¹⁷.

Tetraciclina, Doxiciclina y Oxitetraciclina

La OC se encuentra dentro de tetraciclinas naturales, fue aislada en 1948 a partir de *Streptomyces rimosus*^{16,24}, a partir de esta se obtuvieron mediante modificación química la TC en 1953 y la DC en 1957¹². Las estructuras de estos tres compuestos se muestran en la **Figura 1**.



Compuesto	R ₁	R ₂	Masa Molar (g mol ⁻¹)
Tetraciclina	-H	-CH ₃	444.435
Doxiciclina	-OH	-CH ₃	444.435
Oxitetraciclina	-OH	-CH ₃ *	460.434

*Para la doxiciclina no existe -OH en el carbono correspondiente al enlace con R₂

Figura 1. Estructura química de la Tetraciclina, Doxiciclina y de la Oxitetraciclina.

Estos compuestos tienen tres grupos funcionales ácidos distintos, así el primer valor está asociado con la desprotonación del hidroxilo en C₃, el segundo valor de pKa se atribuye a la pérdida del protón en grupo hidroxilo del C₁₂ y el tercero al nitrógeno protonado del grupo dimetilamonio^{15,25}. Estos valores se resumen en el **Cuadro I**.

Cuadro I. Valores de pKa y pesos moleculares de la tetraciclina, doxiciclina y oxitetraciclina.

Compuesto	pK _a 1	pK _a 2	pK _a 3
Doxiciclina	3.0	8.0	9.2
Oxitetraciclina	3.2	7.5	8.9
Tetraciclina	3.3	7.8	9.6

El **Cuadro II** resume los principales usos de cada una de estas tetraciclinas.

Cuadro II. Usos de la oxitetraciclina, tetraciclina y doxiciclina

Antibiótico	Uso
Oxitetraciclina	En apicultura. Así como tratamiento contra enteritis y neumonía bacteriana en animales ²⁶ . Como promotor de crecimiento en animales ^{12,15} .
Tetraciclina (es el segundo antibiótico más producido y consumido en todo el mundo)	Como promotor de crecimiento en animales. En salud humana como tratamiento contra infecciones del tracto respiratorio, de la piel, de los ojos, del sistema linfático y del aparato digestivo ^{12,15} .
Doxiciclina	Contra enfermedades infecciosas en mascotas, como gatos y perros, así como en bovinos, porcinos, aves y pavos ¹² . Como terapia de primera línea contra neumonía, endocarditis, pirexia y retinitis, además, en el tratamiento de malaria, dengue, chikungunya e infecciones genitourinarias, y se ha utilizada contra complicaciones asociadas al COVID-19 ²⁷ .

Betalactámicos

Los antibióticos BL son antimicrobianos que comparten una estructura y un mecanismo de acción común, la inhibición de la síntesis de peptidoglicanos de la pared celular bacteriana^{28,24}. Su acción consiste en matar las bacterias al unirse a las proteínas para evitar que el microorganismo elabore una pared celular o evita que esta se forme correctamente⁶. Este grupo se divide en penicilinas, las cefalosporinas, los carbapenémicos y monobactámicos²⁸. Son los antimicrobianos más utilizados en la medicina humana, contra bacterias gram (+) y gram (-). Además de sus propiedades terapéuticas y preventivas, estos compuestos se han utilizado ampliamente como promotores del crecimiento en animales de ganado².

Los betalactámicos, son termolábiles, con una estabilidad limitada debido a la presencia de un anillo de cuatro miembros en su estructura y pueden isomerizarse en medio ácido. Tienen origen natural, son de amplio espectro y bactericidas^{18,2}.

Las cefalosporinas son utilizadas para tratar infecciones causadas tanto por bacterias que pueden ser transmitidas a los humanos a partir de fuentes no humanas, como por bacterias que pueden adquirir genes de resistencia a partir de fuentes no humanas¹⁹.

Estas se clasifican por generación. En la primera están los fármacos con actividad contra gram (+) y poca actividad contra gram (-); en la segunda generación están los fármacos con una actividad un poco mayor contra gram (-) e incluye algunos agentes con actividad contra anaerobios; en la tercera generación están antimicrobianos con una actividad contra enterobacterias, y un subgrupo con actividad contra *Pseudomonas.aeruginosa*, mientras que la cuarta cuentan con mayor espectro que las anteriores contra gram (+) y las que pertenecen a la quinta tienen mayor actividad frente a *Staphylococcus aureus*^{28,29}.

Cefotaxima

La cefotaxima es un antibacteriano de cefalosporina parenteral de tercera generación y es uno de los dos antibióticos más utilizados en los hospitales³⁰. Se utiliza en el tratamiento de infecciones debidas a bacterias Gram (+) y Gram (-) susceptibles, incluidas infecciones del abdomen, huesos y articulaciones, piel, tracto genitourinario (incluida la gonorrea) y del tracto respiratorio, en infecciones ginecológicas y en la enfermedad de Lyme.^{31,32} Se clasifica con

relación a la salud humana como de importancia crítica.¹⁹ La **Figura 2** muestra la estructura de esta molécula.

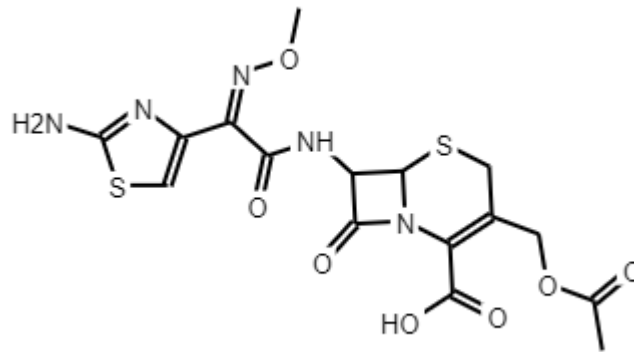


Figura 2.Estructura química de la cefotaxima³³.

Resistencia antimicrobiana

A pesar de los enormes beneficios de los antibióticos, su eficacia se ve limitada por la rápida aparición de bacterias resistentes en todo el mundo⁷. Esto se convirtió en un problema serio poco tiempo después de iniciar el uso de estos y para 1950 muchos de los avances se vieron amenazados. En respuesta, nuevos antibióticos se descubrieron y se desarrollaron restaurando la seguridad, pero luego sucedió lo mismo con la meticiclina, para 1962 en el Reino Unido y en 1968 para los Estados Unidos (EE. UU.). De igual forma, se ha desarrollado resistencia a todos los antibióticos que se producen^{1,34}. En la **Figura 3** se muestra un resumen del tiempo transcurrido entre la producción de un nuevo antibiótico y el desarrollo de la resistencia hacia estos.

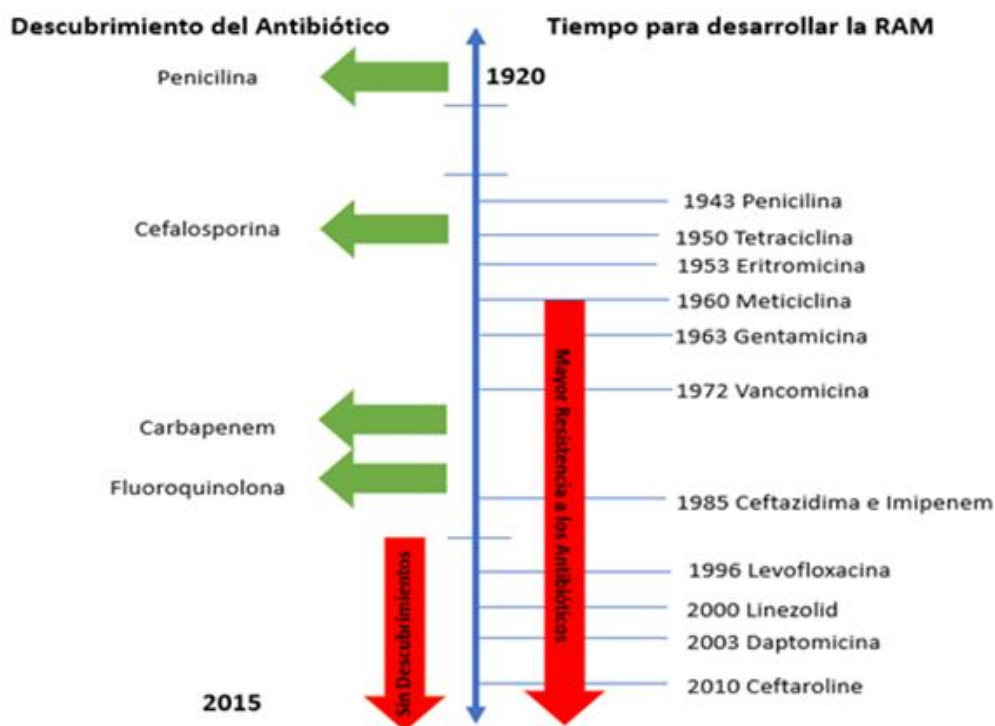


Figura 3. Representación del inicio de la resistencia a los antibióticos frente al tiempo para desarrollar la resistencia a los antibióticos. Traducido de una publicación previa⁷.

Las infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos pueden ser difíciles y, a veces, imposibles de tratar, siendo una importante causa de muerte en el mundo y la tercera en países desarrollados^{8,10}.

Se estima que solamente en EEUU, anualmente, ocurren 2.6 millones de infecciones resistentes a los antibióticos y casi 44,000 muertes debido a esto⁶, generando entre 21 y 34 mil millones de dólares en costos de atención médica y en pérdida de productividad^{35,11}. Asimismo, se han informado, por ejemplo, aumentos de hasta, 650 % de los casos de tuberculosis por bacterias multiresistente en África entre 2005 y 2012³⁶.

Por otro lado, se pierden entre 4 y 20 mil millones de dólares por año (8,3% de la producción anual de la cría de animales) debido a enfermedades parasitarias causadas por coccidios, nemátodos, garrapatas y otros en EEUU. En China, por ejemplo, la industria avícola tuvo que afrontar pérdidas anuales de miles de millones de dólares debido a casi el 100% de morbilidad de los pollos debido a estos problemas³⁷.

Dada la magnitud del problema actual de la resistencia a los antimicrobianos, la OMS, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, por sus siglas en francés) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés) han reconocido la resistencia a los antimicrobianos como una de las amenazas para la salud pública y ambiental del siglo XXI, y que requiere de la implementación de medidas intersectoriales urgentes^{35,38,39}.

Definición y mecanismos de acción

La RAM, es la capacidad los microorganismos para vencer a los medicamentos diseñados para eliminarlos, controlar o inhibir su crecimiento y replicación⁴⁰. Así, las bacterias resistentes son responsables de imponer una carga clínica y financiera sustancial al sistema de atención médica, los pacientes y sus familias¹¹.

El proceso de resistencia se produce mediante mutaciones a nivel genético o por medio de transferencia horizontal de genes asociados a RAM. Específicamente, los antibióticos inducen presión selectiva y los genes actúan en asociación con esta. Una vez que se desarrolla una nueva resistencia, la exposición a los antibióticos elimina los microorganismos susceptibles y permite que los resistentes sobrevivan y se multipliquen. Estos adquieren información genética de resistencia en su ADN que pueden pasar de generación en generación (transferencia vertical) y poseen la cualidad de transferir material genético entre sí mediante la transferencia de plásmidos y otros elementos genéticos móviles que les permiten a las bacterias adaptarse rápidamente a las condiciones ambientales cambiantes (transferencia horizontal)^{4,6,9,23,24,41}, compartiendo su capacidad de volverse resistentes a otras bacterias que no han estado expuestas a los antibióticos^{6,9,42,43}. Además, cuentan con una acelerada reproducción, pueden propagarse por medio del viento, la lluvia, los insectos, otros animales o incluso los seres humanos³.

Asimismo, las bacterias pueden no solo desarrollar la resistencia a un antibiótico en particular, sino, puede ocurrir con otros compuestos estructuralmente relacionados de la misma clase. Por ejemplo, la resistencia a la TCs puede generar resistencia a la OC, la clortetraciclina, la DC y la minociclina⁷. Entonces, es evidente que el proceso del desarrollo de la resistencia bacteriana a los antibióticos es inevitable⁹.

La crisis de resistencia a los antibióticos se ha atribuido entre otras cosas al uso excesivo e inadecuado de estos medicamentos, así como a la falta de desarrollo de nuevos compuestos por parte de la industria farmacéutica, debido a la reducción de los incentivos económicos y los desafiantes requisitos regulatorios¹¹.

Causas de la resistencia antimicrobiana

Se han encontrado diversas bacterias resistentes a varios antibióticos incluso en lugares aislados del exterior durante al menos 4 millones de años, algunas de ellas resistentes a 14 de los antibióticos comercializados. Se han publicado pruebas de que el intercambio de genes asociados a la resistencia a antibióticos entre bacterias ambientales y patógenas de humanos ha sido reciente y que las secuencias genéticas que movilizan los genes también están presentes en bacterias ambientales, lo que ayuda a su diseminación⁹. A continuación, se indican las principales causas que promueven la propagación de las bacterias resistentes.

Sobre uso

Los estudios epidemiológicos han demostrado una relación directa entre el consumo de antibióticos y la aparición y diseminación de cepas de bacterias resistentes^{36,44,11}, además, las correlaciones positivas significativas entre el consumo de antibióticos y la prevalencia de la resistencia a los antibióticos ha consolidado la percepción de una posible relación causa-efecto entre ambos^{24,34,45}. Esto genera una circulación mundial constante, aumenta la probabilidad de que se generen desechos que no se traten adecuadamente y supone una fuente importante de presión de selección sobre el sistema microbiano humano y natural^{4,39} generando así bacterias patógenas y resistentes en todo el mundo.⁴⁶

El consumo mundial de antibióticos aumentó en un 65% entre 2000 y 2015, de 21,1 a 34,8 mil millones de Dosis Definidas Diarias (DDD)^{34,44} con importantes contribuciones de países de ingresos bajos y medianos⁴⁵, como se observa en la **Figura 4**.

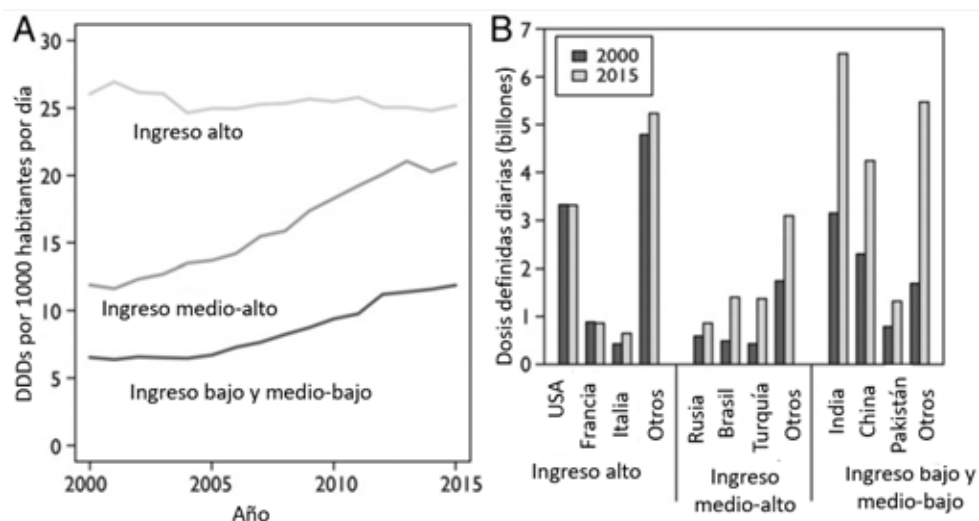


Figura 4. Consumo mundial de antibióticos entre el 2000-2015 por clasificación de ingresos de los países. (A) Tendencias en el consumo en este periodo de tiempo por clasificación de ingresos de los países. (B) Consumo total en el año por país o grupo de países⁴⁴.

Entonces, el sobre uso de los antibióticos por parte de los humanos genera un aumento en la RAM, sin embargo, esto constituye bastante menos de la mitad del consumo en otras áreas⁹, como la agricultura.

Uso en agricultura

Desde 1950 se utilizan antibióticos para el control de ciertas enfermedades bacterianas en frutas, vegetales y plantas ornamentales, siendo uno de los principales la estreptomicina con OC, así como en el tratamiento de infecciones bacterianas en animales y como promotores de crecimiento. Las bacterias resistentes se transmiten a los seres humanos a través del contacto directo con animales o plantas, por exposición a estiércol animal, por consumo de carne poco cocida o frutas y verduras expuestas a tratamientos con antibióticos y por contacto con superficies que estos hayan tocado^{35,37,47,4,36,16}. El CDC estimó que había alrededor de 76 millones de casos anuales de enfermedades transmitidas por alimentos en EEUU, incluidas 325,000 hospitalizaciones y 5,000 muertes³⁷.

Se estima que cada año en EEUU, entre el 70% y el 80% de los antibióticos se utiliza en animales con fines no terapéuticos, sobre todo como promotores de crecimiento^{11,15}, mientras que en China el 85% y en Japón el 60%²². Estudios indican que en algunos países como Canadá, de

todos los antimicrobianos distribuidos, el 99% se utilizan para animales de granja y menos del 1% para mascotas³⁶.

La **Figura 5** resume la tendencia en el consumo de antibióticos para mejorar el crecimiento de los animales de granja y tratar enfermedades infecciosas en EEUU entre 1950 y el 2017. En esta figura se observa claramente como en este sector la cantidad de antibióticos utilizados es significativa (siendo las TCs un grupo importante) y el marcado incremento en su consumo hasta el 2015. También, se observa como los intentos para mitigar sus impactos han sido adecuados, debido a que se nota una disminución de aproximadamente un 30% respecto al máximo alcanzado en el 2015.

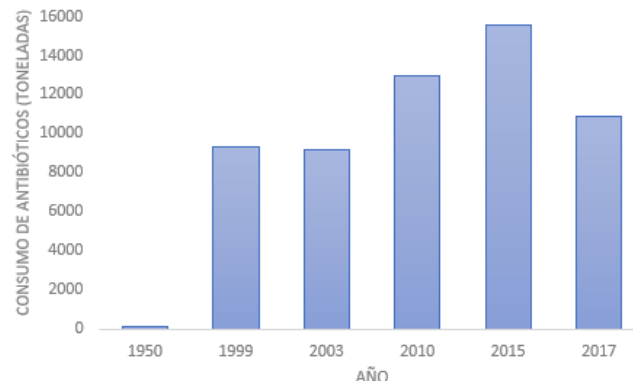


Figura 5. Consumo aproximado de antibióticos en el sector agrícola en los EEUU entre 1950 y 2017^{15,35,9,48}.

Por otro lado, si bien la aplicación de antibióticos como pesticidas representa una proporción mucho menor del uso general de antibióticos, la extensión geográfica resultante puede ser considerable. Esta práctica también contribuye a la exposición de microorganismos en el ambiente a agentes inhibidores del crecimiento, alterando la ecología ambiental al aumentar la proporción de microorganismos resistentes versus susceptibles¹¹.

Prescripción inadecuada

El uso incorrecto de estos medicamentos o el tiempo inadecuado del tratamiento pueden posiblemente dar lugar a la presencia de residuos de antibióticos en los productos alimenticios, concentraciones subinhibitorias y mayores desechos que finalmente llegan al ambiente, lo que

aumenta el riesgo potencial para los consumidores en términos de carácter cancerígeno y reacciones alérgicas, y contribuye al desarrollo de resistencias bacterianas⁴⁹.

Las concentraciones de antibióticos subinhibidores y subterapéuticos pueden promover el desarrollo de resistencia a los antibióticos al respaldar alteraciones genéticas, como cambios en la expresión génica y mutagénesis que contribuyen a la diversificación de cepas en organismos como *Pseudomonas aeruginosa*¹¹. Además, estudios han mostrado que la indicación del tratamiento, el agente escogido y/o la duración del tratamiento es incorrecto entre un 30 y un 50% de los casos. Sumado a esto, se han informado casos de de prescripción innecesaria, inapropiada o subóptima⁴⁹.

Falta de nuevos medicamentos.

La respuesta inicial de la industria farmacéutica ante la resistencia a los antibióticos fue buscar derivados semisintéticos de los antibióticos actuales que fueran refractarios a los mecanismos de resistencia⁵⁰. Sin embargo, el desarrollo de nuevos antibióticos es una estrategia que había sido eficaz para combatir las bacterias resistentes en el pasado y se ha estancado esencialmente debido a obstáculos económicos y regulatorios, por ejemplo, desde 1990, el 78% de las principales compañías farmacéuticas han reducido o recortado la investigación en antibióticos debido a los desafíos del desarrollo. Los datos históricos muestran que, en general, solo 1 de cada 5 medicamentos para enfermedades infecciosas que llegan a la fase inicial de prueba en humanos recibirán la aprobación de la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés). Sumado a todo esto, el desarrollo de fármacos puede llevar muchos años y puede costar millones de dólares a los desarrolladores⁶. Asimismo, la investigación sobre antibióticos realizada en el mundo académico se ha reducido como resultado de los recortes de fondos¹¹.

Debido a esto, la cantidad de antibióticos desarrollados y aprobados ha disminuido constantemente durante las últimas tres décadas, como se observa en la **Figura 6**, dejando menos opciones para las amenazas de las bacterias resistentes¹¹.

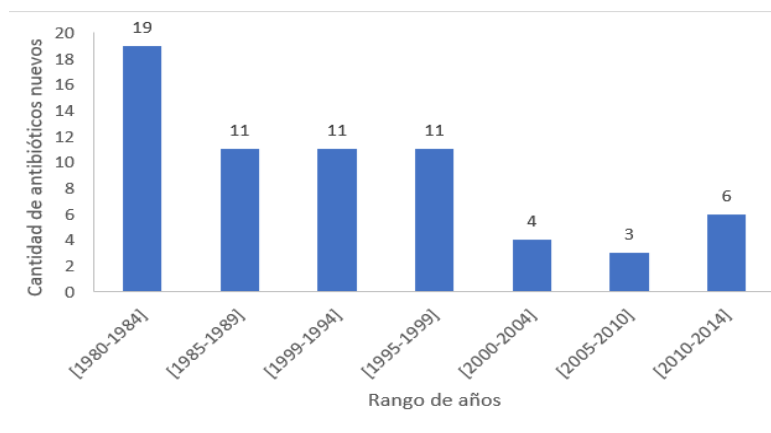


Figura 6. Cantidad de antibióticos desarrollados entre 1980-2014¹¹.

Contaminación de los ecosistemas acuáticos.

El ambiente externo proporciona un reservorio o una fuente para genes asociados a la resistencia tanto para microorganismos patógenos como no patógenos. Este también brinda oportunidades únicas para la recombinación genética y, por lo tanto, la creación de nuevos vectores para genes que ya circulan en patógenos. La falta de higiene suficiente y los hábitos de viaje extensivos, suelen converger en la difusión masiva de los genes asociados a resistencia alrededor del mundo⁵¹.

Además, el tratamiento convencional de aguas residuales incluye metodologías físicas y biológicas bien establecidas, que constituyen los tratamientos primario y secundario, respectivamente. Estos procesos, que fueron desarrollados principalmente para reducir la carga orgánica de las aguas residuales sin tratar, son capaces de eliminar la carga microbiana hasta 2-3 unidades logarítmicas. Sin embargo, esto no es suficiente. Parte de las bacterias encontradas en estos lugares tiene resistencia a una o más clases de agentes antimicrobianos. Dependiendo del antibiótico, se han descrito porcentajes de resistencia por parte de bacterias que varían desde el 2% hasta el 70%. Como consecuencia, se puede estimar que el agua residual tratada convencionalmente descargada por una planta de tratamiento en buen funcionamiento pueden suministrar al ambiente una cantidad significativa de antibióticos y bacterias resistentes por día^{45,52,53,54}.

Entonces, una fracción importante del uso indiscriminado de antibióticos en las prácticas médicas, veterinarias y agrícolas pueden ingresar al ambiente acuático y terrestre a través de

varias vías, como la descarga de aguas residuales municipales, la industria manufacturera, la cría de animales y los lixiviados de los vertederos de eliminación de antibióticos, al desbordarse el agua de tormentas tanto a nivel ciudad como urbano. Otras fuentes pueden incluir la escorrentía de campos agrícolas que contienen estiércol de ganado, estanques de acuicultura y centros urbanos, como se observa en la **Figura 7**, y pueden considerarse como un contaminante orgánico persistente debido al uso frecuente y extenso de antibióticos y a las emisiones ininterrumpidas, junto con bacterias de origen humano y animal^{4,52,55,56}.

Estos agentes antimicrobianos podrían llegar incluso a los humanos a través del agua potable, pueden alterar la microflora del intestino humano y aumentar el riesgo de ciertas infecciones. Los efectos secundarios no deseados bien conocidos dentro de la terapia son reacciones alérgicas y algunas, como la gentamicina, son nefrotóxicas²². El primer caso notificado de contaminación de aguas superficiales por antibióticos fue en Inglaterra hace más de dos décadas, en 1982 se detectó al menos un compuesto del grupo de antibióticos macrólidos, sulfonamidas y TCs en agua de río en concentraciones de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ⁵². El agua es uno de los hábitats y vías de propagación de bacterias más importantes, y juega un papel fundamental en la diseminación de la resistencia a los antibióticos entre el medio ambiente, los seres humanos y otros animales^{45,52}.

Este problema se evidencia mejor al considerar que algunos compuestos se metabolizan en un 90% o más, mientras que otros solo se metabolizan en un 30% o incluso menos, siendo el resto excretado en forma activa. Cuando las cantidades utilizadas para cada compuesto activo se multiplican por su tasa de excreción, incluso algunos compuestos con una alta tasa de metabolización pueden generar un impacto significativo en la concentración ambiental, además, en algunos casos la formación de metabolitos puede resultar en compuestos que son más tóxicos para los humanos que el compuesto original^{39,47}. En este sentido, estudios muestran que algunos antibióticos están presentes en el estiércol en concentraciones superiores a 100 mg kg^{-1} y no se degradan rápidamente en el estiércol^{1,57}. Además, se han reportado concentraciones de TCs, por ejemplo, en heces de aves y vacas de $17,68 \text{ mg kg}^{-1}$ y $60,0 \text{ mg kg}^{-1}$ respectivamente¹⁶. Esta materia fecal por lo tanto, pueden luego ser dispersadas ampliamente a través de fertilizantes, aguas subterráneas y escorrentías superficiales⁸.

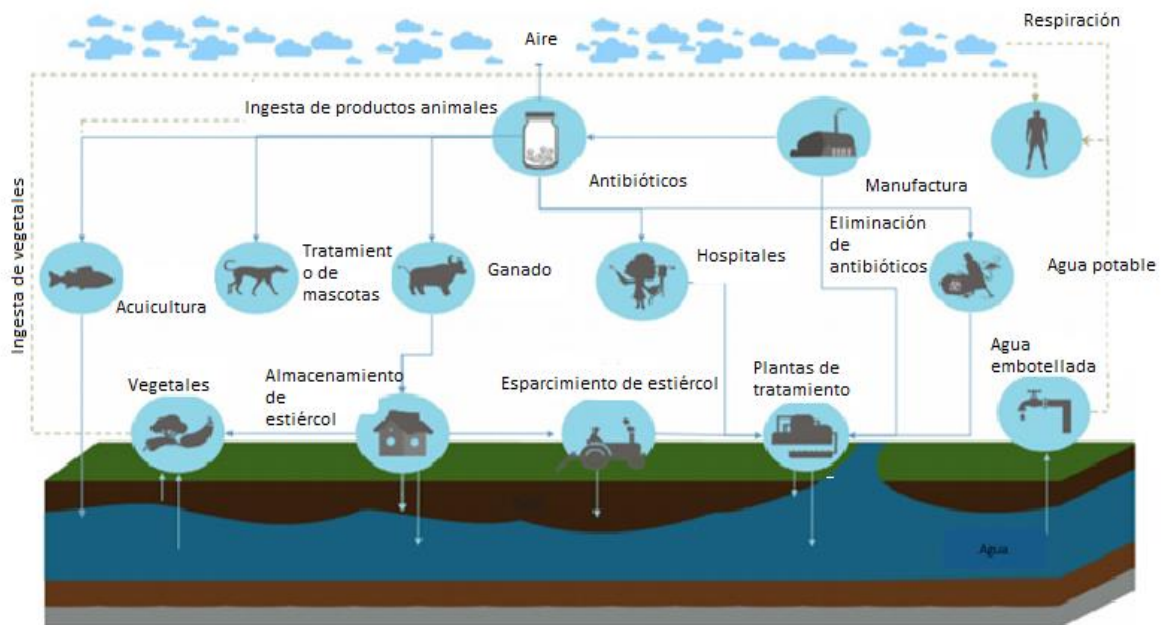


Figura 7. Exposición humana a RAM asociada con los residuos de antibióticos en el ambiente⁴.

A esto se suma que los antibióticos incluso en bajas concentraciones pueden causar efectos adversos a la biota acuática. Los efectos no deseados se pueden potenciar al considerar la exposición crónica, la bioacumulación y las mezclas de varios compuestos que se dan en los reservorios ambientales⁵⁸. Finalmente, se han encontrado antibióticos en agua potable, subterránea, superficial, de desecho, en plantas de tratamiento de aguas residuales, en lodos y sedimentos en concentraciones entre los ng L^{-1} hasta los mg L^{-1} , dentro de los cuales se han evidenciado también bacterias resistentes a TCs, cefotaxima y algunos BL^{2,4,14,59,55,56,4,22,47,22,60}.

En este sentido, en un estudio desarrollado en España, se realizó un análisis de correlación entre las concentraciones absolutas de genes asociados a la RAM en bacterias y las concentraciones de antibióticos a los que confieren resistencia en aguas superficiales y se observaron correlaciones positivas significativas entre las concentraciones de antibióticos y sus correspondientes genes de RAM⁶¹. Estas correlaciones se muestran en la **Figura 8**. Estudios recientes indican que más del 90% de las cepas bacterianas marinas son resistentes a más de un antibiótico y 20% son resistentes a al menos 5^{55,56,59,62}. Se ha indicado que niveles de

cefotaxima y TCs superiores a $1 \mu\text{g L}^{-1}$, son posiblemente suficientes para seleccionar bacterias resistentes^{53,32}.

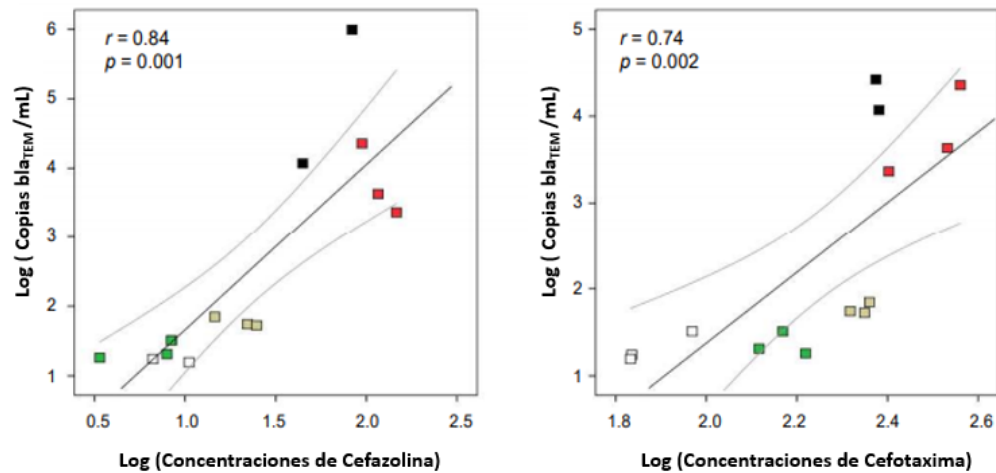


Figura 8. Correlaciones entre las concentraciones de antibióticos y sus correspondientes genes de RAM. Las ubicaciones de las muestras están representadas por: cuadrados negros (efluentes de hospitales), cuadrados rojos (afluentes de PTAR), cuadrados marrones (efluentes de PTAR), cuadrados blancos (aguas arriba) y cuadrados verdes (aguas abajo). Las líneas de color gris claro muestran intervalos de confianza del 95%.⁶¹ *PTAR: Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales.

Si un antibiótico no se elimina de ninguna manera, puede llegar al medio ambiente con el potencial de afectar negativamente no solo al sector de la salud en humanos, sino, también a los organismos acuáticos y terrestres^{47,63}.

Efecto Sobre la Biota Acuática.

La presencia de residuos de antibióticos en ecosistemas acuáticos puede ocasionar alteración del ecosistema y algunos impactos adversos, como toxicidad aguda y crónica y una reducción significativa de la tasa de eclosión de diferentes organismos acuáticos^{37,63,4}. Además, esto expone la flora microbiana nativa a una ecotoxicidad grave que puede obstaculizar procesos cruciales en los ciclos de nutrientes de algunos grupos de bacterias³⁷. La incorporación TCs afectan comunidades procariotas de las raíces de plantas en estos ecosistemas, además de afectar su elongación; y estos efectos^{16,39} pueden modificar los ciclos de nutrientes del suelo^{16,39}.

Los antibióticos, pueden ser propensos a la bioacumulación en organismos acuáticos, particularmente en peces⁶⁴, y se han asociado a los quistes y a una alta tasa de mortalidad, así como a efectos tóxicos en la reproducción. Otros problemas vistos debido a la bioacumulación de CT y OC han sido Encefalopatía trifásica, convulsiones y toxicidad del nervio craneal y bloqueo neuromuscular. Cuando los humanos consumen los organismos acuáticos con antibióticos bioacumulados, también se acumulan con el tiempo, ya que estos compuestos aún están activos⁴. Particularmente, el largo tiempo de exposición, por ejemplo, de las mujeres embarazadas a las trazas de estos antibióticos puede resultar en malformaciones de bebés y niños⁵⁶.

Medidas de acción y recomendaciones

A pesar de todos los problemas ambientales y para la salud humana que conlleva el mal uso de los antibióticos, sus usos también tienen muchos beneficios, por lo que no es viable vetarlos en su totalidad, de hecho, en algunos casos puede ser contraproducente.

En Dinamarca se observó que luego de la prohibición de ciertos antibióticos, se dio un aumento en infecciones bacterianas, en consecuencia, perdiendo así productividad en el sector del agro³⁷. Si el uso de antimicrobianos estuviera totalmente prohibido se necesitarían instalaciones para la producción ganadera y avícola de cientos de millones de m² más grandes a las actuales para obtener el nivel actual de producción animal. Debido a esto, el costo de producción de alimentos y por las infecciones resistentes a los antibióticos aumentarían considerablemente³⁷.

Por otro lado, cuando un paciente utiliza antibióticos, estos medicamentos eliminan el patógeno que causa la infección, pero las bacterias que protegen contra la infección también pueden destruirse al mismo tiempo, y pueden pasar desde semanas hasta meses para que estas bacterias "buenas" regresen. Por lo tanto, tampoco es una opción aumentar las dosis para combatir la resistencia, esto en todo caso sería igualmente contraproducente⁶.

Es importante destacar que no existen niveles guía ni regulaciones para este tipo de compuestos en aguas superficiales¹⁶. Hasta hace poco, las regulaciones ambientales apenas incluían niveles máximos de concentración permitidos para productos farmacéuticos en aguas superficiales, y a pesar de que la Comisión Europea establece 5 antibióticos con

concentraciones permitidas máximas de $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$, ninguno de ellos son de interés en este trabajo^{65,47}. Sin embargo, diferentes organizaciones a nivel mundial han desarrollado protocolos para reducir el impacto ambiental de los antibióticos.

Según la OIE la falta de información sobre los antibióticos a nivel mundial se debe a la falta de marco regulatorio específico para este tipo de sustancias, a su uso específico en la producción, a la falta de herramientas y recursos humanos dedicados a la digitalización y armado de bases de datos y a la falta de cooperación entre el sector privado y las autoridades nacionales en el intercambio de información³⁴. Debido a esto, la OMS y la Sociedad Estadounidense de Farmacéuticos del Sistema de Salud (ASHP, por sus siglas en inglés), impulsan la creación de evaluaciones del uso de medicamentos¹⁰ y proponen limitar y mejorar el uso de antibióticos con el fin de controlar los efectos nocivos de este abuso para salvar la salud humana y reducir el impacto ambiental²⁴.

En 2015, la OMS lanzó el programa del Sistema mundial de vigilancia del uso y la resistencia a los antimicrobianos (GLASS, por sus siglas en inglés) como un esfuerzo de colaboración para estandarizar y mejorar la comprensión de la RAM³⁴. Para esto indica una serie de acciones objetivas para afrontar la RAM, dentro de las cuales, establece la necesidad de generar y compartir datos sobre el consumo de antimicrobianos tanto a nivel nacional como internacional. De manera explícita, el segundo objetivo estratégico es fortalecer la base de conocimientos y evidencia a través de la investigación de vigilancia. Esto implica que es necesario diseñar formas de monitorear los datos sobre el uso y consumo de antimicrobianos³⁴. Con base en este, el Ministerio de Salud de Costa Rica desarrolló el Plan Nacional de Lucha Contra la Resistencia a los Antimicrobianos 2018-2025, en donde uno de los objetivos estratégicos es realizar investigación y vigilancia para reforzar los conocimientos científicos en este tema³⁸. En el mismo sentido, en 2018 el CDC propuso acciones urgentes que se deben realizar para combatir la RAM, en donde se reitera la necesidad de que los países implementen programas de prevención y control de infecciones y administración de antibióticos⁶.

Los datos sobre el consumo de medicamentos antimicrobianos se podrían utilizar, entre otras cosas, para identificar y proporcionar una alerta temprana de problemas relacionados con cambios en la exposición y el uso de antimicrobianos, y desarrollar intervenciones para

abordar los problemas identificados; sensibilizar a los profesionales de la salud, los consumidores y los responsables políticos sobre los problemas del uso inadecuado de antibióticos y su contribución a la resistencia antimicrobiana, y vincular la exposición a los antimicrobianos con el desarrollo de la RAM.

Situación en Costa Rica

El tratamiento de agua residual en Costa Rica puede variar desde modernas plantas de tratamiento hasta áreas con únicamente tratamiento primario, y otras con la descarga de desechos no tratados en las vías fluviales locales por escorrentía o tubería⁶⁶. Además, las aguas superficiales son afectadas principalmente por malas prácticas que facilitan la incorporación de contaminantes a los cuerpos de agua, entre estas prácticas están el incremento y concentración de la población cerca de algunas cuencas, insuficiente planificación de las actividades urbanas e industriales, uso inadecuado de los suelos, deforestación y manejo inadecuado de desechos domiciliarios, agropecuarios e industriales⁶⁷ y el uso de agua tratada para riego en granjas, que también representan un riesgo a la salud debido al potencial reciclaje y propagación de genes y microorganismos resistentes a los antibióticos⁵⁸.

Además, poco se sabe en el país con relación a las cantidades de antibióticos que se consumen en cultivos y ganadería, y los pocos estudios que se han hecho se basan en aproximaciones⁶⁸. Por ejemplo, solamente en el 2008, Costa Rica importó aproximadamente 27,100 kg de productos agropecuarios que contienen OC como principal ingrediente activo, y se ha reportado el uso de otras TCs en esta área⁶⁹. Sin embargo, este tipo de productos se utilizan de forma incorrecta debido a la falta de programas que concienticen al productor sobre los efectos nocivos que el uso irracional de los mismos tiene sobre el ecosistema de la unidad de producción pecuaria y la falta de programas de monitoreo y control por parte de las autoridades gubernamentales^{69,58}. Las actividades ganaderas en Costa Rica son desarrolladas en su mayor parte por pequeños y medianos productores que emplean prácticas tradicionales (no industrializadas) y la aplicación de fármacos en animales no está tan controlada como en la medicina humana³⁸, a veces los fármacos se aplican con fines profilácticos en lugar de terapéuticos⁵⁸. A nivel del sector público, Costa Rica reportó en el 2016 un consumo 14.18 DDD/1000 habitantes por día y 30.17 toneladas métricas de antibióticos, mientras que a nivel

mundial el consumo total de antibióticos osciló entre 4,4 y 64,4 DDD por 1000 habitantes por día y de 1 tonelada a 2,225 toneladas por año³⁴. Por último, diversos antimicrobianos como Estreptomicina, Kagugamicina y OC se están aplicando a los cultivos como arroz, papa, café, tomate, entre muchos otros. Todo esto hace que sea más probable estar causando un impacto en la salud humana, animal, vegetal y ambiente^{38,70}.

En el 2020 se realizó el primer estudio para el monitoreo cuantitativo de productos farmacéuticos en plantas de tratamiento de aguas residuales en Costa Rica, en este se observó que, de 33 moléculas encontradas, el 36,4% de estas correspondían a antibióticos, siendo el mayor número de moléculas detectadas. Los niveles reportados fueron desde 0,95 $\mu\text{g L}^{-1}$ hasta 3,51 $\mu\text{g L}^{-1}$ ⁷¹. En estudios cualitativos previos se encontró que los antibióticos detectados con mayor frecuencia fueron la DC (77%) y TC (22%)⁶⁶, estos estudios sugieren un alto uso de antibióticos en Costa Rica y existe una marcada relación entre los residuos de antibióticos en ecosistemas y el aumento de bacterias resistentes a ellos en el ambiente⁷². Asimismo, la RAM se ha distribuido a lo largo y ancho del territorio nacional, donde se han reportado casos de microorganismos resistentes en hospitales y en la comunidad. Se han detectado genes asociados a resistencia a las TCs en bacterias caracterizadas en lechugas^{12,70,73} y en muestras de alimentos para animales¹², y se evidenció resistencia a TCs y CT en otros aislamientos, provenientes de animales de producción, de compañía y silvestres³⁸, así como en efluentes hospitalarios⁸, en aguas residuales domésticas⁷³ y PTAR⁷⁴.

El aumento mundial de las bacterias resistentes a los antibióticos en el ambiente hace que sea imperativa la vigilancia de la presencia y distribución de las bacterias y de genes asociados a la resistencia, en el ambiente, y por lo tanto, el control de la presencia de los antibióticos en este⁷². Por esta razón, surge la importancia de adoptar y desarrollar metodologías analíticas que permitan el monitoreo de estos contaminantes en matrices ambientales como las aguas superficiales.

Río Durazno

Un lugar de interés en Costa Rica por sus antecedentes de contaminación es la microcuenca del río Durazno que es un punto de captación de agua y se ubica en la subcuenca del río Virilla⁶⁷. Esta microcuenca posee un área de 9.6 km² (ver **Figura 9**). Presenta uso de suelo

forestal, agrícola, pecuario, industrial y urbano (Ver **Figura 10** y **Figura 11**), procesos deficientes de planificación territorial y un constante vertido de contaminantes desde diversas fuentes. Además, previamente se han descrito altos niveles de contaminación microbiológica en el agua superficial de esta microcuenca⁷⁵. En ríos aledaños a esta zona, se han detectado aislamientos de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de primera generación y TCs a partir del agua superficial, lo cual convierte a este espacio en un área propicia para el estudio de la presencia de antibióticos de TCs y BL de espectro extendido como la CT.

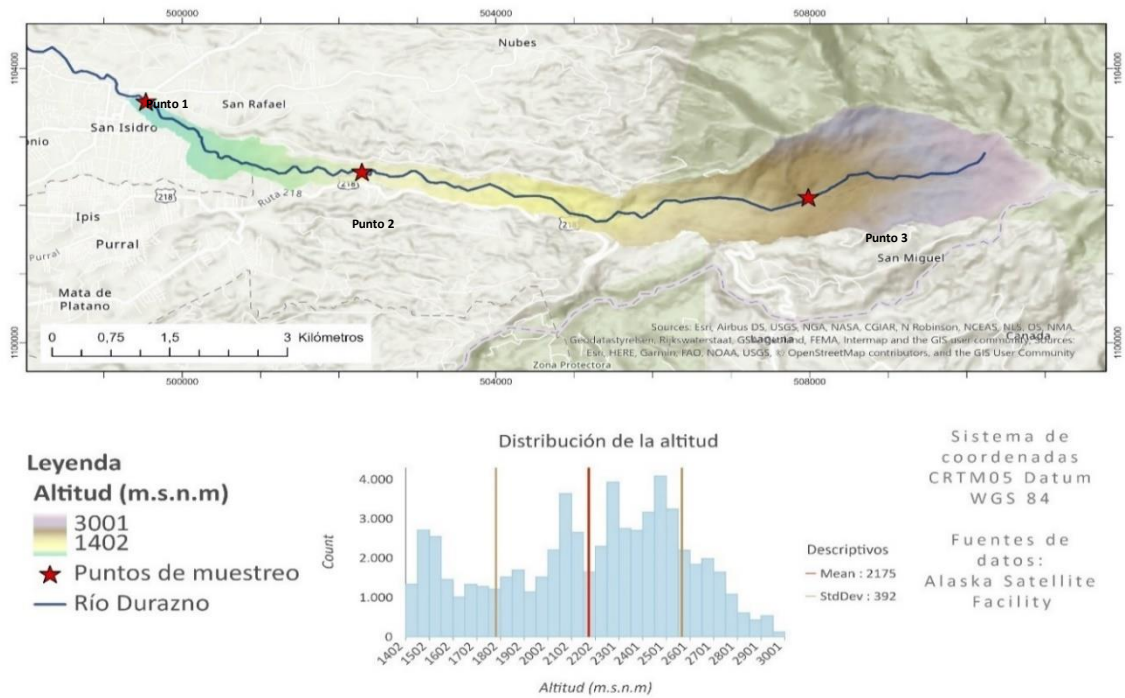


Figura 9. Mapa de distribución de altitud de la microcuenca del río Durazno⁷⁶.

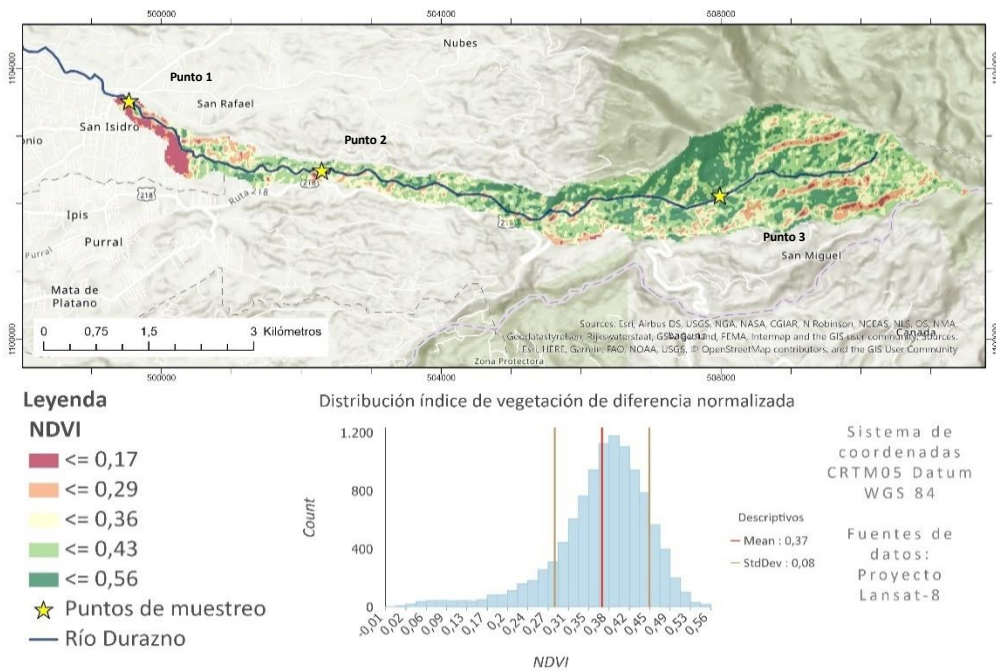


Figura 10. Mapa de distribución del índice de vegetación de la microcuenca del río Durazno⁷⁷.

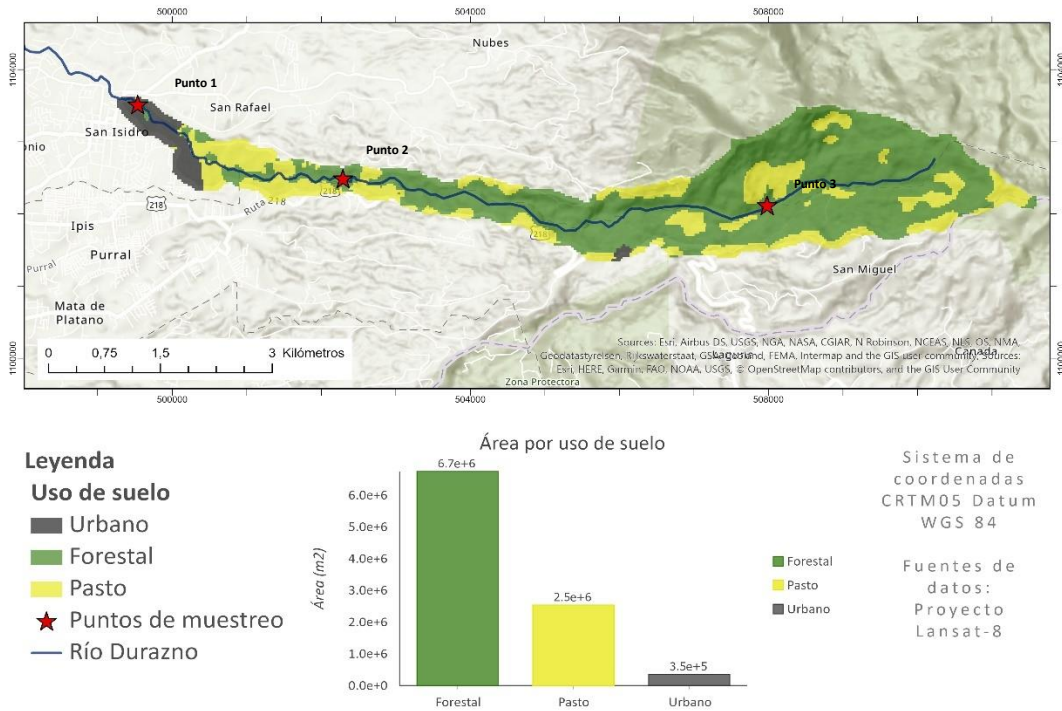


Figura 11. Mapa de uso de suelo de la microcuenca del río Durazno⁷⁸.

Calidad del agua

Además, la contaminación antropogénica de los ríos puede perjudicar la salud pública de las poblaciones adyacentes y las especies originarias de esos ecosistemas acuáticos, esto a su vez se asocia a la presencia de contaminantes emergentes como los antibióticos. Asimismo, estudios previos han demostrado que diferentes factores ambientales como la calidad del agua y la presencia de metales en estos cuerpos están fuertemente relacionados con la presencia y distribución de los genes asociados a la resistencia antimicrobiana^{79,80}, por lo tanto, es importante realizar una estimación de la calidad de los cuerpos de agua. Algunos de los parámetros comúnmente evaluados, así como su importancia y los estándares de calidad establecidos en diferentes instrumentos legales definidos de acuerdo con criterios de uso del agua se resumen en el **Cuadro III**.

Cuadro III. Parámetros fisicoquímicos analizados para evaluar y clasificar las aguas superficiales⁸¹.

Parámetro	Definición	Relevancia	Límites permitidos
Alcalinidad	Capacidad de neutralizar ácidos. Es la suma de todas las bases, principalmente de carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos.	La alcalinidad en exceso de las concentraciones de metales alcalinotérreos es importante para determinar la idoneidad de un riego con agua.	2000 - 4000 mg CaCO ₃ L ⁻¹ *
Conductividad (Conduc.)	Medida de la habilidad de una solución acuosa para transportar una corriente eléctrica. Depende de la concentración total de iones, movilidad y valencia.	Establece el nivel de mineralización para evaluar la concentración total de iones, efectos fisiológicos sobre plantas y animales, velocidades de corrosión y otros.	400 μS/cm**

Continuación **Cuadro III**. Parámetros fisicoquímicos analizados para evaluar y clasificar las aguas superficiales⁸¹.

Parámetro	Definición	Relevancia	Límites permitidos
Material en suspensión (MS)	Cantidad total de material suspendido, como partículas o líquidos inmiscibles.	Es importante debido a que la acumulación en la superficie puede ser transportada mediante el viento y contener bacterias patogénicas o virus.	25 mg L ⁻¹ ***
Temperatura (Temp)	--	Controla muchos procesos biológicos y químicos que se desarrollan en el agua. Puede dañar la vida acuática, generar cambios indeseados en las comunidades biológicas y aumentar la probabilidad de florecimiento de algas.	30 °C ⁺
DQO	Demanda química de oxígeno.	Es la cantidad de un oxidante específico que reacciona con una muestra bajo condiciones específicas. (Se expresa en términos de oxígeno equivalente)	25 mg L ⁻¹ ***
pH	Actividad del ion H ⁺ en la muestra a una temperatura dada	Es uno de las pruebas más importantes y frecuentes en la química del agua y regula la mayoría de los procesos de los sistemas.	6,5-8,5***

Continuación **Cuadro III**. Parámetros fisicoquímicos analizados para evaluar y clasificar las aguas superficiales⁸¹.

Parámetro	Definición	Relevancia	Límites permitidos
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno	Medida de la cantidad de materia orgánica bioquímicamente degradable presente, se define por la cantidad de oxígeno requerido por los microorganismos aerobios presentes para oxidar la materia.	0-9 mg L ⁻¹ ++
Saturación de Oxígeno (%OS)	Proviene del OD por medio del Oxígeno Real In Situ y el valor teórico dado por la temperatura y la presión atmosférica	--	51-130% ⁺⁺
Clorofila (Chla)	Presente en todas las algas (comunidades fitoplanctónicas son los principales productores primarios)	Indica la cantidad relativa de biomasa de algas presente. Su concentración es una representación adecuada de la salud del ecosistema acuático	Menos de 10 mg m ⁻³ ⁸²
Oxígeno disuelto (OD)	Depende de las actividades físicas, químicas y bioquímicas del cuerpo de agua	Clave para conocer el nivel de contaminación del agua	Valores varían entre 7.0-8.0 mg L ⁻¹

* Standard methods for the Examination of water and wastewater⁸¹

**Valor alerta ley calidad de agua de Costa Rica(N 38924-2)⁸³

*** Valores para agua tipo 1 y 2 permisibles en reglamento para la evaluación y clasificación de calidad de cuerpos de agua superficiales (N 33903-MINAE-S) (Aguas clase 1 y 2, necesitan simple desinfección y tratamiento convencional, respectivamente, para utilizarse en el suministro de agua)⁸⁴

+ Valor máximo admisible-ley de calidad de agua Costa Rica (N 38924-2)

++Rango dado en el reglamento para la evaluación y clasificación de calidad de cuerpos de agua superficiales (N 33903-MINAE-S) que considera desde aguas sin contaminación a aguas contaminación moderada (Clase 1-3)

Es necesario también contar con parámetros microbiológicos debido a sus importantes efectos sobre la salud humana y ambiental y en este sentido la Organización Mundial de la Salud dentro de los microorganismos que establece como indicador de contaminación fecal, se encuentra *E.coli* y Coliformes fecales (CF)⁸⁵, también se ha demostrado la necesidad de complementar esta información con otros indicadores como *Enterococcus faecalis* (*E.faecalis*) para evitar subestimar los riesgos a la salud⁸⁶. Otros índices mencionan la importancia de la inclusión de análisis de nutrientes para evaluar la eutrofización, problemas asociados a floraciones bacterianas^{87,88}.

Cuadro IV. Parámetros microbiológicos analizados para evaluar la contaminación en las aguas superficiales y sus límites máximos aceptados.

Parámetro	Concentración admisible (mg L ⁻¹)
CF	2000
<i>E.coli</i>	--
<i>E.faecalis</i>	--

El valor máximo admisible corresponde al permitido para agua clase 3 (máximo nivel de contaminación que puede ser tratado para el uso y consumo humano).

*De acuerdo con el reglamento de agua potable y la guía de calidad para agua potable de la OMS, no deben ser detectables en los suministros de agua.

Cuadro V. Nutrientes analizados para evaluar la eutrofización en las aguas superficiales y sus límites máximos aceptados⁸⁴.

Nutriente	Concentración admisible (mg L ⁻¹)
Fosfatos	N.A
Nitratos	15
Silicatos	N.A
Nitritos	0.1*

**Valor alerta de acuerdo a la ley calidad de agua de Costa Rica(N 38924-2)⁸³

Sumado a las posibles relaciones con los genes asociados a la RAM, la presencia de metales a elevadas concentraciones pueden tener efectos perjudiciales tanto en plantas como en animales e incluso para los seres humanos, como algunos compuestos de cobre y manganeso que pueden ser tóxicos por inhalación e ingestión y el sodio que si es absorbido como ion, al acumularse es tóxico para las plantas y si es absorbido por las arcillas, sustituye al calcio y al

magnesio y provoca cambios en la estructura que afectan la permeabilidad del suelo y el crecimiento de las plantas, así como a estructuras como tuberías, calderas y herramientas que estén comúnmente en contacto con el agua, como utensilios de cocina, por ejemplo, como en el caso del calcio y magnesio que contribuyen significativamente a la dureza del agua, incluso pueden cambiar el sabor y olor de los alimentos como con el hierro. La presencia de estos metales se da por escorrentías por su uso en la agricultura como fertilizantes, como el potasio, calcio, magnesio. Además, su sobreuso en producción de aleaciones, tuberías, pigmentos, explosivos, vidrio, productos farmacéuticos aumenta la probabilidad de que sus desechos alcancen los ecosistemas acuáticos^{81,89}.

Otros elementos como el fósforo pueden estar también presentes en aguas superficiales y provienen de diferentes fuentes, algunas veces se agrega en forma de ortofosfato durante el tratamiento para el suministro, grandes cantidades pueden ser agregadas al lavar o limpiar porque son los principales constituyentes de muchas preparaciones de limpieza. Además, se utilizan en la agricultura como fertilizantes y están presentes en alimentos. Asimismo, el azufre es producido por descomposición de la materia orgánica y reducción bacteriana de sulfato en forma de sulfuro, puede causar molestos olores y gases tóxicos, además de causar corrosión en los metales⁸¹.

El **Cuadro VI** resume algunos de los metales de interés para evaluar la calidad del agua junto a sus niveles máximos permisibles según la ley de calidad de agua de Costa Rica (N 38924-2)⁸³.

Cuadro VI. Metales analizados en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno y sus límites máximos aceptados.

Metal	Concentración alerta (mg L⁻¹)	Concentración admisible (mg L⁻¹)
Calcio	--	100
Cobre	1.0	2.0
Hierro	--	0.3
Magnesio	30	50

Continuación **Cuadro VI**. Metales analizados en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno y sus límites máximos aceptados.

Metal	Concentración alerta (mg L⁻¹)	Concentración admisible (mg L⁻¹)
Manganeso	0.1	0.5
Potasio	--	10
Sodio	25	200
Fósforo	--	0.1*
Azufre (como sulfatos)	25	250
Zinc	--	3.0

* Diario Oficial de la Federación, México.⁹⁰

Capítulo II

Técnicas analíticas para la cuantificación de antibióticos en matrices ambientales.

Preparación de la muestra

Debido a la baja concentración de los antibióticos en el ambiente, los analitos en la muestra deben concentrarse, sin embargo, puede ocurrir lo mismo con los otros componentes de la matriz, que de forma general dan como resultado la supresión o, con menor frecuencia, la mejora de la señal analítica, por lo tanto, las muestras deben limpiarse para eliminar posibles interferencias antes el análisis y de esta forma aumentar la sensibilidad de detección y reducir el efecto de matriz. Esto generalmente se realiza mediante una SPE. En esta los analitos se retienen en un sorbente (Fase sólida) y luego se eluyen (Fase líquida) para el correspondiente análisis instrumental, esto en función de sus diferentes grados de afinidad entre fases. La SPE se ha utilizado ampliamente con excelentes recuperaciones, pero requiere mucho tiempo (acondicionamiento, lavado de carga de muestra y elución), en especial cuando el volumen de muestra es grande^{91,31}.

Existen otras formas diferentes a la SPE para preparar la muestra, por ejemplo, mediante extracción líquido-líquido (LLE, por sus siglas en inglés) es un proceso de extracción que utiliza dos solventes inmiscibles para separar compuestos en función de su solubilidad relativa. Sin embargo, los volúmenes de estos solventes son muy grandes, presenta un costo mayor y ha sido menos estudiada y utilizada en el análisis de antibióticos en los últimos años⁹².

Otras opciones más novedosas y por lo tanto, menos estudiadas pero con mucho potencial que ofrecen una preparación de muestras más fácil, rápida y económica de todos los tipos de agua, lo son la microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés)⁹³, la extracción sortiva en barra magnética (SBSE, por sus siglas en inglés)⁹⁴, los discos de extracción laminar y la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME, por sus siglas en inglés)^{92,95}.

Además, para otras matrices ambientales se han aplicado y acoplado otras técnicas de extracción para la cuantificación de antibióticos, como por ejemplo, la dispersión en fase sólida de matriz, QuEChERS^{23,96} y la extracción asistida por microondas⁸⁵.

Extracción en fase sólida (SPE)

La SPE es, la técnica para preparación de muestra más utilizada en este tipo de trabajos ya que presenta ventajas sobre las otras como por ejemplo: menor consumo de solvente orgánico, se evita la formación de emulsiones, tiene altos porcentajes de recuperación, se generan pocos residuos, presenta una alta reproducibilidad y especificidad, además de que es más fácil en operación y hay gran disponibilidad de equipos y sorbentes^{93,99}, por ejemplo, puede utilizar diferentes sorbentes, solos o en tándem, como polímeros equilibrados hidrófilo-lipófilo, resinas de intercambio catiónico o aniónico, polímero de impresión molecular (que son polímeros reticulados sintéticos que poseen cavidades hechas a medida que son adecuadas para la molécula objetivo o compuestos similares) o C_{18} ^{31,100,101,102}, e incluso estructuras de imidazolato zeolítico con partículas de Fe_3O_4 para que los adsorbentes se separen fácilmente mediante un imán permanente¹⁰² y láminas de grafeno¹⁰³. En este sentido, los cartuchos de extracción como los de estireno divinilbenceno Oasis HLB han sido ampliamente utilizados en trabajos previos con los antibióticos en estudio^{2,39,59,64,95}. Estos demuestran una mejor recuperación frente a otros cartuchos utilizados para la extracción de antibióticos en este tipo de matrices^{64,92}. De hecho, debido a la composición química de Oasis HLB, que contienen unidades de divinilbenceno lipofílico y unidades hidrofílicas de N-vinilpirrolidona, permiten la extracción eficiente de contaminantes orgánicos en un amplio rango de pH (de 1 a 14), la estructura química de este componente se puede observar en la **Figura 12**^{2,62,64,104}.

El proceso para su uso se resume en la **Figura 13**. Este consta de varios pasos, primero se debe acondicionar los cartuchos para activar el sorbente dentro del cartucho con un disolvente según el cartucho utilizado y para eliminar posibles impurezas de fábrica⁹². Luego, la etapa de carga de muestra consiste en pasar cierto volumen de la misma a través de los cartuchos y que los analitos de interés queden retenidos en estos últimos⁹⁹. Finalmente, se eluyen los analitos con un disolvente adecuado para separarlos del cartucho⁹².

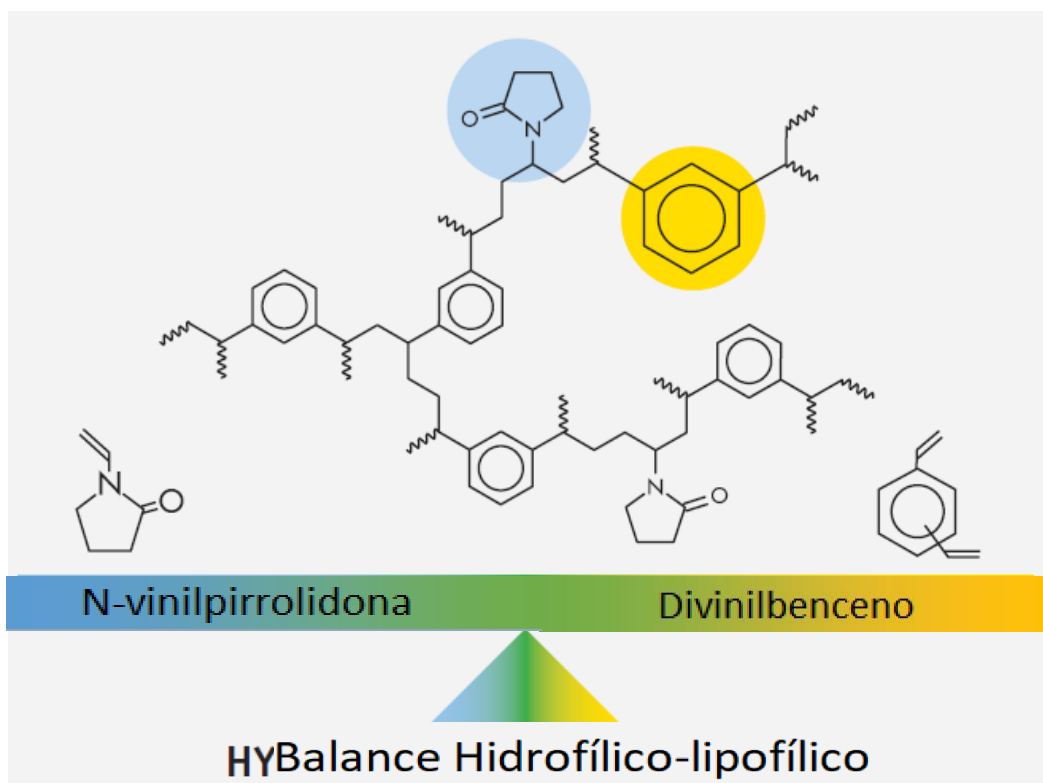


Figura 12. Estructura química de los cartuchos de SPE HLB (Hydrophilic-lipophilic-balance)¹⁰⁴.

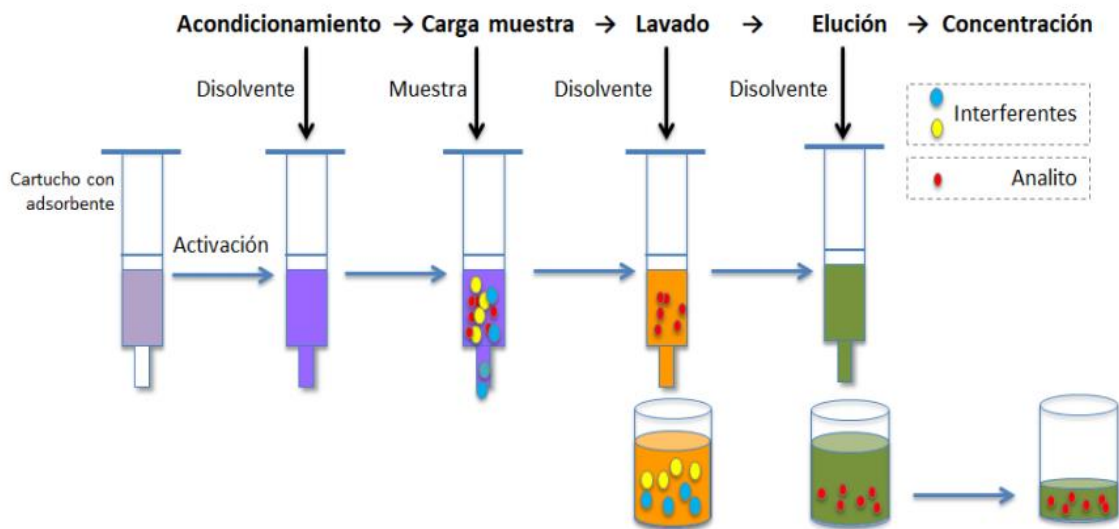


Figura 13. Etapas involucradas en la SPE con cartuchos de extracción¹⁰⁵.

Adición de EDTA

Las matrices ambientales entre otros muchos compuestos contienen cationes divalentes o polivalentes y algunos antibióticos como las TCs pueden formar complejos con estos, además,

se ha observado que estos antibióticos se absorben en los metales residuales de los cartuchos SPE y el material de vidrio, lo que produce una unión irreversible al cartucho y reduce la recuperación. Para obtener una recuperación adecuada de las matrices ambientales, debe haber un algún agente quelatante en la disolución o en la superficie del sorbente, además, de ayudar a mejorar la forma de las señales analíticas obtenidas, inhibir el crecimiento de las bacterias y prevenir interferencias durante la extracción de antibióticos^{106,93,107}. Estudios muestran que se recuperan más compuestos y con mejores porcentajes cuando se trabaja con agentes quelatantes como el EDTA a concentraciones cercanas al 1 g/L⁹². Además, la dureza del agua puede influenciar en la fotólisis de tetraciclinas⁴².

Ajuste de pH

La recuperación del método puede verse afectada por el pH al que se realizan las extracciones debido a que las tetraciclinas son especies anfóteras, por lo tanto, al bajar el pH a la primera pka, se obtiene la forma neutra en los compuestos y se da una mayor interacción con la fase reversa del sorbente, aumentando la recuperación y estabilidad del compuesto (como en el caso de los betalactámicos que pueden sufrir hidrólisis) y se ha evidenciado que algunos antibióticos son más insolubles en condiciones básicas o neutras^{2,91}, para esto, diferentes estudios han optimizado la extracción de antibióticos en distintas matrices acuáticas y otras ambientales utilizando ácido fórmico sobre otros ácidos como el clorhídrico y el fosfórico. Se ha observado que el pH óptimo es aproximadamente 4, por lo que las condiciones ácidas no deben ser muy fuertes^{59,97,108}.

Cuantificación de antibióticos

En las últimas tres décadas se han desarrollado técnicas para la cuantificación de los antibióticos en diferentes matrices ambientales y principalmente en aguas superficiales, por su importancia como vehículo de transmisión de residuos de antibióticos y bacterias resistentes.

Debido a la complejidad de las muestras de agua, se necesitan métodos analíticos robustos para cuantificar analitos en las mismas. El desarrollo y refinamiento de la espectrometría de masas a través de los últimos 20 años la ha convertido en una herramienta esencial para el estudio de residuos de antibióticos en diferentes matrices, incluidas las aguas superficiales,

ante todo por sus características únicas en el análisis multiresiduo de este tipo de compuestos, tanto para métodos cuantitativos como cualitativos^{23,109,12,31,62}. La espectrometría de masas como técnica de detección cromatográfica proporciona una alta especificidad, es robusta, ha demostrado ser una herramienta analítica sensible que conduce a resultados eficientes, con la que se obtienen menores límites de detección (LD) y de cuantificación (LQ), en el rango de los ng L⁻¹ y los pg L⁻¹ y se generan datos confiables en la identificación de los analitos^{31 110,111}. Por lo tanto, la UHPLC-MS/MS se ha convertido en la técnica de elección para el análisis de antimicrobianos, que son polares, no volátiles y, en algunos casos, térmicamente lábiles, sin necesidad de derivatización¹¹⁰.

UHPLC- MS/MS

Esta técnica se divide de forma general en dos partes, una separación mediante UHPLC de los analitos en las muestras y una posterior cuantificación de estos analitos mediante el uso de un detector de masas.

La UHPLC, es una técnica cromatográfica empleada para separar componentes en una muestra, en la cual los componentes son distribuidos con una alta presión entre dos fases, una estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido soportado en un sólido o en un gel que es empaquetada en una columna, y una fase móvil, que es un líquido. Para lograr la separación, se aprovechan una variedad de interacciones físicas y químicas entre ambas fases, para la UHPLC de fase reversa, la fase móvil es polar, mientras que la estacionaria es no polar²⁸. Esta técnica es la versión mejorada de la HPLC, ya que permite trabajar con diámetros de partículas más pequeños, presiones mayores, gradientes más rápidos y columnas más cortas, por lo tanto, se obtienen mejores resoluciones en tiempos más cortos de trabajo que en esta última, sin embargo, el principio de funcionamiento es el mismo^{112,113}.

Entonces, un equipo de UHPLC básicamente debe contar con un sistema de bombeo a alta presión que impulse el flujo de la fase móvil a través de la columna para, separar los componentes de la muestra, un detector que mida alguna característica de dichos componentes conforme van saliendo de la columna y un procesador que convierta la señal electrónica del detector en un cromatograma²⁸ La **Figura 14** muestra el diagrama del equipo típico utilizado en UHPLC.

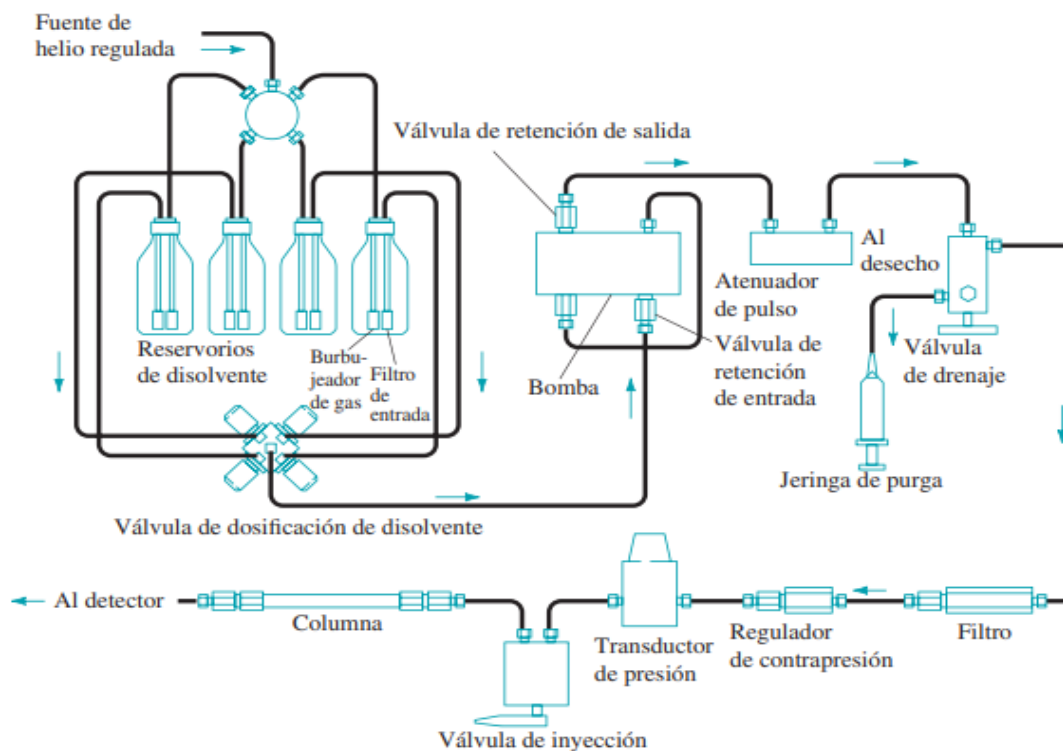


Figura 14. Diagrama de equipo utilizado en la técnica de HPLC/UHPLC¹¹⁴.

En el caso del uso de un detector de masas, y de forma general, en la espectrometría de masas, el principio de funcionamiento se basa en que las moléculas de analito se convierten en iones al aplicarles energía. Estos iones se separan de acuerdo con su relación señal-carga (m/z) y se envían a un transductor que convierte el número de iones (abundancia) en una señal eléctrica. Existen diferentes fuentes de ionización y formas de separar iones. Sin embargo, el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QqQ) es el instrumento preferido para el análisis de analitos en matrices complejas. Las principales ventajas del espectrómetro de masas QqQ son la sensibilidad que, permite cuantificar varios tipos de antibióticos a niveles de ng L^{-1} , y la selectividad que permite principalmente el modo de monitoreo de reacción seleccionado (SRM)^{16,109}.

El analizador de masa de cuadrupolo consiste en cuatro alambres cilíndricos, como se ilustra en la **Figura 15**, que generan campos eléctricos, y con el ajuste adecuado de voltajes, se crea una trayectoria estable para que los iones que tienen una cierta relación m/z pasen a través del analizador hacia el transductor. Este movimiento de los iones a través de estos cuadrupolos son la base de las separaciones. Así en el transductor se obtienen las abundancias relativas

para crear el cromatograma, estos detectores tienen una resolución típica de $1 \text{ uma}^{114,115}$. Cuando estos analizadores se acoplan, se obtiene un resultado similar a la operación de limpieza de un extracto, durante el primer paso de separación de iones, en el primer analizador de masas (MS1), se realiza una limpieza específica, al distinguir en una mezcla compleja los iones propios del analito de las interferencias, y registrar luego sólo las señales características del analito objetivo en el segundo analizador de masas (MS2), que permitirá obtener, un espectro de masas del ion característico del analito objetivo, filtrado por el primer analizador (MS1). Entre los dos analizadores se ubica un dispositivo donde el ion seleccionado puede “activarse”, es decir, aumentar su energía interna que lo conducen a su disociación y posterior formación de iones-fragmento (iones-producto), que se registran en el analizador MS2. Este dispositivo funciona como una “cámara” o celda de colisiones activadas que provocan las disociaciones (inducidas) de iones estables. La configuración “clásica” de un sistema de masas tándem es el MS1, la cámara de colisiones activadas y el MS2, seguido de un sistema de detección y medición de corrientes iónicas, como se muestra en la figura siguiente¹¹⁶.

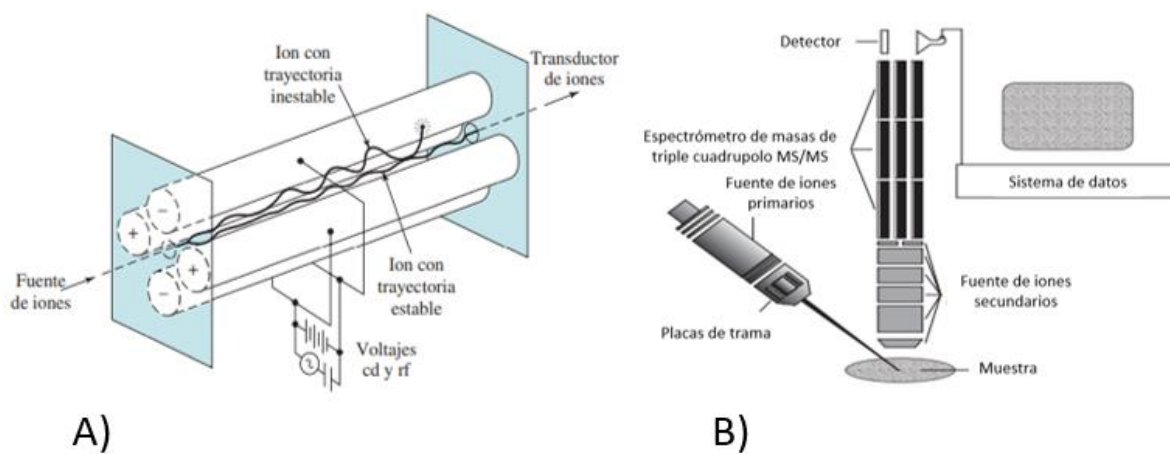


Figura 15. Diagrama de un analizador de masa cuadrupolo. En A) el diagrama de un cuadrupolo y en B) el diagrama general¹¹⁷.

A partir de las técnicas de HPLC-MS/MS y UHPLC-MS/MS, se han cuantificado antibióticos en aguas superficiales alrededor del mundo, el **Cuadro VII** muestra los resultados obtenidos para los antibióticos de interés.

Cuadro VII. Concentraciones de antibióticos determinadas a partir de HPLC-MS/MS y UHPLC-MS/MS alrededor del mundo^{71, 59, 62, 21, 63, 16,36,118}.

Antibióticos	Concentraciones (ng L⁻¹)
Tetraciclina	0.011-1000
Doxiciclina	77
Oxitetraciclina	3-1410
Cefotaxima	89-363.5

Efecto de Matriz

En el análisis LC-MS, especialmente en el análisis ambiental, la intensidad de la señal de los antibióticos puede suprimirse considerablemente. Los efectos de la matriz ocurren con mucha frecuencia en el análisis de Ionización por Electrospray (ESI, por sus siglas en inglés) y es de hecho, la principal desventaja de este tipo de fuentes de ionización, porque es altamente susceptible a otros componentes presentes en la matriz. Como resultado, la supresión de la señal conduce a resultados erróneos. La disminución de la sensibilidad del método puede deberse a varios factores. En primer lugar, los antibióticos pueden absorberse a materia orgánica en las muestras, lo que hace que el paso de preparación de la muestra no sea eficaz desde el punto de vista de la concentración de antibióticos y sean más difíciles de detectar. En segundo lugar, los contaminantes en la matriz de la muestra pueden interferir con las señales cromatográficas del analito al elevar la línea de base del cromatograma. Finalmente, los contaminantes pueden reducir la eficacia de ionización de los analitos absorbiendo parte del número limitado de sitios cargados en exceso en las superficies de las gotas de electropulverización⁹³.

Estándar Interno

Para el análisis ambiental, es conveniente utilizar un estándar interno (IS, por sus siglas en inglés) para mejorar la precisión de la cuantificación. Es necesario elegir el compuesto que no se encuentra en el medio en estudio, para evitar resultados falsos positivos. Los IS se agregan antes del enriquecimiento para evaluar posibles pérdidas durante el procedimiento analítico o a los extractos finales antes de la medición para evaluar el rendimiento del equipo⁹³. Sin

embargo, muchas veces los estándares necesarios no se encuentran disponibles comercialmente o tienen un elevado precio¹¹⁰.

Comparación con otras técnicas

En la actualidad, se dispone de un gran número de métodos analíticos multiresiduo para la cuantificación de un amplio espectro de antibióticos. Se tienen métodos que van desde la cromatografía de capa fina y escaneo por bioluminiscencia, hasta otros métodos de mayor sensibilidad y costo como HPLC, con detectores como Ultravioleta (UV), Fluorescencia (FL) y arreglo de diodos (DAD, por sus siglas en inglés). Sin embargo, a pesar de estas técnicas pueden tener límites de detección aceptables, es consensuada la mejora significativa que poseen técnicas más avanzadas como la espectrometría de masas, con mayor sensibilidad y selectividad^{110,111,31}.

Los sistemas de detección en tándem como CL-MS-MS aportan mayor especificidad y sensibilidad en comparación a sistemas de simples. El monitoreo de dos transiciones padre-hijo de los iones precursores es lo suficientemente específico para confirmar la presencia de compuestos trazas, alcanzando los requisitos de confirmación que proponen legislaciones internacionales como las propuestas por la Comunidad Europea. Además, los detectores de UV y FL requieren habitualmente el uso de agentes derivatizantes, porque algunos antibióticos carecen de cromóforos intrínsecos o su señal de fluorescencia nativa es demasiado escasa para detectarse correctamente, y en algunos casos UV no es lo suficiente sensible para el análisis de algunos compuestos^{16,21}.

Igualmente, cada detector de masas tiene ventajas y desventajas, por ejemplo, el de tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en inglés) es más sensible, pero tiene un rango lineal menor que el QqQ, mientras que Q-TOF es menos sensible y más propenso a la supresión de señales que este último, sin embargo, es de interés para confirmar las identidades del analito por la posibilidad de registrar un espectro completo de iones producto de barrido^{110,111, 108}.

A pesar de que son los más utilizados para la detección y cuantificación de antibióticos, por la importancia y necesidad de su estudio, se han desarrollado e implementado otros métodos como los que se describen a continuación^{12,93,119}.

Cuadro VIII. Métodos alternativos a UHPLC-MS/MS para la determinación de antibióticos en matrices ambientales.

Método	Aplicación
Métodos cromatográficos micelares	Variante de CL, con una solución de tensoactivo a una concentración mayor a la concentración micelar crítica (CMC). Puede mejorar la selectividad, en estructuras similares como TC, pero ha sido muy poco utilizado, además de necesitar los mismos detectores que HPLC
Electroforesis capilar (EC)	Utiliza cantidades más pequeñas de disolventes orgánicos y aumenta la eficiencia de separación. Sin embargo, es poco utilizada debido a la baja sensibilidad inherente a este método. A pesar de esta limitación, se reportó una metodología basada en EC para la determinación cualitativa y cuantitativa de TC en agricultura.
Métodos microbianos	Este tipo de métodos suelen ser rentables, fáciles de aplicar y rápidos. No obstante, las muestras positivas requieren análisis cromatográficos para su confirmación y cuantificación, y solo son aplicables si hay un único antibiótico presente en la muestra, porque no pueden discriminar entre antibióticos de la misma clase.
Métodos inmunológicos	Todos estos métodos utilizan anticuerpos monoclonales exclusivos de la TC en un formato de placa de microvaloración, la mayoría de las veces se basa en una reacción ELISA de biotinavidina. Aunque la mayoría de los anticuerpos no pueden distinguir compuestos estructuralmente similares, algunos kits son capaces de detectar tan solo $\mu\text{g L}^{-1}$ de los analitos en varias matrices.

Degradación de los antibióticos

Cada vez hay más datos disponibles que evidencian que los compuestos inalterados son solo la “punta del iceberg”, estos generalmente representan una parte de la cantidad total de compuestos excretados. En los últimos años, varios artículos han informado de la presencia de muchos metabolitos en aguas superficiales y residuales⁷¹.

La química ácido-base de los antibióticos, es bastante compleja e impacta severamente su comportamiento en matrices ambientales. Las diferentes condiciones de pH, la radiación luminosa y la unión a cationes divalentes afectan a los grupos ionizables presentes en las moléculas en varios grados. E incluso, para las TCs, por ejemplo, los estudios difieren en la cantidad de subproductos asociados^{57,120,3,57,121,21,118,120}. Y estos pueden formarse en una fracción 0.4 y 0.6 con respecto a las TCs originales¹¹⁸.

Por otro lado, los BL tienen anillos químicamente inestables que se someten fácilmente a hidrólisis, lo que se atribuye a su pocas y baja presencia en aguas superficiales^{56,2}. Además, mecanismos como la complejación de metales probablemente jueguen un papel importante en la sorción de CT en sólidos³¹.

Lo anterior complica aún más la adecuada cuantificación de antibióticos y a pesar de que el Centro de Medicina Veterinaria de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (CVM, por sus siglas en inglés, U.S. Food and Drug Administration's Center for Veterinary Medicine) y la UE establecen que la cuantificación de las TCs debe hacerse en términos del compuesto principal y algunos metabolitos, es notorio que muchos estudios realizan la cuantificación basándose únicamente en el compuesto principal, debido probablemente a la baja estabilidad y falta de productos de referencia de los epímeros^{64,106,111}.

Validación

Obtener datos estadísticos confiables es esencial para la interpretación correcta de resultados de estudios científicos de trabajos de rutina, en caso contrario, datos no confiables pueden llevar a conclusiones equivocadas. En ese sentido, los métodos analíticos exigen un cuidado desarrollo seguido de una validación completa del método.

Una validación es básicamente el proceso de definir un requisito analítico y confirmar que el método en consideración tiene capacidades consistentes con lo que requiere la aplicación. Inherente a esto es la necesidad de evaluar la idoneidad y las características de desempeño del método^{122,123}.

Existen diferentes guías de validación, sin embargo, la Guía de validación de métodos bioanalíticos para la industria de la FDA proporciona una orientación específica para la

validación de metodologías para la determinación de drogas y sus metabolitos a partir de análisis cromatográficos¹²³.

Por lo tanto, debido al aumento de la RAM que puede producir la presencia de antibióticos en el ambiente y todos los problemas que esto conlleva, es necesario contar con técnicas analíticas que permitan la cuantificación y el monitoreo de estos contaminantes de una manera confiable, principalmente en ecosistemas acuáticos, los cuales reciben descargas industriales, domésticas, escorrentías agrícolas y juegan un papel muy importante en la diseminación de la RAM y de esta manera ayudar a generar información que permita combatir la misma. Por lo cual se plantean los siguientes objetivos.

Objetivos

Objetivo general:

Evaluar una metodología analítica para la determinación de antibióticos de la clasificación de tetraciclinas y betalactámicos de espectro extendido por UHPLC-MS/MS para muestras de aguas superficiales de río.

Objetivos secundarios:

- Optimizar las condiciones cromatográficas de separación y detección que permitan una cuantificación adecuada de tetraciclinas y betalactámicos de espectro extendido por UHPLC-MS/MS.
- Evaluar los diferentes parámetros de desempeño analítico para la validación del método de análisis de tetraciclinas y betalactámicos de espectro extendido por UHPLC-MS/MS.
- Cuantificar el contenido de tetraciclinas y betalactámicos de espectro extendido en 6 muestras de aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno utilizando el método validado.
- Evaluar la calidad del agua superficial de la microcuenca del río Durazno mediante parámetros fisicoquímicos y microbiológicos.

Capítulo III

Metodología

Materiales y métodos

El desarrollo de la parte experimental de este proyecto referente al análisis de antibióticos fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), ubicado en la Facultad de Ciencias Agroalimentarias de la Universidad de Costa Rica.

La determinación de los parámetros fisicoquímicos y de nutrientes de las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno se realizó en el Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología (CIMAR), mientras que la preparación de la muestra para la determinación de metales, el fósforo y azufre se realizó en el Centro de Investigación en Electroquímica y Energía Química (CELEQ) y la medición se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA). Por otra parte, los análisis microbiológicos se realizaron en el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA). En este trabajo se integran los datos suministrados y se hace el análisis y visualización de los resultados.

Instrumentos

- Agitador vortex, Scientific Industries, vortex- Gene 2 (Nueva York, USA). Placa: 22610.
- Balanza analítica, Mettler Toledo XSE105 (Ohio, USA). Placa:388835.
- Baño ultrasónico Cole-parmer (Illinois, USA). Placa 409549.
- Bomba de vacío (Costa Rica). Placa 329136.
- Centrífuga con evaporación al vacío, Eppendorf Vacufuge Plus (Hamburgo, Alemania). Placa 385741.
- Columna analítica de cromatografía, Waters Acquity (UPLC CSH™ C18 1.7µm 2.1x100 mm) (Massachusetts, USA).
- Computadora, Dell ProSupport (866)-516-3115. Placa 377034.
- Detector de masas de triple cuadrupolo, Thermo Scientific (TSQ Endura, serie TQH-E1-0288) (Massachusetts, USA). Placa: 377032.
- Generador de nitrógeno, Peak Scientific (NM32LA) (Inchinnan, Reino Unido).

- Manifold (Ver Imagen 1)
- Micropipetas automáticas Thermo Scientific (Massachusetts, USA):
 - 0.5-5 FINNPIPETTE F2. Placa: 329414.
 - 2-20 FINNPIPETTE F2. Placa: 3239415.
 - 10-100 FINNPIPETTE F2. Placa: 329412.
 - 100-1000 FINNPIPETTE F2.
- Sistema de purificación para agua ultrapura, Synergy UV, Merck Millipore (Massachusetts, USA). Placa: 402164, con filtro BIOPAK polisher, catalogo CDUFBI001.
- UHPLC, Thermo-Scientific Dionex UltiMate 3000 (Massachusetts, USA). Placa 377032.

Materiales, reactivos y disolventes

- Frascos de vidrio (viales) de 2 mL para inyección en UHPLC.
- Tubos plástico tipo Eppendorf de 1.5, 5 y 15 mL
- Mangueras de politetrafluoroetileno (Sistema Manifold)
- Cristalería común de laboratorio (Balones aforados, pipetas, probetas, goteros, beakers, embudos, vidrios reloj y otros)
- Cartuchos de SPE de estireno divinilbenceno Oasis HLB 200 mg con capacidad para 6 cm³, Waters (Massachusetts, USA).
- Estándares de referencia sólidos y reactivos. Todos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Missouri, USA) a excepción del EDTA y el ácido fórmico:
 - Acetonitrilo grado LC-MS.
 - Ácido fórmico 98-100% EMSURE, Merck Millipore (Massachusetts, USA)
 - Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), Merck (Massachusetts, USA).
 - Agua Ultrapura (Sistema de purificación para agua ultrapura, Synergy UV)
 - Clorhidrato de metaciclina (como estándar interno).
 - Clorhidrato de oxitetraciclina.
 - Clorhidrato de tetraciclina.
 - Diclorometano para LC.
 - Hemihidrato de hemietanolato de clorhidrato de doxiciclina. ≥98.
 - Metanol grado LC-MS.

- Sal sódica de cefotaxima.

Preparación de disoluciones analíticas

Las disoluciones madres de los patrones individuales de los antibióticos fueron preparadas a una concentración de 2 000 mg L⁻¹ a partir de los patrones sólidos correspondientes, considerando la pureza de cada uno. Luego, se preparan disoluciones intermedias de 4 000 µg L⁻¹ y finalmente, se preparó una curva de calibración con todos los antibióticos a ocho niveles de concentración en los rangos indicados en el **Cuadro IX**. Para todas las diluciones se utilizó metanol como disolvente y se almacenaron a -20 °C.

Cuadro IX. Rangos de trabajo de las curvas de calibración de los antibióticos en estudio.

Antibiótico	Límite inferior de concentración (µg L ⁻¹)	Límite superior de concentración (µg L ⁻¹)
Cefotaxima	0.78	78.38
Tetraciclina	9.17	91.86
Doxiciclina	0.10	99.86
Oxitetraciclina	23.05	76.84

Librería de iones

Inicialmente se realiza una librería de iones, inyectando los patrones individuales a una concentración de 4 000 µg L⁻¹, directamente al espectrómetro de masas. Las masas iónicas de los antibióticos, así como sus fragmentos de partición se comparan contra las masas de los fragmentos reportados en la literatura para estos mismos antibióticos, y de esta manera se establecen las condiciones óptimas de trabajo del detector de masas utilizando la técnica de escaneo SRM.

Optimización de las condiciones cromatográficas

La optimización fue realizada utilizando una columna Acquity (UPLC CSH™ C18 1.7 µm 2.1x100 mm), como fase móvil A agua y como fase móvil B acetonitrilo, ambas con una disolución de ácido fórmico a 1 mL L⁻¹. Como se indica en el **Cuadro X**, se realizaron 5 pruebas utilizando diferentes gradientes y tiempos de medición con el fin de obtener una separación e intensidad de señal adecuada de cada antibiótico.

Cuadro X. Optimización del gradiente de la corrida cromatográfica para la cuantificación de antibióticos en aguas superficiales de río.

Prueba	Tiempo de Medición (min)	Gradiente (min.Seg.-%A:%B)
Método 1¹²⁴	27.10	0.00-70:30 3.00-70:30 18.00-0:100 22.00-0:100 22.10-70:30 27.10-70:30
2	12.00	0.00-92:8 3.00-92:8 8.00-20:80 10.00-0:100 10.10-90:10 11.00-92:8 12.00-92:8
3	16.00	0.00-92:8 1.00-92:8 10.00-20:80 13.00-92:8 16.00-92:8
4⁴⁹ (cambio en el flujo de 0.3 a 0.4 mL min ⁻¹)	16.00	0.00-99:1 0.50-99:1 2.50-83:17 7.00-55;45 8.00-1:99 11.00-1:99 14.00-99:1 16.00-99:1

Continuación del **Cuadro X**. Optimización del gradiente de la corrida cromatográfica para la cuantificación de antibióticos en aguas superficiales de río.

Prueba	Tiempo de Medición (min)	Gradiente (min.Seg.- %A:%B)
5 (0.4 mL min ⁻¹)	10.00	0.00-99:1
		0.25-99:1
		1.25-83:17
		3.50-55:45
		4.00-1:99
		5.50-1:99
		8.00-99:1
		10.00-99:1

Validación

El método se valida en términos de linealidad, LD, LC, precisión y veracidad, recuperación y efecto de matriz. En el

Cuadro XI se resumen los principales parámetros de desempeño de validación de este tipo de análisis.

Cuadro XI. Parámetros de desempeño evaluados para la validación del método analítico para la determinación simultánea de tetraciclinas y betalactámicos de espectro extendido en aguas superficiales de río por UHPLC-MS/MS.

Parámetro	Definición	Evaluación	Criterio de Aceptación
Linealidad	Correlación entre la concentración del analito y la señal analítica	Se estima a partir de 6 niveles de concentración de estándares de referencia y 3 repeticiones por nivel en un rango de trabajo de 0.1-100 µg L ⁻¹ . (Ecuación de la recta)	Cada nivel debe estar en un ± 15% de los valores teóricos en cada corrida a excepción de cuando sea en el LIDC*, en este caso deberá estar en un ± 20%.

Continuación del **Cuadro XI**. Parámetros de desempeño evaluados para la validación del método analítico para la determinación simultánea de tetraciclinas y betalactámicos de espectro extendido en aguas superficiales de río por UHPLC-MS/MS.

Límite de detección	Menor cantidad de un analito que puede ser detectada	Se establece a partir de medidas independientes de blancos con un radio de señal-ruido de 3 (S/R=3)	--
Límite de cuantificación	Menor cantidad de un analito que se puede determinar cuantitativamente con precisión y veracidad aceptables.	Se establece a partir de medidas independientes de blancos con un radio de señal-ruido de 10 (S/R=10)	--
Precisión	Concordancia entre una serie de mediciones con mismas condiciones de método	Se establecen con al menos 3 corridas independientes con 4 niveles de concentración por corrida en todo el rango de trabajo y 3 réplicas por nivel	El coeficiente de variación (CV) debe ser $\pm 15\%$ en cada corrida a excepción de cuando sea en el LIDC*, en este debe ser $\pm 20\%$
Veracidad	Grado de proximidad del valor determinado al valor nominal en condiciones prescritas.	Igual que precisión	El CV debe ser $\pm 15\%$ en cada corrida a excepción de cuando sea en el LIDC*, en este debe ser $\pm 20\%$

Continuación del **Cuadro XI**. Parámetros de desempeño evaluados para la validación del método analítico para la determinación simultánea de tetraciclinas y betalactámicos de espectro extendido en aguas superficiales de río por UHPLC-MS/MS.

Parámetro	Definición	Evaluación	Criterio de Aceptación
Recuperación	Eficiencia de extracción de un proceso analítico, expresada como porcentaje de la cantidad conocida de un analito que se transporta a través de las etapas de extracción y procesamiento de la muestra del método.	Se usan muestras enriquecidas a niveles bajo ($10 \mu\text{g L}^{-1}$), medio ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) y alto ($100 \mu\text{g L}^{-1}$), que se comparan contra blancos enriquecidos con el analito luego de la extracción.	Las recuperaciones deben ser altas, consistentes y reproducibles ($\pm 15\%$)
Efecto matriz	Alteración o interferencia directa o indirecta en respuesta debido a la presencia de analitos no deseados (para análisis) u otras sustancias interferentes en la muestra.	Se determinan mediante la supresión o mejora de ionización. Para esto se realizan dos curvas de calibración, una utilizando el método de estándar interno y la otra mediante curva de calibración convencional	$EM (\%) = \left[\frac{\text{Pendiente Curva EI}}{\text{Pendiente curva convencional}} - 1 \right] \times 100$ <ul style="list-style-type: none"> - EM = 0% indica ausencia de efectos de matriz - EM > 0% indica mejora de ionización - EM < 0% indica supresión de ionización

*Límite inferior de cuantificación = estándar de calibración diferente de cero más bajo de la curva de calibración.

Muestreo

La recolección de la muestra se realizó considerando lo descrito por Spongberg et al.⁶⁶ Se tomaron 3 L de agua superficial de la microcuenca del Río Durazno por punto de muestreo en botellas de polietileno de alta densidad (HDPE, por sus siglas en inglés). Antes del muestreo,

las botellas se lavaron con ácido clorhídrico diluido (100 mL L^{-1}) y metanol. En cada sitio de muestreo, las botellas utilizadas se enjuagaron y agitaron tres veces con un volumen completo de agua superficial, tomada en la superficie del cuerpo de agua, para evitar resuspender sedimentos de este. Todas las muestras se almacenaron en hielo hasta su procesamiento en el CIGRAS (menos de 6 h). El excedente de muestra no procesada se almacena a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se realizaron 2 muestreos puntuales los días 18/03/2021 y el 06/04/2021 en 3 sitios de la microcuenca del río Durazno, un total de 6 muestras, de las cuales se analizaron 3 réplicas, para un total de 18 análisis. Se buscaron zonas adecuadas, ubicadas a distintas alturas y para esto se utilizó como información base los mapas geomorfológicos y de uso del suelo del río Durazno suministrados por el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) para caracterizar espacialmente esta zona e identificar los sitios de toma de muestra representativos. (**Figura 9**, **Figura 10** y **Figura 11**).

Preparación de la muestra

Se sigue la metodología desarrollada y publicada por el Centro de Investigación en Contaminación Ambiental (CICA)¹²⁴.

Se realizó una SPE utilizando cartuchos de estireno divinilbenceno (Oasis HLB) con capacidad para 6 mL. Los cartuchos fueron acondicionados con 6 mL de metanol seguido por 6 mL de una disolución de ácido fórmico de 1 mL/L con EDTA (1 g/L).

Se tomaron 200 mL de cada muestra de agua superficial para cada réplica. Se filtraron a través de filtros de membrana de poliamida de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$. El filtrado se pasó a través de los cartuchos SPE con ayuda de vacío y posteriormente, se drenó al vacío por 20 minutos. Las muestras fueron eluidas de los cartuchos con 6 mL de una disolución de ACN:metanol (1:1) y 6 mL de metanol: diclorometano (1: 1) con ayuda de vacío y se drenaron al vacío durante 5 minutos para asegurar una completa elución.

Los eluidos se concentraron hasta sequedad mediante el uso de una centrífuga con evaporación al vacío y se redisolviéron a $250 \text{ }\mu\text{L}$ con metanol para finalmente filtrarse a través de un microfiltro de PTFE con membrana de $0,20 \text{ }\mu\text{m}$ en un vial ámbar de cromatografía. Los extractos de SPE se almacenaron a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el análisis instrumental por UHPLC-MS/MS. La velocidad de filtrado utilizada es de 6 mL min^{-1} .

Calidad del agua superficial de la microcuenca del Río Durazno

Los parámetros asociados a calidad del agua superficial fueron analizados en diferentes centros de investigación de la Universidad de Costa Rica, sin embargo, en este trabajo se realiza el análisis y visualización de los datos.

Parámetros fisicoquímicos

Considerando los posibles efectos ambientales debidos a la contaminación antropogénica de los ríos, se realiza un estudio de la calidad del agua de la microcuenca del río Durazno. Esta se evaluó mediante algunos parámetros fisicoquímicos y los resultados se comparan con los estándares de calidad indicados en el **Cuadro III**. Además, en el **Cuadro XII** se resumen las metodologías de trabajo.

Cuadro XII. Metodologías utilizadas para el análisis de parámetros fisicoquímicos de las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno.

Parámetro	Metodología
Determinación de material en suspensión	Diferencia de Masa. (Filtrar y llevar residuos a masa constante en estufa a 103-105°C) ⁸¹
Determinación de clorofila-a (Chla-a)	Mediciones Espectrofotométricas ⁸⁷
Dureza Total	Titulación complejométrica con EDTA como valorante y eriocromo negro T como indicador ⁸¹
DBO	Mediante sensores Oxitop ¹²⁵
Temperatura, conductividad y oxígeno disuelto	Medición hecha con una sonda multiparamétrica marca YSI modelo 85 A
Alcalinidad	Titulación ácido-base ⁸¹
DQO	Medición espectrofotométrica ¹²⁶
pH	Medición realizada con pH metro

Nutrientes

La eutrofización se ha convertido en uno de los principales indicadores de la calidad del agua ya que resulta en una serie de problemas ambientales y ecológicos. Los nutrientes escogidos son representantes de estresores antropogénicos responsables del deterioro de los ecosistemas de agua dulce. La cuantificación de nitrito, amoníaco, nitrato, fósforo y silicato corresponden a determinaciones espectrofotométricas^{82,127}.

Índice holandés

La clasificación de la calidad fisicoquímica del agua superficial de la microcuenca del río Durazno se realizó a partir del índice holandés, establecido en el Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de los Cuerpos de Agua Superficiales (RECCAS)⁸⁴. Este índice otorga un valor escalado a cada uno de los parámetros (**Cuadro XIII**) y clasifica la calidad del agua a partir de la suma de los valores individuales (**Cuadro XIV**).

Cuadro XIII. Puntajes según sistema holandés de valoración de la calidad fisicoquímica del agua para cuerpos receptores.

Puntos	PSO (%)	DBO (mg L ⁻¹)	N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)*
1	91-100	≤3	< 0.5
2	71-90 111-120	3.1-6.0	0.5-1.0
3	51-70 121-130	6.1-9.0	1.1-2.0
4	31-50	9.1-15	2.1-5.0
5	≤30 y > 130	>15	>5

*Nitrógeno amoniacal

Cuadro XIV. Clases de calidad del agua según sistema holandés, basado en valores de PSO, DBO y nitrógeno amoniacal

Clase	Sumatoria de puntos	Abastecimiento de agua para uso y consumo humano
1	3	Con tratamiento simple con desinfección
2	4-6	Con tratamiento convencional
3	7-9	Con tratamiento avanzado
4	10-12	No utilizable
5	13-15	No utilizable

Análisis elemental

Se realiza la cuantificación de 8 metales, del fósforo y azufre presentes en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno. Para esto, los sobrenadantes de las muestras colectadas se filtraron en filtros de jeringa (Minisart RC15 Regenerated Cellulose, Sartorius; 0.45 μ m). El contenido de metales se analizó para todas las muestras siguiendo lo descrito en los Métodos estándar para el análisis de agua y agua residual (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater) descritos por APHA (método 2320B, Waltham, MA, EE. UU.)⁸¹. Se analizaron con un espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, PerkinElmer, modelo Optima 8300, MA, EE. UU.). El equipo se hizo funcionar en una configuración axial; el **Cuadro XV** resume los metales analizados y sus longitudes de onda de trabajo. Se hizo una cuantificación a partir de curvas de calibración de tres puntos en el ámbito de trabajo esperado para cada metal y se realizaron mediciones de control de calidad para la solución en blanco y la solución de control cada 15 mediciones.

Cuadro XV. Determinación de la concentración de metales en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno.

Metal	Longitud de onda de trabajo (nm)
Calcio	317.933
Cobre	327.393
Hierro	238.204
Magnesio	285.213
Manganeso	257.610
Potasio	766.490
Sodio	589.592
Fósforo	214.914
Azufre	181.975
Zinc	213.857

Parámetros microbiológicos

Se realizó la cuantificación de los Coliformes Fecales (CF), *E.coli* y *Enterococcus faecalis* (*E.faecalis*). Los microorganismos fueron enumerados usando la técnica del número más probable (9221E, 9221F y 9230B, American Public Health Association)¹²⁸. Se inocularon 200 mL de la muestra en menos de 30 h después de la colección en caldo lauril triptosa (Oxoid) para CF y *E.coli* y en caldo azida dextrosa (Oxoid) para *E.faecalis*. Las muestras se incubaron a 35.0°C por 48 h, luego, todos los tubos que dieron positivos fueron inoculados en caldo EC-MUG (Oxoid) para CF y *E.coli* y en agar bilis esculina azida para *E. faecalis*. Luego de 24 h de incubación a 44.5°C (FC y *E.coli*), los tubos con reacción positiva fueron contabilizados. Se utilizó *Escherichia coli* ATCC 25922 como control positivo y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14502 como control negativo. En el caso de *E. faecalis*, después de un período de incubación de 48 h, se inocularon colonias de color negro pardusco con halos marrones en dos tubos de caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI), uno con NaCl al 6,5 % a 35,0 °C y el otro sin NaCl a 45 °C. Después de un período de incubación de 48 h, los tubos con una reacción positiva

fueron contabilizados. Se utilizó *Enterococcus* ATCC 35667 como control positivo y *Escherichia coli* ATCC 25922 como control negativo.

Condiciones climáticas

Finalmente, para la descripción del comportamiento climático durante el estudio se obtuvieron datos de precipitación y temperatura horaria de la zona de estudio, suministradas por el Instituto Meteorológico Nacional (IMN) utilizando para esto la estación meteorológica #84207, Patio de Agua en Coronado, Latitud N 09°58'37", Longitud O 83°58'12" con altitud de 1690 m.s.n.m.

Capítulo IV

Resultados y discusión

Resultados experimentales

A partir de los resultados obtenidos se discute la idoneidad del método analítico para la cuantificación de los antibióticos en estudio en aguas superficiales de río, además, se expone la calidad del agua de la microcuenca del río Durazno.

Librería de iones

Los iones encontrados coinciden con los reportados en la literatura^{28,59,66}. Estos se resumen en el **Cuadro XVI** donde se indican las fragmentaciones de la molécula original correspondientes a los principales iones. A partir de estos se establecen las condiciones óptimas de trabajo del equipo utilizando el modo de escaneo SRM, la transición de mayor intensidad se utiliza para la cuantificación y las otras para identificación de cada uno de los analitos. Además, la caracterización estructural asociada a cada fragmento se muestra en el **Cuadro XVII**.

Cuadro XVI. Resumen de las condiciones óptimas de trabajo del detector MS/MS para la fragmentación de los antibióticos de interés. (* Ion de mayor intensidad)

Antibiótico	Modo de adquisición	Ion Precursor	RF Lens (V)	Ion producto (m/Z)	Energía de Colisión (V)	Intensidad
Tetraciclina	(+)	445.03	144.067	410*	17.534	730582.746
				427	10.253	324579.099
				154	25.320	159685.812
Doxiciclina	(+)	445.03	152.562	428*	15.764	915926.446
				321	30.781	114467.472
				267	44.028	60055.452
Oxitetraciclina	(+)	461.00	128.292	426*	16.421	417706.271
				443	10.253	194017.455
				337	27.697	92585.231
				201	35.534	92585.231

Continuación del **Cuadro XVI**. Resumen de las condiciones óptimas de trabajo del detector MS/MS para la fragmentación de los antibióticos de interés. (* Ion de mayor intensidad)

Antibiótico	Modo de adquisición	Ion Precursor	RF Lens (V)	Ion producto (m/Z)	Energía de Colisión (V)	Intensidad
Cefotaxima	(+)	455.94	126.169	396*	10.303	195532.128
				167	10.253	105921.248
				125	17.888	35502.026
				324	44.079	36477.707

Cuadro XVII. Caracterización estructural de las fragmentaciones más importantes obtenidas en el análisis de los antibióticos de interés.^{129,130}. (* Ion de mayor intensidad).

Antibiótico	Molécula Original	Masa Molar (g/mol)	Ion producto (m/Z)	Fragmentación
Tetraciclina	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	444.44	410*	[M+H-NH ₃ -H ₂ O]
			427	[M+H- H ₂ O]
Doxiciclina	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	444.44	428*	[M+H-NH ₃]
Oxitetraciclina	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	460.44	426*	[M+H-NH ₃ -H ₂ O]
			443	[M+H-H ₂ O]
Cefotaxima	C ₁₆ H ₁₇ N ₅ O ₇ S ₂	455.47	396*	[M+H-CH ₃ OOH]
			324	[M+H-CH ₃ OOH-CO ₂ -CO]

Condiciones cromatográficas

A partir de las pruebas mencionadas en el **Cuadro X**, se establece un método cromatográfico que separa adecuadamente todos los antibióticos, en un tiempo corto de 10 minutos, el cual es 17 minutos menor al de referencia, en donde se presentan buenas formas de las señales y, por lo tanto, funcional para llevar a cabo la cuantificación de los antibióticos. En la **Figura 16**

es posible observar a partir del cromatograma de iones extraídos (XIC), el cromatograma obtenido con los respectivos T_R de cada compuesto.

Es importante señalar que, aunque la CT y la DC tienen tiempos de retención similares en este método, son compuestos estructuralmente muy diferentes y, en consecuencia, la fragmentación correspondiente también lo es, entonces, gracias a la capacidad del detector de MS/MS de discernir entre los fragmentos, el análisis no se ve afectado y es posible una adecuada cuantificación de ambos compuestos.

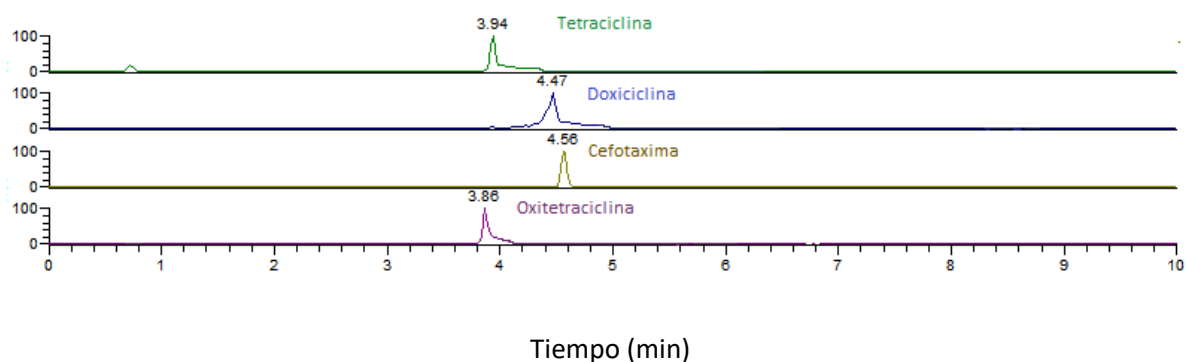


Figura 16. Cromatograma de disoluciones patrón de tetraciclina, doxiciclina, cefotaxima y oxitetraciclina ($\approx 400 \mu\text{g L}^{-1}$) eluidas en un tiempo de análisis total de 10 minutos. Los números sobre cada señal cromatográfica corresponden al tiempo de retención de cada analito.

Además, el **Cuadro XVIII** resume las condiciones cromatográficas y de detección óptimas del método.

Cuadro XVIII. Condiciones cromatográficas y de cuantificación óptimas para la cuantificación de los antibióticos en estudio.

Parámetro	Condiciones cromatográficas
Columna	Waters Acquity (UPLC CSH™ C18 1.7 μm 2.1x100)
Temperatura de columna	37 °C
Temperatura post-columna	37 °C
Fase móvil	(A) Agua con ácido fórmico 1 mL L ⁻¹ (B) Acetonitrilo con ácido fórmico al 1 mL L ⁻¹

Continuación **Cuadro XVIII** Condiciones cromatográficas y de cuantificación óptimas para la cuantificación de los antibióticos en estudio.

Parámetro	Condiciones cromatográficas
Gradiente (min. -% A: %B)	0-99:1
	0.25-99:1
	1.25-83:17
	3.50-55:45
	4-1:99
	5.50-1:99
	8-99:1
	10-99:1
Flujo	0.4 mL min ⁻¹
Volumen de inyección	5 µL
Temperatura del automuestreador	4 °C
Gas de desolvatación	Nitrógeno
Fuente de ionización	ESI
Voltaje del aerosol	3500 V
Temperatura de la fuente	300 °C
Temperatura de evaporización	350 °C
Gas de colisión	Argón
Modo de escaneo	SRM

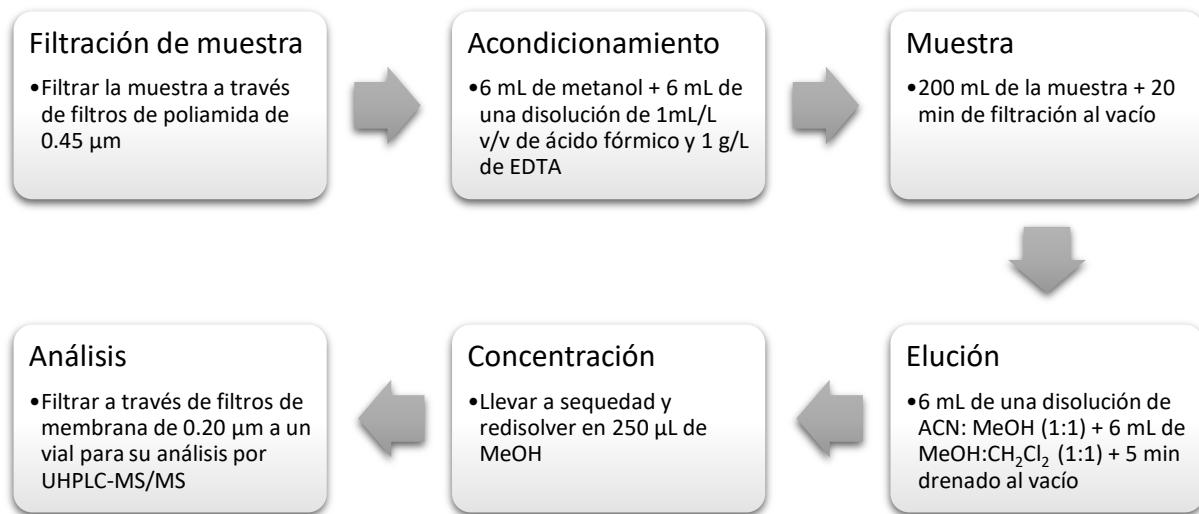
Extracción fase sólida (SPE)

Para llevar a cabo la extracción fue necesario utilizar un equipo conocido como manifold y una bomba de vacío. El sistema final se muestra en la siguiente imagen.



Imagen 1. Sistema utilizado para la SPE de los antibióticos en estudio.

Con el propósito de utilizar eficientemente los cartuchos de extracción, se realizaron pruebas puntuales para optimizar las recuperaciones de extracción, el uso de los disolventes, tiempos de extracción y volúmenes de redisolución para las concentraciones de antibióticos presentes en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno. La **Figura 17** representa esquemáticamente



*Flujo de drenado al vacío $\approx 6 \text{ mL min}^{-1}$

el método de SPE empleado en este trabajo, el cual toma como base lo establecido en un estudio previo¹²⁴.

Figura 17. Método de SPE optimizado para la extracción de los analitos en estudio.

Validación

Linealidad

La linealidad fue evaluada a partir de la preparación de una curva de calibración utilizando como disolvente metanol, es decir, el mismo disolvente usado para redisolución de los antibióticos en la muestra. La **Figura 18** muestra ejemplos de curvas de calibración obtenidas para cada antibiótico. Además, el **Cuadro XIX** muestra los coeficientes de determinación, rangos lineales de trabajo establecidos a través de diferentes pruebas y considerando la concentración de los antibióticos presentes en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno y el porcentaje de error máximo respecto a los valores teóricos de patrones de la curva de calibración.

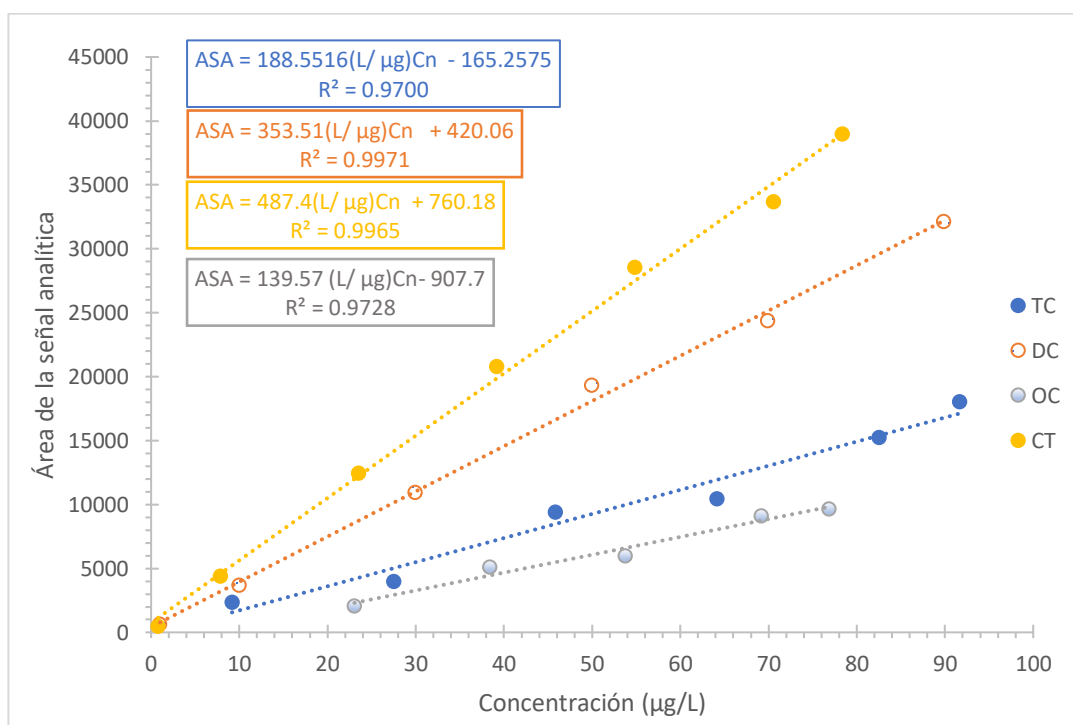


Figura 18. Curvas de calibración de los antibióticos en estudio. (ASA: Área de la Señal Analítica)

Cuadro XIX. Parámetros evaluados de la curva de calibración para la cuantificación de los antibióticos en estudio.

Antibiótico	Rango Lineal (µg L ⁻¹)	R ²	% de error máximo de los patrones *
Cefotaxima	0.78-78.38	0.9965	-65
Doxiciclina	1.00-99.86	0.9971	-20
Tetraciclina	9.17-91.68	0.9700	-20
Oxitetraciclina	23.05-76.84	0.9728	-19

*Los máximos errores se encuentran en el patrón menos concentrado para todos los antibióticos

Así, para todos los antibióticos en estudio, los porcentajes de error están dentro de lo esperado ($\pm 15\%$ de los valores teóricos en cada corrida a excepción de cuando sea en el límite inferior de cuantificación, en este caso deberá estar en un $\pm 20\%$), excepto para cefotaxima que presenta un porcentaje muy alto, sin embargo, este corresponde al patrón más diluido de

todos, por lo tanto, las desviaciones en ese punto se hacen más importantes, como lo indica la ecuación de Horwitz que formaliza que la dispersión de los resultados en este tipo de trabajos está en función del nivel de concentración del analito independientemente del método y la naturaleza de la muestra¹³¹. A pesar de esto, la curva tiene un coeficiente de determinación superior a 0.99 lo cual se considera adecuado en la cuantificación^{31,63,92,109,132}

Límite de detección y cuantificación

Estos límites fueron calculados a partir de una relación señal-ruido de 3 y 10 para el límite de detección y cuantificación, respectivamente, según las ecuaciones [1] y [2].

$$LD = \frac{3 \cdot \frac{S}{\sqrt{n}}}{m} \quad [1]$$

$$LC = \frac{10 \cdot \frac{S}{\sqrt{n}}}{m} \quad [2]$$

Donde:

S es la desviación estándar asociada a la señal analítica respectiva al tiempo de retención y fragmentos mayoritarios (m/z) de un conjunto de blancos estudiados en diferentes días (n) y m es la pendiente asociada a la curva de calibración del antibiótico respectivo.

El **Cuadro XX** resume estos resultados obtenidos, los cuales, demuestran que los rangos lineales son adecuados para la cuantificación.

Cuadro XX. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) del método analítico para los antibióticos en estudio.

Antibiótico	LD (µg L⁻¹)	LC (µg L⁻¹)
Cefotaxima	0.015	0.049
Doxiciclina	0.025	0.082
Tetraciclina	0.044	0.15
Oxitetraciclina	0.057	0.19

Además, a partir del estudio de los blancos se corrobora que no hay un arrastre de los analitos entre corridas. Esto se refleja en la comparación de áreas mostradas en la **Figura 19**, en donde se muestra la señal del blanco luego de analizar los patrones de la curva de calibración y la correspondiente al patrón más diluido de cefotaxima (0.78 µg L⁻¹) y se observa una diferencia

de más de 5 veces el área del patrón respecto al blanco. (Los blancos se analizaron después de cada 3 mediciones consecutivas)

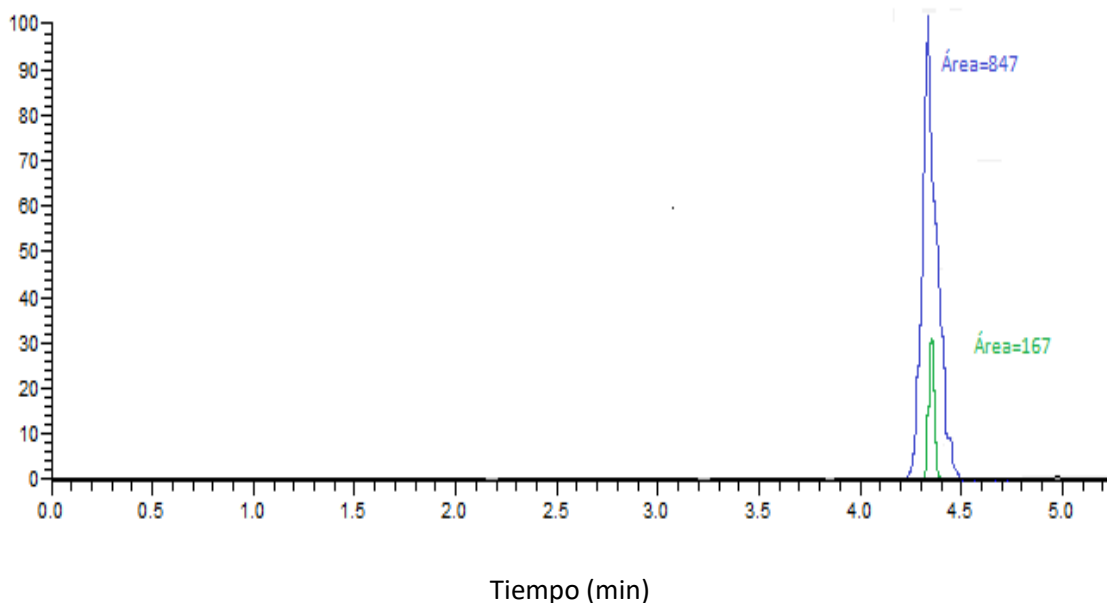


Figura 19. Comparación de las áreas de las señales analíticas de un blanco, en color verde, (posterior a las corridas de la curva de calibración) y la disolución patrón a $0.78 \mu\text{g L}^{-1}$ de cefotaxima, en color azul.

Precisión y veracidad

Se establecieron 3 mediciones independientes con 8 niveles de concentración para evaluar la precisión del equipo entre días y en un mismo día, es importante mencionar que el método siempre se midió por triplicado y se obtiene un promedio de las señales analíticas de los cromatogramas, por lo tanto, la precisión entre las corridas en un mismo día fue evaluada en cada análisis. Sin embargo, por el tiempo en el que se desarrolló el proyecto, que fue paralelo a la pandemia ocasionada por el SARS-CoV-2, y al ser este un laboratorio de venta de servicios e investigación, no fue posible reproducir el método en tres días continuos, como sería lo ideal, para intentar mantener las condiciones lo más estable posible, pero, si se obtuvo esta secuencia con un espacio de tiempo de cinco días.

La **Figura 20** resume los porcentajes de variación (coeficientes de variación) más altos encontrados para las diferentes medidas entre días y en un mismo día (entre corridas), que corresponden, como es de esperarse, a los patrones más diluidos de las curvas. En esta se

puede observar que únicamente para cefotaxima se obtuvieron resultados superiores al límite máximo estipulado para la precisión entre diferentes días, mientras que para todos los demás, así como para la precisión entre corridas de un mismo día, están dentro del rango esperado.

La **Figura 21** muestra las curvas de calibración para la cefotaxima para los mismos tres días de estudio, se debe notar que existe un decaimiento de la señal según los días, esto explica el porqué de la variación tan alta entre días. Se puede concluir que hay una degradación de la curva en un periodo muy corto de tiempo, sin embargo, la baja variabilidad entre corridas del mismo día indica que la curva es adecuada para cuantificación. Entonces, es imperativo preparar una curva de calibración nueva de cefotaxima para cada análisis, es decir, preparar la curva el mismo día de su uso.

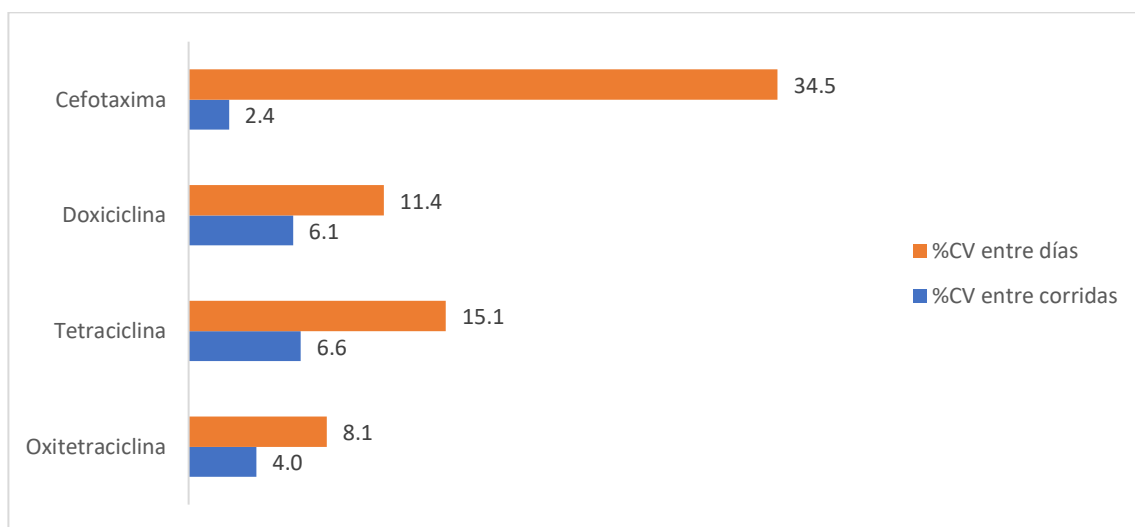


Figura 20. Coeficientes de variación máximos de las señales analíticas de la curva de calibración para cada antibiótico de corridas independientes, en un mismo día y en diferentes días.

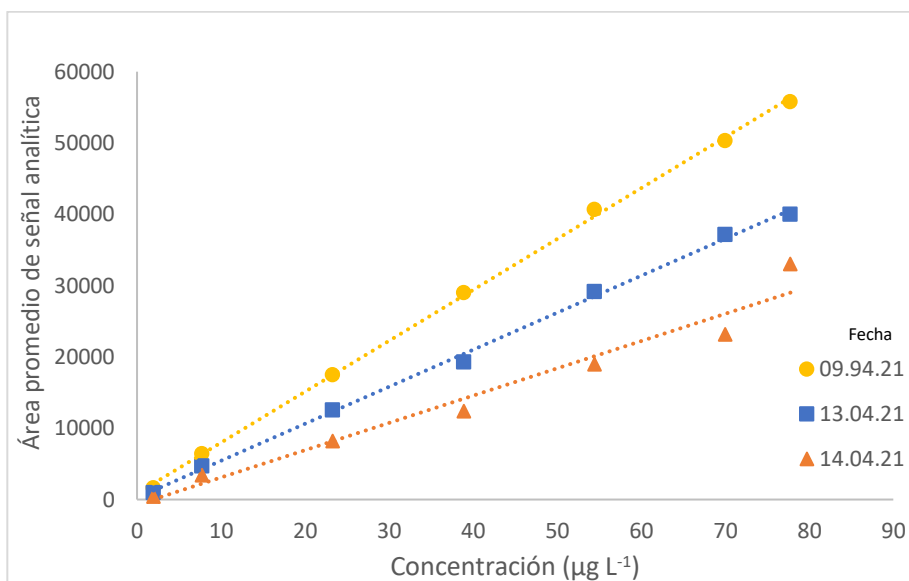


Figura 21. Curva de calibración de cefotaxima medidas en tres días diferentes.

Recuperación

Con el fin de optimizar el uso de los cartuchos de SPE, la eficiencia de extracción de este método analítico fue evaluada a tres niveles que abarcaran el rango lineal de todos los antibióticos en estudio, bajo (10 µg L⁻¹), medio (50 µg L⁻¹) y alto (80 µg L⁻¹) y se compararon contra blancos enriquecidos con el analito luego de la extracción, de acuerdo a la ecuación [3]. La **Figura 22** muestra gráficamente estos resultados.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{(\text{Señal}_{Enr} - \text{Señal}_{BlancoEnr})}{\text{Señal}_{Patrón}} \quad [3]$$

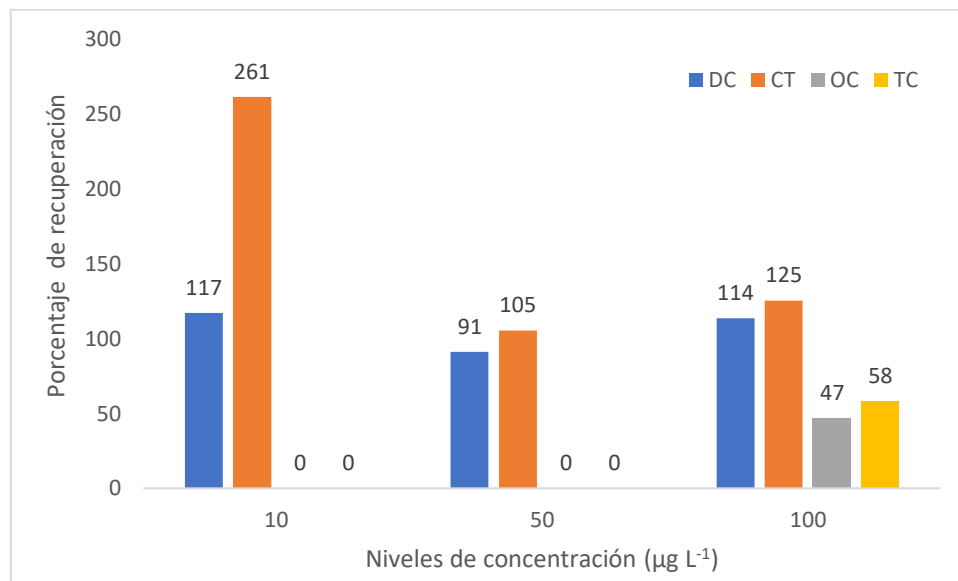


Figura 22. Porcentajes de recuperación para tres niveles de concentración de cada antibiótico en estudio. DC: Doxiciclina, CT: Cefotaxima, OC: Oxitetraciclina y TC: Tetraciclina.

Considerando los resultados de las recuperaciones, es posible observar que el método es eficiente en los rangos de trabajo para la cefotaxima y la doxiciclina, mientras que es ineficiente para la tetraciclina y la oxitetraciclina debido a que no se recupera analito a los niveles bajo y medio del rango de trabajo y al nivel alto, si bien se obtiene, estos están por debajo de los rangos encontrados en la literatura y los considerados aceptables, por lo que el método no es adecuado para la cuantificación de estas tetraciclinas. Algunos estudios enfocados en el análisis de TCs han reportado la pérdidas de analitos durante la etapa de evaporación del disolvente¹³³, además, mencionan la necesidad de utilizar diferentes buffers, como el de McIlvaine para tener un control más riguroso sobre el pH debido a la baja estabilidad que presentan las TCs, así como el uso de diferentes volúmenes de elución y eluentes en la etapa de SPE⁹². Por lo tanto, todos estos factores podrían tener un peso significativo sobre la recuperación de estos analitos. Esto podría mejorarse con un estudio más detallado de los factores mencionados y, a partir de este, escoger un procedimiento más específico para antibióticos (esto ya que el método de referencia fue desarrollado para productos farmacéuticos, en general).

Además, el hecho de obtener recuperaciones nulas a bajas concentraciones puede ser la causa de no observar ninguno de estos antibióticos en las muestras reales y no necesariamente por su ausencia.

Efecto de matriz

El efecto matriz fue evaluado en este trabajo, utilizando metaciclina como estándar interno, este uso se ha reportado previamente, además, se realizaron pruebas para descartar su presencia en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno y así evitar falsos positivos en los resultados.

Así, la supresión o mejora de ionización se determinó construyendo dos curvas de calibración, una convencional y otra en la matriz, y se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$EM = \left[\left(\frac{\text{Pendiente Curva en matriz}}{\text{Pendiente Curva Convencional}} \right) - 1 \right] \times 100 \quad [4]$$

Con base en los resultados de las curvas de calibración que se muestran en la **Figura 23**, se determina que el efecto de la matriz es de -21.1%, es decir, hay una supresión de la señal de un 21.1%, esto concuerda con los rangos esperados según la literatura^{59,108}.

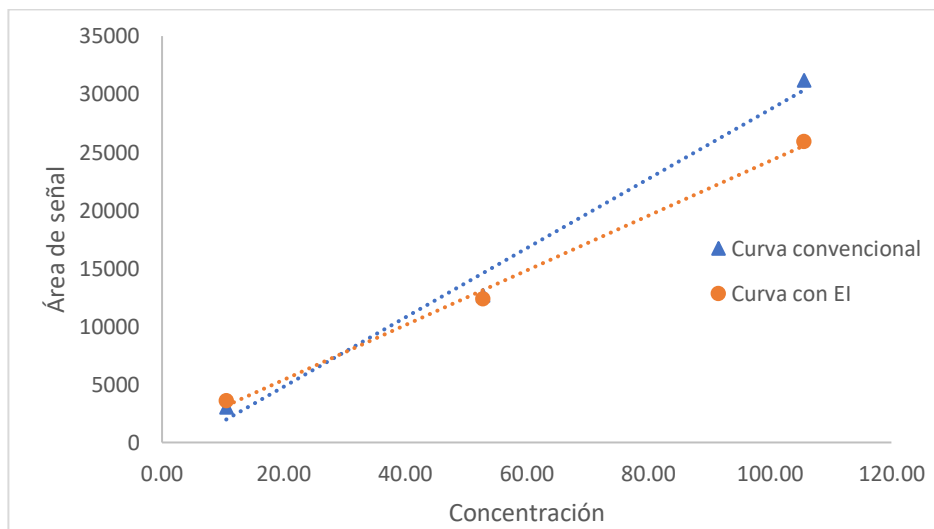


Figura 23. Supresión de la señal por efecto matriz, utilizando metaciclina como estándar interno.

Además, comparando los antibióticos como patrón individual, en conjunto con los otros en las curvas de calibración, o en una muestra real, se evidencia que no hay un efecto significativo de la matriz sobre los tiempos de retención en los análisis de un mismo día.

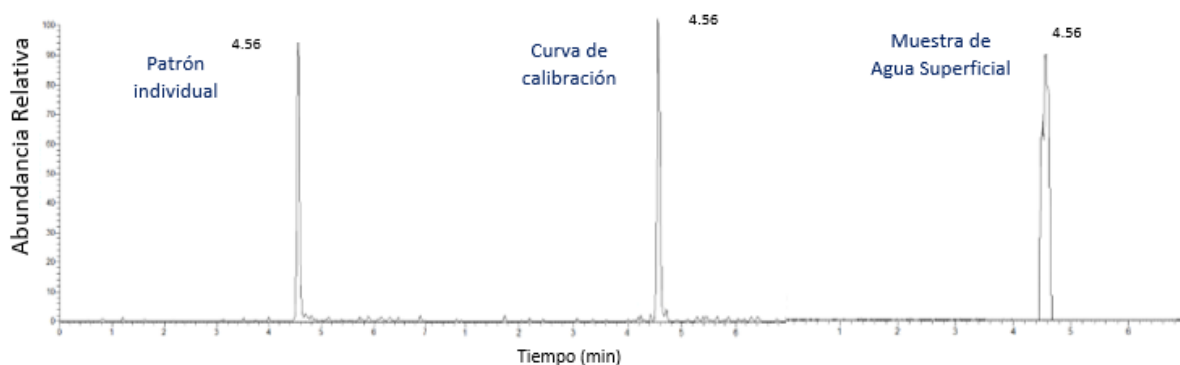


Figura 24. Comparación en los tiempos de retención de la cefotaxima como patrón individual a $50 \mu\text{g L}^{-1}$, presente como un patrón de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de la curva de calibración (en conjunto con los otros antibióticos) y en una muestra de agua superficial.

Estándar interno

A pesar de que los antibióticos deuterados o marcados isotópicamente, suelen ser las mejores opciones como estándar interno, para compensar los efectos de matriz y las pérdidas que se puedan dar en el fraccionamiento³¹, su elevado precio y disponibilidad comercial imposibilitaron su uso en este trabajo. Por este motivo se buscó un estándar interno alternativo y se encontró que la metaciclina, que es un antibiótico de la familia de las tetraciclinas, se ha reportado para estos usos anteriormente¹³⁴. Además, con las distintas pruebas realizadas se descartó su presencia en el agua superficial de la microcuenca del río Durazno, por lo tanto, se decidió usar con el fin de mejorar los resultados de los ensayos. Los resultados obtenidos reflejaron que su uso no mejoraba la linealidad de las curvas, por el contrario, aumentaba la variabilidad en el método. Esto se refleja en los coeficientes de determinación de las curvas de calibración mostradas en la **Figura 25**, que muestra el efecto de la metaciclina como estándar interno sobre las curvas de calibración para doxiciclina y cefotaxima, por lo tanto, se decidió cuantificar estos antibióticos en las muestras reales sin el uso un estándar interno.

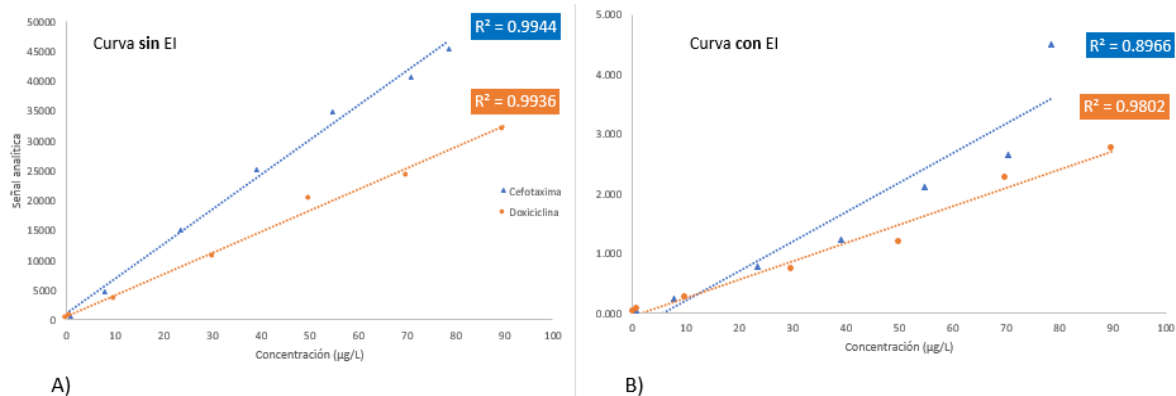


Figura 25. Efecto de la metaciclina como estándar interno (EI) en la linealidad de las curvas de calibración de cefotaxima y doxiciclina. A) Curvas de calibración sin EI. B) Curvas de calibración con estándar interno.

Finalmente, el **Cuadro XXI** resume los resultados de la validación del método analítico para la determinación simultánea de antibióticos en aguas superficiales de río.

Cuadro XXI. Resumen de resultados de los parámetros de desempeño evaluados en la validación del método.

Parámetro de validación	Antibiótico			
	Cefotaxima	Doxiciclina	Tetraciclina	Oxitetraciclina
Rango lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.78-78.38	1.00-99.86	9.17-91.68	23.05-76.84
R^2	0.9965	0.9971	0.9700	0.9728
Límite de detección ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.015	0.025	0.044	0.057
Límite de cuantificación ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.049	0.082	0.15	0.19
Repetibilidad entre corridas (% CV, n=3)	2.4	6.1	6.6	4.0
Repetibilidad entre días (% CV, n=3)	34.5	11.4	15.1	8.1
Recuperación $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (%)	261	117	0	0
Recuperación $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (%)	105	91	0	0
Recuperación $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (%)	125	114	58	47
Efecto Matriz	-21.1%			

Continuación **Cuadro XXI**. Resumen de resultados de los parámetros de desempeño evaluados en la validación del método.

Recomendaciones	<p>La linealidad y estabilidad de las curvas y la recuperación de los analitos pueden mejorarse cambiando los constituyentes de las fases de elución cromatográfica y utilizando agua ultrapura como disolvente en lugar de metanol. (Ver conclusiones)</p> <p>La estabilidad de la cefotaxima se soluciona preparando curvas nuevas para cada análisis. Se podría realizar un estudio de estabilidad en el tiempo para disoluciones más concentradas.</p>
------------------------	--

Aplicación a muestras de aguas superficiales

El método validado en este trabajo fue aplicado a 6 muestras (3 réplicas de cada una) de aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno, tomadas en tres puntos diferentes en dos muestreos, es decir, se realizaron 18 análisis en total. El mapa de la **Figura 9** muestra los puntos de muestreo en la zona.

En la **Figura 26** se presentan los valores de las concentraciones encontradas para cada antibiótico en cada fecha y punto de muestreo.

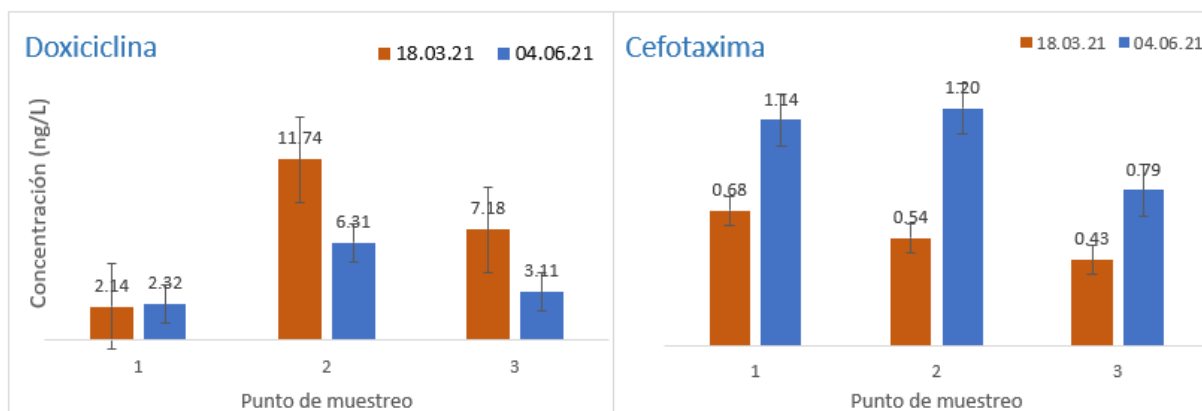


Figura 26. Concentraciones de los antibióticos encontrados en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno, por punto y fecha de muestreo. Las barras representan el error estándar de la media (n=3).

Este es el primer análisis de antibióticos realizado en este cuerpo de agua por lo que no se cuenta con datos previos. Sin embargo, las concentraciones de doxiciclina son menores a los

valores (mediana) reportados en estudios realizados en diferentes partes del país para aguas superficiales (74 ng L^{-1})⁶⁶ y plantas de tratamiento de agua residual ($3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$)¹²⁴. Sin embargo, no se había reportado previamente la presencia de cefotaxima, que como se observa en la **Figura 26**, está presente en todas las muestras de agua superficial de la microcuenca del río Durazno. Esto demuestra que este antibiótico está siendo aplicado ampliamente en el uso agropecuario y no solamente en el sector clínico humano, como era considerado.

En la **Figura 27**. Señal de cefotaxima de muestra M1P2R1.C3 sobrepuesta sobre la señal de un blanco. se observa la señal de cefotaxima de la tercera corrida de la réplica 1, de la muestra tomada en el segundo punto de muestreo en la primera fecha de muestreo (M1P2R1.C3) sobrepuesta sobre un blanco típico a manera de comparación entre intensidades de señales.

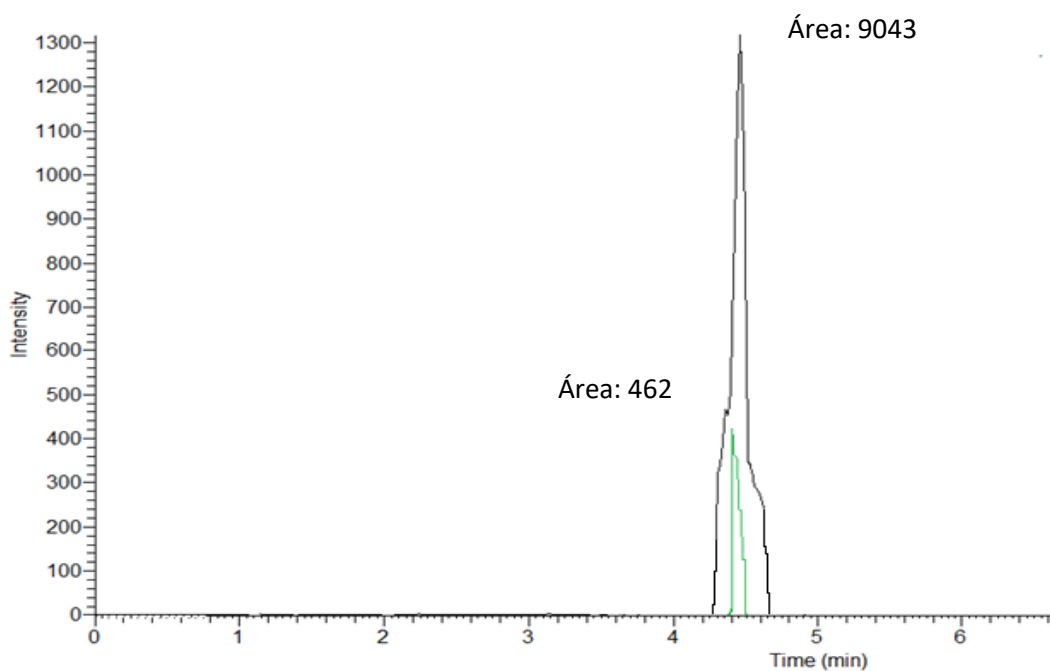


Figura 27. Señal de cefotaxima de muestra M1P2R1.C3 sobrepuesta sobre la señal de un blanco.

Al hacer un análisis de varianza mediante una prueba de Kruskal-Wallis para comparar los resultados obtenidos por antibióticos entre puntos y entre los muestreos, se observa que no existen diferencias significativas entre estos, esto se resume en la **Figura 28**. Por lo tanto, al comparar las concentraciones encontradas de estos antibióticos y los puntos de muestreo, se observa que en los muestreos estudiados el uso del suelo no tuvo un efecto significativo en la

acumulación de los antibióticos. La doxiciclina que es principalmente utilizada en el sector agropecuario no presenta una concentración significativamente mayor en los puntos de muestreo 2 y 3, que como se observa en el mapa de uso del suelo de la **Figura 11**, corresponden a zonas forestales y de pasto. A su vez la cefotaxima, que según la información disponible es utilizada principalmente en medicina humana, no se encontró significativamente mayor en concentración en el primer punto de muestro, que se trata de un uso de suelo principalmente urbano. (Ver análisis de varianza completo en Anexos II)

Variable	Código	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Concentración	CT.MI.P1	3	0.68	0.66	0.75	22.50	0.0206
Concentración	CT.MI.P2	3	0.54	0.74	0.21		
Concentración	CT.MI.P3	3	0.43	0.38	0.57		
Concentración	CT.MII.P1	3	1.14	0.56	1.16		
Concentración	CT.MII.P2	3	1.20	1.25	1.11		
Concentración	CT.MII.P3	3	0.79	0.37	0.70		
Concentración	DC.MI.P1	3	2.14	1.80	2.80		
Concentración	DC.MI.P2	3	3.63	1.26	3.63		
Concentración	DC.MI.P3	3	7.18	3.63	5.26		
Concentración	DC.MII.P1	3	2.32	2.50	2.00		
Concentración	DC.MII.P2	3	6.31	2.31	5.61		
Concentración	DC.MII.P3	3	3.11	1.89	2.73		

Trat.	Ranks
CT.MI.P3	7.83 A
CT.MI.P2	10.00 A B
CT.MI.P1	10.83 A B
CT.MII.P3	11.67 A B
CT.MII.P2	13.17 A B
CT.MII.P1	15.00 A B
DC.MII.P1	18.17 A B C
DC.MI.P1	19.00 A B C
DC.MII.P3	25.00 B C
DC.MI.P2	26.00 B C
DC.MII.P2	32.33 C
DC.MI.P3	33.00 C

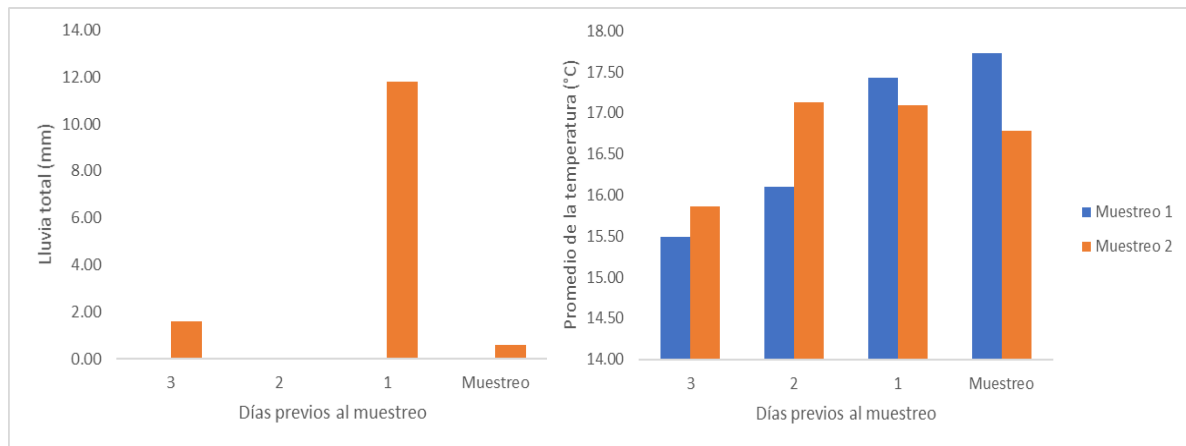
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Figura 28. Prueba Kruskal-Wallis para el análisis de varianza de los antibióticos analizados en las muestras del agua superficial de la microcuenca del río Durazno.

Es importante notar que de forma global la zona con mayor concentración de antibióticos es el punto 2, que a su vez es el punto más cercano a la toma de agua en la zona. Por lo tanto, aumentan las posibilidades de que se estén introduciendo antibióticos al sistema de tratamiento, los cuales se ha demostrado que no suelen ser muy eficientes para eliminarlos ^{61,124} y una degradación de estos podría generar metabolitos incluso más peligrosos ⁷¹.

Condiciones climáticas

La **Figura 29** muestran el comportamiento climático respecto a la precipitación total, temperatura y humedad relativa promedio de los días previos al muestreo. En esta se puede observar que el clima de la zona tiene una temperatura característica de entre 15.30-17.70 °C y únicamente hubo precipitaciones para la semana del segundo muestreo, esto es esperable ya que se llevó a cabo en el mes de Junio (época lluviosa), sin embargo, por lo observado en el análisis de varianza, esto no parece tener un efecto sobre los resultados de las concentraciones de antibióticos obtenidas.



A)

B)

Figura 29. Lluvia total (A) y temperatura (B) en las semanas de muestreo en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno en las dos fechas de muestreo (18.03 y 04.06.21, respectivamente)

Calidad del agua de la microcuenca del río Durazno

Caracterización de la calidad del agua de la microcuenca del río Durazno

Las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno se caracterizan por una temperatura de entre 10.8°C a 16.5°C. Los niveles de oxígeno disuelto se encontraron en un rango de (7.20 a 7.62) mg O₂ L⁻¹, que es suficiente para mantener y conservar la vida acuática de las especies más sensibles.⁸⁹ El pH varió entre 6.80 y 7.82, mientras que la alcalinidad entre (95.78 y 133.14)

mg CaCO₃ L⁻¹. La conductividad tuvo un valor mínimo de 207.1 μS/cm y uno máximo de 233.3. Asimismo, el DBO y el DQO variaron entre 0.50-8.00 y 10-30 mg L⁻¹, respectivamente. Todos estos parámetros están dentro del rango permitido según los diferentes reglamentos indicados en el **Cuadro III**, como se puede observar en la **Figura 30**, mostrando así un agua sin contaminación o con contaminación incipiente. Ninguno de estos parámetros analizados presentó una clara variación espacial y estas pequeñas variaciones en el cuerpo de agua se pueden atribuir a las diferencias de latitud, altitud, estación, el período del día, la circulación del aire, la cobertura de nubes, el flujo y la profundidad promedio de este.¹³⁵ a excepción del material en suspensión y la chl-*a*, sin embargo, estas variaciones pueden deberse a las precipitaciones que se dieron durante los días previos al de muestreo y durante el muestreo, donde por arrastre y escorrentía se puede aumentar la cantidad de sólidos presentes y biomasa fitoplanctónica, además, resuspender los nutrientes en el cuerpo de agua¹³⁶. Para el muestreo I se registraron precipitaciones de 0 mm, en cambio, para el Muestro II, los valores de precipitación oscilaron entre 0.00 y 11.80 mm. Los niveles de clorofila encontrados corresponden a valores entre (1.4 a 3.2) mg m⁻³ para el primer muestreo, mostrando así un comportamiento oligotrófico con una baja producción primaria¹³⁶, y uno mesotrófico con concentraciones (10.61-16.41) mg m⁻³ en el segundo, lo cual indica una calidad de agua buena y regular, respectivamente^{137,138}. Respecto a la cantidad de material en suspensión, para el primer muestreo el valor mínimo obtenido fue de 8.0 mg L⁻¹ y el máximo de 16.2 mg L⁻¹, mientras que para el segundo fueron de 41.6 y 49.7 mg L⁻¹. De esta forma, solamente en estos casos, se superó de forma considerable los valores máximos permitidos.

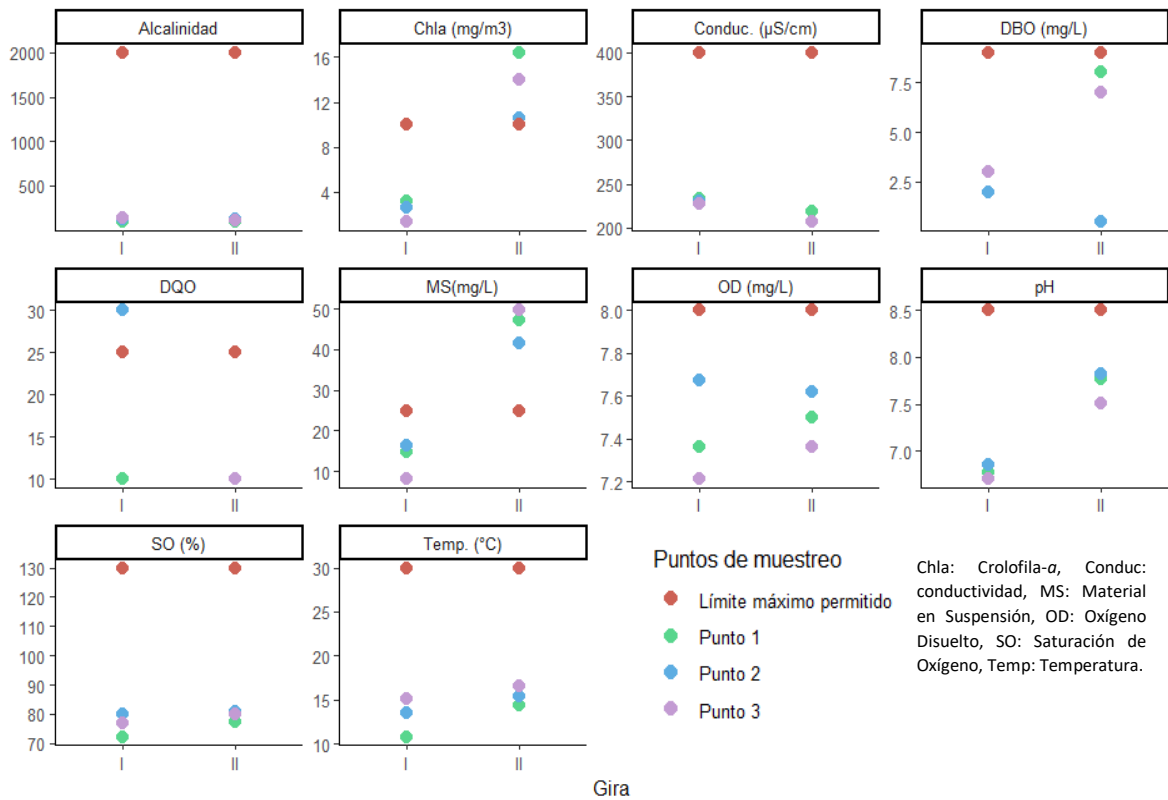


Figura 30. Parámetros fisicoquímicos evaluados en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno.

Nutrientes

La concentración máxima de fosfatos fue de $3.37 \mu\text{mol L}^{-1}$ y la mínima de $2.40 \mu\text{mol L}^{-1}$, para silicatos se obtuvo un máximo de $303.36 \mu\text{mol L}^{-1}$ y un mínimo $218.28 \mu\text{mol L}^{-1}$ y finalmente $0.36 \mu\text{mol L}^{-1}$ y $2.05 \mu\text{mol L}^{-1}$ para nitrito. Se observó una leve tendencia hacia el aumento de las concentraciones de los nutrientes río abajo, es decir, conforme se acerca a zonas de mayor densidad poblacional, esto posiblemente debido a que el crecimiento de la población, el desarrollo de la urbanización y la industrialización, conducen a un aumento de contaminación asociada a estas actividades, incluida la fertilización, la descarga de aguas residuales y la escorrentía urbana que son las principales las fuentes de ingreso de nutrientes a los cuerpos de agua, lo que interfiere con la capacidad de autorremediación de los ecosistemas acuáticos^{138,139}. En especial, la alta concentración de nitratos aguas abajo se puede atribuir al uso de grandes cantidades de fertilizantes nitrogenados¹⁴⁰. Estos comportamientos indican una calidad de agua buena y regular, respectivamente, según los

valores recomendados en el índice de estado trófico de Carlson¹³⁷. Los resultados se resumen en el **Cuadro XXII**.

Cuadro XXII. Concentraciones de nutrientes en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno

Parámetro (mg L ⁻¹)	Punto de muestreo						Valor máximo permisible (mg L ⁻¹)
	Muestreo I			Muestreo II			
	I	II	III	I	II	III	
Amonio	0.06	0.06	0.12	0.08	0.01	0.05	0.5*
Fosfatos	0.20	0.29	0.32	0.23	0.23	0.19	N.A
Nitratos	0.24	0.43	0.63	0.02	0.02	0.67	15
Silicatos	17.04	17.35	17.40	23.09	23.69	23.40	N.A
Nitritos	0.07	0.08	0.08	0.03	0.02	0.09	0.1*

Los valores máximos admisibles son los permitidos para agua clase 3 (máximo nivel de contaminación que puede ser tratado para el uso y consumo humano)

* Valor máximo admisible según reglamento de calidad de agua potable.

Índice holandés

Con base en los resultados de saturación de oxígeno, nitrógeno amoniacal y DBO y lo establecido en el **Cuadro XIII** y el **Cuadro XIV** de acuerdo con el RECCAS, se establece que la calidad fisicoquímica del agua de la microcuenca del río Durazno se clasifica como clase 2 en todos los puntos en ambos muestreos realizados, por lo que se consideraría adecuada, con un adecuado tratamiento, para el uso y consumo humano, esto se resume en el **Cuadro XXIII**.

Cuadro XXIII. Resultados del índice holandés en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno

Punto de muestreo- Muestreo	PSO (%)	DBO (mg L ⁻¹)	N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	Sumatorio de puntos	Clasificación
1-I	77.1	3.00	0.0053	4	2
2-I	79,8	2.00	0.0027	4	2
3-I	72.2	2.00	0.0026	4	2
1-II	80.1	7.00	0.0020	6	2
2-II	80.7	0.50	0.0003	4	2
3-II	77.5	8.00	0.0036	6	2

Análisis elemental

Todas las concentraciones de los elementos estudiados se encuentran por debajo de los límites máximos permitidos en algunos casos incluso para agua potable. En todos los puntos el calcio predominó sobre los otros elementos, esto posiblemente relacionado con el intercambio iónico y el tipo de roca en la cuenca ¹⁴⁰. Estas bajas concentraciones no se pueden atribuir a causas antropogénicas y se consideran como condiciones naturales. La **Figura 31** resume los resultados obtenidos.

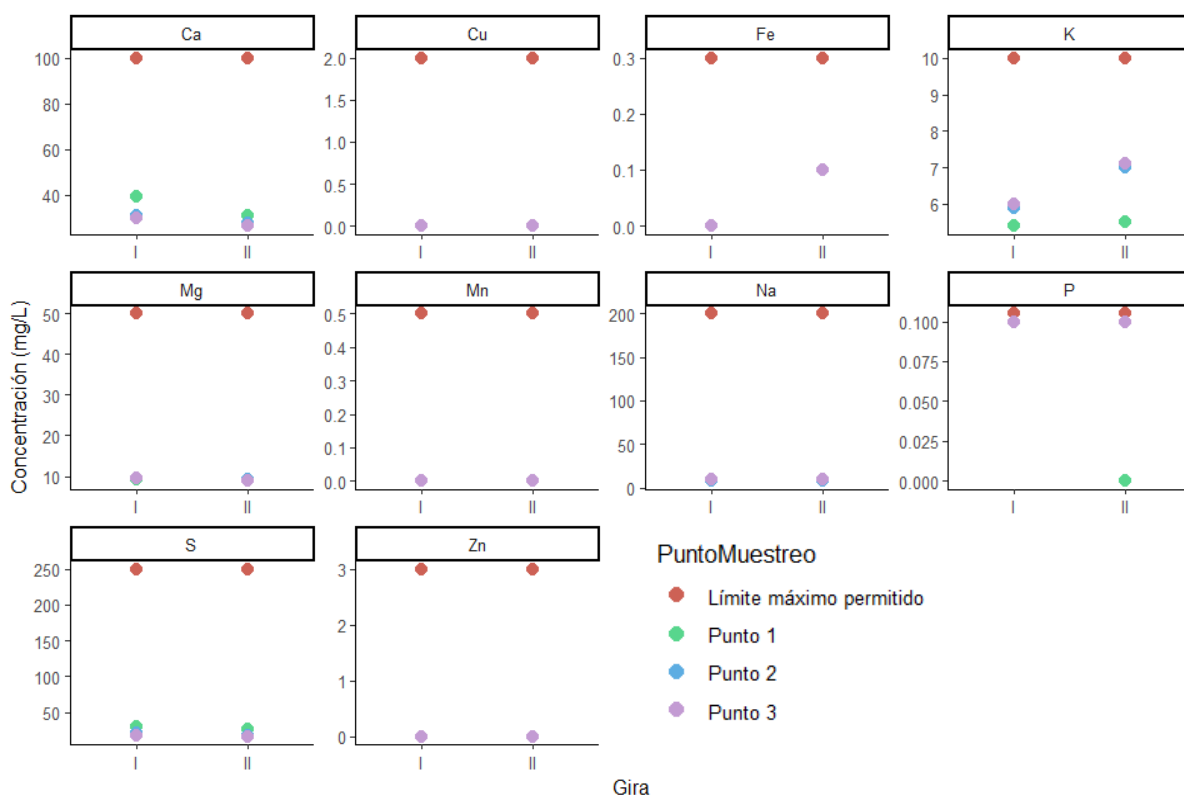


Figura 31. Concentraciones de elementos presentes en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno.

Análisis microbiológicos

Como se observa en la **Figura 32**, todos los análisis de CF superaron el valor máximo admisible para el agua clase 3. En el primer muestreo se obtuvo calidad clase 4 mientras que, en el segundo, fue clase 5. Esto es reforzado por los otros indicadores microbiológicos, que mostraron concentraciones similares en todos los puntos de muestreo. La detección de los microorganismos evaluados proporciona evidencia definitiva de contaminación fecal¹⁴¹. Esto está en concordancia con predominancia de actividades agropecuarias en la zona. Además, se reafirma la limitación del índice holandés para evaluar de forma adecuada la calidad del agua al no considerar el panorama completo de la contaminación presente en la matriz de estudio. Los resultados del análisis microbiológico demuestran que el agua de esta cuenca presenta contaminación muy severa y no es utilizable para consumo humano sin importar el tratamiento.

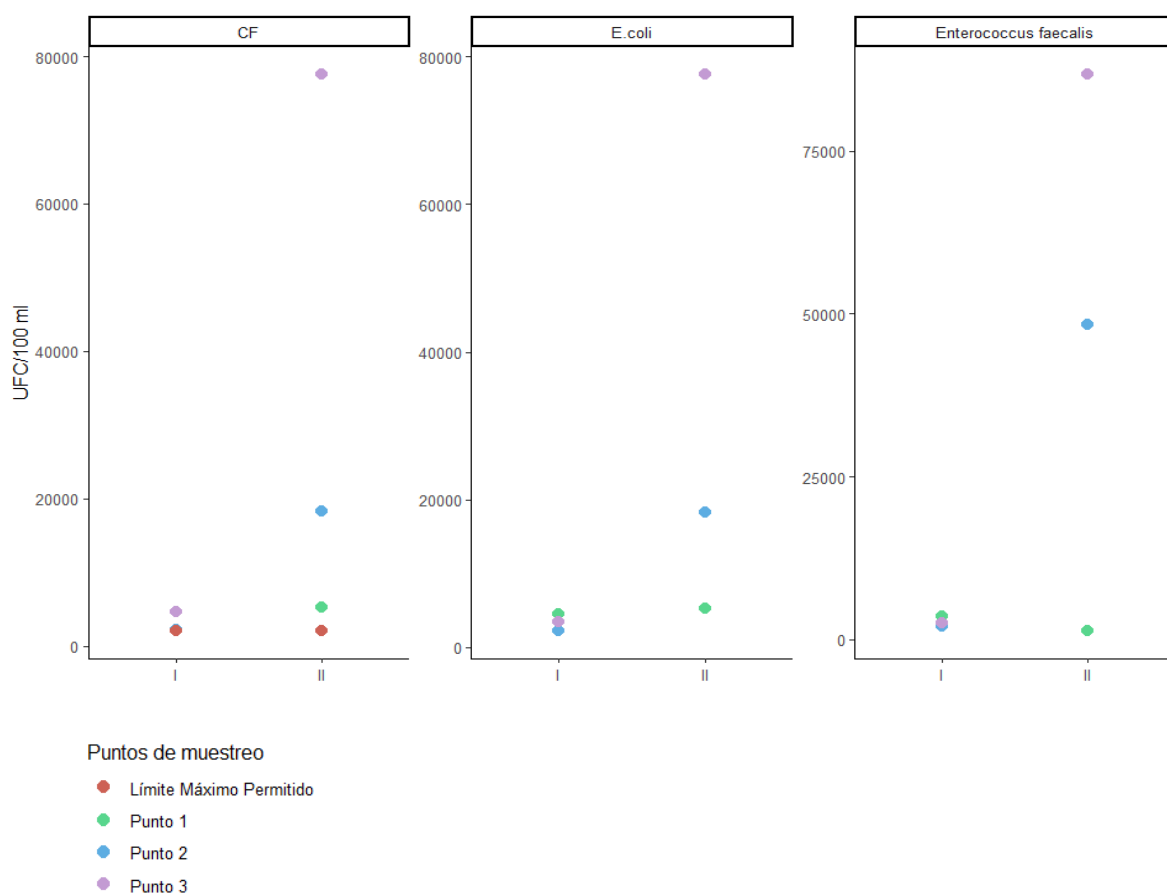


Figura 32. Parámetros microbiológicos analizados en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno.

Los parámetros fisicoquímicos y elementales mostraron niveles bajos de contaminación. Además, las concentraciones de clorofila-*a* y nutrientes indican un ambiente sin eutrofización. Asimismo, el índice holandés establece que las aguas de la microcuenca del río Durazno serían aguas clasificadas como Clase 2, con contaminación incipiente que puede ser utilizada, bajo un tratamiento convencional, en el abastecimiento de agua para uso y consumo humano, entre otras cosas, que es uno de los usos actuales. Sin embargo, a pesar de que los análisis químicos indican una adecuada calidad del agua, los parámetros microbiológicos demuestran que existe una contaminación muy importante en el río, lo que implica que esta agua no puede ser utilizada para consumo humano. Esto muestra que el panorama de contaminación queda incompleto si solamente se incluyen parámetros fisicoquímicos. Por lo que se reafirma la necesidad de mejorar el índice para la evaluación y clasificación de la calidad de agua superficiales, integrando parámetros que aporten información microbiológica. Además, este trabajo demuestra que existen descargas importantes y constantes de antibióticos, que hace sospechar que pueden existir también otros contaminantes emergentes, que no serán eliminados por el tratamiento convencional de las aguas y que además pueden generar una presión selectiva sobre las comunidades bacterianas, por lo tanto, un aumento en la resistencia hacia los mismos, poniendo en riesgo así la salud humana y ambiental.

Capítulo V

Conclusiones

La librería de iones obtenida en este trabajo está en concordancia con lo reportado en estudios previos, por lo que los fragmentos utilizados para la cuantificación de los analitos son adecuados.

Los resultados de la validación demuestran que el método utilizado es adecuado para la cuantificación de doxiciclina y cefotaxima a concentraciones de ng L^{-1} , lo cual reafirma la sensibilidad y la selectividad de este. Además, el tiempo de los análisis cromatográficos total es de 10 minutos, por lo tanto, el método validado muestra ser simple, eficaz, rápido y confiable, y puede ser aplicado en análisis de rutina.

Se hace evidente la necesidad de incorporar parámetros biológicos y microbiológicos en la evaluación de la calidad de las aguas superficiales ya que los resultados de los análisis de parámetros fisicoquímicos, de eutrofización y elementales están dentro de lo establecido como adecuado, por lo tanto, bajo estos criterios la contaminación en la microcuenca se cataloga como baja. A pesar de esto en todas las muestras analizadas de la microcuenca del río Durazno se observó una importante contaminación microbiológica que caracteriza el agua como no utilizable para usos humanos, además, se logró cuantificar tanto cefotaxima como doxiciclina, en un rango de $(0.43-1.20) \text{ ng L}^{-1}$ y $(2.14-11.74) \text{ ng L}^{-1}$, respectivamente, por lo tanto, es notorio que las actividades antropogénicas de la zona generan descargas constantes de antibióticos a este cuerpo de agua. Además, se observó que no existe una diferencia significativa entre las concentraciones de los tres puntos de muestreos.

Este tipo de información generada ayuda al monitoreo de la presencia de antibióticos en el ambiente que lleva a la presión selectiva y desarrollo de la resistencia hacia los mismos por parte de las bacterias, convergiendo en problemas para la salud humana, animal y para el medio ambiente.

Estos resultados permiten tener una línea base de los antibióticos en estudio, además, demuestran el impacto de las actividades de uso de suelo de la zona, en donde es evidente el uso de cefotaxima y doxiciclina tanto en actividades agrícolas como en humanos.

Finalmente, este es uno de los primeros estudios cuantitativos de antibióticos que se realiza en el país y es la primera vez que se reporta cefotaxima en un cuerpo de agua.

Para posibles trabajos futuros se recomienda ampliar la cantidad y clases de antibióticos, muestras analizadas y épocas de muestreo y analizar el agua superficial de otras zonas de la GAM y del país. Además, por sugerencia de Luana Floriano, Máster en Química Analítica de la Universidad Federal de Santa María de Brasil (UFSM) y estudiante de Doctorado en la misma, se realizaron diferentes pruebas que en un principio mejoran los resultados:

Al utilizar agua ultrapura como disolvente se mejora:

- a) La linealidad de las curvas de calibración de los 4 antibióticos en estudio
- b) La forma del pico de la señal analítica, por lo tanto, la repetibilidad de las integraciones
- c) Para OC se puede ampliar el rango de trabajo hacia menores concentraciones $\approx 10 \mu\text{g/L}$ o incluso menos.

Si bien el cambio de disolvente parece ser una buena opción, estos resultados fueron producto de un único análisis, por lo que es importante realizar más pruebas para obtener más información al respecto.

Residuos generados

Los residuos líquidos generados en este trabajo fueron debidamente almacenados en botellas de vidrio en el CIGRAS y luego, tratados por el Laboratorio de Tratamiento de Residuos de la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica.

No se generaron residuos sólidos.

Referencias bibliográficas

- (1) Kümmerer, K. Antibiotics in the Aquatic Environment – A Review – Part I. *Chemosphere* **2009**, 75 (4), 417–434. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>.
- (2) Mirzaei, R.; Yunesian, M.; Nasseri, S.; Gholami, M.; Jalilzadeh, E.; Shoeibi, S.; Bidshahi, H. S.; Mesdaghinia, A. An Optimized SPE-LC-MS/MS Method for Antibiotics Residue Analysis in Ground, Surface and Treated Water Samples by Response Surface Methodology- Central Composite Design. *J Environ Health Sci Engineer* **2017**, 15 (1), 21. <https://doi.org/10.1186/s40201-017-0282-2>.
- (3) Archer, L.; Albrecht, U.; Roberts, P. Antibiotics in Crop Production. *EDIS* **2020**, 2020 (3). <https://doi.org/10.32473/edis-hs1366-2020>.
- (4) Ben, Y.; Fu, C.; Hu, M.; Liu, L.; Wong, M. H.; Zheng, C. Human Health Risk Assessment of Antibiotic Resistance Associated with Antibiotic Residues in the Environment: A Review. *Environmental Research* **2019**, 169, 483–493. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.040>.
- (5) Mehdi, Y.; Létourneau-Montminy, M.-P.; Gaucher, M.-L.; Chorfi, Y.; Suresh, G.; Rouissi, T.; Brar, S. K.; Côté, C.; Ramirez, A. A.; Godbout, S. Use of Antibiotics in Broiler Production: Global Impacts and Alternatives. *Animal Nutrition* **2018**, 4 (2), 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.002>.
- (6) Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019*; Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), 2019. <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>.
- (7) Zaman, S. B.; Hussain, M. A.; Nye, R.; Mehta, V.; Mamun, K. T.; Hossain, N. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells Are Ringing. *Cureus* **2017**. <https://doi.org/10.7759/cureus.1403>.
- (8) Tzoc, E; Valiente, C; Arias, L. Efecto de Las Aguas Residuales Hospitalarias Sobre Los Patrones de Resistencia a Antibióticos de Escherichia Coli y Aeromonas Sp. *Rev Biomed* **2004**, 15 (3), 165–172.
- (9) Alós, J.-I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 8.
- (10) Fernández, J. M. C.; García, E. C.; Madriz, J. P. D.; Blanco, M. M.; Brown, Y. V. Revisión del uso de antibióticos de amplio espectro en el ambiente hospitalario privado en Costa Rica. *AMC* **2020**, 56 (4). <https://doi.org/10.51481/amc.v56i4.854>.
- (11) Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis, Part 1: Causes and Threats. *P&T* **2015**, 40 (4), 7.
- (12) Granados-Chinchilla, F.; Rodríguez, C. Tetracyclines in Food and Feedingstuffs: From Regulation to Analytical Methods, Bacterial Resistance, and Environmental and Health Implications. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* **2017**, 2017, 1–24. <https://doi.org/10.1155/2017/1315497>.
- (13) Wang, G.; Zhou, S.; Han, X.; Zhang, L.; Ding, S.; Li, Y.; Zhang, D.; Zarin, K. Occurrence, Distribution, and Source Track of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in the Main Rivers of Chongqing City, Southwest China. *Journal of Hazardous Materials* **2020**, 389, 122110. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122110>.
- (14) Yao, L.; Wang, Y.; Tong, L.; Deng, Y.; Li, Y.; Gan, Y.; Guo, W.; Dong, C.; Duan, Y.; Zhao, K. Occurrence and Risk Assessment of Antibiotics in Surface Water and Groundwater from Different Depths of Aquifers: A Case Study at Jiangnan Plain, Central China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2017**, 135, 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.006>.
- (15) Sarmah, A. K.; Meyer, M. T.; Boxall, A. B. A. A Global Perspective on the Use, Sales, Exposure Pathways, Occurrence, Fate and Effects of Veterinary Antibiotics (VAs) in the Environment. *Chemosphere* **2006**, 65 (5), 725–759. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.026>.
- (16) Alonso, L. L. Estudio de la distribución ambiental de fármacos de origen pecuario y evaluación de alternativas de mitigación en aguas contaminadas. Doctor en Ciencias Exactas, área Química, Universidad Nacional de La Plata, 2020. <https://doi.org/10.35537/10915/95918>.
- (17) Dasenaki, M. E.; Thomaidis, N. S. Multi-Residue Determination of Seventeen Sulfonamides and Five Tetracyclines in Fish Tissue Using a Multi-Stage LC–ESI–MS/MS Approach Based on Advanced

- Mass Spectrometric Techniques. *Analytica Chimica Acta* **2010**, 672 (1–2), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.04.034>.
- (18) Díaz-Cruz, M. S.; Barceló, D. Determination of Antimicrobial Residues and Metabolites in the Aquatic Environment by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2006**, 386 (4), 973–985. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0444-z>.
- (19) Organización Mundial de la Salud, Enfermedades no Transmisibles y Salud Mental. Lista OMS de Antimicrobianos de Importancia Crítica Para La Medicina Humana, 2017.
- (20) Maffioli, S. I. A Chemist's Survey of Different Antibiotic Classes. In *Antibiotics*; Gualerzi, C. O., Brandi, L., Fabbretti, A., Pon, C. L., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2013; pp 1–22. <https://doi.org/10.1002/9783527659685.ch1>.
- (21) Škrášková, K.; Santos, L. H. M. L. M.; Šatínský, D.; Pena, A.; Montenegro, M. C. B. S. M.; Solich, P.; Nováková, L. Fast and Sensitive UHPLC Methods with Fluorescence and Tandem Mass Spectrometry Detection for the Determination of Tetracycline Antibiotics in Surface Waters. *Journal of Chromatography B* **2013**, 927, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.12.032>.
- (22) Daghri, R.; Drogui, P. Tetracycline Antibiotics in the Environment: A Review. *Environ Chem Lett* **2013**, 11 (3), 209–227. <https://doi.org/10.1007/s10311-013-0404-8>.
- (23) Wang, K.; Lin, K.; Huang, X.; Chen, M. A Simple and Fast Extraction Method for the Determination of Multiclass Antibiotics in Eggs Using LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, 65 (24), 5064–5073. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01777>.
- (24) Ghorbani, B.; Ghorbani, M.; Abedi, M.; Tayebi, M. Effect of Antibiotics Overuse in Animal Food and Its Link with Public Health Risk. 6.
- (25) Conzuelo, F. Bioplataformas electroquímicas para la detección de antibióticos en leche. Tesis Doctoral, Universidad Computense de Madrid, Madrid, 2014.
- (26) Pena, A.; Pelantova, N.; Lino, C. M.; Silveira, M. I. N.; Solich, P. Validation of an Analytical Methodology for Determination of Oxytetracycline and Tetracycline Residues in Honey by HPLC with Fluorescence Detection. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53 (10), 3784–3788. <https://doi.org/10.1021/jf050065r>.
- (27) Vivekanandan, K.; Venkatesh, N.; E Bhavya. Role of Doxycycline in COVID-19 a Review. *Annals of R.S.C.B.* **2021**, 25 (5), 3686–3688.
- (28) Flores, G. Validación de un método por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para cuantificar Cefotaxima en orina humana. Lic, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, 2014.
- (29) Kim, M.-H.; Lee, J.-M. Diagnosis and Management of Immediate Hypersensitivity Reactions to Cephalosporins. *Allergy Asthma Immunol Res* **2014**, 6 (6), 485. <https://doi.org/10.4168/aaair.2014.6.6.485>.
- (30) Adegoke, A. A.; Madu, C. E.; Aiyegoro, O. A.; Stenström, T. A.; Okoh, A. I. Antibigram and Beta-Lactamase Genes among Cefotaxime Resistant E. Coli from Wastewater Treatment Plant. *Antimicrob Resist Infect Control* **2020**, 9 (1), 46. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-0702-4>.
- (31) Van den Meersche, T.; Pamel, E. V.; Poucke, C. V.; Herman, L.; Heyndrickx, M.; Rasschaert, G.; Daeseleire, E. Development, Validation and Application of an Ultra High Performance Liquid Chromatographic-Tandem Mass Spectrometric Method for the Simultaneous Detection and Quantification of Five Different Classes of Veterinary Antibiotics in Swine Manure. *Journal of Chromatography A* **2016**, 1429, 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.046>.
- (32) Oliveira, L. G.; Ferreira, L. G. R.; Nascimento, A. M. A.; Reis, M. de P.; Dias, M. F.; Lima, W. G.; Paiva, M. C. Antibiotic Resistance Profile and Occurrence of AmpC between *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from a Domestic Full-Scale WWTP in Southeast Brazil. *Water Science and Technology* **2018**, 2017 (1), 108–114. <https://doi.org/10.2166/wst.2018.091>.
- (33) Dou, M.; Wang, J.; Gao, B.; Xu, C.; Yang, F. Photocatalytic Difference of Amoxicillin and Cefotaxime under Visible Light by Mesoporous G-C3N4: Mechanism, Degradation Pathway and DFT

- Calculation. *Chemical Engineering Journal* **2020**, *383*, 123134. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123134>.
- (34) WHO | WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption. WHO. http://www.who.int/medicines/areas/rational_use/oms-amr-amc-report-2016-2018/en/ (accessed 2020-10-05).
- (35) Martin, M. J.; Thottathil, S. E.; Newman, T. B. Antibiotics Overuse in Animal Agriculture: A Call to Action for Health Care Providers. *Am J Public Health* **2015**, *105* (12), 2409–2410. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2015.302870>.
- (36) Mehdi, Y.; Létourneau-Montminy, M.-P.; Gaucher, M.-L.; Chorfi, Y.; Suresh, G.; Rouissi, T.; Brar, S. K.; Côté, C.; Ramirez, A. A.; Godbout, S. Use of Antibiotics in Broiler Production: Global Impacts and Alternatives. *Animal Nutrition* **2018**, *4* (2), 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.002>.
- (37) Hao, H.; Cheng, G.; Iqbal, Z.; Ai, X.; Hussain, H. I.; Huang, L.; Dai, M.; Wang, Y.; Liu, Z.; Yuan, Z. Benefits and Risks of Antimicrobial Use in Food-Producing Animals. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00288>.
- (38) Gobierno de Costa Rica. Plan Nacioanal de Lucha Contra La Resistencia a Los Antimicrobianos Costa Rica 2018-2015.2018. <https://Www.Ministeriodesalud.Go.Cr/Index.Php/Vigilancia-de-La-Salud/Normas-Protocolos-y-Guias/Resistencia-Microbiana/3811-Plan-de-Accion-Nacional-de-Lucha-Contra-La-Resistencia-a-Los-Antimicrobianos-Costa-Rica-2018-2025/File> (Accesed Aug 13, 2020).
- (39) Wang, G.; Zhou, S.; Han, X.; Zhang, L.; Ding, S.; Li, Y.; Zhang, D.; Zarin, K. Occurrence, Distribution, and Source Track of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in the Main Rivers of Chongqing City, Southwest China. *Journal of Hazardous Materials* **2020**, *389*, 122110. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122110>.
- (40) World Health Organization. Report on Surveillance of Antibiotic Consumption http://www.who.int/medicines/areas/rational_use/oms-amr-amc-report-2016-2018/en/ (accessed 2020 -10 -05)
- (41) Smalla, K.; Cook, K.; Djordjevic, S. P.; Klümper, U.; Gillings, M. Environmental Dimensions of Antibiotic Resistance: Assessment of Basic Science Gaps. *FEMS Microbiology Ecology* **2018**, *94* (12). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy195>.
- (42) Rojas, G. C.; Ulate, L. A. Resistencia Antimicrobiana: Microorganismos más Resistentes y Antibióticos con Menor Actividad. *REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA* **2016**, No. 621, 757–763.
- (43) Smalla, K.; Cook, K.; Djordjevic, S. P.; Klümper, U.; Gillings, M. Environmental Dimensions of Antibiotic Resistance: Assessment of Basic Science Gaps. *FEMS Microbiology Ecology* **2018**, *94* (12). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy195>.
- (44) Klein, E. Y.; Van Boeckel, T. P.; Martinez, E. M.; Pant, S.; Gandra, S.; Levin, S. A.; Goossens, H.; Laxminarayan, R. Global Increase and Geographic Convergence in Antibiotic Consumption between 2000 and 2015. *Proc Natl Acad Sci USA* **2018**, *115* (15), E3463–E3470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115>.
- (45) Manaia, C. M.; Macedo, G.; Fatta-Kassinos, D.; Nunes, O. C. Antibiotic Resistance in Urban Aquatic Environments: Can It Be Controlled? *Appl Microbiol Biotechnol* **2016**, *100* (4), 1543–1557. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7202-0>.
- (46) Lafossas, C.; Benoit-Marquié, F.; Garrigues, J. C. Analysis of the Retention of Tetracyclines on Reversed-Phase Columns: Chemometrics, Design of Experiments and Quantitative Structure-Property Relationship (QSPR) Study for Interpretation and Optimization. *Talanta* **2019**, *198*, 550–559. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.051>.
- (47) Kümmerer, K. Antibiotics in the Aquatic Environment – A Review – Part I. *Chemosphere* **2009**, *75* (4), 417–434. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>.

- (48) Anthony A, A.; Adekunle C, F.; Thor A, S. Residual Antibiotics, Antibiotic Resistant Superbugs and Antibiotic Resistance Genes in Surface Water Catchments: Public Health Impact. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* **2018**, *105*, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2018.03.004>.
- (49) Zhang, Z.; Li, X.; Ding, S.; Jiang, H.; Shen, J.; Xia, X. Multiresidue Analysis of Sulfonamides, Quinolones, and Tetracyclines in Animal Tissues by Ultra-High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Food Chemistry* **2016**, *204*, 252–262. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.142>.
- (50) Davies, J. Microbes Have the Last Word: A Drastic Re-evaluation of Antimicrobial Treatment Is Needed to Overcome the Threat of Antibiotic-resistant Bacteria. *EMBO Rep* **2007**, *8* (7), 616–621. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401022>.
- (51) Larsson, D. G. J. Antibiotics in the Environment. *Upsala Journal of Medical Sciences* **2014**, *119* (2), 108–112. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.896438>.
- (52) Anthony A, A.; Adekunle C, F.; Thor A, S. Residual Antibiotics, Antibiotic Resistant Superbugs and Antibiotic Resistance Genes in Surface Water Catchments: Public Health Impact. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* **2018**, *105*, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2018.03.004>.
- (53) Ghernaout, D.; Elboughdiri, N. Antibiotics Resistance in Water Mediums: Background, Facts, and Trends. 7.
- (54) Lambirth, K.; Tsilimigras, M.; Lulla, A.; Johnson, J.; Al-Shaer, A.; Wynblatt, O.; Sypolt, S.; Brouwer, C.; Clinton, S.; Keen, O.; Redmond, M.; Fodor, A.; Gibas, C. Microbial Community Composition and Antibiotic Resistance Genes within a North Carolina Urban Water System. *Water* **2018**, *10* (11), 1539. <https://doi.org/10.3390/w10111539>.
- (55) Fernandes, M. J.; Paíga, P.; Silva, A.; Llaguno, C. P.; Carvalho, M.; Vázquez, F. M.; Delerue-Matos, C. Antibiotics and Antidepressants Occurrence in Surface Waters and Sediments Collected in the North of Portugal. *Chemosphere* **2020**, *239*, 124729. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124729>.
- (56) Mahmood, A. R.; Al-Haideri, H. H.; Hassan, F. M. Detection of Antibiotics in Drinking Water Treatment Plants in Baghdad City, Iraq. *Advances in Public Health* **2019**, *2019*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/7851354>.
- (57) Kuhne, M.; Ihnen, D.; Moller, G.; Agthe, O. Stability of Tetracycline in Water and Liquid Manure. *J Vet Med Series A* **2000**, *47* (6), 379–384. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2000.00300.x>.
- (58) Ramírez-Morales, D.; Masís-Mora, M.; Beita-Sandí, W.; Montiel-Mora, J. R.; Fernández-Fernández, E.; Méndez-Rivera, M.; Arias-Mora, V.; Leiva-Salas, A.; Brenes-Alfaro, L.; Rodríguez-Rodríguez, C. E. Pharmaceuticals in Farms and Surrounding Surface Water Bodies: Hazard and Ecotoxicity in a Swine Production Area in Costa Rica. *Chemosphere* **2021**, *272*, 129574. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129574>.
- (59) Liang, Y.; Liu, J.; Zhong, Q.; Yu, D.; Yao, J.; Huang, T.; Zhu, M.; Zhou, T. A Fully Automatic Cross Used Solid-Phase Extraction Online Coupled with Ultra-High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry System for the Trace Analysis of Multi-Class Pharmaceuticals in Water Samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2019**, *174*, 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.06.004>.
- (60) Cárdenas, O. G. G.; Ibarra, L. F. N.; Lara, P. D. L.; Guadalupe, O. Perfiles de resistencia a antibióticos y metales pesados en *Pseudomonas aeruginosa* potencialmente patógenas aisladas de agua de uso agrícola Antibiotic and heavy metal resistance profiles in potentially pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* isolated from agricultural water usage. . *ISSN* **2007**, *9*, 16.
- (61) Rodríguez-Mozaz, S.; Chamorro, S.; Marti, E.; Huerta, B.; Gros, M.; Sánchez-Melsió, A.; Borrego, C. M.; Barceló, D.; Balcázar, J. L. Occurrence of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Hospital and Urban Wastewaters and Their Impact on the Receiving River. *Water Research* **2015**, *69*, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>.

- (62) Paíga, P.; Correia, M.; Fernandes, M. J.; Silva, A.; Carvalho, M.; Vieira, J.; Jorge, S.; Silva, J. G.; Freire, C.; Delerue-Matos, C. Assessment of 83 Pharmaceuticals in WWTP Influent and Effluent Samples by UHPLC-MS/MS: Hourly Variation. *Science of The Total Environment* **2019**, *648*, 582–600. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.129>.
- (63) Böger, B.; Surek, M.; Vilhena, R. de O.; Fachi, M. M.; Junkert, A. M.; Santos, J. M.; Domingos, E. L.; Cobre, A. de F.; Momade, D. R.; Pontarolo, R. Occurrence of Antibiotics and Antibiotic Resistant Bacteria in Subtropical Urban Rivers in Brazil. *Journal of Hazardous Materials* **2021**, *402*, 123448. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123448>.
- (64) Gros, M.; Rodríguez-Mozaz, S.; Barceló, D. 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* **2013**, *1292*, 173–188. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.072>.
- (65) Bengtsson-Palme, J.; Larsson, D. G. J. Concentrations of Antibiotics Predicted to Select for Resistant Bacteria: Proposed Limits for Environmental Regulation. *Environment International* **2016**, *86*, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.015>.
- (66) Spongberg, A. L.; Witter, J. D.; Acuña, J.; Vargas, J.; Murillo, M.; Umaña, G.; Gómez, E.; Perez, G. Reconnaissance of Selected PPCP Compounds in Costa Rican Surface Waters. *Water Research* **2011**, *45* (20), 6709–6717. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.004>.
- (67) Leandro, H.; Coto, J. M.; Salgado, V. Calidad del Agua de los Ríos de la Microcuenca IV del Río Virilla. *UNICIENCIA* **2010**, *24*, 69-74.
- (68) Hazard Prioritization and Risk Characterization of Antibiotics in an Irrigated Costa Rican Region Used for Intensive Crop, Livestock and Aquaculture Farming. *JEB* **2013**, *35*, 84-98. ISSN: 0254-8704
- (69) Gutiérrez, K.; Alfaro, M.; Granados, F.; Sánchez, J.; García, F.; Rodríguez, C. Detección de Tetraciclinas en Nueve Lotes de Alimentos para Cerdos, Tilapias y Pollos Producidos en Costa Rica: Incumplimiento de Normativas y Disconformidades con el Etiquetado Oficial de Garantía. *Agronomía Costarricense* **2010**, *34* (2), 145-151. ISSN:0377-9424 / 2010.
- (70) Rodríguez, C.; Lang, L.; Wang, A.; Altendorf, K.; García, F.; Lipski, A. Lettuce for Human Consumption Collected in Costa Rica Contains Complex Communities of Culturable Oxytetracycline- and Gentamicin-Resistant Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72* (9), 5870–5876. <https://doi.org/10.1128/AEM.00963-06>.
- (71) Fonseca, E.; Hernández, F.; Ibáñez, M.; Rico, A.; Pitarch, E.; Bijlsma, L. Occurrence and Ecological Risks of Pharmaceuticals in a Mediterranean River in Eastern Spain. *Environment International* **2020**, *144*, 106004. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106004>.
- (72) Acevedo, R.; Severiche, C.; Jaimes, J. Bacterias Resistentes a Antibióticos en Ecosistemas Acuáticos. *P+L* **2015**, *10* (2), 160-172.
- (73) Centro Nacional de Referencia de Bacteriología. Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud. *Informe de Vigilancia Basada en Laboratorio: Bacterias Causantes de Infecciones Comunitarias de Importancia en Salud Pública y su Resistencia a los Antimicrobianos*. INCIENCIA, 2011. <http://www.inciensa.sa.cr>
- (74) Barrantes, K.; Chacón, L. M.; Morales, E.; Ramírez-Carvajal, L. Draft Genome Sequence of an Escherichia Coli Strain Harboring BlaCTX-M-115, BlaCMY-2, Aminoglycoside, Tetracycline, and Sulfonamide Resistance Genes, Isolated from a Costa Rican Wastewater Treatment Plant. *Microbiol Resour Announc* **2020**, *9* (1), MRA.01015-19, e01015-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.01015-19>.
- (75) Morales, E. Análisis Cuantitativo de Riesgo Microbiológico Por Cryptosporidium Spp. y Giardia Spp. En Un Sistema de Abastecimiento de Agua Para Consumo Humano Del Gran Área Metropolitana de Costa Rica En El Periodo 2017-2018. Licenciatura, Universidad de Costa Rica, San José, 2018.
- (76) Morales, E. Mapa de Distribución de Altitud de La Microcuenca Del Río Durazno, 2018.
- (77) Morales, E. Mapa de Distribución Índice de Vegetación de La Microcuenca Del Río Durazno, 2018.

- (78) Morales, E. Mapa de Uso de Suelo de La Microcuenca Del Río Durazno, 2018.
- (79) Wang, Z.; Han, M.; Li, E.; Liu, X.; Wei, H.; Yang, C.; Lu, S.; Ning, K. Distribution of Antibiotic Resistance Genes in an Agriculturally Disturbed Lake in China: Their Links with Microbial Communities, Antibiotics, and Water Quality. *Journal of Hazardous Materials* **2020**, *393*, 122426. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122426>.
- (80) He, L.-Y.; Ying, G.-G.; Liu, Y.-S.; Su, H.-C.; Chen, J.; Liu, S.-S.; Zhao, J.-L. Discharge of Swine Wastes Risks Water Quality and Food Safety: Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes from Swine Sources to the Receiving Environments. *Environment International* **2016**, *92–93*, 210–219. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.023>.
- (81) Baird, R.; Eaton, A.; Rice, E. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.*, 23rd ed.
- (82) Parsons, T. R.; Harrison, P. J.; Acreman, J. C.; Dovey, H. M.; Thompson, P. A.; Lalli, C. M.; Lee, K.; Guanguo, L.; Xiaolin, C. An Experimental Marine Ecosystem Response to Crude Oil and Corexit 9527: Part 2—Biological Effects. *Marine Environmental Research* **1984**, *13* (4), 265–275. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(84\)90033-3](https://doi.org/10.1016/0141-1136(84)90033-3).
- (83) Ministerio de Salud. DE-38924-S: Reglamento Para La Calidad Del Agua Potable, 2015.
- (84) MINAE. Reglamento Para La Evaluación y Clasificación de La Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales., 2007.
- (85) United Nations Environment Programme. Global Drinking Water Quality Index: Development and Sensitivity Analysis. **2007**, 60.
- (86) Chacón, L.; Arias, V.; Barrantes, K.; Beita-Sandí, W.; Reyes, L.; Achí, R. Enterococci as a Key Parameter for Water Quality Index: Purires River, Costa Rica. *Journal of Water and Health* **2018**, *16* (6), 1007–1017. <https://doi.org/10.2166/wh.2018.087>.
- (87) Simões, F. dos S.; Moreira, A. B.; Bisinoti, M. C.; Gimenez, S. M. N.; Yabe, M. J. S. Water Quality Index as a Simple Indicator of Aquaculture Effects on Aquatic Bodies. *Ecological Indicators* **2008**, *8* (5), 476–484. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.05.002>.
- (88) Acuña-Alonso, C.; Álvarez, X.; Lorenzo, O.; Cancela, Á.; Valero, E.; Sánchez, Á. Assessment of Water Quality in Eutrophized Water Bodies through the Application of Indexes and Toxicity. *Science of The Total Environment* **2020**, *728*, 138775. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138775>.
- (89) Beita-Sandí, W.; Barahona-Palomo, M. Físico-química de las aguas superficiales de la Cuenca del río Rincón, Península de Osa, Costa Rica. *URJ* **2010**, *2* (2), 157–179. <https://doi.org/10.22458/urj.v2i2.156>.
- (90) SECRETARÍA DE ECONOMÍA DGN. ANÁLISIS DE AGUAS - DETERMINACIÓN DE FÓSFORO TOTAL EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA, 2001.
- (91) Faleye, A. C.; Adegoke, A. A.; Ramluckan, K.; Bux, F.; Stenström, T. A. Identification of Antibiotics in Wastewater: Current State of Extraction Protocol and Future Perspectives. *Journal of Water and Health* **2017**, *15* (6), 982–1003. <https://doi.org/10.2166/wh.2017.097>.
- (92) Antunes de Oliveira, J. Júlia Antunes de Oliveira. Tesis de Maestría, Universidad Federal de Santa María, Santa María, RS, 2019.
- (93) Seifrtová, M.; Nováková, L.; Lino, C.; Pena, A.; Solich, P. An Overview of Analytical Methodologies for the Determination of Antibiotics in Environmental Waters. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *649* (2), 158–179. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.07.031>.
- (94) Peng, J.; Liu, D.; Shi, T.; Tian, H.; Hui, X.; He, H. Molecularly Imprinted Polymers Based Stir Bar Sorptive Extraction for Determination of Cefaclor and Cefalexin in Environmental Water. *Anal Bioanal Chem* **2017**, *409* (17), 4157–4166. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0365-z>.
- (95) Caban, M.; Lis, E.; Kumirska, J.; Stepnowski, P. Determination of Pharmaceutical Residues in Drinking Water in Poland Using a New SPE-GC-MS(SIM) Method Based on Speedisk Extraction Disks and DIMETRIS Derivatization. *Science of The Total Environment* **2015**, *538*, 402–411. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.076>.

- (96) Zhang, C.; Deng, Y.; Zheng, J.; Zhang, Y.; Yang, L.; Liao, C.; Su, L.; Zhou, Y.; Gong, D.; Chen, L.; Luo, A. The Application of the QuEChERS Methodology in the Determination of Antibiotics in Food: A Review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *118*, 517–537. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.012>.
- (97) Hu, X.; Luo, Y.; Zhou, Q. Simultaneous Analysis of Selected Typical Antibiotics in Manure by Microwave-Assisted Extraction and LC–MS n. *Chroma* **2010**, *71* (3–4), 217–223. <https://doi.org/10.1365/s10337-009-1438-8>.
- (98) Khatibi, S. A.; Hamidi, S.; Siahi-Shadbad, M. R. Application of Liquid-Liquid Extraction for the Determination of Antibiotics in the Foodstuff: Recent Trends and Developments. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2020**, 1–16. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1798211>.
- (99) Caldas, S. S.; Gonçalves, F. F.; Primel, E. G.; Prestes, O. D.; Martins, M. L.; Zanella, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Quím. Nova* **2011**, *34* (9), 1604–1617. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000900021>.
- (100) UCT. Determination of Tetracycline Antibiotics in Milk Using a Simple Strong Cation-Exchange SPE Cleanup Procedure and LC-MS/MS Analysis, 2014.
- (101) Chen, L.; Zhang, X.; Xu, Y.; Du, X.; Sun, X.; Sun, L.; Wang, H.; Zhao, Q.; Yu, A.; Zhang, H.; Ding, L. Determination of Fluoroquinolone Antibiotics in Environmental Water Samples Based on Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Extraction Followed by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2010**, *662* (1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.01.001>.
- (102) Liu, H.; Chen, L.; Ding, J. A Core-Shell Magnetic Metal Organic Framework of Type Fe₃O₄@ZIF-8 for the Extraction of Tetracycline Antibiotics from Water Samples Followed by Ultra-HPLC-MS Analysis. *Microchim Acta* **2017**, *184* (10), 4091–4098. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2442-6>.
- (103) Luo, Y.-B.; Shi, Z.-G.; Gao, Q.; Feng, Y.-Q. Magnetic Retrieval of Graphene: Extraction of Sulfonamide Antibiotics from Environmental Water Samples. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218* (10), 1353–1358. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.022>.
- (104) Waters. Oasis Sample Extraction Products: Chemistry & Formats, 2010.
- (105) Fuentes, A.; Fuentes, C.; Fernández, I. Preparación de Muestra Mediante La Técnica de EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.
- (106) Spisso, B. F.; de Araújo Júnior, M. A. G.; Monteiro, M. A.; Lima, A. M. B.; Pereira, M. U.; Luiz, R. A.; Nóbrega, A. W. da. A Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Confirmatory Assay for the Simultaneous Determination of Several Tetracyclines in Milk Considering Keto–Enol Tautomerism and Epimerization Phenomena. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *656* (1–2), 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.012>.
- (107) Chen, Q.; Pan, X.-D.; Huang, B.-F.; Han, J.-L.; Zhou, B. Screening of Multi-Class Antibiotics in Pork Meat by LC-Orbitrap-MS with Modified QuEChERS Extraction. *RSC Adv.* **2019**, *9* (48), 28119–28125. <https://doi.org/10.1039/C9RA04853G>.
- (108) Krakkó, D.; Licul-Kucera, V.; Záray, G.; Mihucz, V. G. Single-Run Ultra-High Performance Liquid Chromatography for Quantitative Determination of Ultra-Traces of Ten Popular Active Pharmaceutical Ingredients by Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry after Offline Preconcentration by Solid Phase Extraction from Drinking and River Waters as Well as Treated Wastewater. *Microchemical Journal* **2019**, *148*, 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.04.047>.
- (109) Sollic, M.; Roy-Lachapelle, A.; Sauvé, S. Quantitative Performance of Liquid Chromatography Coupled to Q-Exactive High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) for the Analysis of Tetracyclines in a Complex Matrix. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *853*, 415–424. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.10.037>.

- (110) Díaz-Cruz, M. S.; Barceló, D. Determination of Antimicrobial Residues and Metabolites in the Aquatic Environment by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2006**, *386* (4), 973–985. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0444-z>.
- (111) Gajda, A.; Posyniak, A.; Zmudzki, J.; Tomczyk, G. Determination of Doxycycline in Chicken Fat by Liquid Chromatography with UV Detection and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B* **2013**, *928*, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.03.011>.
- (112) Fekete, S.; Schappler, J.; Veuthey, J.-L.; Guillaume, D. Current and Future Trends in UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2014**, *63*, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.007>.
- (113) LaCourse, M. E.; LaCourse, W. R. General Instrumentation in HPLC *. In *Liquid Chromatography*; Elsevier, 2017; pp 417–429. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00017-8>.
- (114) Skoog, D. A. *Fundamentals of analytical chemistry*, 9th Ed.; Cengage - Brooks/Cole: Belmont, CA, 2012.
- (115) Dass, C. *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*; Wiley-Interscience series on mass spectrometry; Wiley-Interscience: Hoboken, N.J, 2007.
- (116) Stashenko, E. E.; Martínez, J. R. GC-MS: Más de un Analizador de Masas, ¿para qué? 24.
- (117) Skoog, D. A. *Fundamentals of analytical chemistry*, 9th Ed.; Cengage - Brooks/Cole: Belmont, CA, 2012.
- (118) Sanderson, H.; Ingerslev, F.; Brain, R. A.; Halling-Sørensen, B.; Bestari, J. K.; Wilson, C. J.; Johnson, D. J.; Solomon, K. R. Dissipation of Oxytetracycline, Chlortetracycline, Tetracycline and Doxycycline Using HPLC–UV and LC/MS/MS under Aquatic Semi-Field Microcosm Conditions. *Chemosphere* **2005**, *60* (5), 619–629. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.01.035>.
- (119) Díaz-Quiroz, C. A.; Francisco Hernández-Chávez, J.; Ulloa-Mercado, G.; Gortáres-Moroyoqui, P.; Martínez-Macías, R.; Meza-Escalante, E.; Serrano-Palacios, D. Simultaneous Quantification of Antibiotics in Wastewater from Pig Farms by Capillary Electrophoresis. *Journal of Chromatography B* **2018**, *1092*, 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.017>.
- (120) Liang, Y.; Denton, M. B.; Bates, R. B. Stability Studies of Tetracycline in Methanol Solution. *Journal of Chromatography A* **1998**, *827* (1), 45–55. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00755-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00755-9).
- (121) Spisso, B. F.; de Araújo Júnior, M. A. G.; Monteiro, M. A.; Lima, A. M. B.; Pereira, M. U.; Luiz, R. A.; Nóbrega, A. W. da. A Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Confirmatory Assay for the Simultaneous Determination of Several Tetracyclines in Milk Considering Keto–Enol Tautomerism and Epimerization Phenomena. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *656* (1–2), 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.012>.
- (122) *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*; 2014.
- (123) Food and Drug Administration. *Bioanalytical Method Validation*; New Hampshire, 2018.
- (124) Ramírez-Morales, D.; Masís-Mora, M.; Montiel-Mora, J. R.; Cambronero-Heinrichs, J. C.; Briceño-Guevara, S.; Rojas-Sánchez, C. E.; Méndez-Rivera, M.; Arias-Mora, V.; Tormo-Budowski, R.; Brenes-Alfaro, L.; Rodríguez-Rodríguez, C. E. Occurrence of Pharmaceuticals, Hazard Assessment and Ecotoxicological Evaluation of Wastewater Treatment Plants in Costa Rica. *Science of The Total Environment* **2020**, *746*, 141200. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141200>.
- (125) "; Dunarea de Jos"; University of Galati, Romania; Călmuc, V. A.; Călmuc, M.; "Dunarea de Jos" University of Galati, Romania; Țopa, C. M.; "Dunarea de Jos" University of Galati, Romania; Timofti, M.; "Dunarea de Jos" University of Galati, Romania; Iticescu, C.; "Dunarea de Jos" University of Galati, Romania; Georgescu, L. P.; "Dunarea de Jos" University of Galati, Romania. Various Methods for Calculating the Water Quality Index. *Ann_UGAL_Math_Phys_Mec* **2018**, *41* (1), 171–178. <https://doi.org/10.35219/ann-ugal-math-phys-mec.2018.2.09>.
- (126) HACH COMPANY. Manual de análisis de agua HACH. **2000**, 220.

- (127) Strickland, J. D. H.; Parsons, T. R. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*, Second.; Fisheries Research Board of Canada: Ottawa, 1972.
- (128) APHA. *Standard Methods for the Examination of Wastewater*, 23th edition.; America Public Health Association: Washington, DC, USA, 2017.
- (129) Liu, F.; Zhang, X.; Li, Y.; Gao, H.; Ling, P.; Li, X.; Chen, Q.; Ma, A.; Shao, H.; Li, M.; Wang, F. Simultaneous Screening and Determination of Eight Tetracycline Antibiotics Illegally Adulterated in Herbal Preparations Using HPLC–DAD Combined with LC–MS–MS. *Chromatographia* **2018**, *81* (2), 303–314. <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3450-8>.
- (130) Barbarin, N.; Tilquin, B.; de Hoffmann, E. Radiosterilization of Cefotaxime: Investigation of Potential Degradation Compounds by Liquid Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2001**, *929* (1–2), 51–61. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01175-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01175-X).
- (131) Horwitz, W.; Albert, R. The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* **2006**, *89* (4), 1095–1109. <https://doi.org/10.1093/jaoac/89.4.1095>.
- (132) Do, T. C. M. V.; Nguyen, D. Q.; Nguyen, T. D.; Le, P. H. Development and Validation of a LC-MS/MS Method for Determination of Multi-Class Antibiotic Residues in Aquaculture and River Waters, and Photocatalytic Degradation of Antibiotics by TiO₂ Nanomaterials. *Catalysts* **2020**, *10* (3), 356. <https://doi.org/10.3390/catal10030356>.
- (133) Yang, Y.; Yin, S.; Yang, D.; Jiang, Y.; Li, Y.; Zhou, C.; Sun, C. Carboxyl Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticle-Based SPE and HPLC Method for the Determination of Six Tetracyclines in Water. *Anal Bioanal Chem* **2019**, *411* (2), 507–515. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1475-y>.
- (134) Robert, C.; Hulle, M. V.; Hird, S.; Demoulin, L.; Pierret, G. The Analysis of Tetracycline and Sulfonamide Antibiotics in Shrimp Tissue Using Liquid Chromatography Tandem Quadrupole Mass Spectrometry. 16.
- (135) Oladipo, J. O.; Aboyeji, O. S.; Akinwumiju, A. S.; Adelodun, A. A. Fuzzy Logic Interference for Characterization of Surface Water Potability in Ikare Rural Community, Nigeria. *J geovis spat anal* **2020**, *4* (1), 1. <https://doi.org/10.1007/s41651-019-0044-z>.
- (136) Campos González, M.; Vargas Castellanos, J. R.; Franco Herrera, A.; Medina Calderón, J. H. DISTRIBUCIÓN DE LA CLOROFILA A EN LAS AGUAS ADYACENTES A LAS ISLAS DE PROVIDENCIA Y SANTA CATALINA, CARIBE COLOMBIANO. *BIM* **2016**, *40* (2). <https://doi.org/10.25268/bimc.invemar.2011.40.2.115>.
- (137) Carlson, R. E. A Trophic State Index for Lakes1: Trophic State Index. *Limnol. Oceanogr.* **1977**, *22* (2), 361–369. <https://doi.org/10.4319/lo.1977.22.2.0361>.
- (138) Carlson, J. C.; Anderson, J. C.; Low, J. E.; Cardinal, P.; MacKenzie, S. D.; Beattie, S. A.; Challis, J. K.; Bennett, R. J.; Meronek, S. S.; Wilks, R. P. A.; Buhay, W. M.; Wong, C. S.; Hanson, M. L. Presence and Hazards of Nutrients and Emerging Organic Micropollutants from Sewage Lagoon Discharges into Dead Horse Creek, Manitoba, Canada. *Science of The Total Environment* **2013**, *445–446*, 64–78. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.100>.
- (139) Li, Y.; Fang, L.; Yuanzhu, W.; Mi, W.; Ji, L.; Guixiang, Z.; Yang, P.; Chen, Z.; Bi, Y. Anthropogenic Activities Accelerated the Evolution of River Trophic Status. *Ecological Indicators* **2022**, *136*, 108584. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.108584>.
- (140) Rashid, I.; Romshoo, S. A. Impact of Anthropogenic Activities on Water Quality of Lidder River in Kashmir Himalayas. *Environ Monit Assess* **2013**, *185* (6), 4705–4719. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2898-0>.
- (141) *Surveillance and Control of Community Supplies*, 2. ed.; Weltgesundheitsorganisation, Ed.; Guidelines for drinking-water quality / World Health Organization; Geneva, 1997.

Anexos

Cuadro XXIV. Curvas de calibración de cada antibiótico en estudio para determinar la linealidad correspondiente.

Patrón	Conc. TC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Área TC	Conc. DC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Área DC	Conc. OC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Área OC	Conc. CT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Área CT
1	9.17	2345	1	664	23.05	2051	0.78	488
2	27.5	3998	9.99	3693	38.42	5110	7.84	4405
3	45.84	9423	29.96	10929	53.78	5980	23.51	12454
4	64.17	10446	49.93	19320	69.15	9129	39.19	20786
5	82.51	15255	69.9	24400	76.84	9652	54.86	28571
6	91.68	18042	89.87	32121	--	--	70.54	33700
7	--	--	--	--	--	--	78.38	39000

Cuadro XXV. Áreas teóricas de cada antibiótico en estudio para determinar el error máximo correspondiente.

Patrón	Área TC	Área DC	Área OC	Área CT
1	1953	945	2539	1145
2	5364	4105	4622	4504
3	8775	11128	6705	11969
4	12187	18150	8788	19433
5	15598	25172	9830	26898
6	17304	32194	--	34362
7	--	35705	--	38094

Cuadro XXVI. Señales de blancos obtenidas en diferentes días para determinar los LD y LC de cada curva de calibración de los antibióticos en estudio.

Fecha	#Blanco	Antibiótico	Señal	Fecha	#Blanco	Antibiótico	Señal
6-Jul	1	TC	6.12	6-Jul	5	TC	6.5
6-Jul	1	DC	29.28	6-Jul	5	DC	13.3
6-Jul	1	OC	25.73	6-Jul	5	OC	6.5
6-Jul	1	CT	26.27	6-Jul	5	CT	13.1
6-Jul	2	TC	0.52	6-Jul	6	TC	5.29
6-Jul	2	DC	3.64	6-Jul	6	DC	20.68
6-Jul	2	OC	8.4	6-Jul	6	OC	9.71
6-Jul	2	CT	19.52	6-Jul	6	CT	40.45
6-Jul	3	TC	1.29	6-Jul	7	TC	9.12
6-Jul	3	DC	10.36	6-Jul	7	DC	49.35
6-Jul	3	OC	5.65	6-Jul	7	OC	24.79

Continuación del **Cuadro XXVI**. Señales de blancos obtenidas en diferentes días para determinar los LD y LC de cada curva de calibración de los antibióticos en estudio.

Fecha	#Blanco	Antibiótico	Señal	Fecha	#Blanco	Antibiótico	Señal
6-Jul	3	CT	12.08	6-Jul	7	CT	30.59
6-Jul	4	TC	27.01	6-Jul	8	TC	7.28
6-Jul	4	DC	48.2	6-Jul	8	DC	25.69
6-Jul	4	OC	12.49	6-Jul	8	OC	12.47
6-Jul	4	CT	48.78	6-Jul	8	CT	25.69
6-Jul	9	TC	8.27	16-Jun	5	TC	83.16
6-Jul	9	DC	36.71	16-Jun	5	DC	108
6-Jul	9	OC	14.51	16-Jun	5	OC	41.76
6-Jul	9	CT	27.15	16-Jun	5	CT	47.01
6-Jul	10	TC	15.12	16-Jun	6	TC	96.4
6-Jul	10	DC	34.66	16-Jun	6	DC	96.18
6-Jul	10	OC	17.43	16-Jun	6	OC	71.57
6-Jul	10	CT	15.33	16-Jun	6	CT	50.44
6-Jul	11	TC	16.6	16-Jun	7	TC	28.75
6-Jul	11	DC	18.82	16-Jun	7	DC	71.21
6-Jul	11	OC	20.3	16-Jun	7	OC	40.91
6-Jul	11	CT	28.61	16-Jun	7	CT	79.22
6-Jul	12	TC	20.77	16-Jun	8	TC	70.77
6-Jul	12	DC	29.58	16-Jun	8	DC	56.62
6-Jul	12	OC	19.24	16-Jun	8	OC	43.59
6-Jul	12	CT	27.99	16-Jun	8	CT	74.42
6-Jul	13	TC	19.11	16-Jun	9	TC	21.59
6-Jul	13	DC	41.03	16-Jun	9	DC	82.84
6-Jul	13	OC	13.23	16-Jun	9	OC	99.76
6-Jul	13	CT	13.84	16-Jun	9	CT	83.65
6-Jul	14	TC	4.33	16-Jun	10	TC	105
6-Jul	14	DC	40.39	16-Jun	10	DC	59.44
6-Jul	14	OC	20.45	16-Jun	10	OC	60.67
6-Jul	14	CT	31.54	16-Jun	10	CT	80.93
16-Jun	1	TC	60.41	16-Jun	11	TC	25.2
16-Jun	1	DC	150	16-Jun	11	DC	57.05
16-Jun	1	OC	86.31	16-Jun	11	OC	107
16-Jun	1	CT	54.3	16-Jun	11	CT	22.26
16-Jun	2	TC	21.72	16-Jun	12	TC	24.84
16-Jun	2	DC	37.42	16-Jun	12	DC	45.74
16-Jun	2	OC	25.34	16-Jun	12	OC	107
16-Jun	2	CT	74.72	16-Jun	12	CT	23.16
16-Jun	3	TC	17.75	16-Jun	13	TC	70.78
16-Jun	3	DC	52.93	16-Jun	13	DC	74.92
16-Jun	3	OC	30.1	16-Jun	13	OC	30.25
16-Jun	3	CT	68.77	16-Jun	13	CT	47.35
16-Jun	4	TC	22.74	16-Jun	14	TC	124
16-Jun	4	DC	66.67	16-Jun	14	DC	69.9

Continuación del **Cuadro XXVI**. Señales de blancos obtenidas en diferentes días para determinar los LD y LC de cada curva de calibración de los antibióticos en estudio.

Fecha	#Blanco	Antibiótico	Señal	Fecha	#Blanco	Antibiótico	Señal
16-Jun	4	OC	68.42	16-Jun	14	OC	46.79
16-Jun	4	CT	59.93	16-Jun	14	CT	78.19
16-Jun	15	TC	45.71	16-Jun	25	TC	41.92
16-Jun	15	DC	18.72	16-Jun	25	DC	67.65
16-Jun	15	OC	53.76	16-Jun	25	OC	25.71
16-Jun	15	CT	34.61	16-Jun	25	CT	66.53
16-Jun	16	TC	22.68	16-Jun	26	TC	39.89
16-Jun	16	DC	78.8	16-Jun	26	DC	67.98
16-Jun	16	OC	35.46	16-Jun	26	OC	77.15
16-Jun	16	CT	6.64	16-Jun	26	CT	47.03
16-Jun	17	TC	58.01	16-Jun	27	TC	55.64
16-Jun	17	DC	68.54	16-Jun	27	DC	12.32
16-Jun	17	OC	41.83	16-Jun	27	OC	29.66
16-Jun	17	CT	67.5	16-Jun	27	CT	51.18
16-Jun	18	TC	28.01	16-Jun	28	TC	50.48
16-Jun	18	DC	13.55	16-Jun	28	DC	49.95
16-Jun	18	OC	41.64	16-Jun	28	OC	34.98
16-Jun	18	CT	43.19	16-Jun	28	CT	82.49
16-Jun	19	TC	34.5	16-Jun	29	TC	56.56
16-Jun	19	DC	47.83	16-Jun	29	DC	55.41
16-Jun	19	OC	37.95	16-Jun	29	OC	70.58
16-Jun	19	CT	60.56	16-Jun	29	CT	60.11
16-Jun	20	TC	44.46	16-Jun	30	TC	25.54
16-Jun	20	DC	54.32	16-Jun	30	DC	3.11
16-Jun	20	OC	37.18	16-Jun	30	OC	39.07
16-Jun	20	CT	39.9	16-Jun	30	CT	49.64
16-Jun	21	TC	44.18	16-Jun	31	TC	22.67
16-Jun	21	DC	60.35	16-Jun	31	DC	30.01
16-Jun	21	OC	29.05	16-Jun	31	OC	24.61
16-Jun	21	CT	67.23	16-Jun	31	CT	59.54
16-Jun	22	TC	49.64	16-Jun	32	TC	23.17
16-Jun	22	DC	38.84	16-Jun	32	DC	15.82
16-Jun	22	OC	35.95	16-Jun	32	OC	43.36
16-Jun	22	CT	36.32	16-Jun	32	CT	53.89
16-Jun	23	TC	57.74	16-Jun	33	TC	58.55
16-Jun	23	DC	67.45	16-Jun	33	DC	79.09
16-Jun	23	OC	41.51	16-Jun	33	OC	34.4
16-Jun	23	CT	54.76	16-Jun	33	CT	44.82
16-Jun	24	TC	47.48	16-Jun	34	TC	52.45
16-Jun	24	DC	53.71	16-Jun	34	DC	57.46
16-Jun	24	OC	44.33	16-Jun	34	OC	42.36
16-Jun	24	CT	33.04	16-Jun	34	CT	50.99

Continuación del **Cuadro XXVI**. Señales de blancos obtenidas en diferentes días para determinar los LD y LC de cada curva de calibración de los antibióticos en estudio.

Fecha	#Blanco	Antibiótico	Señal	Fecha	#Blanco	Antibiótico	Señal
22-Jun	1	TC	73.86	22-Jun	11	TC	18.03
22-Jun	1	DC	24.3	22-Jun	11	DC	31.65
22-Jun	1	OC	26.05	22-Jun	11	OC	50.65
22-Jun	1	CT	57.71	22-Jun	11	CT	43.03
22-Jun	2	TC	29.4	22-Jun	12	TC	14.55
22-Jun	2	DC	54.29	22-Jun	12	DC	26.49
22-Jun	2	OC	20.8	22-Jun	12	OC	18.73
22-Jun	2	CT	48	22-Jun	12	CT	9.98
22-Jun	3	TC	8.47	22-Jun	13	TC	40.83
22-Jun	3	DC	51.49	22-Jun	13	DC	21.19
22-Jun	3	OC	42.89	22-Jun	13	OC	19.56
22-Jun	3	CT	48.81	22-Jun	13	CT	32.17
22-Jun	4	TC	42.04	22-Jun	14	TC	34.04
22-Jun	4	DC	44.05	22-Jun	14	DC	21.4
22-Jun	4	OC	18.16	22-Jun	14	OC	30.42
22-Jun	4	CT	55.22	22-Jun	14	CT	14.67
22-Jun	5	TC	52.48	22-Jun	15	TC	4.53
22-Jun	5	DC	51.2	22-Jun	15	DC	16.98
22-Jun	5	OC	8.77	22-Jun	15	OC	35.61
22-Jun	5	CT	20.72	22-Jun	15	CT	22.43
22-Jun	6	TC	49.79	22-Jun	16	TC	32.4
22-Jun	6	DC	45.66	22-Jun	16	DC	43.81
22-Jun	9	OC	36.46	22-Jun	16	OC	51.72
22-Jun	6	CT	20.54	22-Jun	16	CT	9.43
22-Jun	7	TC	23.88	22-Jun	17	TC	19.57
22-Jun	7	DC	34.77	22-Jun	17	DC	37.38
22-Jun	7	OC	27.47	22-Jun	17	OC	19.27
22-Jun	7	CT	36.37	22-Jun	17	CT	11.27
22-Jun	8	TC	38.44	22-Jun	18	TC	44.62
22-Jun	8	DC	41.6	22-Jun	18	DC	37.26
22-Jun	8	OC	38.37	22-Jun	18	OC	27.56
22-Jun	8	CT	50.72	22-Jun	18	CT	36.07
22-Jun	9	TC	35.64	22-Jun	19	TC	14.48
22-Jun	9	DC	45.12	22-Jun	19	DC	44.81
22-Jun	9	OC	19.73	22-Jun	19	OC	23.03
22-Jun	9	CT	44.27	22-Jun	19	CT	31.22
22-Jun	10	TC	13.05	22-Jun	20	TC	13.99
22-Jun	10	DC	21.51	22-Jun	20	DC	34.36
22-Jun	10	OC	48.62	22-Jun	20	OC	61.69
22-Jun	10	CT	27.9	22-Jun	20	CT	20.22

Continuación del **Cuadro XXVI.** Señales de blancos obtenidas en diferentes días para determinar los LD y LC de cada curva de calibración de los antibióticos en estudio.

Fecha	#Blanco	Antibiótico	Señal	Fecha	#Blanco	Antibiótico	Señal
22-Jun	21	TC	31.74	22-Jun	31	TC	39.37
22-Jun	21	DC	21.32	22-Jun	31	DC	37.13
22-Jun	21	OC	42.62	22-Jun	31	OC	11.56
22-Jun	21	CT	18.18	22-Jun	31	CT	22.41
22-Jun	22	TC	32.74	22-Jun	32	TC	45.48
22-Jun	22	DC	54.36	22-Jun	32	DC	13.69
22-Jun	22	OC	44.58	22-Jun	32	OC	40.71
22-Jun	22	CT	35.75	22-Jun	32	CT	43.15
22-Jun	23	TC	38.63	22-Jun	33	TC	47.59
22-Jun	23	DC	35.31	22-Jun	33	DC	28.91
22-Jun	23	OC	23.96	22-Jun	33	OC	23.1
22-Jun	23	CT	13.24	22-Jun	33	CT	46.45
22-Jun	24	TC	15.98	22-Jun	34	TC	43.89
22-Jun	24	DC	77.96	22-Jun	34	DC	32.04
22-Jun	24	OC	30.71	22-Jun	34	OC	41.42
22-Jun	24	CT	49.79	22-Jun	34	CT	12.49
22-Jun	25	TC	78.94	22-Jun	35	TC	4.46
22-Jun	25	DC	53.05	22-Jun	35	DC	42.32
22-Jun	25	OC	74.48	22-Jun	35	OC	46.2
22-Jun	25	CT	58.89	22-Jun	35	CT	39.73
22-Jun	26	TC	49.39	22-Jun	36	TC	31.64
22-Jun	26	DC	22.6	22-Jun	36	DC	14.02
22-Jun	26	OC	29.17	22-Jun	36	OC	46.76
22-Jun	26	CT	8.91	22-Jun	36	CT	2.11
22-Jun	27	TC	52.6	22-Jun	37	TC	36.76
22-Jun	27	DC	97.8	22-Jun	37	DC	46.5
22-Jun	27	OC	20.02	22-Jun	37	OC	34.3
22-Jun	27	CT	50.06	22-Jun	37	CT	7.65
22-Jun	28	TC	9.35	22-Jun	38	TC	26.79
22-Jun	28	DC	62.89	22-Jun	38	DC	37.83
22-Jun	28	OC	49.47	22-Jun	38	OC	15.7
22-Jun	28	CT	55.12	22-Jun	38	CT	28.2
22-Jun	29	TC	61.32	22-Jun	39	TC	25.32
22-Jun	29	DC	56.13	22-Jun	39	DC	31.02
22-Jun	29	OC	60.11	22-Jun	39	OC	22.06
22-Jun	29	CT	17.41	22-Jun	39	CT	20.35
22-Jun	30	TC	9.03	22-Jun	40	TC	41.26
22-Jun	30	DC	37.9	22-Jun	40	DC	38.77
22-Jun	30	OC	52.58	22-Jun	40	OC	10.31
22-Jun	30	CT	64.17	22-Jun	40	CT	21.85

Cuadro XXVII. Evaluación diaria de la curva de calibración para determinar la precisión y veracidad de los resultados de los antibióticos en estudio.

Patrón	09.04.21		13.04.21		14.04.21	
	Área TC	Área DC	Área TC	Área DC	Área TC	Área DC
1	1161	4457	1024	3783	889	3148
2	2617	10809	4461	9983	3512	8329
3	3532	8049	3209	8146	2898	6605
4	9338	26730	11743	27570	11454	18819
5	18554	45667	23161	49049	22882	30910
6	25162	60551	32478	59632	30967	48738
7	34715	81922	42366	83027	39908	64432
Patrón	09.04.21		13.04.21		14.04.21	
	Área OC	Área CT	Área OC	Área CT	Área OC	Área CT
1	1465	1673	1511	1007	1820	433
2	3980	8791	4987	6204	4828	3897
3	3808	6473	4195	4713	3750	3435
4	7633	17519	9409	12585	10095	8208
5	15131	29039	16850	19293	17496	12425
6	18533	40703	22369	29211	21627	19008
7	24603	50360	29207	37190	29180	23204

Cuadro XXVIII. Resultados de ensayos realizados para determinar el porcentaje de recuperación de los enriquecimientos.

Antibiótico	Promedio áreas nivel bajo (10 µL)		
	Patrón	Blanco	Enriquecimiento
TC	0.14367	0.00000	0.00000
DC	4.02320	0.11044	4.82614
OC	0.08154	0.00000	0.00000
CT	0.06654	0.00000	0.17388
--	Promedio áreas nivel medio (50 µL)		
TC	0.86263	0.00000	0.00000
DC	4.50067	0.11044	4.20478
OC	0.43663	0.00000	0.00000
CT	0.33319	0.00000	0.35077
--	Promedio áreas nivel medio (80 µL)		
TC	1.83101	0.00000	1.06291
DC	4.86561	0.13239	5.65592
OC	1.60049	0.00000	0.74572
CT	0.55763	0.00000	0.69849

Cuadro XXIX. Resultados ensayos para determinar el efecto de matriz en el análisis de los antibióticos en estudio.

Tipo de curva	Nivel Bajo (10.6 µL)	Nivel Medio (52.8 µL)	Nivel Alto (105.6 µL)
Curva en Matriz	3041.93	12662.41	31183.47
Curva convencional	3596.18	12340.20	25892.96

Cuadro XXX. Áreas promedio de los análisis de antibióticos en la microcuenca del río Durazno.

Gira-Punto de muestreo	Área de TC	Área de DC	Área de OC	Área de CT
GI-P1	0	1250	0	1255
GI-P2	0	3944	0	1231
GI-P3	0	2665	0	1144
GII-P1	0	1251	0	1457
GII-P2	0	2420	0	1381
GII-P3	0	1521	0	1323

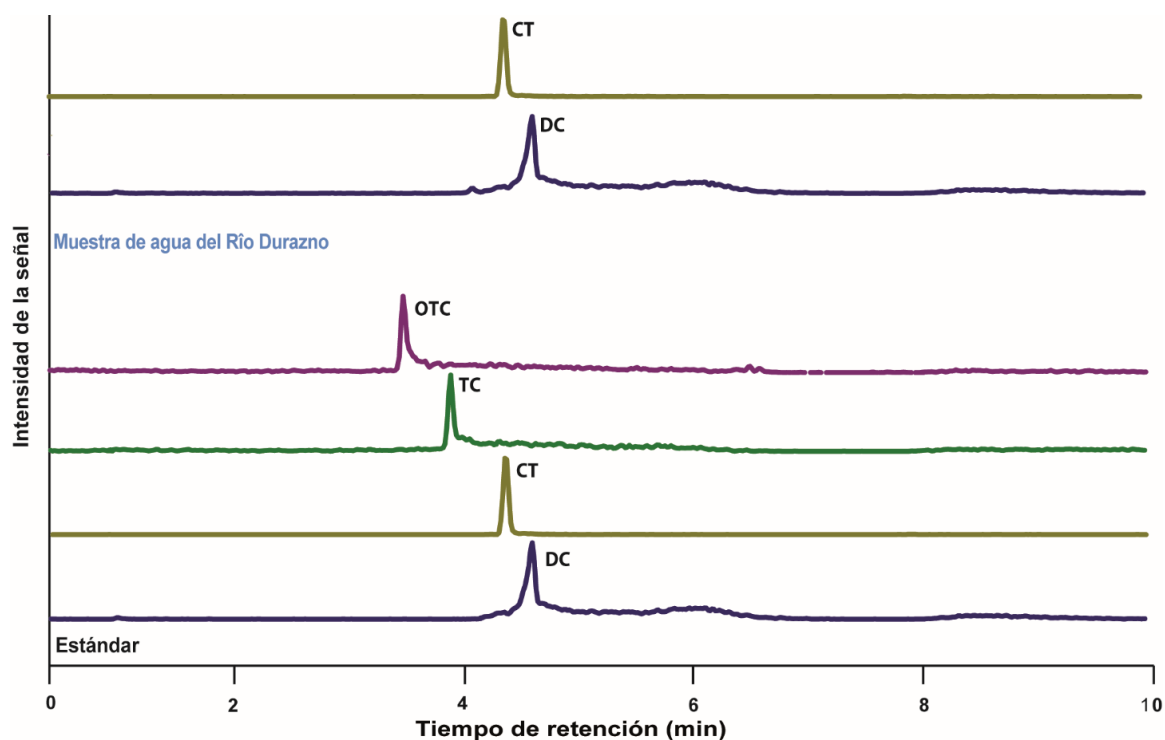


Figura 33. Comparación de los cromatogramas de una muestra de agua superficial y el patrón más concentrado de la curva de calibración.

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Concentración	36	0.00	1.44	0.95	0.2973

Prueba de Levene (Homocedasticidad)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Concentración	36	0.60	0.41	69.93

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	19.44	11	1.77	3.25	0.0076
Código	19.44	11	1.77	3.25	0.0076
Error	13.03	24	0.54		
Total	32.47	35			

Figura 34. Pruebas de Shapiro-Wilks y de Levene para probar normalidad de los resultados obtenidos en el análisis de antibióticos en el agua superficial de la microcuenca del río Durazno.

Variable	Código	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Concentración	CT.MI.P1	3	0.68	0.66	0.75	22.50	0.0206
Concentración	CT.MI.P2	3	0.54	0.74	0.21		
Concentración	CT.MI.P3	3	0.43	0.38	0.57		
Concentración	CT.MII.P1	3	1.14	0.56	1.16		
Concentración	CT.MII.P2	3	1.20	1.25	1.11		
Concentración	CT.MII.P3	3	0.79	0.37	0.70		
Concentración	DC.MI.P1	3	2.14	1.80	2.80		
Concentración	DC.MI.P2	3	3.63	1.26	3.63		
Concentración	DC.MI.P3	3	7.18	3.63	5.26		
Concentración	DC.MII.P1	3	2.32	2.50	2.00		
Concentración	DC.MII.P2	3	6.31	2.31	5.61		
Concentración	DC.MII.P3	3	3.11	1.89	2.73		

Trat.	Ranks
CT.MI.P3	7.83 A
CT.MI.P2	10.00 A B
CT.MI.P1	10.83 A B
CT.MII.P3	11.67 A B
CT.MII.P2	13.17 A B
CT.MII.P1	15.00 A B
DC.MII.P1	18.17 A B C
DC.MI.P1	19.00 A B C
DC.MII.P3	25.00 B C
DC.MI.P2	26.00 B C
DC.MII.P2	32.33 C
DC.MI.P3	33.00 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Figura 35. Análisis de varianza de los antibióticos analizados en las muestras del agua superficial de la microcuenca del río Durazno.

Cuadro XXXI. Resumen de datos de lluvia total y temperatura promedio para los días de muestreo para el análisis de antibióticos en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno.

Parámetro	Lluvia (mm)												Temperatura (°C)											
	Mes	3	3	3	3	6	6	6	6	6	6	6	3	3	3	3	6	6	6	6				
Día	15	16	17	18	1	2	3	4	15	16	17	18	1	2	3	4	15	16	17	18				
1	0	0	0	0	0	0	0	0	10.5	10.9	12.4	13.5	12.6	11.4	14.0	13.9	10.5	10.9	12.4	13.5				
2	0	0	0	0	0	0	0	0	10.3	10.8	12.0	12.8	11.8	10.9	13.4	13.6	10.3	10.8	12.0	12.8				
3	0	0	0	0	0	0	0	0	10.4	11.1	11.8	12.7	11.4	11.0	13.3	13.8	10.4	11.1	11.8	12.7				
4	0	0	0	0	0	0	0	0	10.5	9.6	11.8	12.2	11.0	11.0	13.6	13.8	10.5	9.6	11.8	12.2				
5	0	0	0	0	0	0	0	0	11.6	9.6	11.2	11.7	11.7	11.1	13.4	13.1	11.6	9.6	11.2	11.7				
6	0	0	0	0	0	0	0	0	11.5	10.4	10.9	11.6	12.3	11.1	14.0	13.5	11.5	10.4	10.9	11.6				
7	0	0	0	0	0	0	0	0	12.6	12.0	12.6	12.6	15.3	14.2	16.2	15.8	12.6	12.0	12.6	12.6				
8	0	0	0	0	0	0	0	0	15.5	16.7	18.1	19.4	19.8	19.7	19.4	17.8	15.5	16.7	18.1	19.4				
9	0	0	0	0	0	0	0	0.4	18.7	20.4	21.7	23.3	21.3	22.0	19.5	18.6	18.7	20.4	21.7	23.3				
10	0	0	0	0	0	0	0	0	18.4	21.6	23.8	25.1	19.8	22.3	19.5	18.0	18.4	21.6	23.8	25.1				
11	0	0	0	0	1.2	0	0	0	20.4	22.0	24.8	25.4	19.4	23.8	19.0	18.4	20.4	22.0	24.8	25.4				
12	0	0	0	0	0.4	0	0	0	20.5	21.9	24.6	25.1	19.5	23.7	22.4	20.1	20.5	21.9	24.6	25.1				
13	0	0	0	0	0	0	0	0	20.9	22.2	24.1	25.7	21.3	22.4	23.4	19.2	20.9	22.2	24.1	25.7				
14	0	0	0	0	0	0	0	0	21.3	22.4	23.8	25.0	20.9	20.8	21.1	20.4	21.3	22.4	23.8	25.0				
15	0	0	0	0.8	0	0	10	0.2	21.0	20.7	21.6	21.5	19.7	22.0	19.0	21.3	21.0	20.7	21.6	21.5				
16	0	0	0	5	0	0	1.8	0	20.1	20.1	19.6	17.8	19.3	20.8	17.9	19.6	20.1	20.1	19.6	17.8				
17	0	0	0	0.1	0	0	0	0	17.6	18.0	18.1	18.3	18.1	19.8	17.6	18.5	17.6	18.0	18.1	18.3				
18	0	0	0	0	0	0	0	0	16.5	17.1	17.9	17.6	16.9	18.4	17.4	17.8	16.5	17.1	17.9	17.6				
19	0	0	0	0	0	0	0	0	15.0	15.6	17.4	16.8	15.7	17.4	17.1	17.3	15.0	15.6	17.4	16.8				
20	0	0	0	0	0	0	0	0	14.0	14.8	17.2	16.6	14.3	16.7	17.1	17.1	14.0	14.8	17.2	16.6				
21	0	0	0	0	0	0	0	0	14.2	15.1	16.8	15.9	13.3	16.2	16.7	16.5	14.2	15.1	16.8	15.9				
22	0	0	0	0	0	0	0	0	14.0	14.7	16.3	15.2	12.2	15.6	15.8	15.4	14.0	14.7	16.3	15.2				
23	0	0	0	0	0	0	0	0	13.7	14.7	15.5	14.8	11.9	14.6	14.9	14.9	13.7	14.7	15.5	14.8				
24	0	0	0	0	0	0	0	0	12.6	13.9	14.2	14.8	11.3	14.2	14.5	14.5	12.6	13.9	14.2	14.8				