



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Analítica e Inorgánica
Laboratorio de Química Ambiental

Microextracción de fármacos antiinflamatorios no esteroideos desde matrices acuosas usando polímero de impresión molecular inmovilizado en un sistema de disco rotatorio

Memoria para obtener el título de Químico

Karla Francesca Ulisse Ulisse

Patrocinante y Director de Memoria:

Dr. Pablo Richter Duk

Santiago-Chile

2014

*Incluso el conocimiento de mis desaciertos no
puede mantenerme libre de errores, solo cuando
caigo me levanto de nuevo.*

Vincent Van Gogh

1853 – 1890

Agradecimientos

Cuando este largo y difícil proceso finaliza quiero agradecer en primer lugar a mi familia, Mamá y Mauricio por el apoyo incondicional, por escuchar mis dificultades e indecisiones y ampararme cuando ya no daba más. A mi tía María Luisa por estar ahí con el consejo justo. Sin ustedes esto un hubiera sido posible.

A las grandes personas que conocí en estos 7 años, esto habría sido mucho más difícil y los momentos de ocio no hubiese sido lo mismo sin su compañía, chistes y eternas conversaciones, Alicia, Carla, Valeria, Mario, Raúl, Daniel, Juan Pablo, José, Ricardo. Si se me olvida alguien lo siento, pero todos saben el lugar que ocupan en mi corazón aunque a veces sea difícil para mí demostrarlo. Lucas, gracias por caminar a mi lado por este camino largo y muchas veces difícil.

Al grupo de laboratorio, Romina, Valentina, Yanina, Marcela, Cristina, gracias a ustedes sentí el laboratorio como mi segunda casa y cuando las cosas no salían o el trabajo se hacía interminable tuvieron siempre la palabra de aliento o el consejo preciso para seguir avanzando, gracias por sus enseñanzas y paciencia. Profe Inés, Profe Loreto, Profe Carolina y Betsabet, por su tiempo y aportar al desarrollo de esta tesis.

Profe Pablo, por la oportunidad de trabajar con usted, la confianza, paciencia, los consejos y su increíble disposición en todo momento. Gracias por todo.

Al proyecto Fondecyt 1100085 por el financiamiento de este trabajo.

Y en estas últimas líneas... a mi abuela, que aunque ya no está físicamente, sé que ha colaborado en darme fuerzas para avanzar y superarme cada día mas.

Resumen

Microextracción de fármacos antiinflamatorios no esteroideos desde matrices acuosas usando polímero de impresión molecular inmovilizado en un sistema de disco rotatorio

Los llamados contaminantes emergentes, están presentes en un variado rango de productos de la vida cotidiana, como los productos farmacéuticos que son liberados de manera indiscriminada a las plantas de tratamiento de aguas, donde al no ser removidos en su totalidad tienden a permanecer en la fase acuosa, y por lo tanto, son frecuentemente detectados en aguas superficiales. La preocupación recae en que sus productos de degradación pueden ser incluso más tóxicos que los contaminantes iniciales.

Entre los productos farmacéuticos, las drogas antiinflamatorias no esteroideas (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*) (NSAIDs), han sido detectadas frecuentemente en el medio ambiente y no poseen una legislación que las regule. Es por esto que se desarrolló un método analítico para determinar la concentración de estos fármacos más comúnmente usados en muestras acuosas, mediante la técnica de microextracción por sorción en disco rotatorio (*rotating disk sorptive extraction*) (RDSE). El dispositivo de extracción es de teflón y presenta una cavidad en el cual se le inmoviliza un polímero de impresión molecular (MIP) como sorbente selectivo para la extracción de los analitos, con la posterior cuantificación mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-MS), con previo proceso de derivatización de los extractos provenientes de RDSE.

Las condiciones de extracción optimizadas para los antiinflamatorios no esteroideos, ácido mefenámico y diclofenaco fueron las siguientes: volumen de muestra de 50 mL, 25 mg de fase MIP, agitación a 3000 rpm, tiempo de extracción de 60 minutos, pH 2 y un proceso de desorción con 10 mL de metanol por 5 minutos.

Se demostró que para los fármacos en estudio la fase sorbente de MIP extrae en promedio 3 veces más que la fase con el mismo polímero no impreso (NIP), dejando de manifiesto el efecto de las cavidades de la molécula impresa. La metodología propuesta se validó en una matriz de agua potable.

El método alcanzó límites de detección entre 0,060 - 0,223 μgL^{-1} de AINEs con recuperaciones entre 99-100% \pm 5-6%. La aplicación en muestras de aguas residuales obtenidas de una planta de tratamiento de Santiago entregó concentraciones para estos fármacos entre 1,8 - 4,3 μgL^{-1} en el afluente y de 1,3 – 2,8 en el efluente.

Abstract

Micro extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from aqueous matrices using a molecularly imprinted polymer immobilized on a rotating-disk system.

The so called emerging contaminants are present in a wide range of daily life products such as drugs that are haphazardly released into water treatment plants where, as they are not completely removed, they tend to remain in the aqueous phase and consequently are found in surface waters. The concern lies in that they can transform into products that are more toxic and more dangerous than the original contaminants.

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are a type of drugs that have been frequently detected in the environment and are not regulated by law. For this reason, an analytical method was developed to determine the concentration of the most commonly used NSAIDs in aqueous samples, using the rotating-disk sorptive microextraction technique (RDSE). The extraction device, made of Teflon, contains a cavity in which it can immobilize a molecularly imprinted polymer (MIP) as a selective sorbent for extracting analytes, which are subsequently quantified using the gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method once the extracts from RDSE were subject to a derivatization process.

The optimal condition for extraction of the mefenamic acid and diclofenac NSAIDs were the following: sample volume of 50 mL, 25 mg of MIP, 3000 rpm agitation, extraction time 60 min, pH2 and desorption with 10 mL of methanol during 5 minutes.

For the drugs under study, it was shown that the sorbent phase of MIP recovered on average three times more than the same phase with no imprinted polymer (NIP), evidencing the effect of the cavities of the imprinted molecule. The proposed methodology was validated using a potable water matrix.

The method achieved NSAIDs detection limits between 0.060 to 0.223 μgL^{-1} with recoveries between 99-100% \pm 5-6%. The application (of this method) to waste water samples obtained from a water treatment plant in Santiago showed NSAIDs concentrations of 1.8 to 4.3 μgL^{-1} in the influent stream and 1.3 to 2.8 μgL^{-1} in the effluent stream.

Tabla de contenidos

1. Introducción.....	1
1.1. Contaminantes emergentes	1
1.2. Preparación de muestra	3
1.3. Analitos a estudiar	8
1.4. Determinación y cuantificación	10
2. Hipótesis.....	11
3. Objetivos.....	12
3.1. Objetivo general.....	12
3.2. Objetivos específicos.....	12
4. Materiales, reactivos y equipos.....	13
5. Metodología	16
5.1. Selección de los analitos.....	16
5.2. Preparación de estándares y optimización cromatográfica.....	16
5.2.1. Condiciones Cromatográficas	17
5.3. Optimización de variables químicas e hidrodinámicas.....	17
5.4. Determinación de las cifras de mérito.....	19
5.5. Aplicación del método optimizado a otras moléculas.....	21
5.6. Aplicación del método validado a muestras reales.....	21
6. Resultados y Discusión.....	23
6.1. Caracterización del NIP y MIP.....	23
6.2. Selección de los analitos.....	24
6.3. Preparación de estándares y optimización cromatográfica.....	25
6.4. Optimización de variables que afectan e proceso.....	28
6.4.1. Optimización de variables químicas.....	28

6.4.1.1.	Efecto pH.....	28
6.4.1.2.	Adición de sal y metanol.....	29
6.4.1.3.	Tiempo de desorción y volumen de eluyente.....	32
6.4.2.	Optimización de variables hidrodinámicas.....	34
6.4.2.1.	Cinética de extracción y volumen de muestra.....	34
6.4.2.2.	Velocidad de rotación del disco	36
6.4.3.	Cantidad de fase.....	37
6.4.4.	Reutilización de la fase.....	38
6.5.	Validación del método analítico.....	39
6.6.	Comparación de recuperaciones entre fases MIP en el disco...	39
6.7.	Aplicación del método optimizado a otras moléculas.....	41
6.8.	Análisis muestra real	42
7.	Conclusión.....	45
8.	Bibliografía.....	46
9.	Anexos.....	52
9.1.	Propiedades fisicoquímicas de los fármacos estudiados.....	52

Índice de Figuras

Figura 1: Estructura de algunos antiinflamatorios no esteroideos (ibuprofeno, naproxeno, ácido acetilsalicílico)	2
Figura 2: Esquema de impresión molecular de los MIP.....	6
Figura 3: Imagen del disco rotatorio con cavidad central.....	7
Figura 4: Estructura del monómero 1-vinilimisazol, entrecruzador divinilbenceno y la plantilla de difenilamina	8
Figura 5: Estructura del diclofenaco y ácido mefenámico.....	9
Figura 6: Estructura del agente derivatizante MTBSTFA.....	10
Figura 7: Microscopia electrónica de barrido para el NIP y MIP.....	23
Figura 8: Diferencia en los porcentajes de recuperación del MIP y NIP para los analitos estudiados.....	24
Figura 9: Cromatograma de gases de un estándar de los fármacos y los estándares interno y <i>surrogate</i>	26
Figura 10: Espectros de masa de los compuestos en estudio, donde se observan los fragmentos más importantes para cada compuesto.....	27
Figura 11: Efecto del pH en la extracción.....	29
Figura 12: Diagrama de Pareto para la adición de NaCl y metanol para el ácido mefenámico.....	30
Figura 13: Diagrama de Pareto para la adición de NaCl y metanol para el diclofenaco.....	31
Figura 14: Área obtenida a diferentes tiempos de desorción y volúmenes de eluyente para el ácido mefenámico	32
Figura 15: Área obtenida a diferentes tiempos de desorción y volúmenes de eluyente para el diclofenaco.....	33
Figura 16: Curva del tiempo de extracción a 50 mL de muestra.....	34
Figura 17: Curva del tiempo de extracción a 100 mL de muestra.....	35

Figura 18: Curva del tiempo de extracción a 250 mL de muestra.....	35
Figura 19: Área de los analitos a distintas velocidades de agitación.....	36
Figura 20: Estudio cantidad de fase agregada en el disco.....	37
Figura 21: Estudio de reutilización de la fase.....	38
Figura 22: Estructura del paracetamol.....	41
Figura 23: Cromatograma de gases del afluyente de la planta de tratamiento.....	44

Índice de tablas

Tabla 1: Tiempo de retención y fragmentos de los fármacos en estudio...	26
Tabla 2: Tabla correspondiente a los valores de pH.....	28
Tabla 3: Parámetros analíticos del método.....	39
Tabla 4: Recuperaciones para todos los fármacos de la fase MIP comercial y el MIP sintetizado	40
Tabla 5: Porcentaje de recuperación para el paracetamol por parte del MIP y el NIP.....	41
Tabla 6: Concentración de fármacos en el agua de la planta de tratamiento determinada con RSDE y SPE	43

1. Introducción

1.1. Contaminantes emergentes

A principios de la década de los 90, los compuestos considerados peligrosos para el medio ambiente y la salud humana, tales como los contaminantes orgánicos persistentes (COP) y metales pesados eran un foco de interés y de conciencia como contaminantes prioritarios, siendo hoy en día menos relevantes para los países industrializados, ya que se ha logrado la reducción drástica de sus emisiones a través de la instauración de medidas de regulación y eliminación de las principales fuentes de emisión. ⁽¹⁾

En la actualidad, el foco de interés ha estado en sustancias biológicamente activas, sintetizadas por toneladas y de uso cotidiano en el sector industrial, agrícola, hospitalario, doméstico entre otros, que han sido vertidas y liberadas indiscriminadamente al medio ambiente, sin reparar en las posibles consecuencias ambientales que ello podría provocar. La presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva, pero se sabe relativamente poco o nada acerca de su presencia e impacto en el medio ambiente. Estos compuestos son los denominados “contaminantes emergentes” y su estudio tanto a nivel mundial como en nuestro país es muy escaso. Estas especies están presentes en un variado rango de productos de la vida cotidiana, como son los productos farmacéuticos de uso humano, productos veterinarios, de cuidado personal, plastificantes, aditivos industriales, etc. ⁽¹⁾

Los productos farmacéuticos, son moléculas complejas con diferentes funcionalidades (ej. antibióticos, analgésicos, antiinflamatorios, antihistamínicos, etc.) y propiedades biológicas y fisicoquímicas. ⁽²⁾

Centrándose en las drogas antiinflamatorias no esteroideas (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*) (NSAIDs), estas, reducen los síntomas de la inflamación y poseen menos efectos secundarios que sus homólogos esteroideas derivados de los corticoides.

En el grupo de los antiinflamatorios no esteroideas se encuentran el ibuprofeno, naproxeno, ácido acetilsalicílico, entre otros. (Figura 1)

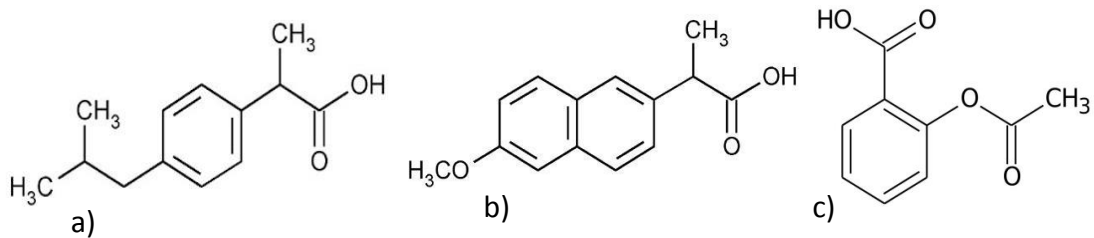


Figura 1. Estructura de algunos antiinflamatorios no esteroideos. a) ibuprofeno (ácido (RS)-2-(4-isobutilfenil) propiónico); b) naproxeno (Ácido (S)-2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico); c) ácido acetilsalicílico (ácido 2-(acetiloxi)-benzoico).

Los antiinflamatorios no esteroideos han sido detectados frecuentemente en el medio ambiente en concentraciones que van de los ngL^{-1} a los μgL^{-1} , tanto en afluentes como en efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas ⁽³⁾ ya que debido a su propiedades físico-químicas y comportamiento farmacocinético, estabilidad, vida media y metabolismo, ⁽⁴⁾ tienden a permanecer en la fase acuosa y ser capaces de penetrar a través de todos los pasos de filtración y tratamientos, y así no ser totalmente eliminados por las plantas de tratamiento de aguas, y por lo tanto, detectados frecuentemente en aguas superficiales provocando un riesgo potencial en el suministro de agua. ^(1,5)

La característica principal que se debe considerar al momento de trabajar con este tipo de compuestos, es que no necesariamente deben ser persistentes en el medio ambiente para causar un efecto negativo, ya que las velocidades de transformación/remoción se ven compensadas con el continuo ingreso de éstos en el medio acuático.⁽⁶⁾

El análisis de este tipo de contaminantes es de gran preocupación ya que se someten a transformaciones en el cuerpo humano, resultando en la liberación de cantidades significativas de una variedad de metabolitos no estudiados en su totalidad ⁽⁷⁾ y que pueden ser incluso más tóxicos que los contaminantes iniciales en sí, y de éstos, la limitada información disponible actualmente. ⁽⁸⁾

En los últimos años, se han dirigido los esfuerzos para realizar una evaluación más completa sobre el riesgo que los productos farmacéuticos, que presentes en el medio ambiente, puedan representar para los seres vivos. Todos los antecedentes indican que es necesaria una regulación futura de estos compuestos, incluso algunos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) ya están siendo considerados por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) como posibles candidatos a ser incluidos en la lista de contaminantes orgánicos prioritarios en agua potable, como es el caso del diclofenaco. ⁽⁹⁾ (Figura 5a)

1.2. Preparación de muestra

El procedimiento de preparación de la muestra, es un paso trascendental en el análisis de productos farmacéuticos que contienen grupos ácidos en su estructura y que se encuentran en cantidades traza en muestras acuosas.

La extracción en fase sólida es una técnica importante para el enriquecimiento y limpieza de muestras ambientales, que permite la preconcentración del analito, si es que éste resulta retenido en la fase sorbente, mientras que los eventuales interferentes de la matriz eluyen. ⁽¹⁰⁾ Como resultado ha sido preferida como técnica de preparación de muestra para extraer fármacos en medios acuosos. ⁽¹¹⁾ Sus beneficios van desde el tiempo de análisis, bajo costo, reducción del trabajo, hasta la rapidez, la menor manipulación de parte del analista y la reducción del consumo de disolvente. ⁽¹²⁾

Desde los años 90, la microextracción en fase sólida (*solid phase microextraction*) (SPME) ha sido introducida como una de las técnicas más usadas para la preparación de muestra en laboratorios analíticos ⁽¹³⁾. Es un proceso propicio para la extracción y preconcentración de compuestos orgánicos. Ha ganado popularidad como una herramienta simple, libre de solventes y fiable para la extracción de una variedad de compuestos volátiles y semi-volátiles. ⁽¹⁴⁾ SPME requiere menos volúmenes de solvente que la extracción en fase sólida o extracción líquido-líquido, siendo el más adecuado para el análisis de medicamentos en el agua a nivel traza. La extracción se lleva a cabo con sorbentes que tengan una alta afinidad por los analitos de interés, de manera reproducible y con baja afinidad por los compuestos interferentes. ⁽¹²⁾

Los clásicos sorbentes utilizados en las técnicas es fase sólida son el PDMS (polidimetilsiloxano), C18, adsorbentes de intercambio catiónico, resinas poliméricas (Oasis™ HLB), etc. sin embargo a estos sorbentes convencionales a menudo les falta selectividad, lo que puede constituir un problema para la extracción selectiva desde matrices complejas como lo son las ambientales. ⁽¹⁵⁾

Desde hace algunos años se ha desarrollado la tecnología de polímeros con impresión molecular (*molecularly imprinting polymer*) (MIP), que se basa en la síntesis de polímeros altamente entrecruzados con propiedades de reconocimiento molecular selectivo hacia los compuestos para los cuales fueron generados. ⁽¹⁶⁾

Los polímeros impresos resultantes son estables y resistentes a un amplio rango de pH, solventes y temperatura. ⁽¹³⁾ Poseen varios aspectos ventajosos, son fáciles de preparar, altamente selectivos, de bajo costo y pueden ser reusados, por lo que han sido explotados en varias aplicaciones, tales como sensores, capilares electrocromatográficos, separaciones enantioméricas, catálisis y adsorbentes selectivos en procesos de extracción en fase sólida para la limpieza y/o preconcentración de muestras. ⁽¹⁷⁾

Esta última aplicación es aprovechada también cuando la muestra es compleja y puede presentar interferentes, como en química medioambiental para la extracción de contaminantes en ríos y suelos, y en toxicología para la extracción de drogas y tóxicos en plasma, suero y orina ⁽¹⁸⁾.

Una de las aplicaciones más promisorias fundamentada en el uso del MIP está basado en el procedimiento de SPE convencional, ésta es la extracción en fase sólida molecularmente impresa (*molecularly imprinted solid-phase extraction*) (MISPE), por lejos la técnica MIP más utilizada ⁽¹³⁾. Aplicado a la extracción de compuestos desde matrices tales como agua, suelo, alimentos, plantas, tabaco, etc ⁽¹⁷⁾. Se han reportado varios trabajos de extracción de NSAIDs, ocupando como fase sorbente el MIP dispuesto en cartuchos de SPE, en su mayoría usando el mismo fármaco como molécula plantilla y ya sea 2-vinilpiridina o 4-vinilpiridina como monómero en la polimerización del MIP ^(19, 20-24).

Como ya se dijo, los MIPs son selectivos para un tipo de analito específico, esta selectividad se origina durante su preparación. El protocolo de polimerización consiste en que una molécula plantilla que interactúa con un monómero funcional para establecer interacciones específicas y un agente entrecruzante que produce un polímero rígido alrededor de la plantilla. Una vez obtenido el polímero, la plantilla es removida; consecuentemente, la plantilla deja impresa su estructura en el polímero, la que es responsable de las propiedades de reconocimiento de los analitos para los cuales fue diseñado (Figura 2) ⁽²⁵⁾.

Las cavidades también conocidas como sitios de unión ⁽¹⁷⁾ son complementarias en tamaño, forma y funcionalidad química al empleado como plantilla en su síntesis, ⁽²⁶⁾ y tienen potencial de re-unión con la molécula plantilla u otra molécula que tenga una estructura molecular similar a ésta, de una manera fuerte y selectiva ⁽¹⁸⁾.

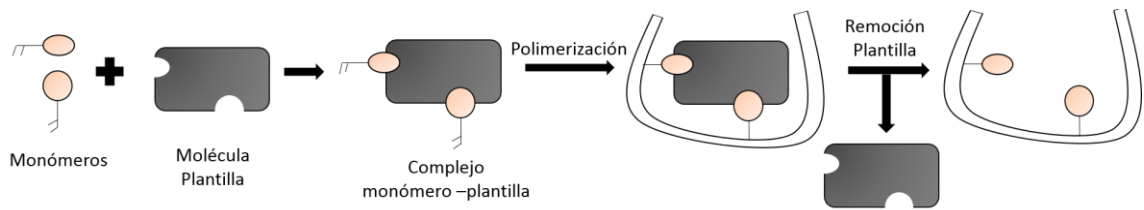


Figura 2. Esquema de impresión molecular, donde el complejo monómero plantilla es estabilizado por co-polimerización con exceso de entrecruzador. Después de la remoción de la molécula plantilla, se obtiene el polímero matriz, donde es bien definido el sitio de reconocimiento, cavidad molecular o sitio de unión en el MIP. ⁽²⁵⁾

Junto con la síntesis del MIP se sintetiza también el NIP (*non-imprinting polymer*) equivalente, éste corresponde al polímero no impreso molecularmente, en el cual se aplica el mismo procedimiento de polimerización pero en ausencia de la plantilla, teniendo las mismas propiedades químicas que el MIP, diferenciándose en la selectividad de las interacciones, siendo más selectivas en el MIP, producto de la impresión molecular.

Su síntesis se origina a modo de comparación, para descartar el efecto de las interacciones que pueda poseer el NIP con los analitos y que puede llegar a atribuirse a la cavidad presente en el MIP.

Como método de extracción en fase sólida es ampliamente utilizada la extracción por sorción con barra de agitación (*Stir Bar Sorptive Extraction*) (SBSE), que consiste en una barra recubierta con una fase estacionaria como sorbente y se sumerge en un vial que contiene la muestra para extraer el analito de la solución. La muestra se agita con el dispositivo de extracción en un tiempo determinado ⁽¹²⁾. Sin embargo esta técnica posee desventajas, como es el rápido deterioro de la fase por la continuo roce de esta con las paredes del vial que lo contiene, debido a esto no se pueden alcanzar velocidades altas de rotación.

Teniendo en cuenta lo anterior, en este estudio se pretende desarrollar un método analítico para determinar la concentración de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) presentes en muestras acuosas, mediante la técnica de microextracción por sorción en disco rotatorio, de 1,5 cm de diámetro que posee una cavidad para inmovilizar el MIP y una barra magnética incorporada que hace posible su rotación en un agitador magnético. El disco tiene una cavidad de 0,44 cm³, en el cual se inmoviliza el material sorbente MIP para la extracción de los analitos ^(27,28). Después de esto la cavidad es cubierta con un filtro de fibra de vidrio (1,4 cm de diámetro, 3 mm de tamaño medio de poros) y se sella con un anillo de teflón. (Figura 3)



Figura 3. Disco rotatorio con cavidad central ⁽²⁹⁾

Esta técnica RDSE es una alternativa a la técnica por extracción por sorción con barra de agitación (SBSE), siendo muy similar a RDSE, sin embargo la ventaja de RDSE es que la fase posee nulo contacto con las paredes del recipiente que contiene la muestra, lo que evita que a altas velocidades de rotación se dañe la fase debido al continuo roce durante la extracción.

Por otra parte, el dispositivo de RDSE posee una mayor relación área/volumen de la fase, ya que toda la fase está en contacto con la solución, es un dispositivo de menor costo, y más versátil con respecto a la fase que se quiere inmovilizar, ya que tiene la capacidad de acomodar sorbentes en polvo como es el OasisTM HLB y los MIP en este caso. Lo que permite inmovilizar el sorbente más adecuado para los analitos en estudio ⁽³⁰⁾.

Existen diversos trabajos previos referentes al disco rotatorio, que divulgan su utilización en una gran variedad de determinaciones analíticas, desde pesticidas, triclosán, hidrocarburos policíclicos aromáticos PAHs, nonilfenol, entre otros (27-37).

La polimerización del MIP utilizado en este trabajo consiste en la reacción del monómero 1-vinilimidazol con una plantilla de difenilamina (parte de la molécula de varios antiinflamatorios), luego se agrega el volumen necesario del entrecruzador divinilbenceno (Figura 4) y el iniciador 2,2'-azo-isobisbutironitrilo. Posteriormente el polímero se lava, se seca y se remueve la plantilla. El NIP se obtuvo en las mismas condiciones que el MIP pero sin agregar plantilla de difenilamina.

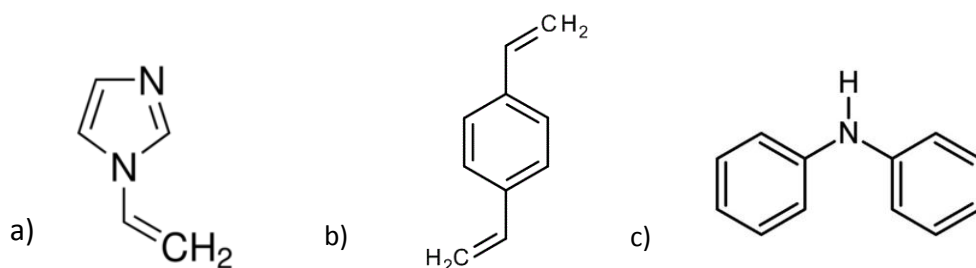


Figura 4. Estructura del monómero 1-vinilimidazol (a); el entrecruzador divinilbenceno (b); y la plantilla de difenilamina (c). Ocupados en la polimerización del MIP

1.3. Analitos estudiados

Los compuestos investigados corresponden a fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) más comúnmente usados, como el ácido acetil salicílico, ibuprofeno, ácido salicílico, naproxeno, ketoprofeno, ácido mefenámico y diclofenaco. En los que se analizará de manera cuantitativa la capacidad que posee el MIP de extraerlos en comparación con el polímero no impreso (NIP).

Ya que la polimerización se llevó a cabo en presencia de una plantilla de difenilamina (Figura 4c), se puede predecir que la selectividad, y por ende la recuperación, sea mayor en los fármacos en que su esqueleto molecular posean

la difenilamina o parte de ella, éstos son el ácido mefenámico, el diclofenaco (Figura 5) y el paracetamol (Figura 22).

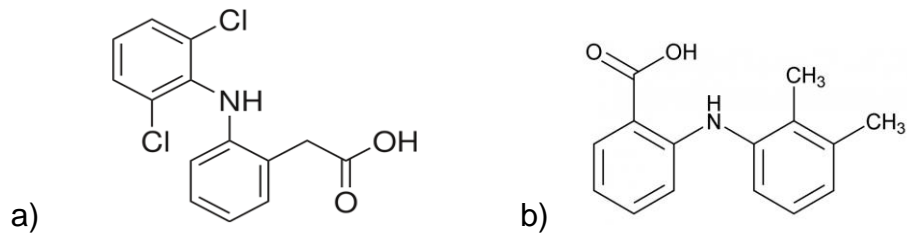


Figura 5. Estructura de los fármacos a estudiar. (a) Diclofenaco, (Ácido 2- (2-[(2,6-diclorofenil) amino] fenil] acético); (b) Ácido Mefenámico, (Ácido 2-(2,3-dimetilfenil) aminobenzoico).

El ácido mefenámico es ampliamente ocupado para el alivio de los síntomas de la dismenorrea e indicado para el tratamiento del dolor leve a moderado, incluyendo dolor menstrual.

El diclofenaco se utiliza comúnmente para reducir inflamaciones y como analgésico, pues reduce dolores causados por heridas menores y dolores intensos. Ambos fármacos entran en la categoría de antiinflamatorios no esteroideos que se excretan por la orina íntegros y/o como sus metabolitos, y por lo tanto pueden llegar a los afluentes de las plantas de tratamiento de aguas (38).

El paracetamol por otro lado no posee propiedades antiinflamatorias sino que solo analgésicas, recomendado para los síntomas de la gripe y el resfrío común, su uso común se debe a su bajo costo y fácil disponibilidad.

1.4. Determinación y cuantificación analítica

Con respecto a la determinación de estos compuestos, la Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masa (GC-MS) es una de las técnicas más usada ⁽³⁹⁾. La separación de NSAIDs por medio de cromatografía gaseosa, debe ser realizada sólo después de la derivatización de los compuestos nativos a especies más volátiles.

Varios reactivos de sililación han sido ampliamente usados para la derivatización de pesticidas y drogas, conteniendo fenólicos, carboxílicos o grupos amida en muestras ambientales y biológicas. El derivatizante N-metil-N-tert-butildimetilsilil-trifluoracetamida (MTBSTFA) (Figura 6) ha sido desarrollado con la intención de derivatizar grupos funcionales orgánicos nucleófilos (-OH, -NH, -CONH, o -COOH) ⁽⁴⁰⁾.

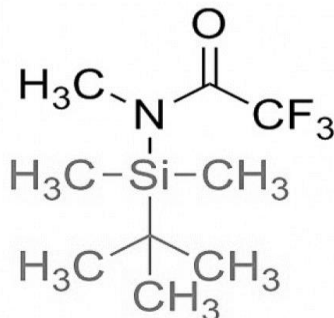


Figura 6. Agente derivatizante N-metil-N-tert-butildimetilsilil-trifluoracetamida (MTBSTFA).

Este agente derivatizante le otorga a sus derivados gran estabilidad térmica e hidrolítica, que se lo otorga el gran impedimento estérico del grupo terbutilo, que al reaccionar con el grupo carboxilo de los antiinflamatorios, concede una alta masa molecular, lo que mejora la separación cromatográfica y la detección en MS ⁽⁴¹⁾. Debido a ésto, ha sido utilizado para la derivatización de los extractos obtenidos.

2. Hipótesis

La microextracción por sistema de disco rotatorio con polímero de impresión molecular (MIP) como fase inmobilizada, permite extraer y preconcentrar de manera selectiva, fármacos antiinflamatorios no esteroidales (AINEs) presentes en matrices acuosas, reteniendo los analitos con estructura afín a la molécula usada como plantilla en la síntesis de los MIPs.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Desarrollar un método analítico para la determinación de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) desde matrices acuosas, utilizando un polímero impreso molecularmente inmovilizado en disco rotatorio, optimizando el proceso de extracción, para su posterior cuantificación mediante cromatografía gaseosa acoplada a un detector de masas (GC-MS).

3.2. Objetivos Específicos

- a) Evaluar la extracción de los analitos propuestos por parte del polímero de impresión molecular y su comparación con el polímero no impreso (NIP)
- b) Optimizar las variables que afectan la determinación de los AINEs en estudio.
- c) Comparar la eficiencia de la extracción del MIP con otras fases comerciales.
- d) Determinar las propiedades analíticas del método
- e) Aplicación del método analítico en muestras reales.

4. Materiales y equipos

a) Materiales

- Disco de teflón con cavidad, 1,5 centímetros de diámetro con barra magnética.
- Jeringa 1 mL, Hamilton.
- Material de vidrio, Vasos precipitado, pipetas aforadas, matraces de aforo, botellas Isolab y Duran.
- Micro-jeringa GC 10 uL, SGE.
- Micropipetas 5-1000 uL, Labopette.
- Papel filtro 125 mm, Whatman.
- Pipetas Pasteur Hirshmann.
- Sacabocado de golpe 12 mm de diámetro, Boehm.
- Viales de vidrio 1.8, 12, 60 mL con tapa con liner de teflón, Genesys.

b) Reactivos

- Acetato de etilo grado para cromatografía líquida, Merck.
- Ácido clorhídrico 37%, Merck.
- Acetonitrilo grado para cromatografía líquida, Merck.
- Acetona grado para cromatografía líquida, Merck.
- Agua milliQ.
- Agente derivatizante: N-metil-N-ter-butildimetilsilil-trifluoroacetamida (MTBSTFA), Sigma Aldrich.
- Cloruro de sodio 99,5%, Merck.
- Estándar diclofenaco 98% Fluka. Sigma Aldrich.

- Estándar ácido meclofenámico 98% (estándar surrogate), Sigma Aldrich.
- Estándar ácido mefenámico 98%, Sigma Aldrich.
- Estándar ibuprofeno 98%, Sigma Aldrich.
- Estándar ketoprofeno 98%, Sigma Aldrich.
- Estándar naproxeno 99%, Fluka, Sigma Aldrich.
- Estándar ácido acetil salicílico 99%, Sigma Aldrich.
- Estándar paracetamol 99,5%, Dr. Ehrenstorfer GmgH.
- Estándar fenoprop 97,7% (estándar surrogate), Dr. Ehrenstorfer GmbH.
- Estándar hexaclorobenceno (estándar interno), Merck.
- Fosfato diácido de potasio, Merck.
- Fosfato ácido de sodio, Merck.
- Hexano grado cromatografía líquida, Merck.
- Hidróxido de sodio, Merck.
- Nitrógeno extra puro 99,995%, AGA.
- Metanol grado cromatográfico, Merck.
- Sorbente SupelMIP™ NSAIDs SPE Column, Supelco.
- Sorbente MIP y NIP, Síntesis Universidad de Concepción.
- Tolueno grado cromatográfico, Merck.

c) Equipos

- Cromatógrafo de gases Thermo Fisher modelo Focus GC con detector de espectrómetro de masas con analizador de cuadrupolo, ISQ. Modo de ionización por impacto electrónico (EI), usando como gas portador helio de 99,999% de pureza y columna capilar marca Restek RTX-5MS 30 mm ID, 0,25 μm , -60 a 350 °C.
- pH metro WTW modelo Pmx 3000.
- Agitadores Bio magnetic stirrer MMS-3000 Boeco.
- Balanza analítica precisa 125A. Swiss quality.
- Vortex mixer KMC-1300V
- Evaporador VWR Analog Heatblock.
- Manifold extracción en fase sólida Supelco.

5. Metodología

5.1. Selección de los analitos

Se estudió la selectividad del MIP respecto a los fármacos antiinflamatorios. Debido a su gran comercialización y disposición en aguas residuales, se seleccionaron siete compuestos: ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, ácido salicílico, naproxeno, ketoprofeno, paracetamol, ácido mefenámico y diclofenaco. Para esto se realizó la extracción de los fármacos comparando los porcentajes de recuperación entre el MIP y el polímero no impreso (NIP) para descartar interacciones no específicas que se pudieran producir entre el fármaco y el polímero.

5.2. Preparación de estándares y optimización cromatográfica para la cuantificación de los analitos.

Se prepararon estándares concentrados de cada uno de los fármacos a estudiar con una concentración de 100 mgL^{-1} , a partir de esta solución se prepararon por dilución los estándares de los siete fármacos, más dos estándar *surrogate*, fenoprop y ácido meclofenámico, alcanzando una concentración de 2 mgL^{-1} utilizados para la determinación cromatográfica y su posterior uso en el proceso de extracción. La determinación cromatográfica de los analitos seleccionados se realizó mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa. Para la optimización se inyectaron $2 \mu\text{L}$ de cada estándar en modo *full scan* para la verificación del tiempo de retención y las masas de cada compuesto para su subsecuente estudio en modo SIM de las muestras, antes de la inyección se le agrega al extracto el estándar interno en este caso fue usado hexaclorobenceno.

5.2.1. Condiciones cromatográficas

Programa de temperaturas del horno se inicia a 100° C, se mantiene por 1 minuto, alcanzando los 280 °C a razón de 5°C/min. El tiempo total de la corrida es de 39 minutos, el *solvent delay* es de 14 minutos, la línea de transferencia una temperatura de 250 °C, la fuente de ionización a 200 °C, el flujo de gas portador a 1 mL/min y la temperatura del inyector a 240 °C en modalidad *splitless*.

5.3. Optimización de variables químicas e hidrodinámicas

Se realizó la optimización de las variables que podrían afectar la extracción de los analitos, tales como: pH, fuerza iónica, cantidad de metanol, velocidad de rotación del disco y tiempo de extracción, etc. El disco con la fase MIP se acondiciona por 5 min con 20 mL de acetato de etilo en primera instancia, luego 20 mL de metanol por 5 min y finalmente 20 mL de agua también por 5 min. Para estudiar la extracción de los analitos, se prepararon soluciones con agua milliQ y un tampón de Na₂HPO₄/KH₂PO₄ para ajustar el pH a 2. Cada muestra acuosa de 50 mL fue enriquecida con 500 µL de estándar, quedando en solución una concentración conocida de fármacos de 20 µgL⁻¹.

Dentro del vial que contiene la muestra se introdujo el disco con la fase MIP. Las condiciones de extracción fueron, velocidad de agitación a 3000 rpm por 120 min, volumen de muestra de 50 mL a pH 2 y 50 mg de MIP. Una vez extraídos los fármacos, la desorción se realizó con 10 mL de metanol por 5 min, posteriormente la solución obtenida se evaporó con N₂ a sequedad con una corriente de nitrógeno gaseoso y luego reconstituida en 500 µL de acetato de etilo. El extracto final se derivatizó con 20 µL de MTBSTFA por 1h a 60°C y se determinaron los analitos por GC-MS ⁽²⁹⁾.

5.3.1. Variables químicas

a) pH

A partir de la solución buffer los pH estudiados fueron desde el 1 a 12. Para el ajuste de pH ácidos (entre 1 y 6) se agregó HCl concentrado y para pH alcalinos (8-12) fue hidróxido de sodio.

b) Fuerza iónica y cantidad de metanol

Se estudió la fuerza iónica agregando cloruro de sodio y el efecto de la adición de metanol en la extracción, para ésto se hizo un análisis multivariado en el programa Statgraphics Centurion XV.I (versión 15.1.02) para el diseño de experimentos.

La concentración de sal fue de 0 -10 y 20 % p/v y los porcentajes de metanol en solución fueron de 0 – 10- 20 % p/v.

c) Desorción y volumen de eluyente

Para la posterior determinación de los analitos es necesario desorberlos desde la fase MIP. La eficiencia se evaluó a distintos tiempos y con diferentes volúmenes de metanol. Se hicieron pruebas variando el volumen de metanol de 5 y 10 ml, una y dos veces y 5 y 10 min de desorción.

5.3.2. Variables hidrodinámicas

a) Cinética de extracción y volumen de muestra

Para determinar el tiempo óptimo se realizaron extracciones variando el tiempo de 15 a 180 min para 50 mL de muestra con una concentración de 20 μgL^{-1} .

De la misma manera se estudió con volúmenes de 100 y 250 mL, procurando tener constante la concentración de $20 \mu\text{gL}^{-1}$ en solución.

b) Velocidad de agitación

Para establecer la dependencia de la agitación en el proceso de extracción, se hicieron pruebas a distintas velocidades de rotación del disco, de 100 a 3000 rpm por un tiempo de 120 min.

5.3.3. Cantidad de fase

Se agregó a la cavidad del disco 50, 25 y 64 mg de fase MIP cada uno por duplicado.

5.3.4. Reutilización de la fase

Al disco se adicionó 25 mg de sorbente MIP y se dispuso al proceso de extracción, luego de la desorción se hizo una nueva extracción. Este procedimiento se efectuó varias veces para establecer cuántas extracciones se pueden hacer sin disminuir la eficiencia de la extracción.

5.4. Determinación de las cifras de mérito para la validación del método.

Para validar el método es necesario obtener sus cifras de mérito.

5.4.1. Precisión

La precisión se evaluó en una muestra de agua potable enriquecida con una concentración de $20 \mu\text{gL}^{-1}$ al nivel de replicabilidad, aplicando el método

propuesto en seis extracciones utilizando diferentes discos en las mismas condiciones. La precisión es expresada como la desviación estándar relativa (RDS) de estas mediciones.

5.4.2. Exactitud

La exactitud se estudió al aplicar el método de extracción a 6 muestras de agua potable enriquecidas a una concentración de $20 \mu\text{gL}^{-1}$, esta fue determinada a partir de la recuperación.

5.4.3. Límite de detección del método

Fue calculado relacionando el área analítica de la señal del analito en una matriz de agua potable a una concentración de $20 \mu\text{gL}^{-1}$ y el ruido de fondo. El valor obtenido de la concentración que correspondería al ruido de fondo fue luego multiplicado por tres para obtener el valor del límite de detección.

5.4.4. Límite de cuantificación del método

Fue calculado de la misma manera que el límite de detección, pero en este caso la concentración correspondiente al ruido fue multiplicado por el factor 10 para obtener el límite de cuantificación.

5.4.5. Curva de Calibración

La curva de calibración se obtiene a través del área cromatográfica producida por los estándares preparados a diferentes niveles de concentración (0,5 – 500 ng/mL), normalizada por el área de la señal del hexaclorobenceno (estándar interno). Se grafica la concentración de cada analito versus la razón de área resultante, para luego determinar la ecuación de la recta.

5.4.6. Aplicación del método optimizado a otras moléculas

Se aplicó el método ya optimizado a la extracción de moléculas que no poseen la estructura de difenilamina completa en su molécula, si no que parte de ella, en ese caso se utilizó el paracetamol.

5.4.7. Aplicación del método validado a muestras reales de agua para estimar los niveles de fármacos estudiados

El método analítico estudiado fue aplicado en el agua procedente de la planta de tratamiento de aguas servidas (PTAS) La Farfana ubicada en la comuna de Maipú en la Región Metropolitana de Santiago.

Las muestras de afluente fueron tomadas en enero del 2013 y las de efluente en marzo del mismo año, almacenadas en botellas plásticas y congeladas hasta el momento de su análisis.

Se tomaron 500 ml de cada muestra, se tamponaron con buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, y se ajustó su pH. Las muestras se dividieron en alícuotas de 50 mL en viales ámbar de 60 mL que poseían el dispositivo de extracción, para luego poner en marcha el proceso de extracción.

Como técnica de confirmación se procedió a la extracción de los fármacos por un método comercial de MIP en cartuchos (SupelMIP™ NSAIDs SPE Column, Supelco), para esto las muestras de la planta de tratamiento se ajustaron a pH 3 con un tampón de formiato de amonio 10 Mm.

El cartucho se acondicionó con 1 mL de acetonitrilo, 1 mL de metanol, 1 mL de 10 mM de formiato de amonio, todo esto en un manifold para extracción en fase sólida. Se hizo pasar 10 mL de la muestra proveniente de la planta por el cartucho con un flujo de 1 mL /min.

Después del paso de limpieza que incluye un lavado de 1 mL de agua milliQ, 1 mL de mezcla acetonitrilo/agua 40:60 y 1 mL tolueno/hexano 40:60, la elución de los analitos se efectúa con 2x1 mL acetona/metanol 20:80 con 1% de ácido acético. ⁽¹¹⁾

A los extractos de ambas técnicas se los trato de la misma manera que las muestras de optimización para su posterior determinación y cuantificación en GC-MS, previa derivatización.

6. Resultados y Discusión

6.1. Caracterización del MIP y NIP

La morfología del MIP y NIP se observaron por microscopía electrónica de barrido (Figura 7) en donde se puede ver que tanto el MIP como el NIP parecen no poseer mayor diferencia estructural, por lo tanto, las diferentes propiedades de sorción para el MIP y NIP no podrían ser atribuidas a las diferencias morfológicas sino al efecto de los sitios de unión presentes en el MIP.

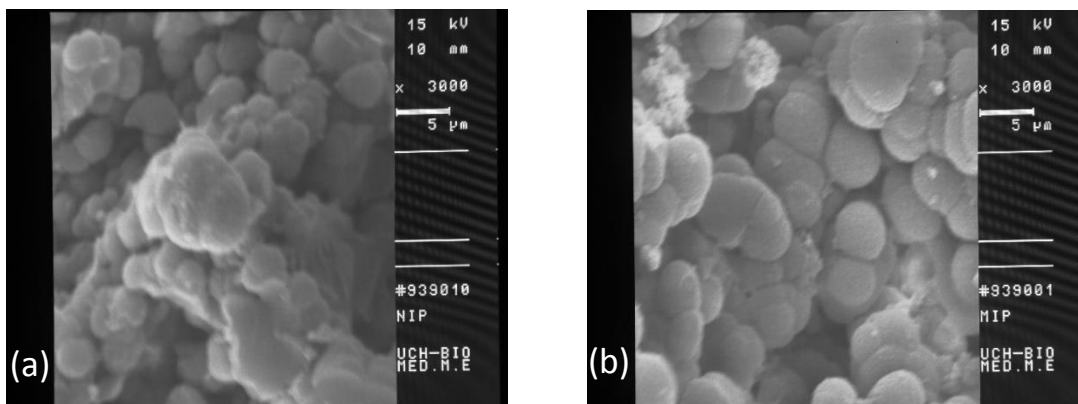


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido para el (a) NIP y el (b) MIP

6.2. Selección de los analitos

Para la selección de los analitos, en el proceso de extracción, se seleccionaron variables químicas previamente investigadas ⁽²⁹⁾. Con éstas, se llevó a cabo la extracción con el polímero no impreso e impreso molecularmente (NIP y MIP) por separado en discos independientes. La muestra es cargada en el correspondiente NIP a modo de comparación para verificar que analitos están siendo verdaderamente extraídos por su afinidad con los sitios de unión presentes en el MIP y no por las interacciones no específicas analito/polímero ⁽¹⁴⁾. Los porcentajes de recuperación de cada fármaco y su comparación con el NIP se pueden ver en la Figura 8.

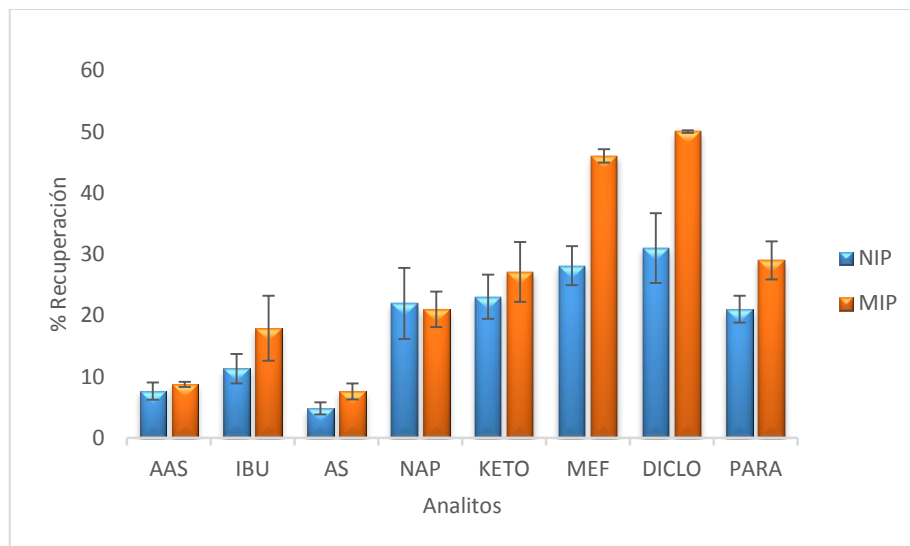


Figura 8. Diferencia en los porcentajes de recuperación del MIP y NIP para los analitos estudiados. (AAS: ácido acetilsalicílico; IBU: ibuprofeno; AS: ácido Salicílico; NAP: naproxeno; KETO: ketoprofeno; MEF: ácido mefenámico; DICLO: diclofenaco; PARA: paracetamol).

La eficiencia de extracción del NIP fue más baja que el MIP para todos los compuestos estudiados, pero concordante con lo propuesto, se observó una mayor diferencia en la recuperación entre el NIP y el MIP, en los compuestos cuya estructura es afín a la plantilla de difenilamina. Estos son el ácido

mefenámico y el diclofenaco (Figura 5), con una diferencia que varió entre el 15–19 % de recuperación entre el NIP y el MIP. Para el paracetamol se puede ver un comportamiento similar pero con menor contribución del MIP, lo que demuestra un comportamiento intermedio con respecto al ácido mefenámico y el diclofenaco, debido a su estructura (Figura 22). Estos resultados sugieren que las cavidades fueron creadas basándose en la interacción, tamaño, forma y funcionalidad de la plantilla y ya que el NIP no posee cavidades adecuadas y sitio de reconocimiento, por lo que retiene compuestos sólo por adsorción no específica ⁽¹⁹⁾.

6.3. Preparación de estándares y optimización cromatográfica para la cuantificación de los analitos.

Mediante uso de estándares se implementó un método cromatográfico que permitió la identificación y cuantificación de los analitos en estudio.

Para la identificación de los fármacos, se inyectaron en el equipo GC-MS los analitos para determinar su tiempo de retención y sus fragmentos (m/z) de cuantificación e identificación (Tabla 1). Luego se obtuvo el cromatograma y espectro de masa de cada uno de los analitos, se elaboró el programa SIM que consideró los 2 analitos en estudio más el ácido meclofenámico (estándar *surrogate*) y el hexaclorobenceno (estándar interno) para obtener la corrida completa y lograr su determinación de forma simultánea (Figura 9).

Los tiempos de retención y los fragmentos de la molécula del espectro de masa (Figura 10) obtenido de cada fármaco, fueron útiles para corroborar la presencia del analito en los análisis de optimización y muestra real.

Analito	Tiempo Retención (t_R)	M/Z Cuantificación	M/Z Identificación
Hexaclorobenceno	19,14	284	286
Ácido Mefenámico	32,57	224	298
Diclofenaco	34,21	352	354
Ácido Meclofenámico	35,57	243	244-352

Tabla 1. Tiempo de retención y fragmentos de los analitos a estudiar.

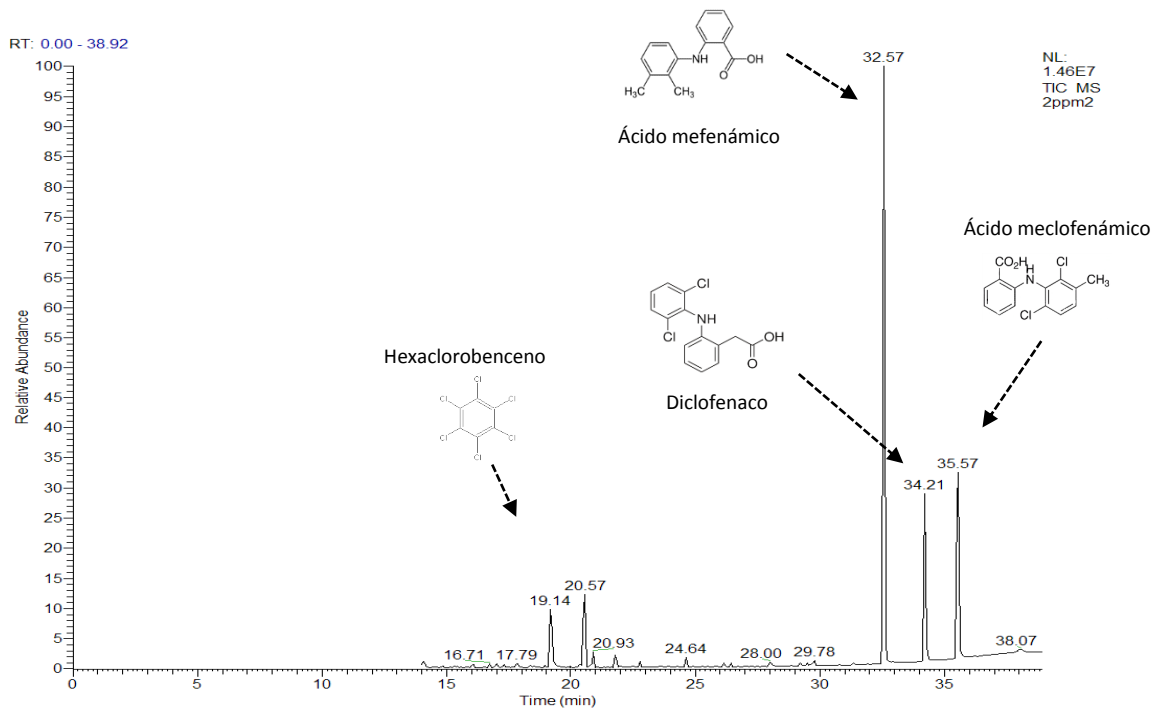


Figura 9. Cromatograma de gases de un estándar de 2 mgL^{-1} que contiene los compuestos en estudio más el estándar interno y surrogate.

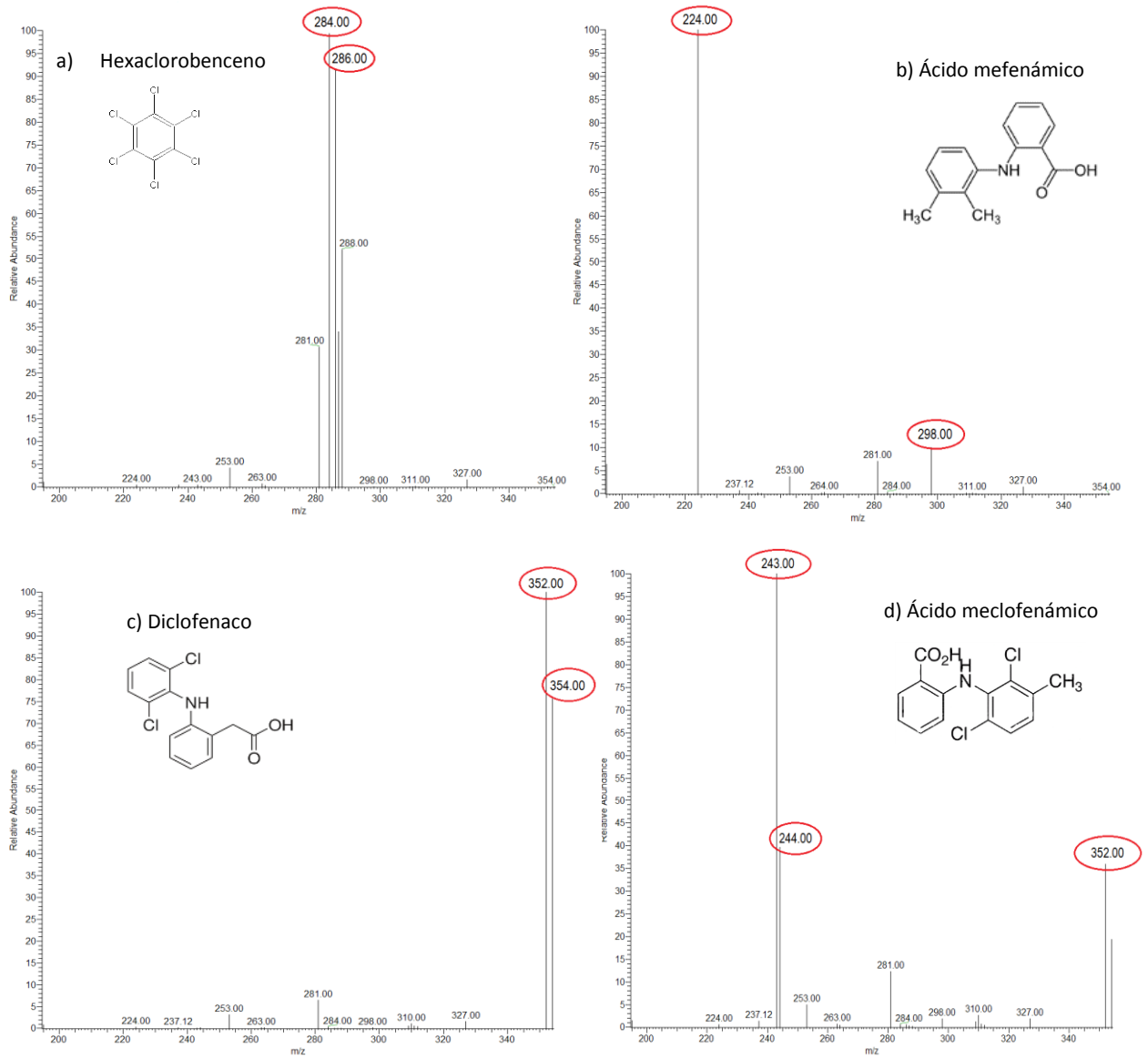


Figura 10. Espectros de masa de los compuestos en estudio donde se observan los fragmentos más importantes en la determinación analítica. (a) Hexaclorobenceno (estándar interno); b) ácido mefenámico; c) diclofenaco; d) ácido meclofenámico (estándar *surrogate*)).

6.4. Optimización de variables que afectan el proceso de extracción

6.4.1. Optimización de variables químicas

6.4.1.1. Efecto pH

El pH en el estudio de la extracción de AINEs es relevante debido a que el pH de la solución no solo afecta las propiedades de la fase, sino que también la de los analitos, dado que son ácidos débiles que interactúan de diferente manera con la fase sorbente, dependiendo si el pH está sobre o bajo el pKa del compuesto. Por lo tanto, la extracción de AINEs fue estudiada por el MIP a diferentes valores de pH.

Como muestra la Figura 11, es posible extraer AINEs más eficientemente en el intervalo de pH 1 y 4, debido a interacciones hidrofóbicas no enlazantes como las π - π entre los grupos aromáticos, también fuerzas electrostáticas y de Van der Waals entre los antiinflamatorios y los sitios de unión presentes en el MIP.

pH	ácido mefenámico	diclofenaco
1	1,9 ± 0,4	0,09 ± 0,02
2	2,4 ± 0,4	0,22 ± 0,05
4	2,33 ± 0,07	0,17 ± 0,02
6	0,7 ± 0,1	0,020 ± 0,007
8	0,2 ± 0,1	0,007 ± 0,002
12	0,141 ± 0,009	0,015 ± 0,003

Tabla 2. Tabla correspondiente a los valores de pH presentados en la Figura 11.

Sin embargo, a pH 2 se favorece la extracción para los compuestos, debido a que estos fármacos poseen una constante de disociación (pKa) cercana a 4 (Tabla anexa 1), es esperable que a pH 2 cercano al 100% de los compuestos se encuentren en su forma neutra, logrando la interacción con el MIP.

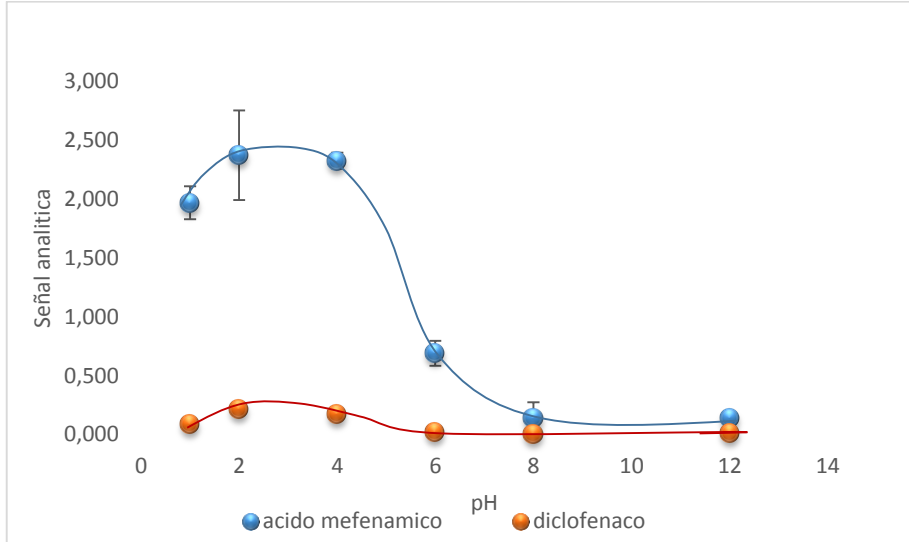


Figura 11. Efecto del pH en la extracción del ácido mefenámico y diclofenaco

Cuando el pH se hace más básico, los compuestos farmacéuticos adquieren carga negativa, como resultado se anulan las interacciones por puente de hidrógeno analito/polímero, principal fuerza durante el proceso de sorción.

6.4.1.2. Adición de sal y metanol

En términos generales, la adición de sal en solución incrementa la fuerza iónica del medio, lo que conlleva que la solubilidad en agua de los compuestos polares o semi polares disminuya cuando un electrolito es añadido a la solución, conocido como el efecto *salting out*, aumentando la transferencia de los analitos a la fase sorbente ⁽⁴²⁾. Mientras mayor es la cantidad de sal añadida a la solución acuosa, menor es la cantidad de moléculas de agua que se mantienen libres para solvatar a los analitos, esto puede reducir la solubilidad de los compuestos y de esta forma intensificar el proceso de difusión de éste hacia la fase sorbente ⁽⁴⁰⁾.

En solución los analitos muy apolares, es decir con un $\text{Log } K_{ow} > 5$ tienden a adsorberse al vidrio del vial que los contiene, para evitar esto, se utilizan modificadores orgánicos como el metanol.

Éstos, vuelven las soluciones menos polares y así aumenta la afinidad de los analitos por la solución acuosa ⁽³¹⁾.

Para corroborar lo predicho y analizar el efecto de ambos agregados de manera conjunta, se realizó un análisis multivariado de experimentos en donde se estudiaron ambas variables.

Al introducir los datos en el programa, a través de los diagramas de Pareto obtenidos de extracción de los dos fármacos (Figura 12 y 13), se obtuvo que ni la presencia de cloruro de sodio ni la de metanol, son significativos en la extracción ($p\text{-value} > 0,05$). Por tanto las condiciones óptimas de extracción, fueron 0% metanol, 0% NaCl.

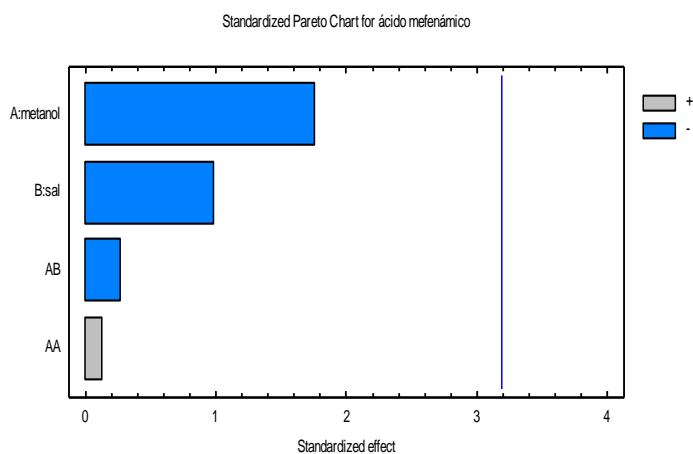


Figura 12. Diagrama de Pareto indicando la influencia de los parámetros sal y metanol para el ácido mefenámico.

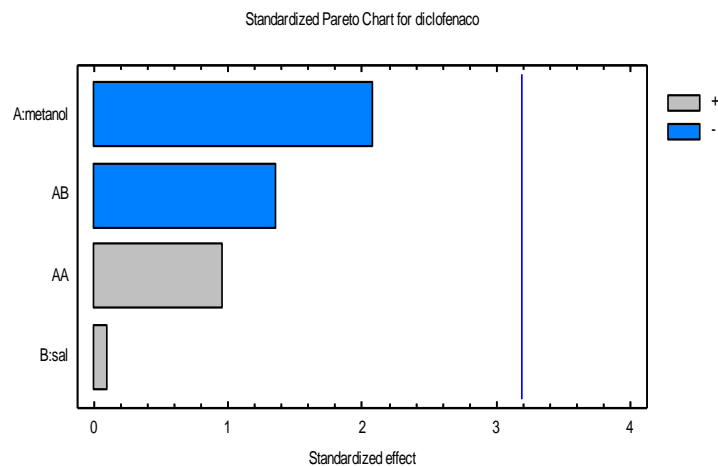


Figura 13. Diagrama de Pareto indicando la influencia de los parámetros sal y metanol para el diclofenaco.

Para el ácido mefenámico y el diclofenaco se encontró que la eficiencia de la extracción disminuyó con la incorporación de sal. Ambos compuestos poseen en su estructura un grupo carboxílico y uno amino en la mitad de la molécula (Figura 5), estos probablemente están presentes como especies protonadas al pH de estudio (pH 2), con un Log K_{ow} entre 4 - 5 (Tabla anexa 1) por lo que entran en la clasificación de hidrofóbicos, para estos compuestos la adición de sal no favorece necesariamente la eficiencia de extracción, debido a su poca afinidad por las soluciones polares ⁽⁴⁰⁾.

Otra razón a analizar puede ser que con la adición de sal, probablemente hay un aumento en la viscosidad del medio y debido a esto, la extracción se ve disminuida, lo que puede dificultar la movilidad de los antiinflamatorios hacia la fase sorbente. A su vez, la sal agregada puede depositarse en el filtro ubicado en el disco, lo que dificulta el paso de los analitos a la fase MIP y provocar una disminución de la recuperación.

Al agregar metanol y debido a que su polaridad es inferior a la del agua, la solución se tornará menos polar, produciendo que los compuestos estudiados aumenten la solubilidad en fase acuosa y presenten mayor afinidad. Lo que puede llevar a una disminución de la recuperación.

6.4.1.3. Tiempo de desorción y volumen de eluyente

Una vez presentes los compuestos en la fase sorbente es necesario un eluyente que con pequeños volúmenes, rápida y cuantitativamente logre la desorción de los analitos y que sea lo menos contaminante posible para el medio ambiente. Para esto se usó metanol como disolvente para eluir los analitos desde la fase MIP. Se estudió el tiempo de desorción y el volumen de este.

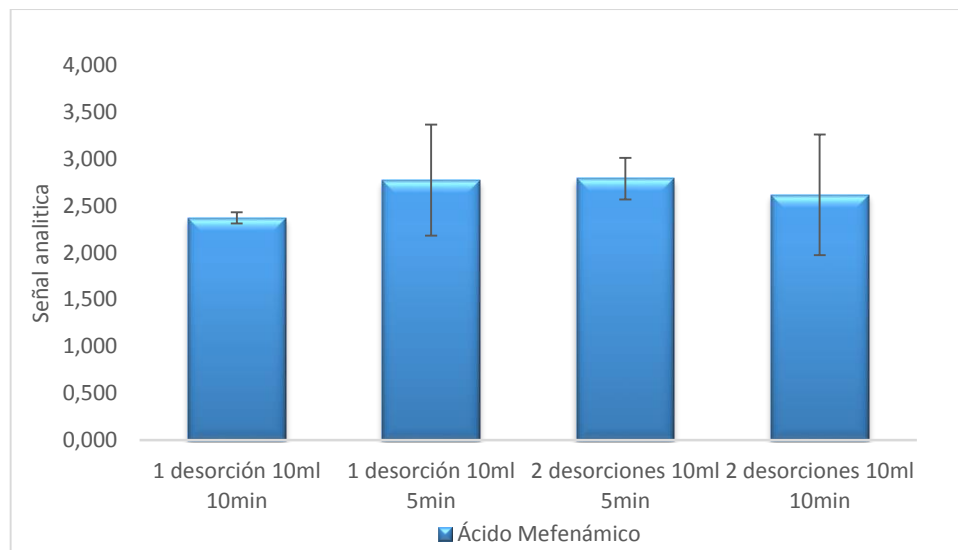


Figura 14. Área obtenida a diferentes tiempos de desorción y volúmenes de eluyente para el ácido mefenámico.

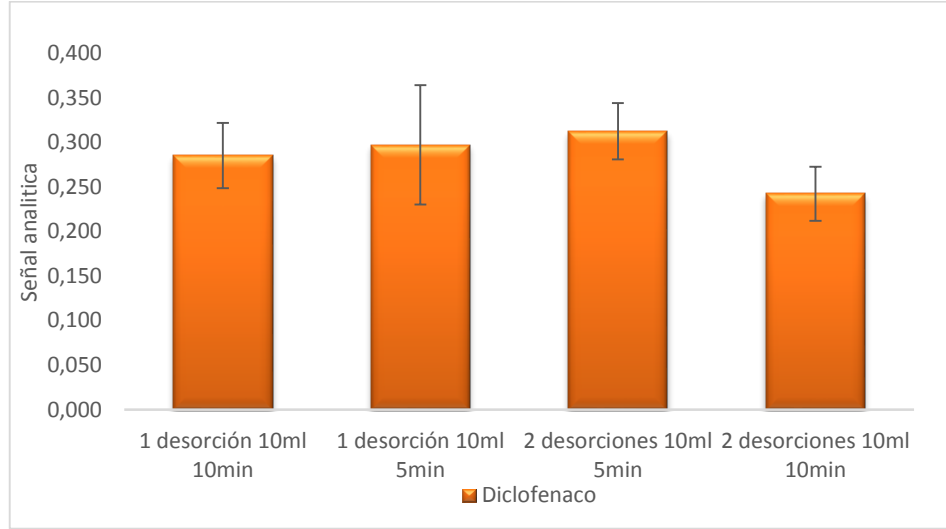


Figura 15. Área obtenida a diferentes tiempos de desorción y volúmenes de eluyente para el diclofenaco.

Como se puede ver las Figuras 14 y 15, ninguna de las características de desorción obtuvo una diferencia marcada del resto, esto se debe a la facilidad de los compuestos a abandonar la fase con la adición de un solvente con alto poder de elución como el metanol en un periodo corto de tiempo, venciendo las fuerzas intermoleculares que lo mantienen unido a la fase, debido a su característica de disolvente polar prótico, posee la habilidad de formar puentes de hidrógeno con los compuestos a eluir ⁽¹³⁾.

Debido a los resultados obtenidos, se decidió eluir los compuestos con 10 mL de metanol por 5 min secando bien la fase con una toalla de papel después de la extracción, para evitar que el agua que pueda quedar en el interior de la cavidad interfiera con el proceso de desorción.

6.4.2. Optimización de variables hidrodinámicas

6.4.2.1. Cinética de extracción y volumen de muestra

Al aumentar el tiempo de extracción, se pretende que la totalidad de los compuestos presentes en la muestra lleguen a la fase sorbente y así lograr que estos alcancen el equilibrio. Las muestras se extrajeron por RDSE en diferentes momentos que van desde 15 a 210 min utilizando un volumen de muestra de 50 mL, con esto se obtiene que los analitos llegan al equilibrio alrededor de los 60 min (Figura 16). Las recuperaciones obtenidas en este tiempo estuvieron alrededor del 97%, por lo que ese será el tiempo en el que se hará la extracción de los compuestos en estudio.

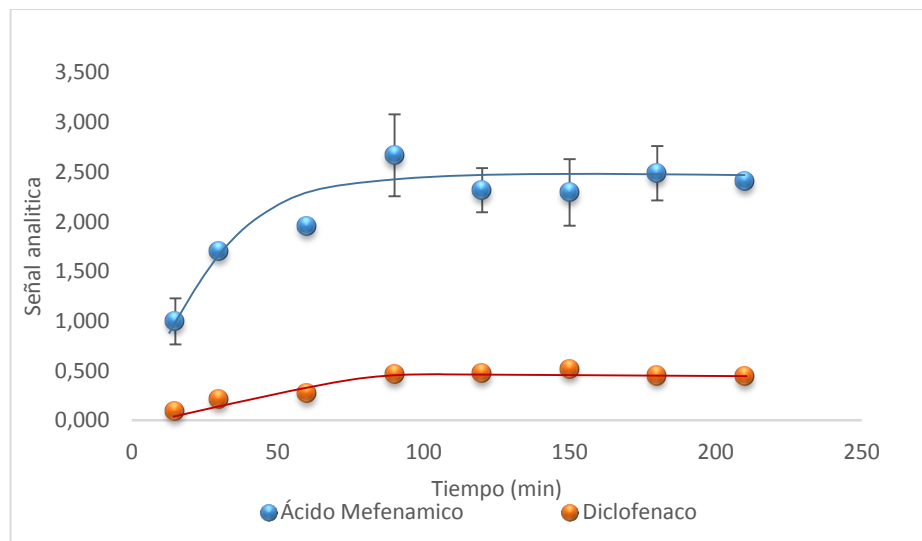


Figura 16. Curva del tiempo de extracción en 50 mL de muestra.

A medida que se aumenta el volumen de muestra de 50 a 100 y 250 mL y manteniendo la concentración de los analitos constante, se puede ver que no se alcanzó el equilibrio dentro del intervalo de tiempo estudiado (Figura 17 y 18), esto se debe a que se incrementa también el espacio donde los analitos pueden estar presentes, obteniendo una mayor estabilidad, siendo necesario aumentar

el tiempo de extracción para lograr que la totalidad de los compuestos lleguen a la fase sorbente y así conseguir que estos lleguen al equilibrio.

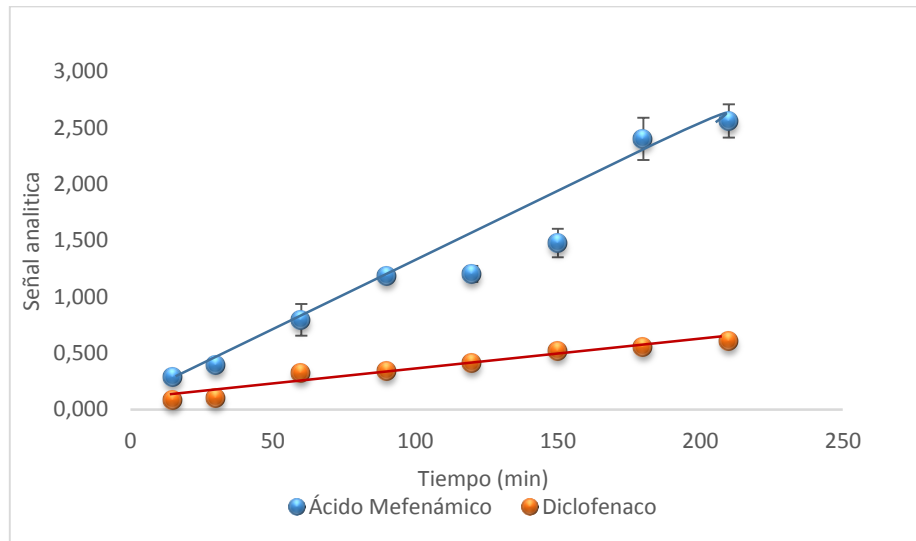


Figura 17. Área obtenida a 100 mL de solución para el ácido mefenámico y diclofenaco.

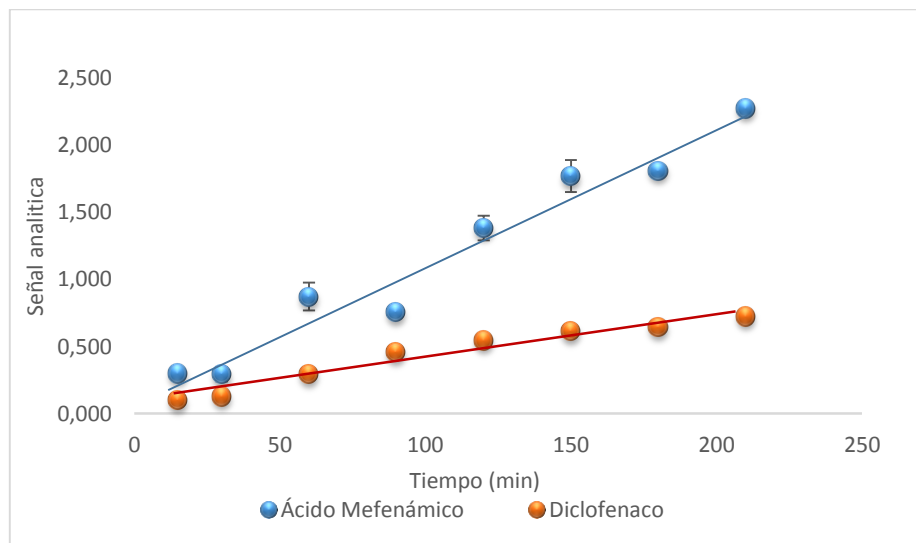


Figura 18. Área obtenida a 250 mL de solución para el ácido mefenámico y diclofenaco.

Debido a que el factor de preconcentración aumenta para el mismo tiempo de extracción, se alcanza una mayor sensibilidad del proceso a volúmenes de muestra mayores, sin embargo también se aumenta el tiempo de extracción.

6.4.2.2. Velocidad de rotación del disco

Con el fin de aumentar la rapidez del proceso de extracción, se estudió el efecto de la velocidad de agitación. A mayor velocidad de rotación, el equilibrio de partición se alcanza más rápido, dado que la velocidad de transferencia del analito hacia la fase aumenta, disminuyendo la capa estancada de agua que se encuentra presente entre la solución acuosa y la fase sorbente. Se estudiaron velocidades de rotación entre 200 y 3000 rpm observando una dependencia lineal, obteniendo una mayor velocidad de transferencia de masa a 3000 rpm (Figura 19). A esta velocidad se logró un flujo más turbulento hacia el disco, aumentando la extracción y por ende la recuperación de los analitos.

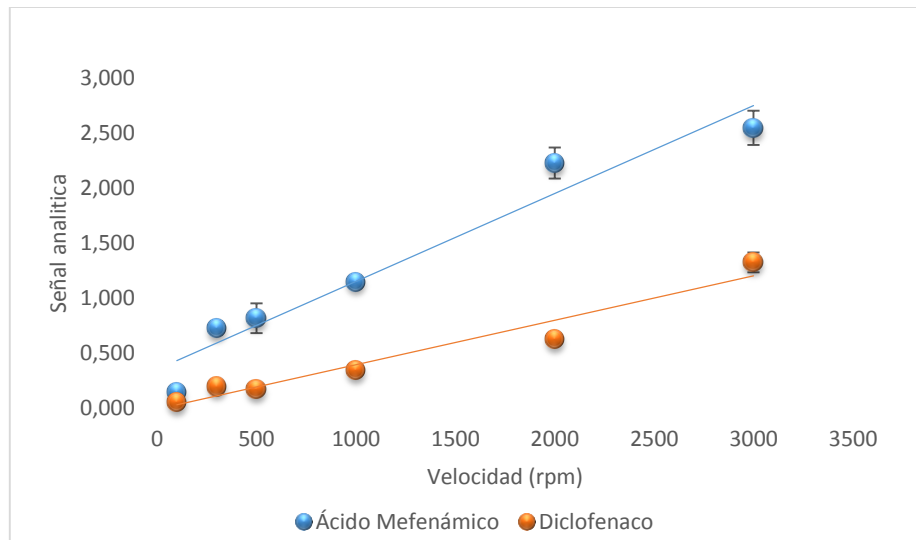


Figura 19. Área de los analitos a distintas velocidades de agitación.

6.4.3. Cantidad de fase

Se estudió la variable de la cantidad de fase a colocar en el disco, la cavidad soporta un máximo de 64 mg de fase, además de esto fue agregado 50 y 25 mg de ésta, obteniéndose conjuntamente para los dos fármacos, que al aumentar la fase disminuye la cantidad de analitos sorbidos por ella. Esto puede deberse a que al haber más cantidad de fase, ésta tiende a comprimirse y así los analitos interactúan con el MIP de manera limitada. A 25 mg quedan más espacios libres en la cavidad del disco lo que permite que la muestra interacciones de mejor forma con la fase, favoreciendo su extracción (Figura 20).

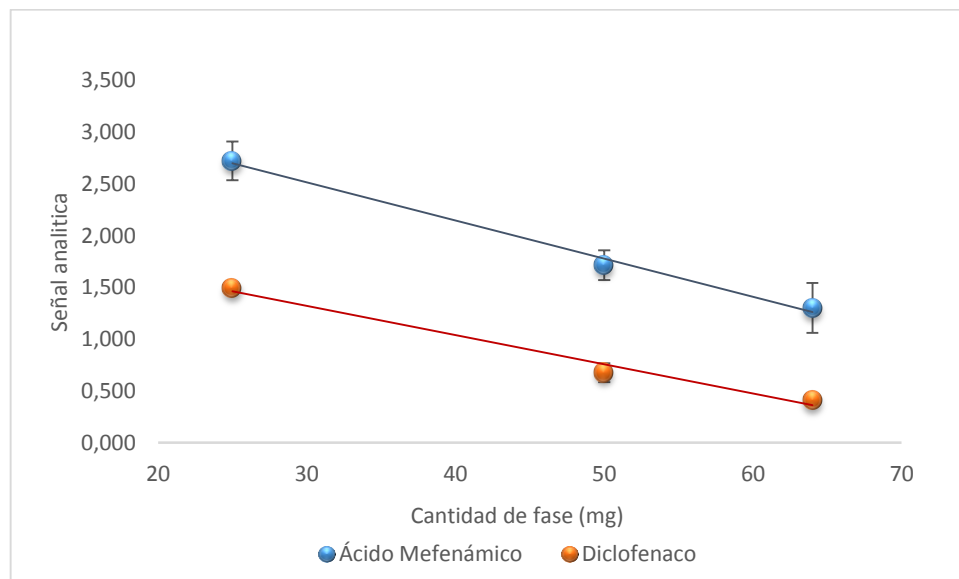


Figura 20. Estudio de la cantidad de fase agregada a la cavidad del disco.

6.4.4. Reutilización de la fase

Algo importante a tomar en cuenta cuando se estudia las condiciones de una fase sorbente para ser ocupada en microextracción es su capacidad de reutilización, debido a que esto disminuye considerablemente el costo de utilización.

Teniendo en cuenta el gráfico 10, podemos concluir que la fase en el mismo disco puede ser sometida a ciclos sorción/desorción hasta siete veces, con una desviación estándar relativa (%DSR) interdisco de 5-6% (n=6) para ambos fármacos, para luego disminuir su recuperación en promedio un 33%.

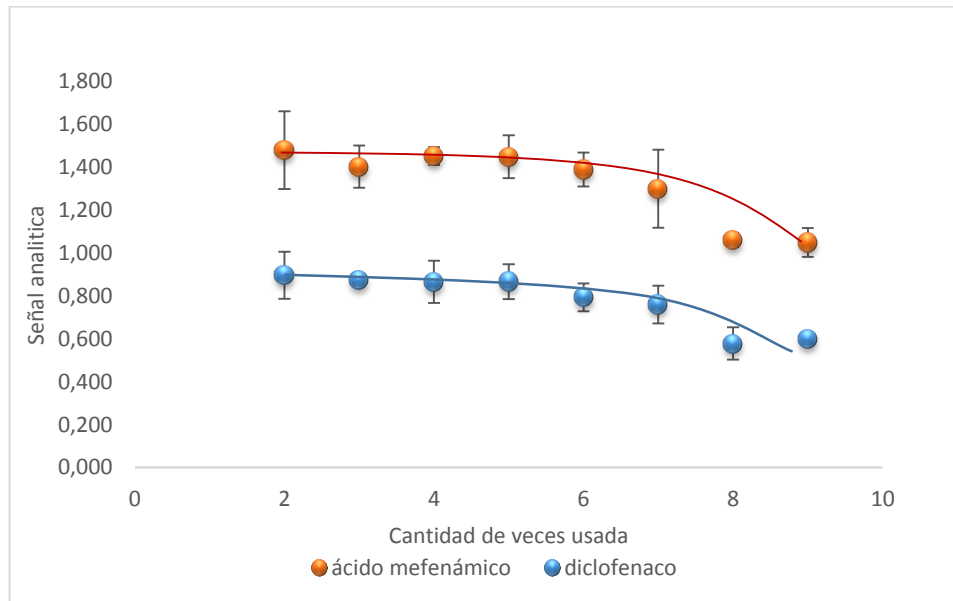


Figura 21. Estudio de la reutilización de fase

6.5. Validación del método analítico

La Tabla 3 muestra los límites de detección y cuantificación, la precisión y la recuperación del método.

Usando un disco para cada muestra, los valores de recuperación oscilan entre 99-100% con desviaciones estándar relativa interdisco (RSD) entre 5 - 6%.

Se determinó también la precisión mediante el uso secuencial del mismo disco de extracción (que contiene la misma fase sorbente) para diferentes alícuotas de la misma muestra con concentraciones de 20 μgL^{-1} ($n = 6$). La RSD intradisco en estas condiciones no cambió mucho con la interdisco, variando entre 4 - 6 %.

Analito	Linealidad (<i>r</i>)	Exactitud (%)	Precisión (% RSD)	LOD (μgL^{-1})	LOQ (μgL^{-1})
ácido mefenámico	0,9964	100	6	0,060	0,200
diclofenaco	0,9987	99	5	0,067	0,223

Tabla 3. Parámetros analíticos del método

6.6. Comparación de recuperaciones entre fases MIP en el disco rotatorio

Se compararon las recuperaciones de la fase MIP comercializada en cartuchos SPE (SupelMIP™ NSAIDs SPE Column, Supelco) y la sintetizada ocupada en esta tesis, las dos con el protocolo optimizado antes estudiado e inmovilizadas en el disco rotatorio, además del NIP correspondiente a la fase sintetizada. Para esto las recuperaciones no se corrigen por el estándar *surrogate*.

Se puede observar una clara diferencia entre las recuperaciones para las dos fases MIP, siendo la del MIP comercial similar a la recuperación obtenida en el NIP en algunos AINEs, como son el ácido mefenámico y diclofenaco, para otros, no obstante la recuperación es mayor, como para el ibuprofeno y el naproxeno (Tabla 4). Esto demuestra que el MIP comercial, no es específico para ciertos compuestos, sino que extrae todos los fármacos con bajas recuperaciones y similares entre sí.

Analito	MIP comercial (%)	NIP (%)	MIP (%)
ácido acetilsalicílico	8,0 ± 0,6	8 ± 1	9,0 ± 0,4
ibuprofeno	22 ± 5	11 ± 2	18 ± 5
ácido salicílico	6 ± 1	5 ± 1	8 ± 1
naproxeno	20 ± 3	22 ± 6	21 ± 3
ketoprofeno	36 ± 2	23 ± 4	27 ± 5
ácido mefenámico	29 ± 1	28 ± 3	46 ± 1
diclofenaco	26 ± 5	31 ± 5	50,0 ± 0,2

Tabla 4. Recuperaciones para todos los fármacos entre una fase MIP comercial y el MIP sintetizado.

Se puede ver de manera notoria la afinidad de la fase MIP por los compuestos semejantes con la plantilla de difenilamina (Figura 4c), en comparación con su NIP correspondiente. Sin embargo el MIP comercial al no poseer NIP con el cual compararlo, no se puede diferenciar cual es el aporte de las interacciones no específicas otorgadas por este último. Sin embargo es muy probable que todas las interacciones analito/polímero sean de este tipo, dada su baja recuperación (muy parecida a la del NIP).

6.7. Aplicación del método optimizado a otras moléculas

Una vez optimizado el método de extracción con el disco rotatorio y la fase MIP inmovilizada en él, se estudió la sorción de una molécula que posee la mitad de la plantilla de difenilamina, el paracetamol (Figura 22).

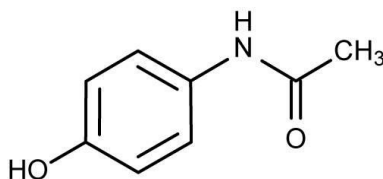


Figura 22. Estructura del paracetamol (N-(4-hidroxifenil) acetamida).

Este compuesto, posee un grupo acetamida en vez de una fenilamina, sin embargo el estudio entre el NIP y el MIP demuestra que la cavidad, al igual como sucede con los compuestos que poseen la difenilamina en su molécula, es capaz de interactuar, aunque en menor grado, con el paracetamol (Tabla 5) con recuperaciones del orden del 29% contra un 21% del NIP. La diferencia entre ambos puede deberse a que está ausente el grupo fenilamina, por lo que se disminuyen las interacciones entre la molécula y el sitio de unión.

	NIP (%Recuperación)	MIP (% Recuperación)
Paracetamol	21 ± 2	29 ± 3

Tabla 5. Porcentajes de recuperación para el paracetamol por parte del MIP y el NIP.

6.8. Análisis Muestra Real

Una vez optimizado el sistema de extracción y validado el método, se necesita demostrar su viabilidad en una muestra real acuosa obtenida de una planta de tratamiento de aguas residuales de la Región Metropolitana de Santiago, en donde se estudió la presencia de los dos fármacos en estudio: ácido mefenámico y diclofenaco. La muestra fue sometida al procedimiento extracción/desorción usando las condiciones óptimas obtenidas, un volumen de muestra de 50 mL con 25 mg de fase MIP a una agitación de 3000 rpm por un tiempo de 60 minutos, a pH 2 y desorción con 10 mL de metanol por 5 minutos. Las muestras de agua de la planta de tratamiento fueron sometidas a extracción unas sin ser enriquecida y otras enriquecidas con $20 \mu\text{gL}^{-1}$ para calcular la concentración de fármacos presente en ella.

Además, se compararon los resultados obtenidos por el método propuesto con los obtenidos a través del procedimiento de extracción en fase sólida (SPE), utilizando cartuchos de MIP comerciales (SupelMIP™ NSAIDs SPE Column, Supelco) siguiendo el protocolo descrito por Zorita ⁽¹¹⁾, método publicado para la remoción de antiinflamatorios no esteroideos con un sorbente de este tipo.

Los resultados obtenidos mostraron que es posible la determinación de los AINEs en estudio en un efluente de planta de tratamiento de aguas servidas, la cual no posee la capacidad de eliminar totalmente este tipo de contaminantes.

En estas mismas muestras, el método fue capaz de extraer el paracetamol, del que se observó la presencia en el efluente de la planta de tratamiento, con concentraciones de $1,5 \pm 0,3 \mu\text{gL}^{-1}$.

La concentración de los fármacos encontrados en el afluente y el efluente por ambos métodos se pueden ver en la Tabla 6.

Concentraciones encontradas (μgL^{-1})				
<i>Analito</i>	RDSE		SPE	
	<i>Afluente</i>	<i>Efluente</i>	<i>Afluente</i>	<i>Efluente</i>
<i>ácido mefenámico</i>	4,3 \pm 0,3	2,8 \pm 0,1	4,3 \pm 0,2	2,5 \pm 0,2
<i>Diclofenaco</i>	1,8 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	1,9 \pm 0,2	1,5 \pm 0,1

Tabla 6. Concentración de fármacos en el agua de la planta de tratamiento determinada con RDSE y SPE.

Al comparar los resultados de las concentraciones del afluente y el efluente obtenidos por la técnica RDSE y la comercializada SPE, utilizando un análisis comparativo con un 95% de nivel de confianza, no se observan diferencias significativas ($p\text{-value} > 0,05$). Sin embargo la técnica del disco con la fase MIP demuestra ser mas específica para los analitos antes señalados.

El cromatograma de gases correspondiente al afluente de la planta de tratamiento (Figura 23), muestra que el disco rotatorio con la fase MIP es capaz de extraer no solo los compuestos en estudio sino también otros muy ampliamente comercializados, como son el ibuprofeno, ácido salicílico y el ketoprofeno, etc. (como ya se vio en el ítem 6,2).

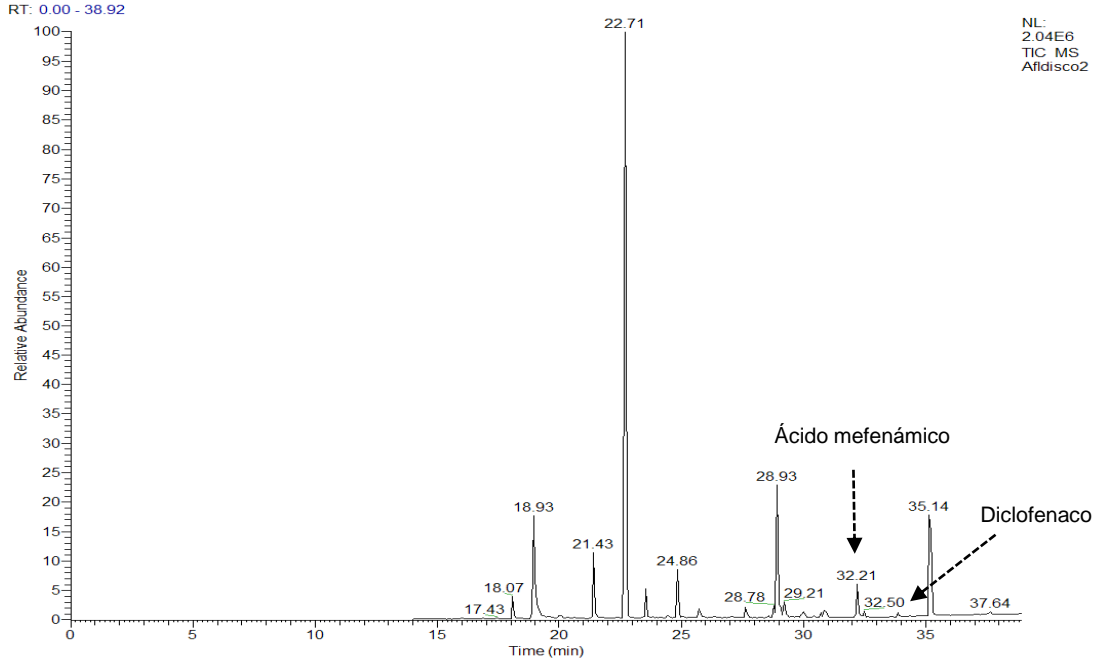


Figura 23. Cromatograma de gases del afluente de la planta de tratamiento obtenido con la técnica del disco donde se observan peaks correspondientes a los diferentes fármacos encontrados en el agua.

Podemos decir que la técnica del disco rotatorio es más sencilla que la del SPE en cartuchos, debido a que la RSDE no requiere primeramente el uso de bomba de vacío para la extracción, eliminando una de las principales variables en la extracción por cartuchos, o variadas etapas de limpieza para la remoción de interferentes. Además, tanto el dispositivo de extracción como la fase, pueden ser reutilizadas. Sin embargo, la principal desventaja de RDSE es que el tiempo implicado en la extracción, siendo para el SPE alrededor de 15 min aproximadamente, versus RSDE de 60 min.

7. Conclusión

La metodología implementada mediante el uso del disco rotatorio, permitió la extracción de antiinflamatorios desde muestras acuosas, incluyendo aguas provenientes de una planta de tratamiento de aguas servidas, de manera selectiva para los analitos con estructura afín a la molécula ocupada como plantilla en la síntesis de la fase sorbente MIP, diclofenaco y ácido mefenámico. Las concentraciones encontradas fueron de $1,8 - 4,3 \pm 0,1 - 0,3 \mu\text{gL}^{-1}$ en el afluente y de $1,3 - 2,8 \pm 0,1 \mu\text{gL}^{-1}$ en el efluente.

También el método fue capaz de extraer analitos carentes de la mitad de la molécula plantilla, como el paracetamol.

Se optimizó el método de extracción con la fase MIP en el disco, determinándose como óptimo un volumen de muestra de 50 mL con 25 mg de fase MIP a una agitación de 3000 rpm por un tiempo de 60 minutos, a pH 2 y una desorción con 10 mL de metanol por 5 minutos.

Los parámetros analíticos del método fueron, límite de detección (LOD) entre $0,060 - 0,067 \mu\text{gL}^{-1}$ y de cuantificación (LOQ) $0,20 - 0,223 \mu\text{gL}^{-1}$, con recuperaciones del 99% para el diclofenaco y 100% para el ácido mefenámico.

8. Bibliografía

- 1) Petrovic M., Gonzáles S., Barceló D. Analysis and removal of emerging contaminants In wastewater and drinking water. Trends in Analytical Chemistry. Vol. 22, No. 10, 2003. 685-696.
- 2) Kummerer K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. Journal of Environmental Management 90 (2009) 2354 -2366.
- 3) Santos L., Araujo A.N., Fachini A., Pena A., Deleure-Matos C., Montenegro M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. Journal of Hazardous Materials 175, (2010). 45-95.
- 4) Ternes T. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. Wat. Res. Vol. 32, No. 11, pp. 3245-3260, 1998.
- 5) Farré M., Ferré I., Ginebreda A., Figueras M., Olivella L., Tirapu L., Vilanova M., Barceló D. Determination of drugs in Surface water and wastewater samples by liquid Chromatography-Mass Spectrometry: Methods and Preliminary Results Including Toxicity Studies with *Vibrio Fischeri*. Journal of Chromatography 938 (2001) 187-197.
- 6) Verlicchi P., Galletti A., Petrovic M., Barceló D. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. Journal of Hydrology 389 (2010) 416-428.
- 7) Nikolaou A., Meric S., Fatta D. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments, Anal Bioanal Chem (2007) 387:1225-1234.
- 8) Gómez M.J., Gómez-Ramos M., Agüera A., Mezcua M., Herrera S., Fernández-Alba A. A new gas chromatography/mass spectrometry method for the simultaneous analysis of target and non-target organic contaminants in waters. Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 4071–4082.

- 9) Barceló L., López de Alda M. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Instituto de investigaciones químicas y ambientales-CSIC (Barcelona).
- 10) Camel V. Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta Part B* 58 (2003) 1177-1233.
- 11) Zorita S., Boyd B., Jönsson S., Yilmaz E., Svensson D., Mathiasson L., Bergström S. Selective determination of acidic pharmaceutical in wastewater using molecularly imprinted solid-phase extraction. *analytica chimica acta* 626 (2008) 147–154.
- 12) Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. Chemical Analysis: A series of Monographs on Analytical Chemistry and its Applications. Edited by Somenath Mitra. Wiley Interscience, A John Wiley & Sons, inc., Publication. Ed 62. 2003.
- 13) Tamayo F., Turiel E., Martín-Esteban A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. *Journal of Chromatography A*, 1152 (2007) 32-40.
- 14) Ligor M., Wojcik J., Buszewski B. Application of the solid phase microextraction (SPME) and gas chromatography (GC, GC/MS) in food analysis. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2004, Vol. 13/54, No 4, pp. 355-362.
- 15) Araujo L., Wild J., Villa N., Camargo N., Cubillan D., Prieto A. Determination of anti-inflammatory drugs in water samples, by in situ derivatization, solid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta* 75 (2008) 111–115.
- 16) Beltran A., Borrull F., Cormack P., Marcé R. Molecularly - imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 29, No. 11, 2010.

- 17) Caro E., Marcé R., Borrull F., Cormack P., Sherrington D. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 25, No. 2, 2006.
- 18) Anderson R., Ariffin M., Cormack P., Miller E. Comparison of molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) with classical solid-phase extraction (SPE) for the detection of benzodiazepines in post-mortem hair samples. *Forensic Science International* 174 (2008) 40-46.
- 19) Chao-Meng D., Zhang J., Ya-Lei Z., Xue-Fei Z., Yan-Ping D., Shu-Guang L. Selective removal of acidic pharmaceuticals from contaminated lake water using multi-templates molecularly imprinted polymer. *Chemical Engineering Journal* 211-212 (2012) 302-309.
- 20) Caro E., Marcé R., Comarck P., Sherrington D., Borrull F. Selective enrichment of anti-inflammatory drugs from river water samples by solid-phase extraction with a molecularly imprinted polymer. *J.Sep.Sci.* 2005, 28, 2080-2085.
- 21) Caro E., Marcé R., Comarck P., Sherrington D., Borrull F. A new molecularly imprinted polymer for the selective extraction of naproxen from urine samples by solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 813 (2004) 137-143.
- 22) Yan-Ping D., Chao-Meng D., Ya-Lei Z., Ling-Chen. Selective trace enrichment of acidic pharmaceuticals in real water and sediment samples based on solid-phase extraction using multi-templates molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta* 758 (2013) 93-100.
- 23) Sun Z., Schussler W., Sengl M., Niessner R., Knopp D. Selective trace analysis of diclofenac in Surface and wastewater samples using solid-phase extraction with a new molecularly imprinted polymer. *Analytica Chimica Acta* 620 (2008) 73-81.

- 24) Pichon V., Chapuis-Hugon F. Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants – A review. *Analytica Chimica Acta* 622 (2008) 48-61.
- 25) Lei Ye. *Molecular Imprinting, Principles and Applications of Micro-and Nanostructured Polymers*. Singapore, Pan Stanford Publishing, 2013. 2p.
- 26) Carmen del Cacho Vicente. *Polímeros de Impresión molecular para la determinación de insecticidas*. Tesis (Doctorado en Química). Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de química analítica, 2009. 15-16 h.
- 27) Richter P., Leiva C., Choque C., Giordano A., Sepúlveda B. Rotating-disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples. *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 8598-8602.
- 28) Cañas A., Richter P. Solid-phase microextraction using octadecyl-bonded silica immobilized on the Surface of a rotating disk: Determination of hexachlorobenzene in water. *Analytica Chimica Acta* 743 (2012) 75-79.
- 29) Manzo V., Honda L., Navarro O., Ascar L., Richter P. Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from waste water samples by rotating-disk sorptive extraction. *Talanta* 128 (2014) 486 – 492.
- 30) Giordano A., Richter P., Ahumada I. Determination of pesticides in river water using rotating disk sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 85 (2011) 2425-2429.
- 31) Jachero L., Sepulveda B., Ahumada I., Fuentes E., Richter P. Rotating disk sorptive extraction of triclosan and methyl-triclosan from water samples. *Anal Bioanal Chem* (2013) 405: 7711 – 7716.
- 32) Corrotea Y., Sanchez K., Rubio M.A., Richter P. Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from water samples into a Rotating-Disk microextractor and the subsequent determination by gas Chromatography-mass Spectrometry. *J. Chil. Chem. Soc.*, 49, N°2 (2014).

- 33) Jachero L., Ahumada I., Richter P., Rotating disk sorptive extraction: effect of the rotation mode of the extraction device on mass transfer efficiency. *Anal Bioanal Chem* (2014) 406: 2987-2992.
- 34) Manzo V., Navarro O., Honda L., Sanchez K., Toral M.I., Richter P. Determination of crystal violet in water by direct solid phase spectrophotometry after rotating disk sorptive extraction. *Talanta* 106 (2013) 305 -308.
- 35) Cañas A., Valdebenito S., Richter P. A new rotating-disk sorptive extraction mode, with a copolymer of divinylbenzene and N-vinylpyrrolidone trapped in the cavity of the disk, used for determination of florfenicol residues in porcine plasma. *Anal Bioanal Chem* (2014) 406:2205–2210.
- 36) Richter P., Cañas A., Muñoz C., Leiva C, Ahumada I. Rotating disk sorbent extraction for pre-concentration of chromogenic organic compounds and direct determination by solid phase spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta* 695 (2011) 73–76.
- 37) Muñoz C., Toral M.I., Ahumada I., Richter P. Rotating Disk Sorptive Extraction of Cu-Bisdiethyldithiocarbamate Complex from Water and Its Application to Solid Phase Spectrophotometric Quantification. *Analytical Sciences* May 2014, Vol. 30.
- 38) Vademecum.es, principios activos diclofenaco y ácido mefenámico. Website: < <http://www.vademecum.es/>> [en línea] [consulta: julio 2014].
- 39) Kosjet T., Heath E., Krbavcic A. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. *Environment International* 31 (2005) 679-685.
- 40) Rodriguez I., Carpinteiro J., Quintana J., Carro A., Lorenzo R., Cela R. Solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for the analysis of anti-inflammatory drugs in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1024 (2004) 1-8.

- 41) Rodriguez I., Quintana J., Carpinteiro A., Carro R., Lorenzo R., Cela. Determination of acidic drugs in sewage water by gas chromatography-mass spectrometry as *tert.*-butyldimethylsilyl derivatives. *Journal of Chromatography A*, 985 (2003) 265-274.
- 42) Sun-Kou M., Lazo J. Estudio del efecto de la Fuerza Iónica en la adsorción de fenol con arcillas organofilicas. Equilibrio y cinética. *Rev. Soc. Quim. Perú.* 75 (1) 2009.
- 43) Bottoni P., Fidente R. Un primo contributo alla problemática dei farmaci come contaminanti delle acque. *Ann Ist Super Sanità* 2005; 41 (3): 333-342.
- 44) Jan AntoniĆ J., Heath E. Determination of NSAIDs in river sediment samples. *Anal Bioanal Chem* (2007) 387:1337–1342.
- 45) Silva F., Sintra T., Ventura S., Coutinho J., Recovery of paracetamol from pharmaceutical wastes. *Separation and Purification Technology* 122 (2014) 315–322.

9. Anexos

	Solubilidad en agua (mg/L) (25°C)	Peso molecular (g/mol)	pKa	Log K_{ow} (l x kg⁻¹)	Constante de Henry (atm m³ mol⁻¹)
Ácido acetil salicílico	4,6	180,16	3,41	1,24	1,30 10 ⁻⁹
Ibuprofeno	21,0	206,28	4,91	3,97	1,50 10 ⁻⁷
Naproxeno	15,9	230,26	4,15	3,18	2,12 10 ⁻¹¹
Ketoprofeno	51,0	254,28	4,45	3,12	3,39 10 ⁻¹⁰
Ácido Mefenámico	20,0	241,29	4,20	5,12	1,65 10 ⁻⁸
Diclofenaco	2,4	296,15	4,15	4,51	4,73 10 ⁻¹²
Paracetamol	14,0	151,17	9,46	0,46	5,00 10 ⁻⁹

Tabla anexo 1. Propiedades fisicoquímicas de los fármacos en estudio. ⁽⁴³⁻⁴⁵⁾