



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

Estudio de absorción de Antiinflamatorios no Esteroidales en Plantas de Trigo y adsorción en Suelos de la Región Metropolitana

Memoria para optar al Título de Químico

Arelis Denisse Carmona Moreno

Patrocinante y Director de Memoria

Dra. María Loreto Ascar Estay

Santiago, Chile.

2012

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero darle las gracias a mis padres Omar y Sara, por todo el cariño que me brindaron desde niña, por el apoyo incondicional y por sobre todo por creer en mí. A ti amada Madre, en especial por tu esfuerzo y dedicación, por levantarme en momentos de desánimos, por iluminarme en los momentos de mayor agobio durante este largo camino, por inculcarme desde pequeña el valor del estudio y principalmente por tu amor incondicional. Sin ella nada hubiera sido posible. También agradecer a los demás miembros de mi familia; hermano, primas, tios, etc. Por el cariño y apoyo. A ti hermano te agradezco el mejor regalo que me pudiste dar, mi sobrina María Paz, la luz del hogar y el amor de nuestras vidas.

Mis sinceros agradecimientos a mi directora y patrocinante de memoria de título Dra. Loreto Ascar por la oportunidad brindada de trabajar en su área de investigación, tiempo dedicado, paciencia, calidad humana y cariño entregado durante el desarrollo de este trabajo. Sin su apoyo nada de esto hubiese sido posible.

Mis compañeros de laboratorio que siempre estaban dispuestos a explicarme el funcionamiento de algún equipo o a suministrarme el material que necesitaba para desarrollar mi memoria de título.

A mis amigas y compañeras de la vida como también a las que gane en esta linda etapa universitaria por estar siempre dispuesta a escuchar, por creer en mí y en mis capacidades, por distraerme cuando lo necesité y brindarme su amistad pese al tiempo y la distancia.

Al Proyecto FONDECYT N° 11090287 por el financiamiento que hizo posible esta investigación.

Y por último, mi novio, Sebastián, a quien amo muchísimo. Gracias por todo el amor, apoyo y comprensión. Durante el estudio de mi carrera has sido un pilar fundamental, gracias por tus palabras de aliento en los momentos difíciles, por soportarme, escucharme, hacerme reír y por sobre todo por tu amor.

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS	iii
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCION	1
1.1. Antiinflamatorios no estereoidales (AINEs)	1
1.1.1 Antecedentes generales	1
1.1.2 Antiinflamatorios derivados del ácido propiónico	3
1.1.3. Antiinflamatorios derivados del ácido acético	4
1.1.4. Antiinflamatorios no esteroidales (AINEs) en el medio ambiente.	5
1.2. Isotermas de adsorción	7
1.2.1. Isoterma de Langmuir	9
1.2.2. Isoterma de Freundlich	10
1.3. Generación de biosólidos o lodos	10
1.4. Sistema hidropónico	12
1.5. Trigo	12
1.6. Biodisponibilidad	13

2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivos generales	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. MATERIALES Y METODOS	15
3.1. Descripción de sistema hidropónico	15
3.1.1. Solución nutritiva	15
3.1.2. Germinación plantas de trigo	16
3.1.3. Montaje de sistema hidropónico	16
3.2. Estudio absorción de AINEs en plantas de trigo	17
3.3. Tratamientos de las muestras	17
3.3.1. Extracción en fase sólida con cartridge OASIS HLB de las muestras	17
3.3.2. Filtrado del extracto final de muestra	18
3.4. Cuantificación AINEs mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	18
3.5. Método de extracción de AINEs desde plantas	20
3.6. Descripción y caracterización de muestras de suelo y biosólido	20
3.6.1. Suelo Linderos	20
3.6.2. Biosólido	21
3.6.3. pH	21
3.6.4. carbono orgánico y materia orgánica	22
3.6.5. Capacidad de intercambio catiónico (CIC)	22
3.6.6. Contenido de metales pesados	23
3.7. Determinación de la capacidad de adsorción de AINEs en los distintos sistemas suelos- biosólido	23

4. RESULTADOS Y DISCUCION	25
4.1. Determinación de antiinflamatorios no esteroidales (AINEs)	25
4.2. Determinación de absorción de AINEs en plantas de trigo	32
4.3. Caracterización de suelo y biosólido	35
4.4. Isotherma de adsorción de los AINEs en suelo Linderos	37
4.5. Isotherma de adsorción de los (AINEs) en diferentes sistemas suelo- biosólido	42
5. CONCLUSIONES	49
6. BIBLIOGRAFIA	51
7. ANEXOS	56
7.1. Curvas de calibración	56
7.2. Contenido de metales trazas en suelo y biosólido	57
7.3 Cantidad de AINEs en el equilibrio y adsorbidos en los distintos sistemas suelo- biosólido	58
7.3.1. Suelo Linderos	58
7.3.2. Suelo Linderos esterilizado	59
7.3.3. Suelo Linderos con biosólido	60
7.3.4. Suelo Linderos con biosólido Esterilizados	61

INDICE DE TABLAS

Tabla

1	Características farmacocinéticas de los AINEs, según Feria (2005)	3
2	Concentración de compuestos y nutrientes para la solución nutritiva	15
3	Antiinflamatorios no estereoidales (AINEs) remanentes en la solución nutritiva	32
4	Contenido de materia orgánica y capacidad de Intercambio catiónico en suelo Linderos y biosólido	35
5	Parámetros de Freundlich, Langmuir y Kd para la adsorción de los AINEs en suelo Linderos	41
6	Parámetros de Freundlich para la adsorción de Ketoprofeno en suelo Linderos, Suelo Linderos Estéril, Suelo Linderos con biosólido y Suelo Linderos con biosólido Estériles	43
7	Parámetros de Freundlich para la adsorción de Naproxeno en suelo Linderos, Suelo Linderos Estéril, Suelo Linderos con biosólido y Suelo Linderos con biosólido Estériles	44
8	Parámetros de Freundlich para la adsorción de Diclofenaco en suelo Linderos, Suelo Linderos Estéril, Suelo Linderos con biosólido y Suelo Linderos con biosólido Estériles	45
9	Parámetros de Freundlich para la adsorción de Ibuprofeno en suelo Linderos, Suelo Linderos Estéril, Suelo Linderos con biosólido y Suelo Linderos con biosólido Estériles.	46

INDICE DE FIGURAS

Figura

1	Estructura de Ibuprofeno. Ácido (RS)-2-(4-isobutilfenil) propanoico	4
2	Estructura de Naproxeno. Ácido (S)-2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico	4
3	Estructura de Ketoprofeno. Ácido 2-(3-benzoilfenil) propanoico	4
4	Estructura de Diclofenaco Ácido 2-{2-[(2,6diclorofenil)amino]fenil} acético	5
5	Principales procesos de interacciones y movilización de contaminantes en el perfil del suelo	6
6	Principales tipos de adsorción según clasificación de Giles y col. (1974). (a) Isotherma tipo C, (b) isoterma tipo L, (c) isoterma tipo H, (d) isoterma tipo S. Adaptado de: Limousin y col. (2007).	7
7	Cromatograma de los estándares de AINEs: ketoprofeno, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno con fase móvil acetonitrilo y KH_2PO_4 50:50(v/v), en condiciones isocráticas con flujo 1 mL/min y detección UV: 220 nm	25
8	Espectro de absorción de estándar de 4 mg/L de Ketoprofeno.	26
9	Espectro de absorción de estándar de 4 mg/L de Naproxeno.	26
10	Espectro de absorción de estándar de 4 mg/L de Diclofenaco	27
11	Espectro de absorción de estándar de 4 mg/L de Ibuprofeno	27
12	Composición del Copolímero OASIS HLB	29

13	Estudio de recuperación de distintos fármacos con y sin ajuste de pH, según Gross y col., (2006)	30
14	Recuperación con distintos solventes, según Santos y col., (2005)	31
15	Cromatograma de muestra de plantas (10ug/L), fase móvil acetonitrilo y KH_2PO_4 50:50 % (v/v), en condiciones isocráticas con flujo 1 mL/min y detección UV: 220 nm.	33
16	Cromatograma de muestra de plantas (60ug/L), fase móvil acetonitrilo y KH_2PO_4 50:50 % (v/v), en condiciones isocráticas con flujo 1 mL/min y detección UV: 220 nm.	33
17	Concentración total de Cu, Zn, Ni, Pb, Cr y Cd en suelo Linderos y biosólido	36
18	Isoterma de adsorción para cada AINEs en suelo Linderos	37
19	Ajuste al modelo matemático de Freundlich, para la isoterma de adsorción de Diclofenaco	39
20	Ajuste al modelo matemático de Lagmuir, para la isoterma de adsorción de Diclofenaco	40
21	Isoterma de adsorción de Ketoprofeno en suelo Linderos, suelo Linderos estéril, suelo Linderos con biosólido y suelo Linderos con biosólido estériles	42
22	Isoterma de adsorción de Naproxeno en suelo Linderos, suelo Linderos estéril, suelo Linderos con biosólido y suelo Linderos con biosólido estériles	43
23	Isoterma de adsorción de Diclofenaco en suelo Linderos, suelo Linderos estéril, suelo Linderos con biosólido y suelo Linderos con biosólido estériles	44
24	Isoterma de adsorción de Ibuprofeno en suelo Linderos, suelo Linderos estéril, suelo Linderos con biosólido y suelo Linderos con biosólido estériles	45

RESUMEN

En la actualidad, existen diversas plantas de tratamiento de aguas servidas, cuyos residuos, los biosólidos, pueden ser usados como fertilizantes complementarios y/o remediadores de suelos. Sin embargo, éstos pueden contener diversos tipos de contaminantes como metales traza, compuestos orgánicos e inorgánicos y compuestos de origen farmacéuticos.

Aunque el organismo es capaz de metabolizar un porcentaje importante de los fármacos ingeridos, un porcentaje de estos se excreta junto con los metabolitos resultantes de la digestión del fármaco a las aguas. Este hecho, puede afectar al medio ambiente, debido al fenómeno de bioacumulación y toxicidad del fármaco, convirtiéndolo en un contaminante emergente.

El creciente uso de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), se debe a sus efectos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos, razón por la cual su incidencia en el medio ambiente es cada vez mayor.

El objetivo de este estudio es determinar el comportamiento de los AINEs (Naproxeno, Ketoprofeno, Ibuprofeno y Diclofenaco), a través de la estimación de la capacidad de absorción en plantas de trigo en sistema hidropónico, junto con determinar la capacidad de adsorción de los AINEs en distintos sistemas suelo-biosólido.

El sistema hidropónico de raíz flotante, consistió en una serie de recipientes plásticos, sobre los cuales se colocaron placas de plumavit, donde se dispusieron las plantas, quedando de esta manera la raíz flotando en solución nutritiva.

Además, se determinó la capacidad de adsorción en suelos por medio de isothermas de adsorción, para conocer el tipo de interacción que existe en la interfase suelo-solución; además se estudió el efecto sobre la adsorción, de la incorporación de biosólidos no esterilizado y esterilizado sobre suelos sin esterilizar y esterilizado.

La presencia de antiinflamatorios en las muestras se determinó mediante HPLC con detector de arreglo de diodos, trabajando con una columna C18 (5 μ m; 250 mm x 4,6 mm), utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo con fosfato diácido de potasio 50 mM a pH 4,2-4,5 a un flujo de 1 mL/min.

La baja absorción de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), en plantas de trigo encontradas en este estudio, se pueden deber principalmente a fenómenos de fotodegradación y degradación enzimática.

Todas las isotermas de adsorción se ajustaron a la ecuación de Freundlich y se determinó su coeficiente de partición o de reparto K_d , el cual nos indica la mayor o menor capacidad de un compuesto químico a ser adsorbido por la fracción sólida del suelo. Dado que para el caso de estas isotermas de adsorción, K_d (L/g) varía con la concentración inicial de AINEs agregada, su valor fue estimado calculando el promedio de todos los puntos de cada isoterma, para así tener una estimación global del proceso de adsorción con todas las concentraciones usadas en el estudio.

En general, se determinó que la adsorción de Ibuprofeno fue menor en todos los sistemas suelo-biosólidos en estudio, en comparación con los otros tres antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

Si bien, la degradación microbiana tiene un papel fundamental en la degradación de los AINEs en estudio, existen otros tipos de degradaciones involucradas, como lo son la degradación oxidativa, fotodegradación, entre otras. En este estudio, solo se evaluó la degradación microbiana, al esterilizar tanto el suelo como el biosólido. A partir de esto, se determinó que para el caso del Diclofenaco y Ketoprofeno este tipo de degradación juega un rol importante, ya que al suprimir la actividad microbiana esterilizando el suelo, la adsorción de estos antiinflamatorios aumentó con la incorporación de biosólido estéril, en comparación con el suelo sin esterilizar. En cambio en el caso de Naproxeno e Ibuprofeno, se encontró que la adsorción no aumentó al inhibir la actividad microbiana, por ende se puede concluir que este tipo de degradación no es preponderante.

SUMMARY

“Absorption study of nonsteroidal anti-inflammatory in wheat plants and adsorption in soils of the Region Metropolitana”

At the present time, there are several treatment plants wastewater whose residues, biosolids, can be used as fertilizer complementary and / or remedial soil. However, they may contain various types of pollutants such as trace metals, organic and inorganic compounds and compounds of pharmaceutical origin.

Although the body can metabolize a significant percentage of ingested drugs, a percentage of these are excreted with the metabolites resulting from digestion of the drug into the water. This fact can affect the environment, due to bioaccumulation and toxicity of the drug, making it an emerging contaminant.

The increasing use of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs), is due to its anti-inflammatory, analgesic and antipyretic, so its impact on the environment is growing.

The objective of this study is to determine the behavior of NSAIDs (Naproxen, Ketoprofen, Ibuprofen and Diclofenac), through the estimate of the absorption capacity in wheat plants in hydroponic system, along with to determine the adsorption capacity of NSAIDs in different soil-biosolid systems.

The floating root hydroponic system consisted of a series of plastic containers which were placed on Styrofoam plates, where plants are arranged, being in this way the root floating in nutrient solution.

In addition, we investigated the adsorption capacity in soils through adsorption isotherms, to know the type of interaction that exists in the soil-solution interface; also studied the effect on the adsorption of the incorporation of non-sterile and sterile biosolids on unsterilized and sterilized soils.

The presence of anti-inflammatory in the samples was determined by HPLC with diode array detector, working with a C18 column (5 μ m, 250 mm x 4.6 mm), mobile phase was a mixture of acetonitrile with potassium dihydrogen phosphate 50 mM at pH 4.2 to 4.5 at a flow rate of 1 mL / min.

The low absorption of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs), found in wheat plants in this study may be due mainly to photodegradation phenomena and enzymatic degradation.

All adsorption isotherms were fitted to the Freundlich equation and determined its partition coefficient or distribution K_d , which indicates the greater or lesser capacity of a chemical compound to be adsorbed by the solid fraction of the soil. As in the case of these adsorption isotherms, K_d (L / g) varied with the initial concentration of NSAIDs added, its value was estimated by averaging all points of each isotherm, thereby having an overall estimation of the process of adsorption at all concentrations used in the study.

In general, it was found that adsorption of ibuprofen was lower in all systems studied soil-biosolids, compared with the three other non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs).

Although microbial degradation plays a fundamental role in the degradation of NSAIDs under study, other types of degradation involved, such as oxidative degradation, photodegradation, among others. In this study only evaluated the microbial degradation, to sterilize both soil and biosolids. Based on this, we determined that for the case of Diclofenac and Ketoprofen this type of degradation plays an important role, that by removing microbial activity sterilizing the soil, the adsorption of these inflammatory increased with the addition of sterile biosolids, compared with non-sterile soil. In contrast, in the case of naproxen and ibuprofen was found that the adsorption do not increased when was inhibited microbial activity, hence can be concluded that this type of degradation is not predominant

1. INTRODUCCION

1.1. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

1.1.1. Antecedentes generales.

En la actualidad, el creciente uso de fármacos tanto en humanos como en animales se está convirtiendo en un nuevo problema medioambiental y, por ello, ha ido en aumento el interés en tener información sobre su presencia en el medio ambiente y sus posibles efectos adversos en humanos y en los sistemas ecológicos (Daughton y col., 1999; Halling-Sorensen y col., 1998; Heberer, 2002).

La cantidad de productos farmacéuticos en el medio ambiente depende de la cantidad de droga fabricada, la frecuencia de dosificación y la eficiencia de excreción. Por otra parte, los compuestos farmacéuticos ingeridos, pueden ser transformados al interior del organismo a uno o más metabolitos y pueden ser excretados, ya sea como los compuestos originales, como sus metabolitos o como una mezcla de éstos. (Gomez y col., 2006). Tanto los fármacos como sus metabolitos al ser excretados, pueden entrar en el sistema de alcantarillado a través de la orina y las heces descargadas. En las plantas de tratamiento de aguas residuales, donde los residuos farmacéuticos no son totalmente eliminados y, por tanto, son vertidas en las aguas receptoras, contaminando sedimentos y suelos (Stumpf y col., 1999; Golet, y col., 2001; Ternes y col., 1999; Ternes, 1998).

Pese a que la cantidad de productos farmacéuticos y sus metabolitos que ingresan al medio ambiente es probablemente baja, su continuo ingreso podría generar acumulaciones en un futuro no muy lejano y provocar efectos adversos tanto en organismos acuáticos como terrestres.

Algunos de los productos farmacéuticos más representativos en las plantas de tratamiento de aguas residuales son: antibióticos, antiinflamatorios no esteroideos

(AINEs), reguladores de lípidos, fármacos antiepilépticos y los medios de contraste radiológico (Carballa y col., 2004).

En general, se considera que entre los fármacos, los antibióticos son los de mayor importancia ya que pueden generar una resistencia potencial por parte de los microorganismos. Sin embargo, existen otros compuestos farmacéuticos, especialmente los de carácter polar, como drogas antiinflamatorias ácidas y reguladores de lípidos que merecen especial atención.

Cerca de 30 millones de personas en el mundo consumen diariamente antiinflamatorios no esteroidales (AINEs), de los cuales el 40% aproximadamente son mayores de 60 años (UNIVERSIA, 2009). En Chile, el control sobre la venta de antiinflamatorios no esteroidales (AINEs) es escasa o nula. Ellos pueden ser adquiridos libremente en farmacias y algunos de ellos incluso en las calles, lo que facilita el acceso de las personas a estos productos y estimula su abuso (Riedemann y col., 2001). Este elevado consumo se debe a sus acciones farmacológicas características, que son aliviar el dolor (acción analgésica), reducir la inflamación (acción antiinflamatoria) y reducir la fiebre (acción antipirética).

Pese a sus diversos beneficios, los AINEs comparten una capacidad elevada de provocar reacciones adversas de intensidad y gravedad diversa, como por ejemplo: irritación gástrica, problemas hemorrágicos, erupciones cutáneas, mareos, cefalea, ansiedad, visión borrosa, insuficiencia renal, etc., de las cuales no son conscientes generalmente los consumidores, por lo tanto, su toxicidad aguda y crónica reviste interés y constituye un motivo de preocupación (Feria, 2005).

Su mecanismo de acción general consiste en inhibir la actividad de las ciclooxigenasas, enzimas que convierten el ácido araquidónico, que se encuentra en las membranas celulares, en endoperóxidos cíclicos inestables, los cuales se transforman en prostaglandinas y tromboxanos. Algunos de estos eicosanoides participan, en diverso grado, en los mecanismos patógenos de la inflamación, el dolor y la fiebre, por lo que la inhibición de su síntesis por los AINEs sería responsable de su actividad terapéutica.

En la actualidad se dispone de numerosos fármacos que, aunque pertenecen a diferentes familias químicas, se agrupan bajo el término AINEs. Dentro de los más usados en Chile se encuentran los derivados del ácido propiónico (ibuprofeno, naproxeno y ketoprofeno) y un derivado del ácido acético (diclofenaco). (Feria, 2005).

Tabla 1: Características farmacocinéticas de los AINEs, según Feria (2005)

Fármacos	Biodisponibilidad (%)	T_{1/2} (h)
Ácidos Propiónicos		
Ibuprofeno	>80	2-3
Naproxeno	99	14
Ketoprofeno	100	1,8
Ácidos Acéticos		
Diclofenaco	54	1-2

Biodisponibilidad: en el cuerpo una vez ingerido el fármaco, t_{1/2}: tiempo de vida media antes de ser metabolizado.

1.1.2. Antiinflamatorios derivados del ácido Propiónico.

Son derivados del ácido fenilpropiónico y, aunque sus estructuras químicas sean relativamente diferentes (Figuras 1-3), forman un grupo bastante homogéneo por sus características farmacológicas. Tienen acción analgésica, antitérmica, antiinflamatoria y antiagregante plaquetaria. Se absorben de forma bastante completa por vía oral (99%) (Tabla 1). Su metabolismo es intenso y variado, de forma que la excreción renal de la forma libre es mínima (en general menor al 1%) (Feria, 2005).

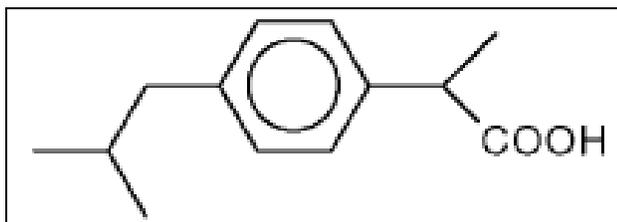


Figura 1: Estructura de Ibuprofeno.
Ácido (RS)-2-(4-isobutilfenil) propanoico

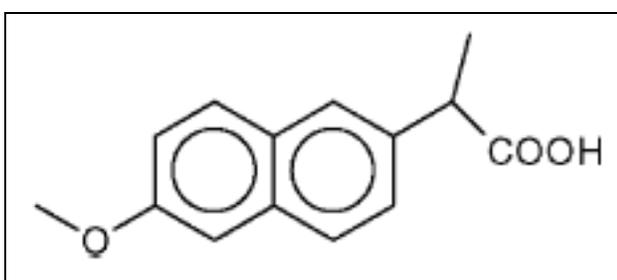


Figura 2: Estructura de Naproxeno.
Ácido (S)-2-(6-metoxi-2-naftil)propanoico

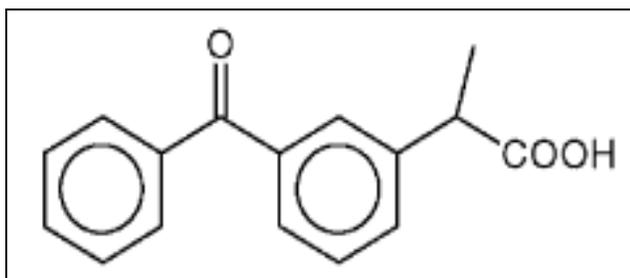


Figura 3: Estructura de Ketoprofeno.
Ácido 2-(3-benzoilfenil)propanoico

1.1.3. Derivados del ácido acético.

Es un conjunto de fármacos que comparten diversos sistemas cíclicos (anillos indólicos, pirrólicos, fenilos) que contienen moléculas de ácido acético. El diclofenaco pertenece a la serie fenilacético (Figura 4) y es de amplio uso en nuestro país. Posee actividad analgésica, antitérmica y antiinflamatoria potente; su eficacia es comparable a la de los derivados del ácido propiónico (Feria, 2005).

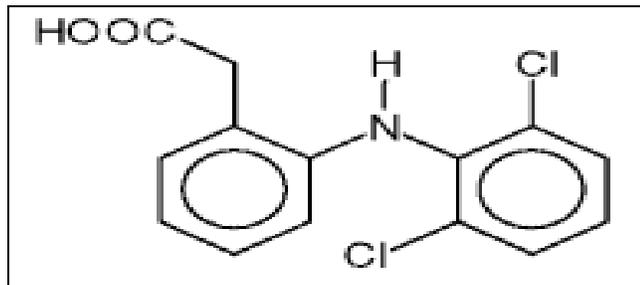


Figura 4: Estructura de Diclofenaco
Ácido 2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acético.

1.1.4. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en el medio ambiente.

Gran parte del antiinflamatorio ingerido es metabolizado por organismo(99%), mientras que el restante (<1%), se excreta a las aguas junto con los metabolitos resultantes de la digestión del fármaco; estas aguas llegan a las Plantas de Tratamiento de Aguas Servidas donde al final del tratamiento una fracción de estos compuestos pueden quedar retenidos en los biosólidos y, por lo tanto, si son utilizados como remediadores o fertilizantes en suelos agrícolas, pueden afectar al medio ambiente, debido al fenómeno de bioacumulación y toxicidad del fármaco en estos suelos, convirtiéndolo en un contaminante emergente.

Por lo tanto si éstos llegan al suelo, pueden interactuar o degradarse en las diferentes zonas de éste, estas interacciones se muestran en la figura 5.

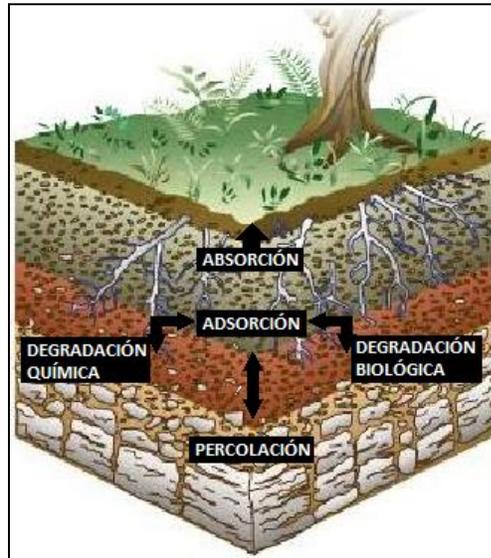


Figura 5: Principales procesos de interacciones y movilización de contaminantes en el perfil del suelo

La absorción de contaminantes se realiza a través de las plantas, dependiendo de factores externos como la temperatura y el pH del suelo. Otros factores importantes que inciden en la penetración del contaminante son su peso molecular e hidrofobicidad que determinan que estas moléculas atraviesen las membranas celulares de la planta. Después de cruzar la membrana, los contaminantes son distribuidos a través de toda la planta.

El proceso de adsorción de un producto químico se ve afectado por múltiples comportamientos ambientales, incluyendo el movimiento, la captación de la planta (biodisponibilidad), las características físicas y químicas del medio receptor (agua, suelo, sedimento), entre otras. Los AINEs entrarán al suelo, se producirá su adsorción y ésta a su vez influirá en las posibilidades de degradación tanto química como biológica, esta última principalmente por acción de los microorganismos presentes. Por otra parte, su potencial de lixiviar dependerá del equilibrio existente en la interfase suelo-solución del suelo; si dicho potencial es elevado también lo será la posibilidad de contaminar aguas.

1.2. Isotermas de adsorción.

Una manera de determinar la capacidad de adsorción de un analito, es a través de la realización de isotermas de adsorción, que relacionan la cantidad de una especie química que es adsorbida desde la solución de suelo y la que se mantiene en ella hasta alcanzar un estado de equilibrio a temperatura y presión constante. En general, el estudio del comportamiento de la capacidad de adsorción puede ser realizada mediante la identificación de la forma y curvatura de las isotermas de adsorción y/o mediante su formulación matemática (Tan, 1998).

De acuerdo a su forma y curvatura, las isotermas de adsorción pueden clasificarse como isotermas tipo C, L, H y S (Giles y col., 1974). La representación gráfica de los distintos tipos de isotermas se puede observar en la figura 6, en donde Q es la cantidad adsorbida por unidad de masa del sólido adsorbente y C es la concentración de equilibrio del adsorbato en la solución, luego de la adsorción.

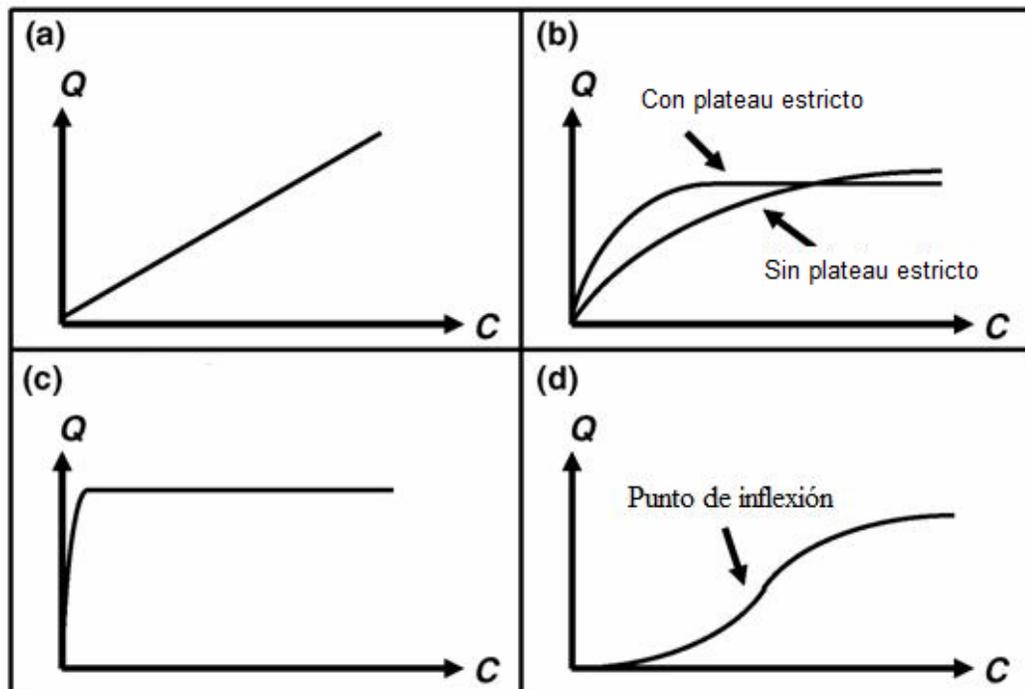


Figura 6: Principales tipos de adsorción según clasificación de Giles y col. (1974). (a) isoterma tipo C, (b) isoterma tipo L, (c) isoterma tipo H, (d) isoterma tipo S. Adaptado de: Limousin y col. (2007).

La isoterma tipo C (figura 6a) es una curva en donde la relación entre la concentración del compuesto remanente en la solución y el adsorbido en el sólido es constante, independiente de cuál sea la concentración. Esta relación es usualmente conocida como “coeficiente de distribución” (K_d) o como “coeficiente de partición” (K_f) (L/kg). La isoterma tipo C usualmente es utilizada como una aproximación (para un rango limitado de concentración o muy bajas concentraciones) más que para una descripción exacta.

En la isoterma tipo L la relación entre la concentración del compuesto remanente en la solución y el adsorbido en el sólido decrece a medida que se incrementa la concentración de soluto, obteniéndose una curva cóncava (figura 6b). Generalmente este tipo de curva se puede presentar con o sin plateau estricto. La curva con plateau estricto indica que el sólido presenta una limitada capacidad de adsorción, mientras que en la curva sin plateau estricto la limitada capacidad de adsorción no es tan evidente.

La isoterma tipo H es el caso extremo de la isoterma tipo “L” y sugiere una fuerte interacción entre adsorbato y adsorbente. En general, en este tipo de curva se observa una pendiente inicial muy elevada (figura 6c).

La isoterma tipo S presenta un punto de inflexión, generando una curva en forma sigmoidea (figura 6d). Este tipo de isothermas sugiere que la interacción adsorbato-adsorbato es más fuerte que la interacción adsorbato-adsorbente. Esta condición favorece la adsorción de moléculas en la superficie debido a fuertes enlaces con otras moléculas adsorbidas.

Cabe destacar que este tipo de clasificación según la forma y curvatura obtenida para las isothermas de adsorción, es una clasificación fenomenológica basada en la observación pura, no revela los procesos que conducen a los distintos tipos de isothermas y carece de cualquier formulismo matemático (Hinz, 2001). Es por esta razón que a lo largo del tiempo se han desarrollado diversos modelos matemáticos para el

tratamiento de los datos experimentales, siendo los más utilizados los modelos desarrollados por Langmuir (1918) y por Freundlich (1926).

1.2.1. Isoterma de Langmuir.

Esta isoterma asume que el sólido tiene una capacidad limitada de adsorción, que las moléculas son adsorbidas en sitios bien definidos, energéticamente equivalentes y que distan uno de otro lo suficiente como para no permitir la interacción entre las moléculas adsorbidas en sitios adyacentes (Shukla y col., 2005; King y col., 2006).

La fórmula general de la isoterma de Langmuir viene dada por la ecuación (1):

$$C_s = \frac{V_m K C_e}{1 + K C_e}$$

La forma lineal de la ecuación de Langmuir puede ser escrita como (2):

$$\frac{C_e}{C_s} = \frac{1}{K V_m} + \frac{C_e}{V_m}$$

En donde C_s es la cantidad adsorbida por unidad de masa de adsorbente (mg/g), y C_e es la concentración de equilibrio del analito en la solución luego de la adsorción (mg/L). Por medio de la gráfica de C_e/C_s versus C_e se obtiene el término K que representa la constante de equilibrio (L/g) y el término V_m que representa la cantidad máxima que puede ser adsorbida (mg/g), este valor corresponde a la formación de una monocapa sobre la superficie del adsorbente.

1.2.2. Isoterma de Freundlich.

La isoterma de Freundlich puede ser descrita mediante la ecuación (3)

$$C_s = K_f C_e^n$$

La forma lineal de la ecuación de Freundlich puede ser escrita como (4):

$$\log C_s = \log K_f + n_f \log C_e$$

En donde los términos K_f y n son constantes empíricas, relacionadas con la capacidad de adsorción máxima y la intensidad de adsorción. Por medio de la gráfica de $\log C_s$ versus $\log C_e$ se obtienen los términos K_f y n .

1.3. Generación de biosólidos o lodos.

Los Biosólidos o lodos domésticos son compuestos orgánicos sólidos, semisólidos o líquidos que se producen durante el proceso de tratamiento mecánico, biológico y/o químico de purificación de las aguas servidas, previo a ser vertidas a los cauces naturales (Marambio y col., 2003).

En Chile, existen diversas Plantas de Tratamiento de Aguas Servidas (PTAS) las que generan como resultado de su tratamiento dos productos principales: aguas tratadas y lodos tratados biológicamente o "biosólido". Una de las principales es la Planta "El Trebal", la cual inicia el tratamiento con la entrada de agua, la que se separa de los lodos los cuales son centrifugados, obteniéndose un producto con una humedad cercana al 60% pudiendo ser secados por métodos adicionales como secados solares y térmicos, llevando a este "lodo" a un nivel de humedad de entre 5% y 40% (dependiendo de la tecnología que se use). Este proceso genera una gran cantidad de residuos sólidos, conocidos como biosólidos.

La Planta de Tratamiento “El Trebal” tiene la aprobación ambiental para utilizar la tecnología de lodos activados convencionales con digestión anaeróbica de lodos. Como resultado de este proceso de tratamiento de las aguas servidas se producen tres subproductos: a) agua tratada que, cumpliendo la normativa vigente, se descarga a los cursos naturales de agua, b) biosólidos, cuyo destino es la disposición en lugares autorizados o su uso agrícola y, c) biogás, con importante presencia de metano, del cual cerca del 35% se reutiliza internamente y el resto se quema mediante antorchas, convirtiéndolo en dióxido de carbono y agua. (Rámila y col., 2008).

Los biosólidos obtenidos en la planta, son residuos sólidos, semisólidos o líquidos, ricos en materia orgánica, bacterias, minerales y compuestos químicos, algunos nocivos como el arsénico y el mercurio, y otros muy beneficiosos como el nitrógeno y el fósforo. Estos biosólidos, pueden ser nocivos para la salud por la presencia de residuos químicos, virus y bacterias, que pueden causar enfermedades; es por esto que los biosólidos requieren de un manejo adecuado para prevenir eventuales impactos negativos para la salud humana y para el medio ambiente

Actualmente, los biosólidos en su mayoría, están siendo llevados principalmente a monorellenos autorizados, los cuales son usados de forma exclusiva para la disposición final de biosólidos, o rellenos sanitarios en los que se codisponen los biosólidos con residuos sólidos domiciliarios. Esto supone un problema ambiental a corto plazo, ya que acorta la vida útil de los rellenos sanitarios y la disposición de éstos en monorellenos está limitada por la capacidad de éstos.

Para disminuir la acumulación de biosólidos en los vertederos, éstos pueden ser usados como fertilizantes complementarios y/o remediadores de suelos, pues poseen un alto contenido de materia orgánica, los cuales pueden contribuir a mejorar las condiciones físicas de los suelos (Rámila y col., 2008). El procedimiento consiste en incorporar los lodos al suelo, mediante el uso de equipos adecuados, y así utilizarlos como un abono para enriquecer el suelo de forma tal que aumente la productividad agrícola y forestal, entre otras. Sin embargo, al incorporarlos al suelo, sus posibles

contaminantes presentes pueden ser degradados o absorbidos en las capas superficiales de los suelos, o lixiviados a aguas subterráneas.

1.4. Sistema hidropónico.

El cultivo de plantas en un sistema hidropónico consiste en cultivar plantas sin suelo. Para ello, se utiliza una combinación precisa de diferentes sales minerales que contienen todos los nutrientes que requieren las plantas para su desarrollo y que habitualmente les entrega la suelo, disueltas en agua (solución nutritiva), la cual se aplica directamente a las raíces de diferente forma, según el método de cultivo hidropónico que se adopte.

Esta forma de cultivo se puede aplicar a cualquier tipo de plantas, ya sean para consumo o decorativas y puede practicarse tanto en espacios abiertos como cerrados.

Existen muy diversos métodos de cultivos hidropónicos, pero todos se ajustan a un principio esencial, que consiste en el cultivo de plantas sin suelo y sin materia orgánica (Castañeda y col, 1997).

1.5. Trigo.

El trigo (*Triticum sativum* Lam = *Triticum aestivum* (L.) Thell) es un cereal de la familia de las gramíneas, una familia a la que pertenecen otros cereales tan importantes como el arroz, maíz, avena, etc.

El trigo es una planta anual herbácea de hasta 1,2 m de altura. Los tallos son erectos y presentan estructura de caña, es decir están huecos en su interior excepto en los nudos. El crecimiento de los tallos no es apical sino que se produce por el estiramiento de los tejidos situados por encima de los nudos (meristemo).

1.6. Biodisponibilidad.

Las reacciones adversas que pueden provocar los AINEs en los consumidores, son: irritación gástrica, problemas hemorrágicos, erupciones cutáneas, mareos, cefalea, ansiedad, visión borrosa, insuficiencia renal, etc. De esta manera para que los AINEs puedan ejercer su toxicidad aguda o crónica sobre un ser vivo, este debe estar biodisponible

El concepto de biodisponibilidad, se encuentra íntimamente relacionado con las condiciones fisicoquímicas del ambiente que determinan la especiación y por lo tanto la concentración de AINEs libre, por ende se debe determinar esta concentración para establecer la fracción de un producto químico accesible a un organismo para la absorción, la tasa a la cual una sustancia se absorbe en un sistema vivo, o una medida de la posibilidad de producir un efecto tóxico. A menudo, los científicos ambientales consideran la biodisponibilidad para representar la accesibilidad de una especie química del suelo, para su asimilación y posible toxicidad (Alexander, 1982).

El presente estudio evalúa el comportamiento de AINEs de uso masivo en Chile (naproxeno, ketoprofeno, ibuprofeno y diclofenaco), a través de la estimación de la capacidad de absorción en plantas de trigo en sistema hidropónico. También por medio de isothermas de adsorción para conocer el tipo de adsorción que existe en la interfase suelo-solución; además se estudia el efecto que tendrá en la adsorción la incorporación de biosólidos no esterilizado y esterilizado a suelos en estas mismas condiciones sin esterilizar y esterilizado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos generales.

Evaluar la capacidad de absorción de antiinflamatorios no esteroidales en plantas de trigo y de adsorción en suelos de la Región Metropolitana tratados con biosólidos

2.2. Objetivos específicos.

- Determinar la absorción de AINEs (Ketoprofeno, Naproxeno, Diclofenaco e Ibuprofeno) en plantas de trigo en condiciones hidropónicas.
- Realizar la caracterización química de suelo Linderos y biosólido
- Determinar la capacidad de adsorción de AINEs en los suelos en estudio y en los suelos tratados con biosólidos.
- Analizar e interpretar los resultados

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Descripción de sistema hidropónico.

3.1.1. Solución nutritiva.

La solución nutritiva se preparó, a partir de una mezcla de soluciones de diferentes sales y nutrientes, en la siguiente tabla, se muestra las concentraciones de los diferentes componentes de la solución:

Tabla 2: Concentración de compuestos y nutrientes para la solución nutritiva, según Garrido (2000)

Compuesto	C Final (mM)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,27
NH_4NO_3	0,3
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,27
K_2SO_4	0,11
KNO_3	0,33
NaCl	0,0586
Fe EDTA	0,018
K_2HPO_4	0,2
Micronutrientes	
H_3BO_3	0,0066
MnSO_4	0,0024
ZnSO_4	0,0006
CuSO_4	0,0002
Na_2MoO_4	0,0001

3.1.2 Germinación plantas de trigo.

Las semillas de trigo se germinaron en una bandeja con arena, dicha arena se lavó con una solución de HNO_3 1M por una hora, para eliminar el bicarbonato presente, luego se enjuagó con agua destilada hasta pH neutro. Posteriormente, la arena se humedeció con solución nutritiva y se dispusieron las semillas, estas fueron regadas periódicamente con solución nutritiva durante 18 días. Las semillas se mantuvieron en incubadora a 25°C.

3.1.3. Montaje de sistema hidropónico.

El sistema hidropónico de raíz flotante, utilizado en este estudio, consistió en una serie de recipientes plásticos forrados con nylon negro, sobre los cuales se colocaron placas de plumavit, donde se dispusieron las plantas, quedando de esta manera la raíz flotando en la solución nutritiva. Se instaló iluminación automática en un invernadero con periodos de 14 horas de luz (día) y 10 horas de oscuridad (noche), a temperatura ambiente con una variación de temperatura de $\pm 5^\circ\text{C}$.

Para cada recipiente se cortaron placas de plumavit, a las cuales se les efectuó orificios, con ayuda de un tubo de acero. A cada círculo de plumavit, se les realizó un corte a la mitad. Luego se tomaron con cuidado las plantas de trigo germinadas, para así evitar que la raíz se lastime y se rompa, dicha raíz se lavó con agua Mili-Q (Millipore Corporation, USA), para extraer la arena remante. Posteriormente se colocó cada planta en medio del círculo de plumavit. Los círculos se pusieron dentro de los orificios hechos en las placas de plumavit y dispusieron sobre cada recipiente plástico. Se instaló un sistema de burbujeo automático con periodos de 24 horas, a temperatura ambiente con una variación de temperatura de $\pm 5^\circ\text{C}$ (Castañeda y col., 1997).

3.2. Estudio de absorción de AINEs en plantas de trigo.

Para la absorción de AINEs se agregó 700 mL de solución nutritiva en cada recipiente con diferentes dosis de antiinflamatorios (0, 1, 10, 20, 40, 60 y 100 μ g/L), cada una en duplicado. Las plantas estuvieron en un periodo de adaptación de 14 días en solución nutritiva sin dosis de AINEs, transcurrido este tiempo se cambió la solución nutritiva y se aplicaron las diferentes dosis de AINEs antes mencionadas, el tiempo de contacto de las plantas con los AINEs fue de aproximadamente 7 días. Transcurrido este periodo las soluciones remanentes en los recipientes se recolectaron en envases plásticos de 1000 mL, para su posterior tratamiento y cuantificación de AINEs.

Las plantas fueron sacadas de la solución, lavadas y guardadas en sobres de papel kraft, posteriormente se secaron en la estufa a 50 °C y finalmente se almacenaron en una desecadora para su posterior análisis.

3.3. Tratamientos de las muestras.

Cada muestra se filtró con membrana estéril de 0,2 μ m utilizando sistema al vacío, las que fueron almacenadas a 4°C hasta su análisis.

3.3.1. Extracción en fase sólida con cartridge OASIS HLB de las muestras.

Las soluciones se pasaron a través de los cartridges Oasis HLB, los cuales se montaron en un equipo manifold conectado a vacío con adaptadores, mangueras y provisto de manómetro con válvula de control independiente que regula el paso de la muestra de elución hacia el interior de la cámara. Los cartridges debieron ser previamente acondicionados para luego hacer pasar la muestra y eluir de acuerdo a los siguientes pasos (Santos y col., 2005):

- Activación de la columna: se pasaron 3 porciones de 1 mL de Acetato de Etilo.
- Acondicionamiento de la columna: se pasaron 3 porciones de 1 mL de metanol, seguido por 3 porciones de 1 mL de agua Milli-Q (Millipore Corporation, USA).
- Aplicación de la muestra: se pasaron las muestras por cartridges con apoyo de embudo de decantación sostenido con soportes, a una velocidad de 1 mL/min.
- Lavado de la muestra: Luego de completado el paso de la muestra por el cartridge, se procedió al lavado con 3 porciones de 1 mL metanol:agua milli Q (en una proporción de 5:95 % v/v), a continuación 3 porciones de 1 mL de n-Hexano.
- Elución del analito: después se realizó la extracción de los analitos desde el cartridge con 3 alícuotas de 1 mL de acetato de etilo, los que se recibieron en un vial ámbar de 12 mL. Finalmente, se concentró con nitrógeno gaseoso en un equipo de evaporación, concentrando hasta sequedad, y luego se reconstituyó con 0,5 mL de metanol.

3.3.2. Filtrado del extracto final de muestra.

Para eliminar sólidos suspendidos en los extractos, se procedió a filtrar las muestras de aguas a través de filtro de membrana 0,45 μm y se lavo exhaustivamente con metanol. Luego de filtradas las muestras se evaporaron nuevamente con nitrógeno gaseoso hasta sequedad. Finalmente, el extracto de cada muestra se reconstituyo a 0,5 mL con metanol.

3.4. Cuantificación AINEs mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los extractos obtenidos de cada muestra se cuantificaron mediante HPLC con detector de arreglo de diodos, utilizando una columna C18 (5 μm ; 250 mm x 4,6 mm), en condiciones isocráticas, usando como fase móvil, una mezcla de acetonitrilo y KH_2PO_4 50mM (pH 4,2-4,5), en una proporción 50:50 % V/V.

Para la preparación la de solución de fosfato 50 mM, se pesaron 6,8040 g de fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4), cuyo peso molecular es de 136,08 g/mol, en un vaso precipitado de 50 mL previamente tarado en la balanza analítica precisa 125 A Quality. Se disolvió el fosfato con agua Milli-Q (Millipore Corporation, USA), con una conductividad de 18 M Ω cm y se transfirió cuantitativamente a un matraz aforado de 1000 mL.

Luego se procedió a filtrar la solución utilizando un equipo de filtración al vacío provisto de un filtro de membrana estéril de 0,2 μm , posteriormente fue almacenado en frasco de vidrio de 1000 mL.

Para la medición se trabajó con los siguientes parámetros: flujo de 1 mL/min en razón 50: 50 % v/v (acetonitrilo/fosfato diácido de potasio), a un rango de presión entre 1500-1800 psi, inyección de 20 μL de muestra, tiempo de medición de 25 minutos para estándares y 30 minutos para muestras reales (Santos y col., 2005).

La identificación de los cuatro analitos se logró a través de los tiempos de retención y los espectros de absorción correspondientes, medidos a una longitud de onda de 220 nm.

Para la cuantificación se utilizó el área de la señal de cada analito, obteniendo las concentraciones en mg/L desde una curva de calibración en un rango de 0,5 a 10 mg/L, preparada a partir de un multiestándar de 500 mg/L que contiene los cuatro antiinflamatorios en estudio (ketoprofeno, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno), la que se mantuvo refrigerada a 4°C en oscuridad, para prevenir su posible descomposición.

3.5. Método de extracción de AINEs desde Plantas.

Se tomó entre 0,4-0,6 g de plantas de trigo (raíz + hoja) seca y se llevó a un tubo de centrifuga de vidrio, donde se agregaron 23 mL de una solución de acetona /Ac. acético (20/1 v/v). Posteriormente, se mezcló bien la muestra con el vortex y se llevó a un baño de ultrasonido por 30 minutos, luego se centrifugó a 2500 rpm por 15 minutos.

A continuación se retiró el sobrenadante y se filtró, llevándolo a un matraz de aforo de 100 mL. Se repitió el procedimiento anterior con el sedimento que quedó en el tubo de centrifuga, pero con acetato de etilo, juntándose los sobrenadantes en el mismo matraz.

Luego se llevó la solución a un balón y se colocó en el rotavapor a una temperatura de 40°C hasta que llegó casi a sequedad. Lo que quedó en el balón se traspasó al mismo matraz de 100mL donde estaba y se lavó el balón con pequeñas cantidades de metanol que también se llevaron al matraz y se aforó con agua milli-Q. La solución se sometió a extracción en fase sólida con cartridge OASIS HLB en un Manifold a 15Pa descritas en el punto 3.3.

Finalmente, la cantidad de antiinflamatorios extraída desde de las plantas se determinó mediante HPLC – DAD bajo las condiciones descritas en el punto 3.4.

3.6. Descripción y caracterización de muestras de suelo y biosólido

3.6.1. Suelo Linderos

La muestra fue obtenida de la capa superficial (0-20 cm) de un suelo agrícola de la Región Metropolitana, correspondiente a la serie Linderos, la que se almacenó en bolsas plásticas para su transporte al laboratorio, donde fue secada al aire, disgregada tamizada (tamiz de 2 mm) y almacenada en frascos de polietileno de alta densidad a temperatura ambiente.

Este suelo corresponde a la serie Linderos y pertenece al orden Inceptisol. Es un suelo de origen aluvial, moderadamente profundo que descansa sobre un sustrato aluvial constituido por piedras de composición mixta, que ocupa entre el 75% y 95% del volumen del suelo, con material intersticial de textura franco (8-28% de arcilla). Posee buena porosidad y arraigamiento en todo el perfil. Es un suelo plano (0 a 1% de pendiente) con microrelieve ligero a moderado. La localidad de Linderos está situada en la comuna de Buin, en la provincia de Maipo (Centro de Información de Recursos Naturales, 1996).

3.6.2. Biosólido.

El biosólido utilizado en este estudio pertenece a una planta de tratamiento de aguas servidas, el cual sigue un proceso que permite concentrarlos y estabilizarlos, antes de su disposición final. El muestreo se realizó el 7 de mayo de 2008 y corresponde a la mezcla de biosólidos de los meses noviembre y diciembre de 2007.

3.6.3. pH.

Se determinó potenciométricamente con un electrodo combinado en el sobrenadante de una suspensión de suelo – agua, en una relación 1:2,5 (p/v).

Se pesó 20 g de suelo o biosólido y se agregó 20 mL de agua, se agitó vigorosamente la solución en agitador mecánico recíproco y se dejó reposar la solución por al menos dos horas. Finalmente, se mide el pH de la solución sobrenadante directamente con un electrodo combinado (Sadzawka y col., 2006).

3.6.4. Carbono orgánico y materia orgánica.

El contenido de materia orgánica de los suelos en estudio, se determinó espectrofotométricamente previa combustión húmeda.

A 1 g de cada suelo o Biosólido se agregó 10 mL de solución de dicromato de sodio 0,5 M y 20 mL de H₂SO₄ concentrado, luego de 30 min, se incorporó agua y se dejó reposar durante toda una noche, para finalmente cuantificar el cromato reducido en el sobrenadante a 600 nm, con un espectrofotómetro UV/vis UNICAM, a partir de una curva de calibración elaborada por una serie de soluciones de sacarosa de entre 0 y 50 mg mL⁻¹.

El contenido de materia orgánica en el suelo se determinó multiplicando el % de carbono orgánico por un factor estimado de conversión de 1,724 (Sadzawka y col., 2006).

3.6.5. Capacidad de intercambio catiónico (CIC).

Se determinó por el método de acetato de sodio a pH 8,2. Para lo cual, en tubos de centrífuga de 50 mL se pesaron 4 g de cada suelo o Biosólido, se trataron con tres porciones de 33 mL cada una de NaOAc 1M (para intercambiar los cationes del suelo por sodio), luego se lavó con tres porciones de 33 mL de etanol y finalmente se agregaron tres porciones de 33 mL de NH₄OAc 1M (para desplazar el sodio adsorbido por el suelo), entre cada adición se procedió a una agitación durante 15 minutos en agitador mecánico recíproco, seguido de una centrifugación durante 15 minutos a 2500rpm, el sodio desorbido por la solución de NH₄OAc se cuantificó por espectrofotometría de emisión atómica, utilizando un espectrofotómetro de adsorción atómica Perkin Elmer 1100 B.

3.6.5. Contenido de metales pesados.

El contenido total de metales (cinc, cobre, plomo, níquel y cromo), se determinó mediante EAA con llama, previa digestión ácida del suelo en horno microondas.

Alrededor de 200 mg de suelo o Biosólido seco al aire (en triplicado) fueron transferidos a vasos para microondas, para luego ser digeridos con una mezcla de 4 mL de HNO₃, 2 mL de H₂O₂ y 4 mL de HF en horno microondas, Milestone mls 1200 mega, que cuenta con un panel de control modelo 240 mega y un módulo de extracción de gases generados durante la digestión, modelo EM-45/A. Se utilizó un programa para la digestión de tres etapas: 5min a 250 W, 5 min a 400 W y 10 min a 500 W. Posteriormente se trasvasijaron con agua Milli-Q a vasos de teflón para eliminar los ácidos por calentamiento en placa calefactora, llegando casi a sequedad, finalmente con HCl 1M fueron traspasados a matraces volumétricos de 10 mL y aforados con el mismo ácido. Finalmente se filtraron a través de papel filtro N° 2. El contenido total de los metales se cuantificó por EAA con llama utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer 1100B.

3.7. Determinación de la capacidad de adsorción AINEs en los distintos sistemas suelo-biosólido.

La capacidad de adsorción se determinó con un método de equilibrio en batch a temperatura ambiente.

Para esto se realizaron cuatro experimentos con suelo linderos y biosólido de la siguiente manera:

- Suelo linderos
- Suelo linderos + biosólido (dosis 200 ton/ha)
- Suelo linderos estéril
- Suelo linderos + biosólido ambos estériles (dosis 200 ton/ha)

Para los cuatro sistemas suelo-biosólido se siguió el mismo procedimiento, en tubos de centrífuga se equilibran 5 g de suelo, con distintas dosis de antiinflamatorios (entre 0 y 500 mg/L), 25 mL de solución de CaCl_2 0,01M, para mantener constante la fuerza iónica del medio, y 5 mg de NaN_3 , para suprimir la actividad microbiana durante el equilibrio. Los tubos se agitaron en un agitador mecánico recíproco durante 24 horas. Al término de este período se procede a centrifugar durante 20 minutos a 2500 rpm, la parte acuosa se filtra con filtros de $0,2\mu\text{m}$, la solución obtenida en el paso anterior se somete a extracción en fase sólida con cartridge OASIS HLB en un manifold a 15Pa descritas en el punto 3.3.(Lin y col., 2011).

Finalmente, la cantidad de antiinflamatorios extraída desde de los suelos se determina mediante HPLC – DAD bajo las condiciones descritas en el punto 3.4.

Existen diferentes métodos para esterilizar suelos con el objetivo de inhibir la actividad microbiana, los más comunes incluyen: Autoclave, irradiación Gamma, fumigación con cloroformo, oxido de etileno o propileno, irradiación UV y microondas. Estos métodos comúnmente alteran las propiedades físicas y químicas del suelo. En este estudio se utilizó el método con cloroformo por su bajo costo y corto tiempo de empleabilidad. La esterilización del suelo y biosólido, consistió en colocar el suelo o suelo con biosólido en una capsula de petri dentro de una desecadora que en su parte inferior contenía cloroformo, durante 7 días. Finalmente, el suelo estéril y suelo con biosólido estéril se almacenaron en una desecadora hasta su tratamiento.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de antiinflamatorios no esteroidales (AINEs).

Debido a su alta sensibilidad y selectividad, HPLC es una técnica analítica adecuada para determinar fármacos polares en muestras ambientales reales. Además, es un método que no requiere derivatización de los analitos alcanzando límites de detección similares a los obtenidos con cromatografía gaseosa (Gentili 2007).

Al aplicar la metodología descrita en el punto 3.3. se logró la separación de los cuatro analitos en estudio en un tiempo inferior a 22 min. (Figura 7). Los analitos eluyeron en el siguiente orden: Ketoprofeno, Naproxeno, Diclofenaco e Ibuprofeno.

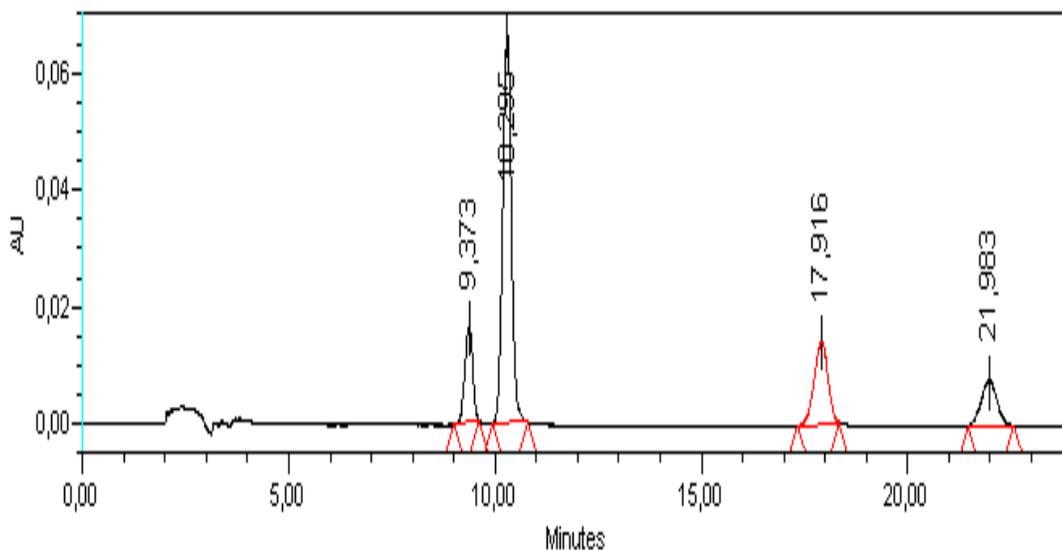


Figura 7: Cromatograma de los estándares de AINEs: ketoprofeno, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno con fase móvil acetonitrilo y KH_2PO_4 50:50(v/v), en condiciones isocráticas con flujo 1 mL/min y detección UV: 220 nm.

Mediante el uso de estándares puros de cada antiinflamatorio No Esteroidal (AINEs) y así como también del software cromatográfico fue posible obtener los espectros de absorción de cada compuesto (Figuras 8 -11):

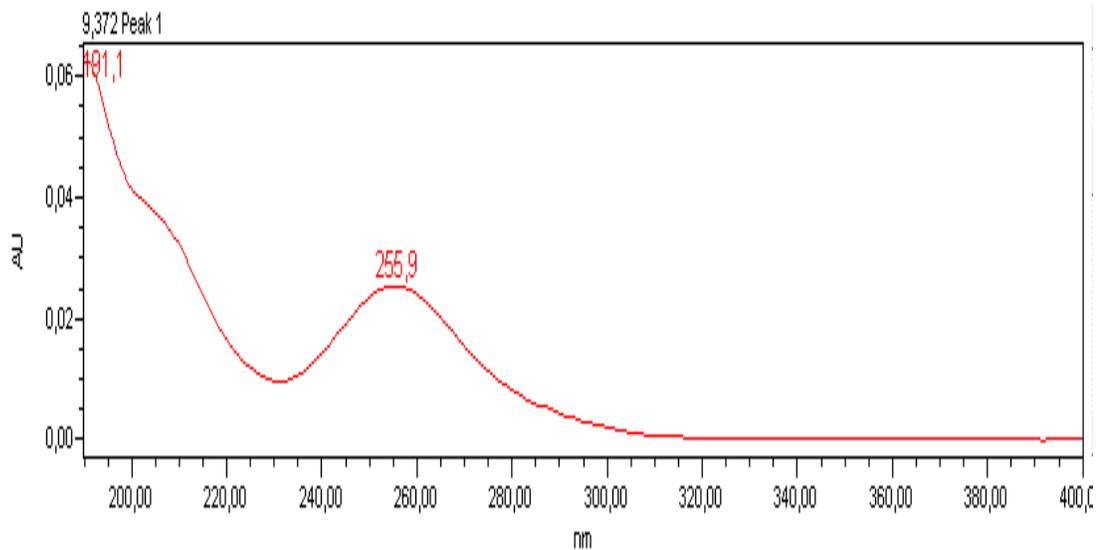


Figura 8: Espectro de absorción de estándar de 4 mg/L de Ketoprofeno.

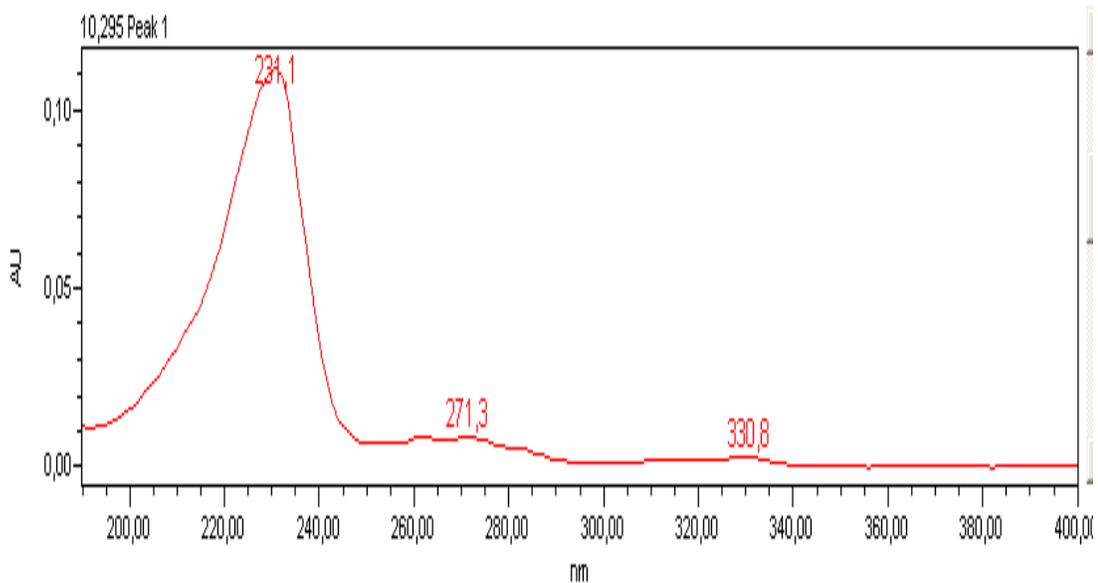


Figura 9: Espectro de absorción de estándar de 4 mg/L de Naproxeno.

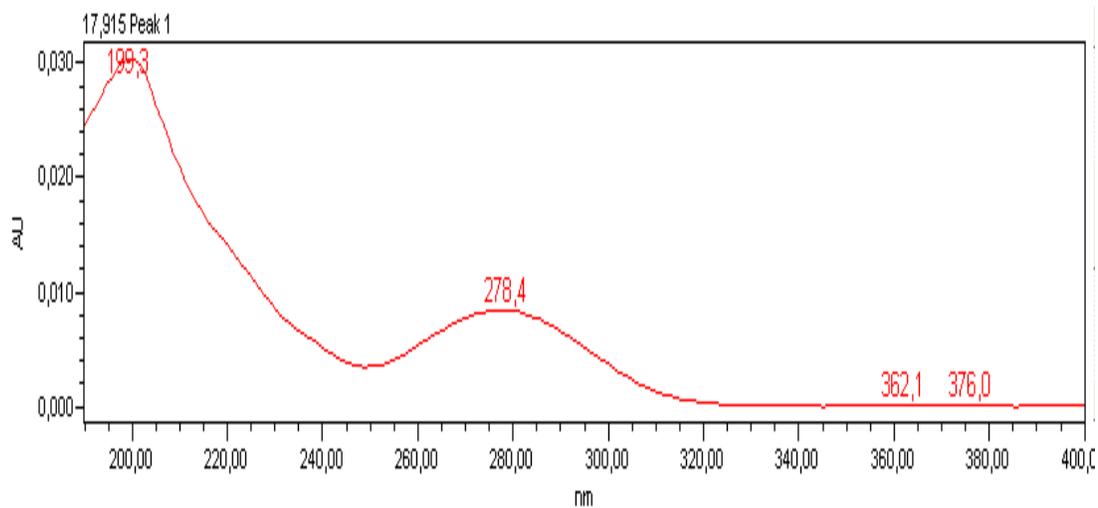


Figura 10: Espectro de absorción de estándar de 4 mg/L de Diclofenaco.

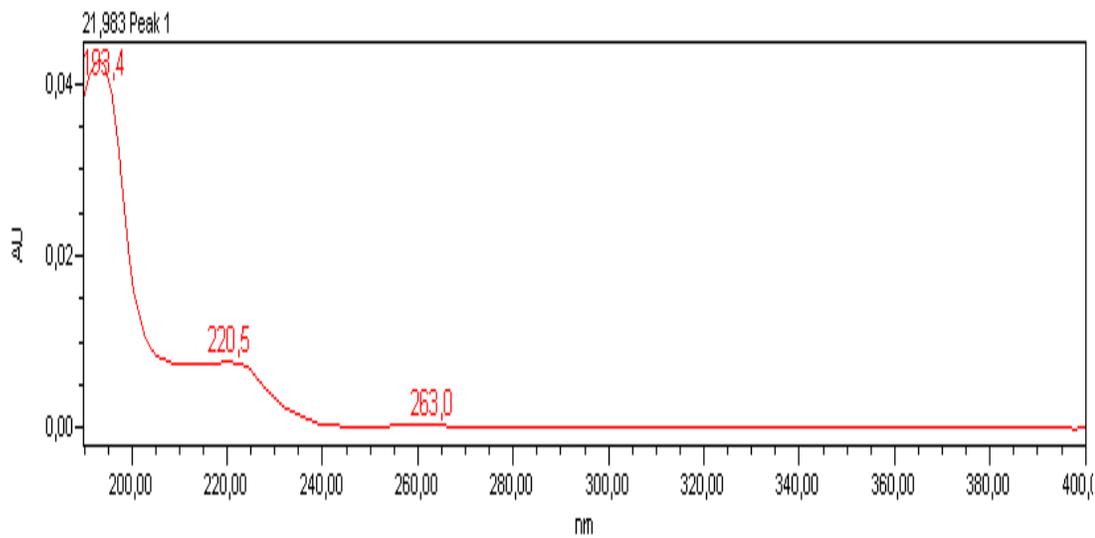


Figura 11: Espectro de absorción de estándar de 10 mg/L de Ibuprofeno.

Un papel fundamental cumplen los espectros de absorción al momento de identificar cada analito, ya que, con muestras reales los tiempos de retención tienden a presentar pequeñas variaciones, dependiendo de su matriz con la que se trabaje. Por lo tanto, en primera instancia se identificó cada analito usando como parámetro su tiempo de retención establecido y ésta información se comparó con los espectros de absorción característico para cada analito.

Si bien, la técnica de HPLC permite detectar analitos en el rango de los mg/L a $\mu\text{g/L}$, con un detector adecuado, la matriz es uno de los mayores impedimentos en la detección y cuantificación, situación que podría ocurrir con matrices complejas como suelos y plantas.

Los efectos de matriz pueden resultar en supresión o con menos frecuencia, en el aumento de las señales analíticas llevando a resultados erróneos. Estas irregularidades pueden ser causadas por distintos fenómenos, como por ejemplo que los analitos pudieran ser sorbidos por la materia orgánica presente en la muestra, provocando que la concentración de analito disuelto disminuya y así sea más difícil detectarlo. Otro ejemplo, es que los contaminantes en la matriz de la muestra pueden enmascarar la señal del analito, levantando la línea base del cromatograma y como consecuencia el área bajo la curva cromatográfica no se puede determinar con exactitud.

La literatura cita posibles estrategias para reducir los efectos de la matriz, como por ejemplo, adición estándar, estándar interno o reducir la matriz de la muestra. La adición estándar es un método confiable pero consume mucho tiempo. Por otra parte, el uso de un estándar interno apropiado, con estructura similar o un estándar isotópico, no siempre están disponibles comercialmente o son muy costosos.

Por lo tanto, una técnica adecuada para conseguir máxima sensibilidad y reproducibilidad de la señal analítica, es aplicando un método de extracción selectiva de los analitos seguida de un clean-up (Gómez y col., 2006), para así reducir los componentes de la matriz previo al análisis con HPLC.

El cartridge OASIS HLB empleado en este estudio contiene un sorbente con macroporos que consiste en un copolímero único que logra un balance lipofílico-hidrofílico, compuesto por dos monómeros, divinilbenceno (lipofílico) y n-vinilpirrolidona (hidrofílico) (Figura 12). Su particular composición permite revertir la fase de la extracción mejorando la captura o retención de analitos polares. Además otorga mayor humectabilidad de la fase, lo que mejora los rendimientos de la extracción. (Chromatography Columns And Supplies Catalog).

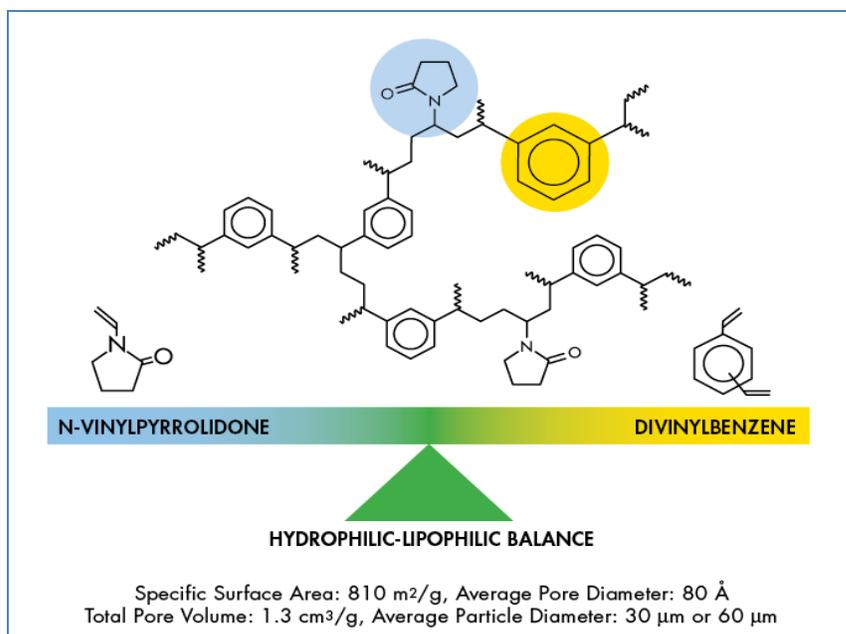


Figura 12: Composición del Copolímero OASIS HLB

Para la extracción de analitos de alta polaridad es frecuente el uso de sorbentes poliméricos. Su elevada área superficial permite mayor retención de analitos. En este caso particular se utiliza el polímero HLB, que tiene la capacidad de extraer analitos ácidos desde muestras acuosas sin acidificar la muestra, también es capaz de extraer analitos neutros en un amplio rango de polaridad y pH (Weigel y col., 2004).

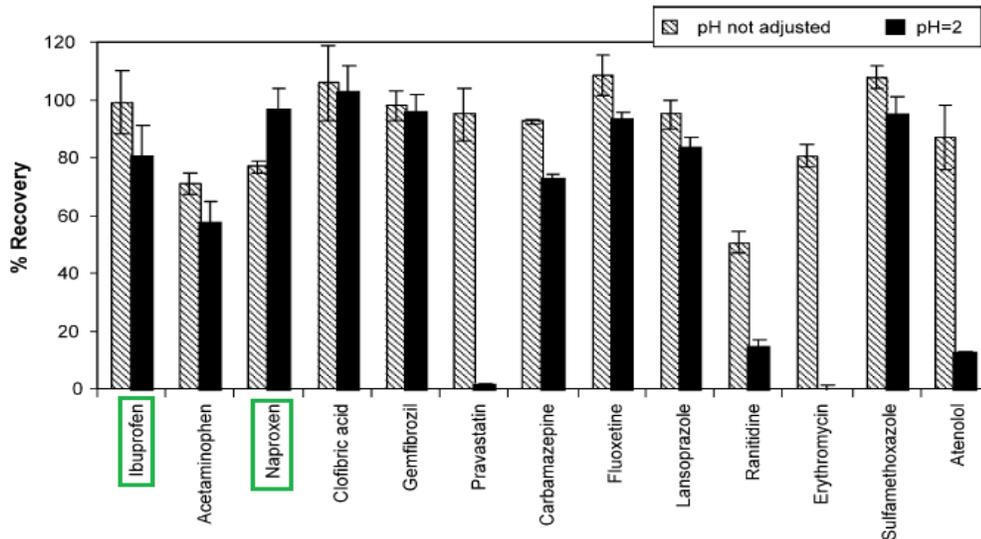


Figura 13: Estudio de recuperación de distintos fármacos con y sin ajuste de pH, según Gross y col., (2006)

En estudios realizados por Gross y col., (2006), encontraron que se obtenía mejor porcentaje de recuperación de Ibuprofeno sin ajuste de pH (Figura 13); para Naproxeno vemos que se obtiene mayor porcentaje de recuperación a pH ácido, sin embargo, a pH muy ácido se corre el riesgo de extraer mas sustancias interferentes lo que podría dificultar la detección de los analitos.

Por otra parte, las ventajas de la extracción con sorbentes poliméricos a pH neutro son:

- Hay un manejo simple de la muestra pues no se necesita paso previo de acidificación.
- Permite una extracción continua, especialmente cuando se trabaja con grandes volúmenes de muestra.
- Disminuye el riesgo de acidificación de la muestra por posible hidrólisis de analitos que pudieran ser susceptibles a estas reacciones.

De acuerdo a estos antecedentes la extracción de los analitos se realiza sin ajuste de pH.

Luego de acondicionar el cartridge, sin ajuste de pH, se procede a pasar la muestra (2-3 mL/min) para posteriormente lavar el cartridge con n-hexano. Se selecciono n-hexano para esta etapa porque remueve los componentes lipofílicos de la matriz.

En estudios realizados por Santos y col., (2005), utilizando acetona, acetato de etilo y metanol como solventes para la extracción de analitos desde el cartridge, encontraron una buena recuperación para Diclofenaco, Ibuprofeno y Naproxeno utilizando acetato de etilo (Figura 14).

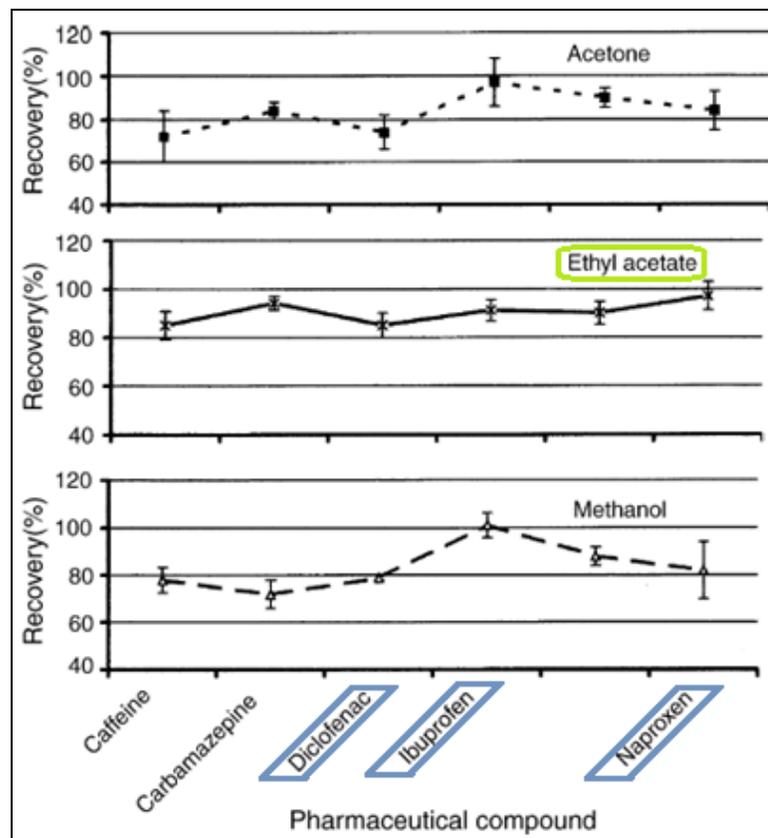


Figura 14: Recuperación con distintos solventes, según Santos y col., (2005)

Finalmente, de acuerdo a la Figura 14, la elución de los analitos desde el cartridge se realiza con acetato de etilo pues tiene mejor porcentaje de recuperación que otros solventes (Santos y col., 2005).

4.2. Determinación de la absorción de AINEs en plantas de trigo.

Una vez extraídas las plantas desde los recipientes con solución nutritiva, se determinó la cantidad de los distintos AINEs remanente en la solución, los resultados se presentan en la tabla 3:

Tabla 3: Antiinflamatorios no esteroidales (AINEs) remanentes en la solución nutritiva

Muestras ug/L	Ketoprofeno (ug/L)	Naproxeno (ug/L)	Diclofenaco (ug/L)	Ibuprofeno (ug/L)
1	0,979	0,881	0,071	0,992
10	7,585	6,859	3,106	2,514
20	8,355	10,084	2,920	3,891
40	11,971	19,127	2,525	21,737
60	20,381	29,885	8,120	13,536
100	31,718	47,822	19,327	37,078

La cantidad de antiinflamatorios no esteroidales remante en la solución nutritiva es menor que la que se agregó en un principio, por lo tanto, se esperaría que en las plantas analizadas se encuentren antiinflamatorios no esteroidales (AINEs), sin embargo en ninguna de las muestras de las plantas de trigo analizadas se evidenció su presencia (Figura 15-16)

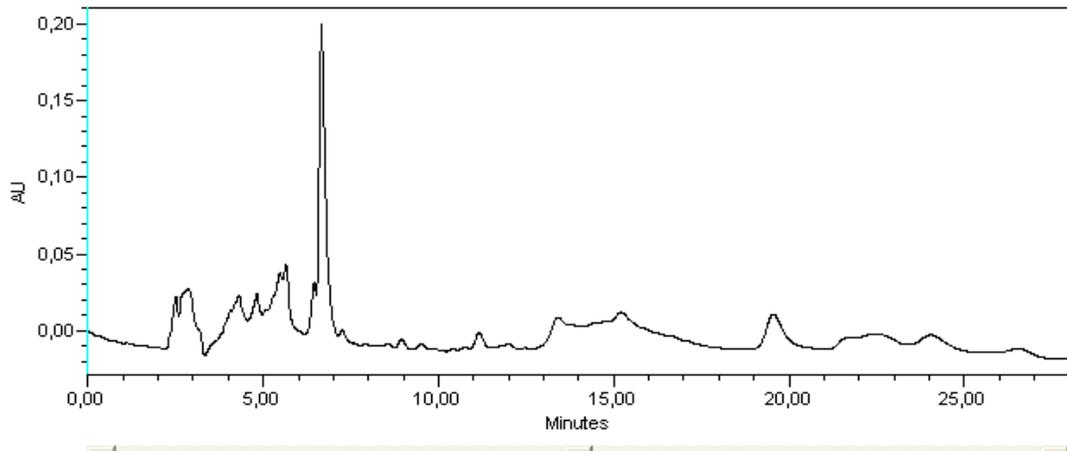


Figura 15: Cromatograma de muestra de plantas (10ug/L), fase móvil acetonitrilo y KH_2PO_4 50:50 % (v/v), en condiciones isocráticas con flujo 1 mL/min y detección UV: 220 nm.

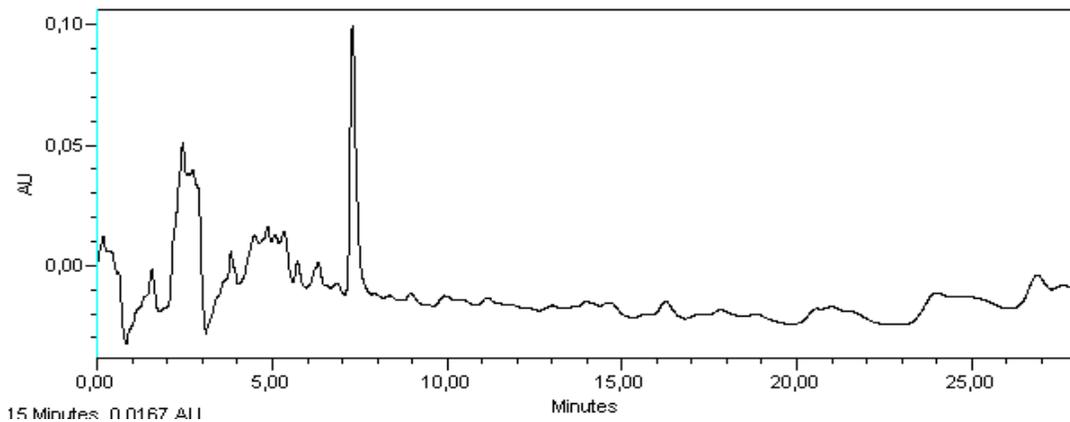


Figura 16: Cromatograma de muestra de plantas (60ug/L), fase móvil acetonitrilo y KH_2PO_4 50:50 % (v/v), en condiciones isocráticas con flujo 1 mL/min y detección UV: 220 nm.

La baja capacidad de adsorción de los antiinflamatorios por las plantas de trigo en el sistema hidrópico se puede deber a posibles transformaciones debidas a la luz solar, fotodegradaciones, ya que estas son una importante vía de degradación para estos compuestos. Los procesos más importantes involucrados en la fotólisis son las fotooxidaciones. También estarán presentes fotoreducciones y ftohídrólisis. Las

transformaciones inducidas por la luz solar estarán presentes en todos los compartimentos ambientales: aguas, atmósfera y en la superficie de los suelos y de las plantas.

En general, las moléculas que absorben energía luminosa a longitudes de onda superiores a 285 nm son susceptibles a la fotodegradación, ello debido a que las longitudes de onda menores son casi completamente absorbidas por el ozono en la atmósfera y por lo tanto no podrán estar involucradas en estos procesos. Tanto Ketoprofeno como Naproxeno absorben a longitudes de onda sobre los 290 nm, por lo tanto serán susceptibles a fotodegradación.

En un estudio previo realizado por Lin y col. (2011) se irradiaron distintos fármacos disueltos en agua Milli-Q., entre ellos Naproxeno y Ketoprofeno, con un fotosimulador con lámparas de Xenón que abarcan longitudes de ondas desde 290 nm a 700 nm. Los resultados muestran que al aplicar mayor irradiación (765 W/m^2) el Ketoprofeno es el compuesto más reactivo, y su reactividad es tan alta que no se alcanza a medir, el Naproxeno alcanza un tiempo de vida media de 1.9 horas. A menor energía de irradiación (250 W/m^2) Ketoprofeno se fotoliza en un tiempo de vida media de 2.5 minutos y Naproxeno en un tiempo de 2 a 5 horas. El Ibuprofeno no absorbe a longitudes de onda mayores a 290 nm y a las 22 horas de irradiación la fotólisis medida es 0, por lo tanto es muy estable frente a estas reacciones.

La rápida fotodegradación del Ketoprofeno se puede explicar por el hecho de que el grupo carbonilo está conjugado con dos anillos aromáticos. Cuando el carbonilo está altamente conjugado la energía de la transición $\pi - \pi^*$ disminuye, resultando en un triple estado muy reactivo (Lin y col., 2011).

La fotooxidación es uno de las vías más comunes de degradación, debido a que moléculas de oxígeno en estado basal se encuentran en abundancia en el ambiente y por acción de la luz solar se producirán especies muy reactivas que conducirán a la oxidación de moléculas (Báez y col., 2010).

El oxígeno también juega un papel importante en la degradación de estas sustancias, ya que se pueden incorporar al anillo aromático ayudando a desestabilizarlo. Las

enzimas responsables de esto son las oxigenasas, ya sea monooxigenasas, que incorporan una sola molécula de oxígeno, o dioxigenasas que incorporan dos.

Por lo tanto, al analizar los resultados y los estudios revisados, se puede deducir que la baja absorción de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en las plantas de trigo, se pueden deber principalmente a fenómenos de fotodegradación y degradación enzimáticas, ya que tanto las muestras de aguas y plantas estuvieron expuestas a la luz durante un periodo de tiempo prolongado, en la etapa de pretratamiento, especialmente en la extracción en fase sólida con cartridge OASIS HLB, debido a que el volumen de las muestras fue entre 500-600 mL, lo cual demoró el proceso de trabajo en los cartridges.

4.3. Caracterización de suelo y biosólido.

La caracterización del suelo y biosólido se llevó a cabo mediante la determinación de: pH, % materia orgánica y capacidad de intercambio catiónico. Los resultados se presentan en la tabla 4:

Tabla 4: pH, Contenido Materia Orgánica y Capacidad de Intercambio Catiónico en suelo Linderos y Biosólido

	Linderos	Biosólido
pH	7,70	6,91
MO %	2,29	---
CO (%)	1,33	8,79
CIC(cmol⁺ kg⁻¹)	18,45	83,16

Se encontró que el biosólido es levemente más ácido que el suelo Linderos, además su contenido de materia orgánica es mas alto; lo anterior puede influir en los procesos de adsorción de los AINEs en los suelos, debido al alto contenido de materia orgánica del biosólido.

En la Figura 17 se presentan los resultados del contenido de total de metales (Cu, Zn, Ni, Pb, Cr y Cd) en el suelo Linderos y en el biosólido.

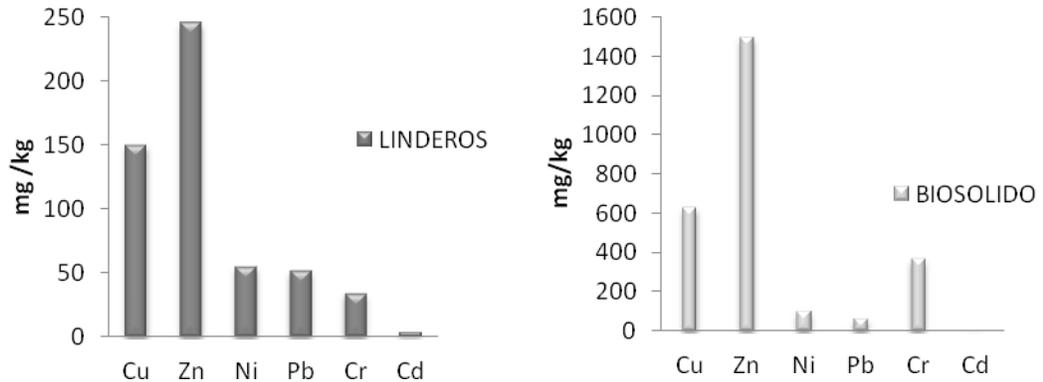


Figura 17: Concentración total de Cu, Zn, Ni, Pb, Cr y Cd en suelo Linderos y biosólido

Para el suelo Linderos, se encontró que la abundancia de los metales obedece el orden $Zn > Cu > Ni > Pb > Cr > Cd$. De acuerdo a la Normativa Chilena (DS004, 2009), cumple con las concentraciones máximas de metales que pueden contener los suelos receptores previo a la aplicación de lodos, por lo tanto, la tasa máxima de aplicación de lodos puede llegar a 90 ton/ha por año (base seca).

En el caso del biosólido, el orden de abundancia de metales sigue el orden $Zn > Cu > Cr > Ni > Pb > Cd$. Las concentraciones de todos los metales analizados, se encuentran bajo los valores máximos permitidos en la Norma Chilena (DS004, 2009) para la aplicación de biosólidos a suelos agrícolas, por lo tanto, el biosólido puede aplicarse en suelos receptores.

4.5. Isotermas de adsorción de los AINEs en el Suelo Linderos.

A continuación en el Figura 18, se presentan las isotermas de adsorción para cada uno de los AINEs en estudio, en el suelo Linderos:

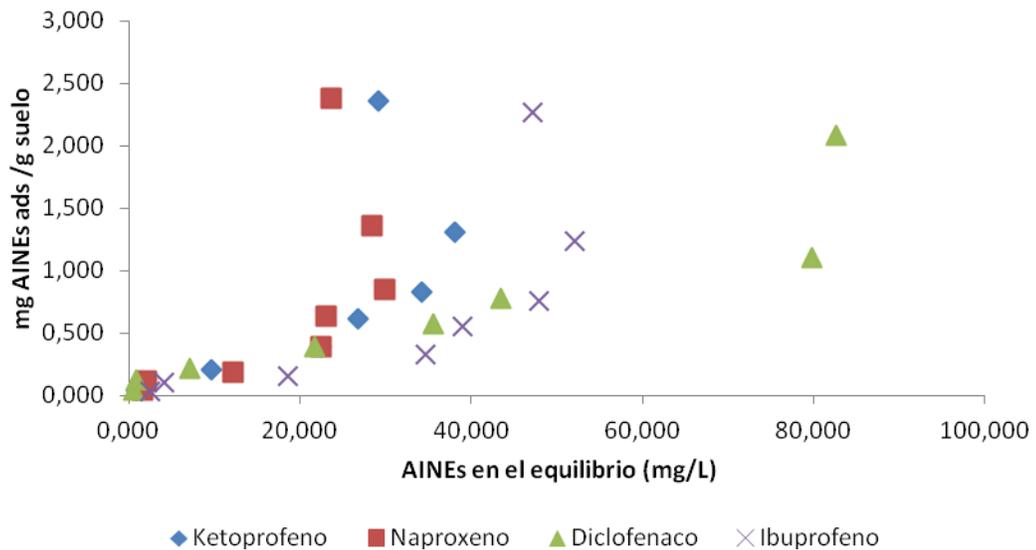


Figura 18: Isoterma de adsorción para cada AINEs en el suelo Linderos.

De acuerdo con la clasificación de Giles y col. (1960), las isotermas de adsorción para cada AINEs en estudio en el suelo Linderos son de tipo S (curvatura convexa inicial) aproximándose a una forma C (Figura 18). Estas isotermas indican una baja afinidad del adsorbente por el adsorbato a bajas concentraciones de equilibrio y un aumento de la adsorción a concentraciones de equilibrio más altas.

En general, pueden existir diferentes reacciones que produzcan esta adsorción como por ejemplo disociación de grupos funcionales de la materia orgánica del suelo, protonación sobre la superficie coloidal, disociación de los grupos funcionales ácidos de los antiinflamatorios, etc. Estas reacciones dependen principalmente del pH del

suelo, de su carga, del contenido de materia orgánica y de la naturaleza del adsorbato (Báez y col., 2001).

Para la obtención de los parámetros de Freundlich, se utilizó la forma lineal del modelo de matemático.

$$C_s = K_f C_e^n$$

La forma lineal:

$$\log C_s = \log K_f + n_f \log C_e$$

Donde C_s (mg/g) es la cantidad de AINEs adsorbido y C_e (mg/L) es la concentración de equilibrio del AINEs en solución, se calcularon las constantes de Freundlich K_f y n_f . Estas constantes son características de la capacidad de adsorción de los AINEs por los suelos, en este caso K_f refleja la afinidad de adsorción en suelos (Xu y col., 2009) y n_f representa la variación de la adsorción con la concentración, dando cuenta de la afinidad del compuesto por los sitios de intercambio.

Para obtener K_f se graficó, en todos los casos, el Log de la concentración en equilibrio del compuesto en fase acuosa ($\log C_e$) versus el Log de la concentración del mismo adsorbida por el suelo ($\log C_s$).

Para el caso del Diclofenaco, se obtuvo la isoterma de adsorción en su forma lineal de acuerdo al modelo de Freundlich (Figura 19), en el suelo Linderos.

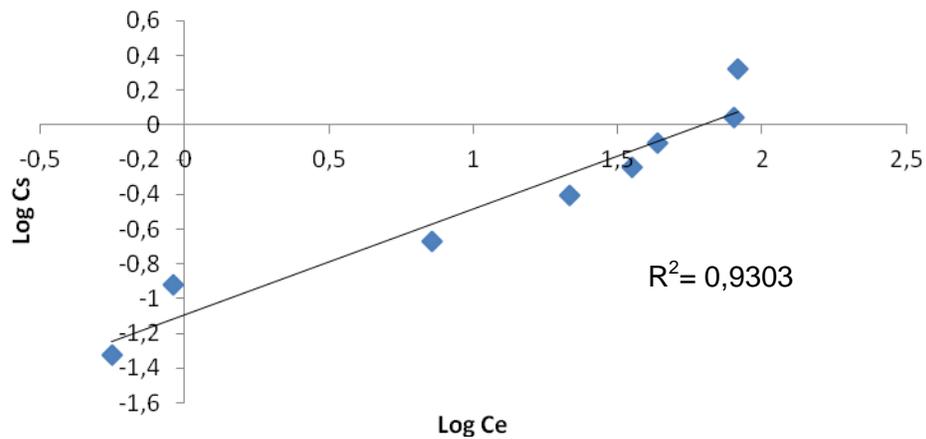


Figura 19: Ajuste al modelo matemático de Freundlich, para la isoterma de adsorción de Diclofenaco

Del ajuste lineal de la ecuación de Freundlich, fue posible obtener tanto la ecuación lineal como el coeficiente de correlación

$$\log Cs = 0,6108 \log Ce - 1,0938$$

De la pendiente de la gráfica se obtuvo un valor de $n_f = 0,6108$, mientras que del intercepto $\text{Log } K_f = (-1,0938)$, aplicando antilogaritmo se obtuvo el correspondiente valor de $K_f = 0,0806$

Para la obtención de los parámetros de la ecuación de Langmuir, se utilizó la forma lineal del modelo matemático.

$$\frac{Ce}{Cs} = \frac{1}{KV_m} + \frac{Ce}{V_m}$$

Donde;

C_s = Cantidad de AINEs adsorbida por gramos de suelo (mg/ g)

C_e = Concentración del AINEs en el equilibrio (mg/L).

Al graficar C_e versus C_e/C_s , se obtiene una línea recta cuya pendiente $m = 1/V_m$ y el intercepto $n = 1/KV_m$.

Para el caso del Diclofenaco, se obtuvo la isoterma de adsorción en su forma lineal de acuerdo al modelo de Lagmuir (gráfico 6), en el suelo Linderos.

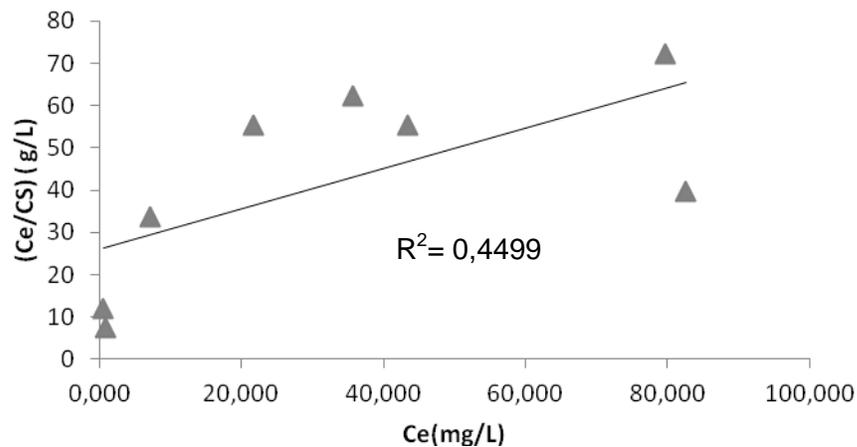


Figura 20: Ajuste al modelo matemático de Lagmuir, para la isoterma de adsorción de Diclofenaco

Del ajuste lineal de la ecuación de Langmuir, fue posible obtener tanto la ecuación lineal como el coeficiente de correlación

$$\frac{C_e}{C_s} = 0,4774 C_e + 26,041$$

De la pendiente de la gráfica ($m = 1/V_m = 0,4774$) se obtuvo un valor de $V_m = 2,0947$, mientras que del intercepto ($n = 1/KV_m = 26,041$), fue posible obtener un valor de $K = 0,0183$

Los valores de coeficiente de correlación para los diferentes analitos fluctuaron entre 0,78 - 0,93 para los ajustes a la isoterma de Freundlich y 0,0062-0,4499 para los ajustes a la isoterma de Lagmuir (Tabla 5). A partir de estos resultados, se establece

que las isothermas de adsorción de los AINEs en estudio pueden ser descritas de mejor manera con la ecuación de Freundlich. Es por esto que para los siguientes estudios de diferentes sistemas suelo-biosólido, se ajustaron las isothermas al modelo matemático de Freundlich.

El valor Kf derivado de la ecuación de Freundlich, como se dijo anteriormente refleja la afinidad de adsorción en suelos, sin embargo, los parámetros de Kf no se pueden comparar entre muestras en las que los factores de no linealidad, n, son diferentes (Chen y col., 1999). Debido al hecho de que la mayoría de los valores de n derivados de la ecuación de Freundlich no fueron cercanos a 1, lo que significaba la no linealidad de las isothermas de adsorción. Por esta razón para fines de comparación se calculo el coeficiente de partición o de reparto Kd, que representa la mayor o menos capacidad de un compuesto químico a ser adsorbido por la fracción solida del suelo, esencialmente los minerales arcillosos y la materia orgánica. Kd. corresponde al cuociente entre la cantidad de AINEs adsorbido y su concentración en la solución de equilibrio ($K_d = C_s/C_e$). Dado que para el caso de estas isothermas de adsorción, Kd (L/g) varía con la concentración inicial de AINEs agregada, su valor fue estimado calculando el promedio de todos los puntos de cada isoterma, para así tener una estimación global del proceso de adsorción con todas las concentraciones usadas en el estudio.

Tabla 5: Parámetros de Freundlich, Langmuir y Kd para la adsorción de los AINEs en suelo Linderos

	Parámetros Freundlich				Parámetros Langmuir		
	Kd (L g ⁻¹)	Kf (mg ⁿ⁻¹)	nf	R ²	Vm (mg g ⁻¹)	K (L g ⁻¹)	R ²
Ketoprofeno	0,0419	0,0579	0,7959	0,8310	2,9674	0,0128	0,0791
Naproxeno	0,0398	0,0337	0,9945	0,7867	-0,0008	-0,0035	0,0062
Diclofenaco	0,0422	0,0806	0,6108	0,9303	2,0947	0,0183	0,4499
Ibuprofeno	0,0200	0,0154	1,0371	0,8289	-2,6344	-0,0049	0,0516

Otros autores encontraron que las isotermas de adsorción de los AINEs en 4 tipos de suelo agrícolas también se ajustaban a la ecuación de Freundlich (Xu y col., 2009). Los valores de K_d (Tabla 5) obtenidos indican que ibuprofeno fue el menos adsorbido, mientras que la adsorción de Diclofenaco, Ketoprofeno y Naproxeno, en el suelo es muy similar.

4.5. Isotermas de adsorción de los AINEs en diferentes sistemas suelo-biosólido.

Las isotermas de adsorción del Ketoprofeno en Suelo Linderos y en éste con los distintos tratamientos se muestra en el Figura 21, mientras que los parámetros de ajuste de las isotermas de Freundlich, se presentan en la Tabla 6.

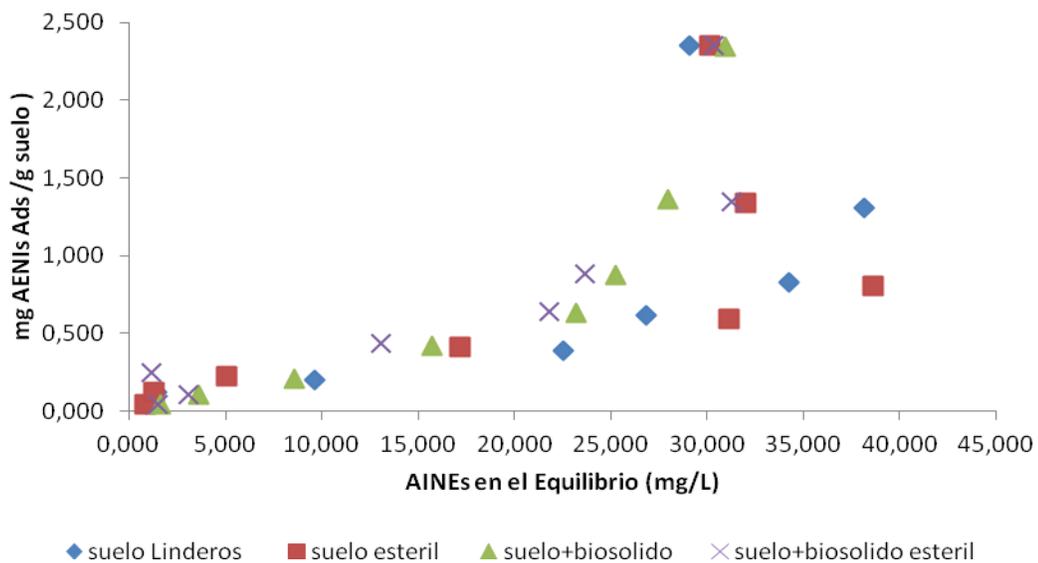


Figura 21: Isotherma de adsorción de Ketoprofeno en suelo Linderos, suelo Linderos estéril, suelo Linderos con biosólido y suelo Linderos con biosólido estériles.

Tabla 6: Parametros de Freundlich para la adsorción de Ketoprofeno en suelo Linderos, Suelo Linderos Estéril, Suelo Linderos con biosólido y Suelo Linderos con biosólido Estériles.

	Kf ($\text{mg}^{n-1} \text{L}^n \text{g}^{-1}$)	n	R ²	Kd (L g^{-1})
Suelo Linderos	0,0579	0,7959	0,8310	0,0419
Suelo Estéril	0,0684	0,7732	0,8637	0,0470
Suelo+ Biosólido	0,0201	1,2101	0,9426	0,0366
Suelo+Biosólido Estériles	0,0669	0,8406	0,7633	0,0619

Las isothermas de adsorción del Naproxeno en Suelo Linderos y en éste con los distintos tratamientos, se presentan en el Figura 22, mientras que los parámetros de ajuste de las isothermas de Freundlich, se presentan en la Tabla 7.

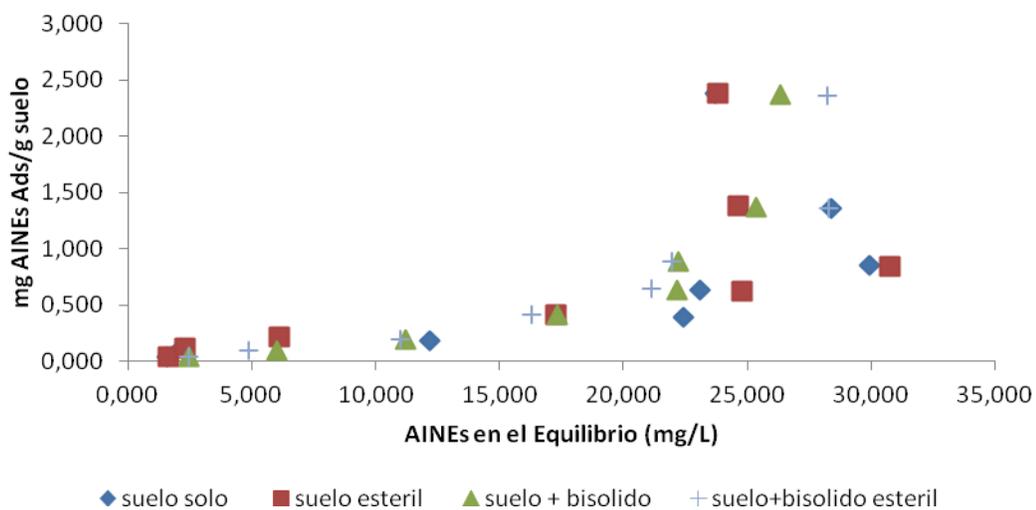


Figura 22: Isotherma de adsorción de Naproxeno en suelo Linderos, suelo Linderos estéril, suelo Linderos con biosólido y suelo Linderos con biosólido estériles.

Tabla 7: Parámetros de Freundlich para la adsorción de Naproxeno en suelo Linderos, Suelo Linderos Estéril, Suelo Linderos con biosólido y Suelo Linderos con biosólido Estériles.

	Kf ($\text{mg}^{n-1} \text{L}^n \text{g}^{-1}$)	n	R ²	Kd (L g^{-1})
Suelo Linderos	0,0337	0,9945	0,7867	0,0398
Suelo estéril	0,0329	1,0596	0,8589	0,0429
Suelo+ Biosólido	0,0066	1,5813	0,9172	0,0357
Suelo +Biosólido Estériles	0,0082	1,5128	0,9428	0,0353

A continuación (Figura 23) se muestran las isotermas de adsorción del Diclofenaco en Suelo Linderos y en éste con los distintos tratamientos, mientras que los parámetros de ajuste de las isotermas de Freundlich, se presentan en la Tabla 7.

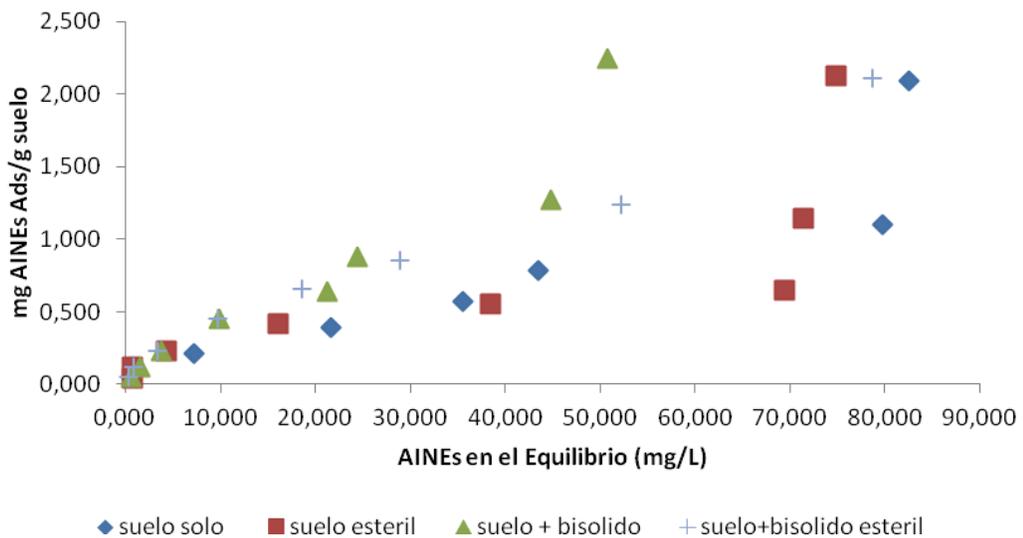


Figura 23: Isotherma de adsorción de Diclofenaco en suelo Linderos, suelo Linderos estéril, suelo Linderos con biosólido y suelo Linderos con Biosólido estériles.

Tabla 8: Parámetros de Freundlich para la adsorción de Diclofenaco en suelo Linderos, Suelo Linderos Estéril, Suelo Linderos con Biosólido y Suelo Linderos con Biosólido Estériles.

	Kf ($\text{mg}^{\text{n-1}} \text{L}^{\text{n}} \text{g}^{-1}$)	n	R ²	Kd (L g^{-1})
Suelo Linderos	0,0806	0,6108	0,9303	0,0422
Suelo estéril	0,0896	0,5805	0,8875	0,0471
Suelo+ Biosólido	0,0734	0,7903	0,9816	0,0393
Suelo +Biosólido Estériles	0,1079	0,6398	0,9916	0,0639

Las isotermas de adsorción del Ibuprofeno en Suelo Linderos y en éste con los distintos tratamientos, se presentan en el Figura 24, mientras que los parámetros de ajuste de Freundlich se muestran en la Tabla 9.

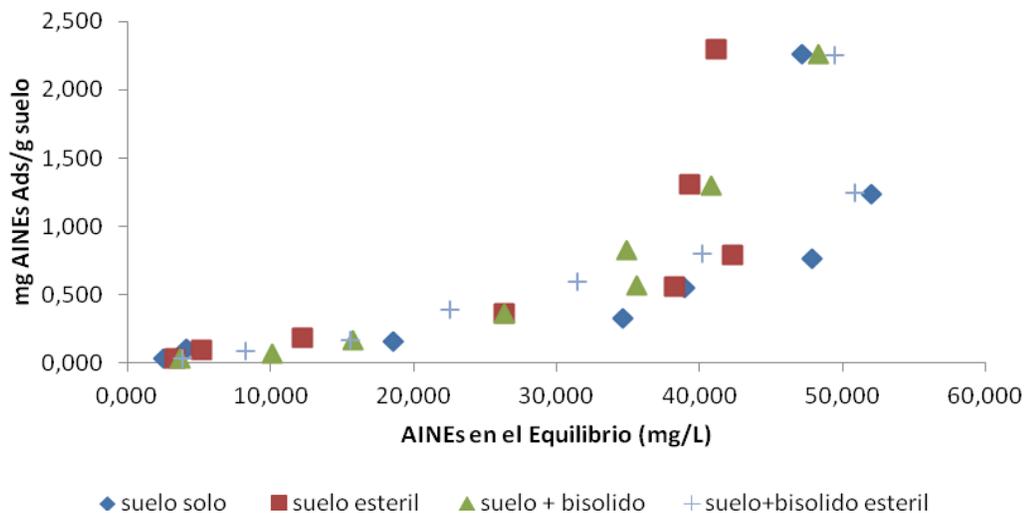


Figura 24: Isotherma de adsorción de Ibuprofeno en suelo Linderos, suelo Linderos estéril, suelo Linderos con biosólido y suelo Linderos con biosólido estériles.

Tabla 9: Parámetros de Freundlich para la adsorción de Ibuprofeno en suelo Linderos, Suelo Linderos Estéril, Suelo Linderos con Biosólido y Suelo Linderos con Biosólido Estériles.

	Kf ($\text{mg}^{\text{n}-1} \text{L}^{\text{n}} \text{g}^{-1}$)	n	R²	Kd (L g^{-1})
Suelo Linderos	0,0154	1,0371	0,8289	0,0200
Suelo estéril	0,0083	1,2904	0,8923	0,0226
Suelo+ Biosólido	0,0026	1,6091	0,9380	0,0190
Suelo +Biosólido Esteriles	0,0033	1,5355	0,9695	0,0199

A partir de los resultados obtenidos se puede deducir que los procesos de degradación biológica (por microorganismos) juegan un papel importante en la adsorción de los antiinflamatorios en los diferentes sistemas en estudio. Entre las enzimas que catalizan las reacciones de degradación se encuentran las dehalogenasas, las oxigenasas y las hidrolasas. Cada tipo de enzima se ha asociado con determinadas especies químicas de compuestos.

Como se dijo anteriormente el oxígeno también juega un rol importante en la degradación de estas sustancias, ya que se pueden incorporar al anillo aromático ayudando a desestabilizarlo.

De acuerdo a los datos obtenidos, al comparar los resultados en suelo Linderos sin dosis de biosólido y con incorporación de biosólido (Tabla 6, 7, 8 y 9) existe una disminución en la cantidad de cada analito adsorbido (Kd) en el suelo al agregar biosólido, lo que sugiere que la actividad microbiana tiene un rol importante en la degradación de los antiinflamatorios no estereoidales (AINEs) en el suelo. Por la tanto, se evaluó la inhibición o remoción de los componentes que tienen actividad biológica en el suelo, a través de estudios en suelo y suelo con biosólido esterilizados con cloroformo, obteniéndose así una disminución de la actividad microbiana.

Al agregar biosólido estéril al suelo lindero esterilizado se puede observar que el valor Kd (Tabla 5) para Ketoprofeno aumenta de 0,0470 a 0,0619 (L g^{-1}), lo que indica un incremento de la cantidad adsorbida, este aumento se podría deber a la mayor cantidad de sitios que ofrece la materia orgánica que contiene el biosólido, permitiendo

la fijación o retención de los analitos. Este efecto no se observa al agregar Biosólido al suelo linderos, ambos no esterizados, (Tabla 6), esto se puede deber a que si bien se aumentan los sitios disponibles para la adsorción de Ketoprofeno, la degradación microbiana tiene un efecto más significativo que dicha adsorción.

En el caso del Naproxeno se aprecia que al comparar los valores de Kd (Tabla 7) la adsorción en el suelo Linderos esterilizado sin dosis de biosólido en comparación al suelo sin esterilizar es similar, este comportamiento se puede explicar por los estudios de degradación realizado por Lin (2011) de Diclofenaco, Ibuprofeno y Naproxeno siguiendo el modelo de Decaimiento Exponencial ($C_t = C_0 e^{-kt}$), en donde se determinó que bajo condiciones aeróbicas el tiempo de vida media del Diclofenaco, Ibuprofeno y Naproxeno para un suelo franco (similar a Linderos) fue de 29,6; 15,2 y 69,3 días, respectivamente. Aunque la disminución en la concentración de Naproxeno (Lin 2011), indicaría que existe degradación en condiciones aeróbicas, esta disminución es menor que para los otros dos compuestos, por lo tanto la degradación microbiana tendría un efecto menor sobre la adsorción.

En estudios de degradación realizados por Lin y col. (2011), para el caso del Diclofenaco no encontraron una disminución significativa en la concentración en suelos esterilizados bajo condiciones aeróbicas y, por lo tanto, se sugiere que los microorganismos juegan un rol importante en su degradación. Este resultado obtenido por Lin 2011, puede explicar el comportamiento del Diclofenaco observado (Tabla 8), donde se aprecia que la adsorción de éste en suelo estéril con Biosólido estéril es mayor que en el suelo con Biosólido sin esterilizar, por lo tanto es de esperar que en ausencia de la flora microbiana de este suelo, sus niveles de adsorción aumenten pues no existe población microbiana que la pueda degradar.

Por otro lado, el Ibuprofeno en el mismo estudio (Lin y col., 2011) bajo condiciones aeróbicas, muestra degradación significativa y sus concentraciones disminuyen a medida que avanza el tiempo, esta disminución está ligada a la formación de residuos no extraíbles; sin embargo, bajo condiciones anaeróbicas la degradación de este compuesto disminuye considerablemente. En la literatura se ha encontrado (Lin y col., 2006) que el Ibuprofeno sufre una transformación microbiana oxidativa a metabolitos

hidroxilados, en mayor medida, y a metabolitos carboxilados, en menor medida, bajo condiciones aeróbicas. Debido a esto, se puede deducir que los bajos niveles de adsorción de ibuprofeno al observar los valores de K_d (Tabla 9) se producen por efecto de esta biodegradación.

Si bien la degradación microbiana tiene un papel fundamental sobre la degradación de los de los AINEs en estudio, existen otros tipos de degradaciones involucradas, como lo son la oxidativa, fotodegradación, entre otras. En este estudio solo se evaluó el efecto de la degradación microbiana, al esterilizar tanto el suelo como el Biosólido. Se observa, claramente en el caso del Diclofenaco y Ketoprofeno (Tabla 6 y 8) que este tipo de degradación juega un rol importante, ya que al suprimir la actividad microbiana con la esterilización del suelo con Biosólido la adsorción de estos antiinflamatorios aumento, en comparación con el suelo sin esterilizar. En cambio, en el caso de Naproxeno e Ibuprofeno (Tabla 7 y 9) no se observa un aumento de la adsorción al inhibir la actividad microbiana, por ende se puede atribuir que este tipo de degradación no es preponderante.

5. CONCLUSIONES

- La metodología aplicada permitió la separación de los cuatro antiinflamatorios en el siguiente orden: Ketoprofeno, Naproxeno, Diclofenaco e Ibuprofeno, en un tiempo inferior a 22 min.
- En los estudios de biodisponibilidad disminuyó la cantidad de antiinflamatorios remanentes en las soluciones nutritivas, sin embargo, no fue posible la cuantificación de éstos en las plantas de trigo, posiblemente por fenómenos de degradación ocurridos durante el proceso.
- Las isotermas de adsorción de los AINEs en estudio se ajustaron al modelo matemático de Freundlich, al presentar valores de coeficiente de correlación para los diferentes analitos entre 0,78 - 0,99.
- La incorporación de biosólido sin esterilizar sobre el suelo Linderos sin esterilizar, provocó una disminución en la cantidad de cada analito adsorbido (K_d), lo que sugiere que la actividad microbiana tiene un rol importante en la degradación de los antiinflamatorios no esteroideos en el suelo.
- Para el caso de Diclofenaco y Ketoprofeno al suprimir la actividad microbiana con esterilización del suelo y del biosólido, la adsorción de estos antiinflamatorios aumentó con la incorporación de biosólido, en comparación con el suelo sin esterilizar, este aumento se podría deber a la mayor cantidad de sitios que ofrece la materia orgánica que contiene el biosólido, permitiendo la fijación o retención de los analitos.
- En el caso de Naproxeno e Ibuprofeno al suprimir la actividad microbiana con esterilización del suelo y del biosólido, la adsorción de estos antiinflamatorios no

incrementó con la incorporación de biosólido, por ende se puede concluir que este tipo de degradación para estos analitos no es preponderante.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alexander M. (1982). Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science & Technology*.34: 4259–4265
- Báez M.E., Rodríguez M., Vilches P., Romero E. (2001). Adsorption of Metabenzthiazuron on six allophanic soils: Effect of organic matter amendment. *Journal of Environmental Science and Health*, 36: 95-105.
- Carballa M., Omil F., Lema J.M., Llombart M., Garcia-Jares C., Rodriguez I., Gomez M., Ternes T.A. (2004). Behaviour of Pharmaceuticals, Cosmetics and Hormones in sewage Treatment Plant. *Water Research*. 38: 2918–2926.
- Castañeda F., Valverde CH., García L. (1997). Manual de cultivos hidropónicos populares: producción de verduras sin usar tierra. Guatemala, Instituto de nutrición de centro América y Panamá.
- Centro de Información de Recursos Naturales. Descripción de Suelos, Materiales y Símbolos. Publicación 115. Región Metropolitana, Ciren CORFO, (1996). Tomo II.
- Daughton C.G., Ternes T.A. (1999). Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change. *Environmental Health Perspectives*. 107: 907–938.
- D.S.N° 004, de 2009, del Ministerio Secretaría General de la Presidencia (DO 28.10.09), Reglamento para el manejo de lodos generados en plantas de tratamiento de aguas servidas.
- Feria M. (2005). Fármacos analgésicos-antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos. Antiartríticos. En: JESÚS FLÓREZ. *Farmacología Humana*. Cuarta Edición. España. Masson, 355-387.

- Freundlich, H. (1926). "Colloid and Capillary Chemistry". Methuen, London.
- Garrido T. (2000). Bioacumulacion de cadmio, cromo y cromo en *Apium Gaveolens* crecido en un sustrato contaminado. Memoria de titulo para optar al título de Químico. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Químicas Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- Gentili A. (2007). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in environmental samples by chromatographic and electrophoretic techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 387:1185–1202
- Giles C. H., Smith D., Huitson A. (1974). A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. *Journal of Colloid and Interface Science* 47: 755-765.
- Giles C. H., MacEwan T., Nakhwa S., Smith, D. (1960). Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids. *Journal of the Chemical Society*. 111: 3973- 3993.
- Golet, E.M., A.C. Alder, A. Hartmann, T.A. Ternes and W. Gigger. (2001). Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical Chemistry*. 73: 3632-3638.
- Gómez M., Petrovic M., Amadeo R. Fernández A., Barceló D. (2006). Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1114: 224–233.

- Gross M., Petrović M., Barceló D. (2006). Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 70: 678–690.
- Halling-Sorensen B., Nielsen S.N., Lanzky P.F., Ingerslev F., Lutzhoft H.C.H., Jorgensen, S.E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment. *Chemosphere* 36: 357-394.
- Heberer T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment. *Toxicology Letters*. 13: 5–17.
- Hinz C. (2001). Description of sorption data with isotherm equations. *Geoderma* 99: 225-243.
- King P., Srinivas P., Kumar Y. P., Prasad V. S. (2006). "Sorption of copper (II) ion from aqueous solution by *Tectona grandis* l.f. (teak leaves powder)". *Journal of Hazardous Materials* 136: 560-566.
- Lin A., Reinhard M. (2005). Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24: 1303-1309.
- Lin K., Gan J. (2011). Sorption and degradation of wastewater-associated non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics in soils. *Chemosphere* 83: 240-246.
- Langmuir, I. (1918). "The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum". *Journal of the American Chemical Society* 40: 1361-1382.
- Limousin G., Gaudet J. P., Charlet L., Sznknect S., Barthès V., Krimissa M. (2007). Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. *Applied Geochemistry* 22: 249-275.

- Marambio C., Ortega R. (2003). Uso potencial de lodos derivados del tratamiento de aguas servidas en la producción de cultivos en Chile. *Revista agronomía y Forestal UC*, 20:20-23.
- Rámila G., Sebastián I., Rojas B. (2008). Alternativas de uso y disposición de Biosólidos y su impacto en las tarifas de agua. Seminario (Ingeniero Comercial Mención Administración). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Economía y Negocios. 9-28.
- Riedeman J. P., Illesca M., Droghetti J. (2001). Automedicación en individuos de la Región de la Araucanía con problemas musculo esqueléticos. Chile. *Revista Médica de Chile*.129:647-652.
- Sadzawka M.A., Zagal E. (2006). *Métodos de Análisis Recomendados para los Suelos de Chile*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Serie Actas INIA-N°34, Santiago, Chile.
- Santos J.L., Aparicio I., Alonso E., Callejón M. (2005). Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors. *Analytica Chimica Acta*, 550:116–122.
- Shukla S. R., Pai R. S. (2005). Adsorption of Cu(II), Ni(II) and Zn(II) on dye loaded groundnut shells and sawdust. *Separation and Purification Technology* 43: 1-8.
- Stumpf M., Ternes T.A., Wilken R.D., Rodrigues S.V., Baumann W. (1999). Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Science of the Total Environment*. 225: 135.-141
- Tan K.J. (1998). *Principles of soil chemistry*. 3° Ed. Marcel Dekker, Inc. Nueva York.

- Ternes T.A., Kreckel P., Mueller J, (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Science of the Total Environment*. 225: 91-99
- Ternes T.A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*. 32: 3245- 3260
- UNIVERSIA. Uso y abuso de los antiinflamatorios: Alerta por alto consumo. [en línea]<<http://noticias.universia.cl/vidauniversitaria/noticia/2009/04/15/291698/uso-abuso-antiinflamatorios-alerta-alto-consumo.html>> [consulta: 5 de agosto 2012].
- Weigel S., Kallenborn R., Hühnerfuss H. (2004). Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1023:183–195.
- Xu J., Wu L., Chang A. C. (2009). Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils. *Chemosphere* 77: 1299–1305

7. ANEXOS

7.1. Curvas de calibración

Tabla A1: Curva de calibración muestras de acuosas

Concentración ppm	Ketoprofeno Area	Naproxeno Area	Diclofenaco Area	Ibuprofeno Area
0,5	20632	115624	46116	23931
1	39537	159348	62011	25312
2	82570	351628	156258	76295
4	197272	949913	328669	186040
6	280056	1269793	499086	242168
8	374211	1697983	598564	353413
10	437097	1822303	607820	388055

Tabla A2: Curva de calibración muestras de suelo

Concentración (ppm)	Ketoprofeno Area	Naproxeno Area	Diclofenaco Area	Ibuprofeno Area
0,5	28040	115324	39500	24773
1	61148	252582	90121	48160
2	107672	458838	162562	96365
4	225258	965187	341064	199018
6	346929	1440022	504043	304679
8	490567	2122529	837392	498480
10	636612	2699490	937031	526160

7.2. Contenido de metales trazas en suelo y biosólido

Tabla A3: Contenido de metales traza en suelo Linderos y en biosólido

	LINDEROS		BIOSÓLIDO	
	(mg/kg)	Desv. Est.	(mg/kg)	Desv. Est.
Cu	150,360	1,731	629,751	17,770
Zn	245,667	2,913	1497,913	19,887
Ni	55,004	9,495	99,741	1,876
Pb	51,784	1,289	64,907	3,993
Cr	34,361	16,115	366,685	21,211
Cd	3,670	0,197	2,992	0,103

7.3. Cantidad de AINEs en equilibrio y adsorbidos en los distintos sistemas suelo-biosólido.

7.3.1. Suelo Linderos

Tabla A4: Cantidad de AINEs en el equilibrio y adsorbido por suelo Linderos

Concentración en el Equilibrio (mg/L)				Concentración Adsorbida (mg/g)			
Ketoprofeno	Naproxeno	Diclofenaco	Ibuprofeno	Ketoprofeno	Naproxeno	Diclofenaco	Ibuprofeno
0,875	1,551	0,560	2,487	0,046	0,042	0,047	0,038
1,433	2,118	0,913	4,111	0,118	0,114	0,120	0,104
9,616	12,171	7,185	18,576	0,202	0,189	0,214	0,157
22,507	22,407	21,657	34,679	0,387	0,388	0,392	0,327
26,815	23,097	35,610	39,003	0,616	0,635	0,572	0,555
34,263	29,913	43,457	47,843	0,829	0,850	0,783	0,761
38,137	28,412	79,730	52,056	1,309	1,358	1,101	1,240
29,095	23,696	82,572	47,179	2,355	2,382	2,087	2,264

7.3.4. Suelo Linderos esterilizado

Tabla A5: Cantidad de AINEs en el equilibrio y adsorbido por suelo Linderos esterilizado

Concentración en el Equilibrio (mg/L)				Concentración Adsorbida (mg/g)			
Ketoprofeno	Naproxeno	Diclofenaco	Ibuprofeno	Ketoprofeno	Naproxeno	Diclofenaco	Ibuprofeno
0,796	1,642	0,700	3,334	0,046	0,042	0,046	0,033
1,319	2,304	0,740	5,122	0,118	0,113	0,121	0,099
5,042	6,076	4,353	12,246	0,225	0,220	0,228	0,189
17,165	17,274	16,112	26,367	0,414	0,414	0,419	0,368
31,150	24,793	38,427	38,295	0,594	0,626	0,558	0,559
38,601	30,783	69,465	42,346	0,807	0,846	0,653	0,788
31,976	24,621	71,429	39,279	1,340	1,377	1,143	1,304
30,134	23,818	74,927	41,192	2,349	2,381	2,125	2,294

7.3.3. Suelo Linderos con biosólido

Tabla A6: Cantidad de AINEs en el equilibrio y adsorbido por suelo Linderos con biosólido

Concentración en el Equilibrio (mg/L)				Concentración Adsorbida (mg/g)			
Ketoprofeno	Naproxeno	Diclofenaco	Ibuprofeno	Ketoprofeno	Naproxeno	Diclofenaco	Ibuprofeno
1,648	2,438	0,631	3,679	0,042	0,038	0,047	0,032
3,586	5,991	1,562	10,084	0,107	0,095	0,117	0,075
8,552	11,188	3,811	15,798	0,207	0,194	0,231	0,171
15,741	17,333	9,873	26,384	0,421	0,413	0,451	0,368
23,177	22,164	21,268	35,636	0,634	0,639	0,644	0,572
25,276	22,238	24,387	34,940	0,874	0,889	0,878	0,825
27,963	25,360	44,866	40,813	1,360	1,373	1,276	1,296
30,958	26,321	50,815	48,337	2,345	2,368	2,246	2,258

7.3.4. Suelo Linderos con biosólido esterilizados

Tabla A7: Cantidad de AINEs en el equilibrio y adsorbido por suelo Linderos con biosólido esterilizados

Concentración en el Equilibrio (mg/L)				Concentracion Adsorbida (mg/g)			
Ketoprofeno	Naproxeno	Diclofenaco	Ibuprofeno	Ketoprofeno	Naproxeno	Diclofenaco	Ibuprofeno
1,522	2,439	0,333	3,823	0,042	0,038	0,048	0,031
3,103	4,864	0,902	8,288	0,109	0,101	0,120	0,084
1,151	10,974	3,314	15,575	0,244	0,195	0,233	0,172
13,082	16,293	9,734	22,552	0,435	0,419	0,451	0,387
21,783	21,119	18,666	31,433	0,641	0,644	0,657	0,593
23,678	21,949	28,925	40,228	0,882	0,890	0,855	0,799
31,257	28,271	52,189	50,838	1,344	1,359	1,239	1,246
30,374	28,221	78,669	49,458	2,348	2,359	2,107	2,253