



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

“Estudio de disponibilidad de Antiinflamatorios no esteroideos en suelos agrícolas enmendados con biosólidos mediante extracción con ultrasonido y su comparación con la fracción biodisponible utilizando plantas de Trigo.”

Memoria para optar al Título de Químico

Karla Alejandra Leiva Miranda

Profesor Patrocinante y Director de Tesis

Dra. María Loreto Ascar Estay.

Santiago – Chile

2013

*Dedicado a mis Padres y Hermanos
sin ustedes y su apoyo incondicional
ésto no hubiera sido posible.*

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres, Leopoldo y Rosa, por apoyarme desde pequeña en todas las decisiones que he tomando, sobre todo en la de entrar en la carrera de Química. Por acompañarme en todo este camino incondicionalmente, por todas las veces en que los hice trasnochar solo para acompañarme, o levantarse temprano cuando tenía que rendir las pruebas los sábados. Porque al fin pueden decir “Tarea Cumplida”.

A Leopoldo, mi hermano mayor, que a pesar de la distancia siempre ha estado apoyándome, desde muy pequeña cuidándome y enseñándome, por ser mi figura paterna cuando mi padre se encontraba lejos trabajando por nosotros. Y por mis dos hermosos sobrinos, Hallgrimur y Elinbjörg, que me alegran cada vez que los puedo ver.

A Claudio, mi hermano y amigo, mi ñoñis, por estar siempre conmigo acompañándome en los buenos y malos momentos a lo largo de mi corta vida, por apoyarme en todo, ayudarme cuando lo necesitaba, entregarme sus conocimientos, por alegrarme los días de trabajo en el laboratorio. Y por mi pequeño sobrino Miguelito, que con sus besos y abrazos me llena de alegría.

A Alejandro, mi pareja y mejor amigo, porque sin su apoyo incondicional todo el camino recorrido durante estos 6 años hubiera sido más difícil. Por estar conmigo desde el primer día en que entré a la carrera y ayudarme desde el primer instante. Por creer en mí y mis convicciones, por escuchar mis suposiciones y corregir mis errores. Por levantarme el ánimo las veces en que me era difícil continuar.

A mi Directora de Tesis, Loreto Ascar, gracias por depositar en mí toda la confianza para llevar a cabo esta investigación, por entregarme todas las herramientas y conocimientos necesarios, por la paciencia y dedicación que me has entregado. Por tu buen humor, cariño y por ser tan maternal. Porque más que a una profesora gané una amiga en la que poder confiar.

A los profesores Inés Ahumada y Pablo Richter, por haberme recibido en el laboratorio siempre con los brazos abiertos, por estar siempre dispuestos a aportarme con sus conocimientos en mi formación como Químico.

A mis amigos, Montserrat, Macarena, Marco, Eduardo, Gastón, Dennis, Nathaly, Carlos, por estar siempre conmigo durante toda la carrera, por el apoyo que siempre me entregaron, por el conocimiento compartido, por todas las risas, los comentarios sin razón, las frases celebres, por la distracción en momentos de estrés o simplemente por estar ahí.

A Cristina y mis compañeros de laboratorio, por hacer a menos el día de trabajo en el laboratorio.

Y por último, al proyecto FONDECYT N° 11090287 por el financiamiento que hizo posible esta investigación.

Tabla de contenidos

I.	Introducción.....	1
II.	Objetivos.....	15
2.1	Objetivos Generales.....	15
2.2	Objetivos Específicos.....	15
III.	Materiales y Métodos.....	16
3.1	Reactivos.....	16
3.2	Equipos.....	16
3.3	Materiales.....	17
3.4	Muestras.....	18
3.4.1	Suelo Polpaico (PLP).....	18
3.4.2	Biosólido.....	18
3.5	Metodologías.....	19
3.5.1	<i>Caracterización de Suelo y Biosólido.</i>	19
3.5.1.1	Determinación de pH.....	19
3.5.1.2	Determinación de Materia Orgánica.....	19
3.5.1.3	Determinación de Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC).....	20
3.5.1.4	Determinación de Metales Totales: Cromo, Cobre, Níquel y Cinc.....	20
3.5.2	<i>Preparación de los diferentes sistemas suelo-biosólido y plantas.</i>	21
3.5.2.1	Enriquecimiento con biosólido.....	21
3.5.2.2	Enriquecimiento con antiinflamatorio.....	22
3.5.2.3	Esterilización de los suelos.....	22
3.5.2.4	Ensayo de invernadero – Plantas de Trigo.....	22
3.5.2.5	Tratamiento de las Plantas de Trigo a partir de ensayo invernadero.....	23
3.5.3	<i>Cuantificación de AINE's mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acoplada a Detector de Arreglo de Diodos (DAD).</i>	24
3.5.4	<i>Metodología de extracción de AINE's desde los diferentes sistemas.</i>	25
3.5.4.1	Extracción Cuantitativa de AINE's desde suelo y biosólido.....	26
3.5.4.2	Extracción de la fracción disponible de AINE's desde los sistemas suelo-biosólido.....	27
3.5.4.3	Extracción de la fracción biodisponible desde plantas de trigo.....	28
3.5.4.4	Extracción en Fase Sólida utilizando Cartridge Oasis HLB (Clean up).....	29
IV.	Resultados y Discusión.....	31
4.1	Caracterización de suelos y biosólidos.....	31
4.2	Cuantificación de AINE's mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	33
4.3	Extracción cuantitativa de AINE's desde suelo y biosólido.....	38

4.4	Fracción disponible de AINE's desde los sistema suelo-biosólido enriquecidos con antiinflamatorios.....	39
4.5	Extracción de la fracción biodisponible de AINE's desde plantas de trigo.	69
4.6	Correlaciones entre las fracciones disponibles de AINE's en los sistemas suelo-biosólido y su contenido en las plantas de trigo.....	73
V.	Conclusiones	81
VI.	Bibliografía.....	83
VII.	Anexo	89

Índice de Tablas

Tabla 1: Comparación RILES industria farmacéutica vs residuo doméstico.....	3
Tabla 2: Propiedades Físicoquímicas de los AINE's.....	9
Tabla 3: Estructura de los AINE's más comunes.....	10
Tabla 4: Características farmacocinéticas de los AINE's.....	11
Tabla 5: Concentraciones de AINE's en el medioambiente acuático.....	12
Tabla 6: Condiciones cromatográficas.....	24
Tabla 7: Método de extracción cuantitativa de AINE's para suelo y biosólido.....	26
Tabla 8: Método de extracción cuantitativa de AINE's para plantas de trigo.....	28
Tabla 9: Propiedades físicoquímicas del Biosólido y suelo Polpaico.....	31
Tabla 10: Tiempos de retención y Longitudes de ondas característicos para cada AINE's en metanol.....	34
Tabla 11: Concentración de AINE's en el Suelo Polpaico y Biosólido.....	38
Tabla 12: Porcentajes de extracción para Ketoprofeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido sin esterilizar enriquecido con $0,2\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.....	40
Tabla 13: Porcentajes de extracción para Ketoprofeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido esterilizado enriquecido con $0,2\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.....	41
Tabla 14: Porcentajes de extracción para Ketoprofeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido sin esterilizar enriquecido con $0,4\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.....	42
Tabla 15: Porcentajes de extracción para Ketoprofeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido esterilizado enriquecido con $0,4\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.....	43
Tabla 16: P-value para test ANOVA Multifactorial con concentración de Ketoprofeno y dosis de Biosólido como factores.....	47
Tabla 17: Porcentajes de extracción para Naproxeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido sin esterilizar enriquecido con $0,2\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.....	48
Tabla 18: Porcentajes de extracción para Naproxeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido esterilizado enriquecido con $0,2\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.....	49
Tabla 19: Porcentajes de extracción para Naproxeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido sin esterilizar enriquecido con $0,4\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.....	50
Tabla 20: Porcentajes de extracción para Naproxeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido esterilizado enriquecido con $0,4\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.....	51
Tabla 21: P-value para test ANOVA Multifactorial con concentración de Naproxeno y dosis de Biosólido como factores.....	54
Tabla 22: Porcentajes de extracción para Diclofenaco utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido sin esterilizar enriquecido con $0,2\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.....	55
Tabla 23: Porcentajes de extracción para Diclofenaco utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido esterilizado enriquecido con $0,2\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.....	56

Tabla 24: Porcentajes de extracción para Diclofenaco utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido sin esterilizar enriquecido con $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's. 57	57
Tabla 25: Porcentajes de extracción para Diclofenaco utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido esterilizado enriquecido con $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's. .. 58	58
Tabla 26: P-value para test ANOVA Multifactorial con concentración de Diclofenaco y dosis de Biosólido como factores..... 61	61
Tabla 27: Porcentajes de extracción para Ibuprofeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido sin esterilizar enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's. 62	62
Tabla 28: Porcentajes de extracción para Ibuprofeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido esterilizado enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's. .. 63	63
Tabla 29: Porcentajes de extracción para Ibuprofeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido sin esterilizar enriquecido con $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's. 64	64
Tabla 30: Porcentajes de extracción para Ibuprofeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido esterilizado enriquecido con $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's. .. 65	65
Tabla 31: P-value para test ANOVA Multifactorial con concentración de Ibuprofeno y dosis de Biosólido como factores..... 68	68
Tabla 32: Biomosas de las plantas de trigo para los suelos enriquecidos con AINE's y enmendados con Biosólido..... 69	69
Tabla 33: Concentración de AINE's en plantas de trigo cultivadas en suelo sin esterilizar. 70	70
Tabla 34: Concentración de AINE's en plantas de trigo cultivadas en suelo esterilizado. 70	70
Tabla 35: Test ANOVA Multifactorial para las plantas de trigo a un intervalo de confianza del 95%. 73	73
Tabla 36: Correlaciones para Ketoprofeno en plantas de trigo y extractantes en los diferentes sistemas en estudio. 74	74
Tabla 37: Correlaciones para Naproxeno en plantas de trigo y extractantes en los diferentes sistemas en estudio. 76	76
Tabla 38: Correlaciones para Diclofenaco en plantas de trigo y extractantes en los diferentes sistemas en estudio. 77	77
Tabla 39: Correlaciones para Diclofenaco en plantas de trigo y extractantes en los diferentes sistemas en estudio. 79	79
Tabla 40: Contenido de metales traza en suelo polpaico y biosólido. 89	89
Tabla 41: Áreas de Curvas de calibración para Ketoprofeno en diferentes solventes. ... 89	89
Tabla 42: Áreas de Curvas de calibración para Naproxeno en diferentes solventes..... 90	90
Tabla 43: Áreas de Curvas de calibración para Diclofenaco en diferentes solventes. 90	90
Tabla 44: Áreas de Curvas de calibración para Ibuprofeno en diferentes solventes..... 91	91

Tabla 45: Porcentajes de extracción de las plantas de trigo en los sistemas suelo-biosólido sin esterilizar.....	91
Tabla 46: Porcentajes de extracción de las plantas de trigo en los sistemas suelo-biosólido esterilizado.....	92

Índice de Figuras

Figura 1: Esquema del proceso de tratamiento de aguas residuales de una Planta de tratamiento de aguas servidas (PTAS).....	5
Figura 2: Oxidación de la Materia Orgánica.....	6
Figura 3: Estructura de la fase sorbente Oasis HLB.....	13
Figura 4: Cromatograma de un estándar de 8 mg L ⁻¹ de AINE's en metanol.....	33
Figura 5: Espectros de Absorbancia de Ketoprofeno (a), Naproxeno (b), Diclofenaco (c) e Ibuprofeno (d) de un estándar de 8 mg L ⁻¹ de AINE's en metanol.....	37
Figura 6: Concentración de la especie predominante de ketoprofeno versus el pH de la solución (Chemicalize.org/ketoprofen).....	45
Figura 7: Concentración de la especie predominante de naproxeno versus el pH de la solución (Chemicalize.org/naproxen).....	53
Figura 8: Concentración de la especie predominante de diclofenaco versus el pH de la solución (Chemicalize.org/diclofenac).....	60
Figura 9: Concentración de la especie predominante de ibuprofeno versus el pH de la solución (Chemicalize.org/ibuprofen).....	67

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Concentración de diversos contaminantes emergentes en lodos.....	8
Gráfico 2: Concentración de Cr, Cu, Ni y Zn en el Suelo Polpaico.....	31
Gráfico 3: Concentración de Cr, Cu, Ni y Zn en el Biosólido.	32
Gráfico 4: Curvas de Calibración para Ketoprofeno en diferentes solventes.	34
Gráfico 5: Curvas de Calibración para Naproxeno en diferentes solventes.....	35
Gráfico 6: Curvas de Calibración para Diclofenaco en diferentes solventes.....	35
Gráfico 7: Curvas de Calibración para Ibuprofeno en diferentes solventes.....	36
Gráfico 8: Cantidad de Ketoprofeno extraída por gramo de suelo sin esterilizar en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.....	40
Gráfico 9: Cantidad de Ketoprofeno extraída por gramo de suelo esterilizado en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.....	41
Gráfico 10: Cantidad de Ketoprofeno extraída por gramo de suelo sin esterilizar en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.....	42
Gráfico 11: Cantidad de Ketoprofeno extraída por gramo de suelo esterilizado en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.....	43
Gráfico 12: Cantidad de Naproxeno extraída por gramo de suelo sin esterilizar en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.....	48
Gráfico 13: Cantidad de Naproxeno extraída por gramo de suelo esterilizado en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.....	49
Gráfico 14: Cantidad de Naproxeno extraída por gramo de suelo sin esterilizar en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.....	50
Gráfico 15: Cantidad de Naproxeno extraída por gramo de suelo esterilizado en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.....	51
Gráfico 16: Cantidad de Diclofenaco extraída por gramo de suelo sin esterilizar en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.....	55

Gráfico 17: Cantidad de Diclofenaco extraída por gramo de suelo esterilizado en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.....	56
Gráfico 18: Cantidad de Diclofenaco extraída por gramo de suelo sin esterilizar en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.....	57
Gráfico 19: Cantidad de Diclofenaco extraída por gramo de suelo esterilizado en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.....	58
Gráfico 20: Cantidad de Ibuprofeno extraída por gramo de suelo sin esterilizar en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.....	62
Gráfico 21: Cantidad de Ibuprofeno extraída por gramo de suelo esterilizado en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.....	63
Gráfico 22: Cantidad de Ibuprofeno extraída por gramo de suelo sin esterilizar en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.....	64
Gráfico 23: Cantidad de Ibuprofeno extraída por gramo de suelo esterilizado en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.....	65

Resumen

En la actualidad, existe un creciente interés por los “contaminantes emergentes”, los cuales corresponden a contaminantes no regulados, pero que pueden ser candidatos para una futura regulación. Estos compuestos no necesitan persistir en el medio ambiente para ser dañinos, ya que son introducidos constantemente en el medioambiente, compensando así su alto índice de remoción, degradación y transformación. Dentro de estos contaminantes emergentes se encuentran los fármacos, de los cuales no existe información disponible sobre su incidencia y riesgo en el medio ambiente ni datos ecotoxicológicos, por lo que las consecuencias de su presencia en el ambiente son inciertas.

Estos compuestos han sido encontrados en aguas superficiales, aguas subterráneas, en la red de alcantarillado e incluso en fuentes de abastecimiento de agua potable. La presencia de fármacos en la red de alcantarillado se debe principalmente al excesivo uso de éstos por parte de la población humana al ser excretado mediante heces fecales y orina; por otro lado, una gran cantidad de fármacos vencidos son vertidos directamente al alcantarillado, tanto por parte de hospitales como por farmacias.

En la Región Metropolitana, la gran mayoría de industrias farmacéuticas vierten sus desechos directamente al alcantarillado, cumpliendo escasamente con la norma que actualmente se encuentra vigente para desechos de RILES al alcantarillado. Posteriormente, las aguas llegan a las plantas de tratamiento de aguas servidas, que se encargan de descontaminar los recursos hídricos de la región, para luego ser utilizados con fines agrícolas. Es sabido que una fracción de los contaminantes presentes no son eliminados en el proceso, pudiendo quedar

en las aguas, lo que provocaría contaminar los suelos agrícolas del lugar que son regados con éstas o en el biosólido. Una de las disposiciones finales de estos biosólidos es el uso como fertilizantes, ya que son ricos en nutrientes como Nitrógeno, Fósforo y Potasio (NPK), pero a la vez puede presentar contaminantes orgánicos e inorgánicos, lo que originaría una contaminación no solo de los suelos remediados con estos fertilizantes, sino que también la posible agricultura del lugar.

La utilización de plantas como bioindicador es una manera de determinar la posible introducción de contaminantes emergentes, como también sus metabolitos, en la cadena trófica. Sin embargo, debido a la excesiva demora en el análisis de los fármacos en plantas, se hace necesario implementar otras metodologías que involucren un menor tiempo de análisis, como extracciones con solventes de diferente capacidad extractiva que permitan estimar la fracción disponible. Por lo que el objetivo de la investigación es estudiar la disponibilidad de antiinflamatorios no esteroideos en suelos y suelos tratados con biosólido mediante la aplicación de solventes de diferente poder extractante y su comparación con la fracción biodisponible utilizando plantas de trigo.

En general, las extracciones con agua y azida de sodio correlacionaron con lo adsorbido por la planta con coeficientes de determinación superiores a un 60%, indicando que con ambos extractantes sería posible estimar el efecto de estos antiinflaamatorios sobre la biodisponibilidad en plantas y evaluar la influencia de la incorporación de biosólido en esta, considerando que la extracción con solución acuosa y agitación es un método más rápido que el uso de plantas y que permitiría la realización de un mayor número de análisis en paralelo.

Summary

Study of non-steroidal anti-inflammatory availability in soils amended with biosolids by extraction with ultrasound and its comparison with the bioavailable fraction using wheat plants.

Currently, is a growing interest in "emerging contaminants" which are unregulated contaminants, but may be candidates for future regulation. These compounds need not persist in the environment to be harmful because they are constantly introduced into the environment, thus compensating its high removal rate, degradation and conversion. Within these emerging contaminants are include drugs, of which no information is available on the incidence and risk in the environment or ecotoxicological data, so that the consequences of their presence in the environment are uncertain.

These compounds have been found in surface water, groundwater, the sewage system and even in sources of drinking water. The presence of drugs in the sewage is mainly due to excessive use of these by the human population and its excreted through urine and feces, on the other hand, a large amount of drug is released directly in to the sewer, both as part of hospital as pharmacies.

In the Region Metropolitana, the great majority of pharmaceutical industries dump their waste directly into sewer with poorly compliance with the regulations that is currently in force for effluent waste into sewer. Subsequently, the water reaches the treatment plant wastewaters, which are responsible for decontaminating the water resources of the region, before being used for agricultural purposes. It is known that a fraction of the contaminants are not

eliminated in the process, being able to be in the water, causing contamination of agricultural soils or in the biosolids. One of the final provisions of these biosolids is the use as fertilizer, because they are rich in nutrients like nitrogen, phosphorus and potassium (NPK), but also can provide organic and inorganic pollutants, which would cause contamination of not only the enmended soil with these fertilizers, but also the possible location agriculture.

The use of plants as bioindicators is a way to determine the possible introduction of emerging contaminants, as well as their metabolites, in the food chain. However, due to the excessive delay in the analysis of drugs in plants, it is necessary to implement other methods that involve less time of analysis, such as extractions with solvents of different extractive capacity to estimate the fraction available. Whereby the purpose of the investigation is to study the nonsteroidal anti-inflammatory availability in soils and soils treated with sewage sludge through the application of different solvent extractant and its compared to the bioavailable fraction using wheat plants.

In general, extractions with water and sodium azide correlated with adsorbed in plant with coefficients of determination over 60%, indicating that with both extractants would be possible to estimate the effect of these anti-inflammatory on bioavailability in plants and evaluating the influence of the incorporation of biosolids in this, considering that the extraction with aqueous solution and with agitation is a faster method than the use of plants that would allow the realization of a greater number of parallel analysis.

I. Introducción.

En la actualidad, existe un creciente interés por el estudio de los “Contaminantes Emergentes”, los cuales corresponden a contaminantes no regulados, pero que pueden ser candidatos para una futura regulación, dependiendo de la investigación sobre sus potenciales efectos en la salud humana. La característica de estos compuestos es que no necesitan persistir en el medioambiente para causar efectos negativos, debido a su continua introducción en este, ya que generalmente corresponden a compuestos presentes en el diario vivir, compensando así su alto índice de remoción, degradación y transformación. Por otra parte, no se encuentra disponible información sobre su incidencia medioambiental, datos ecotoxicológicos y el riesgo que pueden provocar, por lo que las consecuencias de su presencia en el ambiente son inciertas, siendo difícil poder predecir los efectos en la salud que pueden tener tanto en los seres humanos como en los organismos acuáticos (Barceló, 2003).

Dentro de estos contaminantes emergentes se encuentran los compuestos de origen farmacéutico, principalmente debido a que la investigación y el desarrollo de diferentes drogas y compuestos bioactivos evolucionan rápidamente. Los fármacos incluyen más de 4000 moléculas con diferentes propiedades fisicoquímicas y biológicas, además de diferentes tipos de acción bioquímica (Monteiro y Boxall, 2010). Se han encontrado estos compuestos diseminados en el medioambiente, siendo detectados en aguas superficiales, aguas subterráneas, en la red de alcantarillado e incluso en fuentes de abastecimiento de agua potable, lo cual puede ser atribuido a la incompleta remoción de contaminantes

emergentes polares durante el tratamiento de potabilización del agua (Petrović y col, 2003).

La presencia de fármacos en la red de alcantarillado se debe al excesivo consumo de estos por parte de la población humana. Según las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud, “más del 50% de todos los medicamentos se recetan, se dispensan o se venden en forma inadecuada. Al mismo tiempo, alrededor de un tercio de la población mundial carece de acceso a medicamentos esenciales, y el 50% de los pacientes los toman de forma incorrecta.” (OMS, septiembre 2002). En Chile, existe una gran variedad de medicamentos que son vendidos sin receta médica, de los cuales después de su administración, un porcentaje es metabolizado, mientras que una parte importante son excretados en forma intacta mediante heces fecales y orina, junto con los metabolitos producidos por el organismo. Por otra parte, una gran cantidad de fármacos vencidos son vertidos directamente en la red de alcantarillado, tanto por parte de hospitales como por las mismas farmacias, en vez de ser devueltos como se debería a las industrias farmacéuticas para su apropiada eliminación. Se estima que el 0,5% de los medicamentos producidos se vencen, de los cuales aproximadamente el 10% son desechados por las farmacias (CONAMA - ACHS, octubre 2001). En el caso de los desechos hospitalarios, reconocidos como desechos infecciosos, son similares a los desechos domésticos en cuanto a su composición y riesgo, por lo que no se recomienda que sean sometidos en forma sistemática a tratamientos de desinfección o esterilización, como es el autoclavado, excepto para los cultivos de laboratorio y el material contaminado con residuos de sangre y secreciones (Ministerio de Salud, agosto 2001). Por tal motivo, una gran cantidad de fármacos pueden ser desechados al alcantarillado.

Estudios de un efluente hospitalario en España mostraron concentraciones de carbamazepina, trimetoprima y eritromicina en un rango de 10 a 70 ng L⁻¹, ibuprofeno y atenolol en más alta concentración, alrededor de 100 ng L⁻¹, mientras que otros compuestos como antibióticos, antiinflamatorios, medicamentos para la hipertensión arterial, entre otros, se encontraron en una concentración cercana a 10 µg L⁻¹ (Gómez y col, 2006). Además, existe una fuente de contaminación por parte de las industrias farmacéuticas, debido principalmente a inadecuadas prácticas de la eliminación de éstos. En la región Metropolitana solo existen “Plantas de Preparación, Formulación y mezcla de Fármacos”, generando residuos líquidos en la producción de jarabes, cremas, producto de lavado de máquinas y reactores en donde se preparan los medicamentos, los cuales pueden ser vertidos directamente al alcantarillado sin un tratamiento previo debido a cumple con la normativa existente en cuanto a la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅), Demanda Química de Oxígeno (DQO) y Sólidos Suspendidos para residuos domésticos (CONAMA, octubre 2001).

Tabla 1: Comparación RILES industria farmacéutica vs residuo doméstico.

Característica	Residuos líquidos en producción: enjuague y limpieza (mg L ⁻¹)	Residuos líquidos mezclados con otros residuos de la industria (mg L ⁻¹)	Residuo doméstico (mg L ⁻¹)
DQO	1000 – 10000	150 – 1500	700
DBO ₅	660 – 2900	100 – 600	320
DQO/DBO ₅	1,5 – 3,5	1,5 – 2,5	2,2

DQO: Demanda Química de Oxígeno. DBO₅: Demanda Bioquímica de Oxígeno.

En la Tabla 1, se realiza una comparación entre un RIL (Residuo Industrial Líquido) conformado por residuos de enjuague y limpieza de equipos, un RIL mezclados con otros residuos industriales y un residuo doméstico. Se observa claramente que la industria farmacéutica cumple escasamente con la norma que actualmente se encuentra vigente para la Emisión de contaminantes asociados a las descargas de RILES a sistemas de alcantarillado, en la cual se establece que no debe superar una $DBO_5 = 300 \text{ mg L}^{-1}$ (Ministerio del Medio Ambiente, 2011), lo que aumenta en gran medida la concentración de diversos fármacos en la red de alcantarillado.

En la Región Metropolitana actualmente existen dos plantas de tratamiento de aguas servidas (PTAS) en funcionamiento, El Trebal (2001) y la Farfana (2003), que se encargan de descontaminar el 68% de los recursos hídricos de la cuenca de Santiago; se estima que la operación del proyecto “Mapocho Urbano Limpio”, el cual consiste en la descontaminación del río Mapocho, aumentará la descontaminación en un 80%, y se espera que con la nueva planta de tratamientos de aguas servidas, “Mapocho”, se llegue al 100% del tratamiento de las aguas servidas (Rámila y Rojas, 2008). Estos recursos pueden luego ser utilizados con fines agrícolas, sin embargo es posible que una cantidad de los contaminantes presentes no sean eliminados por el proceso. Se ha demostrado que las PTAS tienen una eficiencia de remoción de entre 40 a 90% para una variedad de compuestos polares, dentro de los que se encuentran una remoción de 70 – 90% para fragancias, 40 – 65% para antiinflamatorios, 60% para antibióticos y 65% para 17β -estradiol, lo que tiene como consecuencia que una fracción de estos contaminantes emergentes se encuentran presentes en el efluente de estas plantas de tratamiento, siendo posible el ingreso al medioambiente acuático (Carballa y

col, 2004) provocando la contaminación de los suelos agrícolas que son regados con esta agua.

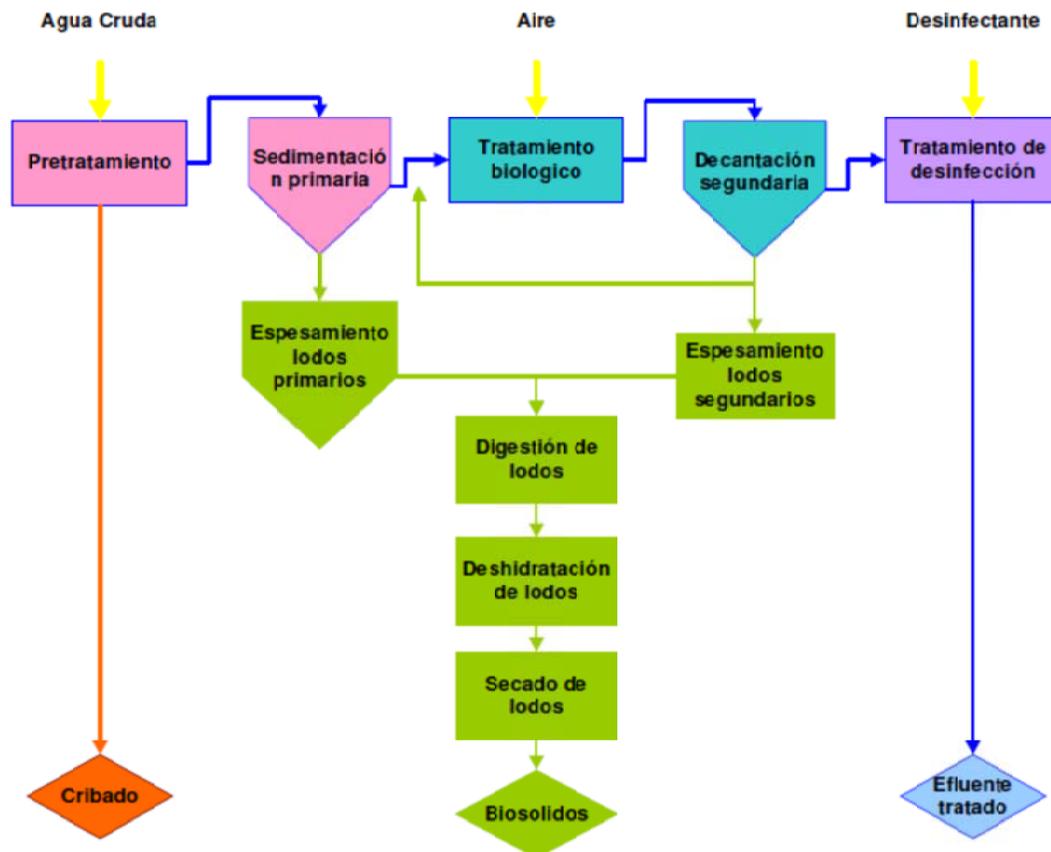


Figura 1: Esquema del proceso de tratamiento de aguas residuales de una Planta de tratamiento de aguas servidas (PTAS).

Una planta de tratamiento de aguas servidas típica se esquematiza en la Figura 1. La “Línea de Tratamiento de Aguas” consta de un pretratamiento, el cual consiste en una serie de tamices de mayor a menor tamaño que se encargan de remover el material sólido de gran tamaño que es arrastrado por las aguas servidas. Posteriormente, un tratamiento primario, el cual consiste en una Sedimentación, en donde por gravitación se separan los sólidos suspendidos. Estos sólidos se

denominan lodos primarios los cuales entran a la línea de tratamiento de lodos. El agua proveniente del sedimentador ingresa a un tratamiento secundario, o también llamado tratamiento biológico, en donde un cultivo aeróbico de microorganismo en suspensión oxidan la materia orgánica biodegradable en un estanque de aireación, de acuerdo a la reacción descrita en la Figura 2, produciendo además biomasa.

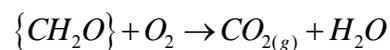


Figura 2: Oxidación de la Materia Orgánica.

La mezcla es dirigida a un estanque de decantación, en donde al igual que antes, por gravedad se separan los sólidos del agua. Una parte de los lodos se recirculan al estanque de aireación, proporcionando el cultivo aeróbico, mientras que el exceso, los denominados lodos secundarios, entran a la línea de tratamiento de lodos. El agua producto del tratamiento biológico entra al tratamiento terciario o de desinfección, el cual se realiza mediante la Cloración en una concentración que permita eliminar un alto porcentaje de la flora microbiana remanente.

En la “Línea de Tratamiento de Lodos”, los lodos primarios son tamizados y espesados gravitacionalmente. Una vez espesados se bombean a una cámara de mezcla en donde se juntan con los lodos secundarios, los cuales fueron previamente espesados aplicándoles un conglomerante. La mezcla es bombeada hacia reactores anaeróbicos para su estabilización biológica en donde se produce una digestión a 35 °C en un tiempo de residencia de 18 días. Posteriormente, los lodos digeridos son deshidratados mecánicamente en centrífugas, siendo el resultado de este proceso se denominado como Biosólidos, los cuales son

transportados a una cancha de secado en donde se llega a una concentración sobre el 65% de sólidos (Aguas Andinas, octubre 2007).

Los Biosólidos son ricos en nutrientes por su elevada concentración de Nitrógeno, Fósforo y Potasio (NPK), además de una gran concentración de materia orgánica y micronutrientes esenciales, tales como Níquel, Cinc y Cobre, por lo que han sido utilizados como una alternativa de bajo costo para la recuperación de suelos agrícolas degradados debido a que ayudan a mejorar las propiedades físicas del suelo, mejorando la textura y la capacidad de absorción de agua, las cuales brindan condiciones más favorables para el crecimiento de raíces e incrementa la tolerancia de la vegetación a la sequía (EPA, septiembre 2000). Al parecer, la aplicación de biosólidos en suelos agrícolas es una de las opciones más factibles para solucionar el problema de la disposición de estos en rellenos sanitarios, cuya vida útil y capacidad estaría limitada en el tiempo. Sin embargo, pueden presentar contaminantes orgánicos e inorgánicos, por lo que al ser aplicados estarían provocando no solo la contaminación de los suelos remediados con estos fertilizantes, sino que también la posible agricultura del lugar. Estudios de contaminantes emergentes en biosólidos, específicamente de fármacos, ha constatado la presencia de estos, uno de los fármacos detectados frecuentemente en el medioambiente y en los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas servidas corresponde a carbamazepina, en un rango de concentraciones de 4,7 – 120 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de lodo, también se ha detectado diclofenaco entre 10,4 – 424,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de lodo, trimetoprima en un rango 13,8 – 133 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de lodo (Díaz-Cruz y col, 2009), correspondientes a los de mayor consumo mundial.

En el Gráfico 1 se puede visualizar de un modo generalizado la concentración de antibióticos y fármacos encontrados en lodos en estudios realizados en Noruega y Suecia, con concentraciones alrededor de 5 mg kg^{-1} (Clarke y Smith, 2011). Por otro lado, en un estudio del riesgo medioambiental ejecutado en Noruega, el cual realiza una predicción de la concentración de fármacos que es posible encontrar en suelos enmendados con dosis entre 40 y 60 Mg ha^{-1} de biosólidos, se proyectan concentraciones inferiores a 1 mg kg^{-1} (Eriksen y col, 2009), predicción realizada de acuerdo a los parámetros establecidos por la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales, (EMA, 2004; EMA, 2006).

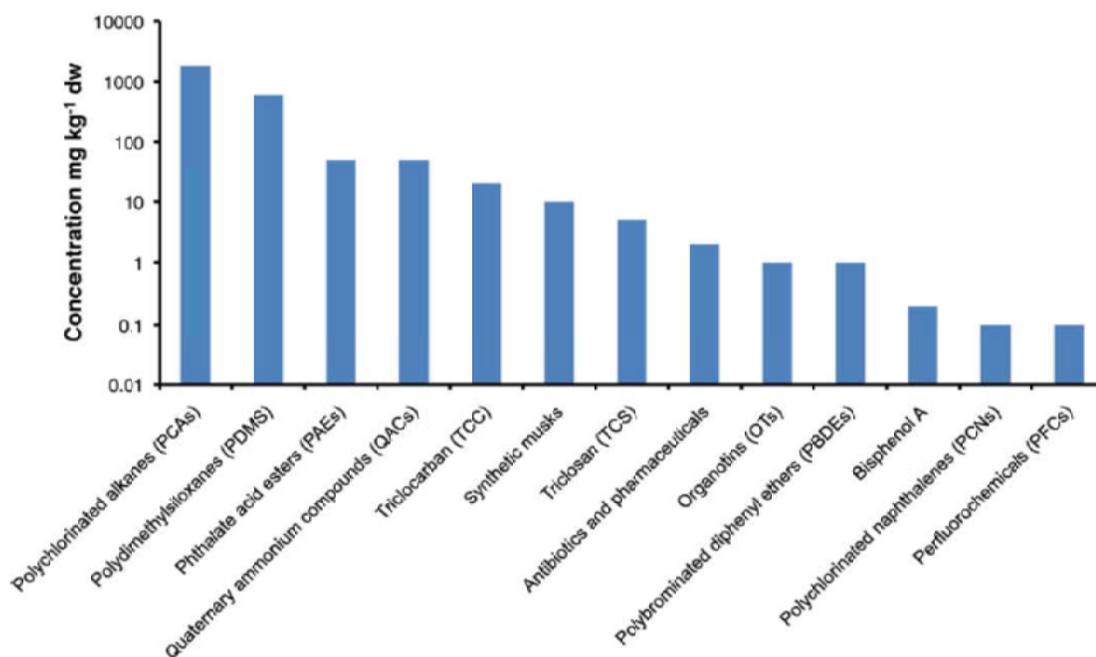


Gráfico 1: Concentración de diversos contaminantes emergentes en lodos.

Dentro de los fármacos que es posible encontrar, tanto en aguas tratadas como en suelos y biosólidos, se encuentran los antiinflamatorios no esteroideos (AINE's) de uso masivo, los cuales están dentro del primer grupo de Medicamentos de uso Humano reconocidos como un potencial riesgo (Eriksen y col, 2009). Entre los AINE's de mayor uso se encuentran Ketoprofeno, Naproxeno, Diclofenaco e Ibuprofeno.

En la Tabla 2 se presentan algunas propiedades fisicoquímicas de estos compuestos (Gross y col, 2006), en donde se puede observar por su pK_a que corresponden a fármacos ácidos, y de baja polaridad ($\log K_{OW}$), lo que también se puede apreciar por su estructura en la Tabla 3.

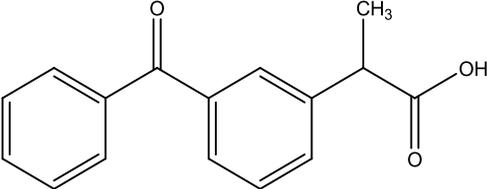
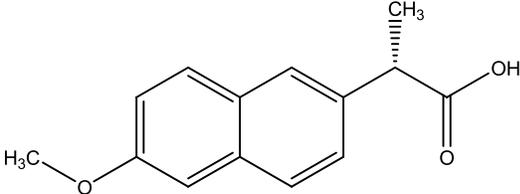
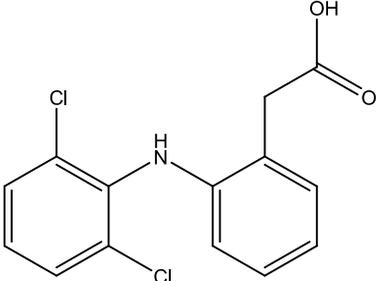
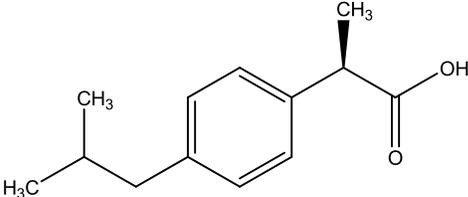
Tabla 2: Propiedades Fisicoquímicas de los AINE's.

Compuesto	Log K_{OW}	pK_a	Peso Molecular
Ketoprofeno	3,12	4,45	254,29
Naproxeno	3,18	4,15	230,27
Diclofenaco	4,51	4,14	296,16
Ibuprofeno	3,97	4,91	206,23

Los AINE's en general se caracterizan por ser fármacos analgésicos (alivian el dolor) que poseen actividad antitérmica o antipirética (reducen la fiebre) y antiinflamatoria (reducen la inflamación). Debido a sus acciones farmacológicas tan características es que con frecuencia son consumidos sin supervisión para aliviar dolores moderados o bajar la fiebre, sin embargo todos estos compuestos comparten una alta capacidad de generar reacciones adversas de diversa gravedad, por lo que constituyen un motivo de preocupación.

El mecanismo de acción de los AINE's consiste en inhibir la actividad de las ciclooxigenasas, enzimas que convierten el ácido araquidónico, presente en las membranas celulares, en endoperóxidos cíclicos inestables, los cuales se transforman en prostaglandinas y tromoxanos. Algunos de estos eicosanoides participan en los mecanismos patógenos de la inflamación, el dolor y la fiebre, por lo que la inhibición de su síntesis por los AINE's sería responsable de su actividad terapéutica (Feria, 2005).

Tabla 3: Estructura de los AINE's más comunes.

Compuesto	Log K _{OW}	Formula Molecular
Ketoprofeno		C ₁₆ H ₁₄ O ₃
Naproxeno		C ₁₄ H ₁₄ O ₃
Diclofenaco		C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NO ₂
Ibuprofeno		C ₁₃ H ₁₈ O ₂

El Ketoprofeno (Ácido 2-(3-benzoilfenil)propanoico), Naproxeno (Ácido (S)-2-(6-metoxi-2-naftil)propanoico) e Ibuprofeno (Ácido (RS)-2-(4-isobutilfenil)propanoico) son derivados del ácido fenilpropionico, presentan acción analgésica, antitérmica, antiinflamatoria y antiagregante plaquetario. Son considerados antiinflamatorios de eficacia moderada. Se absorben en forma casi completa cuando son consumidos por vía oral, lo que se puede observar en la Tabla 4 en donde la biodisponibilidad de Ketoprofeno es cercana al 100%, Naproxeno de 99% e Ibuprofeno superior al 80% (Feria, 2005).

El Diclofenaco (Ácido 2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acético) es un derivado del ácido acético. Presenta actividad analgésica, antitérmica y antiinflamatoria fuerte. Su biodisponibilidad es del 50% debido al primer paso hepático al cual está sometido en el organismo (Feria, 2005).

Tabla 4: Características farmacocinéticas de los AINE's

Compuesto	Biodisponibilidad (%)	T _{1/2} (hrs)	Excreción (%)
Ketoprofeno	100	1,8	<1*
Naproxeno	99	14	<1*
Diclofenaco	54	1 – 2	6,0 – 39**
Ibuprofeno	>80	2 – 3	1,0 – 8**

Biodisponibilidad en el cuerpo una vez ingerido. T_{1/2}: tiempo de vida media antes de ser metabolizado. Excreción: porcentaje eliminado por la orina.

**(Feria, 2005), **(Monteiro y Boxall, 2010)*

Estos AINE's han sido detectados en el medio ambiente en diversas matrices acuosas, como se observa en la Tabla 5 (Monteiro y Boxall, 2010), lo que podría facilitar la introducción de estos compuestos a la cadena trófica si se ocupan para regadío de sectores agrícolas, más aun si los suelos son remediados utilizando

biosólidos, o estos mismos son utilizados como fertilizantes en suelos agrícolas, por lo que se hace de suma importancia poder conocer el efecto medioambiental de estos compuestos en el caso de llegar a zonas agrícolas, en donde se encontrarán biodisponibles para la absorción y/o adsorción por la diversa agricultura del lugar.

Tabla 5: Concentraciones de AINE's en el medioambiente acuático.

Compuesto	Concentración efluente PTAS (min:max) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración en agua superficial (min:max) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración en agua subterránea (min:max) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración en agua potable (min:max) ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Ketoprofeno	nd – 0,871	nd – 0,300	-	<0,005
Naproxeno	nd – 5,22	nd – 2,0	-	nd
Diclofenaco	nd – 5,45	nd – 1,20	0,590	<0,001 – 0,006
Ibuprofeno	7,11 – 85	<0,0002 – 5,04	-	0,0018 – 0,001

Debido a las bajas cantidades encontradas de estos analitos en el medioambiente, se hace necesario contar con metodologías de extracción y preconcentración que sean capaces de retener en forma cuantitativa los diversos contaminantes. En las últimas décadas ha tenido un gran auge la extracción en fase sólida (SPE), la cual consiste en utilizar un medio sólido de características similares al analito de interés en cuanto a polaridad, de manera de que este pueda quedar retenido en la fase sorbente, tanto por un proceso de absorción como de adsorción, dentro de los poros presentes en la fase. Para el caso de fármacos ácidos y de baja polaridad, lo más apropiado corresponde a los Cartridge Oasis HLB, en los cuales la fase sorbente es un copolímero que presenta un grupo N-vinylpyrrolidona, el que se

encarga de retener la parte más polar o hidrofílica del analito, y un grupo divinilbenceno, el cual retiene la zona más apolar o lipofílica del analito por las interacciones enlazantes generadas por pequeñas diferencias de densidad entre las nubes π de los anillos aromáticos del analito y los anillos aromáticos de la fase polimérica (π stacking), como se muestra en la Figura 3. Estudios realizados sobre fármacos ácidos utilizando como fase sorbente Oasis HLB han obtenido porcentajes de recuperación cuantitativos de entre 80 – 100%, en comparación a otras fases sorbentes (Weigel y col, 2004). Esta fase sorbente presenta la ventaja de que se puede trabajar en un amplio rango de pHs debido a que carece de los grupos silanoles de otras fases más comunes, ya que los silanoles son atacados por hidroxilos a pH alcalinos, además su composición otorga mayor humectabilidad a la fase, lo que mejora los rendimientos de la extracción (Waters 2008 - 2009; Waters: Oasis Sample Extraction Products, Weigel, 2004).

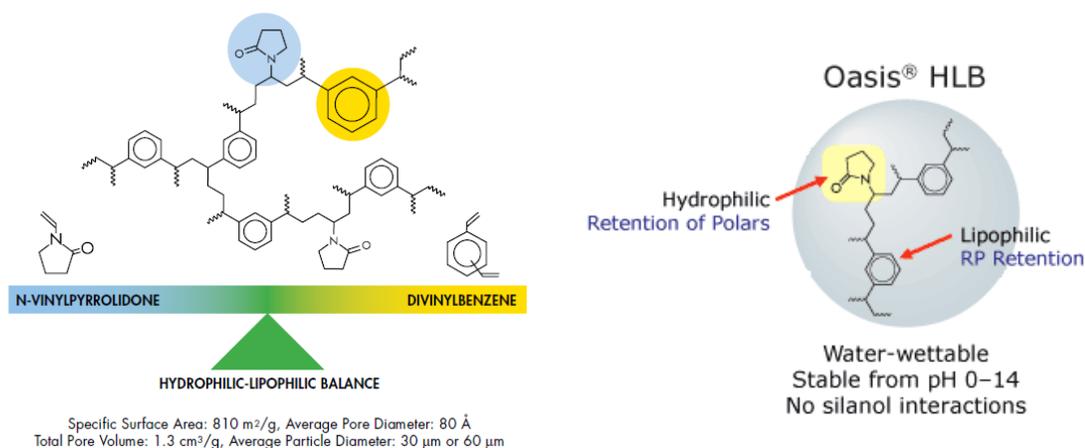


Figura 3: Estructura de la fase sorbente Oasis HLB.

Las bajas concentraciones de los diferentes “contaminantes emergentes” en el medioambiente que se han registrado en las últimas décadas hace que la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) sea la técnica más utilizada para la determinación de estos compuestos, sin embargo, la cromatografía líquida tiene la ventaja que para analitos apolares, como son los AINE’s, no hace necesaria la aplicación de una etapa de derivatización, además, en recientes estudios se ha demostrado que se pueden lograr límites de detección similares a GC-MS, dependiendo del detector utilizado o utilizando metodologías de preconcentración adecuadas. Por otro lado, la concentración de los contaminantes ha ido en aumento con el uso indiscriminado de fármacos, por lo que la cromatografía líquida actualmente es una técnica viable para la determinación de estos compuestos en el medio ambiente (Gentili, 2007).

La utilización de plantas como bioindicador es una manera de determinar la posible introducción de contaminantes emergentes, como también sus metabolitos, en la cadena trófica. Sin embargo, debido a la excesiva demora en el análisis de los fármacos en plantas, se hace necesario implementar otras metodologías que involucren un menor tiempo de análisis, como extracciones con solventes de diferente capacidad extractiva que permitan estimar la fracción disponible.

II. Objetivos.

2.1 Objetivos Generales

Estudiar la disponibilidad de antiinflamatorios no esteroideos en suelos y suelos tratados con biosólido mediante la aplicación de solventes de diferente poder extractante y su comparación con la fracción biodisponible utilizando plantas de trigo.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar caracterización de suelo y biosólido
- Implementar una metodología de extracción de AINE's desde suelo, suelo enmendado con biosólido y plantas de trigo.
- Estudiar el efecto de la incorporación de biosólidos sobre la biodisponibilidad de los fármacos por las plantas de trigo cultivadas en suelo.
- Estudiar la disponibilidad de los fármacos en suelos tratados con biosólido, mediante la extracción con diferentes solventes.
- Analizar e interpretar los resultados.

III. Materiales y Métodos

3.1 Reactivos.

- Ketoprofeno, Sigma-Aldrich (CAS 22071-15-4)
- Naproxeno, Sigma-Aldrich (CAS 22204-53-1)
- Diclofenaco de sodio, Sigma-Aldrich (CAS 15307-79-6)
- Ibuprofeno, Sigma-Aldrich (CAS 15687-27-1)
- Potasio dihidrogenofosfato, Merck. (CAS 7778-77-0)
- Azida de sodio, extra pura, Merck.
- Agua ultrapura, Milli Q.
- Metanol, grado HPLC, Merck
- Acetonitrilo, grado HPLC, Merck
- Acetona, para cromatografía líquida, Merck
- Acetato de etilo, para cromatografía líquida, Merck
- n-Hexano, para cromatografía líquida, Merck
- Cloroformo, para cromatografía en fase líquida, Merck.
- Nitrógeno gas extra puro 99,995% AGA.

3.2 Equipos.

- Cromatógrafo líquido, HPLC Waters 1525, binary pump con Detector de Arreglo de Diodos Waters 2998.
- Baño Ultrasonido
- Incubadora VWR.
- Manifold

3.3 Materiales

- Tubos de Centrifuga, pyrex
- Cartridges Oasis HLB.
- Adaptadores de 50 mL para Cartridges Oasis
- Viales ámbar 12 mL
- Balones de vidrio 100 mL
- Embudos de vidrio
- Micropipetas de 10 – 100 μ L, 100 – 1000 μ L y 1000 – 5000 μ L
- Matraces aforados de 10, 50 y 100 mL
- Buretas de 10 y 50 mL
- Desecador
- Maceteros
- Mortero
- Equipo de filtración al vacío
- Filtros de membrana de 0,45 μ m
- Filtros de jeringa de 0,22 μ m
- Molino para granos Krups 75, type 203 B

3.4 Muestras.

3.4.1 Suelo Polpaico (PLP).

Las muestras de suelo PLP fueron obtenidas del nivel superficial (0 a 20 cm de profundidad) en el Embalse Huechún, a 6332,8 Km Lat. UTM y a 238,0 Long. UTM. La serie polpaico pertenece al orden Mollisol con textura franco arcillosa. Son suelos de origen aluvio coluvial, profundos, en posición de plano inclinado con pendiente dominante de 1 a 2%. (Centro información recursos naturales, 1996).

Las muestras de suelo se almacenaron en bolsas de polietileno, para su traslado al laboratorio. Posteriormente, fueron secadas al aire, disgregadas y tamizadas, utilizando un tamiz plástico de 2 mm de abertura, y luego almacenadas en frascos de polietileno de alta densidad, a temperatura ambiente.

3.4.2 Biosólido

Se utilizó un lodo estabilizado anaeróbicamente, proveniente de una Planta de Tratamiento de aguas servidas ubicada en la Región Metropolitana. El muestreo del biosólido fue realizado el 7 de mayo del 2008 y corresponde a una mezcla de lodos de los meses de noviembre y diciembre del año 2007 (Contreras, 2009).

3.5 Metodologías.

3.5.1 Caracterización de Suelo y Biosólido.

3.5.1.1 Determinación de pH.

Se realiza mediante determinación potenciométrica preparando una solución de 10 g de suelo o biosólido y 25 mL de agua, se agita vigorosamente la solución en agitador mecánico recíproco y se deja reposar la solución por al menos dos horas. Finalmente, se mide el pH de la solución sobrenadante directamente con un electrodo combinado (Sadzawka, 2006).

3.5.1.2 Determinación de Materia Orgánica.

El método consiste en una oxidación de la materia orgánica con una mezcla de dicromato y ácido sulfúrico. Después de la reacción se mide espectrofotométricamente el cromato reducido.

A 1 g de cada suelo o 0,2 g de biosólido se agregan 10 mL de solución de dicromato de sodio 0,5 M y 20 mL de H₂SO₄ concentrado, luego de 30 minutos se incorpora agua y se deja 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 entre 0 y 50 mg mL⁻¹.

El contenido de materia orgánica se determina multiplicando el porcentaje de carbono orgánico (%) por un factor estimado de conversión de 1,724 (Sadzawka, 2006).

3.5.1.3 Determinación de Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC).

Se determina por el método de acetato de sodio a pH 8,2. Para lo cual, en tubos de centrífuga de 50 mL se pesan 4 g de cada suelo y se añaden 33 mL de NaOAc 1M, para intercambiar los cationes del suelo por sodio. Se trata la muestra con otras tres porciones de 33 mL de NaOAc 1M, a continuación se lava la muestra con tres porciones de 33 mL de etanol. En cada adición se procede a agitar los tubos por 15 minutos en agitador mecánico de tipo recíproco, para luego centrifugar durante 15 minutos a 2500 rpm y cada sobrenadante se desecha. Finalmente, para desplazar el sodio adsorbido por el suelo se agregan tres porciones de 33 mL de NH₄OAc 1M, pero esta vez se recogen los sobrenadantes y se aforan a 100 mL para cuantificar el sodio desorbido por la solución de NH₄OAc. La cuantificación se realiza mediante espectrofotometría de emisión atómica, utilizando un Espectrofotómetro Perkin Elmer 1100B (Jackson, 1970).

3.5.1.4 Determinación de Metales Totales: Cromo, Cobre, Níquel y Cinc.

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

Alrededor de 200 mg de suelo seco al aire (en triplicado) se transfieren a vasos para microondas, para luego ser digeridos con una mezcla de 4,5 mL de HNO₃ 65% y 1,5 mL de HCl 30% 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 utiliza un programa para la digestión de tres etapas: 5min a 250 W, 5 min a 400 W y 10 min a 500 W, luego se somete a 1 min de ventilación y a 30 min de baño en agua fría. Posteriormente, las muestras digeridas se trasladan a matraces aforados de 10 mL con H₂O milli-Q, y se pasan a través de papel filtro N°2. El contenido total de los metales se cuantifica por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) con llama utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer 1100B.

3.5.2 Preparación de los diferentes sistemas suelo-biosólido y plantas.

3.5.2.1 Enriquecimiento con biosólido

Se pesaron 300 gr de suelo polpaico seco en bolsas de plástico, en los cuales se agregaron diferentes cantidades de biosólido, de manera de que la concentración final del sistema correspondiera a 0, 100 y 200 Mg ha⁻¹, las bolsas de plástico se agitaron vigorosamente, obteniendo así una mezcla homogénea.

3.5.2.2 Enriquecimiento con antiinflamatorio

Los sistemas de suelo-biosólido preparados se enriquecieron con 10 mL de solución de Antiinflamatorio preparadas a partir de una solución patrón de 500 mg L⁻¹ de AINE's, de manera que la concentración final fuera 200 y 400 µg kg⁻¹. Posteriormente fueron incubadas en condiciones de capacidad de campo previamente establecidas, a temperatura constante de 25 °C durante 7 días en incubadora.

3.5.2.3 Esterilización de los suelos.

Una porción de los suelos enmendados con biosólido fueron esterilizados, para esto se colocaron en un desecador con cloroformo, luego de tres días se procedió a enriquecer los sistemas de suelo-biosólido con AINE's de la manera anteriormente descrita. Posteriormente, fueron incubados en las mismas desecadoras con Cloroformo durante 7 días a capacidad de campo y temperatura ambiente.

3.5.2.4 Ensayo de invernadero – Plantas de Trigo

En macetas plásticas se colocó en el fondo una malla plástica (malla Raschel o Kiwi) como soporte para el cuarzo, del cual se coloraron aproximadamente 500 g con el fin de impedir la pérdida de los sistemas suelo-biosólido. Posteriormente, se agregó en cada macetero la mezcla de los diferentes sistemas suelo-biosólido enmendados con 0, 100 y 200 Mg ha⁻¹ y enriquecidos con 200 y 400 µg kg⁻¹ de

antiinflamatorio previamente homogeneizados, cada uno de estos en duplicado. Se pesaron 7 g de semillas de Trigo y se dispusieron en cada macetero, cubiertas con una delgada capa de la mezcla del correspondiente sistema.

Las plantas fueron cultivadas durante 17 días en invernadero con luz controlada, 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, a temperatura ambiente. Se regaron diariamente con agua Milli Q a capacidad de campo, entre los 3 – 5 primeros días se visualizaron los primeros brotes.

3.5.2.5 Tratamiento de las Plantas de Trigo a partir de ensayo invernadero.

Finalizado el periodo de cultivo se procedió a separar cuantitativamente las plantas de trigo del sistema suelo-biosólido. Para esto se desmoldó la planta de la maceta, se separó el cuarzo y se sumergió en agua potable para facilitar la retirada del suelo. Posteriormente, la planta completa, raíz y hoja se lavó con abundante agua potable, de manera de sacar todo el suelo que pueda haber quedado retenido, luego con agua destilada y por último con agua Milli Q. Para finalizar, se dejaron secar en una estufa a 30 °C durante 5 días.

La planta seca se procedió a moler en un molino para granos, de manera de tener una muestra fina y homogénea para facilitar la extracción de los antiinflamatorios y su posterior análisis.

3.5.3 Cuantificación de AINE's mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acoplada a Detector de Arreglo de Diodos (DAD).

La identificación y cuantificación de los antiinflamatorios no esteroidales (AINE's) se realiza mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Detector de Arreglo de Diodos, utilizando una columna de C18 (5 μm ; 250 mm x 4,6 mm). La fase móvil corresponde a una mezcla 50% v/v de acetonitrilo: fosfato diácido de potasio 50 mM a pH 4,2 – 4,5 (Ascar y col, 2012).

El fosfato diácido de potasio 50 mM se prepara pesando 6,804 g de KH_2PO_4 y llevándolo a 1000 mL de agua Milli Q, posteriormente se filtra en un sistema de filtración al vacío con un filtro de membrana de 0,2 μm .

Los parámetros de trabajo utilizados para HPLC se encuentran resumidos en la Tabla 6.

Tabla 6: Condiciones cromatográficas.

Parámetro	Condiciones
Flujo	1 mL min ⁻¹
Razón flujo	50% acetonitrilo : 50% KH_2PO_4
Inyección	20 mL
Presión	1600 – 1900 psi
Tiempo corrida cromatográfica	22 – 30 min

La identificación de los analitos se realiza mediante los tiempos de retención y sus respectivos espectros de absorción. La cuantificación se ejecuta mediante el área del peak cromatográfico de cada analito, midiéndose las concentraciones en mg L^{-1} a partir de su interpolación en una curva de calibración de entre $0,5 - 10 \text{ mg L}^{-1}$, preparada por dilución de las soluciones patrones de 500 mg L^{-1} de los estándares de cada compuesto en estudio. Para el estudio en los diferentes sistemas de suelo se realizaron las mediciones a la longitud de onda en su máximo de absorbancia.

Se estudió el efecto de la matriz del solvente sobre las señales cromatográficas para cada analito. Para esto se prepararon curvas de calibración de entre $0,5 - 6 \text{ mg L}^{-1}$ en metanol, agua milli Q, solución de 200 mg L^{-1} de azida de sodio, solución 50 mM de fosfato diácido de potasio, solución $20\% \text{ v/v}$ acetona y solución 20% metanol.

3.5.4 Metodología de extracción de AINE's desde los diferentes sistemas.

Para la determinación del contenido total de los AINE's en estudio en las diferentes matrices, se realizaron extracciones cuantitativas mediante extracción con solvente asistida por ultrasonido. Por otra parte, para la estimación de la fracción disponible, se realizaron extracciones con diferentes solventes o mezclas con ayuda de agitación mecánica durante 24 horas.

Los extractos obtenidos en ambos casos fueron sometidos a un proceso de clean up y preconcentración haciéndolos pasar por Cartridges Oasis HLB.

3.5.4.1 Extracción Cuantitativa de AINE's desde suelo y biosólido.

En un tubo de centrifuga de vidrio de 50 mL se agregan 5 g de suelo o biosólido para someterlo a un programa de extracción asistida por ultrasonido, de acuerdo a lo descrito en la Tabla 7, entre cada una de las etapas de extracción el tubo se somete a vortex hasta desprender el suelo o biosólido sedimentado en la etapa de centrifugación, además de asegurarse de que todo el sólido este en contacto con el extractante.

Tabla 7: Método de extracción cuantitativa de AINE's para suelo y biosólido.

Solvente	Ultrasonido (Alto)	Centrífuga (2000 rpm)
20 mL Metanol	5 minutos	5 minutos
10 mL Metanol	5 minutos	5 minutos
10 mL Acetona	5 minutos	20 minutos
10 mL Acetona	5 minutos	20 minutos

Los sobrenadantes de cada etapa se juntan en un balón de 100 mL, filtrándolos previamente con papel filtro grado 232. El extracto se somete a evaporación en un rotavapor a 40 °C hasta aproximadamente 1mL, posteriormente se trasvasija a un matraz de 100 mL aforando con agua milli Q, para ser sometidos a un proceso de clean-up. Cada sistema fue analizado en duplicado (Adaptado de Ternes y col, 2005).

3.5.4.2 Extracción de la fracción disponible de AINE's desde los sistemas suelo-biosólido.

➤ Suelo sin esterilizar.

En un tubo de centrifuga de vidrio de 50 mL se colocaron 5 g de las mezclas suelo-biosólido, se agregaron 25 mL de los extractantes: agua milli Q, solución de 200 mg L⁻¹ de azida de sodio, solución 50 mM de fosfato diácido de potasio, solución 20% v/v acetona o solución 20% metanol. Los tubos se sometieron a agitación mecánica durante 24 hrs. Posteriormente, se centrifugaron durante 20 min a 2000 rpm. Los sobrenadantes se pasaron por papel filtro número 1 y se aforaron en un matraz de 50 mL, para ser sometidos a un proceso de clean-up.

Los sistemas para los cuales se extrajo con agua milli Q, solución de 200 mg/L de azida de sodio o solución 50 mM de fosfato diácido de potasio se sometieron a una segunda extracción, asistida por ultrasonido, utilizando 25 mL de cada extractante, aplicando 30 min de ultrasonido alto. Luego, la solución se somete a centrifugación a 2000 rpm durante 20 min. Los sobrenadantes se trasvasijaron y aforaron en un matraz de 50 mL previamente pasados por papel filtro número 1, para ser sometidos a un proceso de clean-up. Cada sistema fue analizado en duplicado.

➤ Suelo esterilizado.

Los sistemas de suelo-biosólido se sometieron al mismo procedimiento de extracción descrito para los suelos sin esterilizar, sin realizar la segunda etapa de extracción asistida por ultrasonido.

3.5.4.3 Extracción de la fracción biodisponible desde plantas de trigo.

Una vez que se tiene la planta molida y homogénea, se pesaron y fueron transferidas en su totalidad en un tubo de centrifuga de vidrio de 50 mL, para luego realizar el programa de extracción asistida por ultrasonido descrito en la Tabla 8, al igual que para la extracción cuantitativa, antes de cada extracción se somete el tubo a agitación con vortex.

Tabla 8: Método de extracción cuantitativa de AINE's para plantas de trigo.

Solvente	Ultrasonido (Alto)	Centrífuga (2000 rpm)
20 mL Metanol	5 minutos	5 minutos
10 mL Metanol	5 minutos	5 minutos
10 mL Acetona	5 minutos	15 minutos

Los sobrenadantes obtenidos en cada etapa se juntan en un balón de 100 mL y se someten a evaporación en un rotavapor a 40 °C hasta aproximadamente 2 mL. Posteriormente, se trasvasija el concentrado con agua milli Q a un matraz de aforo de 100 mL previamente filtrando con un papel filtro número 1, para finalmente ser sometidos a un proceso de clean-up.

3.5.4.4 Extracción en Fase Sólida utilizando Cartridge Oasis HLB (Clean up).

Las soluciones acuosas obtenidas de las extracciones cuantitativas de suelo, biosólido y plantas, como también de las fracciones disponibles de los sistemas suelo-biosólido, se sometieron al siguiente procedimiento de extracción en fase sólida (SPE).

Etapa 1: Ambientación del cartridge.

Se hacen pasar a una presión de 15Pa por el cartridge las siguientes soluciones:

- 3 mL de acetato de etilo
- 3 mL metanol
- 3 mL agua milli Q

Etapa 2: Cargado de la muestra

Se hace pasar la muestra por el cartridge a una velocidad aproximada de 1 gota por segundo.

Etapa 3: Lavado del Cartridge.

Se hacen pasar a una presión de 15Pa por el cartridge las siguientes soluciones:

- 3 mL de una solución metanol/agua milli Q (5/95 v/v)
- 3 mL n-Hexano

Etapa 4: Extracción de los analitos desde el Cartridge.

Se hacen pasar 3 alícuotas de 1 mL de acetato de etilo y se recoge la solución en un vial ambar de 12 mL.

Etapa 5: Evaporación y Reconstitución

Las soluciones de los viales se evaporan con Nitrógeno gaseoso a sequedad y luego se reconstituyen a 0,5 mL con Metanol para posteriormente ser los analitos determinados y cuantificados mediante HPLC-DAD utilizando los parámetros descritos anteriormente (punto 3.5.3).

Los extractos de las plantas previamente a ser inyectados son pasados por filtros de jeringa de 0,22 μm debido a que al reconstituir la muestra en metanol, se observaba la formación de un precipitado, lo que no ocurre con las muestras de suelo y suelo-biosólido.

IV. Resultados y Discusión.

4.1 Caracterización de suelos y biosólidos

Los resultados obtenidos de la caracterización del suelo y biosólido se encuentra resumida en la Tabla 9, en donde se puede observar que el biosólido es levemente más ácido que el suelo polpaico, además que el contenido de materia orgánica es muy superior, casi 8 veces más en el biosólido, lo que puede influir en una gran medida en la disponibilidad que van a presentar los fármacos cuando los sistemas sean enmendados con biosólido.

Tabla 9: Propiedades fisicoquímicas del Biosólido y suelo Polpaico.

Propiedad Fisicoquímica	Biosólido	Polpaico
pH	6,95	7,21
MO (%)	-	1,81
CO (%)	8,79	-
CIC (cmol kg ⁻¹)	89,13	39,2

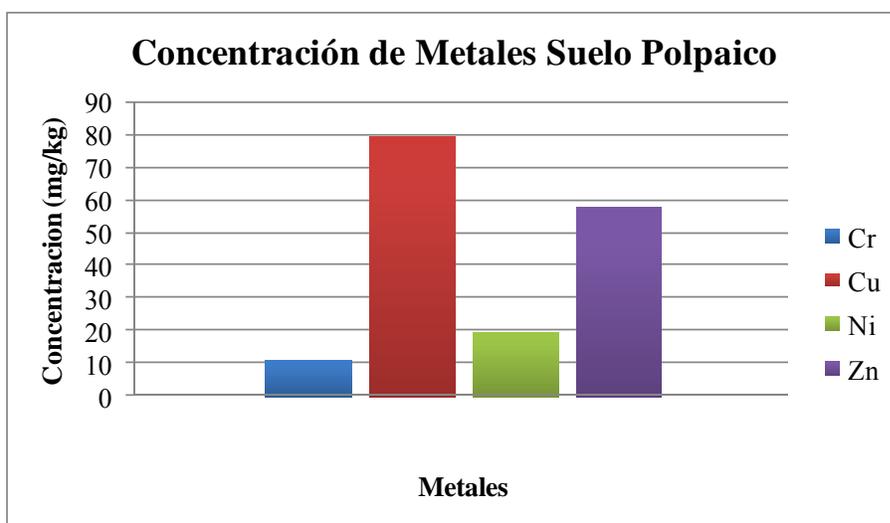


Gráfico 2: Concentración de Cr, Cu, Ni y Zn en el Suelo Polpaico.

Los metales en el suelo polpaico siguen el orden de $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Ni} > \text{Cr}$, como se observa en el Gráfico 2. La normativa Chilena establece que las concentraciones máximas de Cobre, Níquel y Cinc son de 75 mg kg^{-1} , 30 mg kg^{-1} y 175 mg kg^{-1} respectivamente, para suelos receptores de la zona sur previo a la aplicación de los lodos (Ministerio Secretaría General de la Presidencia de la República, DS004, enero 2009), por lo que de acuerdo al contenido de éstos elementos, el suelo cumple con la normativa, siendo posible la tasa máxima de aplicación de lodos de 90 Mg ha^{-1} por año.

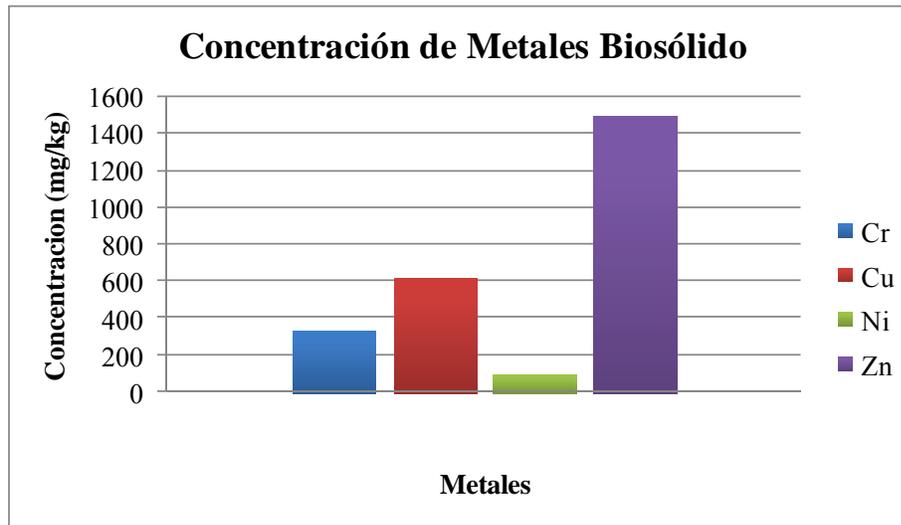


Gráfico 3: Concentración de Cr, Cu, Ni y Zn en el Biosólido.

En el biosólido se encontró que la abundancia de metales sigue el orden de $\text{Zn} > \text{Cu} > \text{Cr} > \text{Ni}$, como se observa en el Gráfico 3. De acuerdo con la normativa, la concentración de Cobre máxima permitida para la aplicación de biosólido a suelos agrícolas es de 1000 mg kg^{-1} , de Níquel 80 mg kg^{-1} y de Cinc 2000 mg kg^{-1} (Ministerio Secretaría General de la Presidencia de la República, DS004, enero 2009), por lo que el biosólido cumple con la normativa chilena, de manera que puede ser aplicado a suelos.

4.2 Cuantificación de AINE's mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Aplicando las condiciones cromatográficas establecidas en la Tabla 6, fue posible la separación de los AINE's en estudio, se puede observar en la Figura 4 un cromatograma correspondiente a un estándar de Antiinflamatorios de 8 mg L^{-1} . Cada peak fue visualizado a 220 nm siendo el orden de elución de Ketoprofeno, Naproxeno, Diclofenaco e Ibuprofeno.

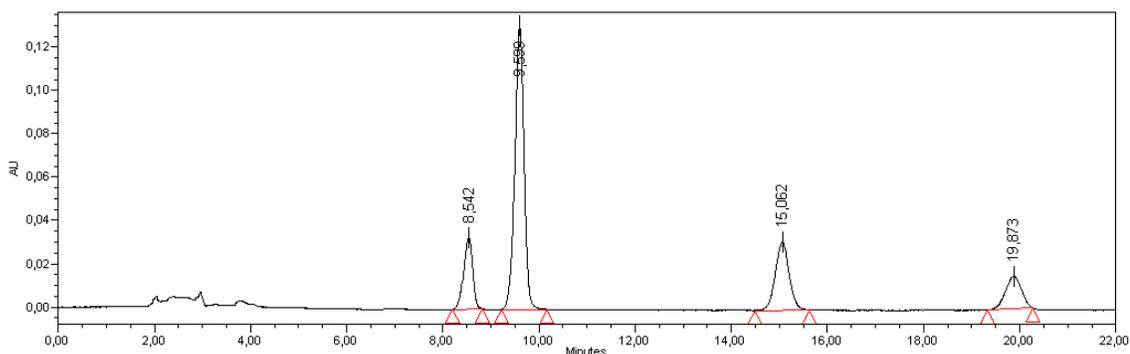


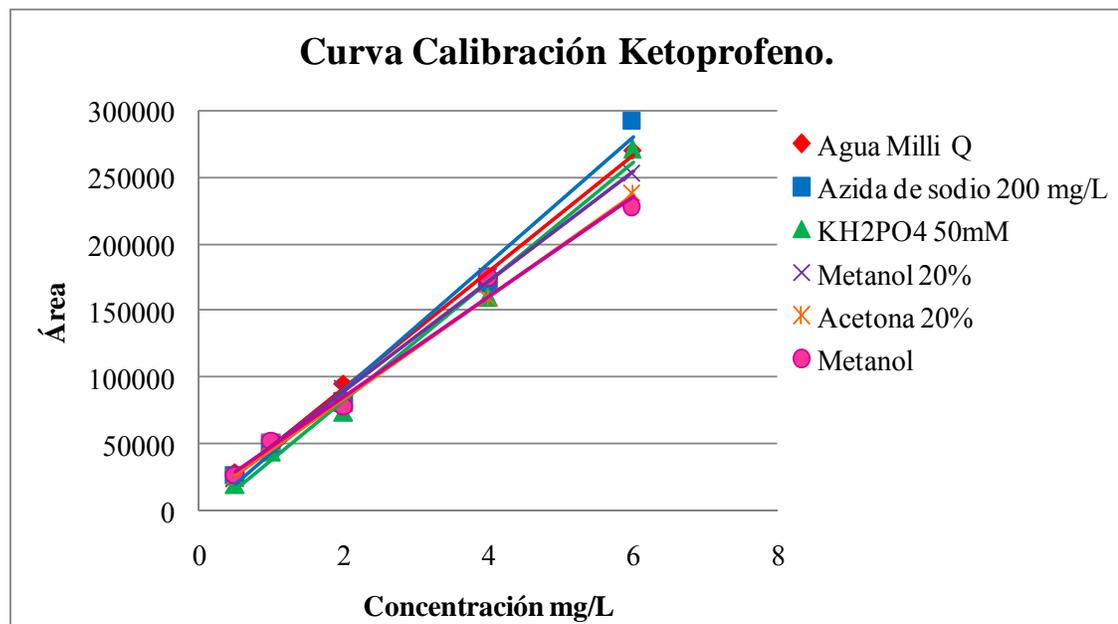
Figura 4: Cromatograma de un estándar de 8 mg L^{-1} de AINE's en metanol.

La identificación de los fármacos se realizó mediante el tiempo de retención, característico para cada uno, el cual se presenta en la Tabla 10. Por otra parte, fue posible obtener los espectros de absorción de cada compuesto con la ayuda del detector de arreglo de diodos (DAD), los cuales se presentan en la Figura 5 para cada analito con sus respectivos máximos de absorbancia. Esta información ayuda a la identificación cuando las muestras presentan matrices complejas, como son los suelos, biosólido y los extractos de las plantas.

Tabla 10: Tiempos de retención y Longitudes de ondas característicos para cada AINE's en metanol.

Analito	Tiempo de retención (min)	Máximo de Absorbancia (nm)
Ketoprofeno	8,5	191,1
Naproxeno	9,6	231,1
Diclofenaco	15,0	200,5
Ibuprofeno	19,8	193,4

Debido a que se efectuaron extracciones en diferentes solventes, se realizó el estudio de sensibilidad para los analitos, de manera de poder determinar si el solvente es un parámetro a considerar al momento de realizar la cuantificación en las muestras reales.

**Gráfico 4:** Curvas de Calibración para Ketoprofeno en diferentes solventes.

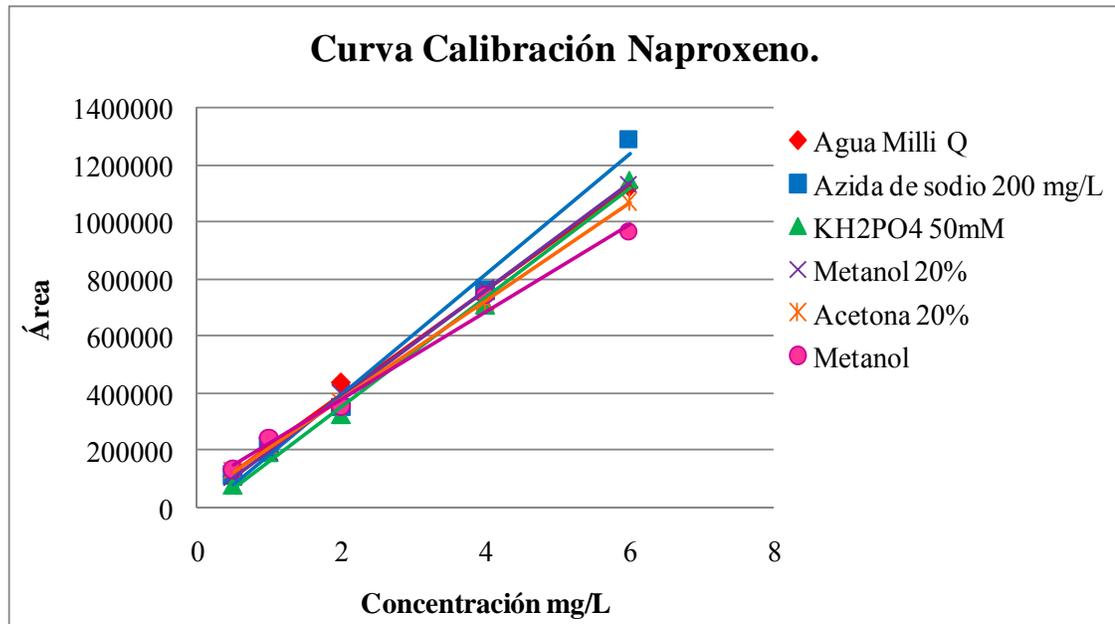


Gráfico 5: Curvas de Calibración para Naproxeno en diferentes solventes.

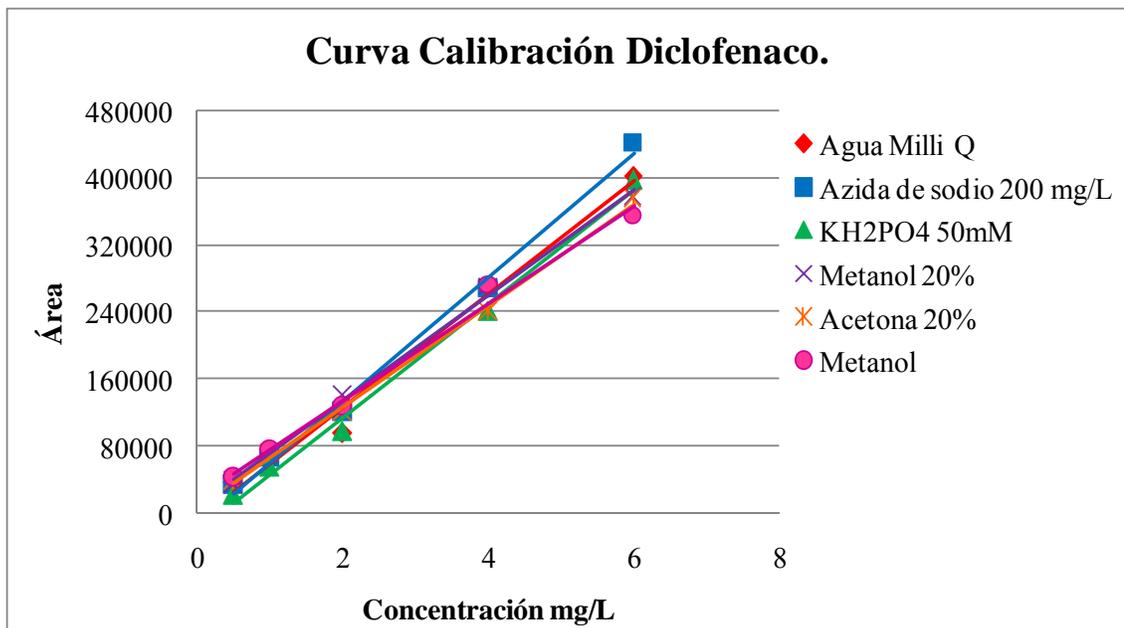


Gráfico 6: Curvas de Calibración para Diclofenaco en diferentes solventes.

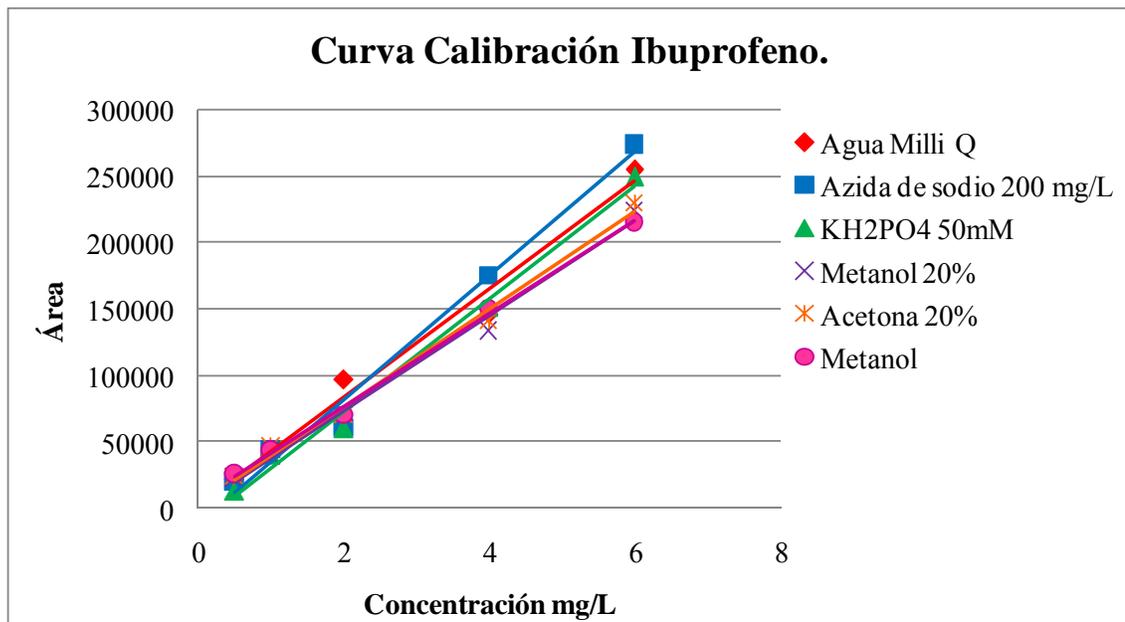


Gráfico 7: Curvas de Calibración para Ibuprofeno en diferentes solventes.

En un estudio realizado por Gross y Col. (2006) para evaluar el efecto de cuantificar utilizando solvente puro o matriz de suelo, encontraron que en los casos en que no hay cambio en la pendiente de las curvas de calibración indicaría que no existe supresión ni aumento de la cuantificación que pudiese ocasionar resultados erróneos. Si al realizar una curva de calibración en matriz, esta presenta una mayor sensibilidad que si se realiza con solvente, es posible que se esté midiendo más analito que el existente.

En las curvas de Calibración presentes entre el Gráfico 4 y el Gráfico 7 no se presenta un cambio notable en las pendientes de cada curva en los diferentes solventes, en el rango de concentraciones estudiadas, por lo que se considera que no hay interacciones de mayor importancia entre los fármacos y los respectivos solventes. Debido a esto es que todas las mediciones posteriores se realizaron con curva de calibrado utilizando como solvente Metanol.

En general, los máximos de absorbancia para los fármacos en estudio se mantienen en todos los solventes estudiados (Figura 5), excepto para Diclofenaco en Agua Milli Q, Azida de sodio y Fosfato, el cual disminuyó levemente a 199,3 nm.

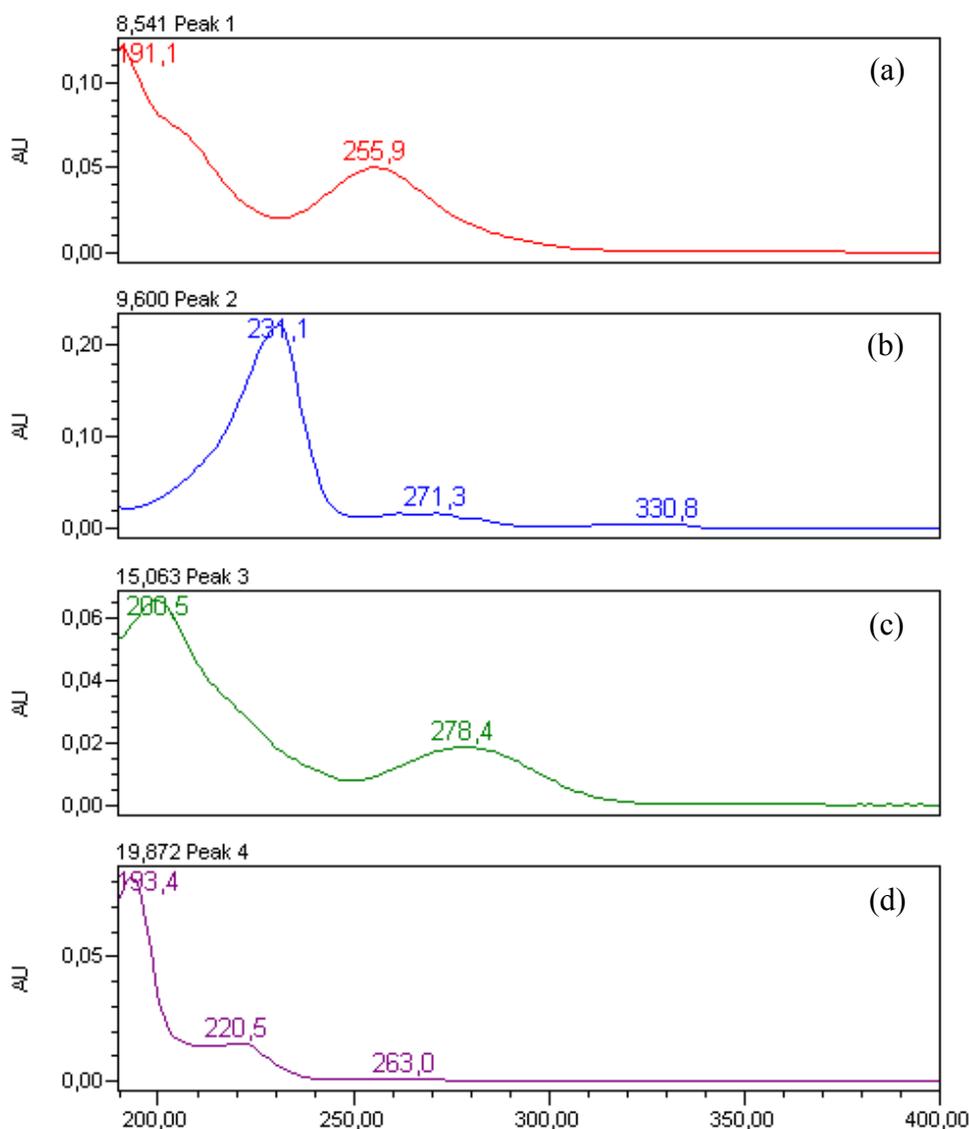


Figura 5: Espectros de Absorbancia de Ketoprofeno (a), Naproxeno (b), Diclofenaco (c) e Ibuprofeno (d) de un estándar de 8 mg L^{-1} de AINE's en metanol.

4.3 Extracción cuantitativa de AINE's desde suelo y biosólido.

Se realizó la extracción cuantitativa del Suelo Polpaico y el Biosólido de manera de determinar si los compuestos en estudio se encontraban presentes. La Tabla 11 resume los resultados, en donde se puede observar que solo fue detectado Naproxeno en el biosólido, debido probablemente a que es el más sensible de los cuatro compuestos en la determinación cromatográfica.

Tabla 11: Concentración de AINE's en el Suelo Polpaico y Biosólido.

Compuesto	Suelo Polpaico ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Biosólido ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Ketoprofeno	nd	nd
Naproxeno	nd	0,023 \pm 0,001
Diclofenaco	nd	nd
Ibuprofeno	nd	nd

(*nd = no detectado*)

4.4 Fracción disponible de AINE's desde los sistema suelo-biosólido enriquecidos con antiinflamatorios.

En general, todos los compuestos presentaron un comportamiento similar, se extrajeron poco desde el suelo sin biosólido, y la extracción aumentó a medida que la concentración de biosólido se incrementó en el sistema. Esto se puede atribuir principalmente a que el suelo Polpaico es un suelo de características Coloidales, presentando tamaño de partícula muy pequeño, lo que aumenta de forma considerable la superficie que se encuentra disponible para poder adsorber a los Fármacos, por otro lado, al ser un suelo arcilloso, presenta microporos, por los cuales la circulación de aire y agua se ve impedida, lo que beneficia la retención de los compuestos. Al agregar biosólido al sistema, se aumenta la aglomeración del suelo, por lo que disminuye la superficie que puede adsorber a los compuestos, de manera que se encuentran más disponibles, aumentando la cantidad de macroporos en el suelo, por los que puede circular libremente el agua.

Por otro lado, el biosólido presenta grupos funcionales atribuidos a la materia orgánica, tales como grupos carboxílicos, enólicos, OH fenólicos, quinonas, grupos sulfónicos, OH alcohólico, éteres, cetonas, aldehídos, ésteres, aminas, amidas, entre otros, con los cuales los AINE's pueden interaccionar químicamente, pudiéndose generar interacciones del tipo de Fuerzas de Van der Waals, Puentes de Hidrógeno, Interacciones electrostáticas, entre otras, las cuales facilitan la fijación de los fármacos al biosólido.

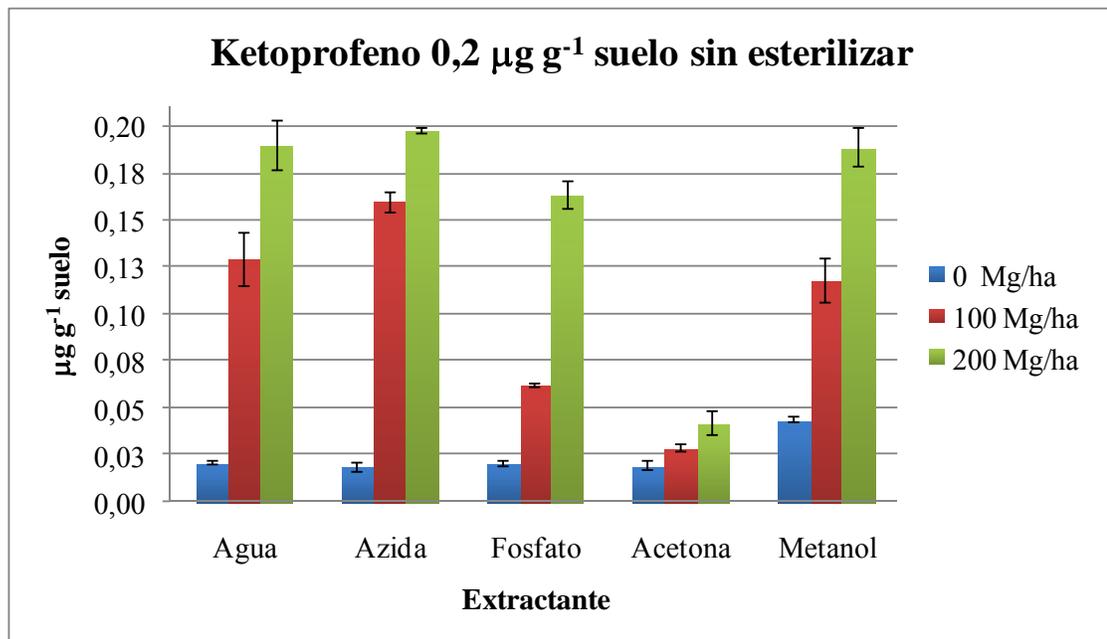
➤ **Ketoprofeno.**

Gráfico 8: Cantidad de Ketoprofeno extraída por gramo de suelo sin esterilizar en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.

Tabla 12: Porcentajes de extracción para Ketoprofeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido sin esterilizar enriquecido con 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.

Biosólido (Mg ha ⁻¹)	Agua Milli Q (%)	Azida de sodio (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	Acetona (%)	Metanol (%)
0	15,4	14,5	6,9	6,2	18,9
100	66,7	81,0	28,5	10,9	57,5
200	95,5	99,2	81,0	17,8	94,2

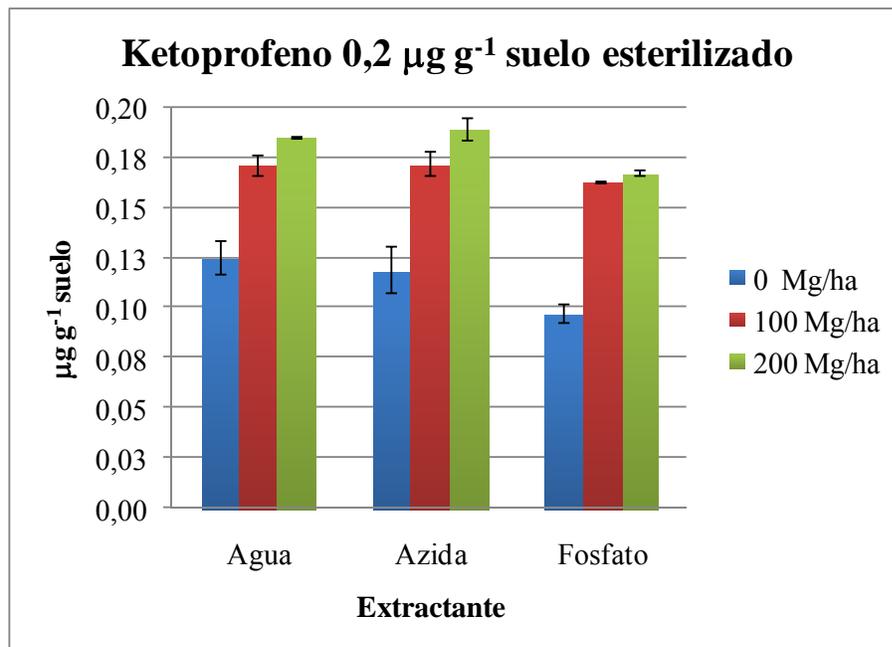


Gráfico 9: Cantidad de Ketoprofeno extraída por gramo de suelo esterilizado en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.

Tabla 13: Porcentajes de extracción para Ketoprofeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido esterilizado enriquecido con 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.

Biosólido (Mg ha^{-1})	Agua Milli Q (%)	Azida de sodio (%)	KH_2PO_4 (%)
0	56,9	53,2	40,6
100	83,7	84,1	78,7
200	91,8	94,1	81,3

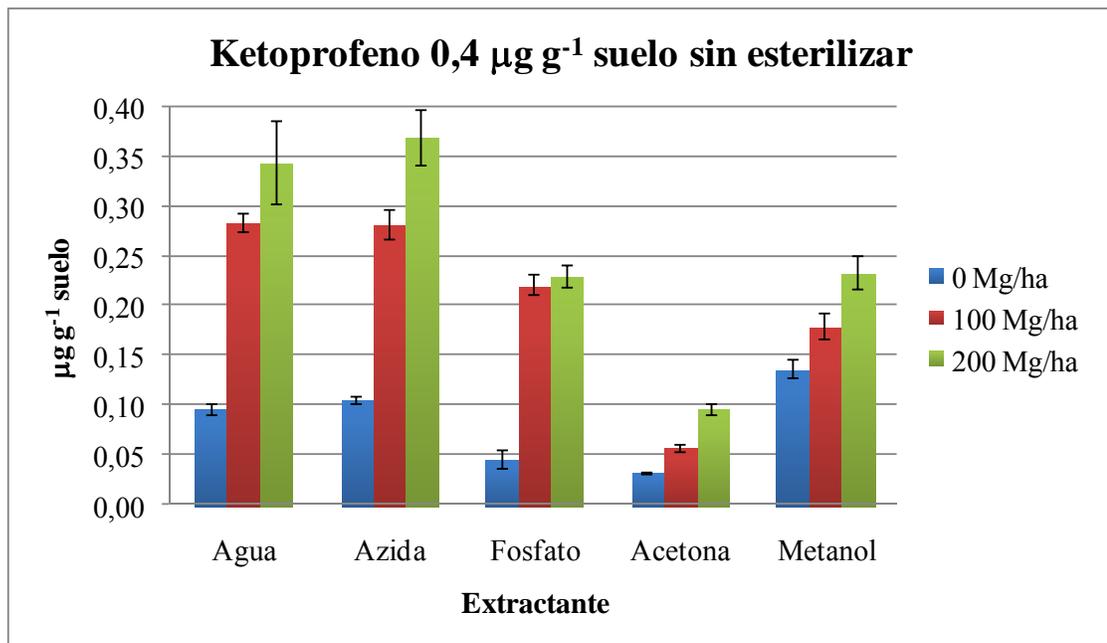


Gráfico 10: Cantidad de Ketoprofeno extraída por gramo de suelo sin esterilizar en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con 0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.

Tabla 14: Porcentajes de extracción para Ketoprofeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido sin esterilizar enriquecido con 0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.

Biosólido (Mg ha ⁻¹)	Agua Milli Q (%)	Azida de sodio (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	Acetona (%)	Metanol (%)
0	26,4	28,6	9,8	6,3	33,1
100	72,1	71,5	54,6	12,8	43,8
200	86,7	92,9	56,9	20,9	57,8

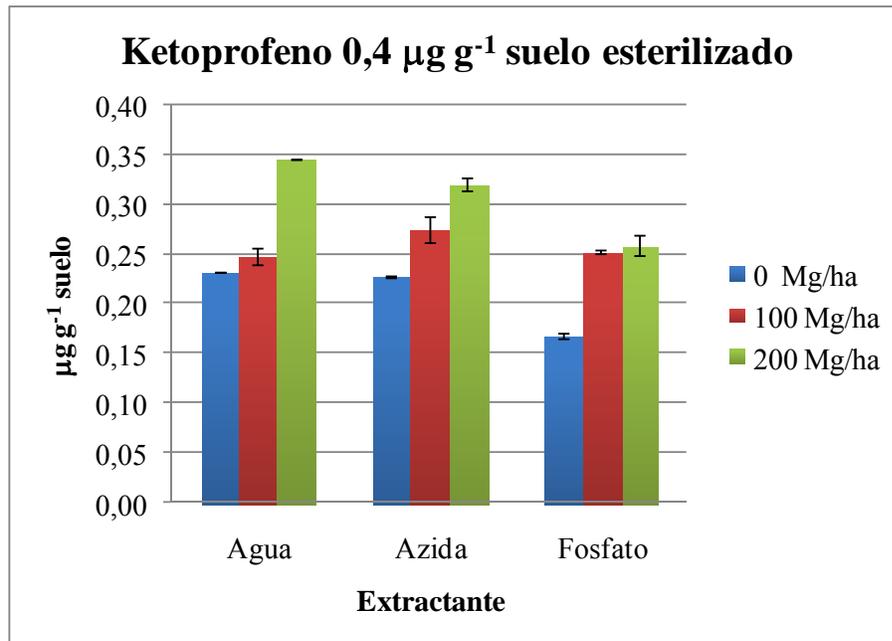


Gráfico 11: Cantidad de Ketoprofeno extraída por gramo de suelo esterilizado en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con 0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.

Tabla 15: Porcentajes de extracción para Ketoprofeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido esterilizado enriquecido con 0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.

Biosólido (Mg ha ⁻¹)	Agua Milli Q (%)	Azida de sodio (%)	KH ₂ PO ₄ (%)
0	55,0	53,9	37,9
100	59,4	66,8	60,5
200	85,4	78,8	64,0

Para el caso de la extracción de Ketoprofeno desde el suelo sin esterilizar y enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de fármaco (Gráfico 8, Tabla 12), se observa un aumento en el porcentaje de extracción con solución de Azida de sodio con respecto a la extracción con Agua milli Q, lo que indicaría que este compuesto es susceptible a la actividad bacteriana presente en el sistema suelo-biosólido. Lo que se ve demostrado en el mismo sistema de suelo, pero esterilizado con cloroformo, donde aumenta considerablemente el porcentaje de extracción de Ketoprofeno tanto con agua milli Q como con azida de sodio en los sistemas enmendados con dosis 0 y 100 Mg ha^{-1} de biosólido (Gráfico 9, Tabla 13). Mientras que para las dosis más altas de biosólido no se produjo el mismo efecto, posiblemente debido a la mayor cantidad de microorganismos aportados por el biosólido que pudiesen aun permanecer activos y degradar el compuesto. Como metabolitos de degradación del ketoprofeno se ha reportado el ketoprofeno glucurónido (Gentili, 2007).

En el sistema esterilizado (Gráfico 9, Tabla 13) se obtiene el mismo comportamiento si la extracción es con Agua Milli Q o con Azida de sodio, debido a que la actividad microbiana ya fue suprimida al ser el suelo esterilizado con cloforormo, por lo que el efecto de la Azida de Sodio en el suelo, para este compuesto, solo se observa en los suelos no esterilizados.

La extracción con fosfato en suelo esterilizado y sin esterilizar es menor a la extracción con agua y azida de sodio, debido probablemente al pH de la solución de fosfato que fluctúa entre 4,2 – 4,5. Se ha demostrado que desde los Cartridge Oasis HLB se obtiene una mejor recuperación de AINE's o fármacos cuando el pH del extracto que se someterá a clean-up es neutro (Weigel, 2004). Cuando se

realiza la extracción con agua, el pH de la solución resultante es mayor, similar al pH del suelo, el cual equivale a 7,2; por lo tanto el grupo carboxilo del ketoprofeno debe estar desprotonado, como se observa en la Figura 6, con lo cual tiene menos posibilidades de interactuar con los sitios activos del suelo, lo cual da cuenta de una mayor disponibilidad, en cambio cuando se usa fosfato, puede estar en condiciones neutras y puede estar más absorbido en el suelo (Lin y Gan, 2011). Por otro lado, en Agua Milli Q aumenta la solubilidad de la especie aniónica, por ser polar, lo que también aumenta la concentración que se extrae de ketoprofeno.

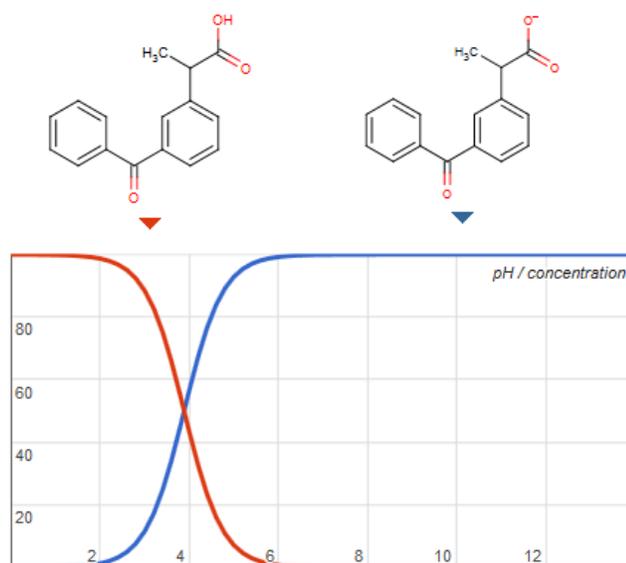


Figura 6: Concentración de la especie predominante de ketoprofeno versus el pH de la solución (Chemicalize.org/ketoprofen).

En cuanto a la extracción con mezclas de solvente orgánico, cuando el sistema presenta 200 Mg ha⁻¹ de biosólido, con Acetona se observa un máximo de recuperación de un 17,8%, mientras que para Metanol se llega a una recuperación cuantitativa del 94,2%, lo que demuestra que en la extracción cuantitativa, el Ketoprofeno es mayormente extraído con Metanol.

En las extracciones con Agua, Azida y Metanol cuando el suelo esta enmendado con 200 Mg ha⁻¹ de biosólido, para el sistema sin esterilizar, se logran extracciones cuantitativas de 95,5; 99,2 y 81,0% respectivamente, mientras que para el sistema esterilizado las recuperaciones son de 91,8; 94,1 y 81,3% respectivamente (Tabla 12 y Tabla 13).

Cuando aumenta la concentración de AINE's a 0,4 µg g⁻¹ (Gráfico 10, Tabla 14), en general, los porcentajes de extracción disminuyen, posiblemente debido a que la solución de extracción se satura antes. Sin embargo, el comportamiento general de encontrarse más disponible el compuesto a medida que aumenta la concentración de biosólido se mantiene. Por otro lado, la disponibilidad del Ketoprofeno solo aumenta al esterilizar el sistema cuando la concentración de biosólido es de 0 Mg ha⁻¹ (Gráfico 11, Tabla 15). Para los sistemas enmendados con 100 y 200 Mg ha⁻¹, cuando se trabaja con agua o con Azida de sodio la extracción disminuye levemente, mientras que utilizando como extractante Fosfato no hay un aumento significativo.

Se realizó un test ANOVA Multifactorial para establecer si la concentración de Ketoprofeno y dosis de Biosólido son factores significativos para la extracción con cada uno de los extractantes. En la Tabla 16 se presentan los p-value para cada factor en donde se observa que todos son menores a 0,05, por lo que se concluye que la concentración de Ketoprofeno y dosis de Biosólido son significativas en la extracción.

Tabla 16: P-value para test ANOVA Multifactorial con concentración de Ketoprofeno y dosis de Biosólido como factores.

Condición	Factor	Agua Milli Q	Azida de Sodio	Fosfato	Acetona	Metanol
Sin	Ket	0,0000	0,0000	0,0032	0,0010	0,0001
Esterilizar	Bio	0,0000	0,0000	0,0005	0,0017	0,0000
Esterilizado	Ket	0,0000	0,0000	0,0000	-	-
	Bio	0,0014	0,0000	0,0000	-	-

KET: Ketoprofeno. BIO: Biosólido.

➤ **Naproxeno**

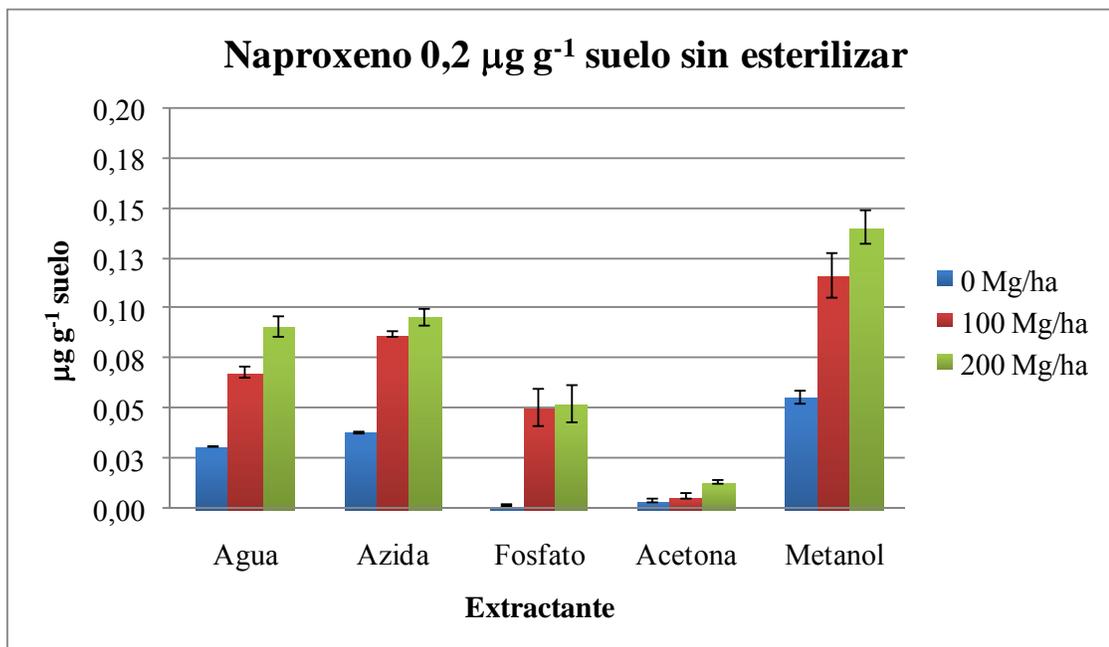


Gráfico 12: Cantidad de Naproxeno extraída por gramo de suelo sin esterilizar en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.

Tabla 17: Porcentajes de extracción para Naproxeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido sin esterilizar enriquecido con 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.

Biosólido (Mg ha ⁻¹)	Agua Milli Q (%)	Azida de sodio (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	Acetona (%)	Metanol (%)
0	20,2	23,6	7,7	8,8	32,9
100	37,8	46,7	30,5	9,6	61,4
200	48,8	50,9	31,4	12,9	72,8

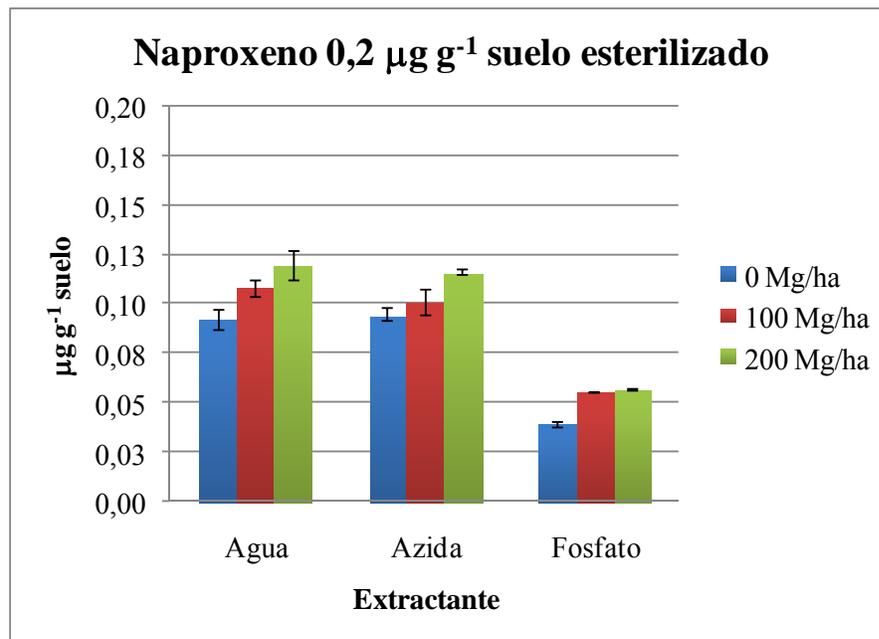


Gráfico 13: Cantidad de Naproxeno extraída por gramo de suelo esterilizado en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.

Tabla 18: Porcentajes de extracción para Naproxeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido esterilizado enriquecido con 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.

Biosólido (Mg ha ⁻¹)	Agua Milli Q (%)	Azida de sodio (%)	KH ₂ PO ₄ (%)
0	39,7	41,2	9,8
100	48,7	44,8	19,1
200	55,1	53,2	19,7

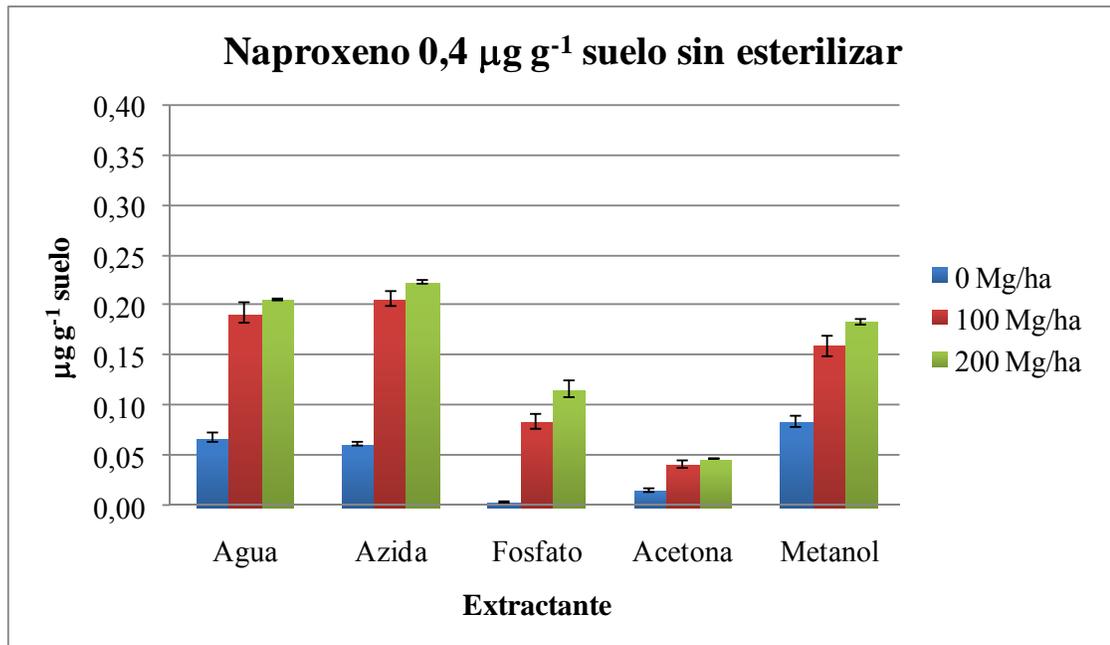


Gráfico 14: Cantidad de Naproxeno extraída por gramo de suelo sin esterilizar en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con 0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.

Tabla 19: Porcentajes de extracción para Naproxeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido sin esterilizar enriquecido con 0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.

Biosólido (Mg ha ⁻¹)	Agua Milli Q (%)	Azida de sodio (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	Acetona (%)	Metanol (%)
0	19,6	18,0	4,6	7,5	24,1
100	49,9	53,3	24,2	13,6	42,4
200	53,3	57,4	31,9	15,1	48,2

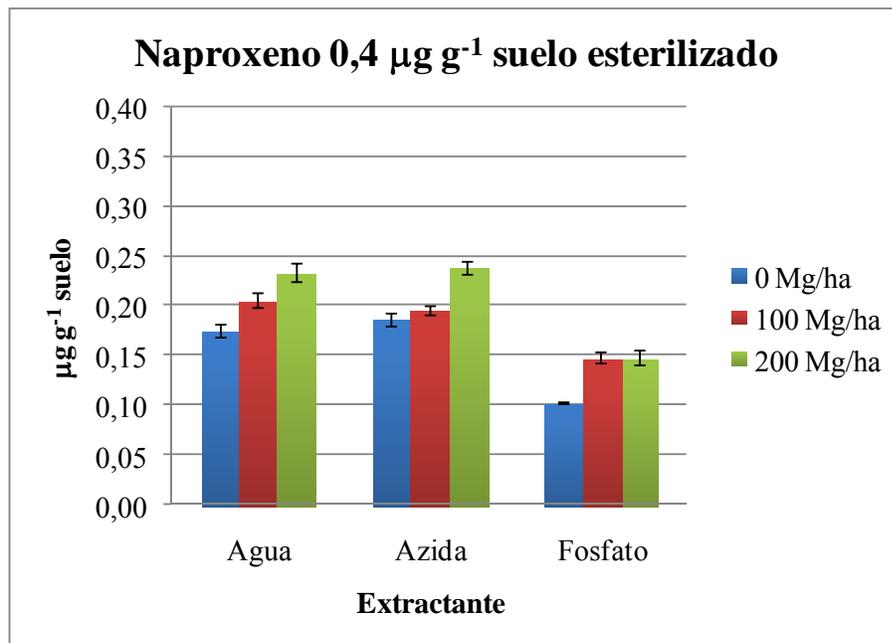


Gráfico 15: Cantidad de Naproxeno extraída por gramo de suelo esterilizado en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.

Tabla 20: Porcentajes de extracción para Naproxeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido esterilizado enriquecido con $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.

Biosólido (Mg ha^{-1})	Agua Milli Q (%)	Azida de sodio (%)	KH_2PO_4 (%)
0	40,8	43,8	21,5
100	48,9	46,3	33,4
200	56,2	57,5	33,6

En la mayoría de los experimentos el porcentaje de extracción de naproxeno fue menor al de ketoprofeno, lo cual podría estar indicando que pudo haber mayor asociación de naproxeno con los sitios activos del suelo, de acuerdo a Lin y Gan (2011) el naproxeno presenta un anillo diaromático, que puede facilitar interacciones π - π con moléculas aromáticas de sustancias húmicas del suelo y del biosólido.

Para el caso de este compuesto, en el sistema sin esterilizar enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's (Gráfico 12, Tabla 17), comparando la extracción entre Agua Milli Q y Azida de sodio, no se observan diferencias entre ambas, por lo que se puede decir que la azida de sodio a esa concentración no suprime lo suficiente la actividad bacteriana o que este compuesto es levemente degradado por los microorganismos presentes en el suelo. Sin embargo, al esterilizar los sistemas (Gráfico 13, Tabla 18), se observa un aumento en los porcentajes de extracción, en donde se demuestra que efectivamente el naproxeno es degradado por acción microbiana y que la esterilización es más efectiva que la azida de sodio en la supresión de la actividad microbiana. Por otro lado, la extracción con agua milli Q y azida para el sistema esterilizado es similar, al igual que en el caso del ketoprofeno, viéndose opacada la acción de la azida de disminuir la actividad bacteriana. Los posibles productos de degradación del naproxeno que se han reportado corresponden a Acyl-glucurónido, O-desmetil-naproxeno y O-desmetil-naproxeno-glucurónido (Gentili, 2007).

En cuanto a la extracción con fosfato, es menor que con agua milli Q y azida de sódio, al igual que en el caso del Ketoprofeno, atribuible posiblemente al pH de la solución, el cual fluctúa entre 4,2 – 4,5; pH al cual se encuentran ambas especies

de naproxeno, protonado y desprotonado, como se observa en la Figura 7, siendo el protonado (la especie neutra) la cual interacciona en mayor medida con el suelo, por lo que solo el naproxeno desprotonado se encontraría disponible (Lin y Gan, 2011).

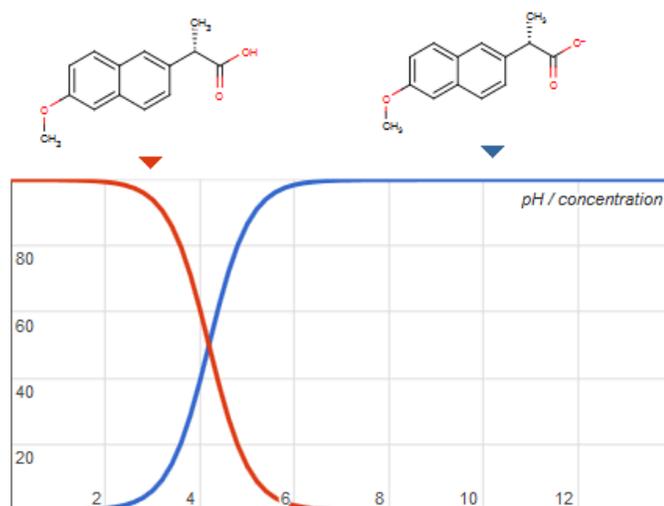


Figura 7: Concentración de la especie predominante de naproxeno versus el pH de la solución (Chemicalize.org/naproxen).

La extracción con acetona presenta un máximo de recuperación de un 12,9%, mientras que para metanol un 72,8% de recuperación, cuando el sistema presenta 200 Mg ha⁻¹, lo que demuestra que en la extracción cuantitativa, el naproxeno es extraído mayormente por el Metanol.

Al aumentar la concentración de naproxeno a 0,4 μg g⁻¹ en los sistemas, no hay gran diferencia entre los porcentajes de extracción, a excepción de la extracción con fosfato en el suelo esterilizado, que tiende a doblarse el porcentaje de extracción (Gráfico 14, Tabla 19 y Gráfico 15, Tabla 20).

Al igual que para Ketoprofeno, se realizó un test ANOVA Multifactorial para establecer si la concentración de Naproxeno y dosis de Biosólido son factores significativos para la extracción con cada uno de los extractantes. La Tabla 21 muestra los valores de p-value para cada factor, en donde se observa que los valores son inferiores a 0,05 por lo que la concentración de Naproxeno y dosis de Biosólido aplicada al sistema es significativa para la extracción obtenida con cada solución.

Tabla 21: P-value para test ANOVA Multifactorial con concentración de Naproxeno y dosis de Biosólido como factores.

Condición	Factor	Agua Milli Q	Azida de Sodio	Fosfato	Acetona	Metanol
Sin	Nap	0,0002	0,0006	0,0076	0,0001	0,0000
Esterilizar	Bio	0,0010	0,00013	0,0003	0,0071	0,0000
Esterilizado	Nap	0,0000	0,0000	0,0000	-	-
	Bio	0,0010	0,0015	0,0014	-	-

NAP: Naproxeno. BIO: Biosólido.

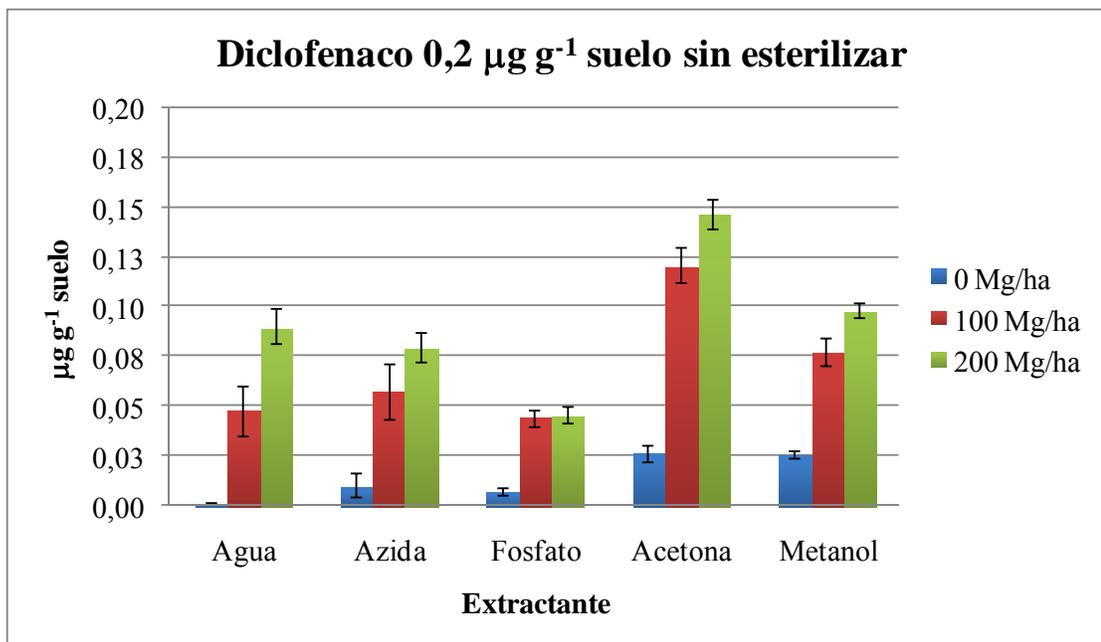
➤ **Diclofenaco**

Gráfico 16: Cantidad de Diclofenaco extraída por gramo de suelo sin esterilizar en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.

Tabla 22: Porcentajes de extracción para Diclofenaco utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido sin esterilizar enriquecido con 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.

Biosólido (Mg ha ⁻¹)	Agua Milli Q (%)	Azida de sodio (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	Acetona (%)	Metanol (%)
0	8,2	12,3	2,7	12,2	12,1
100	29,8	34,1	21,2	60,2	38,1
200	49,4	44,6	22,0	73,3	48,7

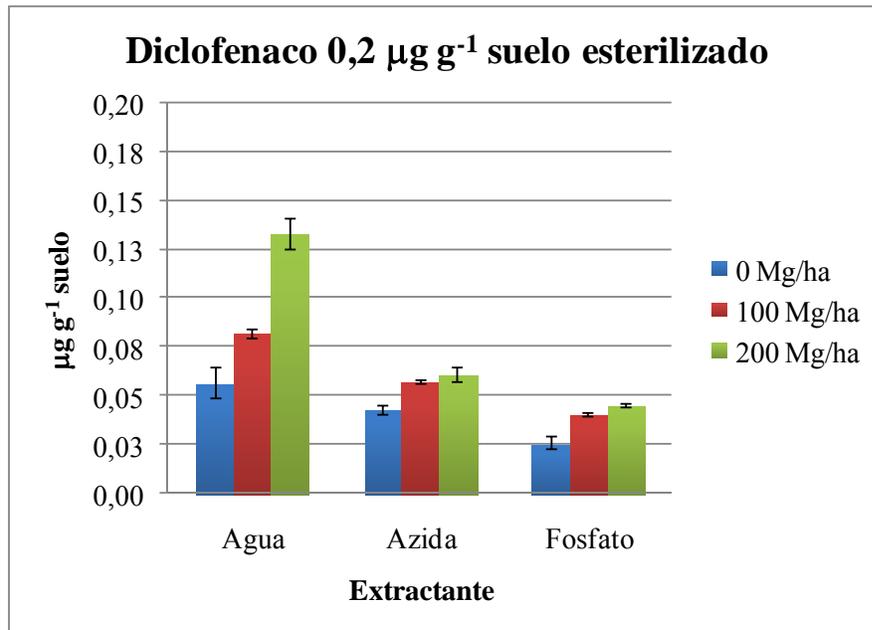


Gráfico 17: Cantidad de Diclofenaco extraída por gramo de suelo esterilizado en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.

Tabla 23: Porcentajes de extracción para Diclofenaco utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido esterilizado enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.

Biosólido (Mg ha^{-1})	Agua Milli Q (%)	Azida de sodio (%)	KH_2PO_4 (%)
0	22,5	15,0	5,8
100	36,2	22,8	13,8
200	64,1	24,7	16,2

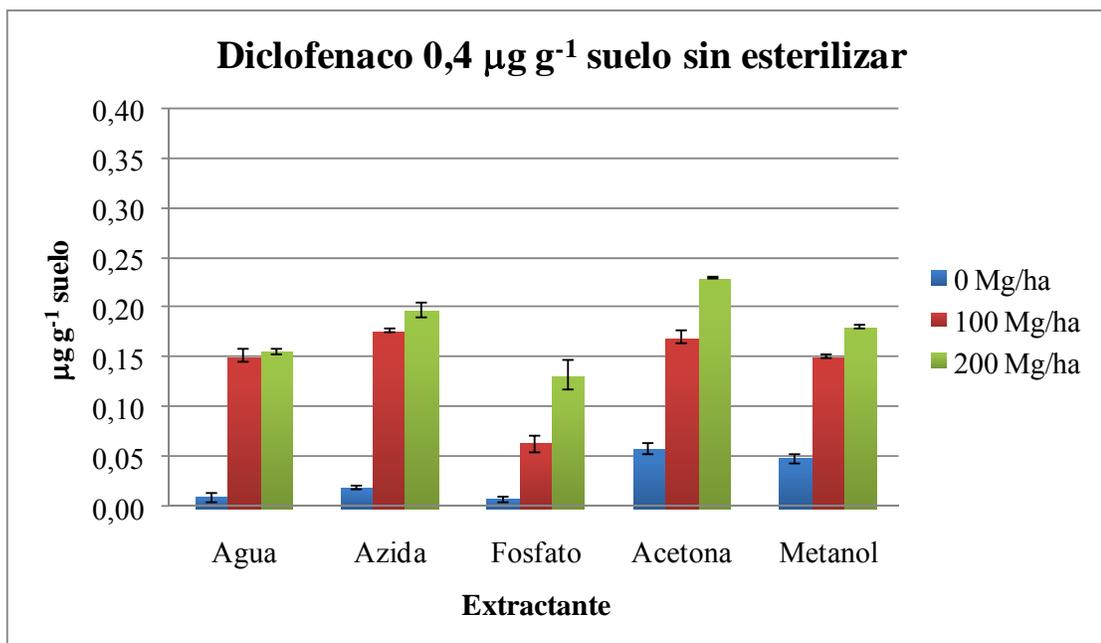


Gráfico 18: Cantidad de Diclofenaco extraída por gramo de suelo sin esterilizar en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con 0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.

Tabla 24: Porcentajes de extracción para Diclofenaco utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido sin esterilizar enriquecido con 0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.

Biosólido (Mg ha ⁻¹)	Agua Milli Q (%)	Azida de sodio (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	Acetona (%)	Metanol (%)
0	6,5	8,8	1,5	14,3	11,8
100	40,7	46,9	15,5	42,7	37,8
200	41,7	51,8	33,2	57,6	45,2

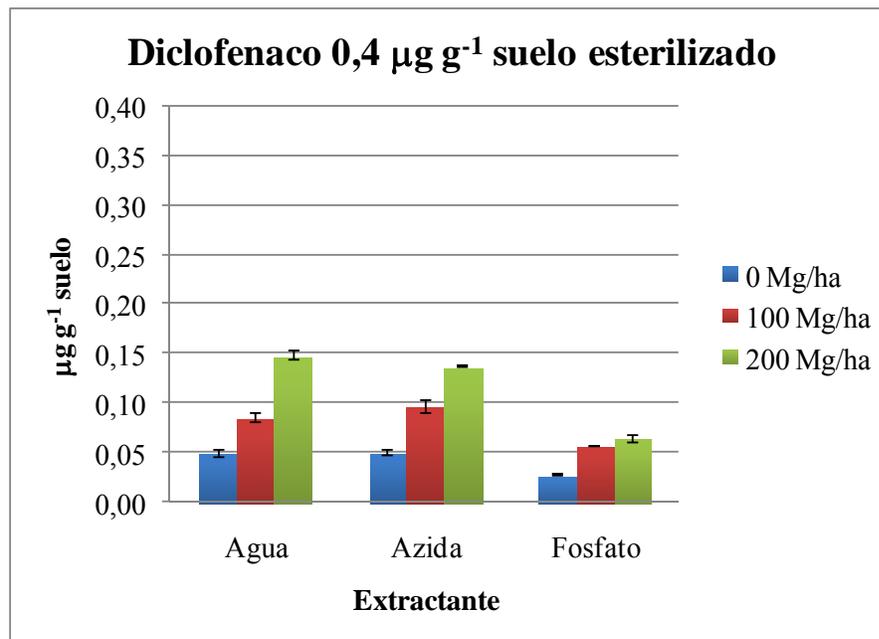


Gráfico 19: Cantidad de Diclofenaco extraída por gramo de suelo esterilizado en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con 0,4 µg g⁻¹ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.

Tabla 25: Porcentajes de extracción para Diclofenaco utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido esterilizado enriquecido con 0,4 µg g⁻¹ de AINE's.

Biosólido (Mg ha ⁻¹)	Agua Milli Q (%)	Azida de sodio (%)	KH ₂ PO ₄ (%)
0	8,9	9,2	3,4
100	18,4	21,6	10,9
200	34,8	32,0	13,0

El Diclofenaco presenta el mayor log K_{OW} (Tabla 2), por lo tanto debido a su carácter menos polar que los demás AINEs en estudio es esperable que tenga mayor interacción con el suelo, y por lo tanto presente baja extractabilidad en agua.

La comparación entre la extracción con Agua milli Q y con Azida de sodio, para el sistema sin esterilizar enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's (Gráfico 16, Tabla 22), muestra un leve aumento en la extracción con azida, indicando una posible degradación bacteriana de este compuesto en el sistema, lo que se evidencia de mayor manera al esterilizar el suelo (Gráfico 17, Tabla 23), donde el compuesto queda disponible en mayor cantidad al estar sometido a una menor actividad bacteriana, esto también se visualiza en el sistema sin biosólido con agua en un aumento de 8,2% a 22,5%, y un aumento de 12,3% a 15,0% cuando el extractante es azida de sodio.

Al esterilizar el suelo, se esperaría que al igual que en los casos de ketoprofeno y naproxeno, la extracción fuera muy similar con agua milli Q y azida de sodio, sin embargo la extracción con azida es mucho menor, posiblemente debido a que en este caso la azida ya no actúa como inhibidor de la actividad bacteriana, sino a que puede estar reaccionando con el compuesto, disminuyendo así la concentración de diclofenaco que se encuentra disponible (Carey, 2007).

La extracción con fosfato es menor, al igual que para ketoprofeno y naproxeno, lo que nuevamente se podría atribuir a que el pH es muy ácido para el clean-up, además por su pKa que estaría desprotonado, como se muestra en la Figura 8, por lo tanto más absorbido en el suelo.

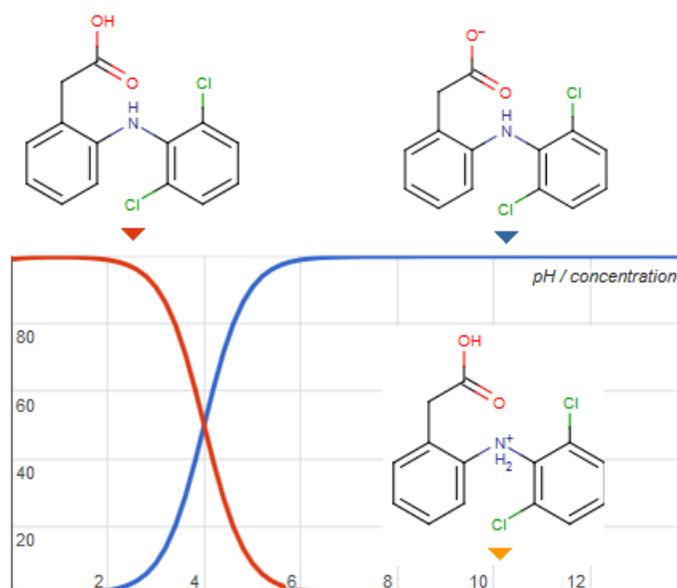


Figura 8: Concentración de la especie predominante de diclofenaco versus el pH de la solución (Chemicalize.org/diclofenac).

En las extracciones con mezclas de solvente orgánico se encontró mayor extracción con acetona que con metanol (Tabla 22, Gráfico 16), siendo los porcentajes de recuperación para los sistemas enmendados con 200 Mg ha⁻¹ de biosólido, de 73,3% y 48,7% respectivamente, lo que demuestra que este compuesto se extrae mayoritariamente en la extracción cuantitativa con Acetona, sin embargo, igual se extrae con Metanol en las etapas previas.

Cuando los sistemas fueron enriquecidos con 0,4 µg g⁻¹ de AINE's (Gráfico 18, Tabla 24), los porcentajes de recuperación fueron menores, posiblemente debido a que el extractante se satura. También se observa el efecto contrario al ketoprofeno y naproxeno, al esterilizar el sistema suelo-biosólido (Gráfico 19, Tabla 25), disminuye o se mantiene la disponibilidad del diclofenaco, observándose que es el compuesto al que menos le afecta la degradación

bacteriana. También puede ser que se degrade menos y quede más retenido en el suelo. Los productos de degradación del diclofenaco que se han reportado corresponden a 4-hidroxi diclofenaco, 3-hidroxi diclofenaco, 5-hidroxi diclofenaco y diclofenaco O-glucorónido (Gentili, 2007).

Los p-value del test ANOVA Multifactorial realizado para cada uno de los extractantes utilizando como factores la concentración de Diclofenaco y dosis de Biosólido, de manera de establecer si son significativos, se encuentran resumidos en la Tabla 26, en donde se puede observar que en todos los casos es inferior a 0,05; excepto para cuando el sistema es esterilizado y la extracción es con Agua Milli Q, en donde el p-value para las diferentes concentraciones de diclofenaco es 0,3798; lo que estaría indicando que la concentración en este caso y para este extractante no es un parámetro significativo.

Tabla 26: P-value para test ANOVA Multifactorial con concentración de Diclofenaco y dosis de Biosólido como factores.

Condición	Factor	Agua Milli Q	Azida de Sodio	Fosfato	Acetona	Metanol
Sin	Dic	0,0030	0,0022	0,0304	0,0001	0,0002
Esterilizar	Bio	0,0004	0,0013	0,0042	0,0000	0,0001
Esterilizado	Dic	0,3798	0,0035	0,0022	-	-
	Bio	0,0000	0,0090	0,0001	-	-

DIC: Diclofenaco. BIO: Biosólido.

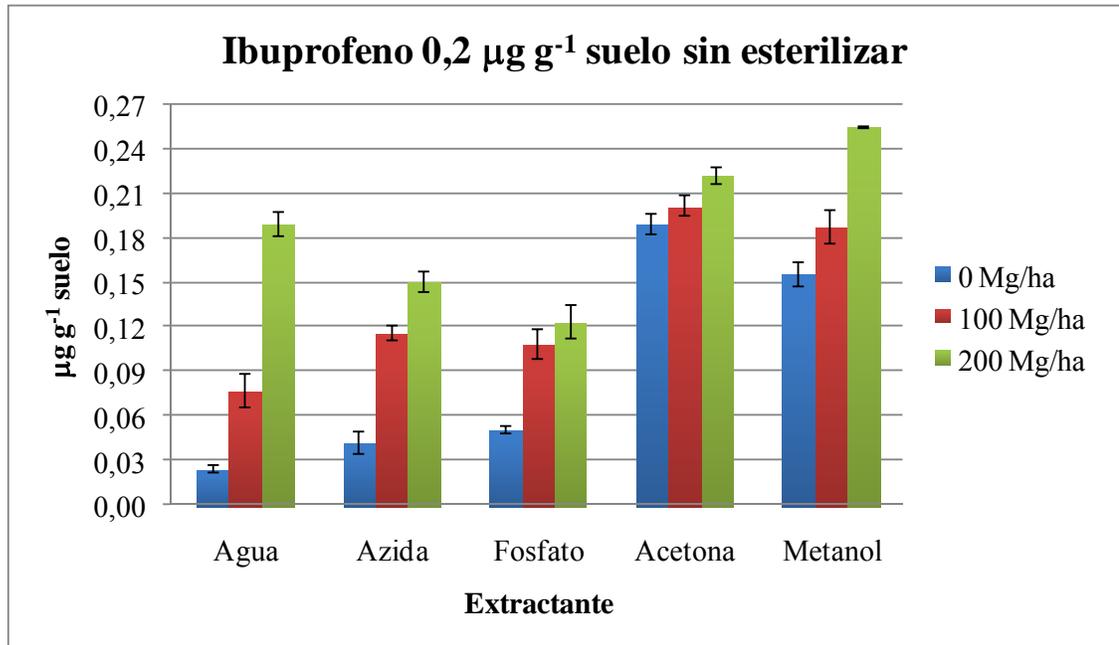
➤ **Ibuprofeno**

Gráfico 20: Cantidad de Ibuprofeno extraída por gramo de suelo sin esterilizar en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.

Tabla 27: Porcentajes de extracción para Ibuprofeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido sin esterilizar enriquecido con 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.

Biosólido (Mg ha ⁻¹)	Agua Milli Q (%)	Azida de sodio (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	Acetona (%)	Metanol (%)
0	18,7	26,8	20,9	95,0	76,9
100	42,9	61,4	53,0	101,6	93,8
200	95,7	77,4	59,7	112,4	129,9

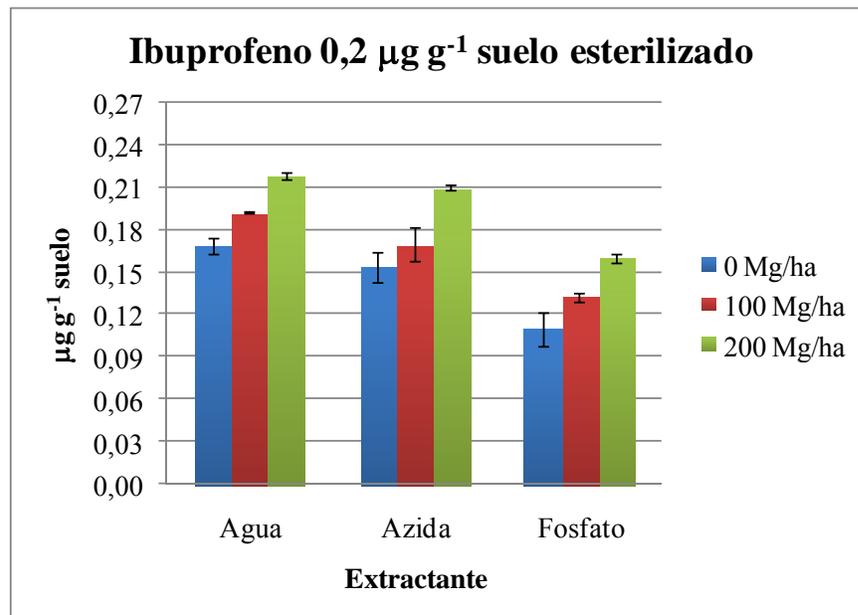


Gráfico 21: Cantidad de Ibuprofeno extraída por gramo de suelo esterilizado en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.

Tabla 28: Porcentajes de extracción para Ibuprofeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido esterilizado enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.

Biosólido (Mg ha^{-1})	Agua Milli Q (%)	Azida de sodio (%)	KH_2PO_4 (%)
0	83,8	75,9	53,1
100	96,3	84,4	64,9
200	110,0	105,3	79,3

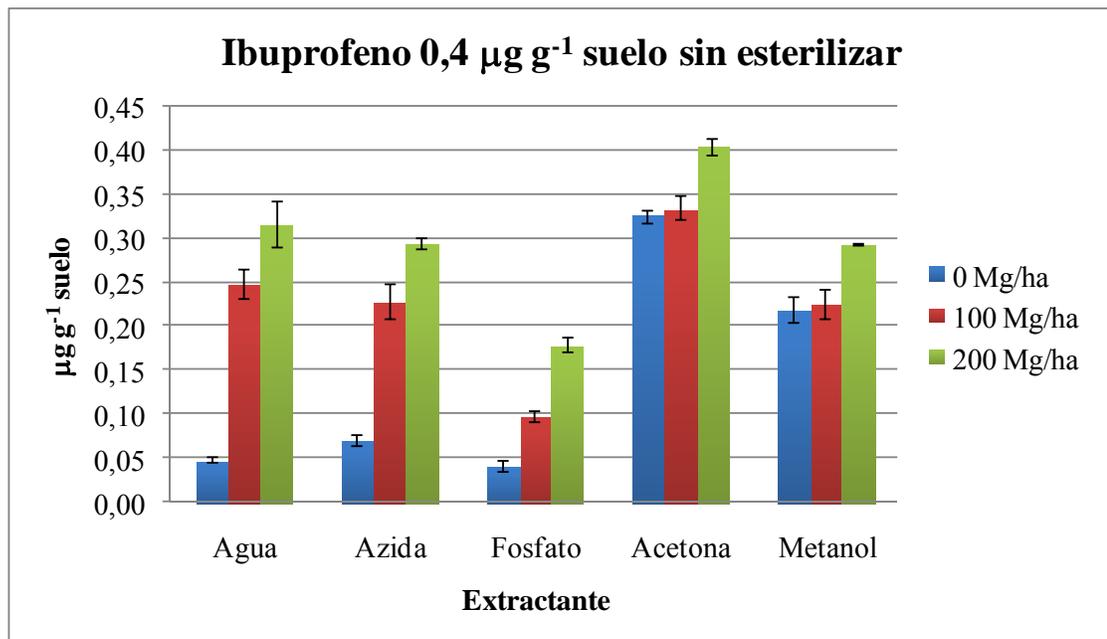


Gráfico 22: Cantidad de Ibuprofeno extraída por gramo de suelo sin esterilizar en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.

Tabla 29: Porcentajes de extracción para Ibuprofeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido sin esterilizar enriquecido con $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.

Biosólido (Mg ha ⁻¹)	Agua Milli Q (%)	Azida de sodio (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	Acetona (%)	Metanol (%)
0	15,2	20,7	7,3	80,9	53,3
100	63,7	75,0	22,0	83,5	55,3
200	79,9	76,1	43,2	101,5	72,7

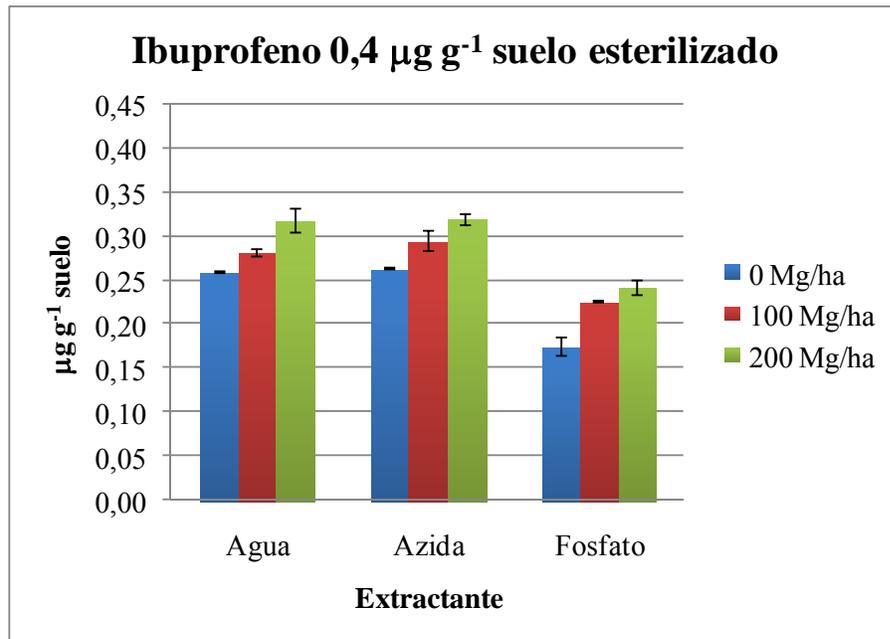


Gráfico 23: Cantidad de Ibuprofeno extraída por gramo de suelo esterilizado en los sistemas suelo-biosólido enriquecido con 0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, utilizando diferentes extractantes.

Tabla 30: Porcentajes de extracción para Ibuprofeno utilizando diferentes extractantes para los sistemas suelo-biosólido esterilizado enriquecido con 0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's.

Biosólido (Mg ha ⁻¹)	Agua Milli Q (%)	Azida de sodio (%)	KH ₂ PO ₄ (%)
0	64,3	65,5	42,8
100	69,9	79,5	55,8
200	79,3	80,6	59,8

El Ibuprofeno se comporta de manera muy similar al Ketoprofeno, ya que al comparar la extracción con agua y azida de sodio en el sistema enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's (Gráfico 20, Tabla 27), se observa un aumento en la extracción para los sistemas enmendados con 0 y 100 Mg ha^{-1} de biosólido, sin embargo la extracción disminuye con azida cuando el sistema es enmendado con una dosis de 200 Mg ha^{-1} de biosólido, de un 95,7% con agua a un 77,4% en el sistema sin esterilizar. Como en todos los casos, el efecto de la actividad bacteriana se aprecia de mejor manera en los sistemas que fueron esterilizados (Gráfico 21, Tabla 28), observándose que es posible extraer más del 50% con casi todos los extractantes.

Los metabolitos de degradación del Ibuprofeno corresponden a 2-hidroximetil-ibuprofeno, 2-hidroxi-ibuprofeno, 2-carboxi-ibuprofeno, acyl glucorónido y 1-hidroxi-ibuprofeno. (Gentili, 2007). Se ha encontrado que ibuprofeno sufre transformación microbiana oxidativa a metabolitos hidroxilados, en mayor medida, y a metabolitos carboxilados, en menor medida, bajo condiciones aeróbicas (Lin y col, 2006), lo cual podría explicar el aumento de la extracción cuando el suelo fue esterilizado.

Al igual que los otros casos, la extracción con fosfato se ve disminuida en comparación a cuando se utiliza cualquier otro solvente, principalmente debido a que el pH de la solución no es el óptimo para estos analitos ya que se encuentran ambas especies en solución, protonada y deprotonada (Figura 9), de manera que se extrae menos cantidad ya que la especie protonada queda más retenida en el suelo (Gross y col, 2006; Lin y Gan, 2011).

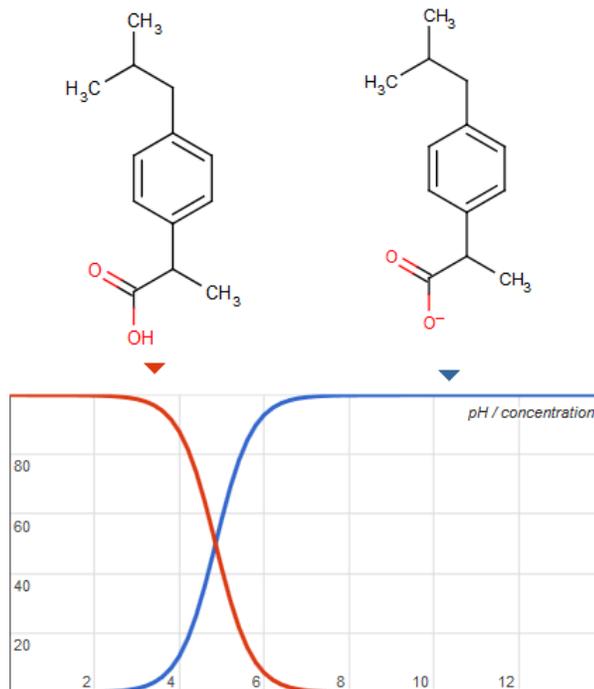


Figura 9: Concentración de la especie predominante de ibuprofeno versus el pH de la solución (Chemicalize.org/ibuprofen).

En cuanto a la extracción con mezcla de solvente orgánico, se puede observar que este analito es posible extraerlo tanto con acetona como con metanol, lo que avala que la extracción cuantitativa sea realizada con ambos solventes. Llegando a porcentajes de recuperación de entre 70 – 130 % para el sistema enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$, siendo casi una extracción cuantitativa (Gráfico 20, Tabla 27), mientras que para el sistema enriquecido con $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$, los porcentajes de recuperación se encuentran entre 40 – 100% (Gráfico 22, Tabla 29).

El test ANOVA Multifactorial realizado para cada uno de los extractantes utilizando como factores la concentración de Ibuprofeno y dosis de Biosólido dio como resultado los p-value resumidos en la Tabla 31, en donde se observa que en todos los casos el valor es inferior a 0,05 indicando que tanto la concentración de

Ibuprofeno como la dosis de Biosólido son significativas para la extracción, excepto cuando la extracción se realiza con fosfato para el sistema sin esterilizar, donde el p-value para la concentración de Ibuprofeno es 0,3741, lo que estaría indicando que la concentración en este caso y para este extráctate no es un parámetro significativo.

Tabla 31: P-value para test ANOVA Multifactorial con concentración de Ibuprofeno y dosis de Biosólido como factores.

Condición	Factor	Agua Milli Q	Azida de Sodio	Fosfato	Acetona	Metanol
Sin	Ibu	0,0018	0,0007	0,3741	0,0000	0,0002
Esterilizar	Bio	0,0002	0,0002	0,0003	0,0024	0,0000
Esterilizado	Ibu	0,0000	0,0000	0,0000	-	-
	Bio	0,0000	0,0001	0,0001	-	-

IBU: Ibuprofeno. BIO: Biosólido.

En general, para Ketoprofeno, Naproxeno e Ibuprofeno la esterilización tuvo un efecto positivo sobre su extracción, atribuible a una menor degradación por parte de los microorganismos de los sistemas suelo-biosólido, mientras que Diclofenaco no presentó un comportamiento similar, lo que se podría atribuir a una mayor interacción con el suelo, imposibilitando la degradación microbiana.

A los residuos obtenidos luego de las extracciones con agua milli Q, azida de sodio y fosfato se le realizaron extracciones con las mismas soluciones asistidas con ultrasonido, no encontrando cantidades cuantificables de los diferentes antiinflamatorios en estudio

4.5 Extracción de la fracción biodisponible de AINE's desde plantas de trigo.

Las Biomosas obtenidas en los cultivos de Trigo utilizando suelo sin esterilizar y esterilizado para dosis de Antiinflamatorio de 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ se presentan en la Tabla 32.

Tabla 32: Biomosas de las plantas de trigo para los suelos enriquecidos con AINE's y enmendados con Biosólido.

Biosólido (Mg ha ⁻¹)	AINE's ($\mu\text{g g}^{-1}$ suelo)	Suelo sin esterilizar (g)	Suelo esterilizado (g)
0	0,2	3,50±0,20	3,30±0,40
100	0,2	3,67±0,03	3,80±0,10
200	0,2	3,56±0,04	3,50±0,05
0	0,4	3,40±0,01	3,40±0,10
100	0,4	3,67±0,01	3,60±0,10
200	0,4	3,67±0,09	3,93±0,04

De acuerdo en los resultados obtenidos no se encontraron diferencias en las biomosas con las diferentes enmiendas de antiinflamatorio y biosólido, indicando que aparentemente no hubo efecto tóxico con la mayor presencia de fármacos en los sistemas, ni un mayor crecimiento con el aporte de nutrientes por parte del biosólido.

La extracción de los antiinflamatorios no esteroideos desde las plantas de trigo, se encuentran resumidos en la Tabla 33 para los sistemas de suelo sin esterilizar.

Tabla 33: Concentración de AINE's en plantas de trigo cultivadas en suelo sin esterilizar.

Biosólido (Mg ha ⁻¹)	AINE's (µg g ⁻¹ suelo)	Ketoprofeno (ng g ⁻¹ planta)	Naproxeno (ng g ⁻¹ planta)	Diclofenaco (ng g ⁻¹ planta)	Ibuprofeno (ng g ⁻¹ planta)
0	0,2	99 ± 8	47 ± 2	77 ± 5	133 ± 10
100	0,2	131 ± 10	56 ± 8	108 ± 8	147 ± 6
200	0,2	189 ± 10	90 ± 2	121 ± 11	223 ± 20
0	0,4	152 ± 1	118 ± 10	112 ± 3	132 ± 1
100	0,4	163 ± 10	173 ± 4	110 ± 4	188 ± 8
200	0,4	256 ± 9	235 ± 17	147 ± 4	304 ± 14

La extracción de AINE's desde las plantas de trigo cultivadas en suelos esterilizados se encuentran en la Tabla 34

Tabla 34: Concentración de AINE's en plantas de trigo cultivadas en suelo esterilizado.

Biosólido (Mg ha ⁻¹)	AINE's (µg g ⁻¹ suelo)	Ketoprofeno (ng g ⁻¹ planta)	Naproxeno (ng g ⁻¹ planta)	Diclofenaco (ng g ⁻¹ planta)	Ibuprofeno (ng g ⁻¹ planta)
0	0,2	104 ± 13	96 ± 7	111 ± 2	151 ± 17
100	0,2	169 ± 2	118 ± 8	129 ± 2	174 ± 8
200	0,2	291 ± 3	137 ± 4	158 ± 2	255 ± 5
0	0,4	186 ± 14	113 ± 8	152 ± 7	207 ± 14
100	0,4	487 ± 21	170 ± 6	158 ± 6	246 ± 2
200	0,4	846 ± 10	270 ± 4	210 ± 13	301 ± 8

Los resultados son congruentes con los obtenidos con los diferentes extractantes, ya que mayoritariamente se extrajo ketoprofeno e ibuprofeno, además al aumentar la dosis de biosólido aumentó la extracción y la biodisponibilidad de los AINE's.

En todos los compuestos, se puede observar que a medida que aumenta la concentración de biosólido en el sistema, aumenta el fármaco adsorbido por la planta indicando que el biosólido contribuye positivamente a la disponibilidad del compuesto, atribuible al aumento en la aglomeración del sistema suelo-biosólido y posibles interacciones con los grupos funcionales del biosólido que hacen que el fármaco quede más disponible.

Para Ketoprofeno, la biodisponibilidad aumenta si el sistema suelo-biosólido es esterilizado. Notándose más las diferencias en los suelos que fueron enriquecidos con $0,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AINE's. En el caso de Naproxeno y Diclofenaco, se puede visualizar un aumento en la biodisponibilidad cuando el suelo es esterilizado, pero en menor grado que para el Ketoprofeno, este comportamiento también ocurrió con las extracciones con agua, azida y fosfato.

En el suelo esterilizado, el mayor efecto de la incorporación de biosólido se observó en la extracción de ketoprofeno, con un incremento de aprox. 600 ng g^{-1} en el sistema es enriquecido con $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's y alrededor de 200 ng g^{-1} cuando fue enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's. El naproxeno presentó un aumento de 150 ng g^{-1} en el sistema enriquecido con $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's y de 40 ng g^{-1} de AINE's cuando fue enriquecido con $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's. Para el caso del diclofenaco, el sistema enriquecido con $0,2$ y $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's, se produjo

un incremento de aprox. 55 ng g^{-1} , siendo el fármaco que menor aumento presentó. Teniendo en cuenta que el diclofenaco tiene mayor $\log K_{OW}$, se espera que presente mayor interacción con el suelo, por lo que debería tener menor absorción por la planta. El ibuprofeno en ambos sistemas presenta un incremento cercano a 100 ng g^{-1} .

En el suelo sin esterilizar, el mayor efecto de la incorporación de biosólido se observó en ketoprofeno e ibuprofeno para ambas dosis de AINE's, y para naproxeno enriquecido con $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de AINE's. Al igual que para el suelo esterilizado, la cantidad de diclofenaco adsorbido por la planta no incrementó mayormente con la dosis de biosólido.

La planta de trigo extrajo porcentajes bajos de todos los AINE's en estudio, siendo para el sistema sin esterilizar el mínimo de 0,26% para Naproxeno y el máximo de 1,14% para Ibuprofeno (Tabla 45, Anexo). Mientras que en el sistema esterilizado se extrajo un mínimo de 0,30% para Naproxeno y 1,47% para Ketoprofeno (Tabla 46, Anexo).

Con el fin de evaluar si existe un efecto significativo por parte de la concentración de AINEs y dosis de biosólido agregada al suelo con respecto a la cantidad extraída de AINEs por las plantas de trigo, se realizó un Test ANOVA multifactorial, los resultados se resumen en la Tabla 35.

Tabla 35: Test ANOVA Multifactorial para las plantas de trigo a un intervalo de confianza del 95%.

Condición	Fármaco	p value AINE's	p-value Biosólido
Sin Esterilizar	Ketoprofeno	0,0001	0,0000
	Naproxeno	0,0000	0,0015
	Diclofenaco	0,0084	0,0021
	Ibuprofeno	0,0163	0,0001
Esterilizado	Ketoprofeno	0,0017	0,0033
	Naproxeno	0,0051	0,0055
	Diclofenaco	0,0000	0,0001
	Ibuprofeno	0,0000	0,0000

Tanto para la condición sin esterilizar como esterilizada, los p-value fueron inferiores a 0,05, por lo que se observa un efecto significativo en cuanto a la concentración de biosólido y a la concentración de AINE's con los que fueron enriquecidos los sistemas.

4.6 Correlaciones entre las fracciones disponibles de AINE's en los sistemas suelo-biosólido y su contenido en las plantas de trigo.

Para evaluar si las extracciones de AINEs desde los diferentes sistemas suelo-biosólido con los diferentes extractantes correlacionan con lo captado por las plantas de trigo, se ajustó un modelo de Regresión Simple, utilizando como variable dependiente los antiinflamatorios extraídos por las plantas, y como variable independiente las fracciones de los fármacos que fueron extraídas con los

diferentes solventes, teniendo en cuenta que para cada extractante y la planta se le realizó previamente un Test ANOVA Multifactorial, en donde se verificó que la concentración de AINE's y dosis de Biosólido aplicada a cada sistema fuera significativa.

➤ **Ketoprofeno.**

Tabla 36: Correlaciones para Ketoprofeno en plantas de trigo y extractantes en los diferentes sistemas en estudio.

Condición	Extractante	R ²	P value	Ecuación
Sin Esterilizar	Agua	75,8	0,0002	$Ket_{trigo}=0,0970+0,3786Agua$
	Azida	77,5	0,0002	$Ket_{trigo}=0,0932+0,3799Azida$
	Fosfato	66,1	0,0013	$Ket_{trigo}=0,1062+0,4738Fosfato$
	Acetona	86,0	0,0000	$Ket_{trigo}=0,0816+1,8006Acetona$
	Metanol	88,4	0,0000	$Ket_{trigo}=0,0501+0,7647Metanol$
Esterilizado	Agua	84,8	0,0000	$Ket_{trigo}=-0,3858+3,3601Agua$
	Azida	80,3	0,0001	$Ket_{trigo}=-0,3948+3,4106Azida$
	Fosfato	77,2	0,0002	$Ket_{trigo}=-0,3903+3,996Fosfato$

R²: coeficiente de determinación (en porcentaje).

Como se presenta en la Tabla 36, para Ketoprofeno, las correlaciones con todas las soluciones acuosas presentan un p-value inferior a 0,05; lo que indica que los modelos matemáticos ajustados son significativos, encontrándose coeficientes de determinación entre 66,1 y 88,4%.

Para las plantas que fueron cultivadas en los sistemas sin esterilizar, se puede observar en la Tabla 36, que el mejor extractante es la solución de Metanol al 20%, puesto que presenta un coeficiente de determinación de 88,4; lo que indica que este modelo matemático puede explicar en gran medida el comportamiento del Ketoprofeno en el medio ambiente en cuanto a la biodisponibilidad en plantas de Trigo.

Tomando en cuenta solo las soluciones acuosas, sin solvente orgánico, el extractante que mejor explica el comportamiento medioambiental, en el suelo sin esterilizar, es la Azida de sodio ya que el modelo explica un 77,5 % del comportamiento, probablemente porque al inhibir la actividad bacteriana del suelo se puede simular de una mejor manera el comportamiento de la planta frente a la adsorción de Ketoprofeno. Cuando el suelo es esterilizado, el mejor extractante fue el agua con un r^2 de 84,8% debido posiblemente a que la actividad microbiana ya se encuentra inhibida, lo que estaría demostrando que la fracción biodisponible que es adsorbida por la planta es la que se encuentra soluble en la parte acuosa del suelo.

En cuanto a la extracción con fosfato, se puede decir que el pH, a pesar de que es similar al de la rizósfera en la planta, no debería ser un factor determinante en la adsorción de Ketoprofeno por la planta.

➤ **Naproxeno**

Tabla 37: Correlaciones para Naproxeno en plantas de trigo y extractantes en los diferentes sistemas en estudio.

Condición	Extractante	R ²	P value	Ecuación
Sin Esterilizar	Agua	86,5	0,0000	$\text{Nap}_{\text{trigo}}=0,0162+0,9429\text{Agua}$
	Azida	81,4	0,0001	$\text{Nap}_{\text{trigo}}=0,0173+0,8603\text{Azida}$
	Fosfato	63,3	0,0020	$\text{Nap}_{\text{trigo}}=0,0524+1,2943\text{Fosfato}$
	Acetona	94,9	0,0000	$\text{Nap}_{\text{trigo}}=0,0350+3,8700\text{Acetona}$
	Metanol	63,2	0,0020	$\text{Nap}_{\text{trigo}}=-0,0309+1,2149\text{Metanol}$
Esterilizado	Agua	67,1	0,0011	$\text{Nap}_{\text{trigo}}=0,0089+0,9065\text{Agua}$
	Azida	63,8	0,0018	$\text{Nap}_{\text{trigo}}=0,0168+0,8578\text{Azida}$
	Fosfato	59,6	0,0032	$\text{Nap}_{\text{trigo}}=0,0569+1,0167\text{Fosfato}$

R²: coeficiente de determinación (en porcentaje).

La Tabla 37 presenta que para Naproxeno, al igual que para Ketoprofeno, todas las correlaciones de las extracciones con las diferentes soluciones acuosas presentan un P value inferior a 0,05, por lo que todos los modelos matemáticos ajustados son significativos, con respecto a lo captado por las plantas de trigo, fluctuando los coeficientes de determinación entre 94,9 y 59,6%.

Para los suelos sin esterilizar, el extractante que mejor explica el comportamiento del Naproxeno frente a la adsorción de la planta corresponde a la Acetona al 20% con un coeficiente de determinación de 94,9, lo que indica que este extractante explica el 94,9% del comportamiento de la planta.

Observando solo las soluciones acuosas, sin solvente orgánico, tanto para los sistemas sin esterilizar como esterilizados, el extractante que mejor modela el comportamiento de la planta es el agua, lo que demuestra que para el Naproxeno, ni la inhibición bacteriana (extracción con Azida) ni el pH (extracción con fosfato), son parámetros fundamentales en la adsorción de este compuesto por la planta, sino que lo que se encuentra soluble en la fase acuosa del suelo es la que será adsorbida por la planta.

➤ Diclofenaco

Tabla 38: Correlaciones para Diclofenaco en plantas de trigo y extractantes en los diferentes sistemas en estudio.

Condición	Extractante	R ²	P value	Ecuación
Sin Esterilizar	Agua	48,4	0,0119	$Dic_{trigo}=0,0943+0,2373Agua$
	Azida	48,6	0,0117	$Dic_{trigo}=0,0938+0,2044Azida$
	Fosfato	67,3	0,0011	$Dic_{trigo}=0,0919+0,4077Fosfato$
	Acetona	71,9	0,0005	$Dic_{trigo}=0,0793+0,2641Acetona$
	Metanol	61,7	0,0025	$Dic_{trigo}=0,0827+0,3059Metanol$
Esterilizado	Agua	58,2	0,0039	$Dic_{trigo}=0,0936+0,6393Agua$
	Azida	78,9	0,0001	$Dic_{trigo}=0,0911+0,8282Azida$
	Fosfato	67,9	0,010	$Dic_{trigo}=0,0743+1,7912Fosfato$

R²: coeficiente de determinación (en porcentaje).

Para Diclofenaco, todas las correlaciones presentan un P value inferior a 0,05, por lo que todos los modelos matemáticos ajustados son significativos, obteniendo coeficientes de determinación entre 48,4 y 71,9 (Tabla 38).

En los sistemas sin esterilizar, el mejor extractante corresponde a Acetona al 20%, con un coeficiente de determinación de 71,6; indicando que este extractante explica el 71,6% del comportamiento de la adsorción de Diclofenaco por la planta.

Observando los extractantes sin solvente orgánico, para los sistemas sin esterilizar, el extractante que mejor explica el comportamiento de la planta corresponde al fosfato, con un coeficiente de determinación de 67,3. Mientras que para los sistemas esterilizados, el extractante que mejor explica el comportamiento de la planta frente a la adsorción de Diclofenaco es la Azida de sodio, explicando el 78,9% del comportamiento de la planta, probablemente debido a que puede retrasar o minimizar la reactivación microbiana producto de la incorporación de biosólido.

Para el caso de la extracción con agua y azida de sodio, los coeficientes de determinación corresponden a 48,4 y 48,6 respectivamente, indicando que el modelo ajustado con estos solventes no es bueno para representar la extracción de la planta en el sistema sin esterilizar, mientras que en el caso de la extracción con agua milli Q para el sistema esterilizado, el modelo matemático planteado no es el adecuado, a pesar de que el coef. de determinación es de 58,2%; debido a que con el test ANOVA multifactorial no dio como significativo el factor correspondiente a la concentración de diclofenaco (p-value = 0,3798; Tabla 26).

➤ **Ibuprofeno**

Tabla 39: Correlaciones para Diclofenaco en plantas de trigo y extractantes en los diferentes sistemas en estudio.

Condición	Extractante	R ²	P value	Ecuación
Sin Esterilizar	Agua	82,7	0,0000	$Ibu_{trigo}=0,1096+0,5196Agua$
	Azida	78,0	0,0001	$Ibu_{trigo}=0,0941+0,6219Azida$
	Fosfato	84,9	0,0000	$Ibu_{trigo}=0,0644+1,2275Fosfato$
	Acetona	37,9	0,0329	$Ibu_{trigo}=0,0539+0,4783Acetona$
	Metanol	79,3	0,0001	$Ibu_{trigo}=-0,0865+1,2283Metanol$
Esterilizado	Agua	71,6	0,0005	$Ibu_{trigo}=0,0215+0,8394Agua$
	Azida	67,8	0,0010	$Ibu_{trigo}=0,0626+0,6819Azida$
	Fosfato	76,5	0,0002	$Ibu_{trigo}=0,0576+0,9478Fosfato$

R²: coeficiente de determinación (en porcentaje).

Para Ibuprofeno, todas las correlaciones presentan un P value inferior a 0,05, indicando que todos los modelos matemáticos ajustados con los diferentes extractantes son significativos, siendo los coeficientes de determinación entre 37,9 y 84,9; .como se muestra en la Tabla 39.

Para el Ibuprofeno, tanto para los sistemas de suelo-biosólido sin esterilizar como esterilizados, se puede observar que el extractante que mejor explica el comportamiento de la planta en cuanto a la adsorción de este fármaco es el Fosfato, dando un coeficiente de determinación de 84,9 y 76,5 para los sistemas sin esterilizar y esterilizado, respectivamente. También se encontró un comportamiento similar con agua milli Q como extracte, con coeficientes de determinación de 82,7 y 71,6, para los sistemas sin esterilizar y esterilizado,

indicando que la adsorción de ibuprofeno por la planta no sería dependiente del pH del sistemas circundante.

En el caso de la extracción con Acetona, el coeficiente de determinación fue de 37,9; lo que indica que el modelo ajustado con este solvente no es bueno para representar la extracción de la planta (Tabla 39).

A pesar que la mejor correlación en el sistema sin esterilizar fue con fostafo, el modelo matemático planteado no es el adecuado, debido a que el test ANOVA multifactorial no dio como significativo el factor correspondiente a la concentración de ibuprofeno (p-value = 0,3741; Tabla 31).

En general, las extracciones con agua y azida de sodio correlacionaron con lo adsorbido por la planta con coeficientes de determinación superiores a un 60%, indicando que con ambos extractantes sería posible estimar el efecto de una contaminación por estos tipos de fármacos sobre la biodisponibilidad en plantas y evaluar la influencia de la incorporación de biosólido en esta, considerando que la extracción con solución acuosa y agitación es un método más rápido que el uso de plantas y que permitiría la realización de un mayor número de análisis en paralelo. Sin embargo, sería necesario realizar un mayor número de estudios considerando suelos de diferentes características para establecerlo como un método que permita predecir el comportamiento en suelos.

V. Conclusiones

En el suelo polpaico no fue detectable la presencia de los antiinflamatorios en estudio, mientras que en el biosólido solo se encontró Naproxeno en una concentración de $0,023 \pm 0,001 \mu\text{g g}^{-1}$.

La incorporación de biosólido sobre los suelos enriquecidos con dosis de 200 y $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AINE's incrementó la cantidad de los antiinflamatorios extraídos por las diferentes soluciones extractantes.

De los fármacos estudiados, Ketoprofeno e Ibuprofeno fueron los antiinflamatorios que presentaron una mayor extracción con las diferentes soluciones extractantes, seguido de Naproxeno y en menor cantidad por Diclofenaco.

Las cantidades de fármacos absorbidos en las plantas de trigo presentaron un comportamiento similar a los obtenidos con los diferentes extractantes, se extrajo mayoritariamente ketoprofeno e ibuprofeno, además, al aumentar la dosis de biosólido aumentó su extracción y biodisponibilidad.

A partir del test de ANOVA Multifactorial, se pudo establecer que tanto la concentración de los AINE's como la dosis de Biosólido agregadas a los sistemas de suelo sin esterilizar y esterilizado, son factores significativos sobre la extracción con las diferentes soluciones extractantes.

La esterilización de los sistemas suelo-biosólido presentó un efecto positivo sobre la extracción de Ketoprofeno, Naproxeno e Ibuprofeno, lo que es atribuible a una disminución de la degradación microbiana, mientras que Diclofenaco no presentó un efecto significativo debido posiblemente a una interacción más fuerte con el suelo, imposibilitando la degradación microbiana.

En general, las extracciones con agua y azida de sodio correlacionaron con lo adsorbido por la planta con coeficientes de determinación superiores a un 60%, indicando que con ambos extractantes sería posible estimar el efecto de una contaminación por estos antiinflamatorios sobre la biodisponibilidad en plantas y evaluar la influencia de la incorporación de biosólido en esta.

La extracción con solución acuosa y agitación es un método más rápido que el uso de plantas, por lo que su uso para estimar la biodisponibilidad permitiría realizar un mayor número de análisis a un menor costo.

VI. Bibliografía.

- ✓ Aguas Andinas. Octubre 2007. Plan de Manejo de Residuos Peligrosos Planta de Tratamiento de Aguas Servidas El Trenal.
- ✓ Ascar L., Ahumada I., López A., Quintanilla F. and Leiva K. 2012. Non steroidal Anti-Inflammatory Drug Determination in Water Samples by HPLC-DAD under Isocratic Conditions. Journal Brazilian Chemical. Society, Vol. 24, No. 7, 1160-1166,
- ✓ Barceló D. 2003. Emerging pollutants in water analysis. Trends in Analytical Chemistry, Volume 22, Pages xiv-xvi.
- ✓ Carballa M., Omil F., Lema J.M., Llompart M, García-Jares C., Rodríguez I., Gómez M., Ternes T. 2004. Behavior of pharmaceuticals, cosmetic and hormones in a sewage treatment plant. Water Research 38, 2918 – 2926.
- ✓ Carey F.A. and Sundberg R.J. 2007. Advanced Organic Chemistry. Parte B: Reactions and Synthesis. Quinta edición. New York. Springer Science + Business Media. Capítulo 10. Pag 950 – 954.
- ✓ Centro de Información de Recursos Naturales. Descripción de Suelos, Materiales y Símbolos. Publicación 115. Región Metropolitana, Ciren CORFO, 1996. Tomo II. Pag 285 – 289.
- ✓ [Chemicalize.org/ketoprofen](http://www.chemicalize.org/ketoprofen)
<<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=ketoprofen&source=fp>>
[Consulta: 1 noviembre 2013]

- ✓ Chemicalize.org/naproxen
<<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=naproxen&source=fp>>
[Consulta: 1 noviembre 2013]

- ✓ Chemicalize.org/diclofenac
<<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=sodium+diclofenac&source=calculate>>
[Consulta: 1 noviembre 2013]

- ✓ Chemicalize.org/ibuprofen
<<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=ibuprofen&source=fp>>
[Consulta: 1 noviembre 2013]

- ✓ Clarke B.O., Smith S.R. 2011. Review of ‘emerging’ organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environment International* 37: 226 – 247.

- ✓ Comisión Nacional del Medio Ambiente - Asociación Chilena de Seguridad (CONAMA - ACHS). Octubre 2001. Guía para el control y prevención de la contaminación industrial. Industria Laboratorios Farmacéuticos.
<<http://www.achs.cl/portal/trabajadores/Capacitacion/Centro%20de%20Fichas/Documentos/control-y-prevencion-de-riesgos-en-laboratorios-farmaceuticos.pdf>>
[Consulta: 1 septiembre 2013]

- ✓ Contreras E. 2009. Biodisponibilidad de metales traza en suelos tratados con distintas dosis de biosólidos. Uso de plantas de *Ballica* como bioindicador. Memoria (Químico). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

- ✓ Díaz-Cruz M.S., García-Galán M.J., Guerra P., Jelic A., Postigo C., Eljarrat E., Farré M., López de Alda M.J., Petrović M., Barceló D. 2009. Analysis of selected emerging contaminants in sewage sludge. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 28, No. 11.
- ✓ European Medicines Agency (EMA). 2004. Guideline on Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products Phase II.
- ✓ European Medicines Agency (EMA). 2006. Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use.
- ✓ Environmental Protection Agency (EPA). Septiembre 2000. Folleto informativo de tecnología de biosólidos. Aplicación de biosólidos al terreno.
- ✓ Eriksen G.S., Amundsen C.E., Bernhoft A., Eggen T., Grave K., Halling-Sørensen B., Källqvist T., Sogn T., Sverdrup L. 2009. Risk assessment of contaminants in sewage sludge applied on Norwegian soils. Pag 141 – 186.
- ✓ Feria M. 2005. Fármacos analgésicos-antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos. Antiartríticos. En: JESÚS FLÓREZ. *Farmacología Humana*. Cuarta Edición. España. Masson, Pag 355-387.
- ✓ 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.
- ✓ Gómez M.J., Petrović M., Fernández-Alba A.R., 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.
- ✓ Jackson M.L. 1970. *Análisis químico de suelos*. Ediciones Omega S. A. Barcelona, España. Pag 1002
- ✓ Lin A., Plumlee M.H., Reinhard M. 2006. Natural attenuation of pharmaceuticals and alkylphenol polyethoxylate metabolites during river transport: Photochemical and biological transformation. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25(6): 1458-1464.
- ✓ Lin K., Gan J. 2011. Sorption and degradation of wastewater-associated non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics in soils. *Chemosphere* 83: 240 – 246.
- ✓ Ministerio del Medio Ambiente. 2011. *Normas de Calidad Ambiental, Normas de Emisión y Planes de Prevención y de Descontaminación*. Pag 260 – 279.
- ✓ Ministerio de Salud. Agosto 2001. *Desechos Hospitalarios: Riesgos Biológicos y recomendaciones generales sobre su manejo*.
<http://www.redsalud.gov.cl/archivos/Evaluacion_tecnologias_salud/calidad_pre_stadores_evaluacion_DesechosHosp.pdf>
[Consulta: 1 septiembre 2013]
- ✓ Ministerio Secretaría General de la Presidencia, Decreto Supremo 004, Enero 2009. *Reglamento para el manejo de lodos generados en plantas de tratamiento de aguas servidas*.

- ✓ Monteiro S.C. and Boxall A. 2010. Occurrence and Fate on Human Pharmaceuticals in the Environment.
- ✓ Organización Mundial de la Salud (OMS). Septiembre 2002. Perspectivas políticas sobre medicamentos de la OMS - Promoción del uso racional de medicamentos: componentes centrales.
- ✓ Petrović M., Gonzales S., Barceló D. 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 22, No. 10.
- ✓ Rámila J., Rojas S. 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.
- ✓ Sadzawka M.A. 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.
- ✓ Ternes T., Bonerz M., Herrmann N., Löffler D., Keller E., Lacida B.B., Alder A.C. 2005. Determination of pharmaceuticals, iodinated contrast media and musk fragrances in sludge by LC/tandem MS and GC/MS. Journal of Chromatography A 1067: 213–223.
- ✓ Waters. 2008 – 2009. Chromatography Columns And Supplies Catalog.

- ✓ Waters. Oasis Sample Extraction Products.
- ✓ Weigel S., Kallenborn R., Hühnersfuss H, 2004. Simultaneous solid-phase extraction of acid, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1024: 183 – 195.

VII. Anexo

Tabla 40: Contenido de metales traza en suelo polpaico y biosólido.

Metal	Polpaico		Biosólido	
	(mg kg ⁻¹)	Desv. Est.	(mg kg ⁻¹)	Desv. Est.
Cr	11,5	5,1	366,685	21,211
Cu	79,9	1,0	629,751	17,770
Ni	20,1	5,6	99,741	1,876
Zn	58,2	15,3	1497,913	19,887

Tabla 41: Áreas de Curvas de calibración para Ketoprofeno en diferentes solventes.

Conc. mg/L	Agua Milli Q	Azida de sodio	KH_2PO_4	Metanol 20%	Acetona 20%	Metanol
0,5	29199	25960	19493	24159	24823	26344
1	45243	49727	44114	50460	50423	51877
2	95278	81143	73858	90820	79980	77345
4	171548	169890	159783	175204	159149	175006
6	270655	291878	271040	252682	237923	227539
Pendiente	43669,63	47384,92	44835,13	41303,36	38255,95	37408,52
Intercepto	4476,58	-4219,69	-7397,27	7145,91	7168,51	10619,18
r	0,9987	0,9942	0,9956	0,9996	0,9993	0,9938

Tabla 42: Áreas de Curvas de calibración para Naproxeno en diferentes solventes.

Conc. mg/L	Agua Milli Q	Azida de sodio	KH_2PO_4	Metanol 20%	Acetona 20%	Metanol
0,5	109074	112835	77379	106050	126324	132086
1	199490	212911	190115	192465	213582	244020
2	435633	349219	322630	397600	367305	353513
4	756757	758669	707166	767741	718829	742711
6	1120267	1288084	1147662	1130876	1069757	965534
Pendiente	182530,1	210687,8	191698,5	187073,7	171469,2	153793,4
Intercepto	31412,9	-24513,6	-28595,7	13847,3	36192,4	72330,4
r	0,9986	0,9947	0,9977	0,9998	0,9998	0,9947

Tabla 43: Áreas de Curvas de calibración para Diclofenaco en diferentes solventes.

Conc. mg/L	Agua Milli Q	Azida de sodio	KH_2PO_4	Metanol 20%	Acetona 20%	Metanol
0,5	37946	34026	20868	32737	38471	42576
1	66392	65270	54484	70254	72441	75351
2	95124	120917	96815	140841	120315	127221
4	267648	267756	240435	269531	240458	272017
6	401592	442142	396780	377096	375406	353967
Pendiente	67801,03	73879,48	68059,45	62729,09	60549,46	58216,08
Intercepto	-9322,40	-13452,41	-21884,1	8723,24	5934,65	17042,96
r	0,9935	0,9971	0,9966	0,9984	0,9988	0,9951

Tabla 44: Áreas de Curvas de calibración para Ibuprofeno en diferentes solventes.

Conc. mg/L	Agua Milli Q	Azida de sodio	KH_2PO_4	Metanol 20%	Acetona 20%	Metanol
0,5	22112	20180	12192	22782	23657	25552
1	39692	43932	40005	39316	46028	43498
2	96251	60702	59833	71984	69401	70221
4	145739	174871	150773	133297	140883	149828
6	254423	273628	249227	224031	229376	214950
Pendiente	40651,83	46573,69	42391,34	35828,94	36596,87	34845,94
Intercepto	1883,45	-11086,3	-12050,6	1543,85	3057,43	6725,74
r	0,9913	0,9932	0,9952	0,9962	0,9962	0,9988

Tabla 45: Porcentajes de extracción de las plantas de trigo en los sistemas suelo-biosólido sin esterilizar.

Biosólido (Mg ha ⁻¹)	AINE's ($\mu\text{g g}^{-1}$ suelo)	Ketoprofeno (%)	Naproxeno (%)	Diclofenaco (%)	Ibuprofeno (%)
0	0,2	0,55	0,26	0,43	0,75
100	0,2	0,72	0,31	0,60	0,81
200	0,2	0,97	0,46	0,62	1,14
0	0,4	0,41	0,32	0,30	0,35
100	0,4	0,45	0,48	0,30	0,52
200	0,4	0,67	0,62	0,39	0,80

Tabla 46: Porcentajes de extracción de las plantas de trigo en los sistemas suelo-biosólido esterilizado.

Biosólido (Mg ha ⁻¹)	AINE's (µg g ⁻¹ suelo)	Ketoprofeno (%)	Naproxeno (%)	Diclofenaco (%)	Ibuprofeno (%)
0	0,2	0,54	0,50	0,58	0,79
100	0,2	0,96	0,67	0,73	0,98
200	0,2	1,47	0,69	0,79	1,29
0	0,4	0,50	0,30	0,41	0,56
100	0,4	1,33	0,46	0,43	0,67
200	0,4	2,39	0,76	0,59	0,85