

UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DOCTORADO EN QUÍMICA



**MICROEXTRACCIÓN POR SORCIÓN CON DISCO ROTATORIO
(RDSE) DE FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO
ESTEROIDALES (AINES) DESDE MUESTRAS ACUOSAS**

Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado de Doctora en Química

Por:

VALENTINA ANDREA MANZO SANDOVAL

Director de tesis

DR. PABLO RICHTER

Co-directora

DRA. MARÍA LORETO ASCAR

SANTIAGO - CHILE

2015

**UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por la candidata:

VALENTINA ANDREA MANZO SANDOVAL

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctora en Química, en el examen de defensa de Tesis rendida el día.....de.....de 2015.

Directores de Tesis:

Dr. Pablo Richter _____

Dra. María Loreto Ascar _____

Comisión Informante:

Dr. Edwar Fuentes (Presidente) _____

Dra. Tatiana Garrido _____

Dra. Verónica Arancibia _____

Dr. Carlos Peña _____

“Bajo la piel de la oruga, late la mariposa, paciente pero curiosa. Pero no basta un paso adelante, es necesario un salto. Poco antes de saltar, es posible que aun no percibamos nuestras alas, que aparecerán un segundo después de habernos lanzado”

AGRADECIMIENTOS

Que complejo comenzar a escribir estos últimos párrafos que cierran una etapa de cuatro años y medio. Una etapa que comenzó dejando atrás planes y sueños para dar inicio a otros, tal vez más ambiciosas, individuales o egoístas. Hoy miro atrás y comprendo que las decisiones tomadas me han hecho una mejor persona, no solo en el ámbito profesional sino también en el personal.

Muchas cosas quedaron durante este camino pero fueron muchas más las que se sumaron. El tiempo ha pasado volando y eso significa que estaba haciendo lo que me gustaba y que disfruté al máximo mientras lo hacía. Dejo los malos ratos en párrafos pasados y avanza conmigo todo lo bueno que me entregó esta etapa.

Agradezco a mi madre, Marcela, por su infinito e incondicional amor, por su preocupación constante y paciencia, por enseñarme desde pequeña a ser responsable, estudiosa, perseverante y ordenada, cualidades que han sido claves para mi desarrollo profesional. Por creer en mis capacidades ciegamente y luchar siempre para que mi hermana y yo alcancemos nuestros sueños y seamos felices. También quiero agradecer a mi padre, Mauricio por su esfuerzo y trabajo para que nunca nos falte nada, por ser un papá que da todo por sus hijas y hacerme sentir siempre lo orgulloso que está por mis logros. A mi hermana, Claudia por sus sonrisas, sus abrazos, su preocupación por mí, por esa capacidad de hacerme olvidar todos los problemas, por ser mi motor, mi energía, mi luz, simplemente porque no hay amor más puro que el que me entregas cada día.

Quiero agradecer también a mi Nona, a mi tía abuela Anita, mis tías Ceci, Tati y padrino Toto por apoyarme en todo momento, por cuidar de mi mamá y hermana cuando estoy lejos, por todo el cariño y la confianza, por inculcarme valores como la lealtad, honestidad y compromiso.

A mi amiga de la vida, Macarena, cuantas historias, cuanta confianza, más de 15 años de amistad, de complicidad, respeto y de felicidad por los logros de cada una. Te agradezco por ser mi psicóloga personal, por dejarme ser parte de tu vida en todo momento y por el amor que tus hijas me entregan.

A mis amigas de la universidad, Cami, Clau, Rommi y Carlita, sin ustedes no hubiese sido lo mismo. Innumerables horas de estudio acompañadas de risas sin parar y a ratos de llanto sin control, nos hicieron formar un lazo único, firme, sólido, un enlace químico indestructible. A ti Italo, por ser el mejor amigo y confidente, por aguantarme, quererme como soy sin juzgar y ser tan igual a mí que parece que me mirará en un espejo. A mis amigas cómplices de locuras, viajes, salidas nocturnas, Fonchita y Nene, por estar conmigo siempre, apoyarme en todo, por acompañarnos entre las tres en momentos difíciles y dejarme entrar en sus corazones. También a mis amigas de laboratorio, Yanina, Orielle, Karen y mi amigo Luis, por recibirme tan bien cuando no conocía a nadie en la Chile y estaba recién partiendo esta etapa, han sido una de las partes buenas del doctorado, hicieron las horas de trabajo mucho más entretenidas. A todos ustedes amigos, gracias por estar, los adoro!

A los profesores del laboratorio, profesora Inés y Loreto, por recibirme con los brazos abiertos cuando comencé a ser parte del grupo de trabajo, en especial a mi tutor profesor Pablo, por confiar en mí sin conocerme, apostar por nuestro trabajo juntos y enseñarme todo lo que he aprendido en esta etapa. Por comprometerse conmigo y darme consejos para ser una mejor investigadora, incentivándome para ampliar mis posibilidades y lograr mis objetivos.

Al laboratorio FI-TRACE de la Universidad de las Islas Baleares, en Palma de Mallorca, dirigido por el profesor Manuel Miró por recibirme durante mi pasantía doctoral de cuatro meses, en especial a María por ser mi compañera y amiga durante ese proceso.

A los profesores miembros de la comisión evaluadora, por ser un aporte con sus críticas constructivas e ideas para lograr un trabajo de tesis completo y con un buen nivel de productividad.

A CONICYT por otorgarme las Becas Nacional de Doctorado en Chile, Apoyo de Tesis Doctoral y de Pasantía en el extranjero.

A quienes trabajan en CEPEDQ, laboratorios y administrativos de la facultad por su buena disposición cuando necesité alguna ayuda o servicio de su parte.

Finalmente, a mi compañera de horas de estudio, lectura de publicaciones y trabajo desde casa, por acostarte sobre mis libros y apuntes, siempre a mi lado o encima del computador, escuchando mis ensayos de avances de tesis y presentaciones a congresos, haciéndome compañía fielmente hasta la hora de irnos a dormir. Gracias por tus ronroneos y cariños mi pequeña Milú.

PUBLICACIONES

- ★ Valentina Manzo, Orielle Navarro, Luis Honda, Karen Sánchez, María Inés Toral, Pablo Richter. ***Determination of crystal violet in water by direct solid phase spectrophotometry after rotating disk sorptive extraction.*** Talanta 106 (2013) 305 – 308.

- ★ Valentina Manzo, Luis Honda, Orielle Navarro, Loreto Ascar, Pablo Richter. ***Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from waste water samples by rotating-disk sorptive extraction.*** Talanta 128 (2014) 486 – 492.

- ★ Valentina Manzo, Manuel Miró, Pablo Richter. ***Programmable flow-based dynamic sorptive microextraction exploiting an octadecyl chemically modified rotating disk extraction system for the determination of acidic drugs in urine.*** Journal of Chromatography A. 1368 (2014) 64 – 69.

- ★ Valentina Manzo, Karla Ulisse, Inés Rodríguez, Eduardo Pereira, Pablo Richter. ***Molecular imprinted polymer as sorptive phase immobilized in a rotating disk extraction device. Determination of diclofenac and mefenamic acid in wastewater.*** Analytica Chimica Acta. 889 (2015) 130 – 137.

PARTICIPACION EN CONGRESOS

2011 Determinación de cristal violeta en aguas mediante extracción por sorción en disco rotatorio y espectrofotometría en fase sólida. Valentina Manzo, Orielle Navarro, Luis Honda, Karen Sánchez, M. Inés Toral, Pablo Richter. XXIX Jornadas Chilenas de Química. Linares, Termas de Quinamávida, Chile.

2012 Diferentes fases sorbentes inmovilizadas sobre un disco rotatorio para la microextracción de anti-inflamatorios no esteroidales presentes en aguas. Valentina Manzo, Orielle Navarro, Luis Honda, Loreto Ascar, Pablo Richter. XI Encuentro de Química Analítica y Ambiental, Antofagasta, Chile.

2012 Extracción de diversos contaminantes emergentes desde agua utilizando un sistema de microextracción con disco rotatorio. Pablo Richter, Lourdes Jachero, Valentina Manzo, Orielle Navarro, Luis Honda, Marcela Valenzuela, Inés Ahumada, Loreto Ascar. 30º Congreso Latinoamericano de Química – CLAQ, Cancún, México.

2012 Microextracción por sorción con disco rotatorio (RDSE) de ketoprofeno, naproxeno y diclofenaco desde muestras acuosas y su determinación por HPLC-DAD. Valentina Manzo, Orielle Navarro, Luis Honda, Loreto Ascar, Pablo Richter. 5to Congreso Iberoamericano de Química Analítica – CIAQA, Montevideo, Uruguay.

2012 Determinación de antiinflamatorios no esteroidales en muestras acuosas. Valentina Manzo, Orielle Navarro, Luis Honda, Loreto Ascar, Pablo Richter. 2do Congreso de Ciencia Joven, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

2013 Polímeros de impresión molecular (MIPs) inmovilizados sobre un disco rotatorio para la microextracción de antiinflamatorios en aguas. Valentina Manzo, Karla Ulisse, Eduardo Pereira, Gabriela Rodríguez, Pablo Richter. XXX Jornadas Chilenas de Química, Pucón, Chile.

2013 Rotating-disk sorptive microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from water samples and their determination by gas chromatography-mass spectrometry. Valentina Manzo, Pablo Richter. XVII EUROANALYSIS, Varsovia, Polonia.

2014 Microextracción por sorción con disco rotatorio basado en un flujo dinámico programable usando fase sorbente de octadecilo químicamente modificado para la determinación de drogas ácidas en orina. Valentina Manzo, Manuel Miró, Pablo Richter. Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines – COLACRO, Cartagena de Indias, Colombia.

2014 Polímeros de impresión molecular (MIPs) utilizados como fase sorbente en microextracción por sorción con disco rotatorio de antiinflamatorios en aguas. Valentina Manzo, Karla Ulisse, Eduardo Pereira, Gabriela Rodríguez, Pablo Richter. VII Congreso Iberoamericano de Física y Química Ambiental, XII Encuentro de Química Analítica y Ambiental, Viña del Mar, Chile.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE FIGURAS	xii
ÍNDICE TABLAS	xiv
ABREVIATURAS	xvi
RESUMEN	xviii
SUMMARY	xxi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
2.1 Hipótesis	21
2.2 Objetivo General	21
2.3 Objetivos específicos	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 Materiales	23
3.2 Reactivos	23
3.3 Equipos	24
3.4 Metodología	25
3.4.1. Selección de analitos	25
3.4.2. Preparación de estándares	25
3.4.2.1. Curva de calibración	26
3.4.2.2. Estándar para enriquecimiento de muestras	26
3.4.3. Optimización cromatográfica para la separación y cuantificación de los analitos por HPLC-DAD	26
3.4.3.1. Preparación de fosfato diácido de potasio 50 mM	26
3.4.3.2. Preparación fase móvil	27
3.4.3.3. Implementación y optimización de la separación cromatográfica por HPLC-DAD	27
3.4.3.4. Curva de calibración	27
3.4.4. Sistema de extracción RDSE	28
3.4.4.1. Fases de extracción	28
3.4.4.1.1. Polidimetilsiloxano (PDMS)	28
3.4.4.1.2. Octadecil C18	28

3.4.4.1.3.	OASIS® HLB	28
3.4.4.1.4.	Polímeros de impresión molecular MIPs	29
3.4.4.2.	Extracción de los analitos	29
3.4.4.3.	Oprimización del proceso de extracción por RDSE	29
3.4.4.3.1.	Variables químicas	29
	a) pH	29
	b) Fuerza iónica	30
	c) Cantidad de metanol	30
	d) Disolvente y tiempo de desorción	30
3.4.4.3.2.	Variables hidrodinámicas	30
	a) Velocidad de agitación	30
	b) Perfil de extracción y volumen de muestra	30
3.4.5	Validación del método analítico	31
3.4.5.1.	Curva de calibración	31
3.4.5.2.	Sensibilidad	31
3.4.5.3.	Precisión	31
3.4.5.4.	Exactitud	32
3.4.5.5.	Límite de detección del método	32
3.4.5.6.	Límite de cuantificación del método	32
3.4.5.7.	Análisis de muestra real por HPLC-DAD	33
3.4.6.	Optimización cromatográfica para la separación y cuantificación de los analitos por GC-MS	33
3.4.6.1	Derivatización	33
3.4.6.2.	Condiciones cromatográficas	34
3.4.6.3.	Implementación y optimización de la separación cromatográfica por CG-MS (SIM).	34
3.4.7.	Validación del método analítico	34
3.4.7.1.	Análisis de muestra real por GC-MS	34
3.4.8.	Automatización	35
3.4.8.1.	Validación del método analítico	35
3.4.8.2.	Análisis de muestra real por sistema automático	35

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1 Optimización cromatográfica para la separación y cuantificación de los analitos por HPLC-DAD	37
4.1.1. Condiciones cromatográficas e identificación de los analitos por HPLC-DAD	37
4.1.2. Curvas de calibración	39
4.2. Estudio de fases sorbentes	40
4.3. Optimización del proceso de extracción por RDSE	43
4.3.1. Fuerza iónica	43
4.3.2. Efecto de adición de metanol	44
4.3.3. Efecto del pH	46
4.3.4. Proceso de desorción	47
4.3.5. Velocidad de rotación	49
4.3.6. Perfil de extracción y volumen de muestra	50
4.3.7. Validación del método analítico por HPLC	52
4.3.7.1. Parámetros analíticos del método	52
4.3.7.2. Análisis de muestra real	53
4.4. Optimización cromatográfica para la separación y cuantificación de los analitos por GC-MS	56
4.4.1. Proceso de derivatización	56
4.4.2. Condiciones cromatográficas e identificación de los analitos por GC-MS	59
4.4.3. Curva de calibración	60
4.4.4. Validación del método analítico	62
4.4.4.1. Parámetros analíticos del método	62
4.4.4.2. Análisis de muestra real	63
4.5. Comparación del método de extracción RDSE con Extracción en fase sólida (SPE).	67
4.6. Mips como fase sorbente alternativa	69
4.6.1. Validación del método analítico usando MIP	71
4.6.2. Análisis de muestra real	72
4.7. Automatización	74

4.7.1. Selección de la fase sorbente para SI-RDSE	76
4.7.2. Estudio de variables experimentales	76
4.7.3. Parámetros analíticos	78
4.7.4. Determinación de AINEs en muestra real de orina	80
5. CONCLUSIÓN	82
6. REFERENCIAS	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes de un ciclo de agua cerrado (parcialmente) con reutilización indirecta de agua potable	3
Figura 2. Ruta de transformación de los productos farmacéuticos (PPs) (CO: compuesto original, M: metabolitos, PT: producto de transformación, PTAS: planta de tratamiento de aguas servidas.	5
Figura 3. Estructura química de AINEs considerados en este estudio	6
Figura 4. Diagrama disco rotatorio	11
Figura 5. Disminución de la capa estacionaria de agua por el aumento en la agitación	12
Figura 6. Efecto de la velocidad de rotación en la extracción de NP	13
Figura 7. Efecto del tiempo de extracción de NP	13
Figura 8. Proceso de polimerización del MIP	14
Figura 9. Cromatograma de AINEs obtenido del HPLC-DAD a una concentración de 2 mgL^{-1} para cada compuesto. Fase móvil 50/50 acetonitrilo/fosfato, flujo 1 mLmin^{-1}	38
Figura 10. Espectros de absorción UV de los analitos en estudio	39
Figura 11. Curvas de calibración de los AINEs en estudio, por HPLC-DAD.	40
Figura 12. Fases sorbentes utilizadas en el estudio de extracción de AINEs. a) PDMS; b) C18; c) disco con cavidad y Oasis® HLB	41
Figura 13. Fases sorbentes utilizadas en la extracción de AINEs en un tiempo de 120 min, determinado por HPLC-DAD.	41
Figura 14. Efecto de la fuerza iónica en la extracción de AINEs, determinado por HPLC-DAD.	43
Figura 15. Efecto de la adición de metanol en la extracción de AINEs, determinado por HPLC-DAD	45
Figura 16. Efecto del pH en la extracción de AINEs, determinado por HPLC-DAD	46
Figura 17. (a): Fase Oasis® HLB en su forma protonada. (b): Fase Oasis® HLB en su forma deprotonada.	47
Figura 18. Efecto de la desorción en el proceso de extracción de AINEs	48

*MeOH: metanol, *Acet.: acetato de etilo (desorciones sucesivas),
determinado por HPLC-DAD.

Figura 19. Efecto de la velocidad de rotación en la extracción de AINEs, determinado por HPLC-DAD.	49
Figura 20. Perfil de extracción de AINEs en 50 mL de muestra, determinado por HPLC-DAD.	50
Figura 21. Perfil de extracción de AINEs en 100 mL de muestra, determinado por HPLC-DAD.	51
Figura 22. Cromatograma obtenido de la muestra PS1-A y espectros de absorción de ketoprofeno, naproxeno e ibuprofeno por HPLC-DAD	54
Figura 23. Cromatograma obtenido de la muestra PS1-A enriquecida con $10 \mu\text{gL}^{-1}$ de cada compuesto por HPLC-DAD.	55
Figura 24. Carta pareto y grafica de interacciones para AINEs en estudio.	58
Figura 25. Cromatograma correspondiente a un multiestándar de 2mgL^{-1} de AINEs, por GC-MS.	59
Figura 26. Curva de calibración de los AINEs en estudio, determinado por GC-MS	61
Figura 27. Cromatograma obtenido de la muestra PS1-A por GC-MS	64
Figura 28. Cromatograma obtenido de la muestra PS2-A por GC-MS	65
Figura 29. A: Cromatograma obtenido de la muestra PS1-E por GC-MS. B: Cromatograma obtenido de la muestra PS1-E por GC-MS enriquecido con 2mgL^{-1} de multiestándar de fármacos.	66
Figura 30. Selección de los analitos afines con la plantilla del MIP	70
Figura 31. Reutilización de la fase sorbente MIP, determinado por GC-MS	71
Figura 32. Descripción esquemática del sistema automático de microextracción por sorción con disco rotatorio basado en un flujo dinámico para la microextracción de AINEs en orina (SI-RDSE)	74
Figura 33. Factor de enriquecimiento (FE) para diferentes volúmenes de muestra. Flujo 1mL min^{-1} , 1mg L^{-1} de fármacos (cuatro réplicas).	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contaminantes emergentes	1
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los AINEs en estudio.	6
Tabla 3. Estructuras químicas de los sorbentes utilizados	15
Tabla 4. Parámetros obtenidos de las curvas de calibración, por HPLC-DAD	40
Tabla 5. Porcentajes de recuperación (%) de AINEs en diferentes fases sorbentes, determinados por HPLC-DAD.	42
Tabla 6. Parámetros analíticos del método, determinados por HPLC-DAD.	53
Tabla 7. Concentración determinada de AINEs en muestra PS1-A	55
Tabla 8. Factores que afectan el proceso de derivatización	57
Tabla 9. Tiempo de retención e iones m/z seleccionados para cada analito, mediante GC-MS	60
Tabla 10. Parámetros obtenidos de las curvas de calibración, determinados por GC-MS	61
Tabla 11. Parámetros analíticos del método, determinados por GC-MS.	63
Tabla 12. Concentración determinada de fármacos en muestra PS1-A por GC-MS y su comparación por HPLC-DAD.	64
Tabla 13. Concentración determinada de fármacos en muestra PS2-A por GC-MS	65
Tabla 14. Concentración determinadas de fármacos en muestra PS1-E	67
Tabla 15. Concentración determinadas de fármacos en muestra real (afluente y efluente) PS1-A y PS1-E, mediante SPE y su comparación con RDSE.	68
Tabla 16. Variables en estudio con fase MIP	69
Tabla 17. Parámetros analíticos del método usando MIP	72
Tabla 18. Concentración de fármacos en agua de la planta de tratamiento determinadas mediante RDSE y SPE.	72
Tabla 19. Etapas del procedimiento de extracción dinámico programable (SI-RDSE)	75
Tabla 20. Eficiencia de extracción del procedimiento dinámico SI-RDSE con fases sorbentes de diferente naturaleza fisicoquímica.	76
Tabla 21. Eficiencia de extracción y reproducibilidad para la determinación de	78

AINEs (0.2 mg L^{-1}) en agua desionizada a pH 2.

Tabla 22. Eficiencia de extracción y reproducibilidad para la determinación de AINEs (0.2 mg L^{-1}) en orina a pH 2. 79

Tabla 23. Parámetros analíticos del método SI-RDSE en orina 79

Tabla 24. Análisis de muestras de orina mediante SI-RDSE después de la administración oral de ibuprofeno y diclofenaco (n=4) 81

ABREVIATURAS

PTAS	: Planta de tratamiento de aguas servidas
AINEs	: Antiinflamatorios no esteroidales
PPs	: Productos farmacéuticos
CO	: Compuesto original
M	: Metabolitos
PT	: Productos de transformación
PM	: Peso molecular
pKa	: Constante de disociación ácida
LogKow	: Logaritmo del coeficiente de partición octanol agua
PAHs	: Hidrocarburos policíclicos aromáticos
SPME	: Microextracción en fase sólida
HPLC	: Cromatografía líquida de alta eficiencia
PDMS	: Polidimetilsiloxano
PDMS-DVB	: Polidimetilsiloxano-divinilbenceno
PA	: Poliacrilato
SBSE	: Extracción por sorción en barra de agitación
RDSE	: Extracción por sorción con disco rotatorio
NP	: Nonilfenol
C18	: Octadecil C18
MIPs	: Polímeros de impresión molecular
MISPE	: Extracción en fase sólida con impresión molecular
HPLC-MS	: Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas
HPLC-DAD	: Cromatografía de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos
GC-MS	: Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas
MSTFA	: N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida
BSTFA	: N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida
MTBSTFA	: N-metil-N-tert-butildimetilsilil trifluoroacetamida
TMSD	: Trimetilsilildiazometano

SPE	: Extracción en fase sólida
SIA	: Análisis por inyección secuencial
HLB	: Balance hidrofílico lipofílico
SI-RDSE	: Sistema dinámico de extracción por sorción con disco rotatorio acoplado a inyección secuencial
LD	: Límite de detección
LC	: Límite de cuantificación
PS1-A	: Planta Santiago 1 Afluente
PS2-A	: Planta Santiago 2 Afluente
PS1-E	: Planta Santiago 1 Efluente
RSD	: Desviación estándar relativa
HCB	: Hexaclorobenceno (estándar interno)
FENO	: Fenoprop (estándar surrogate)
MECLO	: Ácido meclofenámico (estándar surrogate)
RDSE-MIP	: Extracción por sorción con disco rotatorio con fase sorbente de polímeros de impresión molecular
SPE-MIP	: Extracción en fase sólida con polímeros de impresión molecular

RESUMEN

En las últimas dos décadas, los contaminantes orgánicos persistentes y los metales pesados eran el foco de interés y considerados como contaminantes prioritarios, por lo cual eran parte de programas de seguimiento intensivo. Hoy en día la emisión de contaminantes “emergentes” se ha convertido en un problema medioambiental y existe un consenso en que se puede requerir la intervención de legislación respecto a su utilización. Estos contaminantes se derivan principalmente de productos utilizados en grandes cantidades en la vida cotidiana, tales como productos farmacéuticos de uso humano, veterinario, de cuidado personal, plastificantes y aditivos industriales. La característica de estos contaminantes es que no necesitan ser persistentes en el medioambiente para causar efectos negativos, ya que su alta transformación y tasa de retiro puede ser compensada con su introducción continua al medio ambiente.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) se encuentran entre los fármacos más frecuentemente detectados en el medioambiente. Debido a su hidrofiliidad y estabilidad, tienden a permanecer en la fase acuosa y no son totalmente eliminados por las plantas de tratamiento de aguas servidas, y por consecuencia, entran al medio acuático y son detectados en aguas superficiales.

En este trabajo se realizó un estudio sobre la extracción de seis fármacos entre ellos ácido salicílico, ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, ácido mefenámico y diclofenaco, desde muestras acuosas mediante el método de microextracción por sorción en disco rotatorio (RDSE) modificado con una cavidad central que permite la incorporación de la fase Oasis®HLB, la cual se cubre con un papel filtro y se soporta con un anillo de teflón para evitar la pérdida de fase. Los analitos son retenidos y pre-concentrados en la fase sorbente inmovilizada sobre el disco, posteriormente son desorbidos con un pequeño volumen de disolvente, derivatizados y determinados por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Las condiciones optimizadas de extracción fueron una agitación a 3000 rpm por un tiempo de 90-100 minutos, volumen de muestra de 50 mL ajustado a pH 2 y 60 mg de fase Oasis®HLB dentro de la cavidad del disco. La desorción de los compuestos se realizó con dos adiciones de 5 mL de metanol por 10 minutos cada una, posteriormente se evaporó con nitrógeno a sequedad y se reconstituyó con 0,5 mL de acetato de etilo.

El extracto final se derivatizó con 20 μL de N-metil-N-tert-butildimetilsilil-trifluoroacetamida (MTBSTFA) por una hora a 60°C y se determinaron los analitos por GC-MS. Además se incorporaron dos estándares subrogantes (fenoprop y ácido meclofenámico) y un estándar interno (hexaclorobenceno).

Los porcentajes de recuperación en una muestra acuosa enriquecida con $20 \mu\text{gL}^{-1}$ de fármacos estuvieron en el intervalo de $71-104\% \pm 2-8\%$ y los límites de detección y cuantificación entre $1-33 \text{ ngL}^{-1}$ y $3-109 \text{ ngL}^{-1}$, respectivamente.

El método descrito fue aplicado para el análisis de afluentes y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales de Santiago, Chile. La concentración de fármacos detectados estuvo entre $1,5$ y $13,4 \mu\text{gL}^{-1}$ y $1,0-3,2 \mu\text{gL}^{-1}$ en el afluente y efluentes, respectivamente. Las muestras fueron analizadas mediante extracción en fase sólida (SPE) y no se observaron diferencias significativas en la determinación de la concentración de la mayoría de los AINEs, indicando que el sistema RDSE es un método alternativo para la preparación de muestras acuosas.

Alternativamente a la fase HLB se estudio la fase basada en polímeros de impresión molecular (MIP) para el análisis de aguas residuales. El MIP se sintetiza a partir del monómero (1-vinilimidazol), el agente entrecruzante (divinilbenceno) y la plantilla difenilamina. Paralelamente se lleva a cabo la misma síntesis sin la molécula plantilla (NIP) con fines comparativos.

Se observó que bajo las mismas condiciones, el MIP extrae significativamente más AINEs que contienen la difenilamina en su estructura (o parte de ella) que el NIP. Las mayores diferencias significativas entre MIP y NIP se observaron para diclofenaco y ácido mefenámico, indicando claramente el efecto de la plantilla en la extracción.

Las recuperaciones del método fueron entre $100-112\% \pm 5-6\%$, con límites de detección entre $60-223 \text{ ngL}^{-1}$. En el análisis de aguas residuales de la planta de tratamiento de Santiago, se obtuvo concentraciones de fármacos entre $1,6-4,3 \mu\text{g L}^{-1}$ en el afluente y de $1,4-3,3 \mu\text{gL}^{-1}$ en el efluente.

Finalmente, considerando que en los últimos años las técnicas de extracción se han enfocado en lograr avances en cuanto a la automatización, miniaturización y simplificación de las metodologías de extracción, se propone un nuevo enfoque automático de microextracción por sorción con disco rotatorio (RDSE) combinado con

un sistema en flujo programable basado en el análisis por inyección secuencial (SIA) para la limpieza y preconcentración de especies orgánicas de baja polaridad en muestras de orina (AINEs) y su determinación por cromatografía líquida (LC). La fase de extracción utilizada fue octadecil C18.

Se demostró que la película de C18 puede ser reutilizable durante al menos 15 extracciones consecutivas en orina, sin necesidad de reemplazar la fase o cambiar el disco rotatorio. Las recuperaciones relativas de AINEs en orina oscilaron entre 101 y 106 % utilizando una curva de calibración en matriz, con una eficiencia de extracción de 30-38% y con factores de enriquecimiento de aproximadamente 17 en 10 mL de muestra de orina y RSD entre 3 y 6 %. Los límites de detección del método de extracción en línea oscilaron entre 0.02 y 0.04 mg L⁻¹. Además, se determinaron AINEs en muestras de orina de personas que recibieron la administración oral de ibuprofeno y diclofenaco, lo que indica una metodología eficaz para la limpieza de orina y análisis de drogas ácidas a niveles biológicamente relevantes.

SUMMARY

Over the past two decades, persistent organic pollutants and heavy metals were the primary focus of environmental monitoring. Consequently, the decontamination policies applied by industrialized nations have resulted in drastic reductions of their environmental concentrations.

Today, the “emerging” or “new” unregulated contaminants have become an environmental concern. These compounds are mainly derived from products used in large quantities in everyday life, such as pharmaceuticals from human use, veterinary products, personal care products, industrial plasticizers and additives.

Emerging pollutants do not need to be persistent in the environment to cause negative effects because their high transformation and removal rates can be compensated by their continuous introduction into the environment.

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are among the drugs most frequently detected in the environment. Due to its hydrophilicity and stability they tend to remain in water phase and are not completely eliminated by the wastewater treatment plants (WWTP), causing consequently pollution of surface waters.

The extraction of six NSAIDs, including salicylic acid, ibuprofen, naproxen, ketoprofen, mefenamic acid and diclofenac from water samples by rotating-disk sorptive microextraction (RDSE) has been studied in this work. The extraction disk device was modified compared with the traditional disk configuration. In this case, the disk contains a central cavity which allows the incorporation of a powdered sorbent phase (Oasis® HLB in this case). The phase in the cavity is covered with a filter paper and sealed with a Teflon ring to prevent phase leakage from the cavity. The analytes were extracted from water and pre-concentrated on the sorbent phase immobilized on the disc and after to reach the extraction equilibrium, the analytes were desorbed with solvent, derivatized and determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

The optimal conditions for the extraction were the use of 60 mg of Oasis® HLB as sorbent, a rotational disk velocity of 3000 rpm, pH 2, sample volume of 50 mL and extraction time of 90-100 min. Desorption of the compounds was performed with two additions of 5 mL of methanol (10 min each). The extract was evaporated to dryness with N₂, re-dissolved with 0.5 mL of ethyl acetate and derivatized with 20 µL of

MTBSTFA for one hour at 60 ° C. NSAIDs were determined by GC-MS in SIM mode. Two surrogate standards were included for quantification (fenprop and meclofenamic acid) and internal standard (hexachlorobenzene).

The recoveries ranged from 71 to 104% with relative standard derivations (RSD) between 2 and 8%. The detection limits ranged from 1 to 33 ngL⁻¹, and the quantification limits ranged from 3 to 109 ngL⁻¹.

The described method was applied to the analysis of influents and effluents from wastewater treatment plants (WWTP) in Santiago, Chile. The concentrations of the detected drugs ranged from 1,5 to 13,4 µg L⁻¹ and from 1,0 to 3,2 µg L⁻¹ in the influents and effluents, respectively. The samples were extracted also by solid phase extraction (SPE) as comparative sample preparation technique. No significant differences were observed in the determined concentrations from most of the NSAIDs, indicating that RDSE is an alternative method from the preparation of water samples.

Alternatively to the HLB phase, were studied molecularly imprinted polymers (MIP) as sorptive phase to analyze wastewater samples. The MIP was synthesized from the monomer 1-vinylimidazol (VI) together with the cross-linker divinylbenzene (DVB) using diphenylamine as the template molecule. In parallel, nonmolecularly imprinted polymer (NIP) was also synthesized for comparison. It was observed that under the same conditions, MIP extracted significantly more NSAIDs containing diphenylamine (or part of this molecule) in their structure than NIP. Higher significant differences between MIP and NIP were observed for diclofenac, mefenamic acid and paracetamol, clearly indicating the effect of the template on the extraction.

Recoveries of the method were between 100-112%, with relative standard deviations of 5- 6%. The limits of detection were between 60 and 223 ngL⁻¹. Water samples from a wastewater treatment plant (WWTP) of Santiago de Chile were found to contain concentrations of these acidic drugs between 1.6 and 4.3 µgL⁻¹ and between 1.4 and 3.3 µgL⁻¹ in the influent and effluent, respectively.

Finally, considering that in recent years the extraction techniques have been focused on achieving advances in automation, miniaturization and simplification of methodologies of extraction, a novel automatic sorptive microextraction approach combining sequential injection-based programmable flow with rotating disk sorptive extraction (RDSE) was

proposed for the clean-up and concentration of low polarity organic species in urine samples (NSAIDs) and they were further determined by liquid chromatographic (LC) assays. The extracting phase consisted of octadecyl (C18). The thin-film extracting phase was demonstrated to be reusable for at least 15 consecutive extractions in urine without removing or changing the disk. The relative recoveries of the NSAIDs in urine ranged from 101 to 106% using a matrix-matched calibration curve, with extraction efficiencies of 30–38% using a dynamic regime, an enrichment factor of approximately 17 for 10 mL sample and relative standard deviations (RSD) between 3 and 6%. The detection limits of the in-line sample preparation method coupled to LC-UV detection ranged from 0.02 to 0.04 mg L⁻¹. Using NSAID monitored in urine from individuals who received oral administration of ibuprofen and diclofenac, the automatic sample handling method was proven to be efficient for urine clean-up and the determination of acidic drugs at biologically relevant levels.

1. INTRODUCCIÓN

Hasta principios de la década de 1990, los contaminantes orgánicos persistentes y los metales pesados eran el foco de interés y considerados como contaminantes prioritarios, por lo cual eran parte de programas de seguimiento intensivo. Hoy en día, en los países industrializados, se ha logrado una drástica reducción de las emisiones de este tipo de compuestos a través de la adopción de políticas de descontaminación y la eliminación de las principales fuentes de contaminación.

Sin embargo la emisión de contaminantes “emergentes” o “nuevos” no regulados se ha convertido en un problema del medio ambiente y existe un consenso en que este tipo de contaminantes puede requerir la intervención de legislación respecto a su utilización. Este grupo de contaminantes se deriva principalmente de productos utilizados en grandes cantidades en la vida cotidiana, tales como productos farmacéuticos de uso humano, productos veterinarios, de cuidado personal, plastificantes y aditivos industriales ^(1,2)

En la Tabla 1 presenta diferentes compuestos considerados contaminantes emergentes ^(1,2).

Tabla 1. Contaminantes emergentes

Contaminantes emergentes	
Clase de compuestos	Ejemplo
Productos farmacéuticos	
Antibióticos	Eritromicina, amoxicilina, cloritromicina
Analgésicos, antiinflamatorios	Ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, ketoprofeno
Antiepilépticos	Carbamazepina
Esteroides y hormonas	Estradiol, etinilestradiol, estrona
Citostáticos	Ciclofosfamida, bleomicina
Medicamentos psiquiátricos	Diazepam
Reguladores de lípidos	Bezafibrate, ácido clofíbrico, ácido fenofíbrico
β Bloqueantes	Metoprolol, propanolol, timolol
Medios contraste rayos X	Iopromide, iopamidol, diatrizoato
Drogas	Cocaína, opiáceos, cannabinoides, anfetaminas, éxtasis, metadona
Productos de cuidado personal	
Perfumes	Musks nitro
Protectores solares	Benzofenona N,N-dietiltoluamida

Repelentes de insectos	
Antisépticos	Triclosan, clorofeno
Aditivos y agentes industriales	Sulfonatos aromáticos
Aditivos de la gasolina	Dialquil éteres, Metil-t-butil éter (MTBE)
Nanomateriales	Fullereno

La característica de estos contaminantes es que no necesitan ser persistentes en el medio ambiente para causar efectos negativos, ya que su alta transformación y tasa de retiro puede ser compensada con su introducción continua al medio ambiente. Los productos farmacéuticos pueden llegar a éste a través de flujos primarios, es decir, aquellos que van directamente desde la fuente de contaminación a cuerpos de agua y flujos secundarios, los que son descargados a un medio distinto y por un proceso posterior se incorporan al medio acuático. Las fuentes de contaminación de estos fármacos, como se muestra en la Figura 1, son mediante la excreción por humanos y animales en su forma nativa o como metabolitos, también la disposición de medicamentos vencidos o en desuso, tanto por hospitales como en domicilios particulares, incluso descargas directas de plantas manufactureras, pueden ser inapropiadamente dispuestas a sistemas de alcantarillado, llegando a las plantas de tratamientos de aguas servidas (PTAS), donde el proceso de depuración es poco eficiente para la remoción de estos productos. La mayoría de las PTAS no están diseñadas para el tratamiento de este tipo de sustancias y una gran parte de compuestos emergentes y sus metabolitos puede escapar de la eliminación en las PTAS y entrar al medio acuático ⁽¹⁾.

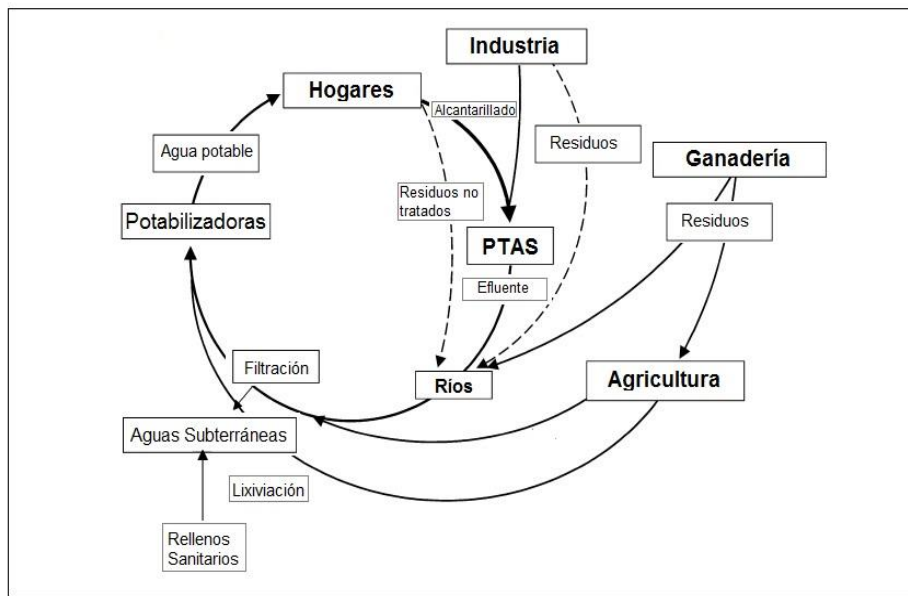


Figura 1. Componentes de un ciclo de agua cerrado (parcialmente) con reutilización indirecta de agua potable ⁽¹⁾.

De acuerdo a la información disponible en literatura se han detectado concentraciones para este tipo de compuestos que van de los ngL^{-1} a los μgL^{-1} y además de ser encontrados en ríos y agua de mar, estudios recientes han demostrado que pueden incluso entrar en el agua potable a niveles trazas (ngL^{-1}), producida a partir de aguas subterráneas ⁽³⁾. Aunque los niveles de contaminación son mucho menores que otros contaminantes y falta información detallada de sus efectos toxicológicos, el uso cada vez mayor de productos farmacéuticos se está convirtiendo en un problema ambiental de gran relevancia.

Los medicamentos están diseñados para tener una ruta y una acción específica, tanto en los seres humanos, como en los animales, pero poseen también efectos secundarios indeseables. Aunque el conocimiento actual sobre la ecotoxicidad de los medicamentos en el medio ambiente es insuficiente, existen datos sobre la toxicidad aguda de los productos farmacéuticos. En un estudio reciente se ha investigado sobre el efecto de estos compuestos en animales acuáticos y se ha comprobado que generan daños celulares al material genético de los organismos, muchos de estos constituyen los

primeros eslabones de las cadenas tróficas o nutritivas (gusanos de agua, pulgas, carpas). De acuerdo a experimentos desarrollados donde se exponen a especies acuáticas a concentraciones relevantes de diclofenaco, se ha concluido que éste fármaco daña las enzimas que protegen las células contra el estrés oxidativo, genera daños neurotóxicos y alteraciones endocrinas ⁽⁴⁾. Es por ello, la importancia de la evaluación de los potenciales efectos perjudiciales sobre especies que pueden ser vulnerables a la continua descarga de fármacos a los ecosistemas.

En los últimos años, se han dirigido los esfuerzos a realizar una evaluación más completa sobre el riesgo que los productos farmacéuticos, presentes en el medio ambiente, puedan representar para los seres vivos. Todos estos antecedentes indican que es necesaria una regulación futura de estos compuestos. Algunos fármacos están siendo considerados por la agencia de protección ambiental (EPA) como posibles candidatos a ser incluidos en la lista de contaminantes orgánicos prioritarios en agua potable, como es el caso del diclofenaco ⁽⁵⁾.

Las drogas antiinflamatorias no esteroideas (AINEs) se encuentran entre los fármacos más frecuentemente detectados en el medio ambiente y corresponden a un grupo de compuestos farmacéuticos ampliamente utilizados en el cuidado de la salud humana y animales. A pesar de la gran variación en su estructura, los AINES comparten un mecanismo común actuando como antipiréticos, antiinflamatorios y analgésicos aliviando la hinchazón y dolor. Los AINEs son compuestos ácidos con un pKa en un rango de 3-5 y después de su administración son metabolizados y excretados como una mezcla de compuesto inicial y metabolitos ^(6,7), como podemos observar en el esquema de la Figura 2 ⁽⁸⁾.

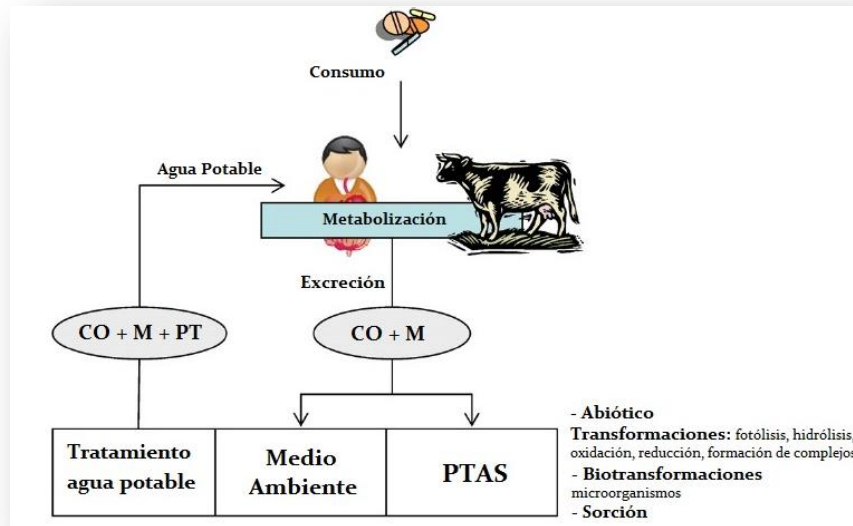


Figura 2. Ruta de transformación de los productos farmacéuticos (PPs) (CO: compuesto original, M: metabolitos, PT: producto de transformación, PTAS: planta de tratamiento de aguas servidas).

Por ejemplo, para el caso del ibuprofeno, uno de los fármacos antiinflamatorio más ampliamente utilizado en el mundo, sólo el 15% del fármaco ingerido es excretado por los seres humanos como el compuesto original, el 26% se excreta como hidroxibuprofeno y el 43% como carboxi-ibuprofeno ⁽⁹⁾.

Debido a su hidrofiliidad y estabilidad, los AINEs tienden a permanecer en la fase acuosa y no son totalmente eliminados por las plantas de tratamiento de aguas (PTAS), por consecuencia, ellos y sus metabolitos son frecuentemente detectados en las aguas superficiales. Se han determinado concentraciones de hasta $1,5 \mu\text{gL}^{-1}$ para el naproxeno y de $85 \mu\text{gL}^{-1}$ para el ibuprofeno ⁽¹⁰⁾. En algunos efluentes de (PTAS) se ha detectado diclofenaco con baja eficiencia de remoción (entre un 15 y 69%), reportado por varios investigadores ⁽¹¹⁻¹⁴⁾.

Los compuestos investigados en este proyecto corresponden a seis fármacos antiinflamatorios no esteroideos, considerados contaminantes emergentes: ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, diclofenaco, ácido acetilsalicílico (como ácido salicílico

mayoritariamente) y ácido mefenámico. Todos estos compuestos son derivados de ácidos carboxílicos aromáticos como se puede ver en sus estructuras químicas presentadas en la Figura 3.

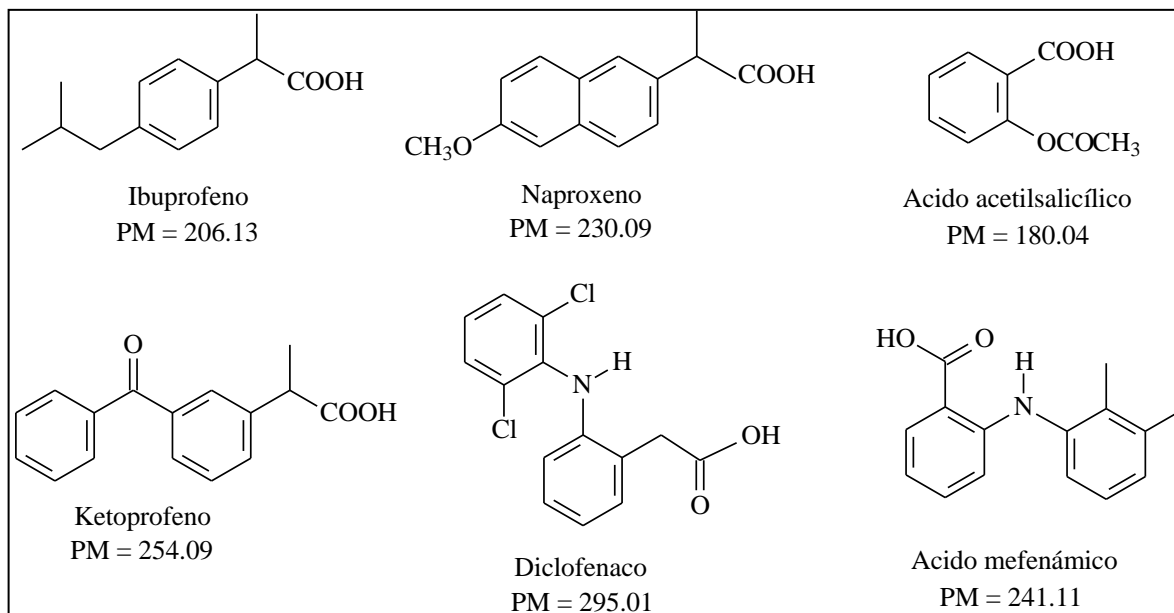


Figura 3. Estructura química de AINEs considerados en este estudio

Sus propiedades fisicoquímicas se pueden observar en la Tabla 2 ^(9, 15-19)

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los AINEs en estudio.

Propiedades	Ibuprofeno	Ketoprofeno	Naproxeno	Diclofenaco	Ácido Acetilsalicílico	Ácido Mefenámico
Constante de disociación (pK _a)	4,91	4,45	4,15	4,15	3,04	4,20
LogK _{ow}	3,97	3,12	3,18	4,51	1,20	5,12
Solubilidad en agua (mg/L a 25°C)	21,0	51,0	15,9	2,3	4,6	20,0
Constante de Henry (atm m ³ mol ⁻¹ a 25°C)	1,50x10 ⁻⁷	3,39x10 ⁻¹⁰	2,12x10 ⁻¹¹	4,73x10 ⁻¹²	1,30x10 ⁻⁹	1,65x10 ⁻⁸

Los fármacos señalados en la Tabla 2 son compuestos ácidos con una constante de disociación (pK_a) entre 3 y 5. Todos estos fármacos, excepto el ácido acetilsalicílico, muestran un logK_{ow} entre 3 y 5, lo que indica que son compuestos de baja polaridad,

pese a eso, se puede observar que son relativamente solubles en agua. Aunque en general se ha determinado que existe una relación inversa entre la solubilidad en agua y el logKow ⁽²⁰⁾, en este grupo de compuestos estudiados no se observa una buena correlación entre ambas propiedades. Si bien se han establecido correlaciones altamente significativas entre la solubilidad en agua y el logKow para una familia de congéneres, como por ejemplo para el caso de los PAHs, cuando la comparación se extiende sobre compuestos de diferente estructura molecular, esta correlación se ve disminuida, es decir, no necesariamente se da una relación inversa entre los dos parámetros ⁽²⁰⁾. Además, se debe considerar que los analitos en estudio son compuestos ionizables, y en solución acuosa se encuentran mayoritariamente ionizados, lo cual favorece su solubilidad en agua pese a ser compuestos de baja polaridad. Además se pueden observar en la Tabla 2 las constantes de la ley de Henry, siendo estas muy bajas, con valores de orden de magnitud entre 10^{-7} y 10^{-12} , lo que indica que estos compuestos se mantienen fijos en la solución acuosa, es decir, tienen una baja presión de vapor y no son volátiles ⁽²⁰⁾. Esta característica favorecería la extracción de los fármacos sin pérdidas significativas por evaporación durante el proceso de preparación de muestra.

La química analítica se define como una ciencia metrológica cuyo principal objetivo es generar información cuantitativa, cualitativa y/o estructural de calidad de cualquier sistema u objeto ⁽²¹⁾ a partir de un problema analítico (problema económico, social, científico). En este plano, el desarrollo de métodos para la medición de la concentración de contaminantes orgánicos, como los AINEs, en matrices medioambientales es un objetivo de esta disciplina de la química. Desde este punto de vista, es posible distinguir dos estrategias de preparación de muestras para analitos orgánicos tanto para muestras líquidas como sólidas, las cuales pueden ser aplicadas dependiendo del nivel de información requerida para poder resolver el problema analítico.

- Extracción completa o total: donde es obligatorio aplicar metodologías de alta eficiencia y reproducibilidad, la cual permitiría romper todas las interacciones analito-matriz, para la transferencia cuantitativa de los analitos a la fase de

extracción. Esta información es normalmente necesaria en estudios regulatorios o para la evaluación de riesgo, teniendo en cuenta el enfoque que considera la situación del peor escenario.

- Extracción de la fracción disponible, que corresponde a la cantidad de analito que afecta directamente al medio ambiente o a la biota (y finalmente al ser humano). La fracción biodisponible de un contaminante se define ⁽²²⁾ como la fracción que se desorbe fácilmente de la partículas, por lo que queda accesible para los organismos bentónicos o para biodegradación. La biodisponibilidad se asocia generalmente con los procedimientos de extracción diseñados para imitar la desorción rápida de las fracciones contaminantes que están levemente enlazadas a la matriz.

En este contexto el objetivo de este proyecto es estudiar y desarrollar métodos de extracción rápidos y eficientes de AINEs presentes en matrices acuosas, tomando en cuenta la preparación de muestras basadas en la extracción completa o total, mencionada anteriormente, la cual se discute a continuación de forma detallada.

Extracción total o cuantitativa de los analitos desde matrices acuosas:

La extracción líquido-líquido ha sido ampliamente usada para la extracción de compuestos orgánicos desde matrices acuosas, siendo esta una técnica versátil y relativamente eficiente. Sin embargo este método de extracción conlleva el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos tóxicos, además de etapas de “clean up” o limpieza y etapas de evaporación para disminuir los límites de detección. Por otra parte, la posibilidad de formación de emulsiones en el proceso de extracción de muestras complejas puede dificultar la automatización de la metodología. Por estas razones, actualmente la extracción líquido-líquido se considera como una técnica contaminante, lenta, de funcionamiento tedioso y de múltiples etapas ⁽²³⁾.

Para superar estos inconvenientes, las nuevas estrategias de la química analítica moderna se han centrado en la reducción del uso de disolventes orgánicos (química analítica verde), además de mejorar en lo posible la etapa de preconcentración del

analito, evitando etapas de evaporación del disolvente. En este plano se han descrito recientemente técnicas de microextracción como se describen a continuación:

- I) Microextracción líquido-líquido en vial ⁽²⁴⁻²⁷⁾: Este tipo de extracción líquido-líquido se realiza en un frasco muestreador automático, seguido por centrifugación para la separación de las fases y posterior inyección de un volumen del extracto.
- II) Microextracción en una sola gota ⁽²⁸⁾: la fase de preconcentración es una micro-gota de un disolvente orgánico inmiscible en agua, suspendida sobre una solución acuosa que contiene los analitos de interés.
- III) Microextracción por membrana ⁽²⁹⁾: las técnicas basadas en membranas se pueden dividir en dos categorías: técnicas de membrana porosa, donde ambas soluciones están en contacto físico mediante los poros de una membrana; y las técnicas de membranas no porosas, donde la membrana forma una fase separada entre las soluciones.
- IV) Microextracción dispersiva líquido-líquido ⁽³⁰⁾: Esta técnica se basa en la microextracción líquido-líquido, utilizando una mínima cantidad de disolventes. En este método, una apropiada mezcla de disolvente de extracción y disolvente dispersor se inyecta en la muestra acuosa mediante una jeringa, rápidamente. La mezcla se agita suavemente y se forma una solución turbia. El método es simple, rápido, bajo costo, con altas recuperaciones y bajo uso de disolventes.

El año 1989 ⁽³¹⁾ comenzó el desarrollo de la micro-extracción en fase sólida (SPME), la cual hoy en día es una técnica de extracción ampliamente consolidada y comercializada en el mundo entero. Esta técnica presenta una ventaja considerable; es una técnica *solvent-free*, es decir no utiliza disolventes orgánicos, aunque en determinadas aplicaciones en HPLC se usa desorción en línea con disolvente. La SPME permite la preconcentración de los analitos mediante la exposición de una fibra de sílice fundida recubierta con una película de polidimetilsiloxano (PDMS) u otro sorbente apropiado, en

la muestra (o en el espacio cabeza de ésta) por un tiempo determinado. Luego la desorción del analito, se realiza normalmente mediante desorción térmica directamente en el inyector de un cromatógrafo de gases, el cual es utilizado para el posterior análisis de la muestra. Se han descrito diversos sorbentes para su uso en SPME como polidimetilsiloxano (PDMS) (para analitos de baja polaridad), polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB) (para analitos semi-polares) y poliacrilato (PA) (para analitos polares). La fase polimérica de PDMS se usa preferentemente para el análisis de compuestos apolares, aunque también se ha descrito su uso para compuestos polares ⁽³²⁾. La evolución de SPME en el último tiempo ha sido notable, para mejorar la capacidad de esta técnica se han propuesto diferentes polímeros y de espesor variable ⁽³³⁾.

Se ha descrito que uno de los inconvenientes de SPME es la pequeña cantidad de PDMS que se usa como recubrimiento (alrededor de 0,5 μL). Recientemente para mejorar su eficiencia se ha propuesto aumentar el volumen de PDMS, informándose nuevas técnicas como la extracción por sorción en barra de agitación (SBSE) ⁽³⁴⁾, extracción mediante vara de PDMS (Silicon rod) ⁽³⁵⁾ y microextracción en una fina película de PDMS ^(36,37).

En SBSE, una barra de agitación de vidrio se recubre con una capa de 50-300 μL de PDMS, favoreciendo con esto el equilibrio de partición PDMS-agua, y alcanzando al menos una sensibilidad 100 veces mayor que SPME. Esta técnica permite la extracción cuantitativa de analitos con K_{OW} mayor que 500 ⁽³⁸⁾. Recientemente se han descrito una serie de aplicaciones para SBSE que incluyen pesticidas en agua y alimento ^(39,40), alquifeno ^(41,42), hidrocarburos aromáticos policíclicos ⁽⁴³⁾, entre otras. Un problema asociado a esta técnica de sorción es que el aumento de la velocidad de agitación puede causar daño físico en la fase debido al contacto directo de la barra con el fondo del vial de extracción ⁽⁴⁰⁾. Por otra parte, la barra tiene que ser manipulada entre el procedimiento de sorción y de desorción.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestro grupo de trabajo ha desarrollado una nueva técnica de microextracción para contaminantes de baja polaridad que consiste en el uso de un disco rotatorio de teflón recubierto con una película de PDMS en una de sus superficies ^(44,45) como se muestra en la Figura 4. Esta técnica lleva el nombre de “Extracción por sorción mediante disco rotatorio” (RDSE). El disco tiene una fase con una alta razón superficie/volumen, y puede ser aún mayor la agitación y velocidad con respecto a la barra de agitación utilizada en SBSE, sin dañar la fase, ya que ésta solo está en contacto con la muestra y no con el fondo el vial. Por lo tanto, una mayor velocidad de agitación facilita la transferencia de masa de analito desde el seno de la solución hacia la superficie de PDMS.

Por otra parte cuando se selecciona un disolvente para la desorción, en vez de la alternativa térmica, la geometría de rotación del disco permitiría su utilización en un sistema de flujo continuo, evitando la manipulación del disco mientras se lleva a cabo los pasos de extracción-desorción.

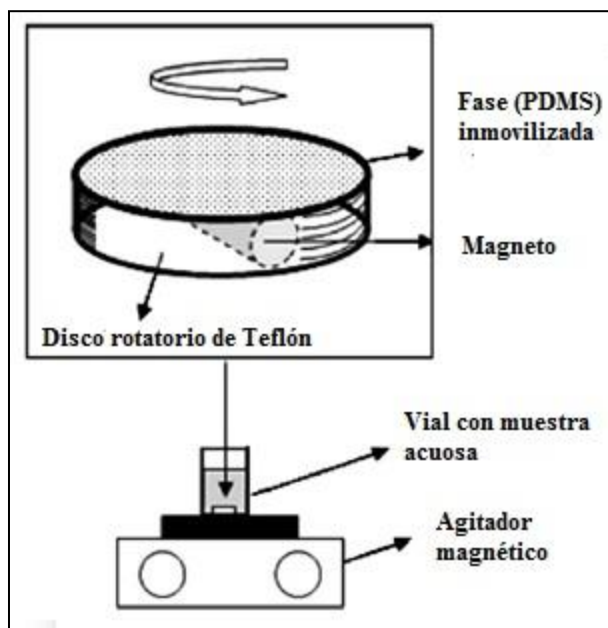


Figura 4. Diagrama disco rotatorio ⁽⁴⁴⁾

La metodología RDSE se aplicó en un principio para la preconcentración de pesticidas usados en Chile a partir de muestras de agua ⁽⁴⁴⁾ y para el contaminante emergente nonilfenol (NP) ⁽⁴⁵⁾, en ambos casos se usó un disco en el cual una de sus superficies

contenía PDMS. Posteriormente fue utilizado también para los contaminantes verde malaquita ⁽⁴⁶⁾ y cristal violeta ⁽⁴⁷⁾. Algunos aspectos teóricos de la capacidad de sorción de PDMS se describen a continuación:

De acuerdo con la siguiente Ecuación, descrita previamente para SPME ⁽³¹⁾:

$$\text{Recuperación} = \frac{K_{ow} / \beta}{\left(1 + \frac{K_{ow}}{\beta}\right)} \quad (1)$$

donde β corresponde a la relación de volumen entre el agua y la fase de PDMS, los compuestos con baja polaridad ($K_{OW} > 400$) deberían ser extraídos cuantitativamente en PDMS a partir de muestras acuosas. Sin embargo, en el caso de los alquifenoles ($\log K_{OW} > 5$), cuando la extracción se realiza en el disco con PDMS, bajo condiciones de flujo continuo, a un caudal de muestra de 1 mL/min, la extracción no es mayor que un 21%. Esta baja recuperación indica que a pesar que la extracción es favorable desde un punto de vista termodinámico, ésta tiene una clara connotación cinética, dado que la transferencia de masa de analito a la fase de PDMS es el paso determinante para la extracción. Observaciones anteriores con respecto a la partición entre PDMS y agua sugieren que la transferencia de masa de compuestos orgánicos de baja polaridad no es solo limitada por la difusión interna en el PDMS, sino que también por la difusión en la capa de agua estacionaria que se forma sobre el disco ⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾.

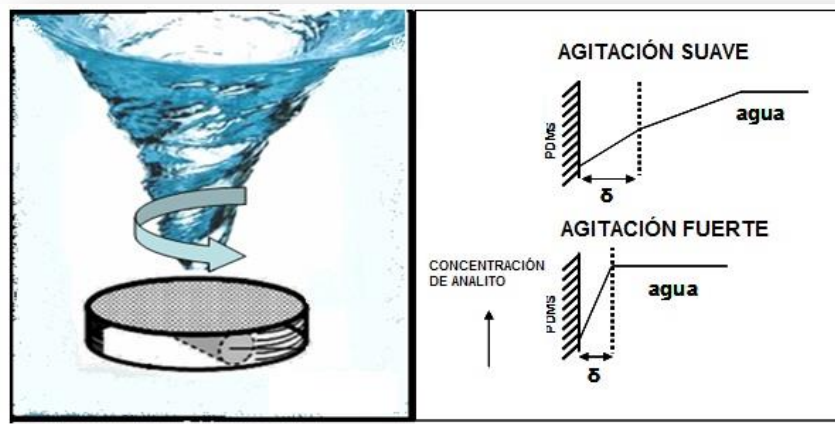


Figura 5. Disminución de la capa estacionaria de agua por el aumento en la agitación

En este contexto, la velocidad de agitación es uno de los factores más importantes para una sorción eficiente en este tipo de extracción en fase sólida. Es bien sabido que a mayor velocidad de agitación (flujo turbulento) el espesor de la capa estacionaria disminuye, lo que facilita el transporte de masas desde el seno de la solución a la fase de extracción, como se observa en la Figura 5 ⁽⁴⁵⁾, que con el incremento de la velocidad de rotación del disco aumenta significativamente la cantidad de analito extraído.

Así el efecto de la disminución de la capa estacionaria y su relación con el tiempo de equilibrio (t_e) entre los analitos de la muestra y la fase de PDMS puede ser teóricamente entendida mediante la siguiente Ecuación, previamente descrita para SPME ^(36,37):

$$t_e = \frac{3 \cdot \delta \cdot K_d \cdot P_t}{D} \quad (2)$$

donde δ es el espesor de la capa estacionaria; D es el coeficiente de difusión de la solución; t_e , el tiempo de equilibrio; K_d el coeficiente de distribución del analito entre la fase de PDMS y la solución y P_t es el espesor de la fase de PDMS. En consecuencia, mediante el aumento de la velocidad de rotación, se reduce la capa de agua estacionaria facilitando la extracción y por consiguiente el tiempo de equilibrio disminuye.

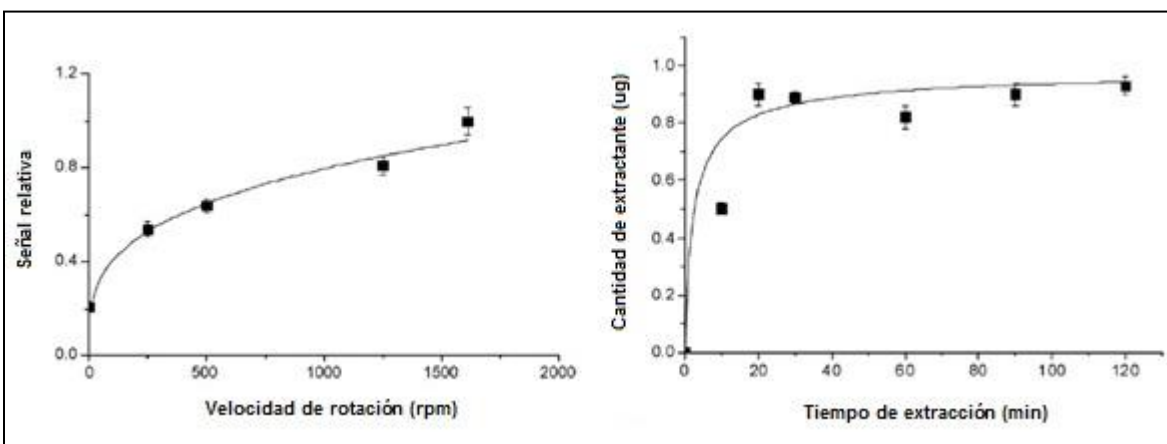


Figura 6. Efecto de la velocidad de rotación en la extracción de NP

Figura 7. Efecto del tiempo de extracción de NP

En la Figura 6 se muestra el efecto en la velocidad de rotación en la extracción de NP y en la Figura 7 se muestra el perfil del tiempo de extracción de 4-NP, obtenidos a una velocidad de rotación de 1250 rpm ⁽⁴⁵⁾. Como se puede observar, en estas condiciones la cantidad de analito aumenta de forma concomitante con el tiempo de extracción, alcanzando el equilibrio en aproximadamente 20 minutos. A pesar de que este tiempo de equilibrio alcanzado mediante el disco es menor en comparación con estudios previos usando SBSE ⁽⁴²⁾, este aún es demasiado largo (20 minutos) como para considerar el procesamiento de la muestra en flujo continuo como alternativa.

De acuerdo a lo planteado anteriormente, el primer aspecto que se investigará en este proyecto es la factibilidad de desarrollar un método cuantitativo para la determinación de AINEs desde matrices acuosas, involucrando la extracción/preconcentración de estos analitos en un dispositivo de disco rotatorio que contiene una fase inmobilizada. A su vez, se estudiarán diferentes fases adheridas al disco rotatorio. Las fases en estudio contemplan polidimetilsiloxano (PDMS), octadecil C18 y Oasis® HLB.

Una fase alternativa a las mencionadas anteriormente son los polímeros de impresión molecular (MIPs) que se sintetizan a partir de un proceso de polimerización donde el monómero funcional y un agente entrecruzante copolimerizan en presencia de una molécula plantilla, que genera una cavidad que actúa como molde (Fig. 8) ^(51,52). La capacidad de reconocimiento molecular hacen de los MIPs excelentes candidatos para su uso en microextracción en fase sólida, denominada extracción en fase sólida molecularmente impresa (*molecularly imprinted solid-phase extraction*) (MISPE) ⁽⁵¹⁾. Esta técnica ha sido aplicada para la extracción de compuestos desde matrices complejas tales como agua, suelo, alimentos, plantas, tabaco, etc. ⁽⁵²⁾.

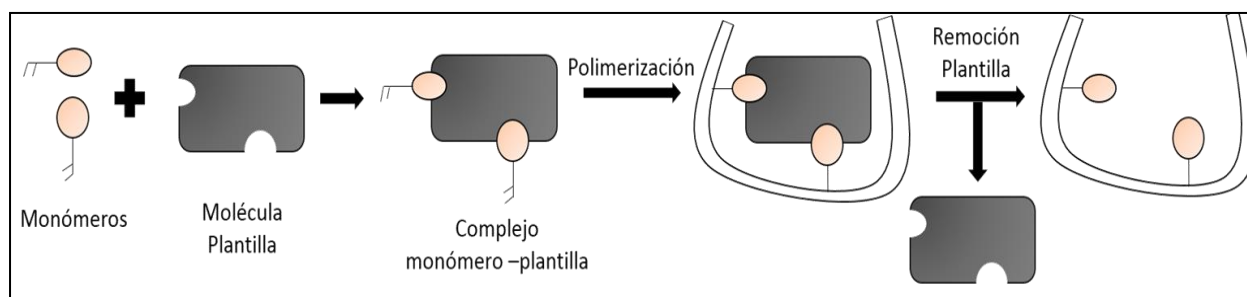
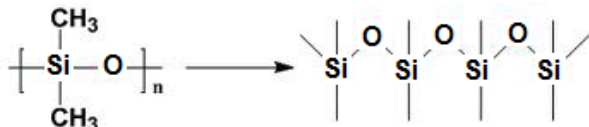
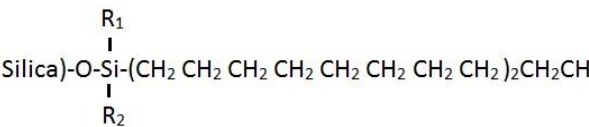
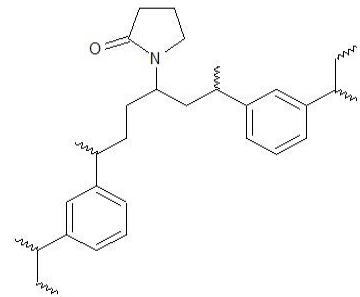
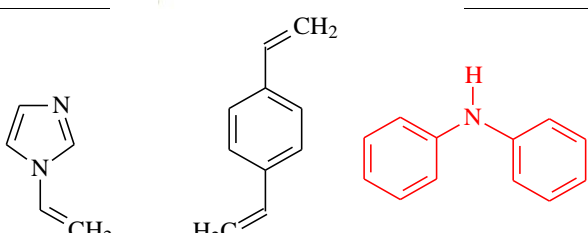


Figura 8. Proceso de polimerización del MIP

Se han publicado varios trabajos de extracción de AINEs, ocupando como fase sorbente el MIP dispuesto en cartuchos de SPE, en su mayoría usando el mismo fármaco como molécula plantilla y 2-vinilpiridina o 4-vinilpiridina como monómero en la polimerización del MIP ⁽⁵³⁻⁵⁸⁾.

En la Tabla 3 se muestran las estructuras químicas de las fases sorbentes.

Tabla 3. Estructuras químicas de los sorbentes utilizados

Fases inmovilizadas	Estructura
Polidimetilsiloxano (PDMS)	
Octadecil (C18)	
Oasis® HLB	
Polímeros de impresión molecular (MIPs)	 <p>(a) 1-vinilimidazol (b) divinilbenceno (c) difenilamina</p>

El PDMS es una fase polimérica que pertenece al grupo de compuestos orgánicos de silicio que se conoce comúnmente como siliconas. El PDMS es ópticamente transparente y es considerado inerte, no tóxico y no inflamable. La fase polimérica de

PDMS extrae preferente analitos no polares a pesar de que se han informado recuperaciones cuantitativas de compuestos polares ⁽³²⁾.

El PDMS es sintetizado y posteriormente cortado con el mismo diámetro que posee el disco rotatorio, adhiriéndose a él con una cinta doble contacto, permitiendo la extracción principalmente por absorción de analitos apolares.

Por su parte, la fase C18 es un adsorbente que ha sido utilizado ampliamente para extraer analitos de baja polaridad en matrices líquidas complejas, utilizando dispositivos de tipo cartucho y filtros. Esta fase está estructurada por una superficie de sílice a la que se une un grupo octadecilo (C18), proporcionando interacciones apolares, para la extracción de los analitos de baja polaridad ⁽⁵⁹⁾.

El octadecil C18 se comercializa como discos de papel de un diámetro de 47 mm. Estos se pueden cortar fácilmente del diámetro del disco rotatorio y adherirlo con cinta doble contacto para realizar la extracción. Al igual que el PDMS, esta fase extraería por adsorción principalmente los analitos apolares.

En este plano, de acuerdo a los valores de logKow de los compuestos estudiados (ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, diclofenaco y ácido mefenámico), se esperaría una buena eficiencia de extracción para este tipo de compuestos en ambas fases sorbentes.

La tercera fase en estudio corresponde al Oasis® HLB, un sorbente de fase reversa con balance hidrofílico - lipofílico para todos los compuestos (por ejemplo, profármaco y sus metabolitos polares). También ha sido utilizado bastante para extracción en fase sólida. Este soporte orgánico presenta cadenas hidrocarbonadas y anillos bencénicos que le proporciona características lipofílicas, y un grupo lactama que otorga características hidrofílicas al sorbente ⁽⁶⁰⁾.

El Oasis® HLB es un polvo amarillo que se podría introducir en un disco rotatorio adaptado con una cavidad central para ser utilizado como fase sorbente en esta técnica. La principal característica de esta fase es que logra extraer por adsorción

compuestos apolares y polares, la cual permitiría la extracción de ambos tipos de analitos ⁽⁶¹⁾, siendo probablemente la fase más adecuada para extraer los seis fármacos de interés por su carácter hidrofílico - lipofílico.

Los MIPs son sintetizados a partir del monómero 1-vinilimidazol con el agente entrecruzante divinilbenceno y la plantilla de difenilamina. Luego de la polimerización, la plantilla es removida de la red polimérica dejando sitios selectivos que logran extraer las moléculas con estructura igual o similar a la plantilla utilizada. El MIPs resultante es estable a diferentes pH, temperatura y solventes ^(51,52). Por lo tanto, considerando la estructura de la plantilla usada, los analitos que mejor se lograrían extraer en esta fase serían diclofenaco y ácido mefenámico.

Una vez que se han logrado extraer/preconcentrar los analitos de interés a través de RDSE será posible su determinación y cuantificación mediante cromatografía líquida y gaseosa.

Para la determinación de productos farmacéuticos en aguas residuales se requieren técnicas precisas y sensibles que permitan cuantificar estos compuestos presentes en el medio acuático. La cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) se ha utilizado para determinar compuestos farmacéuticos en matrices acuosas ^(9,18). Sin embargo, cuando se analizan muestras muy contaminadas, tales como aguas residuales, puede afectar la ionización de la muestra, por lo que se requiere un proceso riguroso de limpieza. Además otra desventaja de esta metodología es el alto costo que implica contar con dicho equipo. Una alternativa es el uso de la cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) ⁽⁶¹⁾.

Se propone implementar y validar una metodología analítica que permite determinar estos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en muestras acuosas reales de la región metropolitana, mediante el empleo de cromatografía líquida de alta resolución con arreglo de diodos (HPLC-DAD), utilizando como metodología de extracción la

microextracción por sorción con disco rotatorio (RDSE) con diferentes fases inmovilizadas, al menos en la etapa de optimización de las variables química e hidrodinámicas que afectan la extracción de los analitos. Esta técnica de determinación permitirá identificar los compuestos en estudio y cuantificar la eficiencia de extracción con el sistema RDSE optimizado.

En comparación con la cromatografía gaseosa, la cromatografía líquida permite determinar analitos polares sin la necesidad de una derivatización previa de la muestra. Esta ventaja es particularmente atractiva cuando se quiere analizar simultáneamente compuestos que pertenecen a diferentes grupos y que no son volátiles o semi volátiles, como ocurre en el presente estudio ⁽⁶²⁾.

Para el análisis de muestras reales, debido a la presencia de eventuales interferencias, se hace necesario contar adicionalmente con una técnica sensible y selectiva que permita la cuantificación y confirmación de los analitos de interés, por lo cual sería preciso el uso de la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Para la determinación de AINEs por cromatografía gaseosa es necesario realizar un paso previo, que consiste en un proceso de derivatización de los analitos. La derivatización consiste en la modificación química de un compuesto para obtener otro con propiedades más adecuadas para el procedimiento analítico utilizado ⁽⁶³⁾. Resulta una herramienta analítica que puede usarse para ofrecer selectividad y sensibilidad.

El análisis directo puede resultar difícil si los compuestos interaccionan entre sí o con la columna. Estas interacciones pueden causar una resolución pobre y/o picos asimétricos que causan una integración y cuantificación difícil o poco práctica. Esta interferencia puede reducirse con la conversión a productos derivados ⁽⁶⁴⁾. Los compuestos que coeluyen puede separarse muchas veces usando los métodos de derivatización adecuados.

Para el caso del análisis por GC-MS una de las principales razones para el empleo de la derivatización analítica para cromatografía gaseosa, es transformar un compuesto no volátil en uno volátil. Los compuestos que contienen grupos funcionales con hidrógenos activos (-COOH, -OH, -NH y -SH) se suelen derivatizar antes de su análisis por cromatografía de gases. La sililación, acilación y la alquilación son las técnicas de derivatización usadas para alterar estos grupos funcionales mejorando sus características térmicas y cromatográficas ⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾.

Los AINEs han sido derivatizados principalmente por reacciones de sililación, debido al grupo OH presente en sus estructuras (Figura 2), para convertirlos en compuestos volátiles que pueden ser detectados por cromatografía gaseosa. Los agentes derivatizantes más utilizados son: N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) ⁽¹⁵⁾, N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) ⁽⁶⁷⁾, N-metil-N-tert-butildimetilsilil-trifluoroacetamida (MTBSTFA) ⁽⁶⁸⁾ y trimetilsilildiazometano (TMSD) ⁽⁶⁹⁾.

Para el caso de los AINEs existen estudios utilizando como agente derivatizante MSTFA, posterior a la extracción de los analitos presentes en sedimentos y clean-up de la muestra. Luego de ser derivatizados, los fármacos son analizados por GC-MS ⁽¹⁵⁾. Se ha utilizado también MTBSTFA ⁽⁶⁸⁾ como agente derivatizante para la identificación y cuantificación de AINEs presentes en aguas residuales donde el proceso de derivatización se realizó posterior a la extracción de los analitos por extracción en fase sólida (SPE) ⁽⁶⁷⁾.

Se pretende entonces implementar el proceso de derivatización de los analitos en estudio posterior a la extracción por RDSE, utilizando un agente derivatizante adecuado y posteriormente validar un método cromatográfico que permita su identificación y cuantificación por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.

Finalmente, considerando que en los últimos 15 años las técnicas de extracción se han enfocado en lograr avances en cuanto a la automatización, miniaturización y simplificación de las metodologías de extracción ⁽⁷⁰⁾, y las ventajas de RDSE ya mencionadas, se propone un nuevo enfoque automático de microextracción por sorción

con disco rotatorio (RDSE) combinado con un sistema en flujo programable basado en el análisis por inyección secuencial (SIA) ⁽⁷¹⁾ para la limpieza y preconcentración de especies orgánicas en muestras de orina, el cual se denomina SI-RDSE.

La segunda generación de inyección en flujo, denominada análisis por inyección secuencial (SIA) ⁽⁷¹⁾ se caracteriza por estar totalmente controlada por un software fácil de usar que permite un preciso control de una bomba de micro-jeringa como conducto líquido para la sincronización exacta y la medición de micro-volúmenes de muestra, estándares, reactivos y eluyentes involucrados en el proceso de RDSE automático y miniaturizado.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

“Teniendo en consideración las propiedades fisicoquímicas de los AINEs sería factible extraerlos desde diferentes muestras líquidas, utilizando un dispositivo RDSE, con distintas fases sorbentes afines con los analitos”

“La plataforma de extracción RDSE se podría automatizar a través de un sistema SIA y de esta forma mejorar los parámetros analíticos del método”

“Los AINEs estarían presentes al nivel de μgL^{-1} en aguas residuales de la Región metropolitana, tanto en los afluentes como en los efluentes de plantas de tratamiento de aguas”

2.2. Objetivo General

- ✓ Desarrollar un método analítico para determinar la concentración de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) presentes en muestras acuosas, mediante el uso de RDSE para la extracción y su posterior cuantificación mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con arreglo de diodos (HPLC-DAD) y cromatografía gaseosa acoplada a un detector de masas (CG-MS).

2.3. Objetivos específicos

- ✓ Implementar y optimizar un programa cromatográfico por HPLC-DAD para cuantificar los AINEs.
- ✓ Evaluar las fases propuestas para la extracción de los analitos: PDMS, C18 y Oasis® HLB.
- ✓ Optimizar las variables que afectan la determinación de AINEs en muestras acuosas mediante RDSE con la fase que provea una mayor eficiencia.
- ✓ Determinar las propiedades analíticas del método.

- ✓ Implementar un proceso de derivatización adecuado para los AINEs en estudio, con el fin de optimizar un método por GC-MS para confirmación en muestras reales.
- ✓ Validar el método analítico de RDSE en matrices acuosas dopadas con AINEs.
- ✓ Aplicación del método analítico validado en muestras reales.
- ✓ Evaluar los MIPs sintetizados en el laboratorio como fase sorbente alternativa y de mayor selectividad.
- ✓ Automatizar, miniaturizar y simplificar el sistema de extracción RDSE acoplándolo a un sistema SIA y su aplicación en muestras de orina humana.
- ✓ Análisis estadístico de los datos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

- Viales de vidrio 12 y 60 mL con tapa sólida con liner de teflón, Genesys.
- Viales de vidrio 1,8 mL con sello de aluminio y septa, Merck.
- Micro-jeringa HPLC 50 μ L, Hamilton.
- Disco de teflón 1,5 cm de diámetro, con barra magnética.
- Jeringa hipodérmica 2 mL, Ruthe.
- Filtro 0,22 μ m, Millipore.
- Filtros 0,45 μ m, Millex™.
- Papel filtro 125 mm, Whatman.
- Micropipetas 5 a 5000 μ L, Labopette.
- Materiales de vidrio (vaso de precipitado, pipetas volumétricas, matraces de aforo, botellas) Brand.
- Cinta doble contacto 3M.
- Sacabocado de golpe 14mm de diámetro, Elora.

3.2 Reactivos

- Estándar Ketoprofeno 98%, Sigma-Aldrich.
- Estándar Naproxeno 98%, Fluka. Sigma-Aldrich.
- Estándar Diclofenaco 98%, Sigma-Aldrich.
- Estándar Ibuprofeno 98%, Sigma-Aldrich.
- Estándar Ácido meclofenámico 98%, Sigma-Aldrich.
- SILVEX: Fenoprop (estándar surrogate), Sigma-Aldrich.
- Fosfato diácido de potasio p.a. Merck.
- Fosfato ácido de sodio. p.a. Mallinckrodt.
- Cloruro de sodio 99,5% p.a. Merck
- Nitrógeno extra puro 99,995%, AGA.
- Acetato de etilo grado cromatográfico, Merck.
- Acetonitrilo grado cromatográfico, Merck.

- Metanol grado cromatográfico, Merck.
- Acido clorhídrico 37% p.a. Merck.
- Acido ortofosfórico 85% p.a. Merck.
- Agua milliQ.
- Agente derivatizante: N-metil-N-tert-butildimetilsilil-trifluoroacetamida (MTBSTFA), Sigma-Aldrich.
- Estándar Hexaclorobenceno (estándar interno) (HBC) Merck.
- Hidróxido de sodio p.a. Merck.
- Disco para extracción en fase solida, Empore™ Octadecil C18 y SDB-RPS, 3M.
- Polidimetilsiloxano: Sylgard 184 silicone elastomer kit (Dow Corning Co. MI, U.S.A.).
- Sorbente Oasis® HLB 30µm, Waters.
- Polímeros de impresión molecular (MIPs) sintetizados en la Facultad de ciencias químicas de la Universidad de Concepción.
- Ibuprofeno (600 mg) Laboratorio CINFA
- Diclofenaco (50 mg) Laboratorio CINFA
-

3.3 Equipos utilizados

- HPLC Waters, provisto de una bomba binaria (Waters1525), columna Atlantis dC18 (5 µm; 250 mm x 4,6 mm), detector UV/visible de arreglo de diodos (Waters 2998), posee 512 fotodiodos y una resolución óptica de 1.2 nm, el detector opera en un rango de longitud de onda de 190 a 800 nm.
- Cromatógrafo de gases Thermo Fisher modelo Focus GC con detector de espectrómetro de masas con analizador de cuadrupolo, ISQ. Modo de ionización por impacto electrónico (EI), usando como gas portador helio de 99,999 % pureza y columna capilar marca Restek RTX-5MS 30 m, 0,32 mm ID, 0,25 df (µm), -60 a 350 °C.
- pH metro WTW modelo pMX 3000 y Eutech PC 2700 EutechInstruments.
- Agitador Bio magnetic stirrer MMS-3000 Boeco y Agimatic-N, Selecta
- Equipo de filtración al vacio Nalgene®.

- Balanza analítica Precisa 125A. Swiss Quality.
- Balanza sensible PJ Precisa Junior 500C.
- Vortex Mixer KMC-1300V.
- Evaporador VWR Analog Heatblock.
- Equipo FIALab-3000

3.4 Metodología

3.4.1 Selección de los analitos

Los compuestos investigados en esta tesis corresponden a: ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, diclofenaco sódico, ácido acetilsalicílico y ácido mefenámico. Estos compuestos son los más frecuentemente detectados en muestras acuosas a nivel mundial, debido a su libre comercialización y en grandes cantidades.

- ✓ Ibuprofeno: $C_{13}H_{18}O_2$ = ácido (\pm) -2 - (4-isobutilfenil) propanóico
- ✓ Naproxeno: $C_{14}H_{14}O_3$ = ácido (+) -2 - (6-metoxi-2-naftil) propiónico
- ✓ Ketoprofeno: $C_{16}H_{14}O_3$ = ácido 2-(3-Benzoilfenil)propiónico
- ✓ Diclofenaco sódico: $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ = 2-[(2,6-diclorofenil)amino]bencenoacético
ácido
- ✓ Ácido acetilsalicílico: $2-(CH_3CO_2)C_6H_4CO_2H$ = ácido 2-(acetiloxi)benzoico
- ✓ Ácido mefenámico: $C_{15}H_{15}NO_2$ = ácido 2-[(2,3-dimetilfenil)amino]benzoico

3.4.2 Preparación de estándares

Se preparó un multiestándar concentrado con los fármacos en estudio, en una concentración de 50 mgL^{-1} para cada uno de los analitos. Para esto se toman 25 mg de cada compuesto y se disuelven en 500 mL de metanol. A partir de ésta solución se prepararon por dilución los estándares ocupados, tanto para la curva de calibración como para el enriquecimiento de las muestras en el proceso de extracción de los analitos.

3.4.2.1 Curva de calibración

Para la obtención de la curva de calibración se preparó una set de estándares de concentraciones que van entre 0,05 - 2,0 mgL⁻¹, estimando que dentro de este intervalo de concentraciones, se cuantificarán las muestras a analizar por HPLC-DAD. Para el caso de GC-MS la curva de calibración se elaboró con un set de estándares en un intervalo de 0,0005 - 2,0 mgL⁻¹.

3.4.2.2 Estándar para enriquecimiento de muestras

A partir de la solución de multiestándar de 50 mgL⁻¹, se preparó una solución estándar de concentración 2 mgL⁻¹ utilizada para el enriquecimiento de las muestras de agua milliQ y agua potable, para la optimización y validación de la extracción, respectivamente. Cada muestra acuosa fue enriquecida con 500 µL del estándar sobre una muestra acuosa de 50 mL, quedando en solución una concentración de fármacos de 20 µgL⁻¹.

3.4.3 Optimización cromatográfica para la separación y cuantificación de los analitos por HPLC-DAD

Mediante el uso de estándares de antiinflamatorios, se realizaron estudios con diferentes condiciones cromatográficas como flujo y mezclas de fase móvil, con el fin de encontrar la separación cromatográfica más adecuadas para la determinación de los distintos analitos, utilizando un equipo HPLC provisto de una bomba binaria (waters 1525), detector de arreglo de diodos (Waters 2998) y una columna Atlantis dC18 (5 µm; 250 mm x 4,6 mm), trabajando con diferentes mezclas de acetonitrilo : fosfato diácido de potasio 50 mM.

3.4.3.1 Preparación de fosfato diácido de potasio 50 mM

Se pesaron 6,8040 g de fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄), cuyo peso molecular es de 136,08 g/mol en un vaso precipitado de 50 mL previamente tarado en la balanza analítica precisa 125 A Quality. Se disuelve el fosfato con agua Milli Q (Millipore Corporation, USA), con una conductividad de 18 MΩ cm y se transfiere

cuantitativamente a un matraz aforado de 1000 mL y se ajusta el pH entre 4,2-4,5. Luego se procedió a filtrar la solución utilizando un equipo de filtración al vacío provisto de un filtro de membrana estéril de 0,22 μm , posteriormente fue almacenado en frasco de vidrio de 1000 mL.

3.4.3.2 Preparación de fase móvil

Se realizó un estudio preliminar para evaluar el comportamiento de los distintos analitos, en función de la variación de la proporción de fase móvil, con mezclas de acetonitrilo : fosfato diácido de potasio 50 mM (pH 4,2-4,5) en proporciones que fluctuaron entre 50:50 y 70:30 % (v/v), las diferentes mezclas se generaron directamente a través de la bomba binaria del Equipo HPLC-DAD.

3.4.3.3 Implementación y optimización de la separación cromatográfica por HPLC-DAD

Para identificar los tiempos de elución y señal de cada analito en estudio, se inyectaron estándares de cada uno de los fármacos seleccionados y se seleccionó el tiempo de elución y su espectro de absorción a una determinada longitud de onda. Una vez establecido los tiempos de cada compuesto se inyectó un multiestándar que contiene todos los analitos y se estableció el tiempo total de la corrida cromatográfica y la mezcla de fase móvil en modalidad de flujo isocrático.

3.4.3.4 Curva de calibración

Mediante una curva de calibración de concentraciones que van entre 0,05 - 2,0 mgL^{-1} se determinó la sensibilidad de cada uno de los analitos en estudio, a través de la pendiente obtenida de la curva de calibración.

3.4.4 Sistema de extracción RDSE

3.4.4.1 Fases de extracción

3.4.4.1.1 Polidimetilsiloxano (PDMS)

La fase de PDMS se preparó de acuerdo al siguiente protocolo, descrito por su fabricante: al elastómero base del kit Sylgard 184 se le agregó el agente curante en una proporción 10:1 (p/p). Esta solución se vertió en una baldosa cuadrada para la gelificación del PDMS, en un área delimitada por una banda de goma de 2 mm y se dejó polimerizar por un tiempo de 48 h, a temperatura ambiente. El espesor de la película de PDMS puede ser modificado en función del ancho de la banda de goma. Una vez polimerizado, la fase es cortada con un sacabocado de un diámetro de 1,5 cm y se fija sobre el disco de teflón con una cinta de doble contacto.

3.4.4.1.2 Octadecil C18

La fase C18 es obtenida comercialmente en forma de láminas circulares de 47 mm de diámetro y 0,5 mm de espesor. Para su uso en la técnica de RDSE son cortadas de un diámetro de 1,5 cm, para inmovilizarlas en el disco de teflón con cinta doble contacto.

3.4.4.1.3 OASIS® HLB

Este sorbente corresponde a un copolímero formado por divinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona, el cual físicamente se presenta como un polvo amarillo, por lo cual fue necesario adaptar el disco para inmovilizar dicha fase. El disco de teflón se adaptó con una cavidad central, la cual permite el ingreso de este tipo de fases. Se agregaron 60 mg de ésta, la cual es tapada con un papel filtro soportado por un anillo de teflón.

Antes de la extracción, la fase de Oasis® HLB, es ambientada con acetato de etilo-metanol-agua durante 5 min en cada disolvente. El PDMS y C18 fueron ambientados de forma similar, sin pasar por el acetato de etilo debido a que en ambos casos la cinta de doble contacto se ve afectada, y en el caso particular del PDMS su composición es alterada.

3.4.4.1.4 Polímeros de impresión molecular, MIPs

Al igual que el Oasis® HLB, el MIP y su respectivo NIP (polímero sin plantilla, usado para fines comparativos) corresponde a un polvo blanco que se depositó dentro de la cavidad central del disco rotatorio adaptado y ambientado de la misma forma que el Oasis® HLB.

3.4.4.2 Extracción de los analitos

Para la extracción de los analitos se prepararon soluciones de 50 mL de agua milliQ, con una concentración conocida de fármacos ($20 \mu\text{gL}^{-1}$). Dentro del vial que contiene la muestra se introdujo el dispositivo de extracción. Una vez extraídos los fármacos, estos son desorbidos con 10 mL de metanol, la solución obtenida es evaporada a sequedad con una corriente de nitrógeno gaseoso y luego reconstituida en 500 μL de metanol. Este extracto final es filtrado con una membrana de PVDF de 0,45 μm para su determinación por HPLC-DAD. Para la determinación por GC-MS los extractos son reconstituidos con 500 μL de acetato de etilo y derivatizados con MTBSTFA previo a la inyección en el equipo.

3.4.4.3 Optimización del proceso de extracción por RDSE

Para la optimización del método analítico se realizó un estudio de las diferentes variables químicas e hidrodinámicas que influyen en el proceso de extracción.

3.4.4.3.1 Variables químicas

a) pH

Las muestras se prepararon a partir de una solución buffer 0,1M de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$. Los pH de estudio fueron de 2,0 - 4,0 - 6,0 - 8,0 y 10,0. El pH inicial de la solución buffer fue de 6,7, el cual fue modificado con hidróxido de sodio y ácido clorhídrico (concentrados) para valores de pH alcalinos y ácidos respectivamente.

b) Fuerza iónica

Se evaluó el efecto de la fuerza iónica con sulfato y cloruro de sodio, preparando soluciones de extracción con distintas concentraciones de sal (0 - 5 - 10 y 15 % p/v). El mismo procedimiento se realizó con cada sal utilizada.

c) Cantidad de metanol

Se evaluó el efecto de la adición de metanol sobre la extracción, se agregaron distintas cantidades de metanol a soluciones a pH óptimo, los porcentajes de metanol en solución de 50 mL de muestras fueron de 0 - 5 - 10 y 15 % v/v de disolvente.

d) Disolvente y tiempo de desorción

Una vez extraídos los analitos en la fase sorbente es necesario desorberlos para su posterior determinación. El dispositivo de extracción se introdujo en un vial, que contenía 10 mL de disolvente orgánico en constante agitación. Se utilizó como disolvente de desorción acetato de etilo y metanol, según la fase utilizada y también para determinar cual proporcionó una mejor recuperación. La eficiencia de desorción fue comparada entre disolventes, en un intervalo de tiempo de 10 a 60 minutos de agitación.

3.4.4.3.2 Variables hidrodinámicas

a) Velocidad de agitación

Para establecer la dependencia de la agitación en el proceso de extracción, se hicieron pruebas en soluciones con pH óptimo en 90 minutos, a distintas velocidades de rotación del disco, las cuales fueron de 0 - 600 - 1200 - 1800 - 2400 y 3000 rpm.

b) Perfil de extracción y volumen de muestra

Para determinar el tiempo óptimo se realizaron extracciones en las mismas condiciones variando el tiempo de 0 a 300 min para 50 mL de muestra. De forma similar se probó con volúmenes de 100 y 500 mL, manteniendo todas las concentraciones constantes.

3.4.5 Validación del método analítico

Para validar el método de determinación de AINEs en muestras acuosas, es necesario obtener las propiedades analíticas.

3.4.5.1 Curva de calibración

La curva de calibración fue obtenida a partir de la señal analítica, medida de los estándares preparados en los distintos niveles de concentración, al graficar la concentración de cada analito versus el área resultante, se determinó la ecuación de la recta como se muestra la Ecuación 3, donde m y b son los coeficientes de pendiente e intercepto respectivamente.

$$y = mx + b \quad (3)$$

3.4.5.2 Sensibilidad

Para determinar la sensibilidad del método, se obtuvo desde la curva de calibración la pendiente de ésta. La pendiente puede ser calculada teóricamente como se muestra en la Ecuación 4.

$$m = \frac{\sum x_i y_i - (\sum x_i \sum y_i / n)}{\sum x_i^2 - ((\sum x_i)^2 / n)} \quad (4)$$

3.4.5.3 Precisión

Para evaluar la precisión a nivel de replicabilidad, se aplicó el método de extracción en diez alícuotas de la misma muestra en concentraciones de $5 \mu\text{gL}^{-1}$, lo que corresponde a un valor de concentración entre 2 y 10 veces el límite de cuantificación, en las mismas condiciones en un corto intervalo de tiempo. La precisión es expresada como la desviación estándar relativa (RSD) y calculada según la Ecuación 5, donde S = desviación estándar de la serie de mediciones de las muestras, \bar{x} = concentración media de las muestras.

$$\% RSD = \left(\frac{S}{\bar{x}} \right) \times 100 \quad (5)$$

3.4.5.4 Exactitud

La exactitud del método fue determinada a partir de la recuperación, al aplicar el método de extracción a cuatro muestras de agua potable a una concentración conocida de $5 \mu\text{gL}^{-1}$, que corresponde a un valor de concentración entre 2 a 10 veces el límite de cuantificación del método para cada analito. La recuperación fue calculada según la Ecuación 6.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{(C_s - C)}{C_a} \times 100 \quad (6)$$

Donde C_s es la concentración de la muestra fortificada, C concentración en la muestras no fortificada y C_a concentración agregada.

3.4.5.5 Límite de detección del método

Este fue calculado aplicando el método analítico a diez muestras acuosas con una concentración de los AINEs entre 4 y 10 veces el límite de detección estimado ⁽⁷²⁾. La señal analítica correspondiente al límite de detección se calculó según la Ecuación 7, este valor fue interpolado en la curva de calibración para obtener la concentración del límite de detección.

$$Y_{LD} = 3 \times S \quad (7)$$

Donde S es la desviación estándar de la señal analítica de las diez muestras fortificadas, Y_{LD} la señal analítica correspondiente al límite de detección.

3.4.5.6 Límite de cuantificación del método

Este fue calculado de forma igual al límite de detección, pero la señal analítica correspondiente a la desviación estándar, fue multiplicada por un factor de 10, como muestra la Ecuación 8, este valor fue interpolado en la curva de calibrado, para obtener la concentración del límite de cuantificación.

$$Y_{LC} = 10 \times S \quad (8)$$

Donde S es la desviación estándar de la señal analítica de las diez muestras fortificadas, Y_{LC} la señal analítica correspondiente al límite de cuantificación.

3.4.5.7 Análisis de muestra real por HPLC-DAD

Se analizó por medio del método analítico estudiado, muestras procedentes de dos plantas de tratamiento de aguas servidas (PTAS) de la región metropolitana. Esta muestra fue tomada por personal especializado de la empresa, desde el afluente de cada planta, luego fue almacenada en botellas de polipropileno de 500 mL y se congelaron hasta el momento de su análisis. Se tomaron 200 mL de muestra la cual se llevó a pH 2 y se dividió en cuatro alícuotas de 50 mL, estas muestras fueron analizadas con y sin adición de estándar, para determinar la presencia y la concentración de estos fármacos. Además se obtuvo una muestra de efluente de una de las dos PTAS para ser analizada de la misma forma de las muestras mencionadas anteriormente.

3.4.6 Optimización cromatográfica para la separación y cuantificación de los analitos por GC-MS

Mediante el uso de estándares se realizó el estudio para la obtención de un método cromatográfico para la determinación y cuantificación de los analitos seleccionados, mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

3.4.6.1 Derivatización

Debido a que los analitos en estudio no son volátiles (Tabla 2: Constante de la ley de Henry), es necesario derivatizar los extractos provenientes de la extracción por RDSE previo a su determinación por GC-MS. Para ello se utilizó como agente derivatizante N-metil-N-tert-butildimetilsilil-trifluoroacetamida (MTBSTFA).

Al extracto reconstituido en 500 μ L de acetato de etilo se agregan 20 μ L de MTBSTFA, se lleva a una temperatura de 60°C en un bloque calefactor por 60 minutos. Los extractos derivatizados son enfriados, se agrega estándar interno de hexaclorobenceno (HCB) y se determina por GC-MS.

3.4.6.2 Condiciones cromatográficas

Se utilizó un cromatógrafo de gases Thermo Fisher modelo Focus GC con detector de espectrómetro de masas con analizador de cuadrupolo, ISQ e inyector SSL. El modo de ionización es por impacto electrónico (EI), usando como gas portador helio de 99,999 % pureza con un flujo de 1 mL/min y columna capilar marca Restek RTX-5MS 30 m, 0,32 mm ID, 0,25 μm , con un máximo de temperatura de 350°C.

3.4.6.3 Implementación y optimización de la separación cromatográfica por CG-MS (SIM).

Mediante el uso de estándares se implementó un método cromatográfico que permite la identificación y cuantificación de los analitos en estudio. Se inyectaron los analitos por separado para determinar su tiempo de retención y sus iones (m/z) de cuantificación e identificación. Luego de obtener el cromatograma y espectro de masas de cada uno de los analitos, se elaboró el programa SIM que considera los seis analitos en estudio más los estándares “surrogate” e interno para obtener la corrida cromatográfica completa y lograr su determinación de forma simultánea.

3.4.7 Validación del método analítico

De la misma forma como se ha descrito para validar el método usando HPLC-DAD en el 3.4.5 anteriormente detallado, se realizó la validación por GC-MS. Contemplando los parámetros de sensibilidad, precisión, exactitud, límite de detección y cuantificación del método.

3.4.7.1. Análisis de muestra real por GC-MS

De la misma forma descrita para el análisis de las muestras reales por HPLC-DAD detallada en el punto 3.4.5.7, se realizó el proceso de extracción por RDSE, el extracto se reconstituye en acetato de etilo, se derivatiza y se determina por GC-MS.

3.4.8 Automatización

El sistema automático de microextracción por sorción con disco rotatorio se combina con un sistema en flujo programable basado en el análisis por inyección secuencial (SIA) para la limpieza y preconcentración de especies orgánicas en muestras acuosas.

El sistema realiza de forma automática la extracción y elución de los analitos, mediante un equipo FIALab 3000 que cuenta con un software que controla las operaciones que se deben llevar a cabo. El equipo dispone en su estructura de una bomba de microjeringa que permite definir el volumen y flujo de la muestra líquida y direccionarla hacia una válvula de multiposición que se conecta a uno de sus puertos de salida con el sistema RDSE.

Las fases utilizadas consisten en discos para extracción en fase sólida Empore™ C₁₈ y SDB-RPS, que se inmovilizaron sobre una de las superficies del disco rotatorio de Teflón (1.5 cm de diámetro) y se introdujo dentro de una cámara de flujo especialmente diseñada para este propósito. Se seleccionaron como analitos modelo para el diseño propuesto cuatro de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs): ketoprofeno, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno y se determinaron mediante cromatografía líquida.

3.4.8.1. Validación del método analítico

De la misma forma como se ha descrito para validar el método usando HPLC-DAD en el 3.4.5 anteriormente detallado, se realizó la validación del sistema dinámico SI-RDSE. Contemplando los parámetros de sensibilidad, precisión, exactitud, límite de detección y cuantificación del método.

3.4.8.2. Análisis de muestra real por sistema automático

Se utilizaron muestras de orina de donantes voluntarios, que fueron analizadas luego de la administración oral de ibuprofeno (600 mg) o diclofenaco (50 mg). Las muestras fueron recolectadas a los 180 y 300 minutos luego de su administración, considerando que los fármacos usados presentan un tiempo de vida media de aproximadamente 2

horas ^(73,74). Cada muestra fue filtrada y ajustada a pH 2 antes de realizarse la microextracción y luego analizadas por HPLC-DAD.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Optimización cromatográfica para la separación y cuantificación de los analitos por HPLC-DAD

Para establecer el orden de elución, se inyectaron estándares puros de cada analito y se obtuvo la longitud de onda para su determinación en conjuntos, además de los espectros de absorción de cada uno de ellos, los cuales posteriormente se utilizan para confirmar la presencia de los compuestos en las muestras reales.

Utilizando mezclas de los antiinflamatorios en estudio, se seleccionaron las condiciones más adecuadas para su correcta separación cromatográfica, probando con mezclas de acetonitrilo:fosfato diácido de potasio bajo condiciones de elución isocrática.

4.1.1 Condiciones cromatográficas e identificación de los analitos por HPLC-DAD

La inyección por separado de los estándares puros de los fármacos en estudio permitió obtener el orden de elución de cada uno de ellos, siendo el siguiente: ketoprofeno (9,8 min), naproxeno (10,64 min), diclofenaco (18,86 min) e ibuprofeno (22,43 min). Este orden de elución de la columna está de acuerdo con la polaridad de los compuestos (Tabla 2), por lo cual es de esperar que ketoprofeno y naproxeno sean los primeros en eluir con la fase móvil, ya que ésta presenta un carácter más polar que la fase estacionaria, mientras que diclofenaco e ibuprofeno, al ser menos polares, permanecen más tiempo retenidos en la fase estacionaria, siendo sus tiempos de elución mayores.

Se inyectó en el equipo HPLC-DAD un multiestandar de concentración 2 mgL^{-1} de cada analito a un flujo de fase móvil de 1 mL/min en modalidad isocrática, usando como fase móvil diferentes proporciones de acetonitrilo:fosfato. Los resultados obtenidos indicaron que en los casos donde se agrega un mayor porcentaje de acetonitrilo, se obtienen los cuatro picos cromatográficos en un tiempo inferior a los 12 minutos pero los dos primeros analitos presentan tiempos muy cercanos, por lo tanto no se logran una adecuada resolución. A medida que se va incrementando el porcentaje de fosfato con

respecto al acetonitrilo, el tiempo de corrida se alarga, lo cual favorece la separación de los compuestos como se puede observar en la Figura 9.

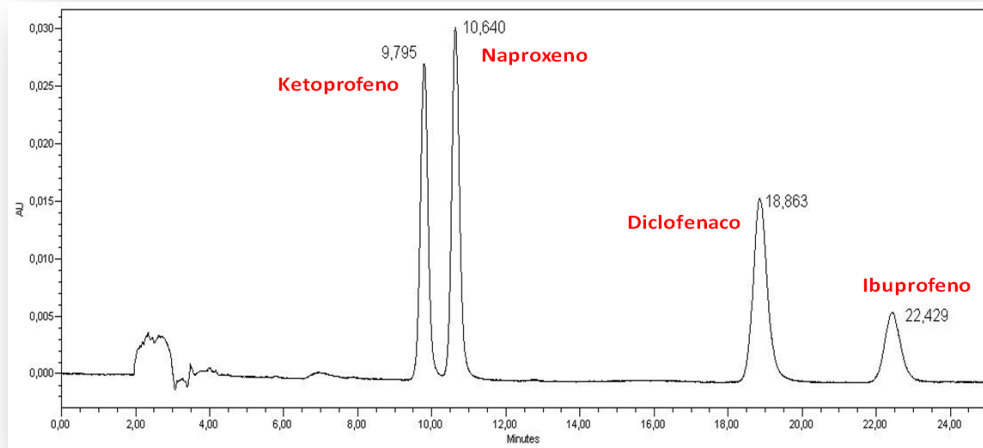


Figura 9. Cromatograma de AINEs obtenido del HPLC-DAD a una concentración de 2 mgL^{-1} para cada compuesto. Fase móvil 50/50 acetonitrilo/fosfato, flujo 1 mLmin^{-1}

Si se trabaja con una mezcla de igual proporción (50:50 % v/v) de ambos disolventes, se logró la separación de los cuatro analitos con un tiempo de corrida inferior a 23 min. Al aumentar el contenido de acetonitrilo disminuye el valor del factor de retención para los compuestos más hidrofóbicos e incrementa la fuerza del eluyente lo que reduce la interacción hidrofóbica entre el analito y la fase estacionaria.

El equipo HPLC utiliza un detector de arreglo de diodos, que permite obtener los espectros de absorción de cada analito, los cuales sirven posteriormente para la identificación de los compuestos en muestras complejas. Los espectros de absorción UV obtenidos de cada fármaco se pueden observar en la Figura 10. La longitud de onda seleccionada para la determinación simultánea de los analitos fue de 210 nm, ya que el conjunto de las señales presentan una buena sensibilidad.

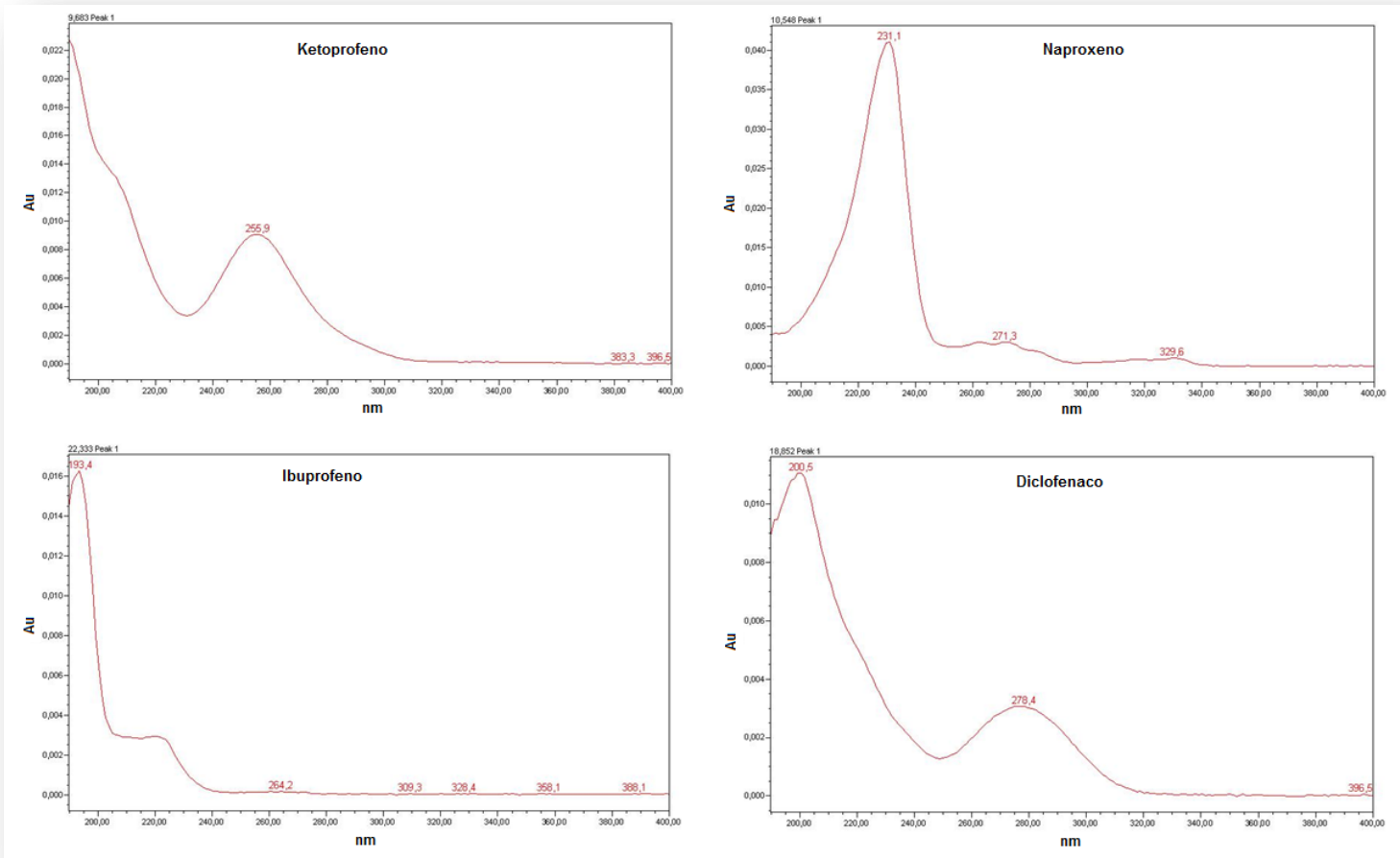


Figura 10. Espectros de absorción UV de los analitos en estudio

4.1.2 Curvas de calibración

Las curvas de calibración obtenidas de cada analito se muestran en la Figura 11, ésta se realizó con valores de concentración de 0,05 a 2 mgL⁻¹ debido a que se espera que las cantidades de estos compuestos en muestras acuosas reales, posterior a la etapa de extracción, llegue a estar dentro de este intervalo de concentraciones. Los resultados obtenidos de las curvas de calibración se muestran en la Figura 11 y Tabla 4.

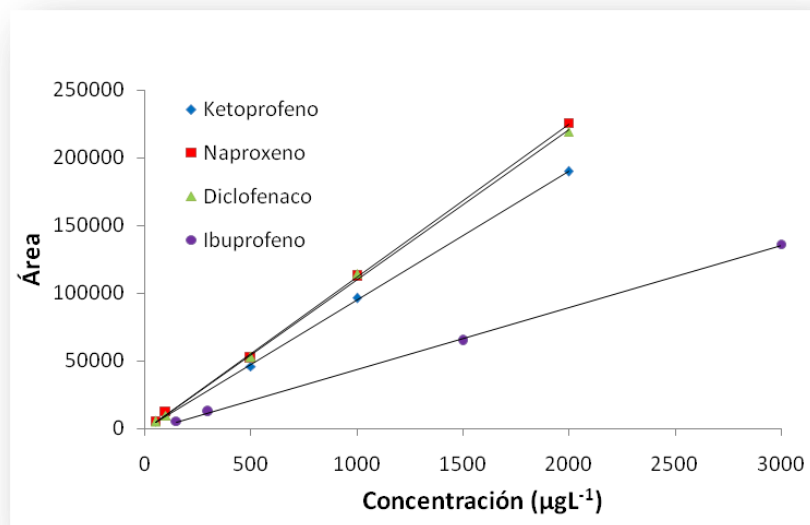


Figura 11. Curvas de calibración de los AINEs en estudio, por HPLC-DAD.

Tabla 4. Parámetros obtenidos de las curvas de calibración, por HPLC-DAD

Analito	Concentración mgL ⁻¹	Longitud de onda (nm)	Pendiente (sensibilidad) mgL ⁻¹	R
Ketoprofeno	0,05-2	210	94967	0,9996
Naproxeno	0,05-2	210	112864	0,9992
Diclofenaco	0,05-2	210	110820	0,9989
Ibuprofeno	0,15-3	210	46903	0,9996

En el caso de ibuprofeno se puede observar una menor sensibilidad (pendiente), respecto a los demás analitos, por lo que el intervalo de concentración considerado fue mayor. En la Tabla 4 podemos observar que el valor R, muestra una buena correlación de todos los analitos entre sus concentraciones y la señal obtenida en el HPLC-DAD.

4.2 Estudio de fases sorbentes

Las fases sorbentes utilizadas en este estudio fueron seleccionadas por la afinidad que presentan, debido a sus estructuras químicas, con compuestos de baja polaridad como es el caso de los antiinflamatorios no esteroideos presentes en este trabajo. Las fases

seleccionadas fueron Polidimetilsiloxano (PDMS), octadecil C18 y Oasis® HLB como se observa en la Figura 12.

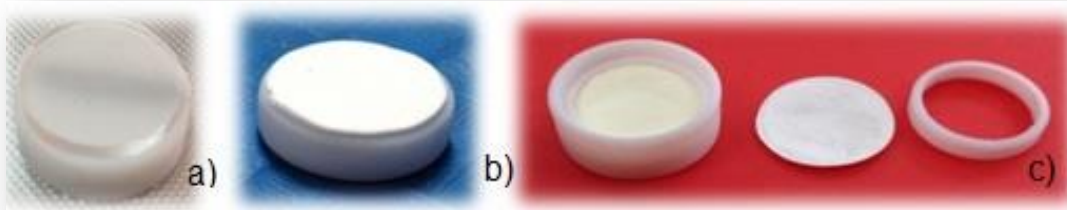


Figura 12. Fases sorbentes utilizadas en el estudio de extracción de AINEs.
a) PDMS; b) C18; c) disco con cavidad y Oasis® HLB

En la Figura 13 se puede observar que al realizar el proceso de extracción a un tiempo de 120 minutos, con los tres tipos de fases sorbentes, la fase Oasis® HLB logra una mayor recuperación de los analitos con respecto a C18 y PDMS.

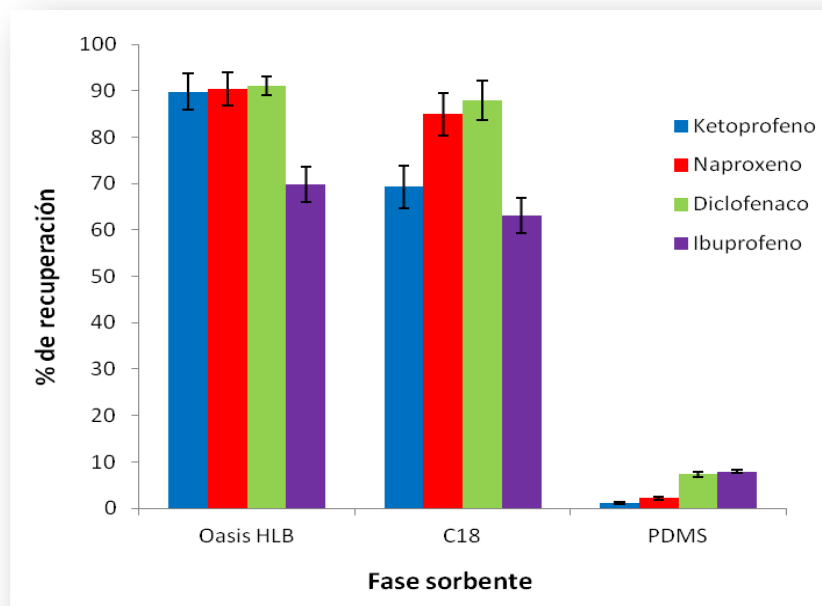


Figura 13. Fases sorbentes utilizadas en la extracción de AINEs en un tiempo de 120 min, determinado por HPLC-DAD.

En la Tabla 5 podemos observar los valores de recuperación de los analitos en cada una de las fases.

Tabla 5. Porcentajes de recuperación (%) de AINEs en diferentes fases sorbentes, determinados por HPLC-DAD.

Fases sorbentes	Porcentajes de Recuperación de AINEs (%)			
	Ketoprofeno	Naproxeno	Diclofenaco	Ibuprofeno
PDMS	1,1±0,2	2,1±0,4	8,3±0,6	9,2±0,4
C18	69±5	85±5	88±4	63±4
Oasis® HLB	90±4	92±3	91±2	70±4

De los datos presentados en la Tabla 5, se observa que para el caso del PDMS se alcanzan valores sólo del 10% de recuperación y para el ketoprofeno y naproxeno entre un 1 y 2%. Esta baja recuperación se puede deber a que a los 120 minutos de extracción no se ha alcanzado el equilibrio de partición, debido a que en el PDMS el proceso es de absorción de los analitos lo que implica un mayor tiempo para el ingreso de los compuestos a la fase.

Para el C18 se puede observar un aumento importante de la recuperación a los 120 minutos de extracción entre un 63 y 88%. En esta fase el proceso de extracción es por adsorción de los analitos en la superficie del material sorbente por lo cual es un proceso más rápido que en el caso del PDMS.

Finalmente para el Oasis® HLB podemos observar porcentajes de recuperación entre un 70 y 92%. Al igual que el caso del C18 se produce un proceso de adsorción de los analitos, con recuperaciones cuantitativas a los 120 minutos. Este aumento respecto al C18 se debe a que además de las interacciones con los sitios apolares de la fase sorbente, el Oasis® HLB presenta sitios polares, debido a su carácter hidrofílico-lipofílico, la cual permite la extracción de una gran variedad de compuestos. Por esta razón esta fase es seleccionada para la extracción de los fármacos mediante RDSE.

4.3 Optimización del proceso de extracción por RDSE

A continuación se detalla el estudio de las variables químicas e hidrodinámicas que afectan el proceso de extracción por RDSE con el fin de obtener las condiciones óptimas de extracción de los analitos en estudio.

4.3.1 Fuerza iónica

La adición de una sal inerte como el cloruro de sodio aumenta la fuerza iónica del medio y los compuestos presentes en solución tienden a ser menos solubles (efecto "salting out")⁽⁷⁵⁾, bajo este efecto es que se busca favorecer la transferencia de masa desde la fase acuosa hacia la fase sorbente. En general se ha observado que para analitos hidrofóbicos ($\text{LogKow} > 3.5$) la adición de una sal inerte no mejora, sino que incluso, reduce la eficiencia de extracción. Por el contrario para analitos polares la respuesta aumenta con la adición de sal⁽⁶⁴⁾. El efecto de la adición de sal a la solución de extracción se puede observar en la Figura 14.

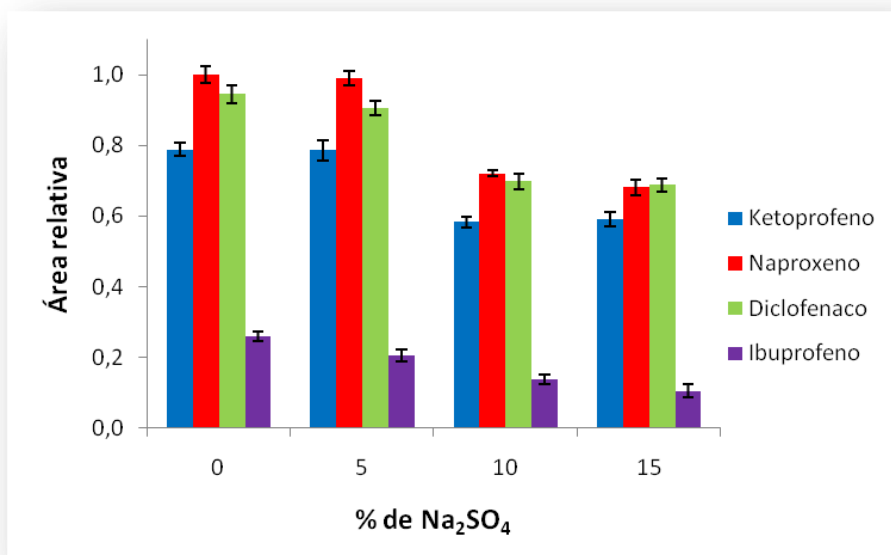


Figura 14. Efecto de la fuerza iónica en la extracción de AINEs, determinado por HPLC-DAD.

En la Figura 14 se puede observar que al aumentar la fuerza iónica del medio mediante la adición de sulfato de sodio a la solución en un rango de 0% a 15%, la extracción se ve disminuida. Este efecto se puede deber a que hay un aumento de la viscosidad del medio, produciendo que dificulte la movilidad de los antiinflamatorios hacia la fase sorbente y como consecuencia el proceso de extracción se vuelve más lento. El estudio de este efecto fue realizado de igual forma con una sal monovalente de cloruro de sodio, obteniéndose el mismo comportamiento, esto se corrobora mediante el cálculo de los valores de la fuerza iónica de la solución a las concentraciones de 5, 10 y 15 % p/v de Na₂SO₄ y NaCl, los cuales son valores similares para ambas sales.

4.3.2 Efecto de adición de metanol

El metanol es utilizado como un modificador orgánico para el caso de analitos muy apolares que tienden a adherirse a las paredes del vial de vidrio que contiene la muestra para la extracción. Sin embargo la adición de algún modificador también puede aumentar la solubilidad del soluto en la fase acuosa y por lo tanto reducir al mínimo la eficiencia de extracción. En términos generales, los compuestos con altos LogKow (> 5.0) la adición de metanol evita la adsorción de los analitos en las paredes de vidrio del vial que contiene la muestra, mientras que para compuestos con LogKow menores (< 2,5) la adición de metanol aumenta la solubilidad de los analitos en solución, disminuyendo la eficiencia de extracción ^(76,77).

Como los AINEs en estudio son de baja polaridad, con logKow entre 3-5, a excepción del ácido acetilsalicílico que presenta característica más polar (Tabla 2), podría ocurrir que al realizar la extracción con RDSE, estos compuestos se adhieran al vidrio del vial. Para evitar este problema se puede utilizar metanol para mantener los compuestos de baja polaridad en solución. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura 15.

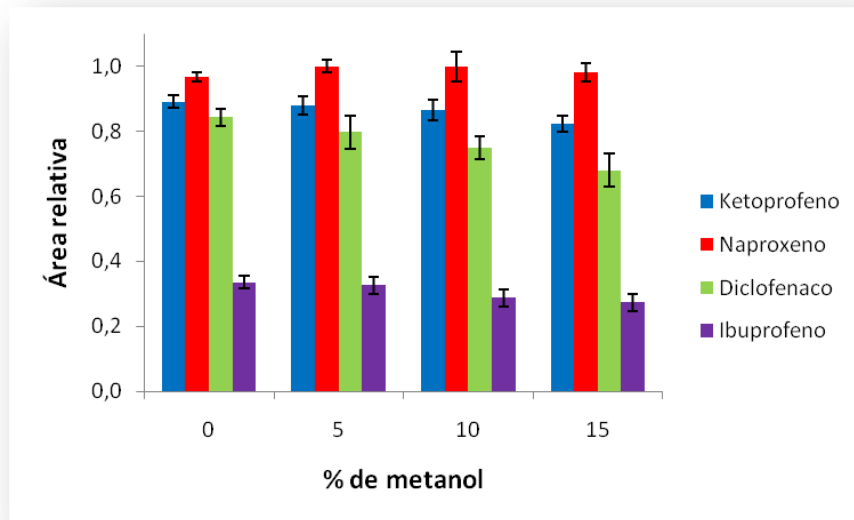


Figura 15. Efecto de la adición de metanol en la extracción de AINEs, determinado por HPLC-DAD

En la Figura 15 se puede observar que a medida que aumenta el porcentaje de metanol presente en la solución de extracción, las señales de los AINEs presentan una baja en el área registrada (excepto naproxeno).

El metanol es un disolvente orgánico que posee una polaridad de 5,1 mientras que el agua posee una polaridad de 10,2. Cuando se mezclan ambos componentes formando una solución, la polaridad final dependerá de las cantidades de estos en la mezcla. Cuando se aumenta la cantidad de metanol, la solución se tornará menos polar, produciendo que los compuestos estudiados presenten una mayor afinidad en la fase acuosa. Este efecto puede explicar la disminución en la recuperación, ya que cuando se está en presencia del modificador orgánico, el equilibrio es desplazado levemente hacia la solución, disminuyendo la transferencia de masa desde la muestra acuosa hacia la fase sorbente.

4.3.3 Efecto del pH

El estudio de pH en la extracción de AINEs se realizó debido a que estos compuestos adquieren distintas estructuras químicas a valores de pH por sobre o bajo sus pKa (Tabla 2), la fase sorbente puede tener distinta afinidad por alguna de estas estructuras formadas de acuerdo al pH, es por esto que es importante identificar a que pH existe una mayor recuperación de todos los analitos en estudio. En la Figura 16 se puede observar el efecto del pH en la extracción de los AINEs.

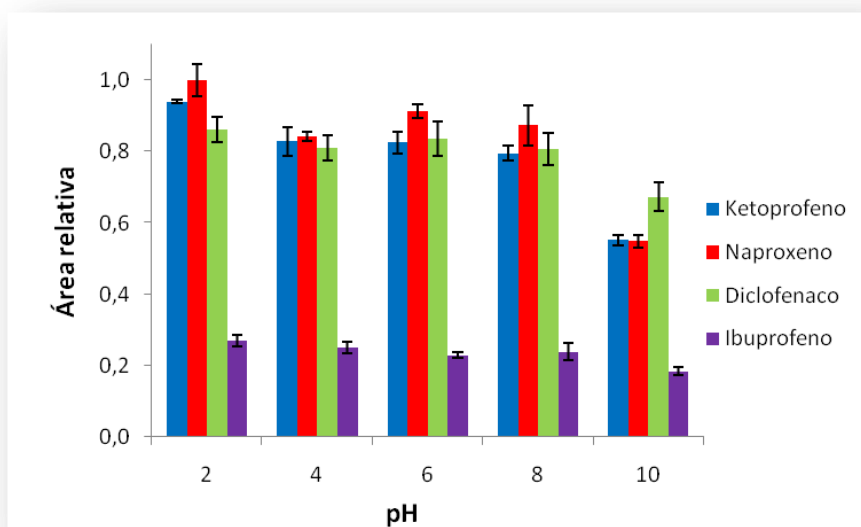


Figura 16. Efecto del pH en la extracción de AINEs, determinado por HPLC-DAD.

Como se puede ver en la Figura 16, con la fase sorbente Oasis® HLB, es posible extraer AINEs en un intervalo de pH de 2 y 10, sin embargo a pH 2 se favorece la extracción para la mayoría de los compuestos sobre los otros pH.

La capacidad de extracción a distintos pH, se debe a que los compuestos son extraídos en su forma protonada a pH 2, en la fase Oasis® HLB mediante interacciones, tanto por puentes de hidrógeno, entre el hidrógeno del grupo ácido de los compuestos con el oxígeno del carbonilo del grupo lactama, como también por la afinidad de los sitios apolares de las cadenas hidrocarbonadas, con los anillos aromáticos de los ácidos. A valores de pH 4 y 6 las interacciones por puentes de hidrógeno son disminuidas, por la deprotonación de los ácidos, generando el ión carboxilato lo que implica que la afinidad

con la fase, sea reforzada por interacciones electrostáticas entre este ión y la fase protonada en el nitrógeno de la lactama, esta última se muestra en la Figura 17a. Este comportamiento es estable hasta pH 8, debido a que a pH más básico, el nitrógeno del grupo lactama, que presenta un pKa aproximado de 7,4, pierde el protón quedando en su forma neutra, pasando de tener cuatro a tres enlaces, como se observa en la Figura 17b. Esta forma neutra no posibilita la interacción electrostática con los compuestos, entonces quedan disponibles sólo los sitios apolares, por lo que la eficiencia de extracción disminuye considerablemente.

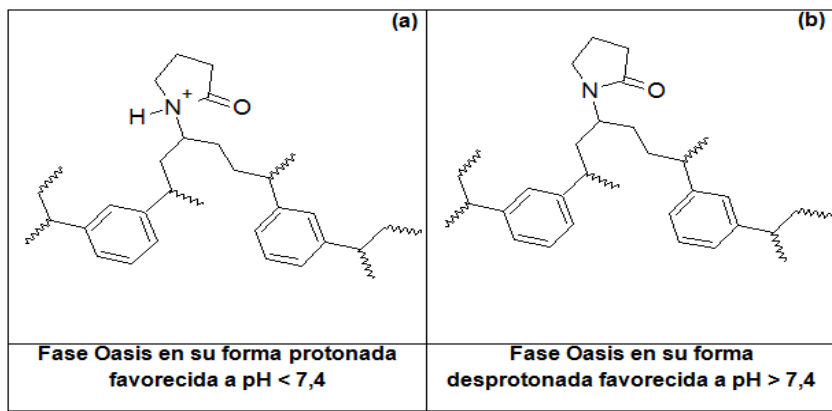


Figura 17. (a): Fase Oasis® HLB en su forma protonada. **(b):** Fase Oasis® HLB en su forma deprotonada.

4.3.4 Proceso de desorción.

Una vez extraídos los compuestos en la fase Oasis® HLB es necesario buscar un disolvente que permita la desorción de los analitos y que cumpla las siguientes características: pequeños volúmenes que logren solubilizar los analitos en una desorción rápida y cuantitativa, que sea compatible con el detector de cuantificación y que sea lo menos contaminante para el medio ambiente.

En la Figura 18 se observan las distintas condiciones en que se realizó la desorción de los analitos extraídos, las cuales consisten en el uso de distintos disolventes en una y dos etapas de desorción sucesivas con diferentes tiempos de agitación.

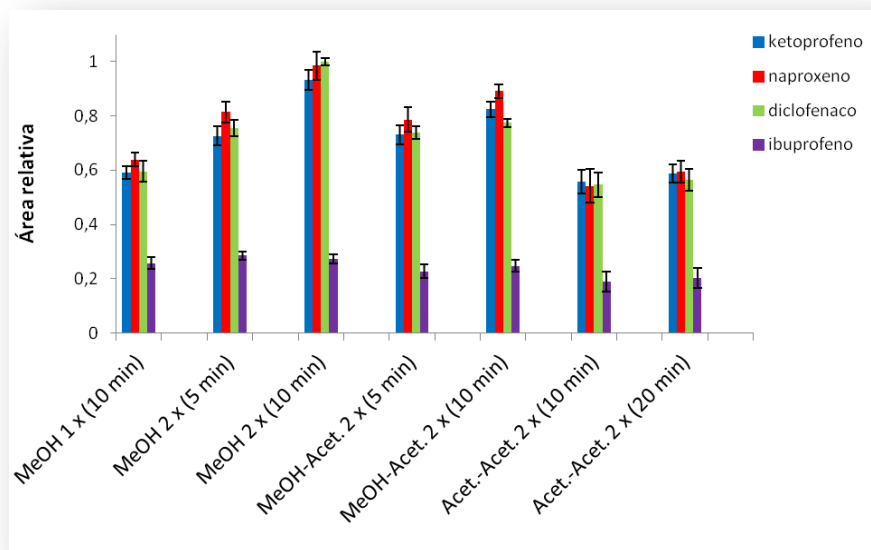


Figura 18. Efecto de la desorción en el proceso de extracción de AINEs

*MeOH: metanol, *Acet.: acetato de etilo (desorciones sucesivas), determinado por HPLC-DAD.

Se puede observar en la Figura 18 que dos desorciones consecutivas de 5 minutos, son más efectivas que una sola desorción de 10 minutos, como se da en el caso de la desorción con metanol, es por esto que todas las desorciones se realizaron en dos pasos. Esto se puede deber a que en una primera desorción, el disco de extracción aun contiene en su interior la solución acuosa de la etapa previa, por lo cual la primera desorción permite eliminar el agua atrapada en la cavidad del disco donde se encuentra la fase sorbente, entonces al realizar la segunda desorción, la fase ya se encuentra ambientada con el disolvente de desorción por lo cual la recuperación de los analitos es más efectiva en dos pasos de desorción que en uno solo.

En el caso de la desorción utilizando solo acetato de etilo, tiene como resultado una menor recuperación de los analitos, con mayor porcentaje de error con respecto a la desorción con metanol, la diferencia se debe a que al traspasar el dispositivo con la fase sorbente desde la muestra acuosa al disolvente de desorción, en el caso del acetato de etilo se forma una capa inmiscible (agua – acetato de etilo), la que dificulta la entrada de éste para extraer al analito. En el caso del metanol, éste es miscible con el agua, por lo que no interfiere en este proceso. Cuando se realiza la desorción con

ambos disolventes, comenzando con metanol, tampoco ocurre este impedimento, y la recuperación es similar a la obtenida cuando se usa solamente metanol, sin embargo se decide trabajar con esta última modalidad de desorción, ya que se obtienen mejores recuperaciones, más reproducibles y con menos uso de disolventes en esta etapa.

4.3.5 Velocidad de agitación

El efecto de la velocidad de rotación del disco es una variable hidrodinámica de gran importancia en el proceso de extracción, debido a que sin la ayuda de un dispositivo que produzca agitación, el proceso solo dependería de la velocidad de difusión del analito en la fase acuosa, produciendo tiempos de extracción demasiado largos, lo que sería poco eficiente en comparación con las técnicas actualmente desarrolladas. Al aplicar agitación se produce un mayor intercambio del analito desde la solución a la fase sorbente mejorando finalmente la rapidez de la extracción.

En la Figura 19 se puede observar el efecto de la velocidad de agitación del disco rotatorio en la solución de extracción.

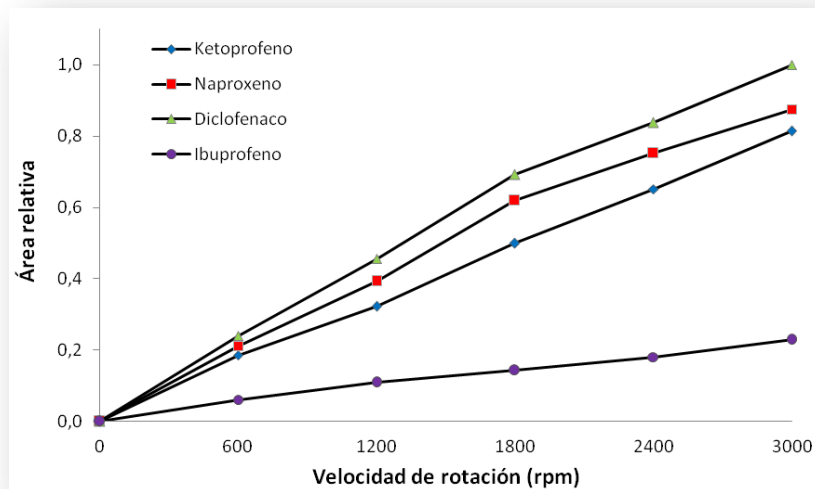


Figura 19. Efecto de la velocidad de rotación en la extracción de AINEs, determinado por HPLC-DAD.

Como se puede observar en la Figura 19, a mayor velocidad de rotación, se obtiene una mayor señal analítica, lo que indica que aumenta significativamente la cantidad de AINEs extraídos. Este efecto ocurre debido a que, al incrementar la velocidad de agitación, se produce un flujo más turbulento, el cual aumenta la movilidad de los analitos en solución y a la vez disminuye el espesor de la capa estacionaria, permitiendo una mayor velocidad de transferencia de masa de los analitos en un tiempo determinado (90 min), proceso que se deduce de la Ecuación 3 descrita anteriormente.

4.3.6 Perfil de extracción y volumen de muestra.

Teniendo en cuenta el efecto significativo de las variables anteriores en la eficiencia de la extracción, también se debe conocer el tiempo mínimo al cual se llega a una recuperación cuantitativa sobre el 80% o el punto en que se ha alcanzado el equilibrio de partición entre la fase acuosa y la fase sorbente. En la Figura 20 se puede observar el perfil de extracción de los analitos.

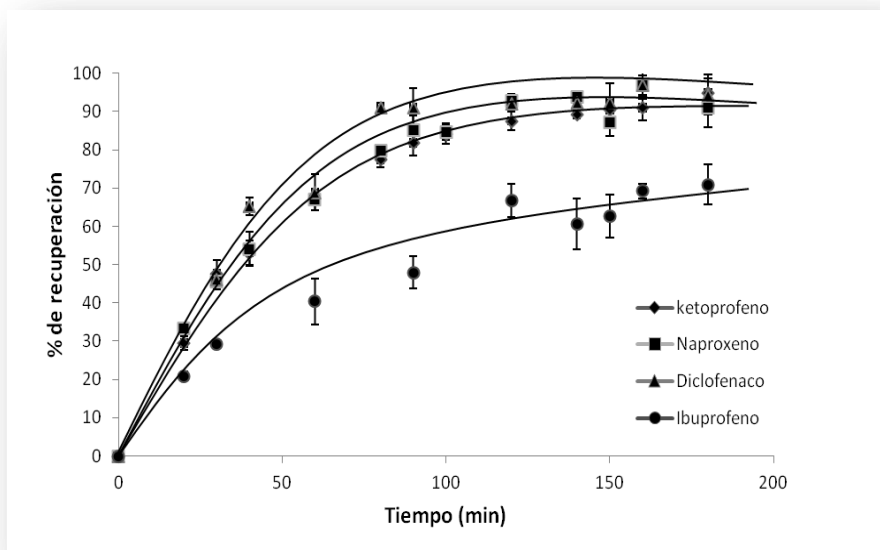


Figura 20. Perfil de extracción de AINEs en 50 mL de muestra, determinado por HPLC-DAD.

En la Figura 20 se puede observar el perfil de extracción de los analitos estudiados entre 5 y 180 minutos en un volumen de muestra de 50 mL. El equilibrio es alcanzado

en un tiempo aproximado de 120 minutos para ketoprofeno, naproxeno y diclofenaco, con recuperaciones sobre el 80%, mientras que ibuprofeno aún no ha alcanzado el equilibrio a ese tiempo, sino a los 150 minutos aproximadamente, con una recuperación del 70%.

Para volúmenes más grandes de muestra de 100 mL, manteniendo constante la concentración de los analitos en solución, se puede observar (Figura 21) que el equilibrio no es alcanzado dentro del intervalo estudiado, esto se debe a que al aumentar el volumen de muestra, incrementa el espacio donde los analitos pueden estar presentes, adquiriendo un mayor tiempo de residencia en la fase acuosa, además al mantener la concentración constante respecto a la utilizada en 50 mL de muestra, la cantidad de los analitos también se ve incrementada siendo necesario aumentar el tiempo de extracción, para lograr que la totalidad de los compuestos lleguen a la fase adsorbente y lograr que estos lleguen al equilibrio. Es por esto que el incremento en el tiempo de extracción, es una variable que va relacionada directamente con el volumen de muestra.

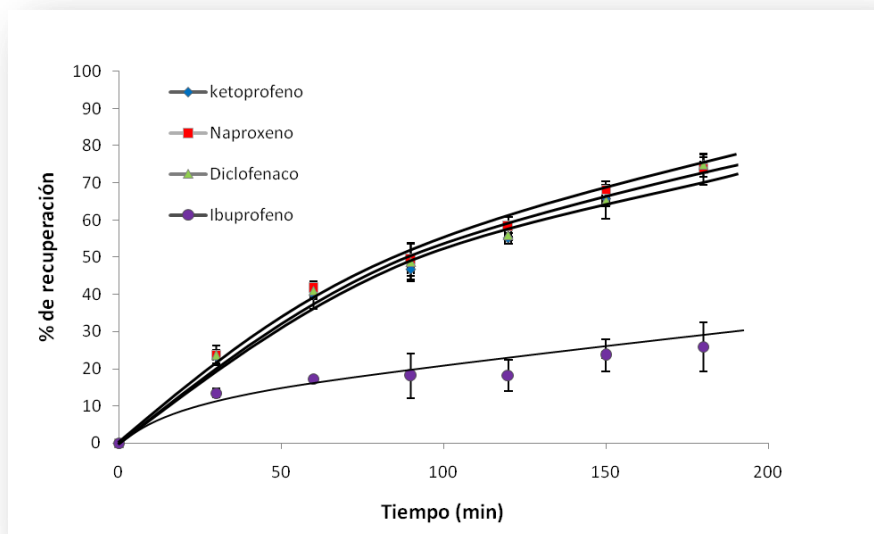


Figura 21. Perfil de extracción de AINEs en 100 mL de muestra, determinado por HPLC-DAD.

4.3.7 Validación del método analítico por HPLC-DAD

4.3.7.1 Parámetros analíticos del método.

Los límites de detección del método fueron determinados a partir de la desviación estándar de 10 muestras a un nivel de concentración de $1 \mu\text{gL}^{-1}$ para ketoprofeno, naproxeno, diclofenaco y $3 \mu\text{gL}^{-1}$ para el ibuprofeno. Se estableció una concentración superior para el ibuprofeno debido a que la señal analítica de éste compuesto es la de menor sensibilidad y a concentraciones como la de los otros fármacos, esta señal no fue detectable, por lo que al calcular el LD y LC en muestras con igual concentración para todos en forma simultánea no sería posible. Los valores obtenidos se pueden observar en la Tabla 6 y se puede observar que el límite de detección más alto corresponde al ibuprofeno, lo que es consecuente con la menor sensibilidad, debido a que necesita mayor cantidad del analito, para provocar un cambio en la señal analítica que sea diferenciable del blanco.

Los valores de exactitud del método obtenidos a través de la recuperación de 10 muestras de 50 mL de agua potable, enriquecida con $5 \mu\text{gL}^{-1}$ de todos los antiinflamatorios y su precisión se pueden observar también en la Tabla 6. Los valores de recuperación tanto para el ketoprofeno, naproxeno y diclofenaco, fueron cercanos al 100%, la precisión expresada como desviación estándar relativa va desde los 2,2 al 9,0% lo que significa que el método sería adecuado para la determinación de AINEs en muestras acuosas.

Tabla 6. Parámetros analíticos del método, determinados por HPLC-DAD.

Analito	Límite de detección (μgL^{-1})	Límite de cuantificación (μgL^{-1})	Exactitud (recuperación, % n=10)	Precisión (RSD, % n=10)
Ketoprofeno	0,16	0,54	100	2
Naproxeno	0,19	0,48	96	8
Diclofenaco	0,21	0,57	100	4
Ibuprofeno	1,18	2,29	67	9

4.3.7.2 Análisis de muestra real

Una vez seleccionada la fase y optimizado el sistema de extracción, se validó el método y se aplicó a una muestra acuosa real obtenida del afluyente de una planta de tratamiento de Santiago (PS-A), donde fue posible identificar ketoprofeno, naproxeno e ibuprofeno, como se puede observar en la Figura 22.

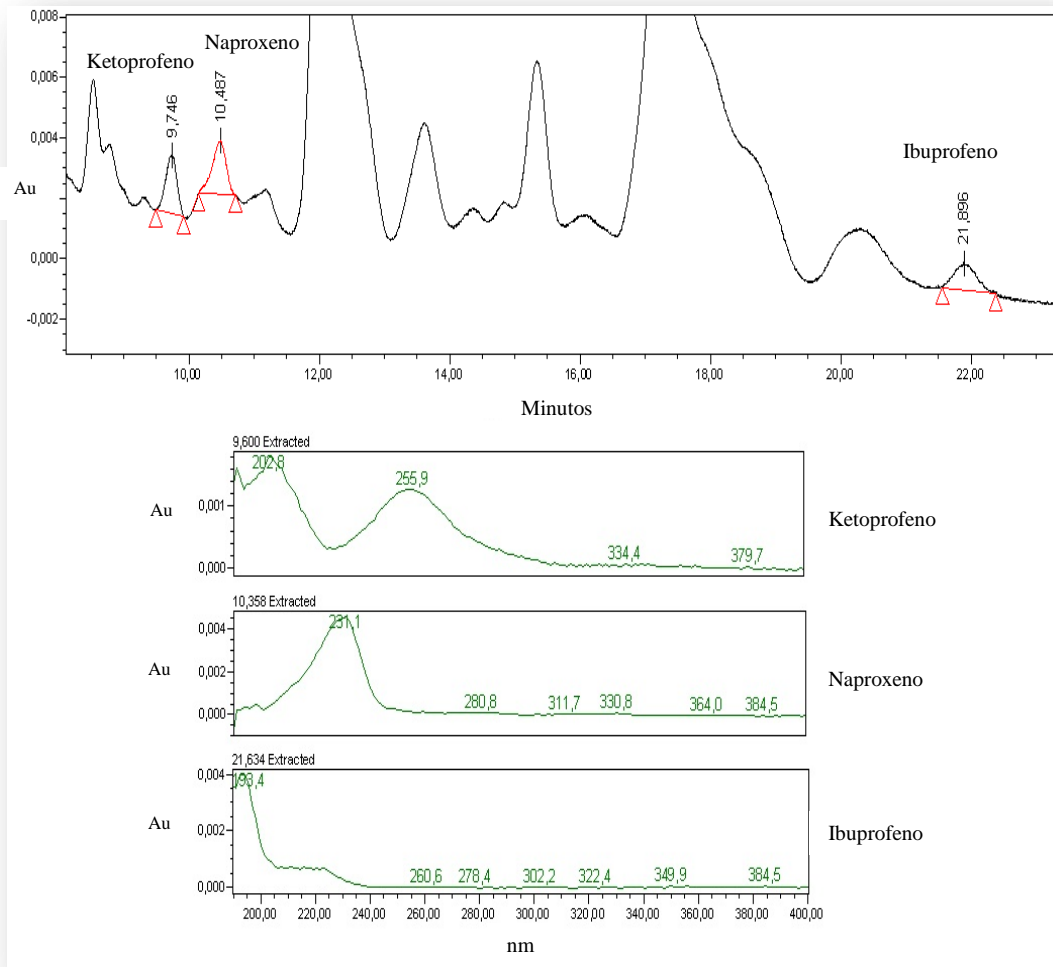


Figura 22. Cromatograma obtenido de la muestra PS1-A y espectros de absorción de ketoprofeno, naproxeno e ibuprofeno por HPLC-DAD

Para el caso del diclofenaco se tiene una interferencia importante aportada por la matriz lo que dificulta su determinación. Es por esta razón que para el análisis de muestras más complejas se hace necesario la utilización de una técnica de determinación más sensible y selectiva como es el caso de la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Para estimar las concentraciones de cada compuesto identificado en la muestra real, fue necesario enriquecer una muestra con estándar de concentración conocida ($10 \mu\text{gL}^{-1}$) y así poder corroborar si la señal analítica se incrementa en forma proporcional a la

cantidad de los analitos agregados. Al realizar este procedimiento la muestra enriquecida mostró una señal mayor a la de la muestra real, como se observa en la Figura 23, sin embargo ésta no se vio incrementada en la cantidad esperada (de acuerdo a la curva de calibración en agua desionizada), ya que se observó un claro efecto matriz, el cual se puede atribuir a la complejidad de la muestra real.

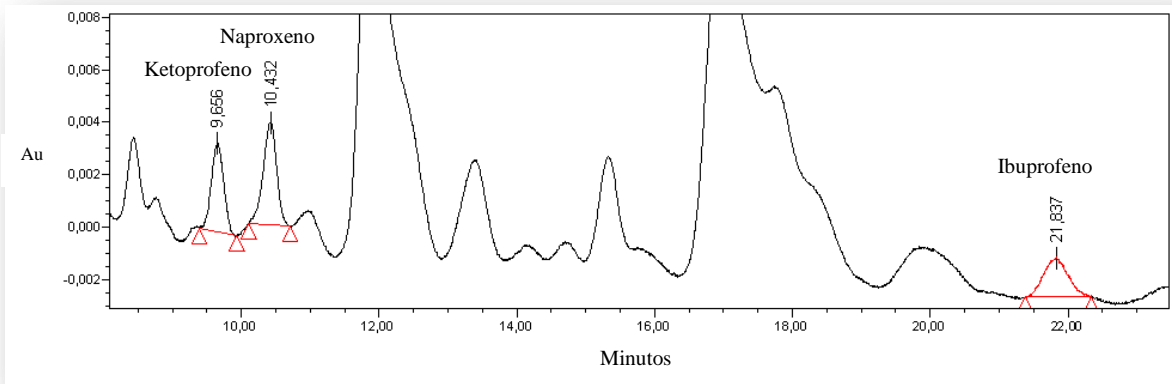


Figura 23. Cromatograma obtenido de la muestra PS1-A enriquecida con $10 \mu\text{gL}^{-1}$ de cada compuesto por HPLC-DAD.

Las concentraciones determinadas sobre la base de la adición estándar de los fármacos identificados en la muestra real se pueden observar en la Tabla 7.

Tabla 7. Concentración determinada de AINEs en muestra PS1-A

Analito	Concentraciones estimadas (μgL^{-1}) PS1-A
Ketoprofeno	$11,1 \pm 0,6$
Naproxeno	$9,1 \pm 0,5$
Diclofenaco	n.d
Ibuprofeno	$8,6 \pm 0,4$

n.d.: no detectado

4.4 Optimización cromatográfica para la separación y cuantificación de los analitos por GC-MS

Debido a la complejidad de las muestras reales provenientes de las plantas de tratamiento de aguas servidas, por la presencia de eventuales interferentes, es necesario contar con una técnica de mayor selectividad que permita la cuantificación de los analitos de interés. Es por esta razón que los extractos de las PTAS (afluentes y efluentes) provenientes del proceso de extracción por RDSE son cuantificados mediante GC-MS, la cual se utiliza como técnica confirmatoria de la presencia de los fármacos en estudio.

Para optimizar el proceso de separación e identificación de los analitos, es necesaria la inyección de estándares de cada uno de los compuestos en estudio para conocer su tiempo de retención y espectro de masas que entrega el equipo. Cabe recordar que los analitos no son volátiles (Tabla 2) por lo tanto se debe derivatizar previo a su inyección.

4.4.1 Proceso de derivatización

Basándose en la revisión bibliográfica sobre procesos de derivatización de estos compuestos, se tienen condiciones optimizadas que permiten realizar pruebas de derivatización, necesarias para poder identificar los compuestos mediante GC-MS. Para ello se colocan en viales ámbar con tapa rosca de 1,8 mL, los 500 μ L del extracto final en acetato de etilo proveniente de la extracción por RDSE y se agregan 20 μ L de agente derivatizante MTBSTFA. Se homogenizó la solución y calentó en un bloque calefactor a 60 °C por 60 minutos. Estas condiciones son usadas en un comienzo para poder identificar los analitos en una muestra estándar de cada fármaco.

Sin embargo, como la derivatización es un paso importante para lograr una señal cromatográfica bien definida y además para volatilizar los compuestos de interés, se evalúan los factores que intervienen en la derivatización con un diseño factorial (2^K), mediante un modelo screening, el número de experimentos N es calculado por la expresión $N= 2^k$, K es el número de variables, los factores a evaluar son: volumen de derivatizante, tiempo y temperatura como se detalla en la Tabla 8.

Tabla 8. Factores que afectan el proceso de derivatización

Factores	Nivel -1	Nivel 0	Nivel +1
A) Volumen MTBSTFA (μL)	20	40	60
B) Tiempo (min)	20	40	60
C) Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	20	40	60

Una vez realizado el tratamiento estadístico de los datos, se obtuvieron los valores de los coeficientes estandarizados para los efectos principales e interacciones, donde se observó que ningún factor fue significativo (95% confianza), como se muestra en el diagrama pareto e interacciones de los factores de la Figura 24. La regresión indicó que se deben utilizar las cantidades máximas descritas en la Tabla 8 (nivel +1). Se puede observar que las condiciones de tiempo y temperatura adecuadas son las mismas que se utilizaron en un comienzo para los ensayos previos, las cuales coinciden con trabajos previos de derivatización de AINEs, pero el volumen de muestra difiere, ya que se establece como óptimo un volumen de 60 μL , sin embargo se decidió seguir utilizando solamente 20 μL , como describen varios autores, ya que este agente derivatizante presenta un alto costo y como dicho factor no es significativo, es posible utilizar la mínima cantidad (nivel -1).

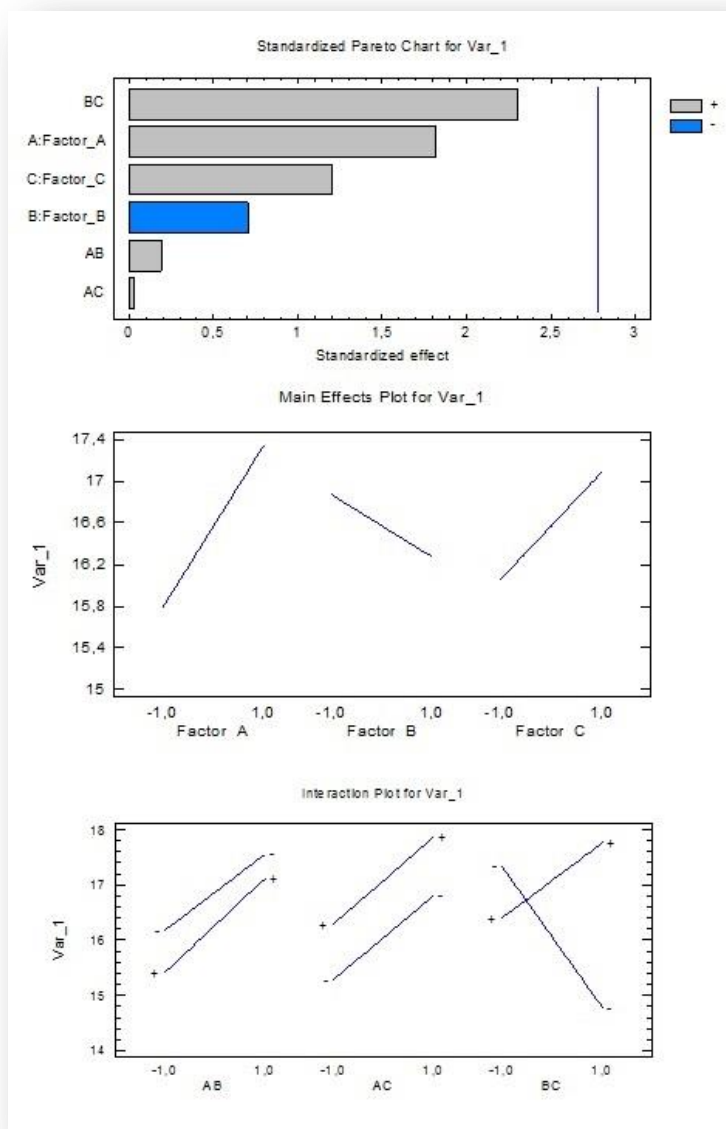


Figura 24. Carta pareto y grafica de interacciones para AINEs en estudio.

Una vez establecidas estas condiciones, se evaluó la precisión en el proceso de derivatización de 12 muestras con una concentración de 2 mgL^{-1} , donde se obtuvo valores de desviación estándar relativa (RSD) entre un 2 a un 10%. Por lo tanto, las condiciones finales de derivatización se mantuvieron como las utilizadas en los ensayos preliminares, considerando $20\mu\text{L}$ de agente derivatizante sobre el extracto de $500 \mu\text{L}$, en un bloque calefactor a 60°C por 60 minutos.

4.4.2 Condiciones cromatográficas e identificación de los analitos por GC-MS

La inyección por separado de los estándares puros de los fármacos en estudio permitió obtener el tiempo de retención de cada uno y sus espectros de masas. Posteriormente se inyectó un multiestándar de concentración 2 mgL^{-1} que contiene los seis analitos más un estándar interno que corrige la inyección y dos estándares subrogantes que permiten corregir el proceso de extracción. Se utilizó hexaclorobenceno (HCB) como estándar interno, fenoprop (FENO) y ácido meclofenámico (MECLO) como estándares subrogantes. En la Figura 25 se puede observar el cromatograma del multiestándar de 2 mgL^{-1} .

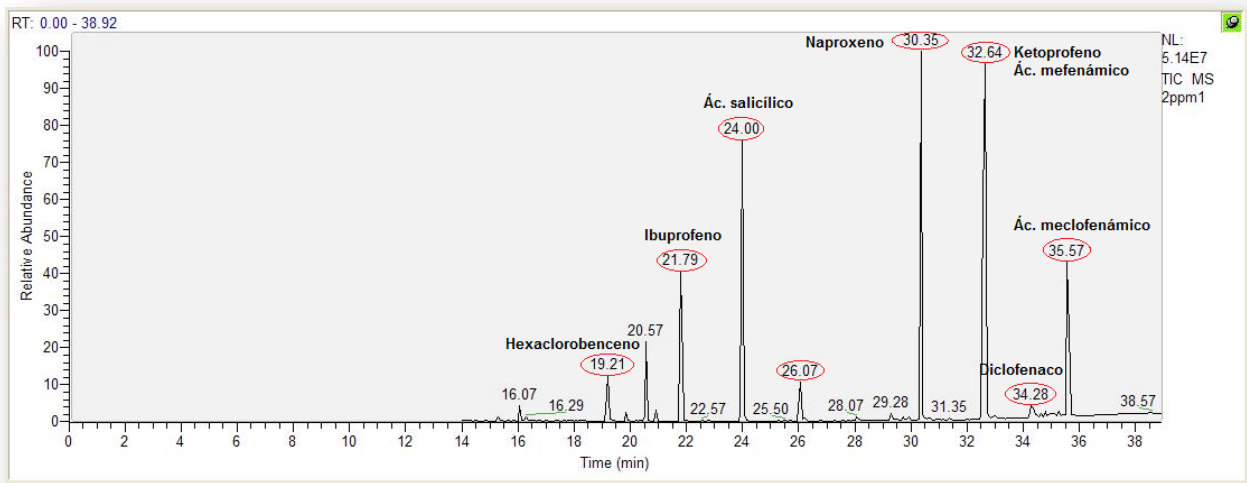


Figura 25. Cromatograma correspondiente a un multiestándar de 2 mgL^{-1} de AINEs, por GC-MS.

El programa de temperaturas del horno inicia en $100 \text{ }^\circ\text{C}$, se mantiene por 1 minuto, alcanzando los $280 \text{ }^\circ\text{C}$ a razón de $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, el tiempo total de la corrida cromatográfica es de 39 min, el *solvent delay* es de 14 minutos, la línea de transferencia a $250 \text{ }^\circ\text{C}$, la fuente de ionización a $200 \text{ }^\circ\text{C}$, el flujo del gas portador es de $1 \text{ mL}/\text{min}$ y la temperatura del inyector es de $240 \text{ }^\circ\text{C}$ en modalidad splitless (sin división).

Mediante el análisis del cromatograma se obtuvieron los tiempos de retención de los analitos en estudio y sus iones de cuantificación e identificación (m/z), como se puede observar en la Tabla 9.

Tabla 9. Tiempo de retención e iones m/z seleccionados para cada analito, mediante GC-MS.

ANALITO	Tiempo de retención (t_R)	m/z
Hexaclorobenceno (EI)	19,21	284, 286
Ácido acetilsalicílico	20,57	195, 237
Ibuprofeno	21,78	263, 264
Ácido salicílico	24,00	309, 310
Fenoprop (ES)	26,07	253, 281, 327
Naproxeno	30,35	287, 288
Ketoprofeno	32,64	311, 312
Ácido mefenámico	32,75	298, 224
Diclofenaco	34,28	352, 354
Ácido meclofenámico (ES)	35,57	243, 244, 352

EI: Estándar interno; ES: Estándar surrogate

4.4.3 Curvas de calibración

Las curvas de calibración obtenidas de cada analito se muestran en la Figura 26, ésta se realizó con valores de concentración de 0,5 a 2000 µgL⁻¹. Este rango es mayor que para el caso del análisis por HPLC-DAD ya que se espera lograr una mayor sensibilidad y lograr detectar concentraciones más bajas, debido a la eliminación de interferencias aportadas por la matriz en el caso de muestras más complejas. Los resultados obtenidos de las curvas de calibración se muestran en la Figura 26 y Tabla 10.

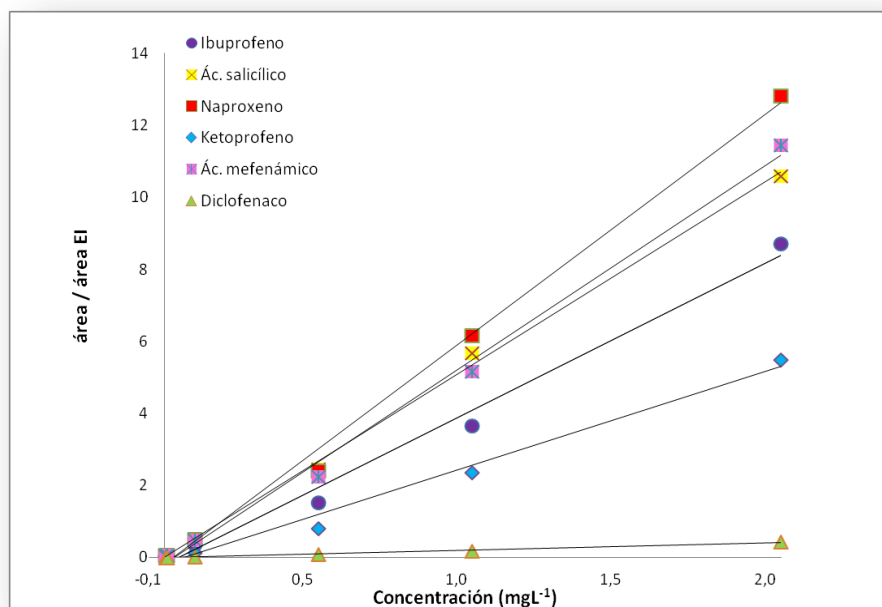


Figura 26. Curva de calibración de los AINEs en estudio, determinado por GC-MS

Tabla 10. Parámetros obtenidos de las curvas de calibración, determinados por GC-MS

ANALITO	Pendiente (sensibilidad) mgL ⁻¹	R
Ibuprofeno	4,2971	0,9902
Ác. acetilsalicílico	5,3581	0,9975
Naproxeno	6,4208	0,9950
Ketoprofeno	2,7374	0,9835
Ác. mefenámico	5,6816	0,9943
Diclofenaco	0,2117	0,9907

En el caso de diclofenaco se puede observar una menor sensibilidad (pendiente), respecto a los demás analitos, seguido de ketoprofeno, mientras que naproxeno es el analito que presenta una mayor sensibilidad, seguido de ácido mefenámico, ácido salicílico e ibuprofeno. En la Tabla 10 podemos observar que el valor R muestra una buena correlación de todos los analitos entre sus concentraciones y la señal obtenida en GC-MS.

4.4.4. Validación del método analítico por GC-MS

4.4.4.1 Parámetros analíticos del método.

Los límites de detección y cuantificación del método fueron determinados a partir de la desviación estándar de 10 muestras a un nivel de concentración cercanas al ruido de $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$, de la misma forma que se realizó por HPLC-DAD. Los valores obtenidos se pueden observar en la Tabla 11, y cabe mencionar que el límite de detección más alto corresponde al diclofenaco, lo que es consecuente con la menor sensibilidad, debido a que necesita mayor cantidad del analito, para provocar un cambio en la señal analítica que sea diferenciable del blanco. También es importante destacar que los límites de detección son entre uno a dos órdenes de magnitud (según cada compuesto) más bajos que los obtenidos por HPLC-DAD.

Los valores de exactitud del método obtenidos a través de la recuperación de 10 muestras de agua potable, enriquecida con $5 \mu\text{gL}^{-1}$ de todos los antiinflamatorios y su precisión se pueden observar también en la Tabla 11. Los valores de recuperación van entre 71-104 % con una precisión expresada como desviación estándar relativa interdisco que va desde 2 al 8% lo que significa que el método sería adecuado para la determinación de AINEs en muestras acuosas.

Tabla 11. Parámetros analíticos del método, determinados por GC-MS.

Analito	Límite de detección (μgL^{-1})	Límite de cuantificación (μgL^{-1})	Exactitud (recuperación, % n=10)	Precisión (RSD, % n=10)
Ibuprofeno	0,002	0,007	87	8
Ác. acetilsalicílico	0,001	0,003	90	6
Naproxeno	0,007	0,024	94	4
Ketoprofeno	0,011	0,036	104	4
Ác. mefenámico	0,006	0,019	99	2
Diclofenaco	0,033	0,109	71	2

La precisión también se determinó mediante el uso secuencial del mismo disco de extracción (que contiene la misma fase sorbente, sin cambios), con varias alícuotas de la misma muestra de $5 \mu\text{gL}^{-1}$ de fármacos ($n=5$). En estas condiciones de extracción se obtuvo un RSD intradisco entre 6 y 13% para cinco procedimientos de extracción consecutivos, lo que indica claramente que la fase sorbente Oasis™ HLB podría ser reutilizada al menos cinco veces. Un mayor número de ciclos de adsorción-elución dio lugar a un RSD mayor al 18%.

4.4.4.2 Análisis muestras reales

En cuanto al análisis de la muestra real del afluyente PS1-A determinada anteriormente por HPLC-DAD (Figura 22 y 23), podemos observar en la Figura 27 que se logran identificar los 6 fármacos en estudio mediante GC-MS, sin la interferencia que se observaba para el caso del diclofenaco por HPLC-DAD. Las concentraciones determinadas por GC-MS se pueden observar en la Tabla 12 y son del mismo orden de magnitud a las obtenidas para ketoprofeno, naproxeno e ibuprofeno mediante HPLC-DAD.

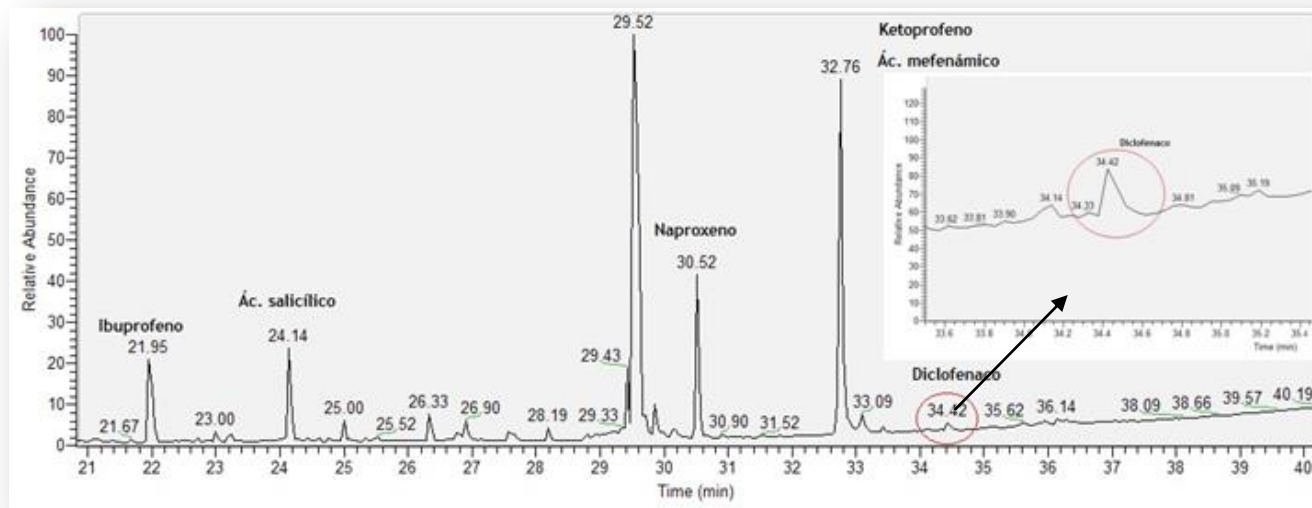


Figura 27. Cromatograma obtenido de la muestra PS1-A por GC-MS

Tabla 12. Concentración determinada de fármacos en muestra PS1-A por GC-MS y su comparación por HPLC-DAD.

ANALITO	Concentración estimada (μgL^{-1}) PS1-A / GC-MS	Concentración estimada (μgL^{-1}) PS1-A / HPLC-DAD
Ibuprofeno	2,1 \pm 0,3	8,6 \pm 0,4
Ácido acetilsalicílico*	2,8 \pm 0,5	----
Naproxeno	3,9 \pm 0,3	9,1 \pm 0,5
Ketoprofeno	13,4 \pm 0,6	11,1 \pm 0,6
Ácido mefenámico	8,4 \pm 0,5	----
Diclofenaco	1,5 \pm 0,1	n.d

*Determinado como la suma de ácido acetilsalicílico y ácido salicílico; n.d: no detectado; -- sin analizar

Además se realizó el análisis de una segunda muestra real del afluyente de otra planta de tratamiento de Santiago (PS2-A) donde también se logró identificar los antiinflamatorios en estudio, como se puede observar en la Figura 28 y las concentraciones estimadas se muestran en la Tabla 13.

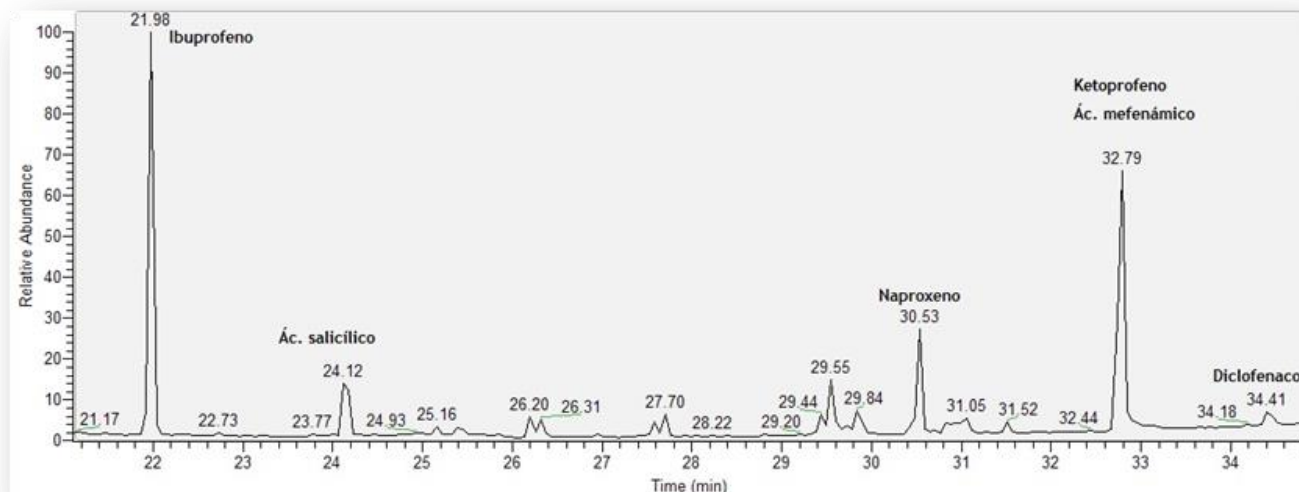


Figura 28. Cromatograma obtenido de la muestra PS2-A por GC-MS

Tabla 13. Concentración determinada de fármacos en muestra PS2-A por GC-MS

ANALITO	Concentración estimada (μgL^{-1}) PS2-A/GC-MS
Ibuprofeno	$6,7 \pm 0,5$
Ácido acetilsalicílico*	$11,4 \pm 0,4$
Naproxeno	$4,7 \pm 0,3$
Ketoprofeno	$5,2 \pm 0,6$
Ácido mefenámico	$2,3 \pm 0,5$
Diclofenaco	$2,8 \pm 0,7$

Además del análisis de los extractos provenientes de la extracción por disco rotatorio (RDSE) de las muestras del afluyente de la plantas de tratamiento de aguas servidas, fue posible el análisis de una muestra real proveniente del efluente de la planta PS1 con el fin de comparar la eficiencia de la planta de tratamiento en la eliminación de este tipo de contaminantes emergentes. En la Figura 29A se puede observar el cromatograma obtenido de la muestra real (efluente) PS1-E y en la Figura 29B la misma muestra

enriquecida con 2 mgL^{-1} de fármacos para corroborar las señales. En la Tabla 14 se observan las concentraciones obtenidas luego de la extracción por RDSE.

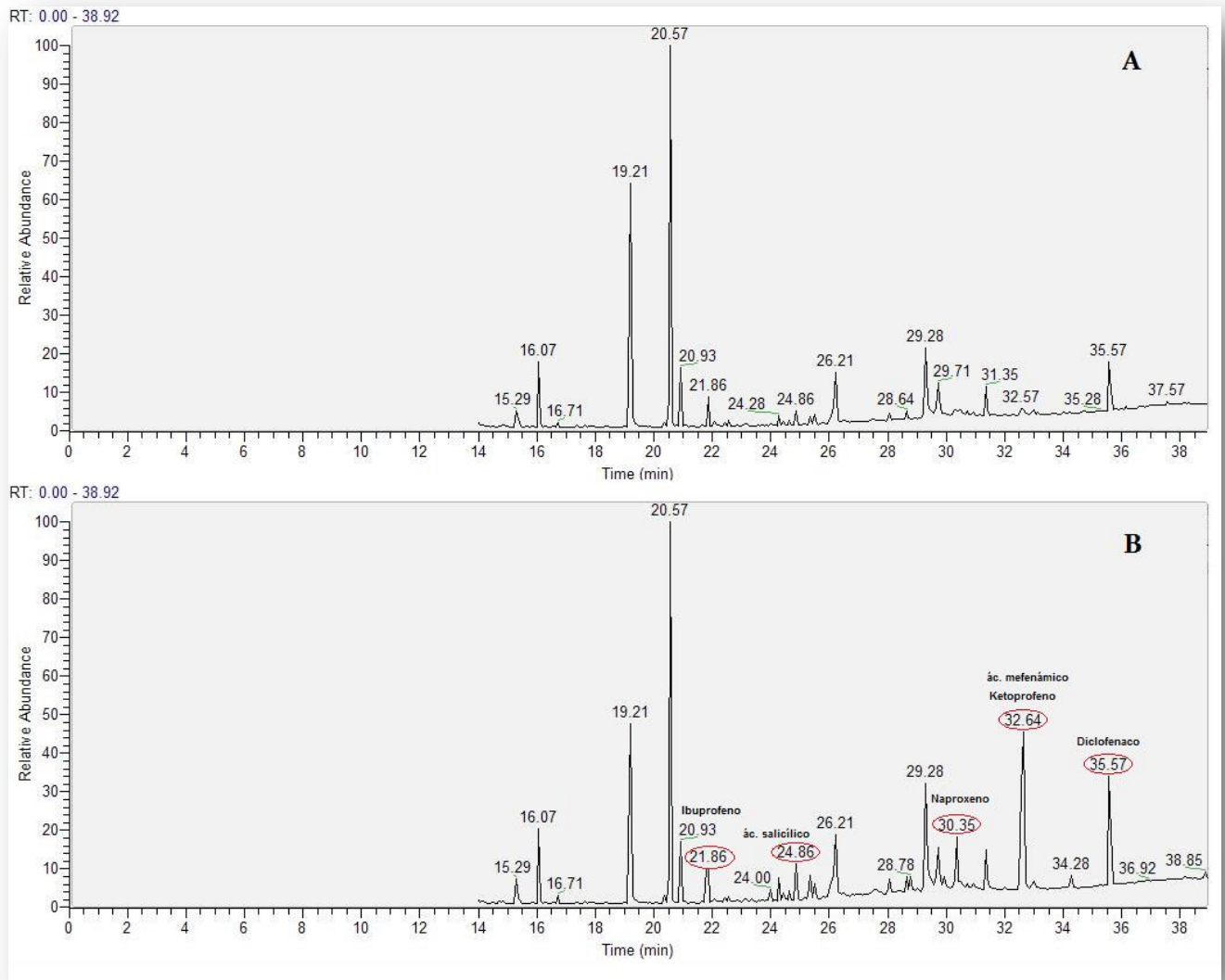


Figura 29. A: Cromatograma obtenido de la muestra PS1-E por GC-MS. **B:** Cromatograma obtenido de la muestra PS1-E por GC-MS enriquecido con 2 mgL^{-1} de multiestándar de fármacos.

Tabla 14. Concentración determinadas de fármacos en muestra PS1-E

ANALITO	Concentración estimada (μgL^{-1})
Ibuprofeno	$1,43 \pm 0,05$
Ácido acetilsalicílico*	$1,01 \pm 0,13$
Naproxeno	$1,44 \pm 0,07$
Ketoprofeno	$2,32 \pm 0,41$
Ácido mefenámico	$1,99 \pm 0,25$
Diclofenaco	$1,30 \pm 0,35$

Se puede observar tanto en la Figura 29 como en la Tabla 14, donde se expresan las concentraciones determinadas, que la planta de tratamiento PS1 no logra la eliminación completa de los AINEs que ingresan a la planta a través de las aguas servidas de la ciudad de Santiago.

Es importante destacar con este estudio que existe actualmente en nuestra ciudad un importante ingreso de los AINEs estudiados a sistemas acuáticos, por diferentes vías de incorporación constante, los cuales se encuentran clasificados como contaminantes emergentes y que las plantas de tratamiento de aguas servidas no están diseñadas para la eliminación o retención de estos compuestos, sin señalar sus metabolitos generados producto de la transformación del compuesto original, los cuales no han sido foco de estudio de este trabajo.

4.5 Comparación del método de extracción RDSE con Extracción en fase sólida (SPE).

Las extracciones con cartuchos de OASIS® HLB por extracción en fase sólida (SPE) han sido realizadas para las muestras de las plantas de tratamiento PS1, tanto afluente como efluente. El protocolo utilizado es el descrito en la publicación de Santos y col. (2005) ⁽⁶¹⁾ y los resultados obtenidos se observan en la Tabla 15, en comparación con los resultados obtenidos mediante extracción con RDSE.

Al comparar los resultados obtenidos por RDSE y SPE, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) para la mayoría de los casos, utilizando un test t para muestras pareadas.

Tabla 15. Concentración determinadas de fármacos en muestra real (afluente y efluente) PS1-A y PS1-E, mediante SPE y su comparación con RDSE.

Analito	Concentraciones encontradas ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	SPE		RDSE	
	PS1-A	PS1-E	PS1-A	PS1-E
Ibuprofeno	3.0 \pm 0.5	1.8 \pm 0.1	2.1 \pm 0.3	1.4 \pm 0.1
Ácido acetilsalicílico*	2.5 \pm 0.5	0.8 \pm 0.2	2.8 \pm 0.5	1.0 \pm 0.1
Naproxeno	3.5 \pm 0.2	1.1 \pm 0.1	3.9 \pm 0.3	1.4 \pm 0.1
Ketoprofeno	12.3 \pm 0.9	2.7 \pm 0.1	13.4 \pm 0.6	2.3 \pm 0.4
Ácido mefenámico	6.3 \pm 0.2	1.2 \pm 0.1	8.4 \pm 0.5	2.0 \pm 0.3
Diclofenaco	1.3 \pm 0.1	1.1 \pm 0.2	1.5 \pm 0.1	1.3 \pm 0.4

* Determinado como la suma de ácido acetilsalicílico y ácido salicílico

Al comparar RDSE con su contraparte SPE, es posible destacar que RDSE es una técnica más simple que no requiere bomba de vacío ni sucesivos pasos de limpieza (con metanol y n-hexano) como es el caso de SPE. Adicionalmente, la configuración del disco permite la reutilización de la fase sorbente por al menos cinco ciclos de adsorción-elución, como se indicó anteriormente. Sin embargo, la principal desventaja de RDSE es un mayor tiempo involucrado en la extracción, en comparación con SPE (90 vs. 45 min aprox).

4.6 Mips como fase sorbente alternativa

Como se mencionó anteriormente, los polímeros de impresión molecular tienen como una de sus principales características entregar una mayor selectividad, logrando retener en su estructura polimérica analitos afín con la plantilla utilizada en la síntesis.

Se realizó un estudio sobre la microextracción de AINEs (diclofenaco y ácido mefenámico) desde muestras acuosas mediante RDSE con fase sorbente de MIP y NIP.

De la misma forma que para la fase sorbente Oasis® HLB, se realizó un estudio de variables involucradas en el proceso de microextracción y los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 16.

Tabla 16. Variables en estudio con fase MIP

Variable	Rango de estudio	Valor óptimo
Cantidad de fase (mg)	25-65	25
Velocidad de rotación (rpm)	0-3000	3000
pH	2-12	2
Volumen de muestra (mL)	50-250	50
Tiempo de extracción (min)	0-200	60
Tiempo de desorción (min)	5-20	10
Volumen derivatizante (µL)	20-60	20
Tiempo derivatización (min)	20-60	60
Temperatura derivatización (°C)	40-80	60

Para la selección de los analitos se llevo a cabo la extracción con polímero sin plantilla (NIP) y con plantilla de difenilamina (MIP). En la Figura 30 se observa una diferencia significativa en la recuperación entre el NIP y el MIP (entre un 18 y 19 %), en los compuestos cuya estructura es afín a la plantilla de difenilamina, como es el caso de diclofenaco y ácido mefenámico.

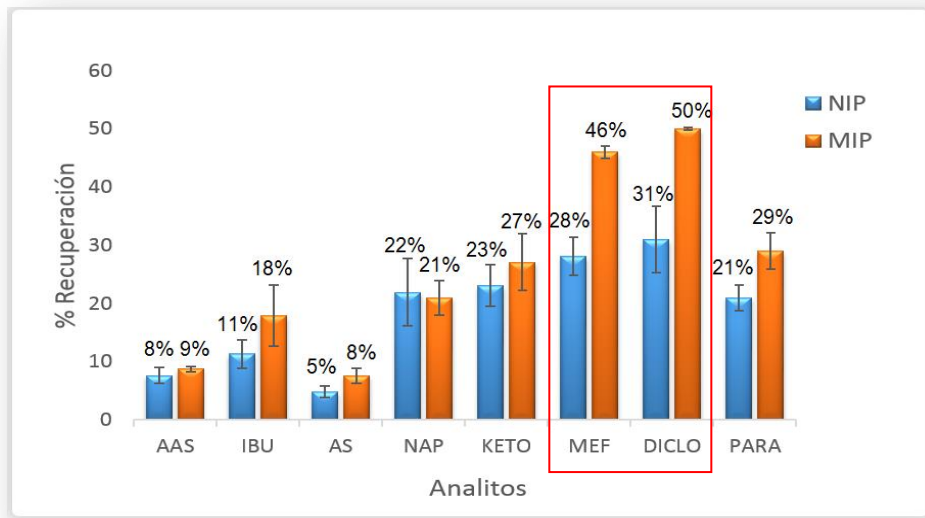


Figura 30. Selección de los analitos afines con la plantilla del MIP

Además es importante destacar que la fase sorbente de MIP se puede reutilizar hasta 6 ciclos de sorción/desorción, ya que al séptimo ciclo las recuperaciones disminuyen en un 33% (Fig. 31).

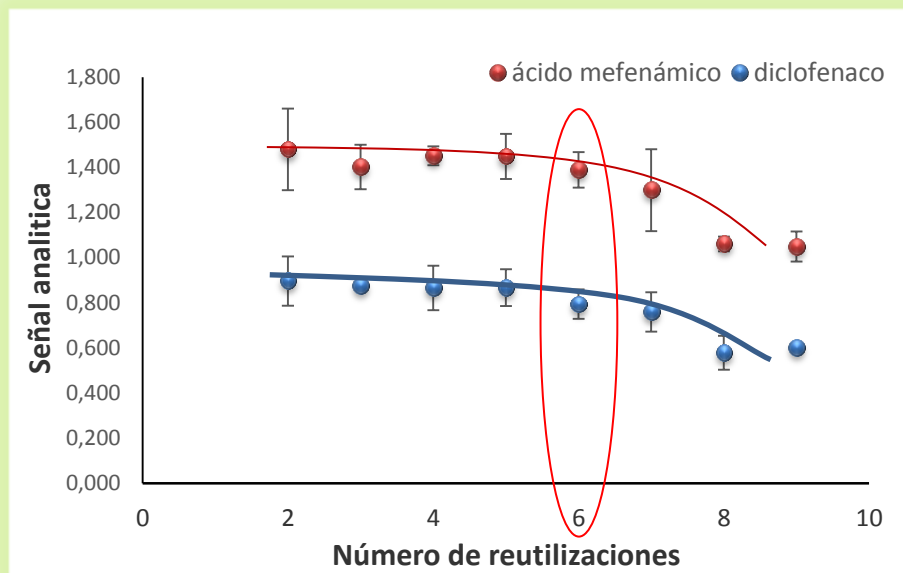


Figura 31. Reutilización de la fase sorbente MIP, determinado por GC-MS.

Se obtuvo que la fase sorbente de MIP extrae en promedio 3 veces más que el NIP para diclofenaco y ácido mefenámico, por lo tanto es posible observar el efecto plantilla de la molécula impresa de difenilamina.

4.6.1 Validación del método analítico usando MIP

En la Tabla 17 se observan los límites de detección y cuantificación, precisión y recuperación del método.

Usando un disco para cada muestra, los valores de recuperación oscilan entre 99-100% con desviaciones estándar relativa interdisco (RSD) entre 5 - 6%. Se determinó también la precisión mediante el uso secuencial del mismo disco de extracción (que contiene la misma fase sorbente) para diferentes alícuotas de la misma muestra con concentraciones de 20 µg/L-1 (n = 6). La RSD intradisco en estas condiciones no difiere mucho con la interdisco, variando entre 4 - 6 %.

Tabla 17. Parámetros analíticos del método usando MIP

Analito	Linealidad (r)	Límite de detección (μgL^{-1})	Limite de cuantificación (μgL^{-1})	Exactitud (recuperación, % n=6)	Precisión (RSD, % n=6)
Diclofenaco	0.9987	0.067	0.223	99	5
Acido mefenámico	0.9964	0.060	0.200	100	6

4.6.2 Análisis de muestra real

Se realizó el análisis de una muestra real acuosa obtenida de una planta de tratamiento de Santiago, PS1-A y PS1-E (la misma utilizada en análisis anteriores). Además se compararon los resultados obtenidos por el método propuesto con los obtenidos a través del procedimiento de extracción en fase solida (SPE) por cartuchos de MIP comerciales (SupelMIP™ NSAIDs SPE Column, Supelco) siguiendo el protocolo descrito por Zorita ⁽⁷⁸⁾, método publicado para la remoción de antiinflamatorios no esteroideos con un sorbente de este tipo.

La concentración de los fármacos encontrados en el afluente y el efluente por ambos métodos se pueden ver en la Tabla 18.

Tabla 18. Concentración de fármacos en agua de la planta de tratamiento determinadas mediante RDSE y SPE.

Analito	Concentración encontrada (μgL^{-1})			
	<u>RDSE-MIP</u>		<u>SPE-MIP</u>	
	Afluente (PS1-A)	Efluente (PS1-E)	Afluente (PS1-A)	Efluente (PS1-E)
Ácido mefenámico	4.3 ± 0.3	2.8 ± 0.1	4.3 ± 0.2	2.5 ± 0.2
Diclofenaco	1.8 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.9 ± 0.2	1.5 ± 0.1

Al comparar los resultados de las concentraciones del afluente y el efluente obtenidos por la técnica RDSE y la comercializada SPE, no se observan diferencias significativas ($p > 0,05$) (test t muestras pareadas). Sin embargo la técnica del disco con la fase MIP demuestra ser más específica para los analitos antes señalados debido a la afinidad con la plantilla.

4.7 Automatización

Se seleccionaron como analitos modelo para el diseño propuesto cuatro AINEs: ketoprofeno, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno y se determinaron mediante cromatografía líquida (HPLC-DAD).

El sistema dinámico programable creado se puede observar en la Figura 32 y en la Tabla 19 se describe el procedimiento experimental.

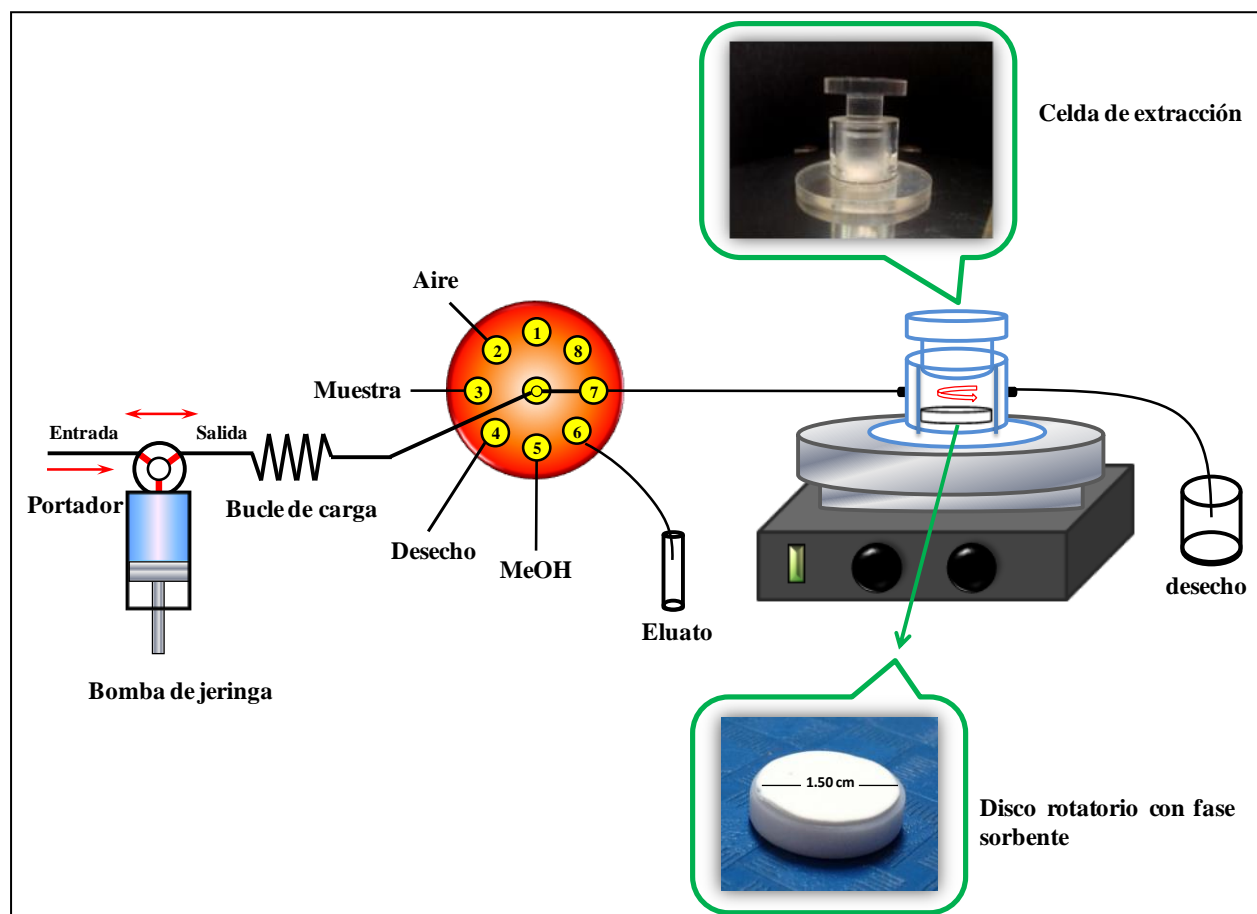


Figura 32. Descripción esquemática del sistema automático de microextracción por sorción con disco rotatorio basado en un flujo dinámico para la microextracción de AINEs en orina (SI-RDSE)

Tabla 19. Etapas del procedimiento de extracción dinámica programable (SI-RDSE)

Etapa	Secuencia y descripción del procedimiento de microextracción dinámica			
	Orden	Volumen (mL) / Flujo (mL min ⁻¹)	Tiempo (min)	Velocidad de rotación (rpm)
1.	Aspirar (P3) y empujar (P7) muestra hacia la celda	10 mL / 1 mL min ⁻¹	10	1600
2.	Aspirar (P2) y empujar (P7) aire hacia la celda	2 mL / 2 mL min ⁻¹	1	1600
3.	Aspirar (P5) y empujar (P7) metanol hacia la celda	1.2 mL / 1 mL min ⁻¹	1.2	1600
4.	Esperar 1 minuto			1600
5.	Aspirar (P7) y empujar (P6) metanol hacia vial de recolección			
6.	Repetir Etapas 3, 4 y 5 una vez			
7.	Aspirar (BC) y empujar (P7) carrier hacia la celda	5 mL / 5 mL min ⁻¹	1	1600
8.	Aspirar (P7) y empujar (P4) carrier hacia desecho	5 mL / 5 mL min ⁻¹	1	1600
9.	Repetir Etapa 3 una vez			

* P: Ubicación en la válvula de multiposición del sistema SIA

* BC: Bucle de carga o "Holding coil"

* Carrier o portador: HCL 0.1 M

4.7.1 Selección de la fase sorbente para SI-RDSE

Se realizó un estudio comparativo entre dos fases sorbente (C18 y SDB-RPS) (Tabla 20) dando como resultados que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) en la eficiencia de extracción ketoprofeno, naproxeno y diclofenaco, bajo condiciones de extracción dinámicas. Sin embargo, para el caso de ibuprofeno si se observaron diferencias significativas entre las dos fases sorbentes siendo la fase C18 la que presenta mayor porcentaje de recuperación de este compuesto. Estos resultados concuerdan con lo esperado ya que la fase sorbente SDB-RPS retiene preferentemente analitos con un menor K_{ow} que el ibuprofeno ⁽⁷⁹⁾. En consecuencia se selecciona la fase C18 ya que provee una mayor eficiencia de extracción para el conjunto de los fármacos en estudio. Sin embargo SDB-RPS se presenta como una buena alternativa a C18 para analitos más hidrofílicos debido a su naturaleza mixta como resultado de los grupos sulfonatos presentes en el polímero.

Tabla 20. Eficiencia de extracción del procedimiento dinámico SI-RDSE con fases sorbentes de diferente naturaleza fisicoquímica.

Analito	t_r (min)	Eficiencia de extracción, %	
		C ₁₈ (n=6)	SDS-RP (n=6)
Ketoprofen	4.44	61 ± 3	64 ± 2
Naproxen	5.28	65 ± 2	62 ± 5
Diclofenac	12.02	65 ± 3	64 ± 4
Ibuprofen	13.48	57 ± 3	50 ± 4

* t_r : Tiempo de retención

* Volumen de muestra: 5 mL agua MilliQ a pH 2

* Eluyente: 2.4 mL metanol

4.7.2 Estudio de variables experimentales

Dentro de las variables experimentales involucradas en el sistema de microextracción dinámico, se estudiaron el volumen de muestra y eluyente, tiempo de elución y modo de elución, con el fin de obtener una máxima eficiencia de extracción (EF) y / o factores de enriquecimiento (FE).

La muestra dopada con 1 mg L^{-1} de fármacos se ajustó a pH 2 ⁽⁸⁰⁾ para asegurar que los analitos se encuentren en su forma protonada. Las etapas de carga y de elución de la muestra fueron ejecutadas a una velocidad de flujo programada de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ con una velocidad de rotación del disco de 1600 rpm.

Como se demuestra en los resultados experimentales de la Figura 33, cuanto mayor sea el volumen de muestra en un rango de 2,5 a 25 ml, mejores son los factores de enriquecimiento de los fármacos en estudio, alcanzando porcentajes de recuperación en un rango de 34-58% para volúmenes de 5,0 a 25 mL. Aunque a volúmenes de muestra sobre 20 mL los factores de enriquecimiento resultaron superiores a 40, los tiempos de extracción aumentan 20 a 30 minutos más que al utilizar 10 mL de muestra. Finalmente se seleccionó un volumen de muestra de 10 mL bombeado en un flujo unidireccional desde el sistema SIA hacia la celda de extracción que contiene el disco rotatorio.

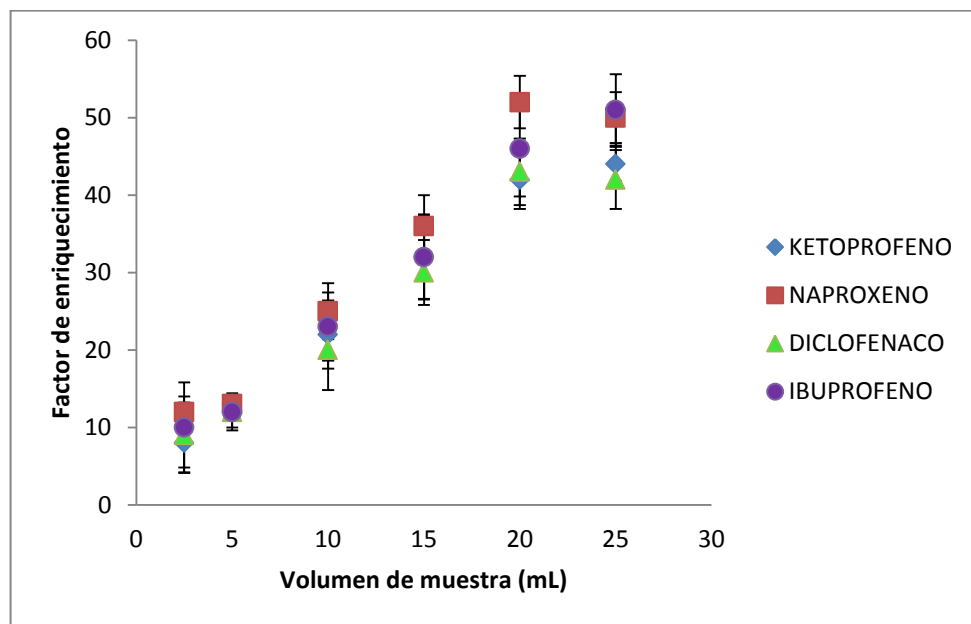


Figura 33. Factor de enriquecimiento (FE) para diferentes volúmenes de muestra. Flujo 1 mL min^{-1} , 1 mg L^{-1} de fármacos (cuatro réplicas).

Para la elución de los analitos se estudiaron volúmenes de metanol entre 0,5 y 1,2 mL en cuatro eluciones consecutivas en modo de flujo detenido por 5 minutos cada uno. Las recuperaciones absolutas aumentaron con mayores volúmenes de metanol. Un volumen de eluyente de 0,5 mL no fue suficiente para llenar completamente la celda de extracción dejando un volumen muerto que provocó la aparición de burbujas de aire durante la agitación, impidiendo la recuperación cuantitativa de los analitos. Otros experimentos demostraron que dos eluciones consecutivas de 1,2 mL de metanol cada una, fueron suficientes para una recuperación exhaustiva de los AINEs con efectos de memoria sobre el disco insignificantes. Además, no se observaron diferencias significativas (nivel de confianza del 99,5%) en las recuperaciones con tiempos de elución a flujo detenido en el rango de 1 a 5 min. Por lo tanto el tiempo de elución seleccionado fue de un minuto para estudios posteriores.

4.7.3 Parámetros analíticos

Los parámetros analíticos del procedimiento dinámico SI-RDSE para AINEs se muestran en las Tablas 21 y 22. Las recuperaciones absolutas, factores de enriquecimiento y reproducibilidad evaluados en agua desionizada con una concentración de 0,2 mg L⁻¹ de cada fármaco se pueden observar en la Tabla 21.

Tabla 21. Eficiencia de extracción y reproducibilidad para la determinación de AINEs (0.2 mg L⁻¹) en agua desionizada a pH 2.

Analito	Eficiencia de extracción (%)	Precisión (% RSD, n=8)	Factor enriquecimiento (EF)
Ketoprofeno	52	3.2	25
Naproxeno	58	3.3	28
Diclofenaco	55	7.0	27
Ibuprofeno	49	3.9	24

Se obtuvieron eficiencias de extracción en un rango de 49 a 58% con RSDs de 3,2-7% y factores de enriquecimiento promedio de 26 ± 2. Las eficiencias de extracción y por consecuencia los factores de enriquecimiento disminuyeron significativamente en muestras de orina debido al efecto matriz (Tabla 22).

Tabla 22. Eficiencia de extracción y reproducibilidad para la determinación de AINEs (0.2 mg L^{-1}) en orina a pH 2.

Analito	Eficiencia de extracción (%)	Precisión (% RSD, n=8)	Factor enriquecimiento (EF)
Ketoprofeno	30	3.1	15
Naproxeno	33	1.3	16
Diclofenaco	38	3.2	18
Ibuprofeno	36	2.4	18

La cuantificación de los analitos en orina se puede realizar utilizando una curva de calibración con ajuste matricial o mediante el uso estándares subrogantes (por ejemplo, fenoprop) según lo recomendado en estudios previos para la determinación de AINEs en lodos⁽⁸¹⁾ y aguas residuales^(80,82). La primera alternativa fue seleccionada para este estudio ya que el fenoprop presentó un comportamiento de extracción ligeramente diferente a los demás fármacos al someterlo al procedimiento dinámico de extracción.

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC), porcentajes de recuperación y precisión, se pueden observar en la Tabla 23.

Tabla 23. Parámetros analíticos del método SI-RDSE en orina

Analito	Linealidad (r)	Concentración (mg L^{-1})	Recuperación (%)	Precisión (% RSD, n=8)	LD (mg L^{-1})	LC (mg L^{-1})
Ketoprofeno	0.9995	0.2–2.0	101	5.1	0.0355	0.1184
Naproxeno	0.9999	0.2–2.0	102	4.2	0.0253	0.0843
Diclofenaco	0.9992	0.2–2.0	106	2.8	0.0217	0.0724
Ibuprofeno	0.9996	0.2–2.0	104	5.9	0.0440	0.1466

Se obtuvo valores de LD entre 0.022 y 0.044 mg L^{-1} y LC entre 0.072 y 0.146 mg L^{-1} . Las recuperaciones relativas fueron obtenidas en muestras de orina enriquecidas con 0.2 mg L^{-1} de fármacos. Las recuperaciones obtenidas estuvieron en un rango de 101 a 106% con desviaciones estándares relativas entre 2.8 y 5.9%.

4.7.4 Determinación de AINEs en muestra real de orina

Se analizaron muestras de orina después de la administración oral de ibuprofeno (600mg) o diclofenaco (50mg), ambas cápsulas obtenidos del laboratorio CINFA. Las muestras de orina fueron recolectadas a los 180 y 300 minutos luego de su administración. Según la información disponible en literatura, estos analitos han sido detectados en orina humada después de su administración en concentraciones que van de 0.25 a 25 mg L⁻¹ para ibuprofeno y de 0.1 a 0.5 mg L⁻¹ para diclofenaco, dependiendo del tiempo al cual ha sido recolectada la muestra ⁽⁸³⁻⁸⁵⁾. Es por ello que se analizaron otras muestras de orina dopadas a dos niveles de concentración para cada fármaco (0,25 y 0,5 mg L⁻¹ de ibuprofeno y 0,1 y 0,25 mg L⁻¹ de diclofenac, sobre la base de los datos obtenidos en literatura ⁽⁸³⁻⁸⁵⁾ para una investigación adicional de la recuperación del método, y se cuantificaron utilizando calibración con ajuste matricial.

En la Tabla 24 se observan las concentraciones de AINEs cuantificadas en muestras de orina después de la administración oral del fármaco. El método de preparación de muestra basada en el flujo dinámico programable SI-RDSE ha demostrado ser adecuado para la limpieza de las muestras y la preconcentración de los fármacos para la cuantificación fiable de ibuprofeno y diclofenaco en muestras de orina obtenidas de pacientes que fueron sometidos a la dosis de fármaco apropiado.

Tabla 24. Análisis de muestras de orina mediante SI-RDSE después de la administración oral de ibuprofeno y diclofenaco (n=4)

Analito	Muestra orina	Tiempo recolección (min)	Adición (mg L ⁻¹)	Encontrado (mg L ⁻¹)	SD (mg L ⁻¹)	Recuperación relativa (%)
IBUPROFENO	1	180	0	0.57	0.03	---
	2		0.25	0.82	0.02	100 ± 7
	3		0.50	1.07	0.02	100 ± 5
	1	300	0	0.26	0.02	---
	2		0.25	0.51	0.01	100 ± 6
	3		0.50	0.78	0.01	104 ± 3
DICLOFENACO	1	180	0	0.12	0.02	---
	2		0.10	0.22	0.01	100 ± 12
	3		0.25	0.37	0.02	100 ± 6
	1	300	0	0.08	0.01	---
	2		0.10	0.19	0.01	110 ± 13
	3		0.25	0.33	0.02	100 ± 5

Las recuperaciones de ibuprofeno y diclofenaco variaron de 100 a 104 ± 3-7% y de 100 a 110 ± 5-13%, respectivamente.

Para evaluar la reutilización de la fase de extracción C18, se realizaron 20 extracciones consecutivas de una muestra de 0,2 mg L⁻¹ de fármacos con un mismo disco rotatorio. Las recuperaciones relativas obtenidas de las muestras de orina estuvieron entre 98 y 102 ± 6-4% para un máximo de 15 extracciones, ya que a partir de análisis posteriores (16 extracciones en adelante) las recuperaciones disminuyeron entre un 21 y 31%. Por lo tanto, la fase C18 se puede reutilizar hasta 15 veces sin disminución significativa de la eficiencia analítica del método SI-RDSE.

En comparación con su contraparte manual (RDSE convencional en batch) ⁽⁸⁰⁾, la principal ventaja del método dinámico automatizado SI-RDSE propuesto es la mejora en el tiempo de extracción y elución de los compuestos que disminuye de 90 a 15 minutos.

5. CONCLUSIÓN

- ✓ De acuerdo a las características y propiedades fisicoquímicas de los AINEs en estudio, fue factible la determinación de éstos fármacos desde diferentes matrices (agua residual y orina) utilizando distintas fases sorbentes para su microextracción por RDSE.
- ✓ La fase Oasis HLB provee una mayor eficiencia de extracción en comparación con PDM o C18 y la fase MIP surgen como una alternativa cuando se requiere una extracción selectiva de analitos que presentan afinidad con la plantilla impresa en el polímero.
- ✓ Fue posible implementar un sistema automático y miniaturizado de microextracción por sorción con disco rotatorio acoplado a un sistema en flujo dinámico programable basado en el análisis por inyección secuencial (SIA-RDSE).
- ✓ Utilizando el sistema automático SI-RDSE fue posible cuantificar ibuprofeno y diclofenaco en muestras de orina humana luego de la administración oral del fármaco.
- ✓ Fue posible la determinación de los fármacos en estudio en muestras de agua residual de dos plantas de tratamientos de la ciudad de Santiago, encontrando niveles de concentración del orden de los μgL^{-1} tanto en el afluente como en el efluente de las plantas analizadas.

6. REFERENCIAS

1. Petrovic M., González S., Barceló D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends in Analytical Chemistry* 22 (2003) 685-696.
2. Heberer T. Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters* 131 (2002) 5-17.
3. Santos L., Araújo A.N., Fachini A., Pena A., Delerue-Matos C., Montenegro M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials* 175 (2010) 45–95.
4. González-Rey M., Joao Bebianno M. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 148 (2014) 221–230.
5. Barceló L. López de Alda M. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Instituto de investigaciones químicas y ambientales-CSIC Barcelona. (http://www.aguasresiduales.info/main/index.php?md_0=4&md_1=&id=2075_pag=6&navi=Netscape&vers=5.0&plat=Win32) (15.7.13).
6. Vane J. R., Botting R. M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflamm. res.* 47, Supplement 2 (1998) S78–S87.
7. Ternes T. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 419-434.

8. Mompelat S., Le Bot B., Thomas O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environmental International* 35 (2009) 803-814.
9. Weigel S., Berger U., Jensen E., Kallenborn R., Thoresen H., Hühnerfuss H. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere* 56 (2004) 583–592.
10. Farré M., Ferré I., Ginebreda A., Figueras M., Olivella L., Tirapu L., Vilanova M., Barceló D. Determination of Drugs in Surface Water and Wastewater Samples by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: Methods and Preliminary Results Including Toxicity Studies with *Vibrio Fischeri*. *Journal of Chromatography* 938 (2001) 187-197.
11. Ternes T. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research* 32 (1998) 3245-3260.
12. Paxeus, N. Removal of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), gemfibrozil, carbamazepine, -blockers, trimethoprim and triclosan in conventional wastewater treatment plants in five EU countries and their discharge to the aquatic environment. *Water Science and Technology* 50 (2004) 253-260.
13. Heberer T., Feldman D. Contribution of effluents from hospitals and private households to the total loads of diclofenac and carbamazepine in municipal sewage effluents--modeling versus measurements. *J Hazard Mater* 122 (2005) 211-218.
14. Gentili A. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in environmental samples by chromatographic and electrophoretic techniques. *Anal Bioanal Chem* 387 (2007) 1185–1202.

15. Antonic J., Heath E. Determination of NSAIDs in river sediment samples. *Anal Bioanal Chem* 387 (2007) 1337- 1342.
16. Cleuvers M. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59 (2004) 309–315.
17. Macia A., Borrull F., Aguilar C., Calull M. Improving sensitivity by large-volume sample stacking using the electroosmotic flow pump to analyze some nonsteroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis in water samples. *Electrophoresis* 24 (2003) 2779–2787.
18. Farré M., Petrovic M., Barceló D. Recently developed GC/MS and LC/MS methods for determining NSAIDs in water samples. *Anal Bioanal Chem* 387 (2007) 1203-1214.
19. Jones O.A.H., Voulvoulis N., Lester J.N. Partitioning Behavior of Five Pharmaceutical Compounds to Activated Sludge and River Sediment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50 (2006) 297–305.
20. Somenath Mitra. Sample preparation techniques in analytical chemistry. John Wiley & Sons, Inc. 162 (2003) 57-75.
21. Kellner R., Mermet J.M., Otto M., Widmer H.M. *Analytical Chemistry*. WILEY-VCH 2da Edición (2004).
22. Brack W., Bandow N., Schwab K., Schulze T., Streck R. Bioavailability in effect-directed analysis of organic toxicants in sediments. *Trends Analytical Chemistry* 28 (2009) 543 – 549.
23. Psillakis E., Kalogerakis N. Developments in liquid-phase microextraction. *Trends Analytical Chemistry* 22 (2003) 565 – 574.

24. Deveau P., Mallet V.N. Analysis of polychlorinated biphenyls and DDT and related isomers in complex samples using a small volume of organic solvent in back extraction. *Intern J. Environ. Anal. Chem.* 75 (1999) 331-344.
25. Vreuls R.J.J., Romijn E., Brinkman U.A.Th. In-vial liquid–liquid extraction with subsequent large-volume on-column injection into GC–MS for the determination of anilines in tap, surface and wastewater. *J Microcolumn* 10 (1998) 581–588.
26. Catalina M.I., Dalluge J., Vreuls J.J., Brinkman U.A.Th. Determination of chlorophenoxy acid herbicides in water by in situ esterification followed by in-vial liquid–liquid extraction combined with large-volume on-column injection and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 877 (2000) 153-166.
27. Hauser B., Popp P., Kleine-Benne E. Membrane-assisted solvent extraction of triazines and other semivolatile contaminants directly coupled to large-volume injection–gas chromatography–mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 27-36.
28. Psillakis E., Kalogerakis N. Developments in single-drop microextraction. *Trends. Anal. Chem.* 21 (2002) 53-63.
29. Jonsson J.A., Mathiasson L. Membrane extraction in analytical chemistry. *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 495-507.
30. Rezaee M., Assadi Y., Milani Hosseini M. R., Aghaee E., Ahmadi F., Berijani S. J. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1–9.
31. Belardi R.P., Pawliszyn J. The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. *Water Pollut Res J Can.* 24 (1989) 179–191.

32. Baltussen E., Sandra P., David F., Janssen H.G., Cramers C. Study into the equilibrium mechanism between water and poly(dimethylsiloxane) for very apolar solutes: Adsorption or sorption?. *C. Anal. Chem.* 71 (1999) 5213-5216.
33. Pawliszyn J. (Ed.) Applications of solid-phase microextraction. RSC chromatography monographs, Royal Society of Chemistry, Cambridge (1999) 655.
34. Baltussen E., Sandra P., David F., Cramers C. J. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *Microcol. Sep.* 11 (1999) 737-747.
35. Montero L., Popp P., Paschke A, Pawliszyn J. Polydimethylsiloxane rod extraction, a novel technique for the determination of organic micropollutants in water samples by thermal desorption–capillary gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1025 (2004) 17-26.
36. Bruheim I., Liu X., Pawliszyn J. Thin-film microextraction. *Anal. Chem.* 75 (2003) 1002-1010.
37. Qin Z., Bragg L., Ouyang G., Pawliszyn J. Comparison of thin-film microextraction and stir bar sorptive extraction for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples with controlled agitation conditions. *J. Chromatogr. A* 1196-1197 (2008) 89-95.
38. Sandra P., Baltussen E., David F., Hoffman A. Stir bar sorptive extraction (SBSE) applied to environmental aqueous samples, Global Analytical Solutions, Gerstel, AppNote 2/2000.
39. Ochiai N., Sasamoto K., Kanda H., Nakamura S. Fast screening of pesticide multiresidues in aqueous samples by dual stir-bar sorptive extraction-thermal

- desorption-low thermal mass gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1130 (2006) 83–90.
40. Liu W., Hu Y., Zhao J. , Xu Y., Guan Y. Determination of organophosphorus pesticides in cucumber and potato by stir bar sorptive extraction. *J. Chromatogr. A* 1095 (2005) 1-7.
41. Nakamura S., Daishima S. Simultaneous determination of alkylphenols and bisphenol A in river water by stir bar sorptive extraction with in situ acetylation and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 291-294.
42. Kawaguchi M., Inoue K., Yoshimura M., Ito R., Sakui N., Nakazawa H. Determination of 4-nonylphenol and 4-tert.-octylphenol in water samples by stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 217-222.
43. Popp P., Bauer C., Wennrich L. Application of stir bar sorptive extraction in combination with column liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Anal. Chim. Acta*. 436 (2001) 1-9.
44. Giordano A., Richter P., Ahumada I. Determination of pesticides in river water using rotating disk sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 85 (2011) 2425-2429.
45. Richter P., Leiva C., Choque C., Giordano A., Sepúlveda B. Rotating-disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8598–8602.
46. Richter P., Cañas A., Muñoz C., Leiva C., Ahumada I. Rotating disk sorbent extraction for pre-concentration of chromogenic organic compounds and direct

- determination by solid phase spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta.* 695 (2011) 73-76.
47. Manzo V., Navarro O., Honda L., Sánchez K., Toral M.I., Richter P. Determination of crystal violet in water by direct solid phase spectrophotometry after rotating disk sorptive extraction. *Talanta* 106 (2013) 305-308.
48. Northcott G. L., Jones K.C. Partitioning, extractability, and formation of nonextractable PAH residues in soil. 1. Compound differences in aging and sequestration. *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 1103-1110.
49. Jonker M.T.O., Hawthorne S.B., Koelmans A.A. Extremely slowly desorbing polycyclic aromatic hydrocarbons from soot and soot-like materials: evidence by supercritical fluid extraction. *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 7889–7895.
50. Cornelissen G., van Noort P.C.M., Parsons J.R., Govers H.A.J. Temperature dependence of slow adsorption and desorption kinetics of organic compounds in sediments. *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 454–460.
51. Tamayo F., Turiel E., Martín-Esteban A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. *J. Chromatogr. A*, 1152 (2007) 32-40.
52. Caro E., Marcé R., Borrull F., Cormack P., Sherrington D. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples. *Trend Anal. Chem.* 25 (2006) 143–154.
53. Chao-Meng D., Zhang J., Ya-Lei Z., Xue-Fei Z., Yan-Ping D., Shu-Guang L. Selective removal of acidic pharmaceuticals from contaminated lake water using multi-templates molecularly imprinted polymer. *Chemical Engineering Journal* 211-212 (2012) 302-309.

54. Caro E., Marcé R., Comarck P., Sherrington D., Borrull F. Selective enrichment of anti-inflammatory drugs from river water samples by solid-phase extraction with a molecularly imprinted polymer. *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 2080-2085.
55. Caro E., Marcé R., Comarck P., Sherrington D., Borrull F. A new molecularly imprinted polymer for the selective extraction of naproxen from urine samples by solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 813 (2004) 137-143.
56. Yan-Ping D., Chao-Meng D., Ya-Lei Z., Ling-Chen. Selective trace enrichment of acidic pharmaceuticals in real water and sediment samples based on solid-phase extraction using multi-templates molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta* 758 (2013) 93-100.
57. Sun Z., Schussler W., Sengl M., Niessner R., Knopp D. Selective trace analysis of diclofenac in Surface and wastewater samples using solid-phase extraction with a new molecularly imprinted polymer. *Analytica Chimica Acta* 620 (2008) 73-81.
58. Pichon V., Chapuis-Hugon F. Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants – A review. *Analytica Chimica Acta* 622 (2008) 48-61.
59. http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/Empore/extraction/center/sorbents/c18-c18ff-c8/ (Catálogo 3M online, consultado: 13/04/2012).
60. <http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=103&cid=513209> (Catálogo Waters online, consultado: 11/04/2012)
61. Santos J.L., Aparicio I., Alonso E., Callejón M. Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors. *Anal. Chim. Acta* 550 (2005) 116–122.

62. Pérez S., Barceló D. Application of advanced MS techniques to analysis and identification of human and microbial metabolites of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Trends Anal. Chem.* 26 (2007).
63. Samuelsson K., Samuelsson B. Gas-liquid chromatography-mass spectroscopy of cerebroside as trimethylsilyl ether derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 37 (1969) 15-21.
64. Knapp D.R. *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. John Wiley & Sons. New York (1979) 2-24.
65. Ehrsson H., et al. Quantitative gass chromatographic determination of pictogram quantities of phenols. *Acta. Pharm. Suecia.* 8 (1971) 319-328.
66. Koshy K.T., et al. O-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl) hydroxylamine hydrochloride as a sensitive derivatizing agent for the electron capture gas liquid chromatographic analysis of keto steroids. *J. Chromatogr. Sci.* 13 (1975) 97-103.
67. Sebok A., Vasanits-Zsigrai A., Palkó G., Zárny G., Molnár-Perl I. Identification and quantification of ibuprofen, naproxen, ketoprofen and diclofenac present in waste-waters, as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography mass spectrometry. *Talanta* 76 (2008) 642-650.
68. Rodríguez I., Carpinteiro J., Quintana J.B., Carro A.M., Lorenzo R.A., Cela R. Solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for the analysis of anti inflammatory drugs in water samples. *J. Chromatogr A.* 1024 (2004) 1–8.
69. Migowska N., Stepnowski P., Paszkiewicz M., Gołbiowski M., Kumirska J. Trimethylsilyldiazomethane (TMSD) as a new derivatization reagent for trace analysis of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by gas chromatography methods. *Anal Bioanal Chem.* 397 (2010) 3029-3034.

70. Lucena R. Extraction and stirring integrated techniques: examples and recent advances. *Anal Bioanal Chem* 403 (2012) 2213–2223
71. Hansen E.H., Miró M. How flow-injection analysis (FIA) over the past 25 years has changed our way of performing chemical analyses. *TRAC-Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 18–26.
72. Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie DR-12-VMC. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. Edition 2000-03-01.
73. R. Bushra, N. Aslam, An overview of clinical pharmacology of ibuprofen, *OmanMed. J.* 25 (3) (2010) 155–161.
74. R. Brogden, R. Heel, G. Pakes, T. Speight, G. Avery, Diclofenac sodium: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in rheumatic diseases and pain of varying origin, *Drugs* 20 (1980) 24–48.
75. Kalra A., Tugcu N., Cramer S.M., Garde S. Salting-in and salting-out of hydrophobic solutes in aqueous salt solutions, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 6380–6386.
76. Prieto A., Basauri O., Rodil R., Usobiaga A., Fernández L.A., Etxebarria N., Zoluaga O. Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *J. Chromatogr A.* 1217 (2010) 2642-2666.
77. Kolahgar B., Hoffmann A., Heiden A.C. A pplication of stir bar sorptive extraction to the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 225-230.
78. Zorita S., Boyd B., Jönsson S., Yilmaz E., Svensson D., Mathiasson L., Bergström S. Selective determination of acidic pharmaceutical in wastewater using

- molecularly imprinted solid-phase extraction. *analytica chimica acta* 626 (2008) 147–154.
- 79.M.C. Hennion, Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 3–54.
- 80.V. Manzo, L. Honda, O. Navarro, L. Ascar, P. Richter, Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from waste water samples by rotating-disk sorptive extraction, *Talanta* 128 (2014) 486–492.
- 81.T.A. Ternes, M. Bonerz, N. Herrmann, D. Löffler, E. Keller, B. Bagó Lacida, A.C. Alder, Determination of pharmaceuticals, iodinated contrast media and musk fragrances in sludge by LC/tandem MS and GC/MS, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 213–223.
- 82.J.B. Quintana, M. Miró, J.M. Estela, V. Cerdà, Automated on-line renewable solid-phase extraction-liquid chromatography exploiting multisyringe flow injection-bead injection lab-on-valve analysis, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2832–2840.
- 83.T. Hirai, S. Matsumoto, I. Kishi, Simultaneous analysis of several non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine by high-performance liquid chromatography with normal solid-phase extraction, *J. Chromatogr. B* 692 (1997) 375–388.
- 84.A. Sarafraz-Yazdi, A. Amiri, G. Rounaghi, H. Eshtiagh-Hosseini, Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by hollow-fiber liquid membrane-protected solid-phase microextraction based on sol-gel fiber coating, *J. Chromatogr. B* 908 (2012) 67–75.

85. A.R. Moraes de Oliveira, E.J. Cesarino, P.S. Bonato, Solid-phase microextraction and chiral HPLC analysis of ibuprofen in urine, *J. Chromatogr. B* 818 (2005) 285–291.
86. P.L. Kole, J. Millership, J.C. McElnay, Determination of diclofenac from paediatric urine samples by stir bar sorptive extraction (SBSE)-HPLC-UV technique, *Talanta* 85 (2011) 1948–1958.