



FACULTAD DE CIENCIAS
EXACTAS Y NATURALES



UNIVERSIDAD NACIONAL
DE LA PAMPA

***FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS y
NATURALES***

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

**“IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS
ORGÁNICOS Y EVALUACIÓN DEL RIESGO
AMBIENTAL EN AFLUENTES Y EFLUENTES DE
PLANTAS MUNICIPALES PARA TRATAMIENTO
DE LÍQUIDOS CLOACALES. FÁRMACOS:
IBUPROFENO Y PARACETAMOL”**

BERNERI MARÍA JIMENA

SANTA ROSA (LA PAMPA)

ARGENTINA

2013

PREFACIO

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Licenciado en Química, de la Universidad Nacional de La Pampa, y no ha sido presentada previamente, para la obtención de otro título en esta universidad ni en otra institución académica. Se llevo a cabo en las instalaciones de PLAPIMU (Planta piloto multipropósito)-LASEISIC (Laboratorios de servicios a la industria y al sistema científico) de la CIC (Comisión de investigaciones científicas) y en las instalaciones del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales durante el período comprendido entre el 9 de Marzo de 2012 y la presente fecha, resolución 11/12 de la Comisión Directiva, bajo la dirección del Dr. Guido Mastrantonio y bajo la codirección de la Bioq. Alena Folynek.

Febrero 2013

Bernerí, María Jimena

Agradecimientos

Después de muchos esfuerzos, éste trabajo de tesina finaliza una de mis etapas más añoradas. Con este trabajo crecí a nivel académico y personal. Me dio el placer de conocer gente nueva que entregó su confianza, su apoyo, su tiempo y me ayudó a llegar a esta meta. A todas ellas mi sincero agradecimiento.

A mi director y co-directora de tesina, Guido y Alena los cuales me acompañaron, me guiaron, me brindaron su ayuda, me dieron fuerzas para no bajar los brazos y depositaron toda su confianza en mi persona. Al Área de Toxicología y a la Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam) por haberme brindado un espacio para poder desempeñarme no solo académicamente.

En lo personal **a mi hermosa e incondicional familia**, por todos estos años de sostén, paciencia, consejos, contención y amor; los amo con toda el alma.

Finalmente **a mis amigos/as de la vida**, los cuales me apoyaron y me acompañaron hasta el final. Los quiero mucho mucho. **Y a los compañeros de la facu** (presentes y pasados) por vivir estos años junto a mí, un bello aprendizaje en todos los aspectos de la vida.

Departamento de Química

Bernerri, María Jimena

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Resumen

El ibuprofeno (IBF) es un anti-inflamatorio no esteroideo (AINE) de venta libre, ampliamente utilizado. Diariamente, junto con los efluentes líquidos urbanos se vierten cantidades no evaluadas de este fármaco y sus metabolitos al ambiente. Según los datos de literatura, se puede considerar que éste es la fuente que generaría uno de los mayores aportes ambientales de fármacos en general y de AINE en particular.

El objetivo de este trabajo fue establecer una técnica para la determinación de IBF en efluentes cloacales, adecuada para el monitoreo asociado a una evaluación de riesgo ambiental en cuerpos receptores y aplicable en laboratorios de baja complejidad. Para su validación se trabajó con muestras tomadas en un punto de vuelco de efluentes de la Provincia de Buenos Aires.

El procedimiento preanalítico consistió en un ultrafiltrado de la muestra, seguido de una extracción en fase sólida, previo ajuste de pH. Para el dosaje analítico se utilizó HPLC/UV de fase reversa a 229 nm. Se trabajó en un rango lineal de entre 0,1 y 23,0 µg/l de IBF. Se obtuvo un límite de detección (LOD) de 0,9 µg/l y un límite de cuantificación (LOQ) de 2,8 µg/l.

Los valores encontrados en las muestras reales, en número limitado, indicaron presencia de ibuprofeno dentro del rango lineal de la técnica. Por otro lado, se hallan dentro de los valores más altos reportados para este tipo de efluentes para otras regiones y sugieren que este compuesto podría representar un potencial riesgo ambiental significativo para las zonas de vertido en la región.

Abstract

Ibuprofen (IBF) is a non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) counter, widely used. Daily, together with the urban effluents discharged unevaluated amounts of this drug and its metabolites into the environment. According to literature data, it can be considered that this is the source that would generate a major environmental contributions drugs NSAIDs in general and in particular.

The aim of this work was to develop a technique for the determination of IBF in sewage suitable for monitoring associated with environmental risk assessment and applicable in receiving bodies of low complexity laboratories. For validation, we worked with samples taken at a tipping point of effluent from the Province of Buenos Aires.

The procedure consisted of an ultrafiltrate preanalytical sample, followed by solid phase extraction, after adjustment of pH. For the dosage used analytical HPLC / UV 229 nm reverse phase. Worked in a linear range of between 0.1 and 23.0 $\mu\text{g} / \text{l}$ of IBF. We obtained a limit of detection (LOD) of 0.9 $\mu\text{g} / \text{l}$ and a limit of quantification (LOQ) of 2.8 $\mu\text{g} / \text{l}$.

The values found on actual samples, limited in number, indicated the presence of ibuprofen in the linear range of the technique. On the other hand, are within the highest reported values for this type of effluent to other regions and suggest that this compound may represent a significant environmental hazard potential for release zones in the region.

INDICE

1. Introducción	1
1.1 Toxicología	1
1.1.1 Definición	1
1.1.2 Desarrollo y Evolución	1
1.1.3 Ramas de la Toxicología	3
1.1.4 Toxicología Ambiental	3
1.2 Contaminantes Emergentes	5
1.2.1 Ibuprofeno (IBF)	6
1.3 Efluentes	9
1.3.1 Parámetros Generales a determinar en un efluente	10
1.3.2 Parámetros Específicos de contaminación a determinar en un efluente	12
1.3.3 Tratamiento de efluentes	12
1.3.4 Tipo de muestras en efluentes	14
1.3.4.1 Muestra puntual o simple	14
1.3.4.2 Muestra compuesta o integrada o balanceada	14
1.3.4.3 Muestras periódicas	14
1.3.4.4 Muestras continuas	15
1.3.5 Preservación de las Muestras	15
2. Objetivos e hipótesis	16
2.1 Objetivo	16
2.2 Hipótesis de trabajo	16
3. Materiales y métodos	17
3.1 Materiales y reactivos utilizados	17
3.1.1 Reactivos	17

3.1.2 Material de laboratorio	17
3.1.3 Equipamiento de laboratorio	18
3.2 Método	19
3.2.1 Muestreo	19
3.2.2 Determinación de parámetros	19
3.2.2.1 Físicoquímicos-Sólidos	19
3.2.2.1.1 Sólidos Disueltos Totales (SDT)	20
3.2.2.1.2 Sólidos Suspendidos Totales (SST)	21
3.2.2.1.3 Sólidos Sedimentables (SS)	21
3.2.3 Dosaje de IBF	22
3.2.3.1 Optimización del pH y condiciones de la <i>SPE</i>	23
3.2.3.2 Ultra-filtrado	26
3.2.3.3 Optimización de variables implicadas en el proceso cromatográfico	26
3.2.3.4 Otros posibles pre-tratamientos	28
3.2.4 Metodología	30
3.2.4.1 Diagrama de flujo del procedimiento desarrollado para el dosaje de ibuprofeno	30
3.2.4.2 Procedimiento de cuantificación de ibuprofeno en efluente cloacal	31
3.3 Preparación de soluciones patrón de ibuprofeno (IBF) y curva de calibrado	33
3.3.1 Solución madre	33
3.3.2 Solución patrón	33
3.3.3 Preparación de la curva de calibrado	33
3.4 Calibración del método	33

4. Resultados y discusión **35**

4.1 Parámetros Generales	35
--------------------------	----

4.2 Parámetros Específicos	35
4.2.1 Curva de calibrado	35
4.2.2 Calibración del método	36
4.2.3 Limite de detección y de cuantificación del método	37
4.2.4 Cuantificación de muestra real	37
4.3 Discusión	39
5. Conclusiones	41
6. Bibliografía	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular del ibuprofeno (IBF) con sus dos enantiómeros	7
Figura 2. Fotografía del lugar donde se tomaron las muestras reales	19
Figura 3. <i>SPE</i> para la purificación del ibuprofeno con una columna conteniendo C_{18}	24
Figura 4. Gráfico % de recuperación relativa de la <i>SPE</i> a diferentes pH	25
Figura 5. Gráfico de la reproducibilidad porcentual a diferentes pH	26
Figura 6. Esquema del procedimiento empleado para el dosaje de IBF	30
Figura 7. Fotografía del equipo armado para la Extracción en Fase Sólida	31
Figura 8. Fotografía de cómo se llevo a cabo la elución de las muestras reales	32
Figura 9. Curva de calibrad de IBF luego del ajuste por regresión lineal	36
Figura 10. Cromatogramas muestra de efluente cloacal con pre-tratamientos	37
Figura 11. Cromatograma de patrón estándar de ibuprofeno	38
Figura 12. Cromatograma de efluente cloacal	38

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clase de contaminantes emergentes	6
Tabla 2. Eleccion de la longitud de onda variable óptima	27
Tabla 3. Eleccion de la fase móvil óptima a una longitud de 229 nm	27
Tabla 4. Elección de las proporciones de la fase móvil a 229 nm de longitud de onda	28
Tabla 5. Valores fisicoquímicos medidos en la muestra cruda	35
Tabla 6. Coeficientes de correlacion de la curva de IBF	36
Tabla 7. Valores de áreas de afluyente cloacal con diferentes pre-tratamientos	37

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Toxicología

1.1.1 Definición

La Toxicología es una rama de la ciencia que se dedica al estudio de las sustancias químicas y los agentes físicos que son capaces de provocar alteraciones a los seres vivos, estudiando a su vez, los efectos nocivos que estas pueden ocasionar, teniendo en cuenta además de las características intrínsecas de cada sustancia, las vías de exposición, mecanismos de biotransformación, dosis, etc. Su campo de estudio abarca desde la clasificación de las sustancias en cuanto a su toxicidad, la determinación de dosis y efectos, la reglamentación de las sustancias, mecanismos de acción, tratamiento, prevención, etc. [1]

Se denomina tóxico a toda sustancia capaz de provocar efectos nocivos sobre algún ser vivo. Cualquier sustancia puede actuar como tóxica dependiendo de las condiciones del sujeto, el tiempo de exposición, de la dosis y del ambiente. [1]

1.1.2 Desarrollo y evolución

Las referencias históricas permiten verificar la utilización de diferentes sustancias, ya sea con fines terapéuticos, criminales, para exterminio de plagas, etc. El hombre maneja desde tiempos muy remotos sustancias con propiedades tóxicas muy diferentes, las cuales a medida que pasan los años van aumentando en cantidad. En un principio, según cuenta la historia, las sustancias utilizadas como tóxicos eran de origen vegetal o mineral, luego a medida que avanzaron los años, empezaron a sintetizarse otro tipo de compuestos. Según data en la época del paleolítico, se impregnaban las puntas de flechas con sustancias tóxicas y de allí es de donde deriva la palabra tóxico –del griego *toxicon*– veneno en punta

de flecha. Ya alrededor del siglo XVII a.C., había escritos que hacen referencia a medicamentos y venenos a partir de plomo, opio, cobre, etc. Además, según se puede observar en algunos hechos o personajes históricos, como el de rey de Nápoles, los venenos o sustancias tóxicas han sido utilizadas desde tiempos muy remotos, obviamente produciéndose avances con el paso de los años que permitieron otras formas de administración, nuevas sustancias, nuevos antidotos, etc. Las publicaciones más importantes de la antigüedad datan del siglo I d.C., donde el médico Dioscórides escribe sobre plantas medicinales y venenos. [1]

El concepto de dosis fue enunciado por primera vez por Paracelso, quien señalaba que ciertos venenos administrados a dosis bajas podían actuar como medicamentos.

En 1564, se publicó una trilogía donde se establecen los primeros pensamientos toxicológicos, remarcándose el concepto de que solamente la dosis determina que una cosa sea o no veneno: *dosis sola o facit venenum* (cita textual de la trilogía). Rápidamente se fueron relacionando las distintas ciencias como la biología, medicina, la química etc., obteniéndose a partir de la integración de conceptos comunes avances importantes que luego estuvieron utilizados en esta nueva ciencia que se llamó posteriormente toxicología y que como se puede observar, incluye conceptos de ciencias relacionadas como las mencionadas anteriormente. [1]

A partir del siglo XVIII comenzaron a incrementarse las publicaciones acerca de la toxicología, comenzándose a divisar las diferentes ramas que pueden encontrarse dentro de ella y produciéndose muchos avances en el área debido al progreso relacionado con la química, que permitió tanto el análisis, detección y síntesis de nuevas sustancias.

A medida que las sustancias tóxicas iban ganando importancia o produciendo efectos tóxicos en distintos aspectos de la vida humana determinó que fueran surgiendo las distintas ramas de la toxicología, por ejemplo el aumento en los riesgos de trabajo determinó el desarrollo de la toxicología ocupacional, etc. [2]

1.1.3 Ramas de la Toxicología

A medida que pasaron los años, la creciente utilización de sustancias tóxicas para diferentes fines o en diferentes sectores hizo que se fueran creando lentamente ramas dentro de la toxicología cuyo fin u objeto de estudio variaba en cada una de ellas. En tal sentido, la creciente utilización de tóxicos en los envenenamientos en tiempos remotos llevo a la necesidad de la creación de la toxicología judicial o forense, con objeto de conseguir identificar estos compuestos en los cadáveres y poder así poner al descubierto casos de envenenamientos que intentaban ser ocultados con causas de muertes referidas a supuestas enfermedades. De esta manera, se fueron desarrollando nuevas técnicas de aislamiento, determinación y síntesis de sustancias que luego dieron origen a otra rama de la toxicología llamada toxicología analítica. [2]

Por otro lado, se pusieron de manifiesto los riesgos que tenían los trabajadores de ciertas profesiones al estar en contacto con productos tóxicos, surgiendo así por ejemplo la toxicología ocupacional. Luego con los avances industriales y todo lo que ello provocó, hizo que fueran surgiendo ramas como la toxicología ambiental o ecotoxicología, la toxicología reguladora, bromatológica, farmacéutica, clínica, etc. [2]

1.1.4 Toxicología Ambiental

La toxicología ambiental, estudia los daños causados al ser humano por la exposición a los tóxicos que se encuentran en el medio ambiente.

El objetivo principal de la toxicología ambiental es evaluar la exposición de la población a los tóxicos ambientales presentes en un sitio contaminado. Es conveniente recalcar que se estudian los efectos sobre los humanos, aunque pudieran existir, en el sitio de estudio, otros blancos de los tóxicos tales como microorganismos, plantas, animales, etc.

Los tóxicos son los xenobióticos que producen efectos adversos en los organismos vivos.

Un xenobiótico es cualquier sustancia que no ha sido producida por la biota, tales como los productos industriales, drogas terapéuticas, aditivos de alimentos, compuestos inorgánicos, etc. La biota son todos los seres vivos; sean plantas o animales superiores o microorganismos. [5]

La contaminación ambiental, se puede considerar simplemente como la acumulación indeseable de sustancias, organismos o formas de energía en un sustrato.

La contaminación ambiental se puede clasificar de diferentes maneras:

- por el proceso que las causa: origen natural y origen antropogénico
- por el tipo de contaminante: biológicos, físicos y químicos.
- por el origen de los contaminantes: natural o artificial.

Las fuentes de contaminación pueden ser naturales o antropogénicas. Las fuentes naturales están relacionadas con la composición de suelos y aguas, los componentes de algunos alimentos, las emanaciones volcánicas entre otras, siendo de bajo porcentaje los problemas de salud pública. En cambio las fuentes antropogénicas son mas importantes como causas de problemas de salud pública, su naturaleza y el tipo de contaminantes que emiten son muy variados; se la puede clasificar dependiendo de la actividad que las origina: industriales, mineras, agropecuarias, domesticas, etc. [10]

Se ha reportado que una de las clases de contaminantes ambientales para la que no ha sido convenientemente evaluado su riesgo ambiental, corresponde a las sustancias utilizadas con fines terapéuticos en humanos y animales. Estos fármacos, son volcados al medioambiente en grandes cantidades como principios activos y como metabolitos a través de los líquidos cloacales. Este grupo de contaminantes, han sido incorporados en lo que hoy se entiende como contaminantes emergentes, a los que nos referimos más adelante.

Experiencias en diferentes países, reportan la detección de diferentes medicamentos e indicadores de contaminación en las corrientes de ríos, aguas y aguas residuales donde descargan los efluentes, tratados o no.

En Alemania en 1998, en el río Elbe se encontraron las siguientes sustancias: diclofenac, ibuprofeno (IBF) y carbamazepina, así como varios antibióticos y reguladores de lípidos en el intervalo de concentración de 20 a 140 ng/L. [17]

1.2 Contaminantes Emergentes

Los contaminantes emergentes corresponden en la mayoría de los casos a contaminantes no regulados, que pueden ser candidatos a regulación futura, dependiendo de investigaciones sobre sus efectos potenciales en la salud y los datos de monitoreo con respecto a su incidencia. Ejemplos de los compuestos que han emergido recientemente como particularmente relevantes, son los surfactantes, productos farmacéuticos, productos para el cuidado personal, aditivos de las gasolinas, retardantes de fuego, antisépticos, aditivos industriales, esteroides, hormonas y subproductos de la desinfección del agua. La característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan persistir en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que sus altas tasas de transformación/remoción se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente. Para la mayoría de estos contaminantes emergentes, la incidencia, la contribución de riesgo y los datos ecotoxicológicos, no están disponibles. Así que es difícil predecir qué efectos de salud pueden tener en seres humanos y organismos acuáticos. [23]

Los productos farmacéuticos son un amplio grupo de compuestos químicos, utilizados en grandes cantidades y variedad, sin embargo el estudio del comportamiento de estas sustancias al ingresar a las aguas superficiales, su impacto en el ambiente y posible incidencia en la salud ha recibido atención solo en los últimos años. Los fármacos, luego de su administración son absorbidos y metabolizados por el organismo y finalmente excretados alcanzando a los sistemas acuáticos, aunque en pequeñas cantidades, de forma continua a través de los efluentes cloacales.

El perfil de composición y niveles de concentración encontrados, varían dependiendo del país y consumo. En los últimos años, se han desarrollado y optimizado métodos analíticos para la determinación de compuestos farmacéuticos, con el objeto de mejorar la precisión y la sensibilidad, para lograr cuantificar con exactitud las concentraciones en muestras ambientales. Ensayos de toxicidad aguda sobre organismos acuáticos sugieren un bajo riesgo ecotoxicológico [24], en cambio esta situación pareciera ser diferente cuando se consideran efectos crónicos debido a que los organismos acuáticos están expuestos a bajas concentraciones a lo largo de todo su ciclo de vida. [25]

Clases de contaminantes	Ejemplos
Productos farmacéuticos	trimetropina, ibuprofeno, paracetamol, fluoxetina, propranolol, atenolol, estradiol, entre otros.
Productos de cuidado personal	policíclicos y macrocíclicos, como la benzofenona.
Antisépticos	triclosan, clorofeno.
Detergentes tensioactivos y sus metabolitos	alquilfenoles etoxilados, alquilfenoles carboxilados.
Retardadores de llama	difenil éteres polibromados (PBDEs)
Aditivos y agentes industriales	Agentes quelantes (EDTA), sulfonados aromáticos.
Aditivos de la gasolina	dialquil éteres
Subproductos de desinfección	Yodo-trihalometanos (THMs), bromoácidos, bromoaldehidos, entre otros.

Tabla 1. Clase de contaminantes emergentes. [26]

En la actualidad, existe una creciente preocupación sobre la presencia de compuestos farmacéuticos en el medio ambiente debido principalmente al riesgo potencial para el medio ambiente acuático.

Los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, se pueden considerar como una de las fuentes más importantes de productos farmacéuticos en el medio ambiente. [33]

1.2.1 Ibuprofeno (IBF)

El IBF es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), utilizado frecuentemente para el alivio sintomático de los dolores ocasionales leves o moderados de cabeza (cefalea), dentales (odontalgia), muscular (mialgia), molestias de la menstruación (dismenorrea), dolor neurológico de carácter leve, síndrome febril y dolor tras cirugía (postquirúrgicos). También se usa para tratar cuadros inflamatorios, como los que se presentan en artritis. Generalmente la dosis diaria recomendada en adultos es de unos 1200 mg diarios. Sin

embargo, bajo supervisión médica, la cantidad máxima de IBF para adultos es de 800 mg por dosis o 3200 mg por día. En niños es de 5 a 10 mg por kg en un intervalo de tiempo de 6 a 8 horas.

El IBF es ampliamente metabolizado en el hígado, siendo eliminado mayoritariamente con la orina (90% en forma de metabolitos inactivos conjugados con ácido glucurónico y un 10% de forma inalterada). La excreción del fármaco es prácticamente completa (75-85%) a las 24 hs desde la última dosis administrada, siendo el resto eliminado en las heces después de la excreción en la bilis.

El IBF fue desarrollado por la división de investigación de Boots Group durante los 60 y patentado en 1961. La droga fue lanzada como un tratamiento para la artritis reumatoidea en el Reino Unido en 1969, y en los Estados Unidos en 1974.

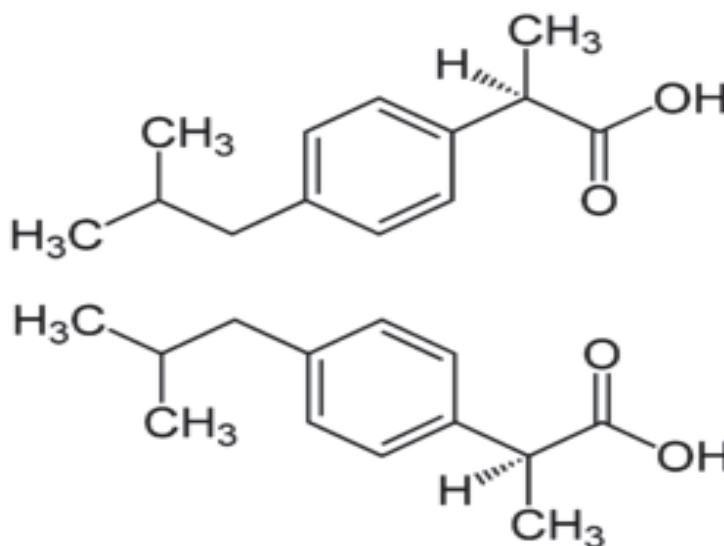


Figura 1. Estructura molecular del IBF con sus dos enantiómeros.

Nombre (IUPAC) sistemático:

ácido (RS)- 2- (4-isobutilfenil) propiónico

Formula: C₁₃ H₁₈ O₂

Peso Molecular: 206.29 g/mol

pKa= 4,4

El IBF, al igual que otros derivados de 2-arilpropionato, contiene un carbono quiral en la posición α (alfa-) del propionato. Esto explica la existencia de dos enantiómeros el (R)-IBF y el (S)-IBF. [21,29]

El IBF, es uno de los ingredientes activos farmacéuticos más utilizado en todo el mundo. Debido a su alto consumo, el IBF ha sido el tercero más vendido en la farmacéutica de España durante los últimos años. Dado que se utiliza como anti-inflamatorio y analgésico, tanto por prescripción médica como por su uso de venta libre, se explican sus altos niveles de uso. Es por esto, que no sorprende en los efluentes cloacales se haya reportado altas concentraciones de IBF.

Su ubicuidad en el medio ambiente y el posible impacto ecológico en el medio ambiente acuático son una causa de preocupación. Otro factor en cuestión es que el IBF se lo considera relativamente persistente en sistemas acuáticos. [35,36] Los organismos acuáticos resultan expuestos a bajas concentraciones de forma continua durante el ciclo de vida, observándose efectos adversos asociados (ej.: sobre crecimiento y reproducción, alteraciones morfológicas, genotoxicidad, entre otros). [24, 25,37]

En las cuencas del Parque Nacional Dañana (Sur de España), se detectaron en efluentes de aguas residuales como en agua superficial, niveles muy altos de IBF asociado a un aumento de concentración del mismo en los meses de verano. Una evaluación de riesgo al medio ambiente, mostró la existencia de un riesgo ecotoxicológico para los organismos acuáticos sobre todo en la época estival. [38]

En la literatura se reporta la presencia de IBF en diferentes estuarios del mundo:

- ❖ En Sevilla, España se detectaron entre 12,1-373 mg/l en el efluente de aguas residuales. Fueron concentraciones más altas en comparación con las concentraciones de los otros compuestos farmacéuticos [33]. La influencia estacional también se observa en las concentraciones de IBF que aumenta en gran medida en los meses de Mayo- Junio y en Agosto- Septiembre. [34]
- ❖ En Reino Unido se encontró en agua de estuarios y ríos concentraciones que van de 48 a 928 ng/l. [36]
- ❖ En los efluentes de 4 países europeos (Francia, Grecia, Italia y Suecia) se hallaron valores entre 0,05-7,11 $\mu\text{g/l}$. [39]

- ❖ En el Sur del estuario del Río de La Plata y en lagunas de la Región Pampeana se encontraron en concentraciones promedio de IBF 10 µg/L. [24]

1.3 Efluentes

Los residuos líquidos urbanos están constituidos por una mezcla compleja y variable de sustancias químicas. En ellos, convergen los residuos líquidos de diferentes fuentes: domicilios, comercios, hospitales, desagües pluviales y muchas veces también aquellos de origen industrial, lo que ha llevado a considerarlos mezclas complejas de composición desconocida [3, 4,5] conteniendo una gran variedad de sustancias orgánicas e inorgánicas [6,7], las cuales interactúan entre sí. [3]

Estos efluentes, suelen presentar una composición dinámica, cuyos componentes y concentraciones cambian constantemente influenciados por la actividad humana y por factores ambientales [9,11],

La biodisponibilidad de las sustancias del efluente pueden ser fuertemente variables por degradación o la interacción química de los componentes de dicho efluente (materia orgánica, microflora) o los sistemas de procesamiento de los mismos. [6, 7,12]

En general, constituyen una importante fuente de contaminantes [13, 14,15] siendo su aporte de éstos mismos al ambiente especialmente alto en países en desarrollo donde los efluentes son vertidos al medio con escaso tratamiento. [16]

En los últimos años, diversos autores han evaluado la presencia y/o la concentración de componentes de la fracción inorgánica, como metales, nutrientes y de una amplia variedad de compuestos orgánicos incluidos fármacos, hormonas, agroquímicos, surfactantes, entre otras sustancias, en efluentes de diversas partes del mundo, ayudados por técnicas analíticas modernas [16]. Algunas de las investigaciones han trabajado sobre un amplio espectro de compuestos, mientras otras se han limitado a un grupo determinado.

Se han establecido leyes y reglamentaciones cuyo fin es evitar la descarga de efluentes contaminantes a los cursos de agua, suelos, etc., mediante la determinación de límites que

deben poseer los efluentes antes de ser vertidos, siendo necesario en el caso de que se superen éstos límites, la aplicación de tratamientos previos al vertido. [18,19]

Es importante cuando se intenta realizar la caracterización del nivel de contaminación que provoca un efluente, tener en cuenta no solamente las concentraciones de parámetros individuales, sino que debe realizarse el análisis de la potencialidad tóxica total del efluente a partir de ensayos o test de toxicidad, debido a que pueden ocurrir interacciones, sinergismo, antagonismo.

1.3.1 Parámetros Generales a determinar en un efluente

Algunos de los parámetros más frecuentes para determinar la calidad del efluente son:

- DBO: demanda bioquímica de oxígeno
- DQO: demanda química de oxígeno
- DBO₅ : demanda bioquímica de oxígeno, 5 días a 20°C
- pH
- Temperatura
- Sólidos, Totales
 - Disueltos totales (SDT)
 - ✓ Fijos (STF)
 - ✓ Volátiles (STV)
 - Suspendidos totales (SST)
 - ✓ Fijos (SSF)
 - ✓ Volátiles (SSV)
 - Sólidos Sedimentables Totales

- DBO: Es una medición indirecta de la materia orgánica porque en realidad sólo se mide el cambio en la concentración de oxígeno disuelto provocado por los microorganismos al degradarla. [18]

- **DQO:** Es la cantidad de oxígeno necesaria para la oxidación química (destrucción) de la materia orgánica. Esta prueba proporciona un medio indirecto de la concentración de materia orgánica en el agua residual.
- **DBO₅:** Es la cantidad de materia orgánica fácilmente biodegradable durante cinco días a 20°C y corresponde a la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar biológicamente la materia orgánica. La relación DQO/DBO₅ proporciona una indicación de la biodegradabilidad de las aguas residuales.
- **Sólidos:** Los residuos sólidos están conformados por materia mineral y materia orgánica. La materia mineral, proviene de los subproductos desechados durante la vida cotidiana y de la calidad de las aguas de abastecimiento. La materia orgánica, proviene exclusivamente de la actividad humana y está compuesta por materia carbonácea, proteínas y grasas. Los sólidos, pueden ser discriminados en distintos tipos según la metodología que se emplee para su determinación. Es así que se consideran:

Sólidos Disueltos y Suspendidos: Son principalmente de naturaleza orgánica; están formados por algunos de los materiales más objetables contenidos en el agua residual. La mayor parte de los sólidos suspendidos y disueltos son desechos humanos, desperdicios de alimentos, papel, trapos y células biológicas que forman una masa de sólidos suspendidos en el agua. Incluso, las partículas de materiales inertes adsorben sustancias orgánicas en su superficie.

Sólidos Fijos y Volátiles: Dentro de los sólidos disueltos y suspendidos tenemos dos fracciones, la fracción inorgánica y la fracción orgánica. Los sólidos fijos corresponden a la fracción de materia inorgánica, mientras que los sólidos volátiles corresponden a la fracción de materia orgánica.

Sólidos Sedimentables: son los materiales que sedimentan de una suspensión en un período de tiempo definido en un cono Imhoff. [19]

1.3.2 Parámetros específicos de contaminación a determinar en un efluente

- Metales Pesados: Los metales pesados son, frecuentemente, añadidos al agua residual en el curso de ciertas actividades comerciales e industriales. Como ejemplos de metales pesados en agua residual tenemos al Cu, Pb y Cd.
- Constituyentes inorgánicos no metálicos: Los constituyentes inorgánicos tales como el calcio, sodio y los sulfatos se añaden al agua de suministro como consecuencia del uso del agua.
- Constituyentes orgánicos: Compuesta principalmente por proteínas, carbohidratos, grasas animales. La materia orgánica biodegradable se mide en la mayoría de las ocasiones en función de la DQO y la DBO.
- Nutrientes: tanto el Nitrógeno como el Fosforo, junto con el Carbono son nutrientes esenciales para el crecimiento. Cuando se vierten al entorno acuático, estos nutrientes pueden favorecer el crecimiento de una vida acuática no deseada
- Compuesto no biodegradables: Son compuestos orgánicos o inorgánicos determinados en base a su carcinogenicidad, mutagenicidad, teratogenicidad o toxicidad aguda conocida o sospechada. Dentro de estos compuestos no biodegradables encontramos a los detergentes, pesticidas, fármacos entre otros.
[19,22]

1.3.3 Tratamiento de efluentes

El tratamiento de efluentes es realizado con el propósito de evitar la contaminación física, química, bioquímica y biológica de los cursos y cuerpos de agua receptores.

De un modo general, el tratamiento persigue evitar:

- a) Daños a los abastecimientos públicos, privados e industriales de suministro de agua.

- b) Daño a las aguas destinadas a la recreación y el esparcimiento.
- c) Daños a las actividades piscícolas.
- d) Perjuicios a la agricultura y depreciación del valor de la tierra.
- e) Impacto al entorno ecológico.

El tratamiento de los efluentes ha sido una consecuencia del desarrollo de la civilización y que se caracteriza por el aumento de la densidad demográfica y expansión industrial.

Las razones, que justifican el tratamiento de las aguas residuales pueden ser resumidas en cuatro puntos:

- Razones higiénicas o de salud pública.
- Razones económicas.
- Razones estéticas.
- Razones legales.[20]

Existen diferentes formas de clasificación de los tratamiento de efluentes, por ejemplo: según el grado de purificación, según la naturaleza del proceso o según se realicen en presencia o ausencia de oxígeno.

Según el grado de purificación, podemos clasificar los tratamientos de efluentes en:

- pre-tratamiento: elimina la fracción sólida de mayor tamaño de la corriente líquida
- tratamientos primarios: separación de las partículas en suspensión por medios físicos
- tratamientos secundarios: reducción del contenido en materia orgánica
- tratamientos terciarios: reducción de nutrientes inorgánicos

Según la naturaleza del proceso podemos dividir los tratamientos en:

- químicos: floculación, coagulación, precipitación química, ósmosis inversa, intercambio iónico
- físicos: sedimentación, flotación, filtración, adsorción, extracción

- biológicos: fangos activados, filtro biológico, biodiscos, lagunaje, digestión anaeróbica

Según se realice en presencia o ausencia de oxígeno en:

- aeróbicos: barros activados, lagunas de aireación, filtros percoladores, discos rotatorios, o piletas de estabilización
- anaeróbicos: procesos de digestión. [18,20]

1.3.4 Tipos de Muestras de efluentes

1.3.4.1 Muestra puntual o simple

Muestra recolectada en un sitio específico durante un periodo corto, de minutos a segundos. Representa un instante en el tiempo y un punto en el espacio del área de muestreo. Las muestras *puntuales discretas* son aquellas que corresponden a un sitio seleccionado, a una profundidad y tiempo definidos. Una muestra *puntual integrada en profundidad* corresponde a la que es recolectada a profundidades definidas de la columna de agua, en un sitio y tiempo seleccionado. El diseño del muestreo deberá tener en consideración descargas cíclicas o temporales del cuerpo receptor en estudio.

1.3.4.2 Muestra compuesta o integrada o balanceada

Provee un muestreo representativo de matrices heterogéneas, en la cual la concentración del o los analito /s de interés pueden variar su concentración en el espacio o el tiempo. Las muestras compuestas pueden combinar porciones de varias muestras simples o las provenientes de sistemas automáticos de extracción. Las muestras integradas en el tiempo recurren a muestreadores con bombes a un flujo continuo constante. [31]

1.3.4.3 Muestras Periódicas

Cuando se realiza la toma a intervalos de tiempo constantes, se obtienen muestras de iguales volúmenes, o bien de volúmenes diferentes, siendo el volumen dependiente del flujo.

1.3.4.4 Muestras Continuas

La recolección se hace en forma continua y la velocidad de flujo con que se toma puede ser fija o variable, dependiendo de si existe o no variación en el caudal del cuerpo de agua que se estudia.

1.3.5 Preservación de las muestras

Una buena técnica de preservación de muestras se basa en garantizar la conservación de los analitos durante el transporte al laboratorio y el tiempo necesario para ejecutar el análisis. Además, debe retardar los cambios químicos y biológicos que sufre la muestra una vez que ha sido removida de su fuente. En general, los métodos existentes para la preservación se limitan a un control de pH, la adición de sustancias químicas, la refrigeración y la congelación de las muestras. [32]

2. OBJETIVOS E HIPOTESIS

2.1 Objetivo

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo y validación de un método para dosar ibuprofeno en líquidos cloacales, utilizando técnicas de baja complejidad (HPLC/UV), adecuado a estudios sistemáticos de evaluación de impacto ambiental.

2.2 Hipótesis de Trabajo

Existe un riesgo ambiental potencial significativo por el vuelco de ibuprofeno. Por otro lado, su dosaje en los afluentes y efluentes de las plantas de tratamiento, podría ser utilizado como un índice de eficiencia de los procesos que se verifican en ellas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales y Reactivos utilizados

3.1.1 Reactivos

Dimetilsulfóxido (DMSO), Anedra p.a

Tetrahidrofurano (THF), Anedra p.a

Metanol, J.T.Baker grado HPLC

Agua destilada

Agua desmineralizada (< 0,2 μ siemens)

Acetonitrilo, J.T.Baker grado HPLC

Acetato de amonio, Merck p.a.

IBF racémico 99.9 %, analizado 4/8/2011

Acido clorhídrico, J. T. Baker p.a.

Acido acético, Analquim p.a.

Buffer acetato de amonio (PM 77,08 g/mol) 0,01 M pH 5. Se peso 0,771 g de acetato de amonio y se agrego agua destilada en cantidad suficiente para 1000 mL. Finalmente se ajusta el pH con ácido acético.

3.1.2 Material de laboratorio

Matraces: 100-25 mL

Pipetas: 10-5-2 mL

Vaso de precipitado 50 mL

Cuchara de metal

Varilla de vidrio

Recipientes de vidrio color caramelo: 100-50-30 mL

Propipetas

Membrana de nylon 0,45 micras

Equipo de filtrado

Erlenmeyer: 4000-1000-100-10 L

SPE Varian Bond Elut C₁₈: 500-1000 mg

Ampolla de decantación: 500-1000 mL

Kitasato: 1000 mL

Cápsula de porcelana

Cono de Imhoff: 1000 mL

3.1.3 Equipamiento de laboratorio

Balanza analítica OHAUS-Pioneer ($\pm 0,1$ mg)

Sonicador FAETA

HPLC Merck Hitachi LC-6200A and Merck-Hitachi UV/Vis L-4250 detector. Columna C18 (5 μ m, 250 X 4 mm I.D. Merck 50983, Lichrospher 100 PR18)

Peachímetro ALTRONIX

Centrifuga Rolco, de mesada

Bomba de vacío

Estufa 35 – 200 °C

Mufla 500 – 1500 °C

Heladera 3 – 7 °C

3.2 Métodos

3.2.1 Muestreo

El muestreo se realizó en la Provincia de Buenos Aires, en la zona Berisso-La Plata, fue una muestra puntual o simple, recolectándose 15 L de efluente cloacal en un bidón de polietileno de alta densidad.

La muestra se conservó sin aditivos a 4 °C.

El vertido de las aguas residuales es directo al cuerpo receptor, sin pasar previamente por una planta de tratamiento.



Figura 2. Fotografía del lugar donde se tomaron las muestras reales.

3.2.2 Determinación de parámetros

3.2.2.1 Físicoquímicos – Sólidos

La determinación de sólidos mediante las diferentes metodologías a describir, ofrecen una idea de los solutos de la muestra ambiental, distinguiendo las sustancias disueltas de las insolubles y las orgánicas de las inorgánicas.

3.2.2.1.1 Sólidos Disueltos Totales (SDT)

Los sólidos disueltos totales son los residuos resultantes luego de la evaporación y secado de la muestra en una estufa a 103-105°C. Los sólidos totales incluyen volátiles y fijos.

Los sólidos totales fijos son los residuos resultantes luego de calcinar la muestra a 550 ± 50 °C. Los sólidos totales volátiles corresponden a los compuestos perdidos durante la calcinación a 550 ± 50 °C. Se determinan por diferencia de peso entre sólidos totales y fijos.

Procedimiento:

Acondicionamiento de capsulas para la determinación de sólidos: Se colocaron las capsulas en mufla a 550 ± 50°C durante 1 hora, se dejo enfriar y luego se peso antes de su uso.

- 1) Se tomaron 100 mL de muestra cruda homogenizada, se colocaron en las capsulas y luego fueron llevadas a estufa a 103-105 °C durante un tiempo de 24 hs hasta sequedad. Después de dejar enfriar, se registro el peso.
- 2) Luego las muestras fueron llevadas a calcinar en mufla a 550 ± 50 °C durante un tiempo de 2 hs, se dejo enfriar y se registro el peso.

Cálculo y Expresión de los Resultados:

$$\text{SDT, mg/l} = ((P_2 - P_1) \times 1000) / V$$

$$\text{STF, mg/l} = ((P_3 - P_1) \times 1000) / V$$

$$\text{STV, mg/l} = \text{SDT} - \text{STF}$$

Donde:

SDT: Sólidos Totales en mg/l

STF: Sólidos Totales Fijos en mg/l

STV: Sólidos Totales Volátiles en mg/l

P₁: Peso de la capsula acondicionada en mg

P₂: Peso de la capsula mas el residuo seco a 103-105 °C en mg

P₃: Peso de la capsula mas el residuo calcinado a 550 ± 50 °C en mg

V: Volumen de muestra tomada en ml

3.2.2.1.2 Sólidos Suspendidos Totales (SST)

Los sólidos suspendidos totales son los materiales retenidos por un filtro de fibra de vidrio (0,45 micras) y secado 103-105 °C.

Los sólidos suspendidos fijos son los residuos resultantes luego de calcinar a 550±50 °C la muestra retenida en el filtro. Los sólidos suspendidos volátiles corresponden a los compuestos perdidos durante la calcinación a 550 ± 50 °C de la muestra retenida en el filtro. Se determinan por diferencia de peso entre sólidos suspendidos totales y fijos.

Procedimiento

- 1) Se pesaron los filtros de fibra de vidrio y se registraron los pesos.
- 2) Se tomaron 1000 mL de muestra cruda homogenizada y se hicieron pasar por un equipo de filtrado; a medida que el filtro se saturaba era removido y colocado en una capsula de porcelana. Posteriormente la capsula conteniendo todos los filtros usados para la muestra fue llevada a estufa a 103-105 °C durante un tiempo de 24 hs hasta sequedad. Se dejo enfriar y se registraron los pesos.
- 3) Luego las muestras fueron llevadas a calcinar a 550 ± 50 °C en mufla hasta cenizas blancas (tiempo estimado 2 hs aproximado), se dejaron enfriar y se registraron los pesos.

Cálculo y Expresión de los Resultados

$$\text{SST, mg/l} = ((P_2 - P_1) \times 1000) / V$$

$$\text{SSF, mg/l} = ((P_3 - P_1) \times 1000) / V$$

$$SSV, \text{ mg/l} = SST - SSF$$

Donde:

SST: Sólidos Suspendidos Totales en mg/l

SSF: Sólidos Suspendidos Fijos en mg/l

SSV: Sólidos Suspendidos Volátiles en mg/l

P₁ : Peso de los filtros en mg

P₂: Peso de los filtros mas el residuo seco a 103-105 °C en mg

P₃: Peso del filtro mas el residuo calcinado a 550 ± 50 °C en mg

V: Volumen de muestra tomada en ml

3.2.2.1.3 Sólidos Sedimentables (SS)

Los sólidos sedimentables, son los materiales que sedimentan de una suspensión en un período de tiempo definido en un cono Imhoff graduado de 1000 mL de capacidad.

Procedimiento

- 1) Se vertió en el cono Imhoff 1000 mL de la muestra cruda perfectamente homogenizada. Se dejó sedimentar y se leyó el volumen a los 30 min en la escala.
- 2) A los 60, 120 e 1440 minutos del comienzo de la medida se volvió a leer el volumen en la escala.

Expresión de los Resultados

Los resultados se expresan en mL de sólidos sedimentables/L de muestra a los 30, 60, 120 y 1440 minutos. [19]

3.2.3 Dosaje de ibuprofeno

En el método planteado para la detección de ibuprofeno se realiza en la etapa pre-analítica una extracción y pre-concentración adecuada para una matriz de complejidad intermedia,

como es un efluente cloacal. Se trabajo con extracción en fase sólida, utilizando columnas C₁₈, adecuadas para la separación de las sustancias orgánicas no polares presentes en la matriz acuosa.

La metodología analítica que se utilizo fue HPLC, asociado a la detección por UV/vis de longitud de onda variable.

Las etapas a optimizar se esquematizan en el siguiente esquema:

Etapa	Propósitos de la optimización
Optimización del pH	Unificar y buscar el pH óptimo de trabajo
Extracción en Fase Sólida (<i>SPE</i>)	Aislar, purificar y preconcentrar con éxito el analito, con adecuados valores de recuperación.
HPLC	Detección y cuantificación. Se busca optimizar la sensibilidad y la especificidad.

3.2.3.1 Optimización del pH y condiciones de la *SPE*

La *SPE* es una técnica de preparación de muestra que limpia y/o concentra muestras antes del análisis y, puede ser empleada de dos formas diferentes:

- 1- La muestra pasa a través de un lecho de fase sólida que retiene las interferencias, mientras que los analitos eluyen (menos común);
- 2- La muestra pasa a través de la fase sólida que retiene los analitos y algunos interferentes. Estos se eliminan del lecho y después se eluyen los analitos. La elución puede ser realizada con un pequeño volumen de disolvente para concentrar la muestra, aumentando los límites de detección y simplificando el análisis.

Para su aplicación práctica se emplean dispositivos comerciales que contienen entre 50 y 1000 mg de partículas porosas. Cuando la disolución que contiene los analitos pasa a través del adsorbente activado, se produce una retención de éstos junto con compuestos interferentes de los diferentes tipos de muestras. Seguidamente, se realiza una etapa de lavado con la que se pretende desorber los interferentes que hayan podido quedar retenidos. Finalmente, los compuestos de interés se eluyen mediante el paso del volumen necesario de una disolución adecuada.

La selectividad de la *SPE*, está relacionada con la capacidad del adsorbente de discriminar entre los analitos de interés y los demás compuestos de la matriz. Por lo tanto, las propiedades del adsorbente están relacionadas y absolutamente implicadas con la

estructura química del analito y/o la composición de la matriz de la muestra. En el presente trabajo para el caso del IBF se utilizó la fase conteniendo C₁₈ donde su mecanismo de interacción se basa en establecer uniones de naturaleza no polar con el analito de interés. [40]

Abajo se representa un esquema del procedimiento de la *SPE*

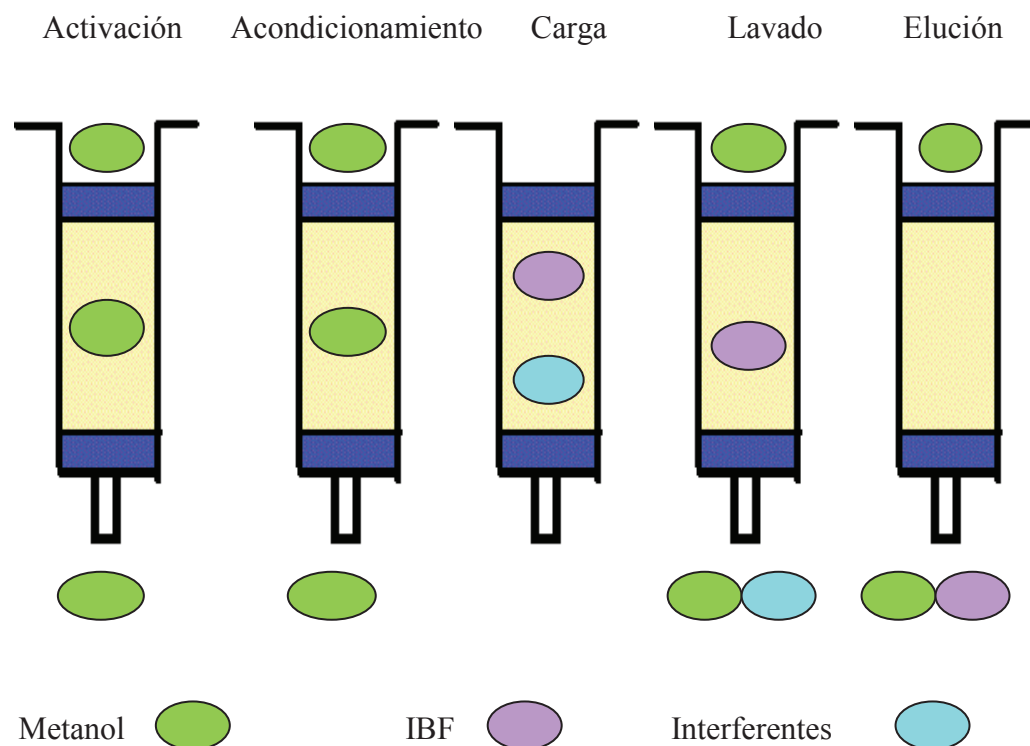


Figura 3. *SPE* para la purificación del IBF con una columna conteniendo C₁₈.

Para la **optimización del pH** se prepararon 4 soluciones estándar de 500 mL c/u de IBF de concentración 2,36 ppb; a cada una se las acondiciono a diferentes pH (7,0; 5,0; 4,0 y 3,0) previamente. Luego se las paso por columnas SPE de 500 mg acondicionadas previamente con 5 mL de metanol. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Las soluciones fueron conservadas por 48 hs a 4-5°C, luego eluidas con 10 mL de metanol. Llevadas a sequedad y resuspendidas con 1 mL de metanol; posteriormente se midieron en HPLC/ UV vis.

Columna: C₁₈; 25mm, 0,5 micras,

Fase móvil: metanol/buffer acetato de amonio pH 5,0/acetonitrilo (45:40:15 V/V); 1 ml/min. Detección: UV 229 nm.

En estos ensayos se calcula: la recuperación (respecto de la señal más alta obtenida) y la reproducibilidad de la recuperación, medida como la fluctuación porcentual de los valores de recuperación, ambos para cada pH. Los datos obtenidos se representan en los gráficos 4 y 5:

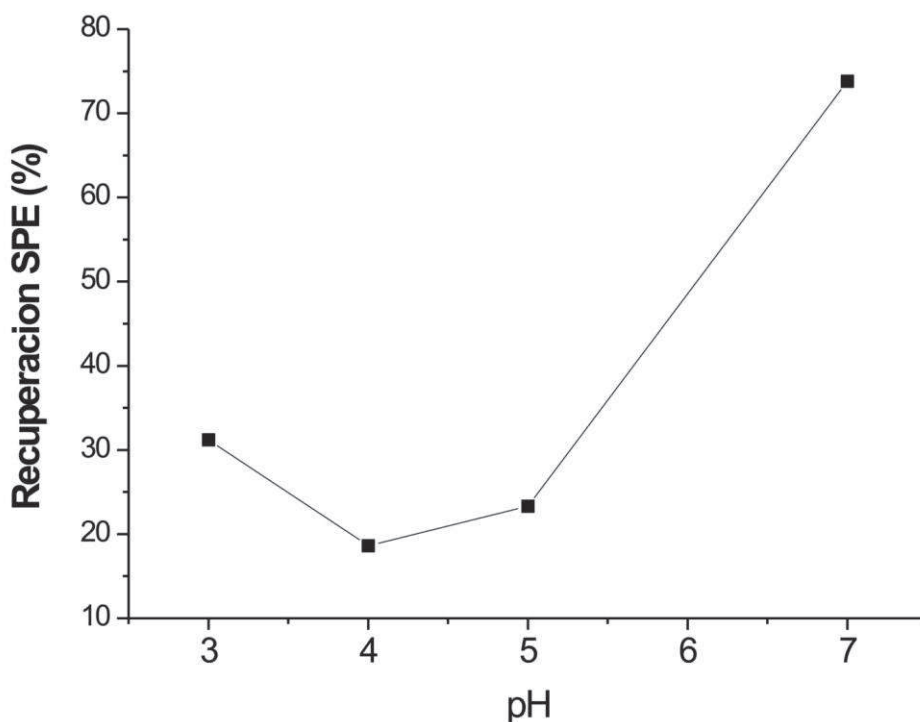


Figura 4. Grafico recuperación de la *SPE* a diferentes pH

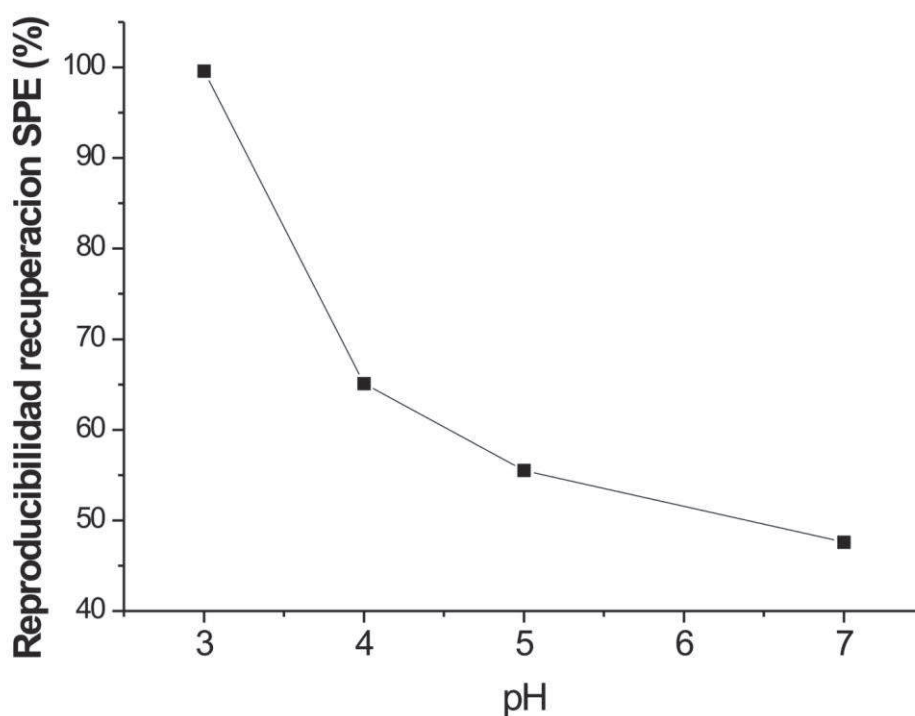


Figura 5. Gráfico de la reproducibilidad porcentual a diferentes pH

3.2.3.2 Ultra-filtrado

En el caso de las muestras reales, después de la optimización del pH y antes de realizar la *SPE* se procede a una ultra-filtración utilizando nylon 0,45 micras para eliminar los sólidos disueltos y otros compuestos presentes en el efluente.

3.2.3.3 Optimización de variables implicadas en el proceso cromatográfico

Se trabajo con soluciones estándar de IBF (R). Los valores que se requieren optimizar son, por un lado, el λ del detector UV, contando con un sistema de fase reversa, y por otro lado, la composición de la fase móvil.

Longitud de onda óptima

Fase móvil metanol/buffer acetato de amonio pH 5 (70:30)

λ (nm)	Respuesta
230	380750
228	472400
229	433572

Tabla 2. Elección de longitud de onda óptima.

Fase móvil óptima a una longitud de onda de 229 nm

Fase móvil (%)				Tiempo de retención (min)	Rango	Flujo (ml/min)
Agua ultra pura	Metanol	Acetonitrilo	Buffer acetato de amonio 0,01M pH 5			
40	60	-	-	5,04	0,03	1
40	60	-	-	4,85	0,03	1
20	60	20	-	1,85	0,03	1
40	40	20	-	4	0,03	1
40	20	40	-	3,11	0,03	1
20	20	60	-	1,92	0,03	1
-	60	-	40	9	0,03	1
-	40	20	40	6	0,03	1
-	45	15	40	6,44	0,03	1
-	45	15	40	6,43	0,03	1
-	45	15	40	4,06	0,03	0,7
-	70	-	30	11,43	1	0,5
-	75	-	25	10,52	1	0,5
-	65	-	35	8,66	1	0,5
-	80	-	20	8,10	1	0,5
-	72	-	28	9,08	1	0,5
-	70	10	20	9,17	1	0,5

Tabla 3. Elección de la fase móvil óptima a una longitud de 229 nm.

Proporciones óptimas de la fase móvil

Proporciones de Solventes de corrida (%)				
Metanol	Buffer acetato de amonio 0,01 M pH 5	Tiempo de retención promedio (min)	Rango	Flujo (ml/min)
70	30	11,43	0,5	0,5
75	25	10,52	0,5	0,5
65	35	8,66	0,5	0,5
80	20	8,10	0,5	0,5
72	28	9,08	0,5	0,5
68	32	8,30	0,5	0,5
68	32	13,51	0,5	0,5
67	33	14,12	0,5	0,5
67	33	14,64	0,5	0,5
66	34	15,76	0,5	0,5
65	35	16,98	0,6	0,6
63	37	21,12	0,5	0,6
62	38	15,39	0,03	0,6

Tabla 4. Elección de las proporciones de la fase móvil a $\lambda = 229$ nm. [27,28]

3.2.3.4 Otro pre-tratamientos

Cuando los fármacos son asimilados por el organismo, la mayoría de ellos son transformados parcial o totalmente en otras sustancias (metabolitos). Las enzimas encargadas de realizar estas transformaciones se encuentran fundamentalmente en el hígado, aunque también se encuentran en menos proporción en otros órganos.

Las reacciones involucradas en el metabolismo de los fármacos son múltiples y diversas, y en general puede considerarse que tienen lugar en dos fases. La reacción de fase I consisten en reacciones de oxidación y reducción; mientras que las reacciones de fase II son de conjugación, en las cuales el fármaco o el metabolito procedente de la fase I se acopla a un

sustrato endógeno, como el ácido glucurónico, el ácido acético o el ácido sulfúrico, aumentando así el tamaño de la molécula, con lo cual casi siempre se inactiva el fármaco y se facilita su excreción.

En las reacciones de conjugación el ácido glucurónico se combina con grupos funcionales como fenoles, alcoholes, aminas aromáticas y ácidos carboxílicos de las sustancias para formar los glucurónidos correspondiente.

Como antes habíamos planteado, el IBF es ampliamente metabolizado en el hígado, siendo eliminado mayoritariamente con la orina (90% en forma de metabolitos inactivos conjugados con ácido glucurónico y un 10% de forma inalterada). Los efluentes cloacales son esencialmente, respecto del IBF, una dilución en agua de los fármacos excretados a través de las heces y la orina para una población dada. Es de esperar, que en esta matriz coexistan entonces, tanto la droga madre como sus metabolitos, en forma libre o conjugada. En el caso del IBF, existe una proporción importante de éste que se excreta conjugado.

Considerando estas cuestiones, un pretratamiento de la muestra que hidrolice los conjugados, debería aumentar el analito disponible para su detección. El empleo de metodologías hidrolíticas es usual para el análisis de fármacos en orina. En este trabajo se intenta su aplicación en muestras ambientales. [30]

A continuación se explica dos pretratamientos realizados a la muestra cruda de efluente cloacal.

Pre – tratamientos de hidrólisis.

Hidrólisis enzimática con β -glucuronidasa

Se tomo 1,5 l de muestra previamente homogenizada, se la coloco en un elermeyer de 1000 ml, se midió el pH y se lo ajusto a un óptimo de 6,5. Luego se llevo a un baño a 37 °C y se lo agito permanentemente durante 3 hs; al estabilizarse se le adiciono la enzima.

Hidrólisis térmica en medio ácido

Se tomaron 1,5 l de muestra previamente homogenizada, se ajusto a un pH óptimo de (2,0 \pm 0,1) y se mantuvo a ebullición (100°C) durante 30 min.

3.2.4 Metodología

3.2.4.1 Diagrama de Flujo del procedimiento desarrollado para el dosaje de IBF

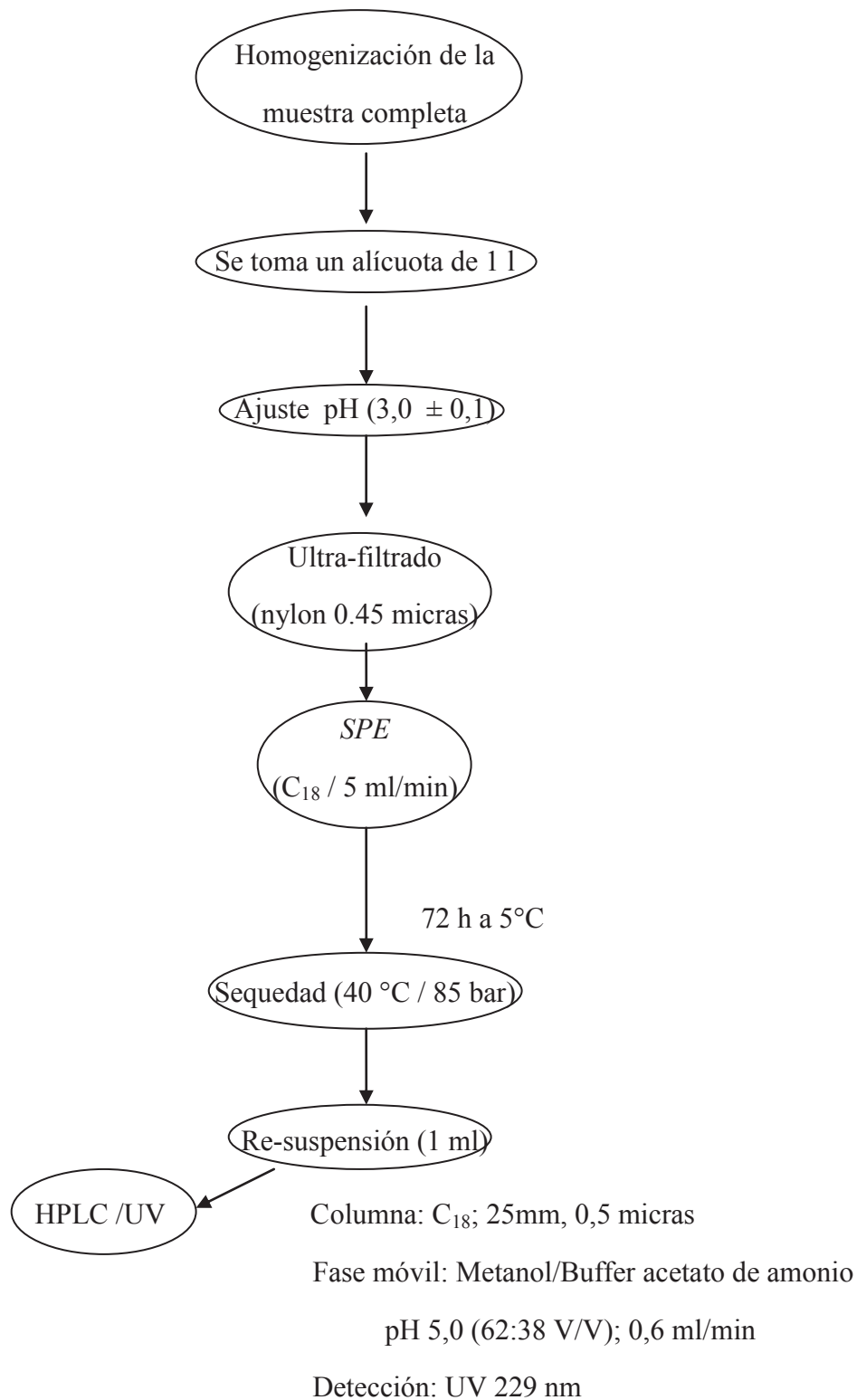


Figura 6. Esquema del procedimiento desarrollado para el dosaje de IBF.

3.2.4.2 Procedimiento de cuantificación de IBF en efluente cloacal:

Homogenización de la muestra completa: se mezcló vigorosamente la muestra de 15 L en un bidón de polietileno de alta densidad para luego tomar una alícuota.

Alícuota de la muestra: se tomó 1,00 L de la muestra homogenizada, para luego ser filtrada.

Ajuste de pH: la muestra se llevó a pH 3,0 con una solución de ácido clorhídrico concentrado y agua al 50 % v/v.

Filtración: se filtró en vacío el litro de muestra homogenizada utilizando membrana de nylon 0,45 micras, un equipo de filtrado y una bomba de vacío.

SPE: se carga la muestra por SPE con un flujo de 5 ml/min. Para el armado del equipo se utilizó una ampolla de decantación de 500 ml, una manguera de plástico para cerrar el sistema, un kitasato de 1000 mL y una bomba de vacío.



Figura 7. Fotografía del equipo armado para la Extracción en Fase Sólida.

Refrigeración: se conservaron todas las columnas de C₁₈ a 4-5 °C durante 72 h aproximado.

Elución: se eluyeron todas las muestras con 5 mL de metanol al 100 % recolectándose en erlenmeyer de 100 ml.

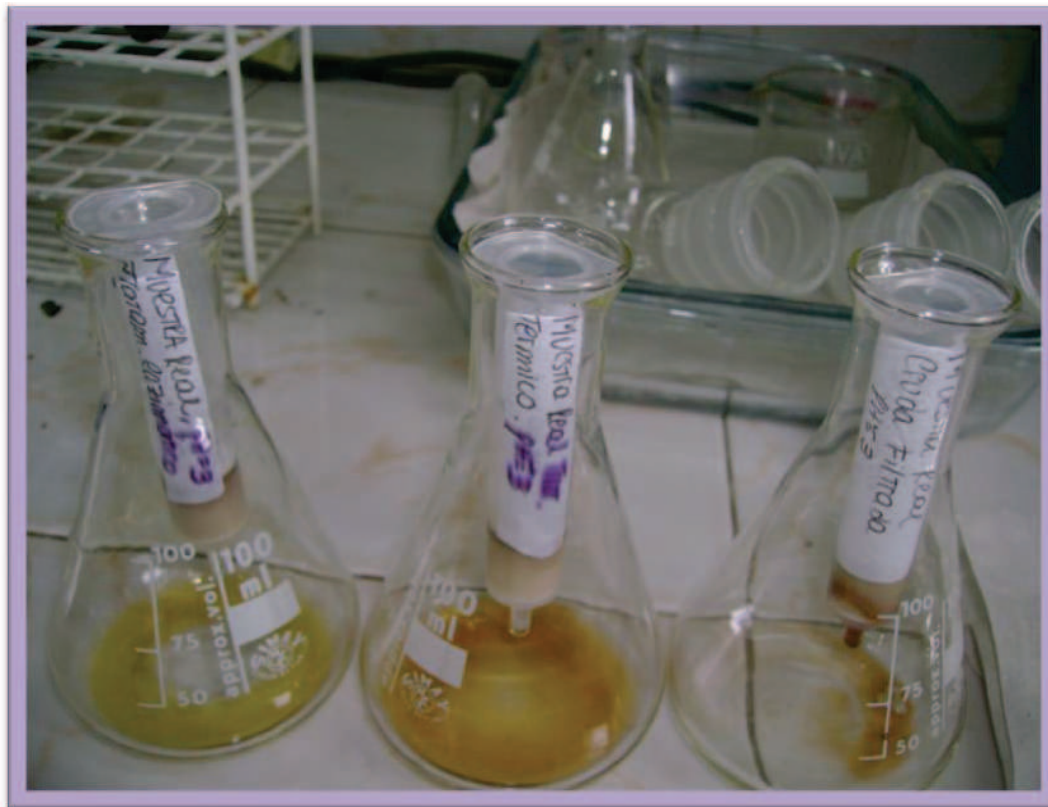


Figura 8. Elución de las muestras reales.

Sequedad: se llevaron a sequedad las muestras eluidas utilizando un rotavapor a presión de 85 bar y temperatura de 40°C durante un tiempo de 20 min aproximado.

Re-suspensión: todas las muestras se re-suspendieron con 1 mL de Metanol al 100 % y se transfirieron a un eppendorf.

Cuantificación: HPLC/UV a 229 nm como longitud de onda variable. Se utilizo una columna C₁₈ de 25 mm y de 0,5 micras. La fase móvil fue metanol / buffer acetato de amonio pH 5,0 (62:38 v/v). El flujo fue de 0,6 ml/min.

3.3 Preparación de soluciones Patrón de IBF y curva de calibrado

3.3.1 Solución madre

Para preparar la solución madre de IBF se utilizó IBF racémico al 99.9% de pureza. En un matraz de 100 mL se colocaron 23,6 mg de IBF racémico pesado en balanza analítica (sensibilidad 0.1 mg), luego se le adiciona 18 mL de dimetilsulfoxido y se completa hasta enrase con agua destilada.

3.3.2 Soluciones patrón

Se toma 1 mL de la solución madre, diluyendo a 100 mL con agua destilada.

3.3.3 Preparación de curva de calibrado

A una serie de 8 matraces de 1000 mL se agregan volúmenes de solución patrón entre 0,05 y 10 mL, llevando a volumen con agua. Se prepararon 3 réplicas de cada solución.

Luego se realizaron las determinaciones en HPLC utilizando las mismas condiciones ya descritas

3.4 Calibración del método

Para validar el método, se aplicaron los análisis estadísticos de regresión y correlación para la curva de calibrado, mediante software Origin 8.0.

Para calcular el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), primero es necesario calcular el desvío estándar de la muestra.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Donde **n** es el número de medidas, **X_i** es el valor medido en el ensayo *i* y \bar{X} el estimador de la media poblacional.

El límite de detección y el límite de cuantificación se calcularon de la siguiente manera:

$$\text{LOD} = \frac{3.3 Sb}{m} \qquad \text{LOQ} = \frac{10 Sb}{b}$$

Donde **Sb** es el error del desvío estándar de la ordenada al origen, **m** es la pendiente y **b** la ordenada al origen.

4. RESULTADOS y DISCUSIÓN

4.1 Parámetros Generales

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos para Sólidos Totales y Sedimentables.

Parámetro	Valor
SDT (Sólidos Disueltos Totales)	13400,0 mg /L
STF (Sólidos Totales Fijos)	13174,5 mg /L
STV (Sólidos Totales Volátiles)	225,5 mg /L
SST (Sólidos Suspendidos Totales)	963,3 mg /L
SSF (Sólidos Suspendidos Fijos)	891,3 mg /L
SSV (Sólidos Suspendidos Volátiles)	72,0 mg /L
SS (Sólidos Sedimentables) 30 min	3,5 mL /L
SS (Sólidos Sedimentables) 60 min	3,5 mL /L
SS (Sólidos Sedimentables) 120 min	3,5 mL /L
SS (Sólidos Sedimentables) 24 horas	4,0 mL /L

Tabla 5. Valores fisicoquímicos medidos en la muestra cruda.

4.2 Parámetros Específicos

4.2.1 Curva de Calibrado

Los resultados de la curva de calibrado se presentan en forma gráfica en la Figura 9.

Todos los datos fueron obtenidos por el procedimiento explicado en el inciso 3.2.4.1.

Curva de calibrado de IBF

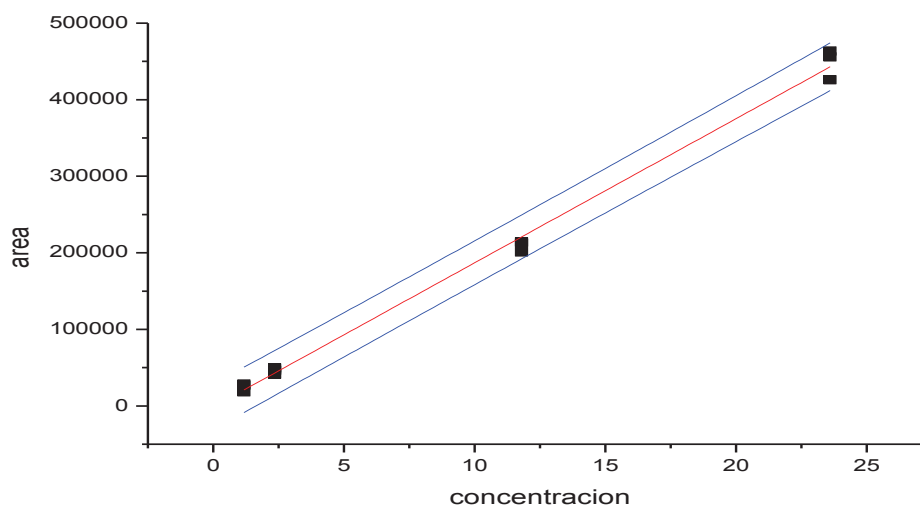


Figura 9. Curva de calibración de IBF luego de ajuste por regresión lineal

4.2.2 Calibración del método

Los datos correspondientes a la curva de calibración de IBF ajustada por regresión lineal se presentan en la Tabla 6, cuya gráfica se representa en la Figura 9.

R	0,99779	
R²	0,99515	
Suma de cuadrados residual	1,52433 x 10⁹	
Observaciones	N = 12	
ANOVA	F_{N-2} = 2260,00028	Prob > F_{N-2} = 4,09006 x 10⁻¹³
	Coefficientes	error estandar
Ordenada al origen (b)	-1257,0555	5249,88078
Pendiente (m)	18823,74307	395,96039

Tabla 6. Coeficientes de correlación de la curva de IBF

4.2.3 Límite de detección y de cuantificación del método

Se aplican las fórmulas para el cálculo del LOD y LOQ

Obteniéndose

LOD =0,9 ppb

LOQ =2,8 ppb

4.2.4 Cuantificación de Muestra real

En la tabla que se encuentra a continuación se hace referencia a los valores de las áreas obtenidos en la muestra cruda filtrada y en las muestras tratadas térmica y enzimáticamente.

Muestras del Efluente Cloacal	Área
Filtrada	333229
Con Tratamiento Térmico Acido	No Detectado
Con tratamiento Enzimático	No Detectado

Tabla 7. Valores de áreas de efluente cloacal con diferentes pre-tratamientos.

En las siguientes figuras se muestran los cromatogramas de la muestra con tratamiento enzimáticos, en los cuales puede observarse que disminuye la resolución de la señal cromatográfica y aumentan el ruido.

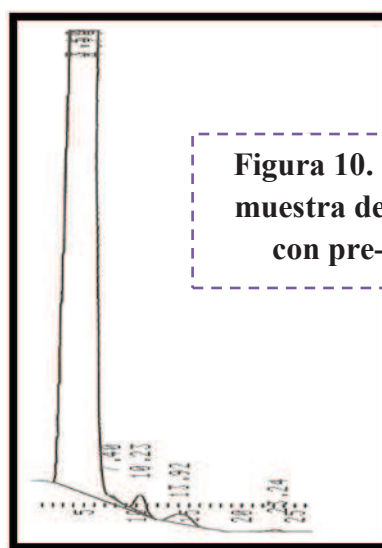
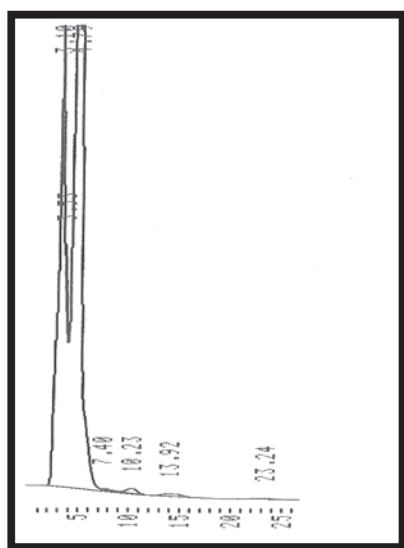


Figura 10. Cromatogramas muestra de efluente cloacal con pre-tratamientos.

Aplicando la metodología y utilizando la ecuación de la recta de la curva de calibrado ajustada a los análisis de regresión, se obtuvo un valor de $17,8 \pm 0,9$ ppb de IBF en las muestras de efluentes cloacal.

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos para un estándar de ibuprofeno y para la muestra real filtrada.

Figura 11.
Cromatograma
de patrón
estándar de
ibuprofeno

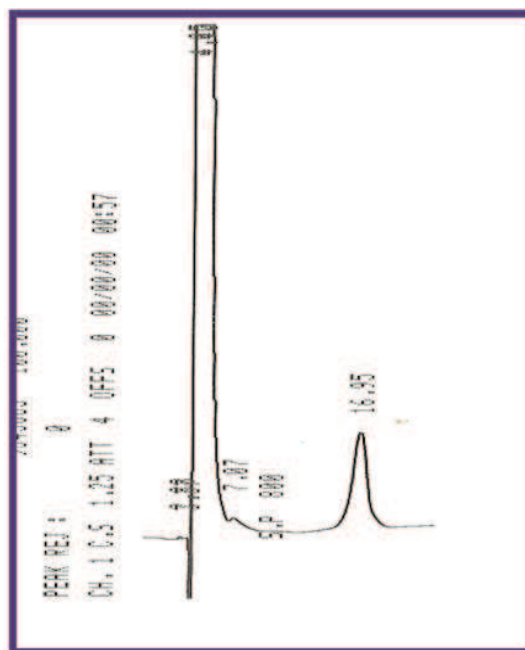
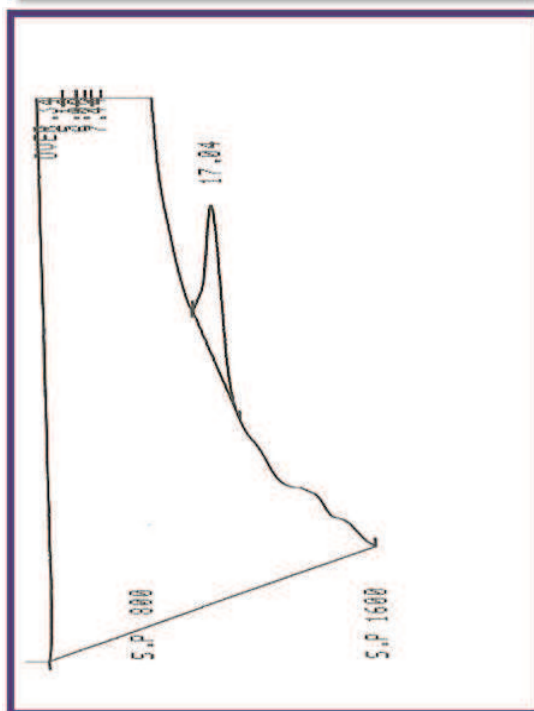


Figura 12.
Cromatograma
de la muestra
del efluente
cloacal



4.3 Discusión

Una vez planteado el desarrollo de la metodología, dentro de ella los parámetros críticos a discutir son:

Optimización del pH de la muestra: de los pH que se trabajó, se eligió el pH 3 ya que fue el que presentó menos fluctuación y segundo en porcentaje de recuperación relativa. Considerando que el pKa del IBF es de 4,4, y el pH seleccionado es menor que dicho pKa, podemos estimar que el IBF se encuentra libre de su conjugado y el equilibrio se encuentra desplazado hacia su forma ácida.

Condiciones de la extracción en fase sólida (SPE): en el desarrollo experimental de la SPE fue necesario conservar en refrigeración durante distintos tiempos los estándares dentro de la columna de C₁₈ a fin de eluirlos todos juntos para obtener el extracto preconcentrado de IBF. Al momento de realizar la cuantificación se halló que solo los extractos almacenados en heladera durante un determinado periodo mostraron presencia de IBF.

Condiciones de la HPLC: como la fase móvil cumple un rol fundamental ya que permite lograr un número muy grande de diferentes separaciones, durante el desarrollo del método se fue probando con diferentes solventes (metanol, agua ultra pura, acetonitrilo, buffer acetato de amonio) hasta hallar la fase móvil óptima. Al ir probando y viendo que con metanol y buffer acetato de amonio pH 5, 0,01M aumentaba la eficacia de resolución, se decidió elegir esa fase móvil para la realización de la metodología, aunque no disminuía el ruido y las interferencias.

Otro de los parámetros a tener en cuenta es la longitud de onda, más allá de elegir una en donde se puede detectar otros compuestos, el λ 229 resultó ser el que mejor eficacia de pico cromatográfico obteníamos al momento de desarrollar la metodología. Sería importante seguir en la búsqueda de una longitud de onda en donde no haya muchas interferencias.

Para seguir mejorando la eficacia de la resolución cromatográfica se buscó diferentes proporciones de fase móvil y flujo, se fue realizando en base a los tiempos de retención, buscando uno en el cual el pico se encuentre alejado del frente del solvente y de las posibles interferencias.

Se valida el método desarrollado al observar la reproducibilidad de las áreas en orden de magnitud encontrada durante el desarrollo de la metodología en la optimización del pH y la metodología aplicada a la cuantificación del IBF en efluentes cloacales.

Validación del método: Se obtienen algunos parámetros de validación que ofrecen un buen desempeño del método. Sin embargo, fundamentalmente no se ha estudiado en profundidad el efecto matriz que, a juzgar por las características de los cromatogramas de las muestras reales, pueden llegar a ser relevantes. De cualquier manera, el trabajo que se presenta es un buen desarrollo que permite establecer las bases de un método validable.

5. CONCLUSIÓN

Se obtuvo un límite de detección (LOD) y un límite de cuantificación (LOQ) compatibles con los reportes de literatura para el IBF en aguas residuales urbanas.

La hidrólisis enzimática y térmica en medio ácido de los conjugados como procedimiento pre-analítico, no aumenta la performance del método, más bien aumentaron el ruido y dificultaron la resolución de la señal cromatográfica.

El método propuesto es aplicable a un monitoreo sistemático (estacional, diferentes cuencas) de los líquidos cloacales de la metrópolis en Argentina, para una evaluación de riesgo preliminar de este componente.

Los valores encontrados en las muestras reales, indicaron presencia de IBF dentro del rango lineal de la técnica. Estos valores, se hallan dentro de los valores más altos reportados para este tipo de efluentes para otras regiones. Esto implica, por un lado, que la técnica desarrollada es adecuada para un monitoreo preliminar en nuestra región. Pero, dado que las cantidades de IBF volcadas asociadas con las concentraciones medidas de manera puntual son elevadas, los resultados sugieren que este compuesto podría representar un potencial riesgo ambiental significativo para las zonas de vertido.

Se hace necesario incrementar el conocimiento sobre esta clase de contaminantes emergentes, contribuir con información relevante para la generación de nuevas tecnologías de tratamientos del agua, con el fin de garantizar una calidad idónea y sin efectos adversos para la salud humana y los organismos acuáticos.

Este trabajo fue presentado y evaluado para su exposición en el IV Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC Argentina y en las XXX Jornadas Argentinas Interdisciplinarias de Toxicología, ambas actividades desarrolladas en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires en octubre del año 2012.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Toxicología Fundamental: Manual Repetto, Editorial Díaz de Santos, publicado 01/01/2009.
2. Toxicologia.NET: <http://wzar.unizar.es/stc/toxicologianet/pages/t/01/t0110.htm> , fecha 22/04/2012.
3. Dalzell, D. J. B., S. Alte, E. Aspichuetal, A. d. I. Sotal, J. Etxebarrial, M. Gutierrezal, C. C. Haffmannl, D. Salas, U. Obst and N. Christofi. 2002. “A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge”. *Chemosphere* 47: 535-545.
4. Farre, M., G. Kloter, M. Petrovic, M. C. Alonso, M. J. Lopez de Alda and D. Barcelo. 2002. “Identification of toxic compounds in wastewater treatment plants during a field experiment”. *Analytica Chimica Acta* 456: 19-30.
5. Aguayo, S., M. J. Muñoz, A. de la Torre, J. Roset, E. de la Peña and M. Carballo. 2004. “Identfication of organic compounds and ecotoxicological assessment of sewage treatment plants (STP) effluents”. *Sciencie of the Total Environment* 328: 69-81.
6. Manusadzianas, L., L. Balkelyte, K. Sadauskas, I. Blinova, L. Pollumaa and A. Kahru. 2003. “Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters: selection of the biotest, and correspondence between toxicity and chemical-based indices”. *Aquatic Toxicology* 63: 27-41.
7. Katsoyiannis, A. and C. Samara. 2007. “Ecotoxicological evaluation of the wastewater treatment process of the sewage treatment plant of thessaloniki, Greece”. *Journal of Hazardous Material* 141: 614-621.
8. Peña, C., D. E. Carter, F. Ayala-Fierro, publicado 2001. “Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental”.
9. Clara, M., B. Strenn, O. Gans, E. Martinez, N. Kreuzinger and H. Kroiss. 2005. “Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants”. *Water Research* 39: 4797-4807.

10. Albert, L. A. “Contaminación Ambiental. Origen, clases, fuentes y efectos”. <http://blogcdam.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2012/03/Contaminaci%C3%B3n-ambiental-origen-clases-fuentes-y-efectos.pdf> , fecha 8/1/2013.
11. Garcia-Reyero, N., C. M. Lavalley, B. L. Escalon, D. Martinovic, K. J. Kroll, P. W. Sorensen and N. D. Denslow. 2011. “Behavioral and genomic impacts of a wastewater effluent on the fathead minnow”. *Aquatic Toxicology* 101: 38-48.
12. Wong, J.W. C., K. Li, M. Fang and D. C. Su. 2001. “Toxicity evaluation of sewage sludges in Hong Kong”. *Environment International* 27: 373-380.
13. Brown, K. D., J. Kulis, B. Thomson, T. H. Chapman and D. B. Mawhinney. 2006. “Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico”. *Science of the Total Environment* 336: 772-783.
14. Oberholter, P. J., A. –M. Botha and T. E. Cloete. 2008. “Biological and chemical evaluation of sewage water pollution in the Rietvlei nature reserve wetland area, South Africa”. *Environmental Pollution* 156: 184-192.
15. Smital, T., S. Terzic, R. Zaja, I. Senta, B. Pivcevic, M. Popovic, I. Mikac, K. E. Tollefsen, K. V. Thomas and M. Ahel. 2011. “Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluent using chemical analyses and biosays”. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 844-851.
16. Terzic, S., I. Senta, M. Ahel, M. Gros, M. Petrovic, D. Barcelo, J. Muller, T. Knepper, I. Marti, F. Ventura, P. Jovancic and D. Jabucar. 2008. “Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region”. *Science of the Total Environment* 339: 66-77.
17. Los Residuos en la Industria Farmacéutica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 37, N 1, 2006. <http://revista.cnice.edu.cu/revistaCB/files/CB-2006-1-025-031.pdf>
18. Valdes, E. C y A. B. Vásquez Gonzales, publicado 2003. México D.F. Libro de Ingeniería de los sistemas de tratamiento y disposición de aguas residuales. http://www.capac.org/web/Portals/0/biblioteca_virtual/doc003/

http://www.capac.org/web/Portals/0/biblioteca_virtual/doc003/TEXTO%20COMPLETO.pdf

19. Manual de procedimientos analíticos para agua y efluentes. Laboratorio DINAMA, 1996.
20. Ing. Rojas, R. 2002. Conferencia Sistema de Tratamientos de aguas residuales. Curso Internacional “Gestión integral de tratamientos de Aguas Residuales”.
21. Álamo, C. Editorial ARÁN, España 2005. “Guía farmacológica de analgésicos”.
22. Da Camara, L; Hernandez, M y Paz, L. Dpto. de Fenómenos de Transporte. “Manual de Diseño para plantas de tratamientos de aguas residuales alimenticias”.
http://www.frbb.utn.edu.ar/carreras/efluentes/manual_tratamiento.pdf
23. Barceló, D. 2003. “Emerging pollutants in water analysis”. Trends in Analytical Chemistry. Vol 22 No. 10.
24. Elorriaga, Y., D. J. Marino, P. Carriquiriborde and A. E. Ronco. 2012. “Human Pharmaceuticals in Wastewaters from Urbanized Areas of Argentina”. Bull Environ Contam Toxicol DOI 10.1007/s00128-0919.
25. Fent, K., A. A. Weston and D. Caminada. 2006. “Ecotoxicology of human pharmaceuticals”. Aquatic Toxicology 76: 122-159.
26. Tesis “Presencia de Contaminantes emergentes en aguas y su impacto en el ecosistema”. Henriquez Villa, D. Santiago de Chile 2012.
27. Costi, E. M., I. Goryacheva, M. D. Sicilia, S. Rubio, and D. Pérez- Bendito. 2008. “Supramolecular solid-phase extraction of ibuprofen and naproxen from sewage based on the formation of mixed supramolecular aggregates prior to their liquid chromatographic/ photometric determination”. Journal of Chromatography A 1210: 1-7.
28. Wen, X., C. Tu, and H. Kee Lee. 2004. “Two-Step Liquid-Liquid-Liquid Microextraction of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs in Wastewater”. Anal. Chem 76: 228-232.
29. Hashim, N. H., S. Khan. 2011. “Enantioselective analysis of ibuprofen, ketoprofen and naproxen in wastewater and environmental water samples”. Journal of Chromatography A 1218: 4746-4754.

30. C. del Arco. Capitulo 5. “Metabolismo de los Fármacos”. [http://dspace.universia.net/bitstream/2024/480/4/CAP+5+\(73-85\).PDF](http://dspace.universia.net/bitstream/2024/480/4/CAP+5+(73-85).PDF) fecha: 8/1/2013.
31. Castillo Morales, G., M. C. Díaz Báez, Y. Pica Granados, A. Ronco, C. Sobrero, G. Bulus Rossini, G. Feola, G. Forget y A. Sánchez-Bain; publicado 2004. México. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. “Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones”.
32. Benito Vives de Andreis, J. Instituto de investigaciones marinas y costeras. “Manual de Técnicas para la determinación de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos (aguas, sedimentos y organismos)”.
33. Santos, J. L., I. Aparicio and E. Alonso. 2007. “Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain)”. *Environment International* 33: 596-601.
34. Santos, J. L., I. Aparicio, M. Callejón and E. Alonso. 2009. “Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-years period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain)”. *Journal of Hazardous Materials* 164: 1509-1516.
35. Ferrando-Climent, L., N. Collado, G. Buttiglieri, M. Gros, I. Rodriguez-Roda, S. Rodriguez-Mazaz and D. Barceló. 2012. “Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment”. *Science of the Total Environment* 438: 404-413.
36. Thomas, K. V. and M. J. Hilton. 2004. “The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries”. *Marine Pollution Bulletin* 49: 436-444.
37. Quinn, B., F. Gagné and C. Blaise. 2009. “Evaluation of the acute, chronic and teratogenic effects of a mixture of eleven pharmaceuticals on the cnidarians, *Hydra attenuate*”. *Science of the Total Environment* 407: 1072-1079.
38. Camacho-Muñoz, D., J. Martín, J. L. Santos, I. Aparicio and E. Alonso. 2010. “Occurrence, temporal evolution and risk assessment of pharmaceutically active compounds in Doñana Park (Spain)”. *Journal of Hazardous Materials* 183: 602-608.

39. Andreozzi, R., M. Raffaele and P. Nicklas. 2003. “Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment”. *Chemosphere* 50: 1319-1330.

40. Nimer Leite, M. 2007. Tesis Doctoral: “Estudio del comportamiento ambiental del sulfonato de alquilbenceno lineal (*LAS*) en una parcela agrícola de La Vega de Granada”. Departamento de Química Analítica, Universidad de Granada.