

**DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC-FID)
PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES TIPO
PRODUCTOS FARMACÉUTICOS**

**SARA LINETH DUQUE ZAMBRANO
LEIDY JOHANA ARANGO RAMIREZ**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE QUÍMICA
PEREIRA**

2015

**DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC-FID)
PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES TIPO
PRODUCTOS FARMACÉUTICOS**

**SARA LINETH DUQUE ZAMBRANO
LEIDY JOHANA ARANGO RAMIREZ**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Tecnólogo Químico**

Director:

Juan Pablo Arrubla Vélez

Químico, M. Sc

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

FACULTAD DE TECNOLOGÍA

ESCUELA DE QUÍMICA

PEREIRA

2015

NOTA DE ACEPTACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO
DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC-FID)
PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES TIPO
PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

Presentado por:

SARA LINETH DUQUE ZAMBRANO

LEIDY JOHANA ARANGO RAMIREZ

Los suscritos director y jurado del presente trabajo de grado, una vez revisada la versión escrita y presenciado la sustentación oral, decidimos otorgar:

La nota de: _____

Con la connotación: _____

Para constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy:

Director:

Juan Pablo Arrubla Vélez _____

Jurado:

Firma _____

Jurado:

Firma _____

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización de este proyecto, en especial a nuestras familias, por su apoyo incondicional, por ser quienes nos motivan a seguir adelante con nuestros sueños.

Especial agradecimiento a nuestro director Juan Pablo Arrubla, por la orientación, seguimiento y la supervisión de este proyecto, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido durante todo este proceso.

A nuestros profesores y a Lina Giraldo Vasquez por la dedicación, tiempo y por brindarnos sus conocimientos.

Además agradecemos a la Vicerrectoría de Investigaciones, innovación y extensión por la financiación y agradecemos a todos aquellos quienes hicieron posible el desarrollo, cumplimiento y culminación de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO TABLAS	7
CONTENIDO DE ECUACIONES.....	7
CONTENIDO DE GRAFICOS	8
CONTENIDO DE IMAGENES.....	8
CONTENIDO DE FIGURAS	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	11
3. OBJETIVOS	13
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	13
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
4. MARCO TEÓRICO.....	14
4.1. CONTAMINANTES EMERGENTES.....	14
4.2. FÁRMACOS	15
4.2.1. Diclofenaco.....	16
4.2.2. Cafeína.....	18
4.2.3. Ibuprofeno.....	18
4.2.4. Carbamazepina.....	18
4.2.5. Comportamiento Ambiental De Los Fármacos.....	19
4.3. FUNDAMENTOS DE LA CROMATOGRAFÍA.....	22
4.4. CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	23
4.4.1. Cromatografía de gases de alta velocidad.....	24
4.4.2. Sistemas de cromatografía de gases miniaturizados.....	24
4.4.3. Sistema de gas portador	25
4.4.4. Puerto De Inyección.....	26
4.4.5. Columna Cromatográfica	27
4.4.6. Fase Estacionaria Líquida.....	28
4.4.7. Detectores.....	29
4.5. EXTRACCIÓN EN FASE SOLIDA (SPE).....	37
4.6. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE).....	40
4.7. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME)	40

4.8.	EXTRACCIÓN POR SORCIÓN BARRA MAGNÉTICA AGITADORA (SBSE) ...	41
4.9.	ESTANDARIZACIÓN.....	42
4.9.1.	Curva De Calibración.....	42
4.9.2.	Registro De Datos O Sistema De Datos.....	43
4.9.3.	Parámetro De Calidad	43
4.9.4.	Exactitud	43
4.9.5.	Precisión	44
4.9.6.	Límite De Detección Y Selectividad.....	44
4.9.7.	Límite De Detección Y Límite De Cuantificación.....	45
4.9.8.	Linealidad Y Rango.....	47
4.9.9.	Sensibilidad	48
4.9.10.	Porcentaje De Recuperación (% REC).....	48
4.9.11.	Repetitividad.....	49
4.9.12.	Reproducibilidad.....	49
4.10.	NORMATIVIDAD GENERAL.....	50
5.	METODOLOGIA.....	52
5.1.	COMPRA DE ESTÁNDARES Y REACTIVOS	52
5.1.1.	Selección Y Compra De Estándares Disponibles	52
5.1.2.	Selección y Compra de Reactivos Y Estándares.....	52
5.1.3.	Compra y Préstamo de Equipos y Materiales.....	52
5.2.	DESARROLLO DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN.....	53
5.3.	DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN EN FASE SOLIDA	55
5.4.	ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES	57
5.4.1.	Contaminación Con Las Muestras Reales	57
5.5.	CARACTERÍSTICAS DEL CROMATÓGRAFO DE GASES	58
5.5.1.	Gas De Portador.....	58
5.5.2.	Método Cromatográfico	60
5.5.3.	Columna cromatografía	60
5.5.4.	Calibración.....	60
5.5.5.	Control de calidad.....	61
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
7.	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	72

8. CONCLUSIONES.....	73
9. RECOMENDACIONES.....	74
10. BIBLIOGRAFIA.....	75
11. ANEXO.....	81

CONTENIDO TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la toxicidad en el ambiente acuático.....	16
Tabla 2. Fármacos y características.....	17
Tabla 3. Tiempo de retención analitos	62
Tabla 4. Datos de analitos a 5 ppm.....	63
Tabla 5. Datos de analitos a 10 ppm.....	63
Tabla 6. Datos de analitos a 20 ppm.....	64
Tabla 7. Datos de analitos a 30 ppm.....	65
Tabla 8. Datos de analitos a 46,6 ppm.....	65
Tabla 9. Datos de analitos a 53,3 ppm.....	66
Tabla 10. Curva de calibración del ibuprofeno	66
Tabla 11. Curva de calibración de la cafeína	67
Tabla 12. Curva de calibración del Carbamazepina.....	68
Tabla 13. Curva de calibración del diclofenaco	68
Tabla 14. Cromatograma muestra real.....	69
Tabla 15. Rangos para curva de calibración	70
Tabla 16. Concentración y % de recuperación de analitos	70
Tabla 17. Desviaciones estándar	72
Tabla 18. Resultados estadísticos.....	72

CONTENIDO DE ECUACIONES

Ecuación 1. Coeficiente de distribución.....	23
Ecuación 2. Cantidad de muestra presente en material desconocido.....	43
Ecuación 3. Limite de detección.....	45
Ecuación 4. Porcentaje de recuperación	49

CONTENIDO DE GRAFICOS

Grafico 1. Resultados de los porcentajes de recuperación de la contaminación... 71

CONTENIDO DE IMAGENES

Imagen 1. Estándares analíticos y soluciones madre	55
Imagen 2. Matraz con contaminación de muestra real.....	55
Imagen 3. Filtración al vacío.....	56
Imagen 4. Acondicionamiento del Cartucho para la SPE	56
Imagen 5. Colector SPE de 12 puestos	57
Imagen 6. Filtración de la muestra antes de inyección.....	58
Imagen 7. Equipo de cromatografía	60
Imagen 8. Curva de calibración del diclofenaco	68

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 3. Esquema de la secuencia de procesos conocida como LADME	19
Figura 1. Representación esquemática de un cromatógrafo de gases	27
Figura 2. Diagrama de proceso SPE.....	38
Figura 5. Método cromatográfico de gases	54
Figura 6. Método SPE para extracción de los fármacos y clean up	59
Figura 7. Cromatograma del Blanco.....	62
Figura 8. Cromatograma de analitos a 5 ppm	63
Figura 9. Cromatograma de analitos a 10 ppm	63
Figura 10. Cromatograma de analitos a 20 ppm	64
Figura 11. Cromatograma de analitos a 30 ppm	64
Figura 12. Cromatograma de analitos a 46,6 ppm	65
Figura 13. Cromatograma de analitos a 53,3 ppm	65
Figura 14. Curva de calibración del ibuprofeno	66
Figura 15. Curva de calibración de la cafeína	67
Figura 16. Curva de calibración del Carbamazepina.....	67
Figura 17. Cromatogramamuestra real	69

1. INTRODUCCIÓN

Algunos productos farmacéuticos y de higiene personal están siendo considerados como contaminantes emergentes debido a su liberación continua en el medio ambiente acuático, su persistencia y el aumento de evidencias de los efectos ecotoxicológicos (Cunningham et al., 2006). Una de las características de este grupo de contaminantes es que no necesitan ser persistentes en el medio ambiente para causar efectos negativos, ya que si bien existen sistemas que los remueven o bien se transforman fácilmente en subcompuestos, su continuo consumo y, por ende, su consiguiente excreción, deriva en su continua introducción y constante presencia en el medio ambiente (Barceló, 2003).

Las actividades antrópicas en ecosistemas naturales se generan a través de los vertimientos de aguas en el medio ambiente gracias a las actividades de cuidado de salud, de lo que resulta interesante abordar el tema de los contaminantes emergentes respecto a fármacos dado que el uso y venta de estos no es medido ni necesariamente adquirido a través de recetas médicas incrementando la liberación y acumulación en el ambiente. Además en muchos casos, las consecuencias de su presencia en el medio ambiente no están aún claras, pero en otros el riesgo parece evidente, y alarmante. Así, por ejemplo, el diclofenaco, aparte de afectar a los riñones en los mamíferos, se ha asociado (como consecuencia de su uso en veterinaria) con la desaparición de los buitres blancos en la India y Pakistán (Dalterio, 2014).

La contaminación del medio ambiente por residuos de farmacéuticos es un fenómeno que se viene dando desde hace más de tres décadas. El primer estudio sobre la contaminación por productos farmacéuticos tuvo lugar en una planta de tratamiento de residuos de la ciudad Kansas en 1976 en donde se encontró ácido clofíbrico, nicotina, cafeína e ibuprofeno. Los resultados fueron publicados y luego ignorados por 16 años. En 1992 investigadores alemanes que trabajaban en la búsqueda de herbicidas en agua encontraron ácido clofíbrico, hipolipemiantes y analgésicos en aguas subterráneas y residuales en Alemania. Ese mismo año, estudios en Dinamarca y Suecia hallaron estos compuestos en ríos, lagos y en el Mar del Norte. A partir de los resultados de este trabajo europeo, algunos investigadores norteamericanos comenzaron a prestar atención al tema de los medicamentos en el ambiente dando lugar a varios estudios para medir los residuos farmacológicos en el agua, lo que fue posible gracias a la aparición de nuevos equipos y técnicas analíticas más eficaces (Muñoz, 2012).

Por sus características intrínsecas, los productos farmacéuticos son sustancias altamente solubles en agua, que se liberan al medio ambiente vía excreción, ya sea metabolizados o no metabolizados, por vertido de los productos no utilizados o caducados, o bien procedentes, como residuos, de los procesos de producción, por lo que pueden estar presentes en todas las etapas de un ciclo de vida del agua puntual y referido a su uso. Si bien no se trata de compuestos persistentes, éstos si son constantemente utilizados y vertidos, y los sistemas de tratamiento convencionales de agua potable y de aguas servidas muchas veces no son capaces de eliminarlos (Henríquez, 2012).

Un factor muy importante del estudio es que los contaminantes emergentes no están incluidos en la legislación del país, y al no existir una regulación legal que determine las concentraciones máximas admisibles no se está cumpliendo el interés de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en donde sus lineamientos tienen relación con la protección de la salud pública de la población, adoptando medidas que tienen que ver con mejorar la calidad del agua para consumo humano.

Según lo establecen las “Guías para la Calidad del Agua Potable”, el agua para consumo no debe ocasionar ningún riesgo significativo para la salud cuando se consume durante toda la vida, teniendo en consideración las diferentes vulnerabilidades que pueden presentar las personas en las distintas etapas de su vida. La finalidad de dichas guías es básicamente apoyar el desarrollo y la ejecución de estrategias de gestión de riesgos que permitan asegurar la inocuidad del abastecimiento de agua, mediante el desarrollo de normas nacionales o regionales basadas en información científica que proporcionan las Guías, y que consideran un análisis de riesgos y beneficios. Considerando que los fármacos son considerados “contaminantes emergentes” su incorporación específica en las Guías de la OMS aún no se ha registrado, encontrándonos incluso con que ni siquiera son mencionados en éstas (Henríquez, 2012). De modo que queda totalmente justificada la necesidad de implementar nuevos procedimientos que permitan la eliminación de estos contaminantes de las aguas para consumo.

Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo de grado se pretende obtener las curvas de calibración para la detección de productos farmacéuticos como cafeína, carbamazepina, diclofenaco e ibuprofeno usando como técnica la cromatografía de gas capilar-FID. Este sería apenas el primer paso a dar ya que la problemática ambiental aumenta y aquí en Colombia existe un gran vacío en cuanto al tema de los contaminantes emergentes y esperamos como estudiantes de tecnología química implementar esta técnica para el desarrollo de futuras investigaciones.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La detección generalizada de los productos farmacéuticos en muestras ambientales como resultado de mejora de las capacidades de análisis y estudios centrados en el terreno ha llevado a la preocupación por los riesgos potenciales asociados con la liberación de productos farmacéuticos en el medio ambiente. Esta preocupación ha sido impulsada por los programas de muestreo de aguas superficiales en EE.UU., Europa y en otros lugares que han demostrado la presencia de diferentes clases de productos farmacéuticos. La alta polaridad y baja volatilidad de la mayoría de los productos farmacéuticos significa que son susceptibles de ser transportados hacia y por el cuerpo del agua (Cunningham et al, 2006).

A nivel mundial se han empezado a estudiar contaminantes emergentes dando la importancia al impacto ambiental que estos generan en la composición de cuerpos hídricos en los que se hallan sustancias como lo son productos farmacéuticos y de cuidado personal (PFCP) y en Colombia, en una investigación realizada en el Hospital Universidad del Norte en Barranquilla se encontraron, en los efluentes que se descargan al sistema de alcantarillado de la ciudad y este a su vez al río, sustancias de origen farmacéutico, que evidencian que los sistemas de tratamiento de aguas residuales deben ser repensados. Las sustancias de mayor uso en un hospital de esta categoría son los analgésicos, antiinflamatorios como el diclofenaco, ibuprofeno y otros medicamentos como la aspirina, antisépticos como el triclosán, hormonas como el estriol y el estrona, estimulantes como la cafeína, y otras drogas de uso lícito en centros hospitalarios como la morfina (Gil, et al 2012). Cabe anotar que aunque la normatividad colombiana regula las sustancias de interés sanitario en agua cruda y residual esta está contemplada en el decreto 3039 de 2010, pero en dicha reglamentación no se hace mención a los compuestos derivados de los PFCP, por lo que se hace necesario cualificar y cuantificar este tipo de contaminantes, con el fin de generar herramientas que permitan tomar decisiones acertadas según la problemática ambiental encontrada.

Sin embargo hasta el momento no se han desarrollado investigaciones a nivel local en el tema que permitan cualificar y cuantificar los PFCP, pues se desconoce su concentración en el agua y sus efectos sobre la salud humana y el ambiente, por tal razón la necesidad de adaptar métodos analíticos modernos, sensibles y confiables como la cromatografía de gas capilar FID permitiendo que encaje y se destaque el perfil del tecnólogo químico que consiste en el desarrollo de técnicas analíticas, proporcionando herramientas de validación que permitan soportar el desarrollo del estudio de productos farmacéuticos en matrices acuosas por medio de esta técnica cromatográfica.

El desarrollo de este trabajo va a servir para el avance de nuevas y futuras investigaciones ya que aquí se da el primer paso de la investigación obteniendo las curvas de calibración, pero con el apoyo de semilleros podrán otros estudiantes continuar con los estudios hasta quizás llegar a técnicas de depuración y descontaminación de aguas dándonos como triunfo a las estudiantes encargadas del proyecto no solo la formación de talento como profesionales sino también el orgullo por el aporte realizado.

El desarrollo de la técnica es un procedimiento estadístico que consiste en verificar y documentar, que exista un alto grado de seguridad en la obtención de resultados que deberían ser precisos y exactos dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos (Aguirre, 2001). Miller en Estadística para Química Analítica en 1993 propuso para la estandarización el cálculo de la señal ruido que se define como el límite de detección. Así el desarrollo de la técnica de cromatografía de gas capilar-FID para el análisis de contaminantes emergentes tipo productos farmacéuticos cumple con el objetivo que esta plantea y tal curva de calibración permite tener una información certera como herramienta para los grupos de Investigación locales, entidades públicas de control (Secretaría de Salud de Risaralda, La CARDER), las empresas prestadoras del servicio de agua potable (Aguas y aguas de Pereira) y el público en general, en la formulación de respuestas a las problemáticas emergentes de contaminación de los humedales y fuentes hídricas (Arrubla, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar la técnica de Cromatografía de gas capilar-FID por medio de sus curvas de calibración para la identificación y cuantificación de contaminantes emergentes tipo productos farmacéuticos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener en forma experimental los valores de los parámetros como lo son: precisión, linealidad, límite de detección y cuantificación, sensibilidad y correlación lineal que sirvan como criterio para que una vez montado el método analítico pueda empezar a reportar datos con adecuado y comprobable grado de confianza.
- Documentar la técnica de extracción en fase sólida para el consiguiente análisis de la Cafeína, Carbamazepina, Diclofenaco e Ibuprofeno en el Cromatografo de gases - FID.
- Documentar la cromatografía de gases para el análisis de productos farmacéuticos en matrices acuosas.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. CONTAMINANTES EMERGENTES

Los contaminantes emergentes, cuyo estudio se encuentra entre las líneas prioritarias de investigación de los principales organismos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental, tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA), o la Comisión Europea, se definen como contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos como tales cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva pero si la preocupación por las posibles consecuencias de la misma (Barcelo, 2014).

La detección de estos contaminantes en el medio ha sido posible sólo recientemente gracias al desarrollo de nuevas y más sensibles tecnologías analíticas. Entre los contaminantes emergentes presentes en el agua cabe destacar fármacos, compuestos perfluorados, hormonas, drogas de abuso, y productos de cuidado y de higiene personal (Barcelo, 2014).

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 (Becerril, 2012).

El alto potencial en la proliferación continua de fármacos y productos de uso personal, medicamentos veterinarios, y de otros productos químicos antropogénicos, plantea desafíos substanciales y quizá insuperables para su regulación y control, desde el punto de vista de su evolución y del diseño de sistemas viables para su aplicación. Por otra parte, la investigación y el desarrollo de drogas y compuestos bioactivos evoluciona rápidamente y, en muchos casos, los mecanismos de acción son nuevos para los sistemas biológicos, por lo que las consecuencias en el ambiente son inciertas (Becerril, 2012).

Por estos motivos la información disponible sobre los impactos potenciales de muchas de esas sustancias es limitada, aunque hay evidencias de que algunas de ellas causan efectos adversos en la salud humana y el ambiente. Actualmente existe un interés creciente por las repercusiones que tendrán los compuestos orgánicos de origen antropogénico en el ambiente. El agua es una fuente importante de estos compuestos para los seres vivos. La regulación de estos

contaminantes es escasa, debido al desconocimiento de sus efectos, además de que no se tiene un inventario de “todas” las especies químicas presentes en una muestra ambiental, por limitaciones analíticas (Becerril, 2009).

Actualmente las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs) y las plantas de potabilización de agua para abastecimiento humano, están recibiendo gran cantidad de trazas de diferentes compuestos contaminantes, para lo que las tecnologías convencionales no han sido específicamente diseñadas y por lo que dichas sustancias permanecen en el agua, aún después de ser tratada o potabilizada. Varios estudios han presentado pruebas de que algunos medicamentos no se remueven eficientemente en las plantas de tratamiento de aguas residuales (Dordio et al., 2010), lo que sumado a la baja cobertura en sistemas de tratamiento de aguas residuales para el caso de Colombia (IDEAM, 2004), enmarca una realidad amplia por descubrir y tratar (Grupo de investigación en agua y saneamiento, 2014).

4.2. FÁRMACOS

Entre los fármacos más prescritos en medicina humana destacan los analgésicos/antiinflamatorios como el ibuprofeno y el Diclofenaco, los antiepilépticos como la Carbamazepina, Antibióticos como la amoxicilina y el Sulfametoxazol. A estos cabe añadir los, cada vez más, utilizados en veterinaria, en actividades como la acuicultura, la ganadería, y la avicultura. Según las propiedades fisico-químicas de los fármacos y sus metabolitos y productos de degradación, y las características de los suelos, estas sustancias pueden llegar a alcanzar las aguas subterráneas y contaminar los acuíferos o bien quedar retenidas en el suelo y acumularse pudiendo afectar al ecosistema y a los humanos a través de la cadena trófica (Barcelo, 2003).

Como resultado de las investigaciones llevadas a cabo hasta ahora, algunos fármacos están siendo considerados por la US EPA como posibles candidatos a ser incluidos en la lista de los contaminantes orgánicos prioritarios en el agua potable, como es el caso del Diclofenaco (antirreumático), la Carbamazepina (antiepiléptico), y el cloranfenicol (antibiótico). En la UE, por el momento, no se han fijado límites máximos en el agua potable, y por tanto, no es necesario el seguimiento de tales compuestos, sin embargo, lo más probable es que en un futuro próximo sean regulados (Dalterio, 2014).

Jones et al. (2002) propusieron una clasificación de la toxicidad de medicamentos en función del grupo farmacéutico al que pertenecen, con base en la CE_{50} (tabla 1)

para diferentes organismos de prueba, encontrándose que los analgésicos como el Diclofenaco, resultan tóxicos para los crustáceos y dañinos para los peces. Por otro lado de acuerdo a la clasificación del peligro ambiental y valoración de riesgo de ingredientes farmacéutico en Suecia (2002), el diclofenaco está clasificado como peligroso para el ambiente, y se considera además potencialmente bioacumulable (Valdez, 2009).

Toda vez que sus acciones son muy similares, estos fármacos generalmente se suelen clasificar con base en su estructura química. Las drogas “clásicas”, como la aspirina, el diclofenaco y el ibuprofeno son inhibidores no selectivos de la ciclooxigenasa.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son un grupo heterogéneo de fármacos con propiedades antipiréticas, analgésicas y antiinflamatorias.

Tabla 1. Clasificación de la toxicidad en el ambiente acuático.

Substancia	Extremadamente toxico $CE_{50} \leq 0,1$ mg/L	Muy toxico $CE_{50} 0.1-1$ mg/L	Toxico $CE_{50} 1- 10$ mg/L	Dañino $CE_{50} 10-100$ mg/L	No toxico $CE_{50} \geq 100$ mg/L
Analgésico			D	D,E	
Antiinflamatorios	A	B			
Antidepresivo		D			
Antiepiléptico			C		D,E
Cardiovasculario		D			
Citostatico		A		D,E	

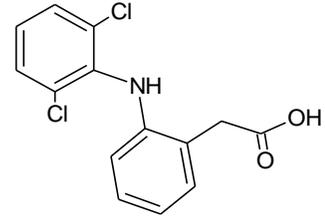
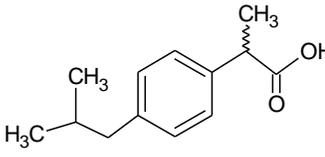
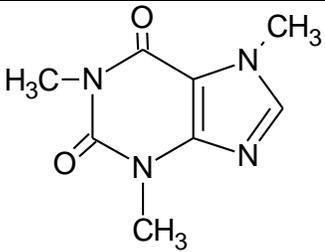
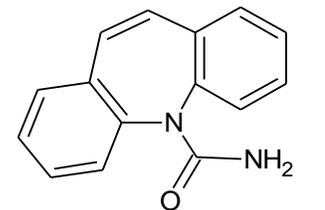
Donde A: Microorganismos; B: Algas; C:Cnidaria; D:Crustáceos; E:Peces

Tomado de: (Valdés, 2009).

4.2.1. Diclofenaco

El Diclofenaco es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) derivado del ácido benzoacetico, que posee propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. Su venta no requiere receta médica y es uno de los medicamentos más utilizados por la población (Gomez et al., 2009).

Tabla 2. Fármacos y características

Nombre	Nombre científico	Marca	Número de Cas	Pureza %	Estructura Química
Diclofenaco	Ácido 2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acético	Sigma Aldrich	15307-86-5	98,5	
Ibuprofeno	Ácido (RS)-2-(4-isobutilfenil)propiónico	Sigma Aldrich	15687-27-1	98	
Cafeína	1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6(3H,7H)-diona 1,3,7-trimetilxantina	Sigma Aldrich	58-08-21	99	
Carbamazepina	5H-dibenzo-[b,f]-azepina-5-carboxamida	Sigma Aldrich	298-46-4	99	

4.2.2. Cafeína

La cafeína, también denominada teína, guaranina o mateína, es un constituyente natural presente en más de 60 especies de plantas. Se encuentra en la dieta diaria contenida en bebidas como el café o el té, el chocolate y algunos refrescos. Se podría considerar la sustancia estimulante de mayor consumo y la más socialmente aceptada a nivel mundial.

Según sus propiedades físico-químicas la cafeína es un polvo inodoro, incoloro y amargo. Friedrich Ferdinand Runge la aisló del café en 1819 y del té en 1827, pero su estructura química no se describió hasta 1875 por E. Fischer (Calle, 2011).

4.2.3. Ibuprofeno

El ibuprofeno es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) perteneciente al subgrupo de los derivados del ácido propiónico (naproxeno, ketoprofeno), que posee una eficaz actividad antiinflamatoria, antipirética y analgésica. Es probablemente la molécula más estudiada clínicamente entre todos los AINEs (Bejarano, 2006).

4.2.4. Carbamazepina

La Carbamazepina es un compuesto sintético tricíclico derivado del núcleo de la dibenzazepina, emparentada con los fármacos antidepresivos tricíclicos. Tiene acción anticonvulsiva, antineuralgica, antidiurética y antipsicótica. Se desconoce su mecanismo de acción con exactitud, pero se supone que es capaz de estabilizar la membrana celular neuronal, si bien no ha sido demostrado. Es metabolizada principalmente en el hígado (Theodore, 2006).

La Carbamazepina se desarrolló a finales de la década de 1950 en los laboratorios suizos de J.R. Geigy AG, en Basilea Walter Schindler descubrió su síntesis en 1961, W. Theobald y H.A. Kunz comunicaron sus propiedades en 1963, y su eficacia en pacientes con epilepsia y síndromes dolorosos paroxísticos se demostró en Europa a comienzos de la década de 1960 (López, 2006).

4.2.5. Comportamiento Ambiental De Los Fármacos

Para poder comprender cómo los fármacos llegan finalmente al medio ambiente, cuando son excretados por el ser humano, es necesario primeramente tratar de conocer los mecanismos que regulan su comportamiento dentro del organismo.

Los fármacos ingresan al organismo generalmente vía oral, y el o los principios activos que contiene el fármaco, es o son expuesto(s) para su absorción en el intestino delgado, a través de las vellosidades que éste posee, después que los jugos gástricos del estómago han realizado su trabajo de liberarlos. Cuando el medicamento ya se encuentra en el torrente sanguíneo, éste se distribuye, metaboliza y elimina. A esta secuencia de procesos se le conoce como LADME (Henríquez, 2012).

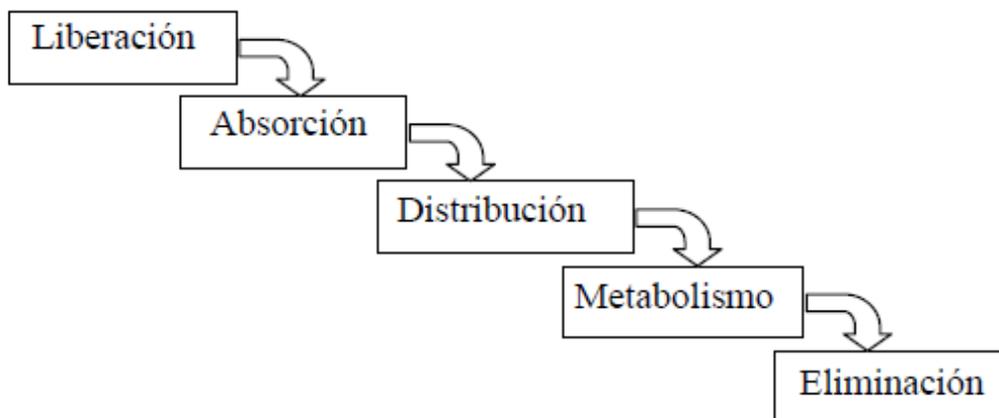


Figura 1. Esquema de la secuencia de procesos conocida como LADME

Tomado de: (Henríquez, 2012).

La liberación del medicamento al torrente sanguíneo, si su administración fue oral, se lleva a cabo después de la ingesta de éste y la acción de los jugos gástricos que permiten su absorción en el intestino. Así se puede señalar que la cantidad de fármaco inalterado que llega al torrente sanguíneo es el que se encuentra biodisponible (Henríquez, 2012).

Una vez que se ha producido la absorción en el intestino, el fármaco es transportado hacia el hígado dónde generalmente es sometido a uno o más procesos metabólicos. La cantidad de fármaco que es metabolizado durante el paso de la sangre por el hígado se conoce como “efecto del primer paso”.

La velocidad a la que un fármaco es absorbido y su biodisponibilidad, depende directamente de las características fisicoquímicas del fármaco, de los procesos fisiológicos y de las alteraciones patológicas que pueda presentar la persona que toma dicho fármaco (Henríquez, 2012).

La modificación que sufre un fármaco en el organismo humano se conoce como biotransformación (transformaciones enzimáticas), e implica una serie de reacciones que en general generan metabolitos inactivos, más polares e hidrosolubles que facilitan su eliminación. Sin embargo, en algunos casos estos procesos de biotransformación generan metabolitos con una mayor actividad biológica lo que implica con propiedades tóxicas, así como también menos tóxicas. Estas reacciones enzimáticas incluyen oxidación (el compuesto cede electrones aumentando su estado de oxidación), reducción (el compuesto gana electrones disminuyendo su estado de oxidación), hidrólisis (el compuesto reacciona con agua), conjugación (se unen covalentemente al compuesto: ácido glucorónico, sulfatos, glutatión, aminoácidos o acetatos) (Henríquez, 2012).

Estudios realizados respecto de la presencia de analgésicos en aguas residuales, y en cuerpos de agua superficiales y subterráneas, han permitido concluir a los investigadores que la fotólisis es la mayor causa de la disminución de diclofenaco en aguas superficiales. (Daughton et al., 1999)

En el medio ambiente las biotransformaciones que sufre un fármaco se conoce como biodegradación. Los fármacos están constituidos por moléculas orgánicas lo que implica que los mecanismos de degradación a los que se ven expuestos en el medio ambiente son similares a los de cualquier compuesto orgánico, pero con la gran diferencia que las reacciones se llevan a cabo aun cuando las concentraciones de estos compuestos estén muy diluidas (Henríquez, 2012).

En general se tiene que en el medio ambiente las reacciones de descomposición son desarrolladas por los “agentes inertes del medio ambiente”, es decir: el agua, el oxígeno o la luz; llevándose a cabo en períodos de tiempo de meses o años. (Hernández et al., 1995). En este contexto puede señalarse que los tipos de degradación más importantes que los fármacos sufren en el medio ambiente son: hidrólisis, oxidación y fotólisis (Henríquez, 2012).

4.3. HISTORIA DE LA CROMATOGRAFÍA

1850 Runge, Schoenbein, y Goepfelsroeder: Estudiaron el análisis por capilaridad en papel.

1892 Reed: Separación en columna en tubos de kaolín usados para la separación de FeCl_3 y el CuSO_4 .

1906 el botánico ruso Mikhail Tswett (1872-1919) formalizó el uso de la cromatografía en estudios científicos, aplicándola a la separación de los pigmentos naturales que se encuentran en las plantas (conocidos como carotenoides y clorofilas). Además le dio ese nombre a la técnica. Tswett empacó una columna de vidrio vertical (de unos cuantos centímetros de diámetro) con material adsorbente. Luego, por la columna vertical vertió una solución que contenía la mezcla de pigmentos provenientes de las hojas molidas de una planta. Pasados unos minutos, el material empacado en la columna había adquirido una coloración diferente por segmentos. Es decir, había logrado la separación de los pigmentos naturales de la planta. En cada segmento de color definido había un pigmento diferente. Dando este el paso más importante para la cromatografía.

1930 Karrer, Kuhn, y Strain: Usó adsorbentes como hidróxido de calcio activado, aluminio y magnesio

1938 Reichstein: Introdujo la cromatografía líquida o fluida, así extendió las aplicaciones de la cromatografía a sustancias sin color.

1938 Izmailov y Schraiber: Describieron el uso de la capa fina de alumina extendida sobre un vidrio.

1939 Brown: Fue el primero que usó la cromatografía circular en papel.

1941 Martin y Synge: Introdujo la cromatografía por partición en columna.

1944 Consden, Gordon, y Martin: Fueron los primeros que describieron la cromatografía de partición en papel.

1947 Boyd, Tompkins, Spedding, Rieman, y otros: Cromatografía de intercambio iónico aplicada a varios problemas analíticos.

1948 M. Lederer y Linstead: Cromatografía en papel aplicada a compuestos inorgánicos.

1951 Kirchner: Introdujo la cromatografía de capa fina como es practicada ahora.

1952 James y Martin: Desarrollaron de la cromatografía de gas.

1964 J. C. Moore: Desarrolló la cromatografía de permeación en gel (Garcia, 2002).

4.4. FUNDAMENTOS DE LA CROMATOGRAFÍA

La cromatografía tiene como principio la diferencia de distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles. Una de ellas, la fase móvil, que puede ser un líquido o un gas, fluye a través de una fase estacionaria, que puede ser un líquido o un sólido. Durante el proceso de separación cromatográfica la fase móvil fluye de manera continua sobre la fase estacionaria. De esta manera los componentes de la mezcla, y sus respectivas diferencias de afinidad con la fase móvil y la fase estacionaria, crean un equilibrio dinámico, permitiendo que los componentes que sean más afines a la fase estacionaria, se muevan lentamente bajo el influjo de la fase móvil. Análogamente, aquellos componentes que son retenidos con poca fuerza por la fase estacionaria, se mueven con mayor rapidez al paso de la fase móvil. Como consecuencia de las diversas velocidades de desplazamiento, los componentes de la mezcla se separan en bandas o zonas discretas, que pueden analizarse cualitativa y cuantitativamente (Castro, 2010).

Existen diferentes tipos de separaciones cromatográficas, con diferentes tipos de fases estacionarias y móviles. Habrá consideraciones particulares para las distintas variaciones de la cromatografía, pero de manera general, el proceso consta de 4 etapas fundamentales:

1. Preparación de la placa o columna: Esto hace referencia a la disposición espacial que adoptará la fase estacionaria.
2. Siembra, inyección o desorción: Es el primer contacto entre la mezcla a separar con la fase estacionaria, para su posterior desarrollo.
3. Desarrollo o separación: Corresponde al paso de la fase móvil a través de la fase estacionaria permitiendo la separación de la muestra.
4. Detección: Implica la localización de las zonas en que se encuentran los compuestos ya separados (Castro, 2010).

Como ya se dijo, las técnicas cromatográficas se fundamentan en las diferencias de distribución de una muestra entre dos fases inmiscibles. Con respecto a esta distribución, hay un aspecto que debe tenerse muy en cuenta en una separación, y es el llamado coeficiente de distribución. Si se efectúa un experimento de extracción de un determinado analito entre dos fases inmiscibles, a diferentes concentraciones, los resultados de cada extracción se verán descritos por la siguiente expresión (Castro, 2010).

$$K_D = \frac{C_1}{C_2}$$

Ecuación 1. Coeficiente de distribución

Esta expresión se conoce como factor de reparto, coeficiente de partición, o coeficiente de distribución. En ella, C1 corresponde a la concentración de la molécula de interés (expresada en Molaridad) en la fase orgánica, y C2 corresponde a la concentración de esta en la otra fase, que en muchos casos es acuosa. Así, esta expresión es una relación de concentraciones, la cual es constante a determinadas condiciones de temperatura y presión, y se puede emplear para determinar concentraciones en alguna de las fases, y aún si se conoce el volumen de las fases, se puede llegar hasta conocer la cantidad de analito presente en cada fase (Castro, 2010).

4.5. CROMATOGRAFÍA DE GASES

Para evaluar la importancia de la cromatografía de gases (GC) es necesario distinguir entre los dos papeles que desempeña la técnica. Primero, la cromatografía de gases es una herramienta para efectuar separaciones. En este sentido, los métodos de la GC son inmejorables cuando se aplican a muestras orgánicas complejas, a organometálicos y a sistemas bioquímicos conformados por especies volátiles o por especies que pueden someterse a un proceso para producir sustancias volátiles. El segundo papel que desempeña la GC es en la terminación de un análisis. En este caso se emplean los tiempos o volúmenes de retención para la identificación cualitativa y las alturas de los picos o sus áreas dan información cuantitativa. Desde el punto de vista cualitativo, la GC es una técnica mucho más limitada que la mayoría de los métodos espectroscópicos. Por eso, una tendencia importante en este campo ha sido en la dirección de combinar las notables cualidades para la separación que tiene la GC con las mejores propiedades de identificación que poseen instrumentos como los espectrómetros de masas, de infrarrojo y de resonancia magnética nuclear (Skoog, 2008).

A pesar de que la cromatografía de gases es ya una técnica madura, se han perfeccionado en los años recientes la teoría, los instrumentos, las columnas y las aplicaciones prácticas. Enseguida se estudian algunos de los adelantos en la cromatografía de gases de alta velocidad y los sistemas miniaturizados.

4.5.1. Cromatografía de gases de alta velocidad

Los investigadores especializados en cromatografía de gases se enfocan a menudo en conseguir una resolución más alta para separar más y más mezclas complejas. En la mayoría de las separaciones, las condiciones se hacen variar para aislar el par de componentes más difícil de separar, denominado par crítico. En estas condiciones, muchos de los componentes de interés se separan en exceso. La idea básica de la cromatografía de gases de alta velocidad es que, para muchas de las separaciones de interés, la alta velocidad se puede lograr aunque sea a expensas de la selectividad y la resolución (Skoog, 2008).

4.5.2. Sistemas de cromatografía de gases miniaturizados

Durante muchos años ha habido el deseo de reducir las dimensiones de los sistemas de cromatografía de gases y alcanzar la escala de un microcircuito. Los sistemas de cromatografía de gases en miniatura son útiles en la exploración del espacio, en los instrumentos portátiles para uso en el campo y para la supervisión del ambiente. Las primeras investigaciones dieron a conocer columnas para cromatografía de gases producidas con ácido sobre un microcircuito. Sin embargo, el rendimiento cromatográfico relativamente deficiente de dichos dispositivos originó que se eliminara la columna del chip en los sistemas comerciales que se produjeron. En años recientes las columnas microfabricadas se diseñaron con sustratos de silicio, varios metales y polímeros. En el sustrato se marcan canales angostos, relativamente profundos, con la ayuda de ácido. Dichos canales tienen bajo volumen muerto para reducir el ensanchamiento de banda y un área superficial alta con el fin de aumentar el volumen de la fase estacionaria (Skoog, 2008).

Dentro de la cromatografía de gases se presentan fundamentalmente interacciones gas-sólido y gas-líquido y recibe su nombre particular por el uso de un gas como medio de arrastre (fase móvil). Aunque ambas comparten un fundamento general, difieren en la naturaleza de la fase estacionaria, pues en la primera es un material sólido, mientras que en la segunda se trata de un líquido. Ambas operan de tal manera que los componentes de una muestra vaporizada son separados como consecuencia del reparto entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria contenida en una columna. La muestra es vaporizada e inmediatamente sembrada en la columna, mediante un dispositivo de inyección. Una vez sembrada en la columna, es eluída a causa del flujo de un gas inerte, que desempeña el rol de fase móvil.

A diferencia de la mayoría de las técnicas de separación cromatográfica, la fase móvil en la cromatografía de gases no interactúa con los componentes de la muestra, toda vez que su única función es transportar los componentes de la misma a través de la columna. La cromatografía gas-sólido se fundamenta en una fase estacionaria sólida en la cual los analitos son retenidos gracias al fenómeno de la adsorción, y su aplicación es limitada a separar compuestos de bajo peso molecular. Los materiales finamente divididos como carbón activado, alúmina activa o silica-gel microporosos con una gran área superficial activa (superficie de contacto) son fuertes adsorbentes, motivo por el cual son muy empleados como fases estacionarias en la cromatografía gas-sólido. Esto se debe al fenómeno de adsorción preferente, que ocurre cuando las moléculas de dos o más sustancias están presentes en un material adsorbente y las moléculas de una de esas sustancias pueden ser retenidas más fácilmente que las de las otras. Estos materiales también suelen ser empleados como soportes de la fase estacionaria líquida, en la cromatografía gas-líquido (Castro, 2010).

4.5.3. Sistema de gas portador

En la cromatografía de gases la fase móvil se llama gas portador y debe ser químicamente inerte. El helio es el gas para fase móvil más común, pero también se usan argón, nitrógeno e hidrogeno. Estos gases se surten en recipientes a presión. Se requieren reguladores de presión, manómetros y medidores de flujo para controlar la corriente del gas. Además, el sistema del gas portador contiene a menudo un tamiz molecular para eliminar el agua y otras impurezas. Los flujos se controlan mediante un regulador de presión de dos etapas colocado en el cilindro de gas y algún tipo de regulador de presión o de flujo instalado en el cromatógrafo. (Skoog, 2008). Pero estos deben de reunir ciertos requisitos para cumplir la función de arrastre eficazmente, las cuales se describen a continuación.

- Debe de poseer un comportamiento inerte frente a la fase estacionaria y los componentes de la muestra.
- Debe ser térmicamente estable.

Su selección depende de:

- Disponibilidad del Gas.
- Pureza del gas (Castro, 2010).

Consideraciones particulares del análisis y del detector empleado:

- El N_2 y el O_2 son los más empleados debido a la fácil adquisición y bajo

costo.

- El contenido de O₂ en el gas de arrastre no debe superar las 20 ppm, toda vez que existe el riesgo de que al estar en contacto con la mezcla durante un tiempo a elevadas temperaturas, se pueda producir una degradación o algún tipo de alteración de la muestra (Rodríguez, 2011).

4.5.4. Puerto De Inyección

La introducción de la muestra se logra por medio de una microjeringa graduada en microlitros provista de una aguja hipodérmica que atraviesa un tapón de caucho (séptum) del recipiente tipo vial que contiene la muestra. De allí se extrae para luego ser depositada en el puerto de inyección. La muestra puede ser introducida allí mediante el empleo de válvulas y en forma automatizada para minimizar errores en la cantidad inyectada. Es un recinto calentado eléctricamente y recubierto de un material refractario que lo mantiene a elevadas temperaturas, lo que permite la vaporización de la muestra. Además se puede ubicar en su interior un tubo capilar de vidrio, para la retención de los sólidos que pueda poseer la muestra y así proteger la columna de posibles contaminantes de este tipo. A la salida de la cámara de inyección, la muestra en fase de vapor, se encuentra con el gas portador, que la conduce a la columna (Castro, 2010).

4.5.4.1. *Sistemas de Inyección de muestras en cromatografía de gases*

Dependiendo de la cantidad de muestra disponible, del tipo de columna que se emplee y en últimas de la concentración de los analitos, existen dos sistemas usados para inyectarla muestra en la columna de separación:

a) Inyección en Split: Al momento de trabajar con columnas capilares, es necesario reducir el volumen de muestra para no sobrecargar el sistema. Generalmente se inyecta 1µL de muestra por medio de un inyector-divisor (inyección en split) pero realmente solo ingresan 0.01µL a la columna. Este método impide la sobre carga de la columna pero desperdicia una cantidad considerable de muestra.

b) Inyección en splitless: Cuando la cantidad de muestra disponible es muy limitada y las concentraciones de los analitos están en niveles considerablemente bajos, si se empleara inyección en Split se introduciría muy poca muestra en la columna.

Para estos casos se requiere un sistema de inyección sin división (inyección splitless). A través de este mecanismo, la muestra completa incluyendo el disolvente se introducen en la columna a través de un vaporizador instantáneo caliente. Se evita un exceso de solvente en la columna, abriendo hacia la atmósfera el puerto de inyección, poco tiempo después de inyectada la muestra, cuando una buena parte del disolvente y la totalidad de la muestra han ingresado a la columna (Rodríguez, 2011).

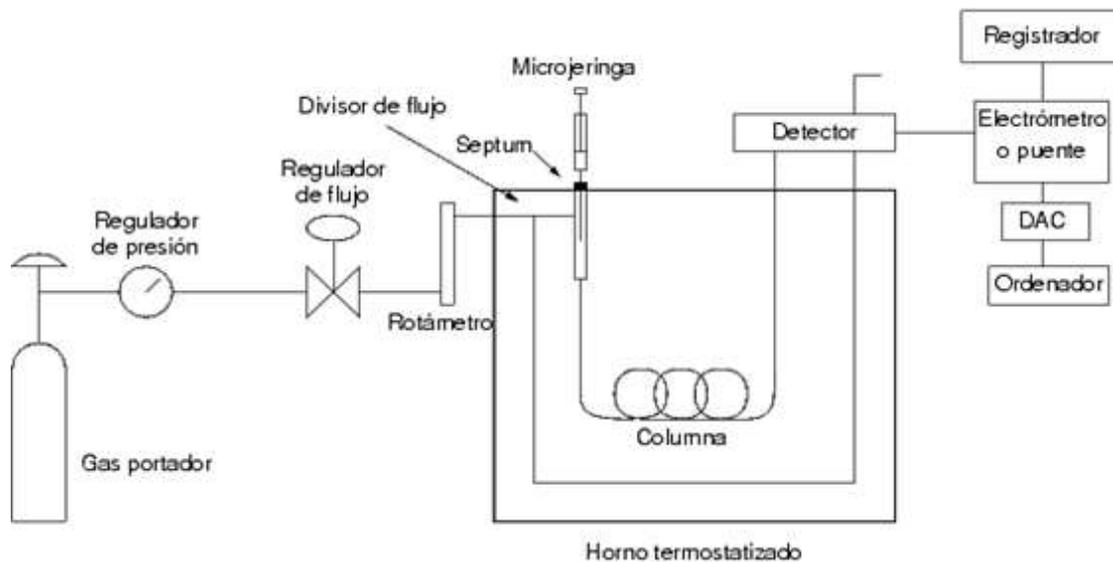


Figura 2. Representación esquemática de un cromatógrafo de gases

Tomado de: (Castro, 2010).

4.5.5. Columna Cromatográfica

Es al interior de esta donde se efectúa la separación, por lo que se le conoce como el “corazón del cromatógrafo”. Debido a la amplísima variedad de análisis que se pueden realizar por cromatografía de gases, existen diferentes tipos de columnas que pueden variar en muchos aspectos como longitud, material de la columna, diámetro interno, etc. Sin embargo, la diferencia fundamental entre un tipo de columna y otra radica en la constitución de la fase estacionaria, así:

- Empacadas
- Capilares

La columna se encuentra ubicada en el interior de un recinto termostático u horno. Esto se debe a que la temperatura influye de manera importante en la retención de los componentes por la columna, y por ende en la separación de éstos. Por tal motivo, la temperatura debe ser uniforme a lo largo de la columna y fácilmente controlable. Se consigue uniformidad en la temperatura a lo largo de la columna haciendo circular aire caliente por todo el recinto que la contiene. Esto se hace por medio de un ventilador. En la mayoría de los equipos la temperatura se puede regular de un modo continuo a un valor deseado. De igual forma en algunos equipos se acopla un programador lineal de temperatura para calentar la columna con una o varias rampas de calentamiento.

4.5.6. Fase Estacionaria Líquida

La fase líquida debe poseer características fisicoquímicas similares a la muestra a analizar. Así, para el análisis de hidrocarburos saturados se emplea un hidrocarburo saturado como fase líquida. Es conveniente relacionar esta semejanza con base a polaridades. Además de ser semejante a la muestra, la fase líquida debe cumplir ciertos requisitos que permitan un buen desempeño de la misma, y por ende ofrecer una separación efectiva de los componentes de la muestra. Dentro de estas características las más importantes son:

- Viscosidad: No debe ser muy alta a la temperatura de trabajo, para proporcionar un rápido establecimiento de los equilibrios de reparto entre las fases.
- Tensión Superficial: Debe mojar bien el soporte, asegurando que la adherencia soporte-líquido sea suficiente para evitar que la fase móvil arrastre la fase estacionaria, provocando mala distribución en la columna.
- Tensión de Vapor: Debe ser mínima, con el objeto de prevenir que una evaporación de la fase estacionaria haga que la misma pase a la fase móvil. Lo cual presentaría perturbaciones en la separación y en el análisis posterior.
- Selectividad respecto a los componentes de la fase móvil: Esta condición es la que define en sí a la cromatografía de gases. Las constantes de reparto de los componentes a separar deben ser suficientemente diferentes para que la fase estacionaria oponga distintas resistencias al paso de los componentes a través de la columna, proporcionando así una buena separación de los componentes de la misma.
- Reversibilidad de reparto: El reparto de cada componente entre las fases debe ser reversible para favorecer que los procesos consecutivos de absorción y desorción, que se llevan a cabo a lo largo de la columna, sean

rápidos y completos al momento de alcanzar el equilibrio. Esta condición excluye por defecto, cualquier reacción química entre los componentes de la muestra y la fase estacionaria.

4.5.7. Detectores

Los detectores son dispositivos que determinan la presencia o no de un analito de interés y miden la cantidad del mismo en la corriente del gas portador, convirtiendo una señal no medible directamente en una señal elaborable de una propiedad física. Esta señal es elaborada por una comparación entre el gas acarreador puro (blanco) y el mismo gas llevando cada uno de los componentes previamente separados en la columna, esto es traducido en una señal eléctrica que es amplificada y registrada al momento de salir de la columna (Olguin, 2004).

Los detectores usados en cromatografía de gases son transductores de concentración, es decir, instrumentos con la capacidad de medir, en este caso, la variación de la concentración de las sustancias eluidas en el seno del gas portador, convirtiéndola en una señal eléctrica proporcional, fácilmente medible y registrable en función del tiempo. En general, los detectores empleados en cromatografía de gases, deben reunir ciertos requisitos propios de las exigencias y de la naturaleza de la técnica cromatográfica como tal; esto implica que debe ser un transductor de concentración en fase de vapor, poseer una adecuada sensibilidad así como un bajo nivel de ruido, estabilidad y reproducibilidad, que le confieran por ende una alta fiabilidad y manejo sencillo (Castro, 2010).

Características del detector ideal para cromatografía de gases

1. Sensibilidad adecuada.
2. Buena estabilidad y reproductibilidad.
3. Respuesta lineal para los solutos que se extienda a varios órdenes de magnitud.
4. Intervalo de temperaturas desde la temperatura ambiente hasta al menos 400°C
5. Tiempo de respuesta corto independiente de la tasa de flujo.
6. Alta confiabilidad y manejo sencillo. El detector debería estar a prueba de la impericia de operadores inexpertos, si es posible.
7. Respuesta semejante para todos los solutos o, por el contrario, una respuesta selectiva y altamente predecible para uno o más tipos de solutos.
8. No debe destruir la muestra.

Por desgracia, no hay un detector que reúna todas estas características (Skoog, 2008).

Algunos de los detectores más usados se describen a continuación.

4.5.7.1. Detector de ionización de llama (FID):

Este es el detector más extensamente utilizado, y por lo general, uno de los más aplicables en cromatografía de gases. El detector FID responde al número de átomos de carbono que entra en el detector por unidad de tiempo, por ello, es más un detector sensible a la masa, que un sistema sensible a la concentración. Grupos funcionales, tales como carbonilo, alcohol, halógeno y amina originan en la llama pocos iones o prácticamente ninguno. Además el detector es insensible a los gases no combustibles como H₂O, CO₂, SO₂ y NO_x. El detector FID posee una elevada sensibilidad de (10⁻¹³ g/s), un gran intervalo de respuesta lineal (10⁷), un bajo ruido además de ser resistente y fácil de utilizar. Estas propiedades hacen del detector FID uno de los detectores generales más utilizado para el análisis de la mayoría de compuestos orgánicos (Zenteno, 2011).

El detector de ionización de llama se ha utilizado para la determinación de contaminantes emergentes tipo productos de cuidado personal, compuestos orgánicos en general, plaguicidas, antidepresivos y alcoholes.

4.5.7.2. Detector de captura de electrones (ECD)

El detector de captura de electrones ha llegado a ser uno de los más ampliamente utilizados para el análisis de muestras ambientales porque es sensible a compuestos orgánicos que contienen halógenos, como los plaguicidas y los bifenilos policlorados (Skoog, 2001).

Los detectores de captación de electrones son muy sensibles y tienen la ventaja de no alterar la muestra de manera significativa, a diferencia del detector de ionización por flama, que consume la muestra. Por otra parte, la respuesta lineal del detector se limita a alrededor de dos órdenes de magnitud. (Skoog, 2008).

El detector de captura de electrones ha servido para determinar bifenilos policlorados, compuestos organoclorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos y pesticidas organoclorados.

4.5.7.3. Detectores termoiónicos de llama (FTD)

El detector termoiónico es sensible a los compuestos orgánicos que contienen fósforo y nitrógeno. Su respuesta a un átomo de fósforo es aproximadamente 10 veces mayor que a un átomo de nitrógeno y de 10^4 a 10^6 veces superior que a un átomo de carbono. En comparación con el detector de ionización por llama, el detector termoiónico es unas 500 veces más sensible a los compuestos que contienen fósforo y unas 50 veces más sensible a las especies nitrogenadas. Un detector termoiónico tiene una configuración similar al detector de llama. El efluente de la columna se mezcla con hidrógeno, pasa a través de la punta de la llama y se quema. Entonces, el gas caliente fluye alrededor de una bola de silicato de rubidio calentada mediante electricidad que se mantiene a unos 180 V respecto al colector. La bola caliente forma un plasma que alcanza una temperatura de 600°C a 800°C. Se desconoce lo que ocurre exactamente en el plasma para que se produzca una cantidad inusual y enorme de iones a partir de las moléculas que contienen fósforo o nitrógeno, pero el resultado es una gran corriente iónica, la cual se utiliza para la determinación de compuestos que contienen estos dos elementos (Parrales et al, 2012).

El detector termoiónico ha permitido determinar plaguicidas que contienen fósforo gracias a su alta sensibilidad.

4.5.7.4. Detectores de conductividad electrolítica

Los compuestos que contienen halógenos, azufre o nitrógeno se mezclan en el detector Hall de conductividad electrolítica con un gas de reacción en un reactor tubular pequeño, casi siempre de níquel. El tubo de la reacción se mantiene a 850°C–1000°C. Luego se disuelven los productos en un líquido, lo cual origina una solución conductora. A continuación se mide el cambio en la conductividad como resultado de las especies iónicas en la celda de conductancia. En el modo de halógenos, el hidrógeno se usa como gas para la reacción. Los compuestos que contienen halógenos se convierten en HX y se disuelven en alcohol n-propílico como solvente de conductividad. De este modo, los compuestos que contienen azufre se transforman en H₂S y los compuestos que contienen nitrógeno en NH₃, lo cual no da respuestas significativas porque ambos se ionizan de manera deficiente en el solvente. El límite de detección es ~0.5 pg Cl/s, y el intervalo lineal es 10^6 (Skoog, 2008).

En el modo de azufre, el gas para la reacción es aire, el cual transforma los compuestos que contienen azufre en SO_2 . El solvente de conductividad es alcohol metílico con una pequeña cantidad de agua. El SO_2 se convierte en sulfito y en iones sulfato en presencia de agua. Los compuestos que contienen nitrógeno se transforman en N_2 y óxidos de nitrógeno y manifiestan poca o ninguna respuesta. Los compuestos que contienen halógeno se transforman en HX y se tienen que eliminar mediante un depurador después de reaccionar y antes de la detección. En la modalidad de azufre, se puede detectar alrededor de 2 pg S/s con un intervalo lineal de tres órdenes de magnitud. En el modo de nitrógeno se utiliza hidrogeno como gas de reacción, como en el modo de halógeno. No obstante, en este caso se usa agua que contiene una pequeña cantidad de un solvente orgánico como solvente de conductividad. En este solvente el NH_3 producido se transforma en NH_4^+ . El HX y el H_2S producidos a partir de compuestos que contienen halógenos y azufre se eliminan con un depurador después de la reacción. El límite de detección es de ~4 pg N/s con un intervalo lineal de tres órdenes de magnitud (Skoog, 2008).

También hay detectores de conductividad electrolítica en seco. La diferencia con los detectores ordinarios es que no requieren un solvente, sino que detectan los iones del producto en la fase gaseosa. Los detectores en seco son sensibles a los compuestos que contienen cloro y bromo. Se utilizan en serie con un detector de ionización por flama (Skoog, 2008). El detector de conductividad electrolítica ha permitido identificar los factores de respuesta de compuestos organoclorados, organofosforados y la detección de goitrina y su derivado heptafluorobutirilo.

4.5.7.5. *Detector de fotoionización*

En el detector de fotoionización, las moléculas que salen de la columna de cromatografía de gases son fotoionizadas mediante radiación ultravioleta proveniente de una lámpara de hidrogeno de 10.2 eV o de una lámpara de argón de 11.7 eV. Esta fuente ioniza las especies con un potencial de ionización por debajo de la energía de la lámpara. Los compuestos con un potencial de ionización superior no absorben la energía y, por tanto, no son detectados. Luego, los iones y los electrones producidos por fotoionización se colectan en un par de electrodos polarizados. El detector es más sensible a los hidrocarburos aromáticos y los compuestos organosulfurados u organofosforados que se fotoionizan con facilidad. El intervalo lineal es hasta de siete órdenes de magnitud (Skoog, 2008).

4.5.7.6. Detectores de emisión atómica (AED)

En el detector de emisión atómica, el efluente procedente de la columna de cromatografía de gases se introduce en un plasma inducido por microondas (MIP), un plasma acoplado por inducción (ICP) o un plasma de corriente continua (DCP). El plasma inducido por microondas es el que se usa más ampliamente y ya se encuentra en el comercio. Se utiliza junto con diodos en serie o con un espectrómetro de emisión atómica con un dispositivo de acoplamiento de carga. El plasma tiene suficiente energía para atomizar todos los elementos de una muestra y excitarlos para obtener así sus espectros de emisión atómica característicos. Por tanto, el detector de emisión atómica es un detector selectivo de elemento (Skoog, 2008). Este detector ha permitido la determinación de compuestos volátiles formados en un sistema modelo de glucosa-selenometionina y determinación de mercurio atmosférico.

4.5.7.7. Detector fotométrico de flama (FPD)

El detector fotométrico de flama se ha utilizado de manera extensa para el análisis de contaminantes del aire y del agua, de plaguicidas y de los productos de la hidrogenación del carbón. Se trata de un detector selectivo que es sensible sobre todo a los compuestos que contienen azufre y fósforo. En este detector el eluyente se hace pasar a través de una flama de hidrógeno-aire a baja temperatura, la cual convierte parte del fósforo en una especie HPO que emite bandas de radiación centradas alrededor de 510 y 526 nm. El azufre de la muestra se convierte al mismo tiempo en S₂, el cual emite una banda centrada en 394 nm. Sin embargo, el detector de quimioluminiscencia del azufre, proporciona límites de detección más bajos y un intervalo de trabajo lineal más amplio que el detector fotométrico de flama. Para aislar estas bandas se emplean filtros adecuados y su intensidad se registra por medios fotométricos (Skoog, 2008).

Con la fotometría de flama se han detectado otros elementos, entre los que están los halógenos, nitrógeno y diversos metales, como estaño, cromo, selenio y germanio (Skoog, 2008). Este detector ha permitido la determinación de pesticidas organofosforados y de compuestos orgánicos de estaño en el agua de mar.

4.5.7.8. Detectores de espectrometría de masas

Uno de los detectores más potentes para cromatografía de gases es el espectrómetro de masas. La combinación de cromatografía de gases con espectrometría de masas se conoce por las siglas *GCMS*.

La tasa de flujo procedente de las columnas capilares es casi siempre tan baja que la salida de la columna se puede alimentar de manera directa a la cámara de ionización del espectrómetro de masas. Antes del surgimiento de las columnas capilares en la GC, cuando se usaban las columnas empacadas, era necesario reducir al mínimo el gran volumen del gas portador que salía de la GC. Con este propósito se utilizaban diversas válvulas, membranas y separadores de efusión; pero, en muchos casos, dichos dispositivos también eliminaban una cantidad importante del analito, por lo cual eran muy ineficientes. En la actualidad las columnas capilares se emplean de modo invariable en los equipos de GC-MS y los mencionados separadores ya no se utilizan (Skoog, 2008).

La degradación térmica de los componentes puede ser una dificultad en la GC-MS. No solo la portezuela de inyección de la GC y la columna de GC causan degradación, sino también las superficies metálicas de la fuente de iones del espectrómetro de masas podrían ocasionar problemas. La reducción de la temperatura reduce al mínimo la degradación. Sin embargo, con frecuencia el espectrómetro de masas se usa para identificar productos de descomposición, los cuales pueden ocasionar modificaciones cromatográficas que resuelven el problema de la degradación. Las fuentes de iones más comunes que se usan en GC-MS son la ionización por impacto de electrones y la ionización química (Skoog, 2008).

En GC-MS, el espectrómetro de masas barre la masa en forma repetida durante el experimento cromatográfico. Si este dura 10 minutos, por ejemplo, y se toma un barrido cada segundo, entonces se registran 600 espectros de masas. La información se analiza mediante el sistema de datos de varias maneras. Primero, se puede sumar la abundancia de iones en cada espectro y graficarla en función del tiempo para obtener un Cromatograma de iones totales. Esta grafica es parecida a un cromatograma ordinario. Así mismo, se puede desplegar el espectrómetro de masas en un momento en particular durante el Cromatograma para identificar las especies que salen en dicho momento. Por último, se puede elegir un solo valor de masa-carga (m/z) y supervisararlo a lo largo de todo el experimento cromatográfico (Skoog, 2008).

A esta técnica se le conoce como *supervisión de un ion selecto*. Los espectros de masas de iones seleccionados que se obtienen durante un experimento cromatográfico se conocen como cromatogramas de masas (Skoog, 2008).

A través de la espectrometría de masas como detector se han logrado determinar trazas de explosivos además de caracterizar fósiles químicos en el petróleo.

4.5.7.9. Cromatografía de gases acoplada con detección espectroscópica

A menudo, la cromatografía de gases se combina con otras técnicas selectivas como la espectroscopia y la electroquímica para generar herramientas potentes con las que se pueden separar e identificar los componentes de muestras complejas. Las combinaciones de GC con espectrometría de masas (GC-MS), con espectroscopia en infrarrojo y transformada de Fourier (GC-FTIR), con espectroscopia magnética nuclear y métodos electroanalíticos se llaman a veces métodos acoplados. En los primeros sistemas, los gases efluentes de una columna cromatográfica se recogían como fracciones separadas en una trampa fría y se usaba un detector no destructivo y no selectivo para indicar su aparición. La composición de cada fracción se investigaba mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear, de infrarrojo o a través de mediciones electroanalíticas. Una limitación importante en esta metodología era que las cantidades de soluto que contenían las fracciones eran muy pequeñas (normalmente micromoles) (Skoog, 2008).

La mayor parte de los métodos acoplados modernos supervisa en forma continua el efluente proveniente de la columna cromatográfica mediante métodos espectroscópicos. La combinación de dos técnicas que se basan en principios distintos puede alcanzar una enorme selectividad. Los actuales instrumentos computarizados para cromatografía de gases ya tienen incorporadas bases de datos muy grandes para comparar espectros e identificar compuestos (Skoog, 2008).

4.5.7.10. Otros tipos de detectores

Otros tipos de detectores para cromatografía de gases son útiles para aplicaciones específicas. El detector de quimioluminiscencia del azufre se basa en la reacción entre ciertos compuestos azufrados y el ozono. La intensidad de la luminiscencia resultante es proporcional a la concentración de azufre. Ésta demostrado que este

detector es especialmente útil en la detección de contaminantes como los mercaptanos. En el detector de quimioluminiscencia del azufre el eluyente se mezcla con hidrogeno y aire, y se produce la combustión igual que en el detector de ionización por flama. Los gases así obtenidos se mezclan luego con ozono y se mide la intensidad de la emisión resultante. El intervalo lineal es de alrededor de cinco órdenes de magnitud y el límite de detección para el azufre es de casi 0.5 pg/s. El detector de quimioluminiscencia del azufre también ha sido adaptado a la cromatografía de fluidos supercríticos (Skoog, 2008).

El detector de quimioluminiscencia específico para nitrógeno es muy similar al detector del azufre. El producto de combustión del oxido nitroso reacciona con el ozono para producir quimioluminiscencia. La respuesta del detector es lineal con respecto al nitrógeno en casi cuatro órdenes de magnitud. El límite de detección para el nitrógeno es de casi 5 pg/s. El detector se puede usar para compuestos orgánicos nitrogenados y compuestos inorgánicos, como el amoniaco, hidracina, HCN y óxidos de nitrógeno (Skoog, 2008).

Durante el desarrollo de la cromatografía de gases se han investigado y utilizado decenas de detectores. Sin embargo los utilizados con mayor frecuencia son los nombrados anteriormente.

La cromatografía de gases ha sido un gran avance para la química analítica y la ciencia en general, sin embargo, la tecnología y las técnicas están avanzando, y así como la técnica de GC-FID ha sido ampliamente utilizada por su alta sensibilidad en identificación de compuestos orgánicos y más específicamente la determinación de compuestos farmacéuticos como lo muestra este trabajo y contaminantes emergentes en general, se están utilizando también otras técnicas, así por ejemplo se evaluó la remoción de 15 PPCP del agua por Fotólisis UV directa (Carlson, et al 2015), también a través microfiltración en membranas de carbono dispuestos en nanotubos se logró determinar productos farmacéuticos y de higiene personal (Wang, et al,2015).

Apartándonos un poco de la cromatografía de gases se encontró también como la Técnica cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) que permitió la determinación de trazas de compuestos farmacéuticos en plantas de tratamiento de agua (Letzel et al. 2015); los anteriores proyectos todos basados en análisis de aguas para encontrar dichos contaminantes emergentes, sin embargo, hay un método de dilución isotópica sensible y preciso que fue desarrollado para la determinación simultánea de 17 productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCP) incluyendo 14 farmacéuticos y 3 productos para el cuidado personal. El método propuesto es a través de hidrólisis enzimática, seguido por espectrometría

de masas secuencial de limpieza usando la cromatografía de gel de sílice y cromatografía de permeación en gel, y el análisis por cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento con tándem y en este caso en vez de agua se analizaron órganos y tejidos (Tanoue et al, 2014).

4.6. EXTRACCIÓN EN FASE SOLIDA (SPE)

A mediados de los años 70 se introduce un método alternativo de extracción, llamado extracción en fase sólida (SPE o *solid phase extraction*) el cual consiste en un dispositivo en forma de reservorio de una jeringa, en el cual se introduce un material adsorbente (fase estacionaria) que cumple la función de atrapar o retener una sustancia que está contenida en un solvente determinado (fase móvil). Es así que la SPE comprende la interacción de tres componentes descritos: el material adsorbente, el analito y el solvente (Zwir, 2006).

La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica conveniente para evitar el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos en los pasos de pre-concentración y extracción. Se utiliza principalmente para el enriquecimiento de muestras de agua con ventajas sobre la extracción líquido-líquido (LLE), tales como:

- a) Reducción en las cantidades de disolventes utilizados.
- b) Extracciones sin inconvenientes por la formación de emulsiones.
- c) Eficacia de extracción.
- d) Facilidad de automatización (Becerril, 2012).

El principio de la SPE es similar a la de extracción líquido-líquido (LLE), el cual consiste en un reparto de solutos entre dos fases. Sin embargo, en vez de dos fases líquidas inmiscibles, como en LLE, la SPE implica la partición entre un líquido (o matriz de la muestra solvente con los analitos) y una fase sólida o fase estacionaria (material adsorbente). La introducción de un amplio espectro de materiales absorbentes en los procedimientos de análisis dio un nuevo impulso para el desarrollo de la metodología SPE desde la década de 1960 hasta finales de los 80 (Zwir, 2006).



Figura 3. Diagrama de proceso SPE

Tomado de: (Zwir, 2006).

Como se indica en la figura 2, el primer paso consiste en un acondicionamiento del material adsorbente con una sustancia apropiada que solventa los grupos funcionales de dicho material. Luego, la solución que contiene el fármaco en este caso. La columna contiene ahora los analitos e impurezas, los cuales se lavan con un solvente apropiado que eluye las impurezas, y preserva en analito en la columna.

La SPE en fase normal hace referencia a un sistema en el cual el material adsorbente es más polar que la fase móvil o la solución de la muestra. La SPE en fase reversa se refiere a un sistema en el cual el material adsorbente es menos polar que la fase móvil o la solución de la muestra (Zief). La extracción en fase sólida se compone de tres modalidades de uso, consistentes en la limpieza o clean up, concentración del analito y remoción de la matriz. En el clean up se busca que el material adsorbente o fase estacionaria retenga el analito, mientras que el solvente o fase móvil arrastra las impurezas (Vega, 2006).

La concentración del analito se da cuando éste está retenido en el material adsorbente y es eluido por un volumen de solvente inferior al que inicialmente lo contenía previo atrapamiento, lo que resultará en un extracto “enriquecido” con el analito. En la remoción de la matriz, la fase estacionaria cumple un papel inverso al del *clean up*, donde las impurezas son retenidas mientras que el solvente arrastra el analito a través de la fase estacionaria. El correcto desarrollo de la SPE depende fundamentalmente de un profundo conocimiento de las características químicas del analito tales como su índice de polaridad, peso molecular, estructura química, grupo funcional y otras como la solubilidad en solventes comunes en la técnica (Vega, 2006).

Aunque en este trabajo se está utilizando GC acoplado a FID los análisis modernos se están enfocando en otras metodologías de aislamiento y preconcentración, usado en diferentes investigaciones: la extracción líquido-líquido

(LLE), la extracción en fase sólida (SPE) y la microextracción en fase sólida en la modalidad de espacio de cabeza (HS-SPME). Estos tratamientos de muestra se complementan con análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Estas investigaciones han arrojado como resultado que en la LLE y SPE se consiguen mejores resultados en cuanto a sensibilidad y número de compuestos medibles. La SPE es un proceso que consume menos tiempo y es más respetuoso con el medioambiente que la LLE, ya que utiliza una menor cantidad de disolvente. Dependiendo de la naturaleza química de las distintas familias de compuestos seleccionadas la técnica de extracción es diferente (Molina, 2014).

La SPE se utiliza normalmente para la extracción de analitos polares o semipolares. Muchos factores influyen en la eficiencia del proceso de SPE, pero los dos más importantes son la capacidad del adsorbente y la retención de los analitos en él. Existe en el mercado una amplia gama de adsorbentes como las sílices enlazadas químicamente con cadenas alquílicas (C-18, C-8) o grupos polares (-CN, -NH₂), polímeros porosos (estireno-divinilbenceno), Florisil (silicato de magnesio activado) y carbón grafitizado. Grupos funcionales iónicos como el ácido carboxílico o los grupos amino también pueden enlazarse a sílice o polímeros para crear adsorbentes de intercambio iónico.

La SPE en comparación con al LLE es más selectiva, reproducible, con un gasto bajo de disolventes orgánicos y fácilmente automatizable, pero debido a que hay que filtrar la muestra previamente a su paso por el cartucho, no se consigue extraer los compuestos absorbidos en la materia sólida de las muestras acuosas que la contengan (Molina, 2014).

Por medio de esta técnica se realizó un estudio en España donde el objetivo fue evaluar el comportamiento de una variedad de contaminantes orgánicos, de los cuales fueron identificados 14 contaminantes emergentes en un humedal de flujo superficial a gran escala alimentado con un efluente secundario. Los compuestos encontrados fueron fármacos como (ácido clofíbrico , carbamazepina , cafeína , ketoprofeno , diclofenaco , ibuprofeno y naproxeno), fragancias (metil dihidrojasmonato , galaxolide y tonalide), herbicidas (mecoprop , MCPA y terbutilazina) y medicamentos veterinarios (flunixin) clofíbrico. (Matamorros, 2008)

4.7. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE)

Este tratamiento de muestra está basado en la solubilidad relativa de un analito en dos fases inmiscibles y está gobernada por el coeficiente de distribución o reparto que es la relación entre las concentraciones de analito en cada una de las fases en condiciones de equilibrio. El procedimiento experimental consiste en mezclar en un embudo de decantación, un volumen determinado de muestra con uno o varios volúmenes de disolvente o mezcla de disolventes orgánicos de polaridad similar a la de los analitos e inmiscible con la muestra. Normalmente para aumentar la cantidad de analito extraído en la fase deseada, se suele repetir la extracción varias veces. Para aumentar la selectividad de la técnica se pueden adicionar sales inorgánicas que facilitarán el paso del analito a la fase orgánica. Otro parámetro a controlar es el pH de la muestra, de forma que es acidificada para que los analitos ácidos pasen a la fase orgánica más fácilmente, y se alcaliniza para que los analitos básicos sean extraídos. Entre los inconvenientes que presenta esta técnica de extracción se encuentran la elevada cantidad de disolvente, los bajos valores de la constante de reparto, las interferencias de matriz o la formación de emulsiones difíciles de romper. Pero presenta la ventaja que las muestras acuosas no tienen que ser filtradas previamente, por lo que los compuestos que se encuentran adsorbidos en las partículas sólidas también son extraídos. La LLE se suele aplicar a la separación de analitos no polares o semipolares en muestras acuosas empleando disolventes como n-hexano, ciclohexano, diclorometano o acetato de etilo (Molina, 2014).

A partir de esta técnica se desarrolló una metodología analítica basada en la extracción líquido-líquido (LLE) y cromatografía de gases-espectrometría de masas de alta resolución (GC-HRMS) con un analizador de sector magnético de doble enfoque, para el análisis de 14 sustancias prioritarias, entre las que se encuentran plaguicidas como el alacloro o la simazina y compuestos éteres de difenilo polibromados (PBDEs). El método se validó utilizando muestras de efluentes de agua residual fortificadas a dos niveles de concentración (0.1 y 1 μgL^{-1}), obteniéndose recuperaciones comprendidas entre 80 y 120% para todos los analitos estudiados, excepto para los triclorobencenos (~50) (Robles, 2014).

4.8. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME)

La SPME utiliza una fibra de sílice fundida recubierta de un material adsorbente, en general un recubrimiento polimérico, que se utiliza para la extracción de compuestos orgánicos y/o inorgánicos volátiles derivados del mercurio, arsénico,

etc. La fibra se encuentra en el interior de un tubo hueco, de tal forma que ésta puede retraerse y extraerse de su interior, quedando así expuesta a la muestra. Su uso implica dos etapas bien diferenciadas: primero la etapa de extracción (retención de los analitos en la fase estacionaria mediante procesos de absorción o adsorción), que puede llevarse a cabo sumergiendo directamente la fibra en el interior de la muestra, o bien, manteniéndola en el espacio en cabeza que está en equilibrio con la disolución; y, segundo, la etapa de desorción, que se puede hacer térmicamente (en el inyector de un cromatógrafo de gases), o bien, utilizando disolventes orgánicos (de forma manual, o acoplado con un cromatógrafo de líquidos) (Robles, 2014).

Uno de los proyectos utilizados con esta técnica para fármacos se desarrolló y optimizó por medio del método Microextracción en Fase Sólida seguido de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (MEFS-CG-EM) para la determinación de ibuprofeno, naproxeno, clorofeno, triclosán y bisfenol catalogados dentro de los contaminantes emergentes o productos farmacéuticos de cuidado personal en aguas residuales (Peña, 2015).

4.9. EXTRACCIÓN POR SORCIÓN EN BARRA MAGNÉTICA AGITADORA (SBSE)

Es una técnica de extracción que está basada en los mismos principios que la SPME pero viene a mejorarla en algunos aspectos. Su aparición data del año 1999 cuando se publicó la información acerca de la teoría y práctica de este nuevo proceso de extracción. Consiste en poner en contacto la muestra acuosa directamente o por espacio de cabeza con una barra magnética que está recubierta por una película de polímero de PDMS. Seguidamente esta barra se aclara con agua, se seca y se introduce en un tubo de vidrio el cual se coloca en la unidad de desorción térmica (desarrollada comercialmente para su acoplamiento con el sistema de inyección del cromatógrafo) para la introducción de los analitos normalmente en un GC por desorción térmica. Esta desorción también se puede producir por acción de un disolvente (Robles, 2014).

Con esta técnica se desarrolló, optimizó y validó de un método de residuos múltiples para la determinación simultánea de 102 contaminantes, incluyendo fragancias, filtros UV, repelentes, disruptores endocrinos, biocidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilos policlorados (PCB), y varios tipos de pesticidas en matrices acuosas. Las muestras de agua fueron procesados mediante la extracción de barras magnéticas (SBSE) después de la optimización

de varios parámetros: tiempo de agitación, la fuerza iónica, la presencia de modificadores orgánicos, pH, y el volumen del agente de derivación. El protocolo optimizado mostró porcentajes aceptables de recuperación (50-100%) y los límites de detección por debajo de 1 ng L^{-1} para la mayoría de los compuestos (Pintado, et al, 2014).

4.10. ESTANDARIZACIÓN

El proceso de estandarización de una metodología analítica que consiste en verificar y documentar, que ésta conduzca en un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de los atributos y especificaciones de calidad preestablecidos (Aguirre, 2001). La estandarización de un método analítico es un proceso riguroso que dependiendo de la técnica a la que pertenezca el método, la matriz, el analito, la cantidad de parámetros de la estandarización, y de la logística empleada para su desarrollo, puede requerir de un tiempo más o menos considerable (Coy, 1999).

Los requisitos analíticos para un uso determinado establecen los parámetros o criterios de calidad del método a utilizar para resolver el problema. Estos criterios de calidad, pueden ser de tipo estadístico. En estos figuran los parámetros fundamentales de exactitud (relacionados con la trazabilidad) y precisión (relacionados con la incertidumbre) y los secundarios de selectividad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación (Rius, 2000).

La validación de métodos proporciona una idea de las capacidades y limitaciones que posee un método analítico cuando se utiliza para el análisis rutinario, una vez se ha completado el proceso de validación, es muy importante documentar el procedimiento de tal forma que el método analítico pueda reproducirse sin ninguna ambigüedad (Rius, 2000).

4.10.1. Curva De Calibración

Se inyectan cantidades exactas de la muestra pura. Luego se representan los valores de las áreas del pico en función del peso conocido inyectado. Se obtiene así una curva de calibración; que debe ser lineal y pasar por el origen. Luego se inyecta una cantidad exacta del material conocido. Se mide el área del pico y a

partir de la curva de calibración se calcula la cantidad de muestra presente en el material desconocido.

$$\% \text{ en peso } A = \frac{\text{Área}(A) \cdot \left(\frac{g}{\text{área}}\right)}{g \text{ inyectados}} \cdot 100$$

Ecuación 2. Cantidad de muestra presente en material desconocido

4.10.2. Registro De Datos O Sistema De Datos

Es el dispositivo en el cual rápidamente se interpreta la señal del GC por medio de un hardware. Generalmente hay dos tipos de sistemas utilizados, el integrador-computadores y el microprocesador basado en integradores, este último tiene la capacidad de convertir la señal de análogo a digital produciendo el cromatograma como señal análoga y el digital para reportar análisis cuantitativos (Shirey et al., 1999).

4.10.3. Parámetro De Calidad

Los parámetros de calidad son los criterios cuantitativos que se utilizan para decidir si un método es adecuado o no para resolver un determinado problema analítico. Son por lo tanto los criterios que se utilizan en la validación de los métodos analíticos (para demostrar su validez en la resolución de un problema de este tipo). Los parámetros de calidad son la materialización, expresión numérica de características o indicadores de calidad de los métodos tales como la precisión, exactitud, sensibilidad, selectividad, linealidad, rango, límite de detección y límite de cuantificación (Sierra et al., 2010).

4.10.4. Exactitud

Se define exactitud como la cercanía de la medida de una variable a su valor verdadero (Coy, 1999). Cuando un método posee un alto valor de exactitud, la medida de la muestra proporciona un valor que idealmente es idéntico al valor verdadero (previamente) (Morante et al, 2007). Generalmente la exactitud de un

método se calcula mediante estudios de porcentajes de recuperación, pero también se puede determinar por análisis de un material estándar o de referencia, así como por comparación con un método previamente validado.

4.10.5. Precisión

Se define precisión como el grado de concordancia entre los resultados de pruebas individuales cuando el procedimiento es aplicado repetidas veces para una muestra homogénea. Generalmente, la precisión de un método se expresa en términos de desviación estándar (SD) o desviación estándar relativa en porcentaje (coeficiente de variación, RSD) (Morante et al, 2007). La precisión de un método puede estimarse de varias formas:

- Repetitividad Instrumental: Grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando una misma muestra es analizada repetidamente por el mismo analista, en el mismo equipo y bajo las mismas condiciones en un corto periodo de tiempo.
- Repetitividad del Método: Grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando el método es aplicado repetidamente por el mismo analista, en el mismo equipo y en un corto periodo de tiempo.
- Precisión Intermedia: Grado de concordancia entre los resultados que se obtienen cuando se realizan pequeñas variaciones en el laboratorio como distintos días, diferentes analistas o equipos.
- Reproducibilidad: Grado de concordancia entre resultados obtenidos cuando el método es aplicado en distintos laboratorios.

Los estudios de precisión de un método analítico deben realizarse con un número suficiente de alícuotas que permita un cálculo estadístico correcto de la desviación estándar y del coeficiente de variación.

4.10.6. Límite De Detección Y Selectividad

El límite de detección de un analito por un método instrumental se puede definir como aquella concentración que proporciona una señal significativa del “blanco” o señal de fondo. El término debe aclararse en términos estadísticos.

Esto sucede cuando la distancia entre y_{bl} y M es aproximadamente 3 veces la desviación estándar del blanco, de forma que la mínima señal analítica distinguible, y_m sería:

$$y_m = y_{bl} + 3 S_{bl}$$

Ecuación 3. Límite de detección

Los términos “límites de detección” y “sensibilidad” no son exactamente sinónimos. La sensibilidad de una técnica se define correctamente como la pendiente de calibración, y si este es lineal, puede medirse en cualquier punto de él. Sin embargo, el límite de detección de un método se calcula con ayuda de la zona del calibrado próximo en el origen, y para ello se utiliza, tanto la pendiente, como la ordenada en el origen.

El “intervalo útil” de un método analítico se considera como el margen de concentraciones, comprendido entre la concentración más pequeña a la que pueden realizarse medidas cuantitativas (límite de cuantificación).

El intervalo útil de los métodos analíticos deberá ser, al menos, de dos órdenes de magnitud.

Los métodos instrumentales son más sensibles que los métodos químicos. Esto implica que son capaces de detectar y determinar cantidades de analito mucho más pequeños que los métodos clásicos, lo cual los hace particularmente útiles para el análisis de trazas, de gran importancia, por ejemplo, en muestras biológicas y medio ambientales (Hernandez, 2002).

4.10.7. Límite De Detección Y Límite De Cuantificación

El límite de detección (LOD) se puede definir como la concentración más baja del analito presente en una muestra que puede ser detectable, pero no necesariamente cuantificable, en las condiciones experimentales de trabajo. El límite de cuantificación (LOQ) se puede definir como la concentración más baja del analito presente en una muestra que puede ser determinada con una precisión y exactitud aceptable en las condiciones experimentales de trabajo. Ambos se expresan normalmente en términos de concentración de analito en la muestra, y en un método instrumental se pueden determinar de varias formas. En algunos casos se determinan como la relación señal/ruido (S/R) obtenida entre resultados de muestras con concentraciones conocidas de analito y resultados

obtenidos en muestras blanco y se establece que el LOD es la concentración que proporciona una relación S/R de 2 o 3 y que el LOQ es la concentración que proporciona una relación S/R de 10. En otros casos se estiman a través de la desviación estándar multiplicada por un factor de 10 proporciona una estimación de la señal mínima cuantificable, siendo este último el modo más usado para obtener este parámetro estadístico (Filho et al., 2010).

Hay muy diversos métodos de análisis y equipos instrumentales, dependiendo de cada uno se elegirá el método para hallar tanto el límite de detección como el de cuantificación, en los siguientes párrafos se mencionaran algunos métodos para hallarlos.

4.10.7.1. Método Basado en la Relación Señal/Ruido.

Este es uno de los más conocidos y empleados, requiere que el procedimiento de análisis sea instrumental y que proporcione una señal blanco, un ruido de fondo o una línea de base, es decir una señal residual a concentración de cero analito (cromatografía de gases o líquida, espectrofotometría UV-visible). Este procedimiento presenta la desventaja de que en numerosas ocasiones al llevar a cabo la comprobación experimental del LC calculado, se observa que es posible obtener resultados igualmente precisos y exactos aun cuando se desciende más en la concentración límite (Aguirre, 2001).

4.10.7.2. Método Basado en la Desviación Estándar de la Respuesta del Blanco y la Pendiente de la Recta de Calibrado.

De acuerdo con la IUPAC, puede calcularse el LD y LC de un método analítico a partir del conocimiento de la desviación estándar atribuible a la respuesta de una muestra y la pendiente de la recta de calibrado del analito. La expresión a aplicar para este cálculo varía en función de si el método instrumental empleado corrige la señal frente a un blanco (métodos espectrofotométricos) o no (métodos cromatográficos) (López, 2008).

4.10.7.3. Método Basado en la Extrapolación de la Recta de Calibrado a concentración Cero.

Se trata de un procedimiento aplicable también a métodos analíticos instrumentales que proporcionan resultados numéricos y dirigido a evitar el cálculo, en ocasiones costoso en tiempo, de la señal media del blanco y su desviación estándar. Utilizando como en el anterior la pendiente de la recta de calibrado, pero en este caso sustituye el valor real de un blanco, por la extrapolación de dicha recta

4.10.8. Linealidad Y Rango

La linealidad de un método analítico es su habilidad para proporcionar resultados que sean, directamente o mediante transformación matemática, proporcionales a la concentración de analito presente en la muestra dentro de un rango determinado. El rango de un método analítico puede definirse como el intervalo de concentraciones, incluyendo la más baja y la más alta en el cual se pueden realizar determinaciones del analito con adecuada precisión, exactitud y linealidad (Sierra et al., 2010).

La linealidad de un método analítico se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis de disoluciones patrón con diferentes concentraciones conocidas de analito incluidas en el rango. El rango de un método debe ser comprobado realizando un estudio conveniente de precisión, exactitud y linealidad en los extremos del mismo.

El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito (López, 2008).

Para evaluar la linealidad existen unos criterios mínimos aplicables a cualquier procedimiento.

- Dentro del rango establecido se recomienda estudiar al menos 4 niveles de concentración. Estadísticamente lo correcto sería analizar las muestras de forma aleatoria, no obstante, se establece como criterio práctico analizarlas en sentido creciente de concentración para minimizar posibles efectos memoria en el equipo.
- Para realizar los análisis se recomienda hacer pesadas independientes, ya que así se elimina el posible error sistemático que se podría arrastrar partiendo de una sola pesada y realizando diluciones. No obstante, para evaluar la linealidad en las

impurezas se suelen utilizar sucesivas diluciones ya que normalmente se trabaja en niveles de concentración muy bajos y esto dificultaría las pesadas (López, 2008).

4.10.9. Sensibilidad

Es la capacidad de un método para distinguir pequeñas diferencias en la concentración del analito. Los factores que determinan la sensibilidad son la pendiente de la recta de calibrado y la precisión, de manera que si dos métodos tienen igual precisión será más sensible que tenga una recta con mayor pendiente, y si dos métodos tienen igual pendiente será más sensible el que presente mayor precisión. La sensibilidad de un método puede expresarse como:

- Sensibilidad de la calibración (m): Es la pendiente de la recta de calibrado.
- Sensibilidad Analítica (γ): Se expresa como la pendiente de la recta de calibrado dividida entre la desviación estándar de las medidas (precisión).

La sensibilidad de calibración tiene la ventaja de que es independiente de la concentración. Por su parte, la sensibilidad analítica tiene la ventaja de ser insensible a los factores de amplificación.

En contraste con el límite de detección, la sensibilidad de un método está definida como la habilidad para distinguir entre diferentes concentraciones. Para métodos donde la respuesta con respecto a la concentración es una función lineal, la sensibilidad es constante con respecto a la concentración y es igual a la pendiente de la curva de calibración. Contrariamente a las funciones lineales, la sensibilidad de métodos cuando su respuesta es no-lineal cambia con la concentración del analito (López, 2008).

4.10.10. Porcentaje De Recuperación (% REC)

Proporción de la cantidad de analito, presente en la porción de la muestra ó adicionado a ésta, que es cuantificada por el método de ensayo (Castro, 2010).

Normalmente se utiliza para evaluar la recuperación en porcentaje (% de recuperación) del analito presente o agregado a una muestra de control de calidad, evalúa la eficiencia de extracción, proceso de preparación o interferencias que pueden existir al aplicar el método de ensayo.

El porcentaje de recuperación (% R) se calcula de la siguiente manera:

$$\% R = \left(\frac{CF - CU}{CA} \right) \times 100$$

Ecuación 4. Porcentaje de recuperación

Dónde:

CF = Concentración del analito medida en la muestra fortificada

CU = Concentración de analito medida en la muestra sin fortificar

CA = Concentración de analito adicionada.

4.10.11. Repetitividad

Es la precisión expresada como la concordancia obtenida entre las determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo. Es función de la variabilidad que tiene el equipo de medida o calibre. Se expresa como el coeficiente de variación %CV (Rubio, M., Vallejo, A. 2014)

4.10.12. Reproducibilidad

Es un concepto de precisión relacionado con medias hechas bajo iguales condiciones pero con variación de al menos un factor. Expresa la precisión entre laboratorios como resultado de estudios interlaboratorios diseñados para estandarizar la metodología.

Variación de la media de las mediciones realizadas por diferentes personas usando el mismo equipo de medición para medir las mismas características de las mismas piezas. Es función de la variabilidad del operador (Rodríguez, 2011).

4.11. NORMATIVIDAD GENERAL

Las directrices sobre la regulación de estos productos aún no existe en nuestro país, sin embargo a nivel internacional el tema ha sido regulado desde hace ya varios años. Por ejemplo la Administración de Drogas y Alimentos de los EE.UU. (FDA) ha regulado productos farmacéuticos en el medio ambiente desde 1977 bajo los auspicios de la Ley Nacional de Política Ambiental de 1969. En Canadá, está en desarrollo un requisito para la evaluación ambiental de los productos farmacéuticos (USEPA, 2002). Para Colombia se espera en el nuevo marco normativo para manejo de vertimientos, la introducción de este tipo de contaminantes como compuestos que requieren control en la descarga de las aguas residuales (grupo de investigación en agua y saneamiento UTP, 2014) afortunadamente ya se están adelantando estudios como estandarizaciones y desarrollos de técnicas que pueden contribuir a estas normatividades en donde indiquen límites máximos de concentraciones y obligue a las plantas de tratamiento a seguir con los estándares.

Actualmente debido a que la contaminación por fármacos se da principalmente por vertimientos el decreto que se acopla es el 3039 de 2010 que indica que al estado le corresponde garantizar la calidad del agua para consumo humano. Así mismo, regular entre otros aspectos, la clasificación de las aguas, señalar las que deben ser objeto de protección y control especial, fijar su destinación y posibilidades de aprovechamiento, estableciendo la calidad de las mismas y ejerciendo control sobre los vertimientos que se introduzcan en las aguas superficiales o subterráneas, interiores o marinas, a fin de que estas no se conviertan en focos de contaminación que pongan en riesgo los ciclos biológicos, el normal desarrollo de las especies y la capacidad oxigenante y reguladora de los cuerpos de agua.

Siendo este decreto tan claro y con toda la problemática mencionada es evidente que la calidad del agua se afecta y no se está ejerciendo el control ni tratamiento con el fin de remediar la contaminación por fármacos como contaminantes emergentes. Las aguas o residuos líquidos provenientes del uso doméstico, comercial e industrial se introducen en las aguas superficiales, subterráneas, interiores y marinas y estas alteran los ecosistemas, el ciclo del agua y el sano desarrollo de especies vivas que consumen y son dependientes de este recurso natural.

Así mismo otra normatividad que aplica es la resolución 2115 de 2007 por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano.

El ciclo del agua repercute y no hay tratamientos eficientes para los contaminantes emergentes en las plantas de tratamiento lo que conlleva a que el recurso hídrico que se dirige a nuestros hogares en forma de agua potable llega con trazas de estos componentes y terminamos siendo nosotros mismos quienes los consumimos.

5. METODOLOGIA

La metodología utilizada en el desarrollo de la técnica de cromatografía de gases (GC-FID) para la determinación de contaminantes emergentes tipo productos farmacéuticos se llevó a cabo a través de los siguientes pasos.

5.1. COMPRA DE ESTÁNDARES Y REACTIVOS

En la realización de las prácticas de laboratorio fue necesario comprar, adquirir o disponer de analitos, reactivos, materiales e instrumentos que permitieran el pleno desarrollo de las curvas de calibración y el análisis de productos farmacéuticos siendo necesaria la:

5.1.1. Selección Y Compra De Estándares Disponibles

- Ibuprofeno
- Diclofenaco
- Carbamazepina
- Cafeína

5.1.2. Selección y Compra de Reactivos Y Estándares

- Agua destilada de la Escuela de Química UTP
- Ácido clorhídrico concentrado
- Hexano grado HPLC
- Acetato de etilo grado HPLC
- Acetonitrilo grado HPLC
- Metanol grado HPLC
- Ibuprofeno Estándar analítico
- Cafeína Estándar analítico
- Carbamazepina Estándar analítico
- Diclofenaco Estándar analítico

5.1.3. Compra y Préstamo de Equipos y Materiales

- Estufa

- Bomba al vacío
- Colector de SPE al vacío de doce puestos
- Equipó para filtración al vacío
- Cabina para gases
- Pinzas para soporte universal
- Soporte universal
- Aro analítico
- Papel filtro cualitativo
- Papel indicador de pH
- Par de guantes
- Probeta de 200 mL
- Probeta de 1000 mL
- Beacker de 500 mL
- Beacker de 100 mL
- Beacker de 200 mL
- Pipetas aforadas de 2 mL
- Pipetas aforadas de 5 mL
- Pipetas aforadas de 10 mL
- Micropipeta
- Microjeringa
- Jeringa
- Filtro de jeringa (filtro Banda azul de 0,45 μm)
- Vidrio de reloj
- Varilla agitadora
- Embudo de vidrio pequeño
- Cartucho de ENVICARB para la SPE.

5.2. DESARROLLO DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN

Las curvas de calibración correspondientes de los 4 productos farmacéuticos (Diclofenaco, Ibuprofeno, Carbamazepina y Cafeína) fueron desarrolladas en un rango de concentración entre 5 ppm y 53,3 ppm, compartiendo el mismo vial para las mismas concentraciones, el procedimiento realizado es el indicado en el diagrama de flujo de la figura 5 utilizando el equipo de cromatografía de gases FID del laboratorio de la Escuela de Química de la Universidad Tecnológica de Pereira.

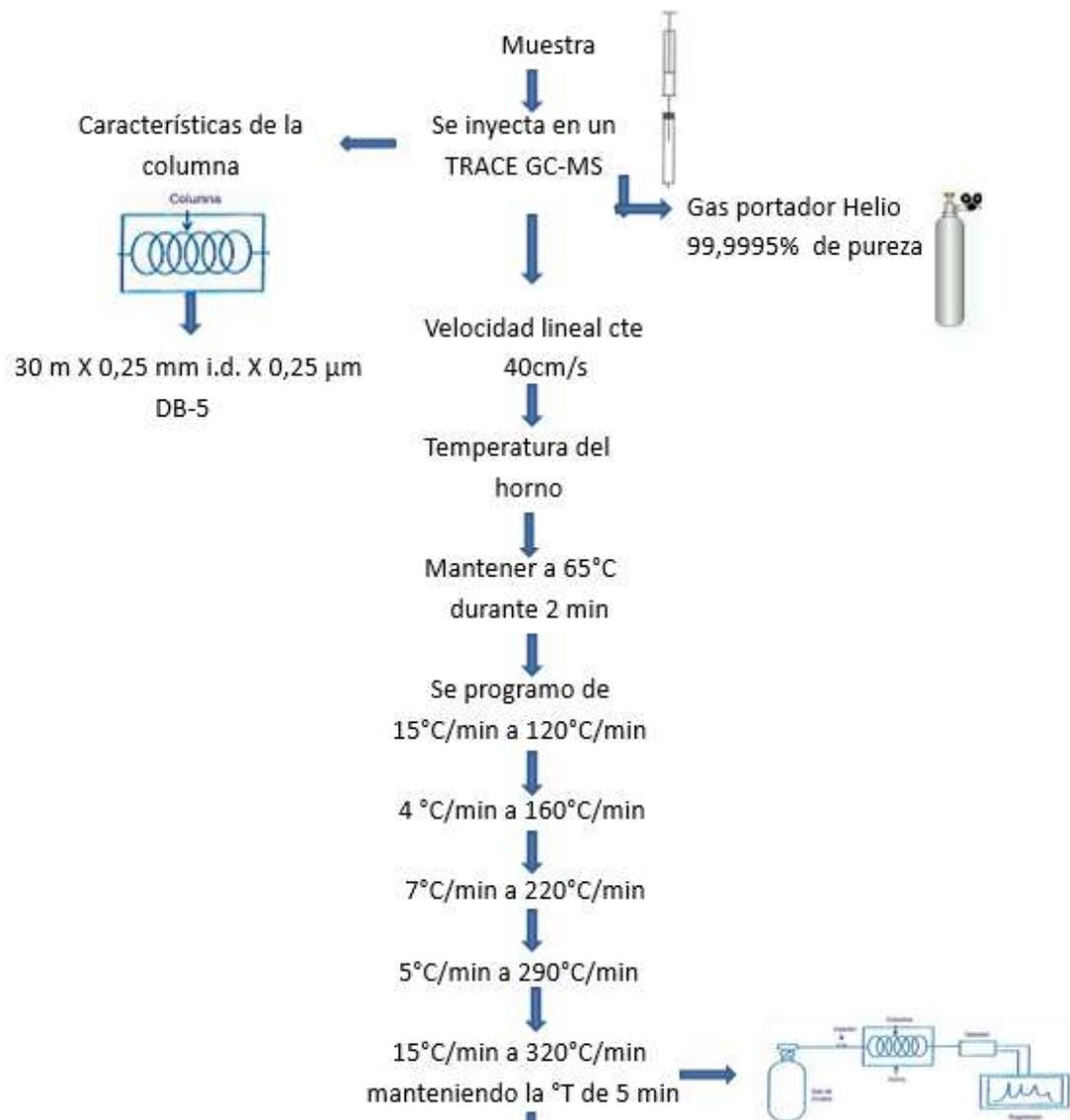


Figura 4. Método cromatográfico de gases

La siguiente imagen muestra los fármacos (Diclofenaco, Carbamazepina ibuprofeno y cafeína) respectivamente organizados en la imagen, adquiridos de la marca Sigma Aldrich y enseguida de estos en igual orden las soluciones madres preparadas a la concentración de 1000 ppm para las diluciones necesarias de las curvas de calibración.



Imagen 1. Estándares analíticos y soluciones madre

5.3. DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN EN FASE SOLIDA

Esta técnica fue necesario implementarla ya que es necesario realizarle un tratamiento previo a la muestra para poder llevarla al cromatógrafo de gases y una vez hechas las curvas de calibración se procedió a la contaminación de 1 L de agua destilada con los analitos (Ibuprofeno, Diclofenaco, Carbamazepina y Cafeína) a una concentración de 40 ppm de muestras comerciales y así proceder a la técnica SPE de los productos farmacéuticos utilizando cartuchos Supelclean Envi-Carb/LC-NH₂ SPE tuvo 500mg de 6 mL de marca SIGMA.



Imagen 2. Matraz con contaminación de muestra real



Imagen 3. Filtración al vacío

Del litro contaminado se tomaron 200 mL, esta cantidad se filtró al vacío (imagen 3) para eliminar partículas en suspensión y se acidifico la muestra de agua con HCL concentrado a pH 2 y paralelo a este procedimiento se iban acondicionando los cartuchos SPE (imagen 4) percolando primero con 3 mL de MeOH, luego 3 mL de H₂O y finalmente con 3mL de H₂O acidificado a pH 3 con HCL a una velocidad de flujo de 10 mL/min.



Imagen 4. Acondicionamiento del Cartucho para la SPE

A través de un colector de SPE se filtraron al vacío los 200 mL de muestra en cartuchos de SPE nombrados anteriormente donde su objetivo consistió en pasar la muestra a través de la fase estacionaria, enriquecida previamente, para luego proceder a percolar los analitos allí retenidos eluyéndolos con 5 mL de (5% Acido formico) en MeOH, luego se desorbió el extracto evaporando hasta sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno, adicionalmente se reconstituyo en 1,5 mL de metanol para su preparación a la siguiente técnica Cromatografía de gases.

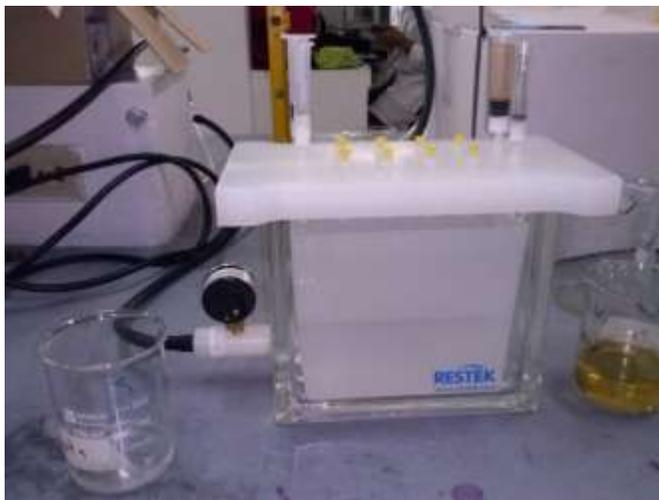


Imagen 5. Colector SPE de 12 puestos

5.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES

5.4.1. Contaminación Con Las Muestras Reales

Para el análisis de trazas de compuestos orgánicos, esta etapa principalmente comprende la extracción, que sirve para aislar los compuestos de interés de la matriz, y finalmente la concentración de los compuestos objetivo para mejorar (enriquecer) y, al mismo tiempo, reducir los efectos de la matriz, es decir “limpiar la muestra” (Becerril, 2012).

La contaminación con muestras reales fueron medicamentos comprados en droguerías, macerados y pesados para su siguiente dilución como se describió en el paso anterior de SPE.

Después de reconstituidas las muestras se procedió a filtrar cada una de ellas (imagen 6) con el fin de evitar contaminantes que puedan haberse adquirido durante el procedimiento y que pudiesen afectar el equipo.



Imagen 6. Filtración de la muestra antes de inyección

El procedimiento paso a paso de cómo realizar el tratamiento se describe en el diagrama de flujo ilustrado en la (figura 6).

5.5. CARACTERISTICAS DEL CROMATÓGRAFO DE GASES

Las Muestras se inyectaron en un equipo de cromatografía de gas capilar - FID autoinyector, automuestreador marca Shimadzu GC 2014, y se utilizaron rampas para las corridas de los 4 analitos y así posteriormente realizar el análisis estadístico.

5.5.1. Gas De Portador

Se utilizó helio como gas portador (99,9995% de pureza) en una constante la velocidad lineal promedio de 40 cm s^{-1} .

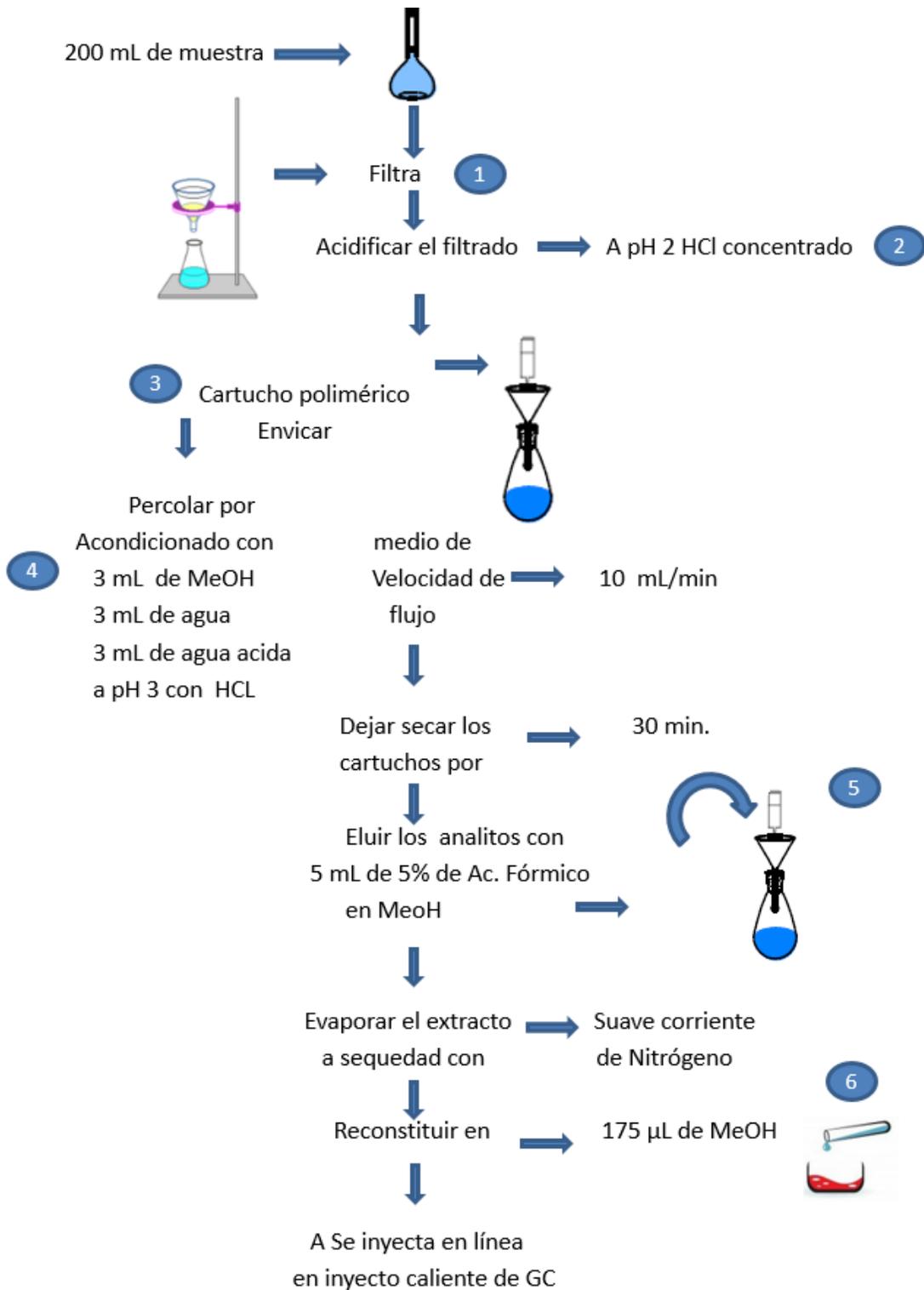


Figura 5. Método SPE para extracción de los fármacos y clean up



Imagen 7. Equipo de cromatografía

5.5.2. Método Cromatográfico

Se utilizó el equipo de cromatografía de gas a una velocidad lineal promedio constante de $40 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$. El horno mantuvo una temperatura de 50°C durante 2 min luego aumenta la temperatura de a $15^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta llegar a 120°C . Luego se sigue la misma metodología de calentamiento de: $4^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 160°C , $7^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 220°C , $5^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 290°C y $10^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 300°C manteniendo esta temperatura por 5 minutos más.

Un volumen de $1 \mu\text{L}$ de muestra se inyectó en el modo splitless a una temperatura del inyector de 260°C con una purga del inyector de tiempo de activación de 1 minuto (Matamorros, 2005-2006).

5.5.3. Columna cromatografía

Las características de la columna capilar son $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm id} \times 0.25 \mu\text{m DB-5}$.

5.5.4. Calibración

Para estimar la concentración de los analitos en la muestra de manera confiable se prepararon unas curvas de calibración según sus concentraciones que van desde 5 ppm a 53,3 ppm

5.5.5. Control de calidad

Se garantizó la realización las curvas de calibración con estándares certificados por Sigma Aldrich, que garantiza la concentración, pureza y alta calidad de estos reactivos y el buen almacenamiento de estos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inicialmente se analizó cada uno de los analitos de interés con la técnica cromatográfica identificando tiempos de retención para luego realizar el análisis cromatográfico de la mezcla de los 4 estándares de fármacos marca SIGMA (Carbamazepina, Ibuprofeno, Diclofenaco y Cafeína) todos a una concentración de 40ppm, que después de inyectado en el cromatógrafo arrojó ciertos resultados.

Los cromatogramas muestran buenos resultados contando con la ventaja de que no hubo solapamiento entre ellos pudiendo así realizar el análisis con la curva de calibración y esto fue gracias a que los 4 fármacos contaban con tiempo de retención aunque cercanos diferentes.

Los tiempos de retención de los fármacos arrojados se describen a continuación en la tabla 3 con el fin de identificar claramente en que tiempo de retención apareció cada analito.

Tabla 3. Tiempo de retención analitos

Analitos	Tiempo de retención
Ibuprofeno	18.863
Cafeína	24.582
Carbamazepina	25.833
Diclofenaco	28.799

Las curvas de calibración se hicieron combinando los 4 farmacos, pero en un vial diferente para cada concentración. Dando como resultado los cromatogramas de las figuras 7,8,9,10,11,12 y 13.

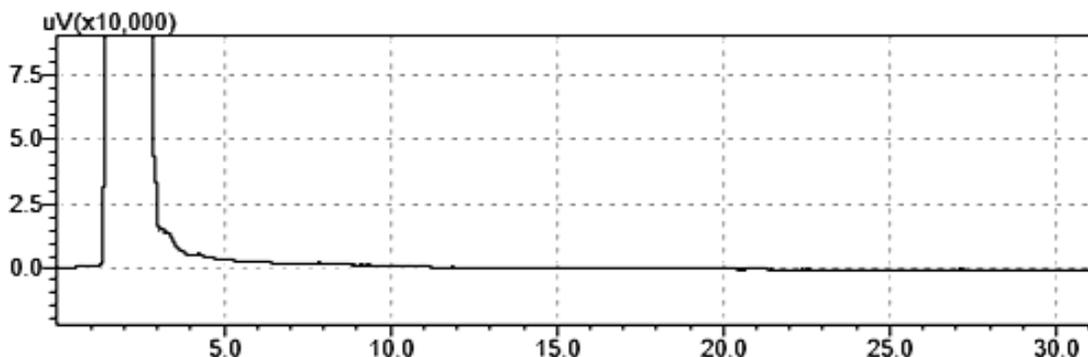


Figura 6. Cromatograma del Blanco

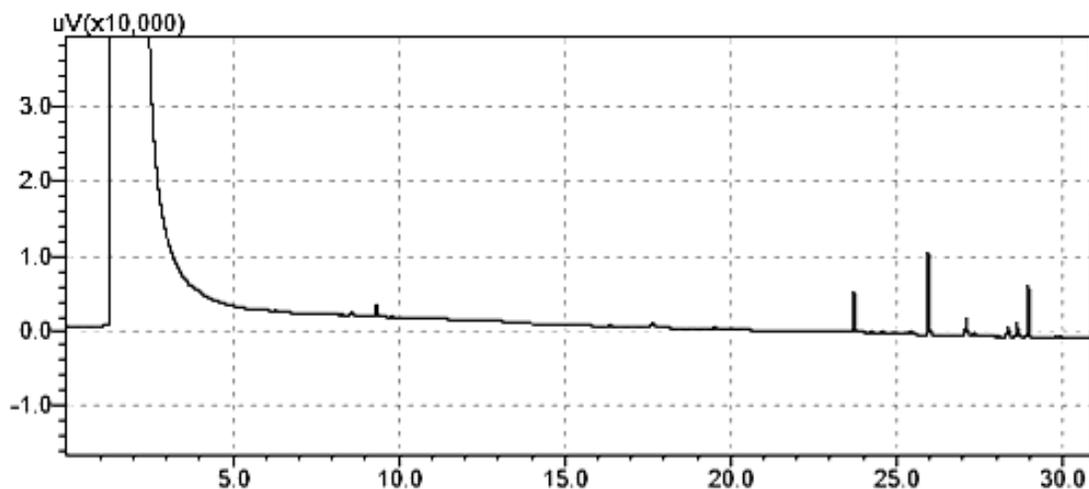


Figura 7. Cromatograma de analitos a 5 ppm

Tabla 4. Datos de analitos a 5 ppm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark	Compound ID#	Compound Name
1	23.514	247.2	44.8	2.66987	ppm		2	Cafeina
2	25.953	35427.0	11227.4	4.80752	ppm		3	Carbamazepina
3	28.972	22601.0	7075.8	6.25819	ppm		4	Diclofenaco
4	31.462	117591.8	29364.8	0.00000				

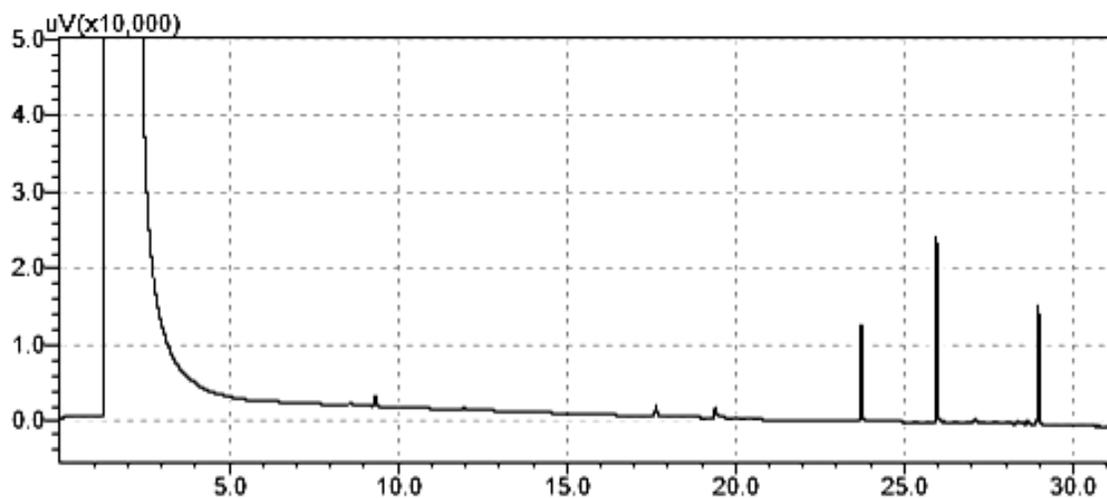


Figura 8. Cromatograma de analitos a 10 ppm

Tabla 5. Datos de analitos a 10 ppm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark	Compound ID#	Compound Name
1	19.400	6724.5	1401.0	10.22517	ppm		1	Ibuprofeno
2	23.723	36964.6	12603.3	9.09611	ppm		2	Cafeina
3	25.953	66980.5	23723.8	8.48931	ppm		3	Carbamazepina
4	28.972	49949.2	15700.0	10.43046	ppm		4	Diclofenaco

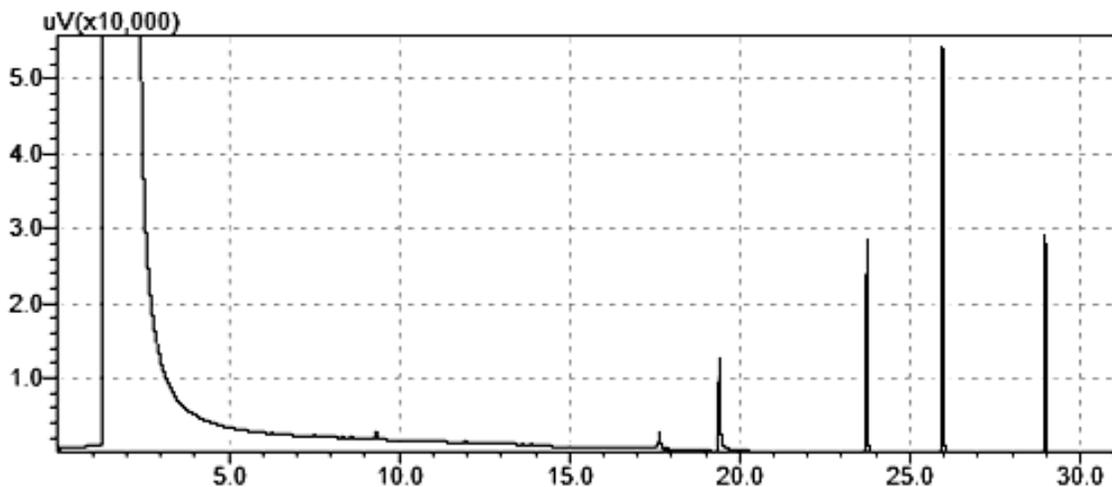


Figura 9. Cromatograma de analitos a 20 ppm

Tabla 6. Datos de analitos a 20 ppm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark	Compound ID#	Compound Name
1	19.401	35116.9	11775.4	17.00810	ppm		1	Ibuprofeno
2	23.734	87722.7	28550.6	17.97975	ppm	S	2	Cafeina
3	25.956	167477.1	54149.3	20.21563	ppm	S	3	Carbamazepina
4	28.974	94867.8	29627.8	17.28330	ppm		4	Diclofenaco

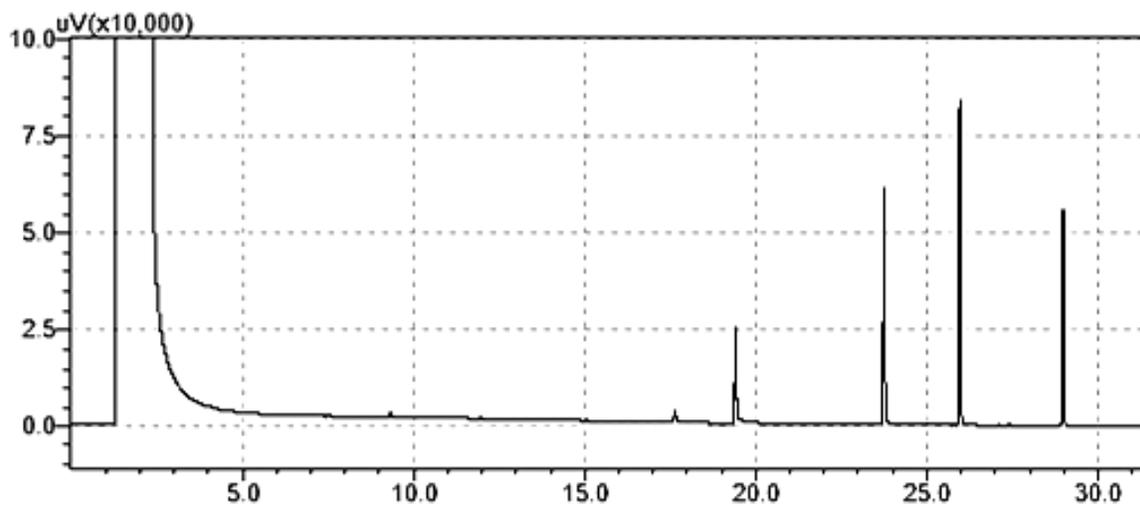


Figura 10. Cromatograma de analitos a 30 ppm

Tabla 7. Datos de analitos a 30 ppm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark	Compound ID#	Compound Name
1	19.416	94773.7	24457.8	31.26007	ppm	S	1	Ibuprofeno
2	23.757	203259.4	60569.6	38.20088	ppm	S	2	Cafeina
3	25.962	256294.9	82953.3	30.57924	ppm	S	3	Carbamazepina
4	28.981	177564.2	55116.2	29.89957	ppm		4	Diclofenaco

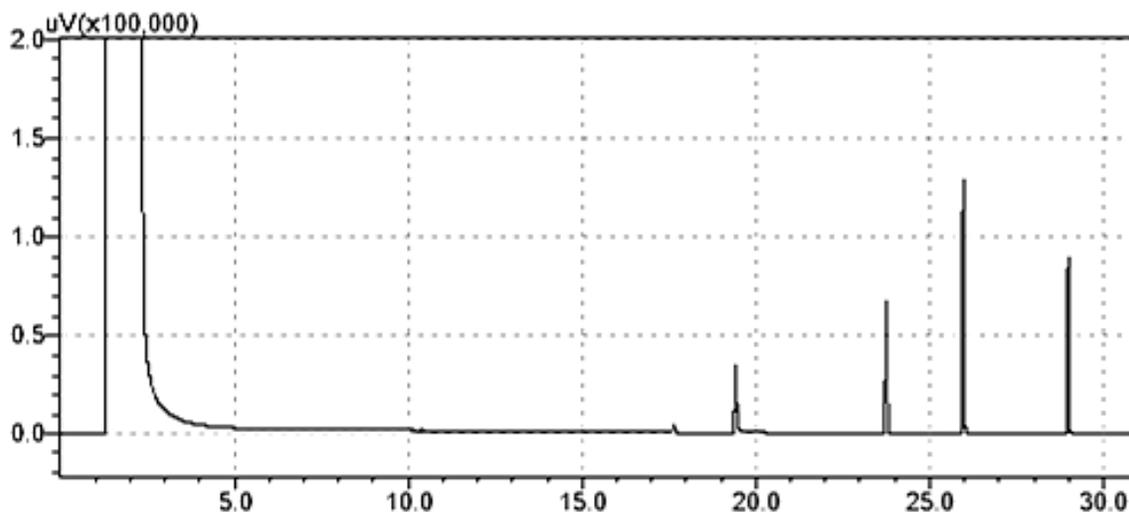


Figura 11. Cromatograma de analitos a 46,6 ppm

Tabla 8. Datos de analitos a 46,6 ppm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark	Compound ID#	Compound Name
1	19.426	137833.7	34142.8	41.54706	ppm	S	1	Ibuprofeno
2	23.761	227025.1	66902.6	42.36033	ppm	S	2	Cafeina
3	25.968	400798.3	128807.7	47.44045	ppm		3	Carbamazepina
4	28.988	291549.8	89336.0	47.28936	ppm		4	Diclofenaco

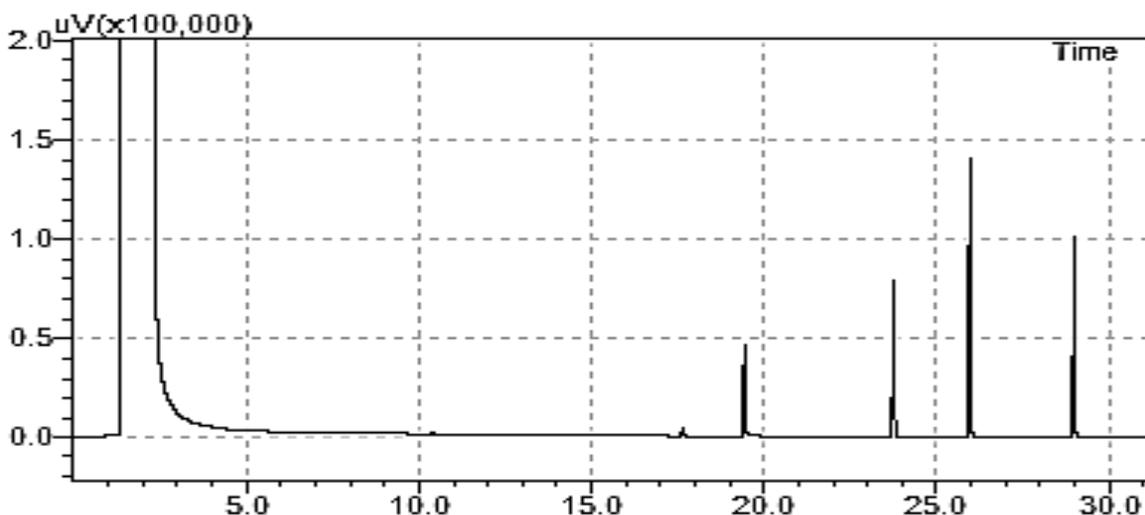


Figura 12. Cromatograma de analitos a 53,3 ppm

Tabla 9. Datos de analitos a 53,3 ppm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark	Compound ID#	Compound Name
1	19.440	187596.2	45500.5	53.43531	ppm		1	Ibuprofeno
2	23.769	279086.1	78276.8	51.47200	ppm	S	2	Cafeina
3	25.971	441559.1	139247.7	52.19657	ppm		3	Carbamazepina
4	28.992	330931.9	100822.3	53.29755	ppm		4	Diclofenaco

Las curvas de calibración de todos los compuestos fueron arrojadas por el equipo, todos los analitos a excepción del ibuprofeno detectaron las concentraciones desde 5 ppm, y el equipo al formar las curvas arroja datos como lo indican las tablas 4,5,6,7,8 y 9 que fueron utilizados para el análisis estadístico generando así mayor coherencia y exactitud de estos.

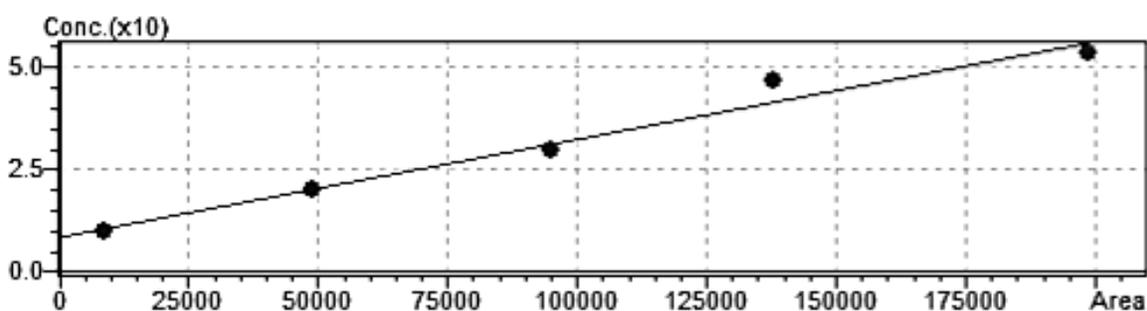


Figura 13. Curva de calibración del ibuprofeno

Tabla 10. Curva de calibración del ibuprofeno

Level	Conc.	Area 1
1	5.0000	0
2	10.000	8.704
3	20.000	48.873
4	30.000	94.774
5	46.600	137.834
6	53.300	198.752

$Y = aX + b$
 $a = 2.388994e-004$
 $b = 8.618693$
 $R^2 = 0.9726403$
 $R = 0.9862253$
 External Standard
 Calib. Curve: Linear
 Origin: Not Forced
 Weight: None

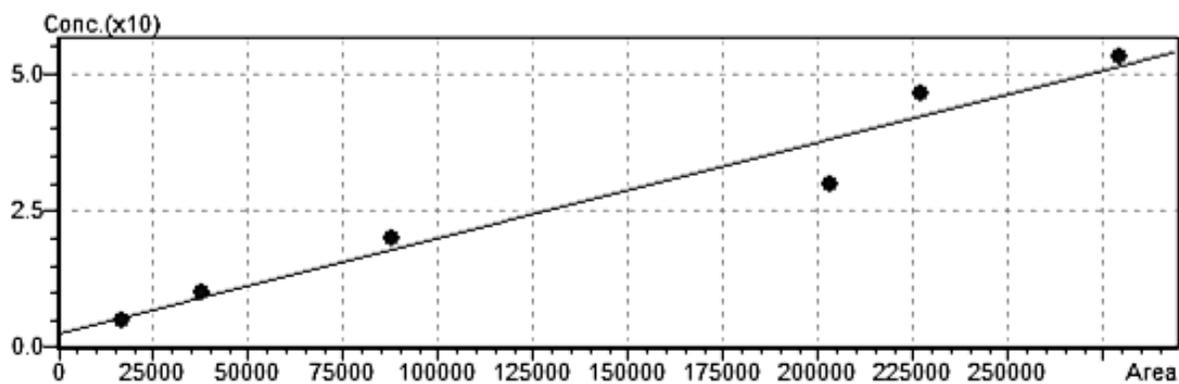


Figura 14. Curva de calibración de la cafeína

Tabla 11. Curva de calibración de la cafeína

Leve	Conc.	Area1
1	5.0000	17.017
2	10.000	38.027
3	20.000	87.723
4	30.000	203.259
5	46.600	227.025
6	53.300	279.086

$Y = aX + b$
 $a = 1.750191e-004$
 $b = 2.626603$
 $R^2 = 0.9509126$
 $R = 0.9751475$
 External Standard
 Calib Curve: Linear
 Origin: Not Forced
 Weight: None
 Mean RF : 2.214368e-004
 RF SD : 5.224802e-005

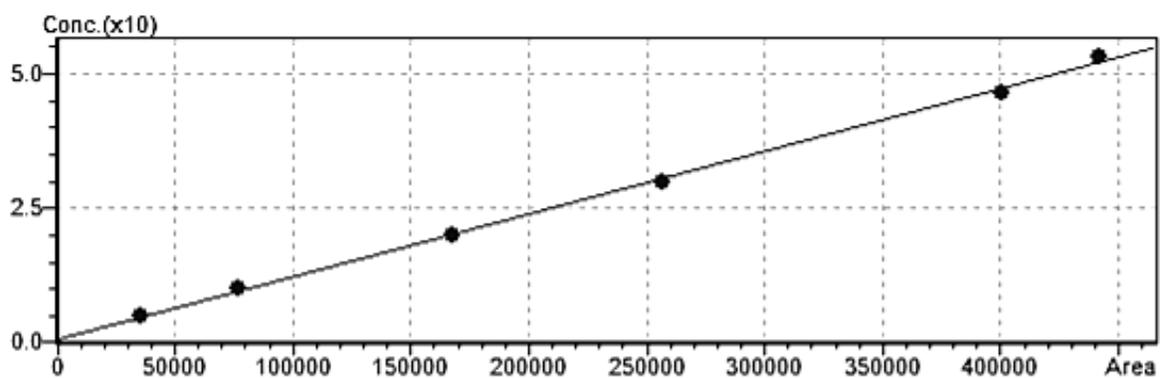


Figura 15. Curva de calibración del Carbamazepina

Tabla 12. Curva de calibración del Carbamazepina

Level	Conc.	Area1
1	5.0000	35,692
2	10.000	76,753
3	20.000	167,477
4	30.000	256,295
5	46.600	400,798
6	53.300	441,559

Y = aX + b
a = 1.166838e-004
b = 0.6737694
R² = 0.9987041
R = 0.9993519

External Standard
Calib.Curve:Linear
Origin:Not Forced
Weight:None

Mean RF : 1.239705e-004
RF SD : 9.361327e-006

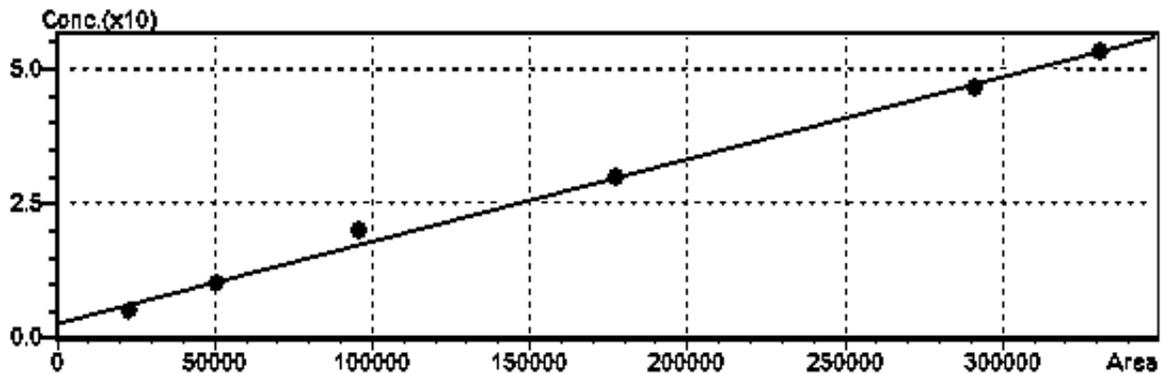


Imagen 8. Curva de calibración del diclofenaco

Tabla 13. Curva de calibración del diclofenaco

Level	Conc.	Area1
1	5.0000	23,265
2	10.000	51,121
3	20.000	95,926
4	30.000	177,564
5	46.600	291,550
6	53.300	330,932

Y = aX + b
a = 1.525612e-004
b = 2.810157
R² = 0.9951540
R = 0.9975741

External Standard
Calib.Curve:Linear
Origin:Not Forced
Weight:None

Mean RF : 1.848118e-004
RF SD : 2.458907e-005

Después de tener las curvas de calibración listas se procedió a contaminar 1 L de agua destilada con productos farmacéuticos comerciales a una concentración de 40 ppm, de esta se tomaron solo 200 mL para su tratamiento de SPE y después

de todo el procedimiento indicado en la metodología se corrió la muestra en el cromatógrafo de gases en el cual se analizó con dichas curvas de calibración arrojando las concentraciones recuperadas.

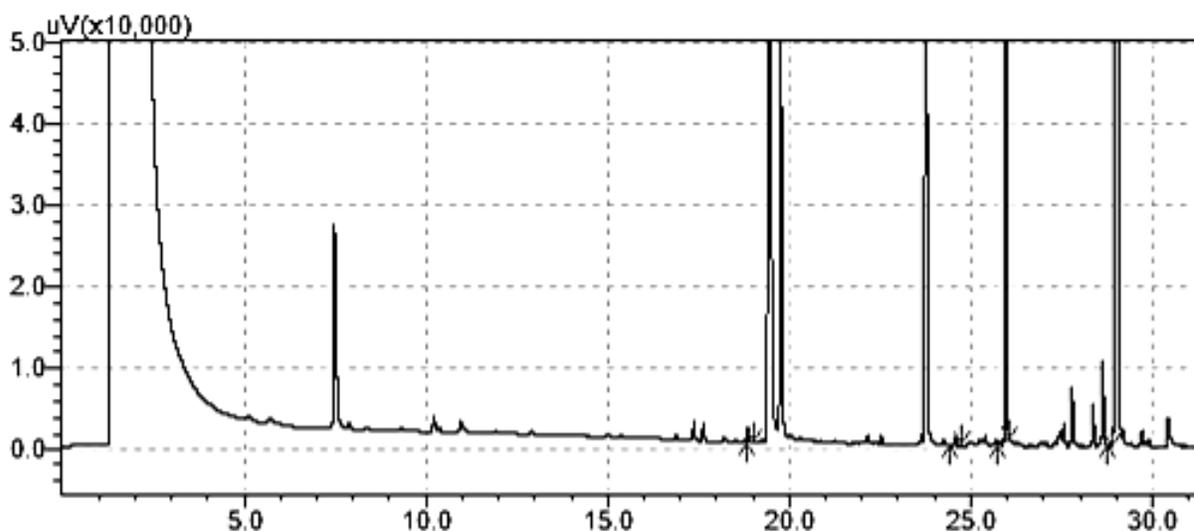


Figura 16. Cromatogramamuestra real

Tabla 14. Cromatogramamuestra real

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark	Compound ID#	Compound Name
1	18.858	6212.1	1829.0	10.10276	ppm	V	1	Ibuprofeno
2	24.584	3526.4	1130.2	3.24379	ppm		2	Cafeina
3	25.956	268513.5	89671.0	32.00495	ppm		3	Carbamazepina
4	28.775	696.5	205.2	2.91641	ppm		4	Diclofenaco

Se realizó el análisis de 200 mL de una muestra real contaminada en el laboratorio de la escuela de química Universidad Tecnológica de Pereira en un equipo de cromatografía de gas capilar - FID autoinyector, automuestreador marca Shimadzu GC 2014.

Las curvas de calibración realizadas con cada uno de los fármacos usados son estándares analíticos de la empresa Sigma Aldrich la cual certifica su pureza y alta calidad.

El resultado arrojado previamente se realizó por medio de una curva de calibración para cada fármaco con concentraciones en el rango de 5 ppm a 53.3 ppm que se exponen a continuación.

Tabla 15. Rangos para curva de calibración

Patrones de cada analito	Concentración (ppm)
1	5
2	10
3	20
4	30
5	46.6
6	53.3

La tabla 16 indica según la concentración de los analitos el porcentaje de recuperación, mostrando que aunque si se recupera una parte de la muestra inicial no es la esperada teniendo solo la Carbamazepina un porcentaje de recuperación representativo. Un factor químico por los que se acudió a dicho procedimiento es su similitud en polaridades, sin embargo hubo factores del medio que afectaron por ejemplo el hecho de ser productos comerciales con una mayoritaria cantidad de excipientes .

Tabla 16. Concentración y % de recuperación de analitos

Analitos	Concentración (ppm)	% Recuperación
Ibuprofeno	10.10276	25.15
Cafeína	3.24379	8.109
Carbamazepina	32.00495	80.01
Diclofenaco	2.91641	7.291

Se puede observar que a pesar de que se partió de una cantidad igual de concentración de 40 ppm para los 4 analitos la concentración final entregada por el equipo vario considerablemente desde 2.91641ppm para el Diclofenaco 32.00495 ppm para la Carbamazepina lo cual nos indica como la técnica de extracción en fase solida es más confiable para unos fármacos que para otros y que es conveniente hacer ensayos diferentes para cada fármaco con el fin de afinar técnicas apropiadas para cada uno de ellos.

La siguiente grafica está dada por la tabla 16 con el fin de mostrar gráficamente los resultados de porcentajes de recuperación calculados.

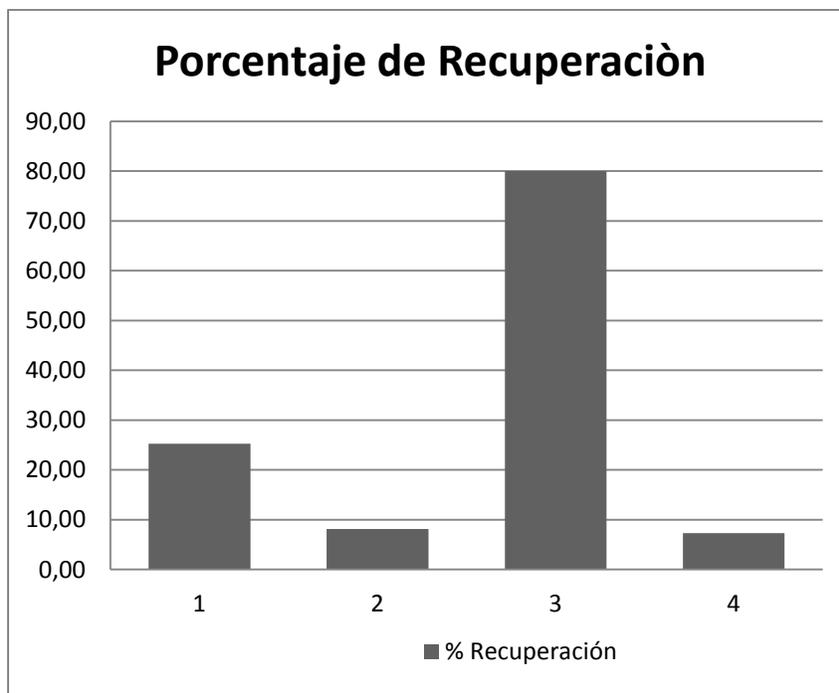


Gráfico 1. Resultados de los porcentajes de recuperación de la contaminación

La necesidad de afinar mejor la técnica SPE que no es el objetivo principal de este trabajo de grado se sigue presentando para futuros proyectos de investigación ya que la técnica solo dio un resultado representativo para la Carbamazepina según el porcentaje de recuperación, las bases que entregan en este documento como lo son las curvas de calibración debidamente estandarizadas son un gran avance debido a que aquí en Colombia no se había tenido en cuenta esta problemática y aunque en otros países ya han adoptado la técnica se trató de tener marcos de referencia para que los resultados fueran óptimos para los analitos. El llamado que aquí se hace es que se tenga en cuenta la problemática ambiental a la que nos estamos enfrentando y que este estudio no se quede como un simple documento sino que siga avanzando hasta que se pueda incluso implementar una norma en donde se controlen estos y muchos más contaminantes emergentes en los tratamientos y vertimientos de agua.

7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los parámetros estadísticos necesarios en la estandarización del método para cada curva de calibración son los siguientes: R^2 coeficiente de correlación, relación lineal, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

Las curvas de calibración se modelaron según el método de mínimos cuadrados simple. Se evaluó la pendiente y el intercepto mediante la regresión, los límites de detección y cuantificación fueron calculados utilizando una extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero donde primero se obtuvo la pendiente, y se realizó una lectura por triplicado del blanco, de la cual se obtuvo la desviación estándar. Todos los datos fueron arrojados por el software del equipo de GC capilar - FID marca Shimadzu GC 2014 de la Escuela de Química UTP.

A partir de la relación señal/ruido se calcularon los valores de límite de detección y límite de cuantificación, el LC se calculó para la concentración que proporcionó una señal 10 veces superior a la señal producida por el ruido de fondo (blanco), mientras que el LD es igual a la concentración de analito que proporcionó en una señal 3 veces superior a este.

Los datos registrados para estas medidas se observan en la Tabla 17.

Tabla 17. Desviaciones estándar

Analitos	Desviación estándar
Ibuprofeno	3.683703 E ⁻⁴
Cafeína	5.224802 E ⁻⁵
Carbamazepina	9.361327 E ⁻⁶
Diclofenaco	2.458907 E ⁻⁵

Tabla 18. Resultados estadísticos

Analitos	Sensibilidad (Área/ppm)	R^2	Desviación del blanco (ppm)	Límite de cuantificación (ppm)	Límite de detección (ppm)
Ibuprofeno	60132,9	0,9726	0,1008	1,008	5,5965
Cafeína	55322,8	0,9509	0,1188	1,188	1,8064
Carbamazepina	87603,3	0,9987	0,0214	0,214	0,78024
Diclofenaco	61666,2	0,9951	0,0315	0,315	1,0103

8. CONCLUSIONES

- Se logró el desarrollo de la técnica cromatográfica (GC-FID) para la determinación de contaminantes emergentes tipo fármacos como cafeína, Carbamazepina, diclofenaco e ibuprofeno con unas muy buenas curvas de calibración
- Las metodologías analíticas utilizadas en este trabajo de grado son sencillas, rápidas y fiables para la determinación de contaminantes emergentes.
- En cuanto a las lecturas que brindó el cromatógrafo de gases con las muestras corridas se notó muy buena señal y detección de los analitos, tanto a la hora de identificarlos como de cuantificarlo
- Se documento la técnica de extracción en fase solida (SPE) para la determinación y cuantificación, pero presentando un porcentaje de recuperación representativo solo para la Carbamazepina de 80.01%
- Se debe disminuir el tiempo de corrida solo si es estrictamente necesario ya que dicha disminución afecta la señal, sensibilidad y los factores estadísticos disminuyendo confiabilidad de los resultados.
- El cromatógrafo de gases con detector FID, arrojó unas curvas de calibración con un R^2 promedio de 0,979325 siendo este un valor muy cercano a 1, lo que indica que la correlación lineal da un alto criterio de confianza.

9. RECOMENDACIONES

- Aunque la SPE solo se pretendía documentar era necesario hacer el procedimiento para llevar la muestra al cromatógrafo por lo tanto se debe de mejorar para próximas investigaciones el acondicionamiento de la fase estacionaria y adsorción del solvente de la técnica de extracción en fase sólida, con el fin de que arroje mejores porcentajes de recuperación para diferentes fármacos y no solo para la Carbamazepina y así poder contribuir a la disminución de la amenaza ambiental y silenciosa que son los contaminantes emergentes.
- Aumentar la atención de investigadores al impacto real de productos farmacéuticos sobre el medio ambiente, intercambiando experiencias y difundiendo resultados de las investigaciones.
- La recopilación bibliográfica realizada muestra la necesidad de mejorar el conocimiento sobre los contaminantes emergentes.

10. BIBLIOGRAFIA

Aguirre, L. *Validación de métodos analíticos*, ed. A.E.F. industria. 2001, España

Arrubla, J. 2012. *Evaluación del grado de contaminación por productos farmacéuticos y de cuidado personal, en el río Otún, Departamento de Risaralda, mediante cromatografía de gases - espectrometría de masas*. Colombia

Barcelo D.; Lopez M. *Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes*. Fundación nueva cultura del agua panel científico-técnico de seguimiento de la política de aguas convenio Universidad de Sevilla-Ministerio de medio ambiente

Barcelo D.; Postigo C. 2014. *Los contaminantes emergentes: Descripción y tratamientos*. iAgua Magazine 4. Instituto Catalán de Investigación del Agua. 29 de octubre de 2014.

Becerril, J. 2012. *Optimización de metodologías analíticas para la determinación de contaminantes emergentes en aguas de abastecimiento y residuales*. Universidad De Santiago De Compostela. Facultad De Química, Departamento De Química Analítica, Nutrición Y Bromatología, Santiago De Compostela, 2012. Tesis Doctoral

Becerril, J. 2009. Revista digital universitaria. 10 de agosto 2009 • volumen 10 número 6 • ISSN: 1067-6079

Bejarano, P. 2006. *Ibuprofeno y analgesia. Especialista en dolor y cuidados paliativos*, Madrid. Emb. España. Volumen 5 enero/febrero 2006

Calle, A. 2011. *Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales*. Departamento de Química Industrial. Universidad Politécnica de Catalunya (UPC). Barcelona, 12 de junio de 2011.

Carlson, J.; Stefan, M.; Parnis, M.; Metcalfe, C. 2015. *Direct UV photolysis of selected pharmaceuticals, personal care products and endocrine disruptors in aqueous solution*. Water Research. Volume 84. November 2015, pages 350-361

Castro, F. 2010. *Técnicas cromatográficas – apuntes de clase. análisis instrumental ii*. Universidad Tecnológica De Pereira.

Coy, G. 1999. Protocolo. Estandarización de métodos analíticos, ed. i.d.e.a.m.p.f ambiental, Bogotá

Cunningham, V. L; Buzby, M.; Hutchinson, T.; Mastroco, F.; Parke, N.; Roden, N. 2006. *Effects of Human Pharmaceuticals on aquatic Life: Next Steps*. Environ Technol. 40, 3456- 3462

Dalterio, A. 2014. Agencia Iberoamericana para la difusión de la ciencia y la tecnología. <http://www.dicyt.com/noticias/bacterias-autoctonas-se-dan-festines-contra-la-contaminacion-ambiental> [citado 21 de julio de 2014].

Daughton, C. 1999. *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change*. *Environmental Health Perspectives*. 107(6):907-938

Filho, A., Santos, F., Pereira, P. 2010. *Development, validation and application of a method bases on di-spme and GC-MS for determination of pesticides of different chemical groups in surface and ground wáter samples*. *Microchemical Journal* 96. pág. 139-145.

García R. 2002. *Cromatografía*. Instituto De Biotecnología, Unam Cromatografía Mexico

Gil, M., et al. 2012. *Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos*. Instituto tecnológico Metropolitano

Grupo de Investigación en Agua y Saneamiento – GIAS. *Taller Especializado Contaminantes Emergentes: Impacto Ambiental y Alternativas de Manejo*. Facultad de Ciencias Ambientales. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira – Colombia. <http://www.aguaysaneamientooutp.info/es/eventos/taller-especializado-contaminantes-emergentes.html> Tomado 25 octubre de 2015

Heberer, T. 2002. *Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water*. En: *Journal of Hydrology*. Vol. 266, No. 3-4. p. 175-189.

Henríquez, D. 2012. *Presencia de contaminantes emergentes en aguas y su impacto en el ecosistema. Estudio de caso: productos farmacéuticos en la cuenca del Rio Biobío, Region Del Biobío, Chile*. Universidad de Santiago de Chile

Hernandez, L.; Gonzalez, C. 2002. *Introducción al análisis instrumental*. Primera edición. ISBN: 84-344-8043-3

Letzel, T.; et al. 2015 . *LC–MS Screening Techniques For Wastewater Analysis And Analytical Data Handling Strategies: Sartans And Their Transformation Products As An Example*. Chemosphere. Volume 137. October 2015, pages 198-206

Lopez, F.; Alamo C. 2006. *Historia de la psicofarmacología. La revolución de la psicofarmacología: sobre el descubrimiento y desarrollo de los psicofármacos*. Tomo 2. Buenos Aires. Madrid..ISBN: 84-7903-458-0

Lopez, J., 2008. *Estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de metilésteres de ácidos*. Universidad Tecnológica de Pereira.

Matamoros, V., García, J., Bayona, J. 2005. *Behavior of selected pharmaceuticals in subsurface flow constructed wetlands: a pilot-scale study*. *environ. sci. technol.* 39, 5449–5454.

Matamoros, V., Bayona, J., 2006. *Elimination of pharmaceuticals and personal care products in subsurface flow constructed wetlands*. *environ. Sci technol.* 40, 5811–5816.

Miller, J. 1993. *Estadística para Química Analítica*. Estados Unidos. ISBN 0-201-60140-0

Molina, J. 2014. *Desarrollo de metodologías analíticas mediante cromatografía/espectrometría de masas para el control de contaminantes orgánicos prioritarios y emergentes en aguas y residuales y superficiales*. Universidad de Jaén. ISBN 978-84-8439-881-3

Morante, S.; Sierra, I.; Del Hierro, I. 2007. *Desarrollo de métodos analíticos para la separación quiral y su aplicación al estudio de procesos de síntesis asimétrica*. Editorial Dykinson, Madrid, España, pag 24-28

Muñoz, A. 2012. *Los medicamentos, una amenaza invisible para el medio ambiente*. Contaminacion. Medio ambiente. Nuestra tierra. <http://nuestra-tierra.laverdad.es/medio-ambiente/contaminacion/2545-los-medicamentosuna-amenaza-invisible-para-el-medio-ambiente> [citado 20 de julio de 2014]

Olguin, P.; Rodriguez, M. 2004. *Cromatografía de gases*. Métodos en biotecnología .Instituto De Biotecnología. Universidad Autónoma De Mexico.

Pal, A., Gin, K.Y. & Reinhard, M. 2010. *Impact of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects*. Sci. Total Environ., 408 (24), 6062-6069.

Parrales, A.; et al. 2012. *Cromatografía del gas natural*. Escuela Superior Politecnica del Litoral. Facultad de Ingeniería en Ciencias de la Tierra. Ecuador.

Peña, A.; Castillo, A. 2015. *Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM)*. TIP. Volume 18. Junio 2015. Pages 29-42.

Petrović, M., González, S. y Barceló, D. 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in water and drinking water. Trends Anal. Chem. 22(10):685-696.

Pintado, M.; Gonzalez, E.; Lara, P. 2014. *Atmospheric pressure gas chromatography–time-of-flight-mass spectrometry (APGC–ToF-MS) for the determination of regulated and emerging contaminants in aqueous samples after stir bar sorptive extraction (SBSE)*. Analytica Chimica Acta. Volume 851. 3 december 2014. Pages 1-13.

Rius, X.; Et al. 2001. *Validación de métodos analíticos*. Universidad Rovira I Virgili. España.

Robles, J. 2014. *Desarrollo De Metodologías Analíticas Mediante Cromatografía/Espectrometría De Masas Para El Control De Contaminantes Orgánicos Prioritarios Y Emergentes En Aguas Residuales Y Superficiales*. Universidad de Jaén. Facultad de ciencias experimentales departamento de Química, Física y Analítica. 29 de mayo de 2014. ISBN: 978-84-8439-881-3

RIUS, X.; et al., *La validación de métodos analíticos*. Revista Técnicas de laboratorio, 2000. 252: p. 382-385.

Rodríguez, F.; Mesquita, P.; Oliveira, L.; Menezes, F.; Pereira, A.; Andrade, J. 2011. *Development of a headspace solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry method for determination of organophosphorus pesticide residue in cow milk*. microchemical journal. 98. pag 56-61

Rubio, M., Vallejo, A. 2014. *Evaluación del grado de contaminación por plaguicidas organofosforados en cultivos de cebolla (Allium fistulosum) en suelo y*

agua de escorrentía en el corregimiento de la florida de la ciudad de pereira-colombia. Universidad Tecnológica de Pereira

Sierra. A., Pérez. Q., Gómez. R., Morante. Z. 2010. *Análisis instrumental.* ISBN 978-84-9475-377-6. pág 5-9

Shirey, R.; Mindrup, R. 1999. *spme – Adsorption vs absorption.selection*

Skoog, D. et al., 2001. *Principios de Análisis Instrumental.* 5° edición. Madrid: M.G. Hill. 2001, España

Skoog, D. et al., 2008. *Principios de analisis Instrumental.* ISBN 13:978-607-481-390-6

Tanoue, R.; Nomiya, K; Nakamura, H.; Hayashi, T.; Kim, J.; Isobe, T.; Shinohara, R.; Tanabe, S. 2014. *Simultaneous determination of polar pharmaceuticals and personal care products in biological organs and tissues.* Journal of chromatography A. Volume 1355. 15 august 2014, pages 193,205

Theodore, W; Leonar S. 1991. *Farmacos efectivos en el tratamiento de la epilepsia.*en: Theodorewr, Alan, S., Palmer T. Las bases farmacológicas de la terapeutica, 8.aed. Mexicodf.: Panamericana. p. 443-5

Valdez, A. 2009. *Evaluacion de la toxicidad producida por diclofenaco sobre Daphnia magna.* Instituto Politécnico Nacional. Secretaria De Investigacion Y Postgrado.Escuela Nacional De Ciencias Biologicas. pag.6-7

Vega, M.; Sosa, F.; Santana, R. 2006. *Sample extraction method combining micellar extraction-spme and hplc for the determination of organochlorine pesticides in agricultural soils.*journal of agricultural and food chemistry. 54. pág. 7747-7752.

Wang, Y.; Zhu, J.; Huang, H. The Key Laboratory of Water and Sediment Sciences, Ministry of Education, School of Environment, Beijing Normal University, No. 19, Xijiekouwai Street, Beijing 100875, China.

Zenteno, M. 2011. *Validación De La Metodología Analítica De Determinación De Etanol Por Cromatografía Gaseosa Con Detector Fid Acoplada A Headspace En El Servicio Médico Legal De Temuco.* Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Escuela de Química y Farmacia. Chile

Zief, M.; Kissler, R. *Solid phase extraction for sample.*j.t.baker manual.pág.7-15.

Zwir-ferenc, A.; Biziuk, M. 2006. Solid phase extraction techniques, opportunities and applications. polish journal of environmental studies. vol 5. no.5.

Tomado 20 de octubre de 2015 15:30 pm <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=URISERV:128180&from=ES>

11. ANEXO

Como anexo a este trabajo de grado se implementó una guía de laboratorio que fue entregada al laboratorio de aguas de la Facultad de Ciencias Ambientales de la Universidad Tecnológica de Pereira con el fin de que pudieran implementar su propia técnica, ya que contaban con un proyecto de investigación acerca de humedales construidos depuradores de contaminantes emergentes y para analizar la cantidad de contaminantes absorbidos por las plantas era necesario realizar ciertos análisis que podían lograr a partir de la presente guía.

Semillero de Cromatografía de gases - Escuela de Tecnología Química – Universidad Tecnológica de Pereira

DESARROLLO DE LA TECNICA DE CROMATOGRAFIA DE GAS CAPILAR FID PARA EL ANALISIS DE CONTAMINANTES EMERGENTES TIPO FARMACEUTICOS EN MATRICES ACUOSAS

CONTENIDO

1. Alcance	2
2. Fichas de seguridad de los reactivos	2
3. Conceptos / Abreviaturas	3
4. Principio	4
5. Reactivos y materiales	8
6. Equipos	8
7. Muestras y muestreo	9
8. Calibración	9
9. Control de calidad	10
10. Procedimiento	10
11. Cálculos	14
12. Bibliografía	14

1. Alcance

Los métodos Extracción en Fase Solida y Cromatografía de gases son usados en esta guía para la separación, determinación y cuantificación de contaminantes emergentes tipo farmacéuticos en matrices acuosas.

2. Fichas de seguridad de reactivos

ACTIVIDAD	Riesgo	Medida de Seguridad	Numero CAS
Manipulación del Ácido Clorhídrico concentrado (HCL)	Corrosivo, toxico	Manipular en cabinas de gases, usar guantes, gafas y careta	Cas: 7647-01-0
Metanol grado HPLC (CH ₃ OH)	Riesgos de fuego y explosión, toxico	Manipular en un lugar bien ventilado y usar guantes, gafas y bata.	CAS: 67-56-1
Hexano grado HPLC (C ₆ H ₁₄)	Riesgos de fuego y explosión, toxico para los organismos acuáticos	Manipular en un lugar bien ventilado y usar guantes, gafas y bata.	CAS: 110-54-3
Acetonitrilogrado HPLC (C ₂ H ₃ N)	Riesgo de fuego, nocivo e irritante	Manipular en un lugar bien ventilado y usar guantes, gafas y bata.	CAS: 75-05-8
Acetato de Etilo grado HPLC (CH ₃ COOCH ₂ CH ₃)	Riesgos de fuego, explosión, toxico y peligroso para el medio ambiente	Manipular en un lugar bien ventilado y usar guantes, gafas y bata.	CAS: 141-78-6

3. Conceptos / Abreviaturas

Fármaco: Un fármaco, de acuerdo con la farmacología, es cualquier sustancia que produce efectos medibles o sensibles en los organismos vivos y que se absorbe, puede transformarse, almacenarse o eliminarse. Esta definición se acota a aquellas sustancias de interés clínico, es decir aquellas usadas para la prevención, diagnóstico, tratamiento, mitigación y cura de enfermedades, y se prefiere el nombre de tóxico para aquellas sustancias no destinadas al uso clínico pero que pueden ser absorbidas accidental o intencionalmente; y droga para aquellas sustancias de uso social que se ocupan para modificar estados del ánimo[1].

SPE (Extracción en fase sólida): Consiste en un dispositivo en forma de reservorio de una jeringa, en el cual se introduce un material adsorbente (fase estacionaria) que cumple la función de atrapar o retener una sustancia que está contenida en un solvente determinado (fase móvil).

GC (Cromatografía de gases): En cromatografía de gases la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil que es un gas inerte, y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna [2].

Fase estacionaria: Consiste en partículas, generalmente sólidas, pequeñas y con una superficie microporosa, de forma que presenta un amplio desarrollo superficial. Puede estar empaquetada en forma de columna o extendida en forma de capa. En ocasiones es necesario un tratamiento químico de la fase estacionaria para conseguir unas partículas de tamaño y poro adecuados.

Fase móvil: Puede ser un líquido o un gas, y su función es transportar a los componentes de la mezcla a través del sistema cromatográfico [3].

4. Principio

4.1. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

La SPE en *fase normal* hace referencia a un sistema en el cual el material adsorbente es más polar que la fase móvil o la solución de la muestra. La SPE en *fase reversa* se refiere a un sistema en el cual el material adsorbente es menos polar que la fase móvil o la solución de la muestra [4]. La extracción en fase sólida se compone de tres modalidades de uso, consistentes en la limpieza o *cleanup*,

concentración del analito y remoción de la matriz. En el *cleanup* busca que el material adsorbente o fase estacionaria retenga el analito, mientras que el solvente o fase móvil arrastra las impurezas [5]. La concentración del analito se da cuando éste está retenido en el material adsorbente y es eluido por un volumen de solvente inferior al que inicialmente lo contenía previo atrapamiento, lo que resultará en un extracto “enriquecido” con el analito. En la remoción de la matriz, la fase estacionaria cumple un papel inverso al del *cleanup*, donde las impurezas son retenidas mientras que el solvente arrastra el analito a través de la fase estacionaria. El correcto desarrollo de la SPE depende fundamentalmente de un profundo conocimiento de las características químicas del analito tales como su índice de polaridad, peso molecular, estructura química, grupo funcional y otras como la solubilidad en solventes comunes en la técnica [5].



Fig. 1. Diagrama de proceso de extracción en fase sólida, SPE.

Como se indica en la anterior figura, el primer paso consiste en un acondicionamiento del material adsorbente con una sustancia apropiada que solventa los grupos funcionales de dicho material. Luego, la solución que contiene el fármaco en este caso. La columna contiene ahora los analitos e impurezas, los cuales se lavan con un solvente apropiado que eluye las impurezas, y preserva en analito en la columna.

4.2. Cromatografía de gases

Dentro de la cromatografía de gases se presentan fundamentalmente interacciones gas-sólido y gas-líquido y este recibe su nombre particular por el uso de un gas como medio de arrastre (fase móvil). Aunque ambas comparten un fundamento general, difieren en la naturaleza de la fase estacionaria, pues en la primera es un material sólido, mientras que en la segunda se trata de un líquido. Ambas operan de tal manera que los componentes de una muestra vaporizada

son separados como consecuencia del reparto entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria contenida en una columna. La muestra es vaporizada e inmediatamente sembrada en la columna, mediante un dispositivo de inyección. Una vez sembrada en la columna, es eluída a causa del flujo de un gas inerte, que desempeña el rol de fase móvil.

A diferencia de la mayoría de las técnicas de separación cromatográfica, la fase móvil en la cromatografía de gases no interactúa con los componentes de la muestra, toda vez que su única función es transportar los componentes de la misma a través de la columna. La cromatografía gas-sólido se fundamenta en una fase estacionaria sólida en la cual los analitos son retenidos gracias al fenómeno de la *adsorción*, y su aplicación es limitada a separar compuestos de bajo peso molecular. Los materiales finamente divididos como carbón activado, alúmina activa o sílica-gel microporosos con una gran área superficial activa (superficie de contacto) son fuertes adsorbentes, motivo por el cual son muy empleados como fases estacionarias en la cromatografía gas-sólido. Esto se debe al fenómeno de *adsorción preferente*, que ocurre cuando las moléculas de dos o más sustancias están presentes en un material adsorbente y las moléculas de una de esas sustancias pueden ser retenidas más fácilmente que las de las otras. Estos materiales también suelen ser empleados como soportes de la fase estacionaria líquida, en la cromatografía gas-líquido [6].

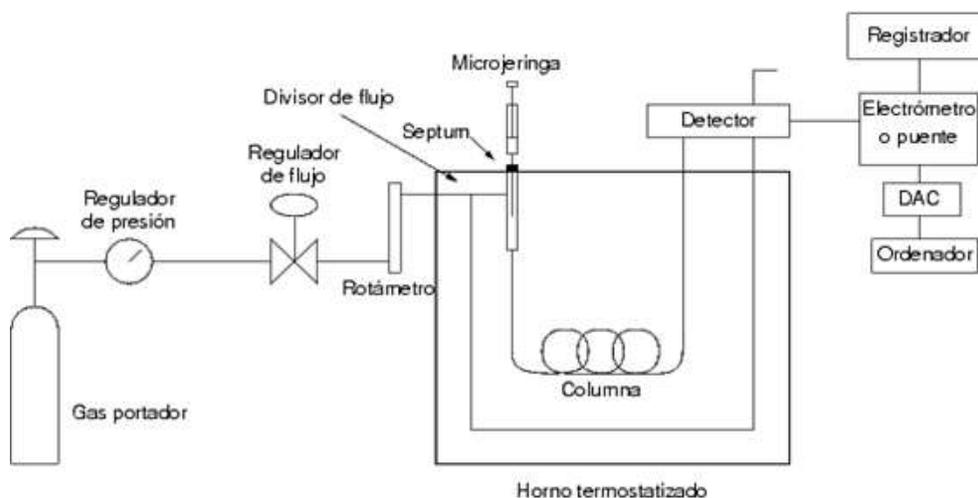


Fig. 2. Representación esquemática de un cromatógrafo de gases.

4.3. 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 y 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 (Barceló, 2003).

El alto potencial en la proliferación continua de fármacos y productos de uso personal, medicamentos veterinarios, y de otros productos químicos antropogénicos, plantea desafíos substanciales y quizá insuperables para su regulación y control, desde el punto de vista de su evolución y del diseño de sistemas viables para su aplicación. Por otra parte, la investigación y el desarrollo de drogas y compuestos bioactivos evoluciona rápidamente y, en muchos casos, los mecanismos de acción son nuevos para los sistemas biológicos, por lo que las consecuencias en el ambiente son inciertas.

Por estos motivos la información disponible sobre los impactos potenciales de muchas de esas sustancias es limitada, aunque hay evidencias de que algunas de ellas causan efectos adversos en la salud humana y el ambiente.

Actualmente existe un interés creciente por las repercusiones que tendrán los compuestos orgánicos de origen antropogénico en el ambiente. El agua es una fuente importante de estos compuestos para los seres vivos. La regulación de estos contaminantes es escasa, debido al desconocimiento de sus efectos, además de que no se tiene un inventario de “todas” las especies químicas presentes en una muestra ambiental, por limitaciones analíticas [7].

Entre los fármacos más prescritos en medicina humana destacan los analgésicos/antiinflamatorios como el ibuprofeno y el diclofenaco, los antiepilépticos como la carbamacepina, antibióticos como la amoxicilina y el sulfametoxazol, y los ∞ -bloqueantes como el metoprolol. A estos cabe añadir los, cada vez más, utilizados en veterinaria, en actividades como la acuicultura, la ganadería, y la avicultura. Según las propiedades físico-químicas de los fármacos

y sus metabolitos y productos de degradación, y las características de los suelos, estas sustancias pueden llegar a alcanzar las aguas subterráneas y contaminar los acuíferos o bien quedar retenidas en el suelo y acumularse pudiendo afectar al ecosistema y a los humanos a través de la cadena trófica. En consecuencia, para una evaluación realista del medio acuático es necesario un estudio integrado agua subterránea-suelo/sedimento-agua superficial suelo.

Como resultado de las investigaciones llevadas a cabo hasta ahora, algunos fármacos están siendo considerados por la US EPA como posibles candidatos a ser incluidos en la lista de los contaminantes orgánicos prioritarios en el agua potable, como es el caso del diclofenaco (antirreumático), la carbamacepina (antiepileptico), y el cloranfenicol (antibiótico). En la UE, por el momento, no se han fijado límites máximos en el agua potable, y por tanto, no es necesario el seguimiento de tales compuestos, sin embargo, lo más probable es que en un futuro próximo sean regulados [8].

5. Reactivos y materiales

Agua destilada	Probeta de 1000 mL
Ácido clorhídrico concentrado	Beacker de 500 mL
Hexano grado HPLC	Beacker de 100 mL
Acetato de etilo grado HPLC	Beackerde 200 mL
Acetonitrilo grado HPLC	Pipetas aforadas de 2 mL
Metanol grado HPLC	Pipetas aforadas de 5 mL
Papel filtro cualitativo	Pipetas aforadas de 10 mL
Papel indicador de pH	Vidrio de reloj
Par de guantes	Varilla agitadora
Frascos ámbar de 1 L para el muestreo	Embudo de vidrio pequeño
Probeta de 200 mL	Cartucho de ENVICARB para la SPE

6. Equipos

Estufa	Bomba al vacío
--------	----------------

Colector de SPE al vacío de doce puestos

Equipó para filtración al vacío

Cabina para gases

Pinzas para soporte universal

Soporte universal

7. Muestras y muestreo

7.1. Contaminación de humedales construidos

Se Contaminaron 13 humedales construidos cada uno de 8 litros de los cuales se encontraban 4 plantas diferentes y de cada una se tenía 3 individuos de la misma especie y un blanco sin planta, la contaminación se realizó con 4 fármacos (ibuprofeno, cafeína, Carbamazepina y Diclofenaco) con una concentración de 40 ppm.

7.2. Toma de muestreo

Se introdujo una varilla agitadora para homogenizar el humedal construido, se extrajo con un beacker de 1000 mL, se midió el volumen con una probeta de 1000 mL, luego se trasvaso con ayuda de un embudo de vidrio en un frasco ámbar para luego ser almacenado en la nevera.

7.3. Preparación de la muestra

Los frascos se transportaron rápidamente al laboratorio para ser refrigeradas y analizadas en un plazo inferior a 7 días después de su recolección. Los extractos deben ser refrigerados a 4°C para su posterior análisis por cromatografía de gases en un plazo no superior a 40 días después de la extracción, para garantizar que no haya ningún tipo de cambio de los analitos contaminados en los humedales construidos.

8. Calibración

Para estimar la concentración de los analitos en la muestra de manera confiable se prepararon unas curvas de calibración según sus concentraciones que van desde 5 ppm a 53,3 ppm

Estas curvas se realizaron para calcular la concentración en la cual se recuperó los contaminantes en la muestra y comprobar el método empleado para su extracción.

8.1. Blanco

El blanco o control se preparó en un humedal de 8 litros de agua potable, se contaminó con 40 ppm de los contaminantes tipo fármacos con el fin de observar el porcentaje de remoción de las plantas sembradas en estos humedales.

Este fue tratado con el mismo método, en las mismas condiciones y con las mismas curvas de calibración.

9. Control de calidad

Se garantizó el buen almacenamiento de las muestras después de su muestreo.

Se realizaron las curvas de calibración con estándares certificados por Sigma Aldrich, que garantiza la concentración y pureza de estos reactivos.

10. Procedimiento

10.1. Tratamiento de la muestra

Se tomó una muestra de 200 mL del frasco ámbar, se filtró al vacío para eliminar partículas en suspensión y se acidificó la muestra de agua con HCL concentrado a pH 2.

10.2. Método de extracción en fase sólida

La muestra acidificada se percola a través de una extracción en fase sólida con el cartucho ENVICARB.

Se acondicionó el cartucho con 10 mL hexano/acetato de etilo (1:1), a una velocidad de 10 mL/min.

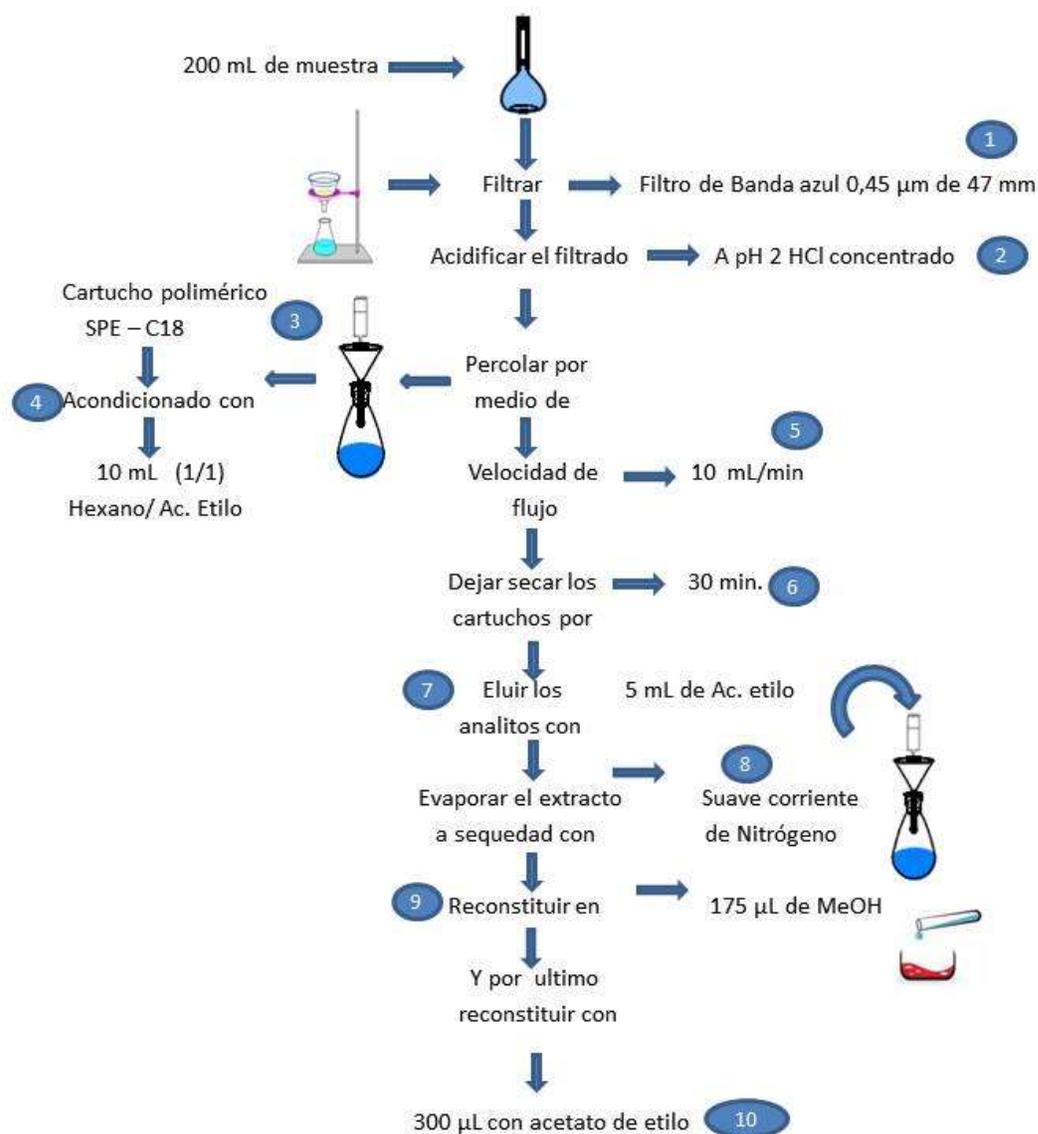


Fig. 3. Diagrama de flujo. Método SPE para extracción de contaminantes emergentes tipo farmacéuticos y clean up.

10.3. Método cromatografía de gases

Se utilizó el equipo de cromatografía de gases de marca Shimadzu GC 2014 con helio como gas portador (99,9995% de pureza) a una velocidad lineal promedio constante de $40 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$. El horno mantuvo una temperatura de 50°C durante 2 min luego aumenta la temperatura de a $15^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta llegar a 120°C . Luego se sigue la misma metodología de calentamiento de: $4^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 160°C , $7^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 220°C , $5^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 290°C y $10^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 300°C manteniendo esta temperatura por 5 minutos más.

Un volumen de 1 μL de muestra se inyecta en el modo splitless a una temperatura del inyector de 260 ° C con una purga del inyector de tiempo de activación de 1 minuto

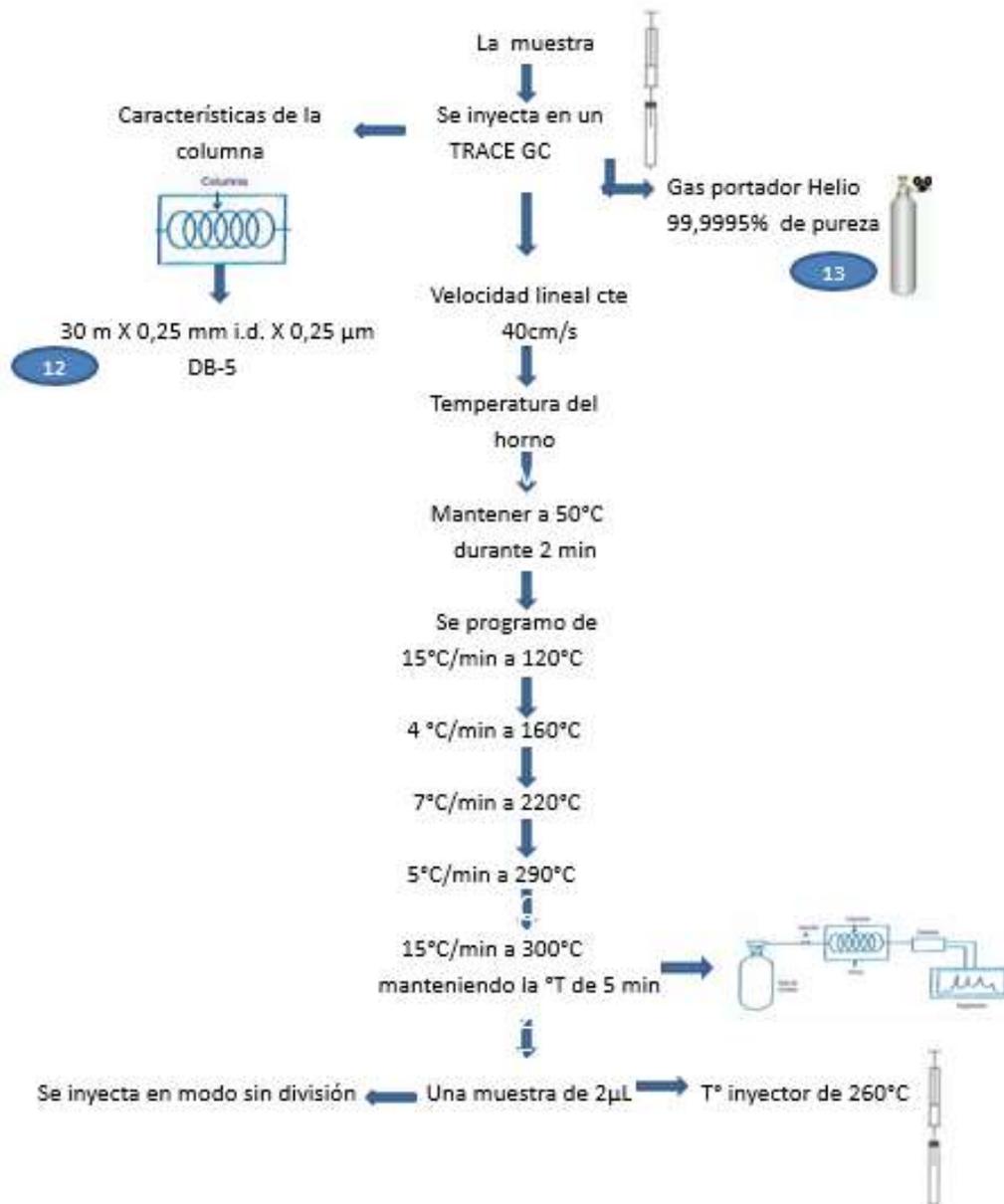


Fig. 4. Diagrama de flujo. Cromatografía de gases

11. Cálculos

Porcentaje de recuperación

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{[]_{\text{final}}}{[]_{\text{inicial}}} \times 100 =$$

- [] Final: concentración final hallada después de la extracción
- [] Inicial: concentración inicial cuando se contaminaron los humedales construidos.

Porcentaje de remoción

$$\% \text{ Remoción} = \frac{[]_{\text{inicial}} - []_{\text{final}}}{[]_{\text{inicial}}} \times 100 =$$

- [] Final: concentración final hallada después de la extracción
- [] Inicial: concentración inicial cuando se contaminaron los humedales construidos.

12. Bibliografía

[1]. <http://farmacologia.bligoo.com.mx/definicion-de-farmaco#.U7LmjZR5OSo>

[2]. <http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/cromatografa-de-gases>

[3]. <http://www.textoscientificos.com/quimica/cromatografia/parametros>

[4]. ZIEF, M.; KISSER, R. Solid phase extraction for sample. J.T. Baker Manual. Pág. 7-15.

[5]. VEGA, M. D.; SOSA, F. Z.; SANTANA, R. J. 2006. Sample extraction method combining micellar extraction-SPME and HPLC for the determination of organochlorine pesticides in agricultural soils. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54. Pág. 7747-7752.

[6]. CASTRO E, F. 2010. Técnicas cromatografías – Apuntes de clase. Análisis Instrumental II. Universidad Tecnológica de Pereira.

[7]. Revista Digital Universitaria. 10 de agosto 2009 • Volumen 10 Número 6 • ISSN: 1067-6079

[8].Fundación Nueva Cultura del Agua. PANEL CIENTÍFICO-TÉCNICO DE SEGUIMIENTO DE LA POLÍTICA DE AGUAS. Convenio Universidad de Sevilla-Ministerio de Medio Ambiente. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. L Damià Barceló* y María José López de Alda Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC (Barcelona)