



# Optimización de un método analítico para la determinación de Contaminantes Emergentes en matrices acuosas

Tesis para optar por el Título de Licenciada en Saneamiento y  
Protección Ambiental

**Año 2019 | LUCIANA ZEBALLOS RODRIGUEZ**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE  
FACULTAD DE CIENCIAS DEL AMBIENTE Y LA SALUD  
LICENCIATURA EN SANEAMIENTO Y PROTECCIÓN AMBIENTAL



**Nombre de la alumna:** Luciana Zeballos Rodriguez

**Legajo:** 129.454

**Directora:** Lorena Latini

**Co-directora:** María Belén Aguiar

**Fecha de aprobación del plan de tesis:** 25 de marzo de 2019

**Fecha de finalización de la tesis:** 14 Noviembre de 2019

## Agradecimientos

Quiero agradecer, en primer lugar, a mi Directora de Tesis la Lic. Lorena Latini y a mi codirectora la Mg. María Belén Aguiar por acompañarme durante todo el proceso de elaboración de esta tesis y por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias con generosidad, comprensión y motivación.

También quiero agradecer a mi familia y amigos que me brindan su apoyo incondicional en todo momento, tanto en los malos como en los buenos. Igualmente, a mis compañeros quienes hicieron de mi etapa universitaria una etapa única e inolvidable.

Por último, no puedo dejar de agradecer a los profesionales que trabajan en el laboratorio de Cromatografía del Centro de Investigaciones en Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue (CITAAC), que siempre estuvieron dispuestos a darme una mano y ayudarme en todo lo que estaba a su alcance.

A todos ellos, les dedico mi trabajo y les agradezco por siempre.

# Contenido

Agradecimientos .....	ii
Resumen .....	1
Abstract.....	2
1. Introducción .....	4
2. Definición de los objetivos .....	6
2.1. Objetivo General .....	6
2.2. Objetivos Específicos .....	6
3. Marco teórico y Antecedentes .....	8
3.1. Contaminantes emergentes .....	8
3.2. Extracción en fase sólida .....	9
3.3. Análisis por HPLC UV-vis.....	12
3.4. Antecedentes .....	15
4. Materiales y métodos.....	19
4.1. Reactivos y solventes.....	19
4.2. Preparación de soluciones de trabajo .....	19
4.2.1. Soluciones madres.....	19
4.2.2. Solución intermedia.....	20
4.2.3. Soluciones para curva de calibración y fortificación .....	20
4.2.4. Soluciones de materia orgánica soluble .....	20
4.2.5. Muestras analíticas utilizadas en la SPE de CE .....	20
4.2.6. Muestras analíticas para la evaluación del efecto de MOS.....	20
4.3. Extracción en fase sólida (SPE) .....	21
4.3.1. Selección de las condiciones para SPE .....	21
4.3.2. Etapas de la SPE.....	21
4.4. Comparación de la eficacia de extracción de dos adsorbentes .....	22
4.5. Evaluación de la influencia del pH del agua en la SPE de CE .....	22
4.6. Efecto de la materia orgánica soluble en la extracción de CE.....	22
4.7. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	22
4.8. Análisis estadístico .....	23
5. Resultados y discusión.....	25
5.1. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	25
5.1.1. Análisis cromatográfico en soluciones estándares de CE .....	25
5.1.2. Análisis cromatográfico en soluciones con MOS .....	26
5.2. Comparación de la eficacia de extracción de dos adsorbentes .....	27
5.3. Evaluación de la influencia del pH del agua en la SPE de CE.....	28

5.4.	Efecto de la materia orgánica soluble en la extracción de CE.....	31
6.	Conclusiones .....	34
6.1.	Recomendaciones .....	35
7.	Bibliografía utilizada .....	37
8.	Anexos.....	42
8.1.	Análisis estadístico .....	42
8.1.1.	Análisis de adsorbente.....	42
8.1.2.	Análisis del pH de la muestra.....	46

## Resumen

Los contaminantes emergentes (CE) son compuestos de distinto origen y naturaleza química cuya presencia en el ambiente se debe mayoritariamente a los vertidos de efluentes urbanos. Particularmente, los principios activos farmacéuticos están recibiendo considerable atención de la comunidad científica, siendo necesario el desarrollo de metodologías analíticas que permitan su identificación y cuantificación. El objetivo del presente trabajo fue optimizar un procedimiento analítico de extracción en fase sólida (SPE) para la determinación simultánea de cuatro CE: paracetamol (PAR), cafeína (CF), diclofenac (DIC) e ibuprofeno (IBU) en matrices acuosas de diferentes propiedades fisicoquímicas.

Se utilizó la técnica SPE y se ensayaron diferentes métodos (denominados M1, M2 y M3), en los que se variaron las condiciones de acondicionamiento, elución y adsorbentes. Con el objetivo de comparar la eficiencia de extracción del adsorbente Oasis HLB® con Strata X®, se realizaron SPE en muestras analíticas preparadas con agua ultrapura y fortificadas con 15 mg/L de CE, utilizando M1 y M2 para cada adsorbente. Para evaluar la influencia del pH de la matriz, se realizó SPE para cada uno de los métodos estudiados, utilizando Strata X® como adsorbente, a tres condiciones de pH (3, 7 y 10). Para estudiar el efecto de la presencia de materia orgánica soluble (MOS), se realizó extracción según M3 a muestras analíticas de soluciones a distintas concentraciones de MOS (5, 10 y 20 mg/L) a pH 10 y fortificadas con CE.

Los resultados de la comparación de los adsorbentes Oasis HLB® y Strata X® muestran que ambos adsorbentes proveen resultados que no presentan diferencias estadísticamente significativas, excepto para el PAR. Por este motivo, se decide trabajar con el adsorbente Strata X® dado que es el más económico y se encuentra disponible en el Laboratorio de Cromatografía, ya que se utiliza en otras determinaciones. Los resultados del estudio del efecto del pH del agua, sólo presentan diferencias en los porcentajes de recuperación (%R) para el M3; sin embargo, CF, DIC e IBU, extraídos por este método, muestran los mayores valores de %R. En la evaluación del efecto de la presencia de MOS se evidencia que no hay diferencia significativa ( $p < 0,05$ ), respecto del blanco para la CF, DIC e IBU.

El método 3 propuesto es recomendado como un buen método de extracción de CF, DIC e IBU de matrices acuosas; siendo un método robusto y sencillo aplicable en un amplio rango de pH y en presencia de MOS. Sin embargo, dada los bajos porcentajes de recuperación obtenidos para el PAR, se recomienda evaluar otras condiciones para la extracción de este compuesto.

**Palabras claves:** contaminantes emergentes, extracción en fase sólida, matrices acuosas.

## Abstract

Emerging contaminants (EC) are compounds of different origin and chemical nature. The presence of these pollutants in the environment is mainly due to urban effluent discharges. Especially, the active pharmaceutical ingredients are receiving considerable attention from the scientific community, being necessary to develop analytical methodologies that allow their identification and quantification. The objective of the present work was to optimize an analytical procedure of Solid Phase Extraction (SPE) for the simultaneous determination of four EC: paracetamol (PAR), caffeine (CF), diclofenac (DIC) and ibuprofen (IBU) in aqueous matrices of different physicochemical properties.

For the SPE technique, different methods (which called M1, M2 and M3) were tested, in which different conditions of elution, conditioning and different adsorbents were chosen. To compare the extraction efficiency of the Oasis HLB<sup>®</sup> adsorbent with Strata X<sup>®</sup>, SPE were performed in analytical samples prepared with ultrapure water and fortified with 15 mg/L of EC, using M1 and M2 for each adsorbent. To evaluate the influence of the matrix's pH, SPE was performed for each of the methods studied, using Strata X<sup>®</sup> as adsorbent, at three different pH conditions (3, 7 and 10). To study the effect of the presence of soluble organic matter (SOM), extractions of analytical samples at different concentrations of SOM (5, 10 y 20 mg/L) at pH 10 and fortified with EC, where performed according to M3.

The results of the comparison of the Oasis HLB<sup>®</sup> and Strata X<sup>®</sup> adsorbents show that both adsorbents provide results that do not show statistically significant differences, except PAR. For this reason, it is decided to work with the adsorbent Strata X<sup>®</sup> since it is the most economical. The results of the study of the effect of the pH's water, only present differences in the %R for the M3. However, CF, DIC and IBU extracted by this method show the highest values in %R. The evaluation of the effect of the presence of MOS shows that there is no significant difference ( $p < 0.05$ ), concerning the target for CF, DIC and IBU.

Method 3 resulted an appropriate method to the extraction of CF, DIC and IBU from aqueous matrices; being a robust and simple method applicable in a wide range of pH and in presence of SOM. However, because of the low recovery percentages obtained for the PAR, it is recommended to evaluate other conditions for the extraction of this compound.

**Key Word:** Emerging contaminants, solid-phase extraction, aqueous matrices.

# Introducción



# 1. Introducción

Se entiende como contaminación, a la introducción en el ambiente de sustancias ajenas o no al mismo, en tales cantidades que resultan perjudiciales para el ser humano y la biota; siendo uno de los problemas más importantes que nos aquejan hoy en día (Arbeláez Salazar, 2016). Actualmente, la mayor fuente de contaminación de los cuerpos de agua tiene su origen en el vertido de efluentes urbanos e industriales sin tratar o mal tratados sobre los mismos, que contienen un amplio rango de distintos contaminantes antropogénicos, entre los que se encuentran los contaminantes emergentes (Pérez-Parada y col., 2012).

Se entiende como contaminante emergente (CE) o contaminante de preocupación emergente, a todo contaminante cuya presencia en el ambiente, y los posibles daños que podrían ocasionar, han pasado en gran parte inadvertidos a pesar de que su presencia en el medio no es nueva. Es aproximadamente a partir del año 2000 donde aparece el interés científico de conocer las posibles consecuencias sobre la salud humana y de la biota acuática (Reinoso Carrasco y col., 2017). Estos contaminantes hace poco son reconocidos como tales, gracias al desarrollo de nuevas y más sensibles técnicas analíticas.

En el agua, los CE que suelen prevalecer son fármacos, compuestos perfluorados, hormonas, drogas de abuso, productos de cuidado e higiene personal y nanomateriales. La agricultura y ganadería constituyen una fuente de contaminación difusa de plaguicidas y antibióticos (Talib y Randhir, 2016). Sin embargo, la principal fuente de contaminación por CE de los cuerpos de agua es la descarga de efluentes urbanos e industriales (Caban y col., 2014).

Actualmente, existen tecnologías para la remoción de estos contaminantes de las aguas residuales, denominadas tratamientos cuaternarios, como puede ser la tecnología de ósmosis inversa, la microfiltración o los procesos de oxidación avanzada. Sin embargo, la aplicación de este tipo de tecnologías supone un alto costo en el tratamiento del agua que aún pocos países están dispuestos a asumir y son escasos los que tienen legislación al respecto (García Gómez y col., 2011). En nuestro país, estas tecnologías no se aplican ni se han legislado, por lo que estos contaminantes, de estar presentes, llegarían sin ningún tipo de tratamiento a los cuerpos de agua, muchos de los cuales son utilizados para el abastecimiento de agua potable.

En el caso particular de la ciudad de Neuquén, el rápido crecimiento poblacional, producto de la explotación de yacimientos de petróleo y gas con técnicas no convencionales, trae aparejado el desafío de contar con servicios públicos para un número cada vez mayor de habitantes. Las plantas de tratamiento de aguas residuales, tanto domiciliarias como industriales, poseen una capacidad instalada que no resulta suficiente y, por lo tanto, se hace

necesaria su ampliación y adecuación a la nueva realidad regional. Esta situación es, al mismo tiempo, una oportunidad para incorporar herramientas analíticas que permitan la detección de CE y desarrollar métodos de tratamiento o atenuación de los mismos.

Los contaminantes orgánicos se encuentran en bajas concentraciones en las distintas matrices ambientales, por lo que se requiere el desarrollo de métodos de alta sensibilidad y que puedan diferenciar compuestos de estructuras químicas similares. Las etapas de extracción de analitos de la matriz, reducción de las interferencias (clean-up) y preconcentración, son críticas para la obtención de buenos resultados (Arbeláez Salazar, 2016). Los métodos de extracción tradicionales, como la extracción Líquido-Líquido (LLE) para muestras de agua y la extracción Soxhlet para muestras de suelo y sedimentos, producen excelentes resultados, pero tienen como desventaja el alto consumo de solventes orgánicos, tiempos de procesamiento largos y la generación de un gran volumen de residuos.

En los últimos años se han desarrollado métodos alternativos que buscan lograr la reducción del volumen de muestra y de solventes utilizados. Los métodos de extracción para CE son extracción en fase sólida (SPE) o extracción asistida por ultrasonido.

El presente Trabajo Final de Carrera tiene como objetivo, optimizar un método de extracción en fase sólida para la determinación de cuatro CE: paracetamol (PAR), cafeína (CF), diclofenac (DIC) e ibuprofeno (IBU) en muestras acuosas. Dicha extracción deberá permitir la preconcentración de estos contaminantes presentes en las muestras, proporcionando la selectividad y sensibilidad necesaria para llevar a cabo su determinación.

## 2. Definición de los objetivos

### 2.1. Objetivo General

- Optimizar un método de extracción en fase sólida para la determinación de contaminantes emergentes en matrices acuosas.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Establecer las condiciones óptimas para la extracción en fase sólida de paracetamol, cafeína, diclofenac e ibuprofeno en agua.
- Comparar la eficacia de dos adsorbentes distintos en la extracción en fase sólida de los contaminantes emergentes.
- Estudiar la influencia del pH del agua en la extracción en fase sólida de los contaminantes emergentes.
- Estudiar el efecto de la materia orgánica soluble en la extracción de los CE de soluciones acuosas.

# Marco teórico y Antecedentes

### 3. Marco teórico y Antecedentes

#### 3.1. Contaminantes emergentes

La denominación CE comprende un gran número de compuestos sintéticos o derivados de productos naturales que se utilizan ampliamente en la industria química, farmacéutica, cosmética, en la agricultura y en la ganadería, entre otras actividades (Talib y Randhir, 2016). Los mismos han sido detectados en todas las matrices ambientales. Dada la gran diversidad de sustancias, se los ha agrupado por su uso, donde se destacan:

- ✓ **Productos de Cuidado Personal (PCPs)** como fragancias, jabones, lociones y protectores solares.
- ✓ **Productos Farmacéuticos (PFs)** de uso en humanos y de uso veterinario. Los ingredientes activos de los fármacos que no se metabolizan completamente llegan a las plantas de tratamiento.
- ✓ **Retardantes de llama (RLs)** que se usan como aditivos en la industria de los polímeros para la fabricación de textiles, plásticos, circuitos electrónicos y mobiliario para prevenir la propagación del fuego. Los FRs bromados han sido prohibidos, pero se continúan utilizando compuestos clorados, ésteres sulfato y fosfato.
- ✓ **Nanopartículas (NPs)**, materiales de dimensiones entre 1-100 nm. Se han desarrollado numerosas aplicaciones de los nanomateriales en los últimos años y, entre ellas, una de las más interesantes es que pueden contribuir a la descontaminación de aguas, sin embargo, no se dispone de suficientes datos respecto de su presencia, distribución y efectos adversos en el ambiente.

Las propiedades fisicoquímicas de la mayoría de los CE dificultan su remoción por métodos convencionales de tratamiento de aguas y es por ello que se los puede detectar en aguas para consumo humano. Aunque los niveles de detección son bajos (ng/L o µg/L) los compuestos de origen o sus metabolitos son biológicamente activos y pueden bioacumularse en organismos acuáticos (Glassmeyer y col., 2017), dado que ellos están expuestos a bajas concentraciones a lo largo de todo su ciclo de vida (Fent y col., 2006). Algunos de estos compuestos son resistentes a degradación fotoquímica, biológica y/o química, lo que justifica su persistencia en el ambiente (García Delgado, 2015).

Entre los productos farmacéuticos (>3.000) los analgésicos, los antiinflamatorios no esteroideos y las hormonas constituyen los más difundidos y su presencia ha sido reportada en distintas regiones del mundo. Sin embargo, los niveles de detección presentan variaciones entre países y entre regiones de un mismo país (Jennifer Ebele y col., 2017). Este hecho

podrías explicarse por las cantidades que se prescriben de los distintos fármacos, la venta sin receta, los hábitos de consumo y la capacidad de remoción de los métodos de tratamiento de aguas residuales.

Particularmente en la Argentina, según la Confederación Farmacéutica Argentina (CoFA, 2017), entre los diez medicamentos más vendidos en el país, se encuentran la aspirina, paracetamol, clonazepam, ibuprofeno, levotiroxina, diclofenac, entre otros; logrando uno de los mayores índices de consumo de la región, superando a Chile, Uruguay y Brasil. Sumado a esto, varios medicamentos tienen entre sus componentes cafeína, la cual actúa como agente potenciador del efecto analgésico (Tavares y Sakata, 2012). A continuación, se presentan las estructuras químicas de cuatro CE:

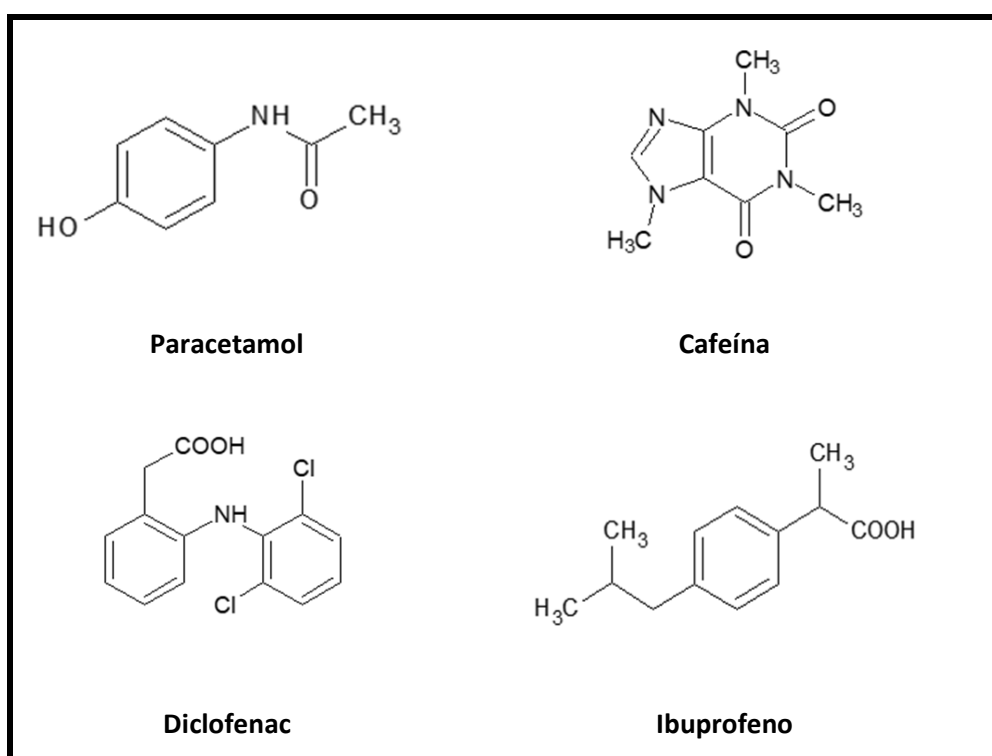


Imagen 1: estructura química de los CE.

### 3.2. Extracción en fase sólida

Para lograr la sensibilidad y selectividad que los métodos analíticos requieren, se debe realizar un acondicionamiento previo de las muestras analíticas a través de alguna técnica de extracción, tal como LLE, SPE, microextracción en fase sólida (SPME) o extracción con fluidos supercríticos (SFE). Estos métodos de acondicionamiento separan los analitos de la matriz, eliminando posibles interferencias y concentrando la muestra analítica.

En particular, la SPE se basa en la partición selectiva o distribución de uno o más compuestos entre dos fases. La partición selectiva se realiza en un sólido adsorbente y los analitos podrán ser recuperados empleando un solvente adecuado para su elución (Skoog y col., 2008). El fenómeno de partición se realiza en un líquido, pero también puede ser una emulsión, un gas o un fluido supercrítico.

El adsorbente de extracción utilizado puede estar contenido en un disco, jeringa o cartucho. La selección del adsorbente es un factor muy importante, que dependerá del analito y de sus grupos funcionales, del tipo de muestra y de cómo interacciona ésta con el adsorbente. La capacidad de retención de solutos dentro de una columna SPE depende del tipo de material de relleno, tamaño de la columna, tipo de analito y condiciones de extracción. (Valls Puig, 2004).

La SPE puede clasificarse, de acuerdo a las características del adsorbente, como:

- **Fase reversa**: la fase estacionaria o adsorbente es no polar. Suele contener grupos metilo, octilo (C8) u octadecilo (C18), unidas a una superficie de sílica, que permite adsorber los analitos no polares para su extracción de matrices líquidas polares como el agua. En este caso, las interacciones entre la fase sólida y el analito son de tipo hidrofóbicas. (Valls Puig, 2004). Según Raynie y Majors (2016) esta es la técnica mayormente empleada actualmente.

- **Fase normal**: la fase estacionaria es una sílica polar sin modificación, o unida a grupos ciano, amino o diol, que permite extraer analitos polares de matrices líquidas no polares o poco polares como acetona, hexano, solventes clorados, etc. En este caso, los analitos polares son retenidos en la fase sólida a partir de interacciones hidrofílicas (Valls Puig, 2004).

- **Intercambio iónico**: los rellenos de intercambio iónico están constituidos por grupos funcionales catiónicos o aniónicos; y estos se utilizan para extraer compuestos que se encuentran cargados electroestáticamente o cuya carga puede ser inducida, por ejemplo, mediante modificación del pH de la matriz. Las interacciones entre la fase sólida y el analito son electroestáticas (Valls Puig, 2004).

Dos cartuchos muy utilizados en la SPE que se comercializan son el Strata X® y el Oasis HLB®.

→ **Strata X®**: es un adsorbente de sílice que se utiliza tanto para analitos polares como no polares, que contienen cadenas de carbono. El mismo tiene una superficie específica de 800 m<sup>2</sup>/g y una carga de carbono del 18%. Es estable para un rango de pH de 1-14 (Phenomenex, 2019). Su estructura química es:

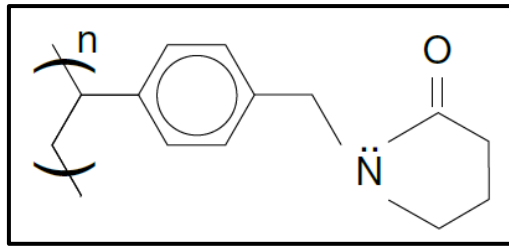


Imagen 2: estructura química del adsorbente Strata X<sup>®</sup>. Fuente: Phenomenex (2019).

→ **Oasis HLB<sup>®</sup>**: es un polímero multiuso, humectable con agua. Es un adsorbente de fase reversa para analitos neutros, básicos y ácidos; se puede trabajar en un rango de pH de 0-14 (Waters, 2019). Su estructura química es:

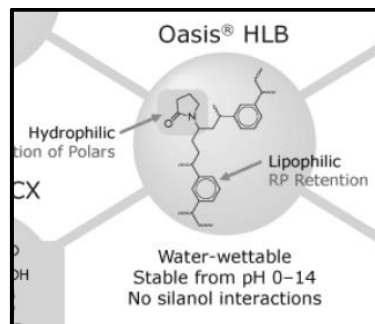


Imagen 3: estructura química del adsorbente Oasis HLB<sup>®</sup>. Fuente: Waters (2019).

Los métodos SPE presentan un gran número de ventajas frente a otras técnicas de extracción. Se trata de una técnica que utiliza una instrumentación económica, sencilla y con un consumo de solventes relativamente bajo comparado con los métodos habituales como LLE. Se puede automatizar el proceso e incluso acoplarlo a sistemas cromatográficos. Además, se puede usar en una combinación con otros sistemas de extracción.

La metodología para llevar a cabo la extracción consta de varias etapas que se describen a continuación:

1. **Etapas de acondicionamiento del adsorbente:** consiste en hacer circular a través del cartucho, un solvente o mezcla de solventes, para facilitar la posterior transferencia de los analitos desde la fase acuosa al adsorbente, logrando al mismo tiempo eliminar las impurezas que pueden estar retenidas en él.
2. **Pasaje de la muestra:** en esta etapa, se hace pasar la muestra líquida a través del adsorbente para lograr que los analitos queden retenidos en él. La muestra fluye por gravedad, presión positiva o vacío, a una velocidad de flujo controlada, que permita la completa retención de los analitos.



3. **Etapa de lavado:** se pueden usar solventes o mezcla de solventes de diferente tipo para mejorar la eficacia del lavado y su objetivo es la eliminación de compuestos que puedan interferir en la etapa siguiente, manteniendo los analitos en el lecho de adsorbente.
4. **Etapa de elución de los analitos:** se hace circular un solvente apropiado para remover los analitos del adsorbente. La elución de los analitos puede llevarse a cabo por gravedad o con ayuda de una fuente de vacío, mediante presión o por centrifugación. La velocidad de flujo debe ser adecuada para permitir que se alcance el equilibrio entre el analito y el solvente para que la extracción sea efectiva.
5. **Etapa de concentración:** el extracto obtenido en la etapa anterior, se evapora a sequedad y se redisuelve en un solvente compatible con la técnica analítica que se utilice para la cuantificación de los analitos extraídos.

Las concentraciones de CE en las muestras medioambientales son, habitualmente, bajas. Esto, unido a la complejidad de ese tipo de matrices, requiere algún tratamiento previo de la muestra que suele implicar la extracción de los CE de interés del resto de la matriz. Unos de los métodos más empleados a nivel mundial para extraer los CE es la SPE. Las recuperaciones de productos farmacéutico por SPE, han demostrado ser aceptables (70-120%) así como los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) alcanzados, en el orden de los ng/L (Jennifer Ebele y col., 2017).

### 3.3. Análisis por HPLC UV-vis

La cromatografía líquida de alta resolución se basa en el reparto de una sustancia entre la fase móvil y la fase estacionaria. En este tipo de cromatografía, la muestra analítica, que contiene una mezcla de sustancias a analizar (analitos), fluye a través de la fase estacionaria, contenida en la columna cromatográfica, mediante el bombeo de la fase móvil a alta presión a través de la columna. Los componentes de la muestra avanzan a lo largo del sistema con una velocidad diferente de acuerdo a su afinidad con cada una de las fases. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del analito y de la composición de la fase estacionaria y la fase móvil. De esta manera, los analitos tendrán diferentes tiempos de retención, lográndose separarse uno de otro

El tiempo de retención es característico de cada analito, y depende de varios factores, entre ellos: composición y caudal de fase móvil, tipo y composición de fase estacionaria, presión, longitud de columna, gradiente de elución, entre otros. La utilización de presión en

este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna, reduciendo así su difusión dentro de la misma y mejorando la resolución de la cromatografía.

En cromatografía líquida, es posible trabajar bajo dos condiciones distintas:

- **Isocráticas**: cuando la fase móvil mantiene la misma composición durante la elución.
- **Gradiente**: cuando la composición de la fase móvil cambia a lo largo de la corrida cromatográfica.

Todo equipo de HPLC se compone como mínimo de cinco partes:

1. **Sistema de suministro de fase móvil.** Este sistema tiene una bomba o sistema de bombas que permite llegar a las altas presiones que se requieren (cerca de las 410 atm). Además, en la mayoría de los casos, se cuenta con un dispositivo que permite realizar gradientes de elución, modificando la fuerza de la fase móvil a lo largo de la corrida cromatográfica (Skoog y col., 2008). Los solventes utilizados deben filtrarse al vacío con un filtro de tamaño de poro de 0,20  $\mu\text{m}$ , para eliminar impurezas que puedan desgastar las bombas y contaminar u obstruir la columna; y también deben desgasificarse para eliminar las burbujas del seno del líquido. Las formas más comunes para desgasificar consisten en burbujear con helio (que desplaza el aire de la fase móvil), eliminando el 80% del aire de la solución, o sometiendo a vacío, logrando una remoción de 60%. En algunos casos, se combinan ambas técnicas.
2. **Sistema de inyección de muestra.** El sistema de inyección más utilizado actualmente, es el bucle de vías múltiples (Imagen 4). Este sistema de inyección consiste en una válvula de seis vías, dos de las cuales están conectadas entre sí por medio de un loop. Este loop es un tubo de volumen conocido, cuya misión es la de contener la muestra antes de efectuarse la inyección. La introducción de la muestra en la columna se lleva a cabo en dos etapas:
  - **La primera**: consiste en cargar la muestra en el loop con ayuda de una jeringa, se realiza a presión atmosférica.
  - **La segunda**: se hace pasar el eluyente a través del loop hacia la columna, mediante un giro de la válvula, arrastrando la muestra hacia la columna.

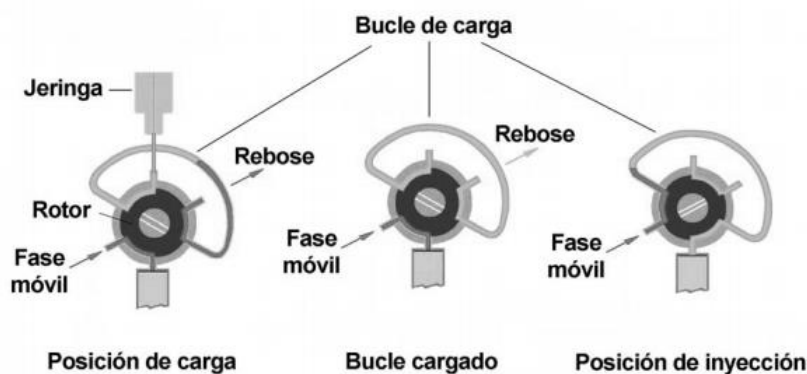


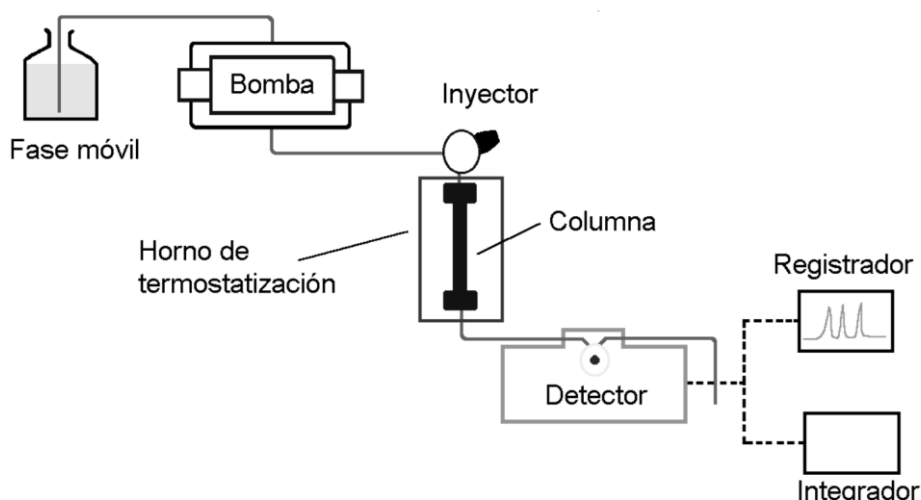
Imagen 4: esquema de bucle de vías múltiple.

3. **Columna.** La columna es el elemento fundamental de la cromatografía líquida, dado que en ella tiene lugar la separación. Las columnas más utilizadas en este tipo de cromatografía son las columnas rellenas. Estas columnas consisten en un tubo, generalmente de acero, cuyo diámetro interno suele ser de hasta 5 mm, relleno de una fase estacionaria adecuada al tipo de analitos que se busca separar. La longitud de estas columnas varía entre 50 a 300 mm (Skoog y col., 2008).

4. **Detector.** Todo cromatógrafo tiene acoplado, a la salida de la columna, un detector que mide una propiedad física del eluyente, lo que permite cualificar y cuantificar los componentes de la mezcla. Uno de los detectores más utilizados en HPLC es el detector ultravioleta visible (UV-vis) dado que tiene mejor selectividad, es insensible a la temperatura y se puede utilizar en condiciones de gradiente. Su principal limitante es que no se pueden utilizar solventes que tengan absorción apreciable en el UV o para aquellos analitos que no absorban en dicha región del espectro. Un tipo particular de detector UV-vis es el de arreglo de diodos. En este tipo de detector, el haz de radiación que atraviesa la muestra es dispersado por medio de una red de difracción fija, permitiendo recoger, de manera simultánea, todas las longitudes de onda dispersadas mediante una matriz de fotodiodos.

Otros detectores que pueden ser acoplados son: los detectores de fluorescencia, utilizado para aquellos analitos que tiene la capacidad de fluorecer; el detector amperométrico, adecuado para detectar sustancias electroactivas, entre otros.

5. **Transductor.** Traduce la información generada por el detector, en un cromatograma.



*Imagen 5: componentes básicos de un equipo de HPLC.*

Por último, para poder llevar a cabo la cuantificación de los analitos, deben realizarse curvas de calibración. Éstas representan gráficamente la relación lineal que existe entre la concentración del analito de interés y una determinada señal analítica (por ejemplo, absorbancia, transmitancia, conductividad eléctrica, entre otros). Para construir una curva de calibración, se debe preparar soluciones de concentraciones crecientes y conocidas de estándares, en un rango tal que incluya la concentración esperada del analito en la muestra a analizar. Luego se mide la señal analítica que genera cada una de las soluciones estándar. Con estos valores se grafica la curva y se aplica regresión lineal mediante el ajuste por mínimos cuadrados.

Las matrices ambientales suelen ser complejas por la presencia de un gran número de compuestos. Para poder identificar y cuantificar los CE presentes en estas matrices, es necesario realizar un pre-tratamiento de la muestra para su cuantificación. Por tal motivo, en matrices acuosas se puede aplicar la técnica de SPE para eliminar interferentes y concentrar las sustancias de interés. De esta manera se logra obtener una muestra en condiciones de ser cuantificada por HPLC UV-vis.

### 3.4. Antecedentes

Tal como se nombró anteriormente, la técnica de SPE se ha utilizado para extraer diferentes analitos de una fase acuosa. Para el caso de los CE, su aplicación es reciente. En Estados Unidos y Europa, desde hace aproximadamente dos décadas, se están estudiando cómo detectar, extraer y tratar aguas contaminadas con CE, incluso cuentan con legislación al

respecto. Sin embargo, en los países latinoamericanos, y en Argentina especialmente, la temática es incipiente y hay pocos estudios realizados al respecto.

Martín y col. (2012) investigaron 16 fármacos durante un año en muestras de plantas de tratamiento de Sevilla (España), siendo ibuprofeno, ácido salicílico y cafeína los compuestos con mayores concentraciones, tanto a la entrada (32, 27 y 4 µg/L respectivamente) como a la salida de las plantas (4, 1 y 0,94 µg/L respectivamente). También detectaron la presencia, aunque en menores concentraciones, de los antiinflamatorios diclofenac, ketoprofen y naproxen, del antiepiléptico carbamazepina y de los estrógenos 17α-etinilestradiol, 17β-estradiol, estriol y estrona.

En el Reino Unido, donde se prescriben alrededor de 1.000 kg/año de antiinflamatorios, analgésicos y antidepresivos, se ha reportado la presencia de más de 70 fármacos en aguas superficiales (Petrie y col., 2014); lo cual puede explicarse por el bajo porcentaje de remoción de la mayoría de los compuestos (<50%).

Birch y col. (2015) investigaron la presencia de distintos CE, entre los que se incluyeron productos de cuidado personal, antibióticos, aditivos de alimentos y plaguicidas en el estuario de Sydney, Australia. Con estos estudios concluyeron que el paracetamol y diurón estaban presentes en todo el estuario, mientras que los demás contaminantes analizados sólo en algunos sectores; producto del vertido de aguas residuales sobre el cuerpo de agua.

Por otro lado, distintos investigadores han analizado la presencia de CE en agua para consumo humano. En Estados Unidos, Glassmeyer y col. (2017), detectaron la presencia de 244 CE en agua potable.

En nuestro país, se estudiaron los efectos que generan los CE en el ambiente y en el ser humano en particular. Dicho trabajo indicó que los CE alteran al sistema endocrino y bloquean las funciones hormonales en el ser humano y animales, aún en bajas concentraciones (García Gómez y col, 2011). Anteriormente, los autores Hoeger y col. (2005) estudiaron los efectos que el DIC causa en la biota acuática, concluyendo que este CE afecta a los tejidos de las branquias y de los riñones en peces de agua dulce.

En el laboratorio de cromatografía del Centro de Investigaciones en Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue (CITAAC), Instituto de bipertenencia UNCo-CONICET, se está desarrollando un proyecto denominado “Efectos de estresores múltiples en comunidades acuáticas. Estrategias integradas para la evaluación de impactos y la remoción de contaminantes en agua.” En él se espera validar técnicas analíticas para identificar y cuantificar

estos contaminantes en el agua, para luego diseñar y poner a prueba una técnica de remoción y tratamiento. Paralelamente, se está investigando la posibilidad de utilizar macroinvertebrados presentes en ríos como bioindicadores de la presencia de CE en los mismos. En la zona del valle del Río Negro y Neuquén, Macchi y col. (2018) han investigado el efecto de los plaguicidas en comunidades de macroinvertebrados, estudio que podría servir de partida para el análisis de CE en macroinvertebrados en la región.

**Materiales y  
 métodos**

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Reactivos y solventes

#### Los reactivos utilizados fueron:

- Paracetamol 98-102% de pureza, marca Sigma-Aldrich.
- Cafeína, marca Sigma-Aldrich. Pureza no especificada.
- Diclofenac sal sódica, marca Sigma-Aldrich. Pureza no especificada.
- Ibuprofeno 98%, marca Sigma-Aldrich.
- Buffer pH 4, 7 y 10, marca Cicarelli.

#### Los solventes utilizados fueron:

- Metanol, grado HPLC, Sintorgan.
- Acetonitrilo, grado HPLC, Sintorgan.
- Hidróxido de sodio, Sigma-Aldrich.
- Ácido clorhídrico, grado analítico, marca Cicarelli
- Acetato de etilo, grado HPLC, Sintorgan.
- Ácido fórmico, grado HPLC, Sintorgan.
- Agua ultrapura.
- Sustancias húmicas Leonardita, suministrada por IHSS (natural organic matter research).

#### Los adsorbentes utilizados fueron:

- Strata<sup>®</sup> X, marca Phenomenex.
- Oasis<sup>®</sup> HLB, marca Oasis.

### 4.2. Preparación de soluciones de trabajo

En esta sección se detallará como fueron preparadas las soluciones empleadas en este trabajo. Para determinar la masa de las drogas se utilizó una balanza analítica modelo AB135-S/TACT, Mettler Toledo. El peso mínimo de esta balanza es de 1 mg, con un desvío de 0,01/0,1mg.

#### 4.2.1. Soluciones madres

A partir de los estándares sólidos, Sigma-Aldrich (USA), de cada compuesto a analizar, se prepararon soluciones madres en metanol, cuyas concentraciones finales en mg/L fueron de:



Tabla 1: soluciones madres individuales de los contaminantes emergentes (CE) en metanol.

CE	Concentración (mg/L)
Paracetamol	1765
Cafeína	1554
Diclofenac	1432
Ibuprofeno	3585

#### 4.2.2. Solución intermedia

A partir de las soluciones madres individuales de CE se preparó una solución mezcla intermedia en metanol de 100 mg CE/L.

#### 4.2.3. Soluciones para curva de calibración y fortificación

Partiendo de la solución intermedia de 100 mg/L, se realizaron distintas diluciones en metanol para alcanzar concentraciones finales de 5; 7,5; 10; 15 y 20 mg/L. Estas soluciones fueron utilizadas para realizar las curvas de calibración para la cuantificación por HPLC UV-vis. La disolución de 15 mg/L además, se utilizó para fortificar las muestras de agua ultrapura y las soluciones con sustancias húmicas.

#### 4.2.4. Soluciones de materia orgánica soluble

Las soluciones para evaluar el efecto de la materia orgánica soluble (MOS) se prepararon a partir de Leonardita, comercializada por la Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas (IHSS), que contiene 40% de MOS (IHSS, 2019). Se prepararon tres soluciones de MOS de concentraciones: 5, 10 y 20 mg/L, denominadas H<sub>1</sub>; H<sub>2</sub> y H<sub>3</sub> respectivamente, las cuales se agitaron durante 24 horas en oscuridad.

#### 4.2.5. Muestras analíticas utilizadas en la SPE de CE

Las muestras se prepararon a partir de 160,0 mL de agua ultrapura y se fortificaron con 250 µL de solución estándar de 15 mg/L. En la evaluación de la influencia de pH, antes de la fortificación, se ajustó el pH del agua ultrapura utilizando hidróxido de sodio 0,1M y ácido clorhídrico 0,1M según el pH deseado. Las determinaciones de pH se realizaron con un peachímetro Starter 2100, OHAUS®.

#### 4.2.6. Muestras analíticas para la evaluación del efecto de MOS

Las soluciones preparadas en la sección 4.2.4 se ajustaron a pH 10 con NaOH y se fortificaron con 250 µL de solución estándar de 15 mg/L de CE. El volumen final de las muestras fue de 160,0 mL.

### 4.3. Extracción en fase sólida (SPE)

#### 4.3.1. Selección de las condiciones para SPE

Se realizó una revisión bibliográfica con el fin de obtener información sobre distintas condiciones de acondicionamiento, elución y adsorbente para la extracción de CE en agua. Se seleccionaron tres métodos que fueron descritos por Pérez-Parada y col. (2012); Santos y col. (2005) y Caban y col. (2014). A cada método se lo denominó M1, M2 y M3; respectivamente. En la Tabla 2 se detallan los métodos originales propuestos por los autores.

Tabla 2: condiciones de acondicionamiento y elución para la SPE.

Método	M1	M2	M3
<b>Acondicionamiento</b>	- 6,00 mL agua a pH= 8,01	- 5,00 mL acetato de etilo - 5,00 mL metanol - 10,00 mL agua ultrapura	- 5,00 mL de metanol - 5,00 mL de agua ultrapura
<b>Elución</b>	- 2,00 x 4,00 mL acetato etilo	- 4,00 mL acetato de etilo - 4,00mL acetato de etilo -metanol (1:1)	- 5,00 mL de metanol
<b>Adsorbente</b>	Oasis HLB®	Oasis HLB®	Strata X®

M1: Pérez-Parada y col. (2012); M2: Santos y col. (2005) y M3: Caban y col. (2014).

#### 4.3.2. Etapas de la SPE

Para la SPE en primera instancia se realizó el acondicionamiento del adsorbente utilizando una bomba peristáltica Gilson Minipuls Evolution, versión 2, a un caudal de 6 mL/min, posteriormente se pasaron, en todas las extracciones, 160,0 mL de muestra analítica. Luego del pasaje de la muestra, los adsorbentes se secaron durante 10 minutos en vacío con un Manifold LiChrolut y durante 15 minutos por corriente de nitrógeno a 35°C, en baño termostático modelo Masson, Vicking. Luego se realizó la elución de los CE según las condiciones de esta etapa que se detallan en la Tabla 2. Posterior a la elución, se concentró el eluido en un evaporador de solventes, Turbovap®, hasta sequedad y se reconstituyó el extracto con 0,5 mL de metanol grado HPLC para su posterior cuantificación por HPLC UV-vis.

#### 4.4. Comparación de la eficacia de extracción de dos adsorbentes

Con el objetivo de comprobar si es posible reemplazar el adsorbente Oasis HLB®, propuesto originalmente por los autores Pérez-Parada y col. (2012;) y Santos y col. (2005), por el adsorbente Strata X® (el cual es económicamente más accesible que el Oasis HLB®), se realizó la extracción de CE utilizando las condiciones originales de M1 y M2 para cada uno de los adsorbentes (ver Tabla 2). Cabe destacar que el método M3, originalmente usa Strata X® como adsorbente, por tal motivo, la comparación del adsorbente para este método no se incluye en esta prueba. Las muestras analíticas utilizadas fueron preparadas según lo descrito en la sección 4.2.5.

#### 4.5. Evaluación de la influencia del pH del agua en la SPE de CE

La evaluación del efecto pH se realizó en muestras a pH 3, 7 y 10 preparadas según lo descrito en la sección 4.2.5. A dichas muestras analíticas, se les realizó SPE aplicando las condiciones de acondicionamiento y elución de los métodos: M1, M2 y M3; utilizando en todos los casos Strata X® como adsorbente.

#### 4.6. Efecto de la materia orgánica soluble en la extracción de CE

Para la evaluación de la eficiencia de extracción de CE en soluciones de distintas concentraciones de MOS, se trabajó bajo las condiciones del M3 (Tabla 2). Para ello, se utilizaron las muestras analíticas descritas en la sección 4.2.6. En simultáneo, se realizó la extracción de CE en agua ultrapura a pH 10 usada como blanco de MOS ( $H_0$ ).

#### 4.7. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La identificación y cuantificación de los CE se realizó por HPLC. El equipo utilizado fue un HPLC Shimadzu, modelo LC-20ADXR con un detector UV-vis modelo SPD-20 UFLC. Para seleccionar las condiciones cromatográficas, se adaptó el método propuesto por Birch y col. (2015).

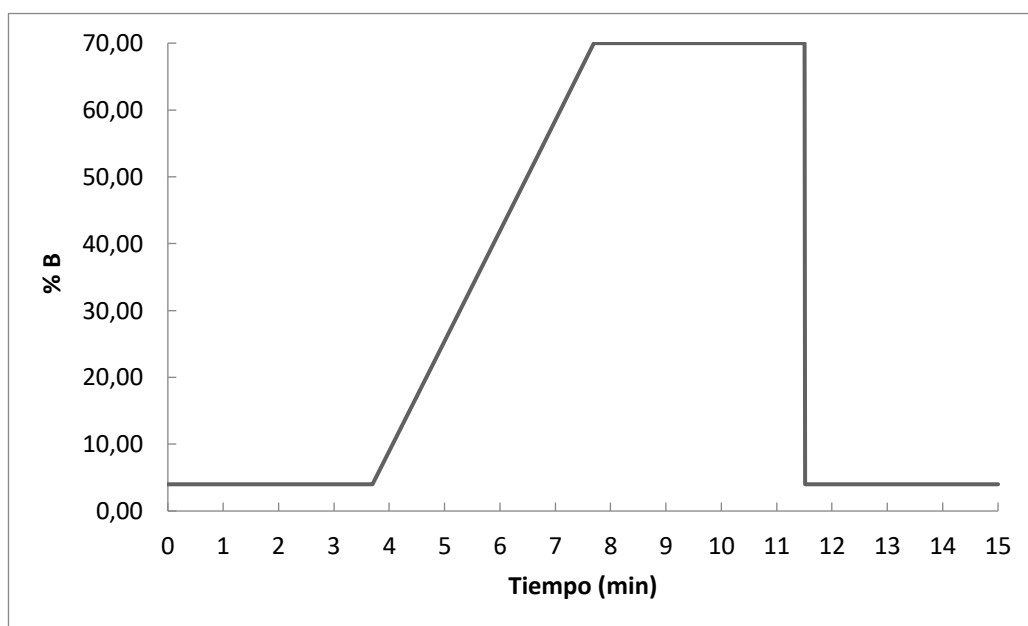


Imagen 6: equipo de HPLC UV-vis.

La separación se logró utilizando una columna Shim-pack GIST-HP C18 con un tamaño de poro de 3  $\mu\text{m}$ , de 3 mm de diámetro y 150 mm de largo. Para la elución de los compuestos, se realizó una corrida en gradiente de dos soluciones:

- solución A: 300,0 mL de agua ultrapura con 3,00 mL de acetonitrilo (AcN) calidad HPLC.
- solución B: 285,0 mL de AcN calidad HPLC con 15,0 mL de agua ultrapura y 15  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico.

En el Gráfico 1 se detalla el gradiente de elución aplicado a lo largo de una corrida cromatográfica de 15 minutos con caudal variable de 0,3 a 0,4 mL/min. Las longitudes de onda se modificaron a lo largo de la corrida cromatográfica según la máxima absorción de cada CE.



*Gráfico 1: gradiente aplicado en la corrida cromatográfica.*

La cuantificación de los CE extraídos en cada una de las variables estudiadas en esta tesis, se realizó mediante curvas de calibración en el rango de 5 a 20 mg/L.

#### 4.8. Análisis estadístico

A los datos obtenidos en las pruebas anteriores, se les realizó un ANOVA y una prueba de Tukey para realizar una comparación de medias aritméticas. El análisis se realizó con el programa Statistica versión 7.0. Se trabajó con un  $p$  de 0,05. Los gráficos se confeccionaron con Microsoft Excel.

# Resultados y discusión

## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

#### 5.1.1. Análisis cromatográfico en soluciones estándares de CE

En el Gráfico 2 se muestra un cromatograma que corresponde a una solución estándar de CE de 15 mg/L. El orden de elución corresponde a PAR, CF, DIC e IBU en las condiciones de corrida descritas en la sección 4.7. En el eje de abscisas se indica el tiempo de retención de cada CE mientras que en el eje de coordenadas indica la absorbancia de cada CE, expresada en mV.

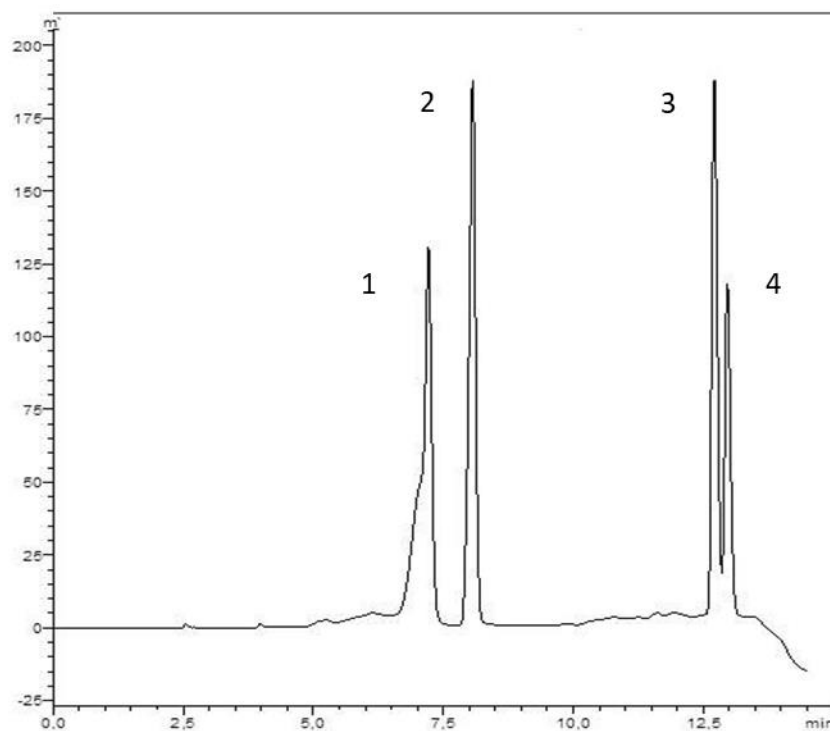


Gráfico 2: cromatograma obtenido a partir de una solución estándar de contaminantes emergentes de 15 mg/L. **1.PAR; 2.CF; 3.DIC y 4.IBU.**

Las curvas de calibración para cada uno de los CE estudiados se muestran en la Gráfico 3. Los coeficientes de correlación ( $r^2$ ) obtenidos fueron todos cercanos a la unidad, lo que nos indica la linealidad en las curvas de calibración.

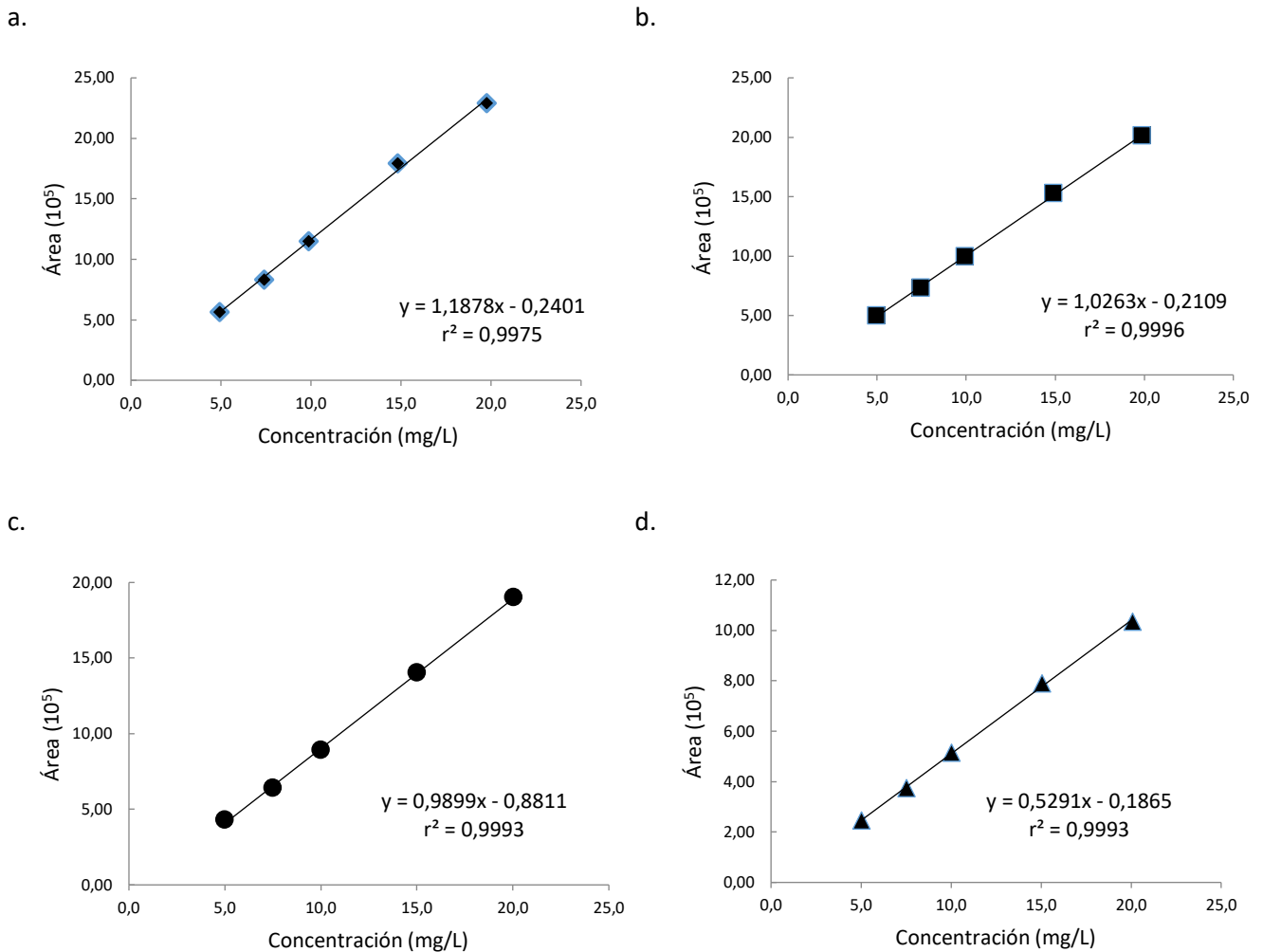


Gráfico 3: curvas de calibración de los contaminantes emergentes correspondientes a soluciones de: **a** PAR, **b**.CF, **c**. IBU y **d**. DIC.

### 5.1.2. Análisis cromatográfico en soluciones con MOS

Se analizó por HPLC el perfil de MOS en ausencia de CE y en presencia de CE (Gráfico 4). En ambos casos, se observa una señal a un tiempo de retención  $t=12,5$  min (marcada en azul), siendo este tiempo, diferente a los tiempos de retención de cada uno de los CE.

Por otro lado, en el perfil de MOS en presencia de CE se observa una señal a un tiempo de retención aproximado de  $t=13,5$  min (marcado en rojo) que no se observa en el perfil de MOS en ausencia de CE. Aunque es necesario profundizar el análisis para conocer el origen de estas señales, el mismo supera el objetivo de este trabajo por lo que quedará para investigaciones futuras. En este caso, esta señal observada también tiene un tiempo de retención diferente a los tiempos de retención de cada uno de los CE. De esta manera, se infiere que la MOS no interfiere en la cuantificación de los CE analizados.

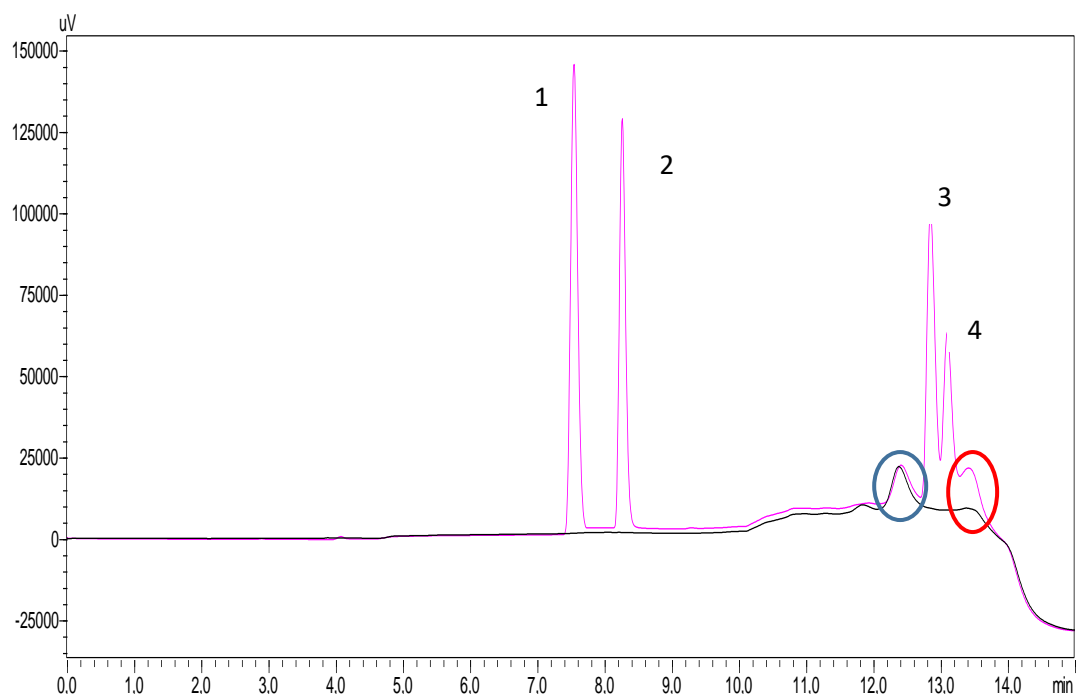


Gráfico 4: cromatograma correspondiente a una solución de materia orgánica soluble (MOS) de 5 mg/L (—). Cromatograma correspondiente a una solución de MOS de 5 mg/L fortificada con contaminantes emergentes (CE) (—). Remarcada con círculo azul, la señal producida a un tiempo de retención (t) de 12,5 minutos. Remarcada con círculo rojo, la señal producida a un tiempo de retención (t) de 13,5 minutos.

## 5.2. Comparación de la eficacia de extracción de dos adsorbentes

Los resultados de la comparación entre adsorbentes Oasis HLB® y Strata X® se muestran en la Tabla 3. En este caso, se trabajó con las condiciones propuestas según M1 y M2; con el objetivo de evaluar si se puede reemplazar el adsorbente Oasis HLB® propuesto por los autores de estos métodos, por el adsorbente Strata X®, económicamente más accesible. No se trabajó con M3, dado que originalmente los autores del método plantean utilizar Strata X® como adsorbente.

Cuando se trabajó bajo las condiciones del M1, se observó una diferencia estadísticamente significativa, siendo el porcentaje de recuperación (%R) del PAR obtenido 5 veces mayor utilizando Oasis HLB® respecto al %R utilizando Strata X®. Asimismo, trabajando con las condiciones del M2, también se observó una diferencia significativa en el %R de PAR. Sin embargo, en este caso, la relación de los %R fue 2 veces mayor entre cartuchos Oasis HLB® y Strata X®. Santos y col. (2005), trabajaron en matrices reales fortificadas con estos CE, pero no lograron una extracción satisfactoria utilizando Oasis HLB® a pH 2 y 7. La diferencia entre estos resultados y los obtenidos en este laboratorio podría ser explicado por el hecho que el PAR se extrajo a partir de una matriz a pH 8 con Oasis HLB®. Cabe destacar, que independientemente del adsorbente, los %R del PAR para el M1 son menores que los obtenidos con el M2.



Para los CE restantes, (Tabla 3) no se observaron diferencias estadísticamente significativas de los %R entre adsorbentes para los métodos ensayados. Patrolecco y col. (2013); Lajeunesse y Gagnon (2007) entre otros, obtuvieron recuperaciones aceptables con Strata X<sup>®</sup> acondicionado a pH ácido. Por otra parte, Baranowska y Kowalski (2010) trabajaron con Oasis HLB<sup>®</sup> acondicionado a pH neutro y obtuvieron %R > al 80% para DIC e IBU.

En base a los resultados obtenidos, la extracción de PAR se recomienda realizarla con Oasis HLB<sup>®</sup> según el M1 y M2. Sin embargo, para CF, DIC e IBU, se obtuvieron recuperaciones aceptables con ambos adsorbentes, por lo que se pudo comprobar que el Strata X<sup>®</sup> puede reemplazar al Oasis HLB<sup>®</sup>, y de esta manera disminuir el costo de análisis, especialmente en ensayos de rutina. Por tanto, se utilizó para ver el efecto que ejerce el pH y la MOS sobre el %R de los CE, incluido PAR.

Tabla 3: comparación de los %R de contaminantes emergentes obtenidos con diferentes condiciones de SPE.

	M1		M2	
	Oasis HLB <sup>®</sup>	Strata X <sup>®</sup>	Oasis HLB <sup>®</sup>	Strata X <sup>®</sup>
	%R ± DS	%R ± DS	%R ± DS	%R ± DS
Paracetamol	75,62 ± 3,27	16,93 ± 1,52*	94,59 ± 2,48	48,22 ± 1,87*
Cafeína	81,13 ± 3,95	71,15 ± 8,28	85,2 ± 1,46	75,75 ± 3,32
Diclofenac	74,14 ± 8,54	91,22 ± 8,37	95,9 ± 5,42	89,09 ± 6,73
Ibuprofeno	79,60 ± 5,48	81,14 ± 3,29	90,67 ± 7,17	94,00 ± 5,51

\* Diferencia estadísticamente significativa respecto de Oasis HLB<sup>®</sup>. (Media ± DS n=3; p<0,05).

### 5.3. Evaluación de la influencia del pH del agua en la SPE de CE

Los resultados de la evaluación de la influencia del pH del agua en la extracción de cada CE se presentan para cada uno de los métodos seleccionados (M1, M2 y M3).

El Gráfico 5 muestra los %R obtenidos en la extracción de CE aplicando las condiciones de acondicionamiento y elución del M1 en matrices acuosas a distintos pH. Como se puede observar, no hay diferencias al comparar los %R de cada uno de los CE a los pH estudiados (p<0,05). Particularmente para el DIC se obtuvieron los mayores %R en todo el rango de pH. Sin embargo, el PAR y la CF presentan valores próximos al 20% y 70% respectivamente.

Condiciones similares de SPE fueron propuestas por Togola y Budzinski (2007), quienes trabajaron con muestras a pH 2 y utilizaron como adsorbente Strata X<sup>®</sup>, logrando %R aceptables para el DIC e IBU. A partir de lo expuesto, se concluye que, bajo las condiciones propuestas para M1, se obtienen %R aceptables para la CF, DIC e IBU.

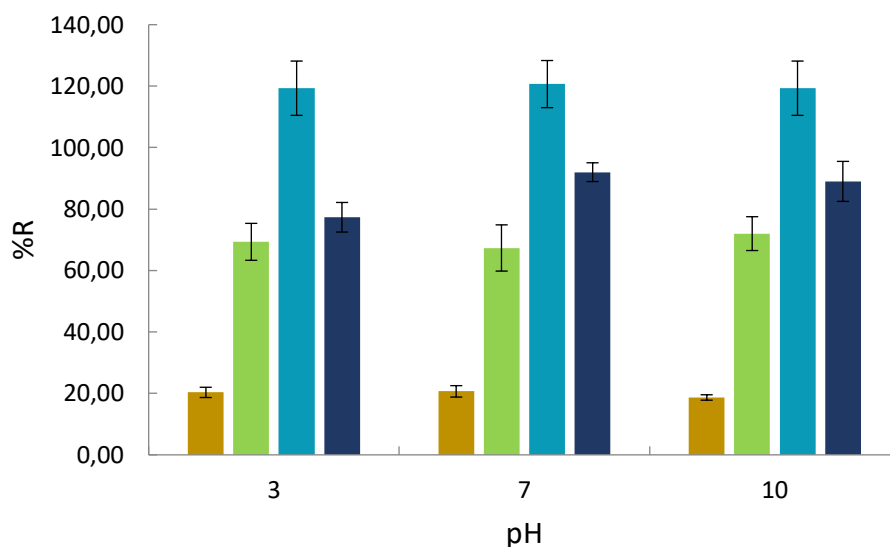


Gráfico 5: efecto del pH de la matriz en los porcentajes de recuperación (%R) de los contaminantes emergentes: (■ PAR; ■ CF; ■ DIC; ■ IBU) con las condiciones de extracción de M1. (Media  $\pm$  DS n=3;  $p < 0,05$ ).

Para las condiciones de acondicionamiento y elución del M2 los resultados se muestran en el Gráfico 6. El análisis estadístico muestra que las recuperaciones no presentan diferencias significativas comparando cada CE a los distintos pH. Se logró recuperar el CF, DIC e IBU en %R mayores al 80%. Sin embargo, los %R del PAR no son aceptables, dado que en todos los casos fueron menores al 70% (47,67%; 46,67% y 27,00% a pH 3, 7 y 10 respectivamente).

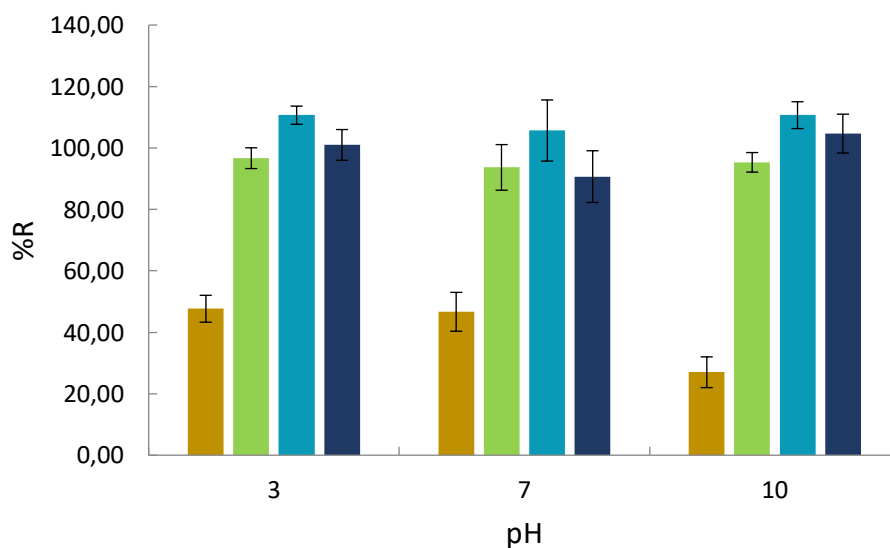


Gráfico 6: efecto del pH de la matriz en los porcentajes de recuperación (%R) de los contaminantes emergentes: (■ PAR; ■ CF; ■ DIC; ■ IBU) con las condiciones de extracción de M2. (Media  $\pm$  DS n=3;  $p < 0,05$ ).

Los resultados de la extracción de los CE con las condiciones de acondicionamiento y elución del M3 se muestran en el Gráfico 7. En particular, para el PAR se observa una diferencia significativa a pH 3 respecto de una matriz a pH 7. Cabe destacar para este contaminante un aumento 2 veces mayor en el %R a pH 10 en comparación a la extracción bajo las condiciones del M2. Sin embargo, a pesar de lo expuesto anteriormente, es importante resaltar que los %R para el PAR no superan el 55%. En el caso del DIC el análisis estadístico marca una diferencia significativa en los %R a pH 3 y pH 10 con respecto a pH 7. A pesar de estas diferencias, todas las recuperaciones fueron satisfactorias, 92,00%; 103,75% y 91,00% a pH 3, 7 y 10 respectivamente. Por su parte, los autores Gaffney y col. (2014) aplicaron condiciones similares de SPE a las propuestas en el M3. Llegaron a resultados similares a los obtenidos en este trabajo, logrando %R aceptables para la CF, DIC e IBU en muestras de agua ultrapura a pH neutro; pero alcanzaron un %R para el PAR inferior al 30%, a pesar de que trabajaron con Oasis HLB® como adsorbentes.

Las diferencias observadas para el PAR y el DIC, pueden ser debidas a que el número de réplicas utilizado para realizar el análisis estadístico fue bajo. Esto implica un aumento de la desviación estándar de la media, lo que podría explicar las diferencias significativas señaladas.

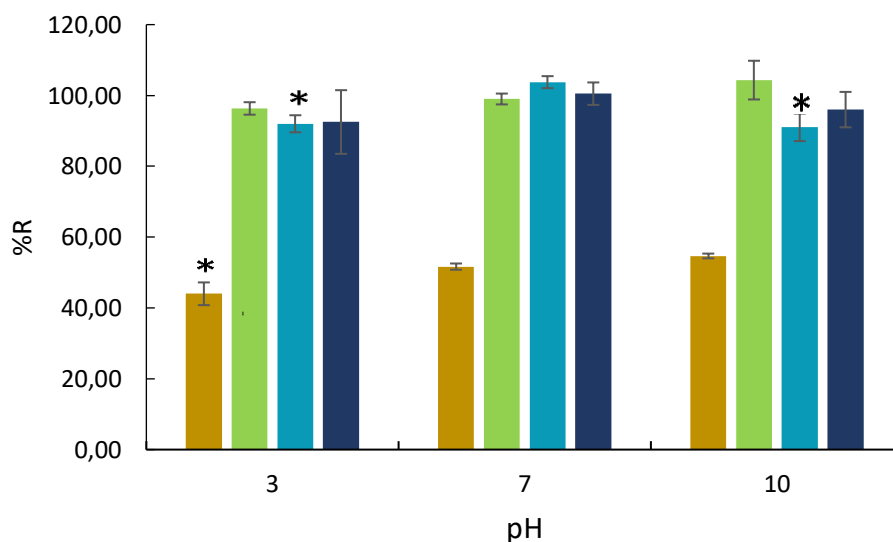


Gráfico 7: efecto del pH de la matriz en los porcentajes de recuperación (%R) de los contaminantes emergentes: ■ PAR; ■ CF; ■ DIC; ■ IBU con las condiciones de extracción de M3. \*Diferencia significativa respecto a pH 7. (Media  $\pm$  DS n=3; p<0,05).

En la bibliografía, se observa que varios autores proponen trabajar con muestras a condiciones de pH ácidas dado que así se obtienen los mayores %R de los CE. Ejemplo de esto es el trabajo realizado por Berneri (2013) quien trabajó con muestras con IBU a condiciones

de pH ácidas y neutras; llegando a la conclusión de que los mayores %R del IBU se alcanzan a condiciones ácidas. A su vez, Patrolecco y col. (2013) trabajaron con muestras de CE (entre ellos DIC e IBU) en matrices acuosas a pH ácidos (pH 3), logrando %R para el DIC e IBU mayores al 70%. Paralelamente, para el caso particular de la CF, Afonso-Olivares y col. (2012) trabajaron con muestras con CF a tres condiciones de pH (3, 6 y 8); llegando a la conclusión que los mayores %R de este compuesto se obtienen a pH 8. Sin embargo, en este trabajo de tesis no se observó diferencia significativa en la recuperación de la CF a los tres pH trabajados, para ninguno de los tres métodos probados.

A partir de los resultados mostrados, se podría inferir que el pH de la matriz no interfiere, en la extracción de CF, DIC e IBU independientemente del método aplicado. Dado que al aplicar las condiciones de extracción del M3 se logran mayores %R de estos CE, se decide continuar trabajando con este método. Además, es el método que menor consumo de solvente propone, lo que agiliza la técnica y disminuye los costos.

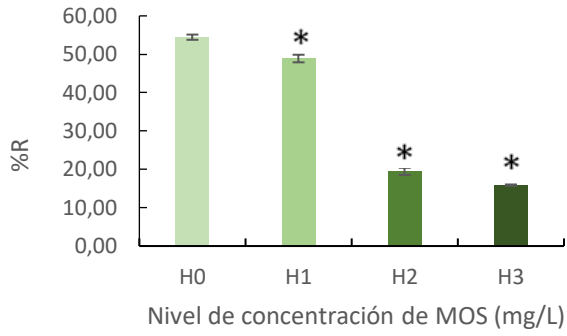
#### 5.4. Efecto de la materia orgánica soluble en la extracción de CE

Los resultados de la extracción de cada CE en muestras analíticas a distintas concentraciones de MOS se muestran en el Gráfico 8. Como se observa en el Gráfico 8a, el mayor %R en la extracción del PAR se obtuvo en el blanco de MOS ( $H_0$ ), siendo significativamente mayor comparado con las restantes extracciones de este compuesto en presencia de MOS. Esta diferencia podría ser indicadora de algún tipo de interacción, ya que se observó que a medida que aumenta la concentración de MOS, disminuye el %R del PAR.

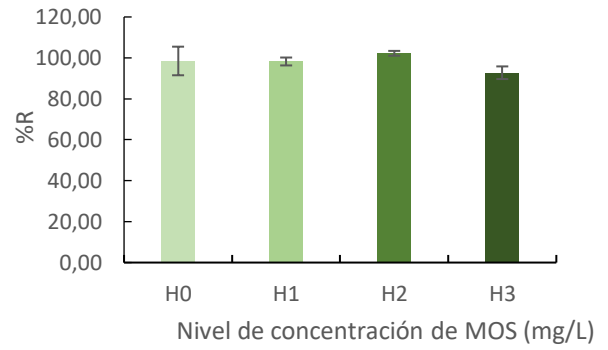
A diferencia del PAR, los %R de CF, DIC e IBU en presencia de MOS, no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al blanco (Gráfico 8 b, c y d respectivamente). Gómez Ramos (2012) analizó CE en muestras reales de agua residuales con un contenido de carbono orgánico disuelto (COD) de 25 mg/L, logrando %R aceptables para CF, DIC e IBU. Estos estudios sugieren que la presencia de MOS en muestras acuosas no afectaría en la extracción de CF, DIC e IBU. Una consideración importante a tener en cuenta, es que las aguas naturales superficiales de la zona de la Confluencia, Neuquén, según la Autoridad Interjurisdiccional de Cuencas de los ríos Limay, Neuquén y Negro (2008), presentan niveles de carbono orgánico disuelto entre 1,2 y 2,4 mg/L. Dado que en este trabajo de tesis se ha trabajado con valores de COD mayores a los que presentan las aguas naturales en la región, el método desarrollado podría ser utilizado, en trabajos futuros, para realizar un análisis de la presencia de CE en las aguas superficiales de la región, teniendo en cuenta que esto puede no

cumplirse para muestras de agua de descarga o cerca de los puntos de vertido, donde la concentración de COD tiende a ser mayor .

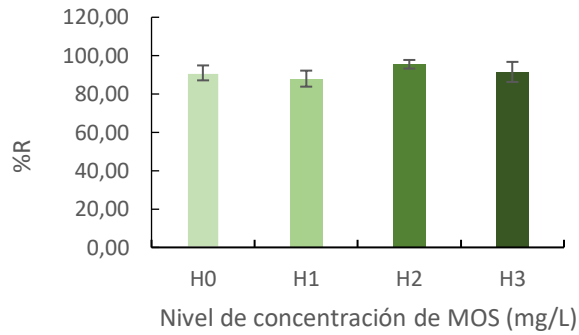
a.



b.



c.



d.

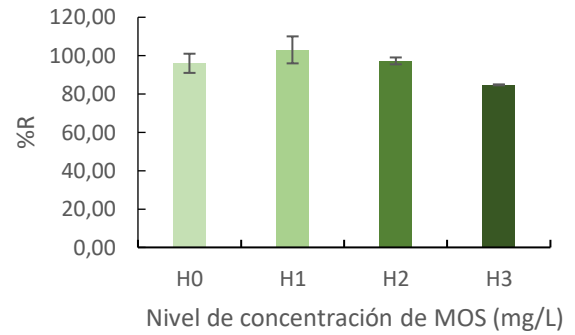


Gráfico 8: extracción de los contaminantes emergentes en soluciones de materia orgánica soluble (MOS) a pH 10. **a.** PAR, **b.** CF, **c.** DIC, **d.** IBU. (Media  $\pm$  DS n=3;  $p < 0,05$ ) \*Diferencia significativa respecto al blanco de MOS (H<sub>0</sub>).

**Conclusión**

## 6. Conclusiones

- Los métodos de SPE aplicados para la extracción de cafeína, diclofenac e ibuprofeno (CF, DIC e IBU respectivamente) pudieron ser reproducidos satisfactoriamente.
- Se logró optimizar las condiciones de extracción en fase sólida para la determinación de CF, DIC e IBU en matrices acuosas.
- El estudio permitió la selección del adsorbente Strata X<sup>®</sup>, que resultó adecuado para la extracción de CF, DIC e IBU; contribuyendo a una disminución en el costo de la técnica.
- Las condiciones de pH de la matriz no interfieren en la extracción en fase sólida de los contaminantes emergentes.
- Con las condiciones seleccionadas de acondicionamiento y elución (M3) aplicadas a CF, DIC e IBU no se obtienen porcentajes de recuperación satisfactorios para el PAR, dado que los %R obtenidos para este compuesto fueron menores al 70% en todos los casos.
- Las diferencias observadas para el PAR y el DIC al aplicar M3, pueden ser debidas a que el número de réplicas utilizado para realizar el análisis estadístico fue bajo, lo que aumenta la desviación estándar de la media. Cabe destacar que, en el caso del DIC, si bien hay diferencias significativas entre los %R, estos presentan valores satisfactorios para los tres pH trabajados. En el caso del PAR, a pesar de las diferencias observadas, no se obtuvieron %R aceptables a ninguno de los pH trabajados.
- Se seleccionó M3 para la determinación de CE basado en el criterio de la obtención de los mayores porcentajes de recuperación para CF, DIC e IBU. Además, es el método más amigable con el ambiente ya que genera menor cantidad de residuos.
- La presencia de Materia Orgánica Soluble en la matriz acuosa no genera interferencia en la SPE de CF, DIC e IBU.
- Para el caso particular del PAR, será necesario seguir investigando nuevas condiciones de acondicionamiento y elución para poder extraerlo de matrices acuosas.

## 6.1. Recomendaciones

En primer lugar, se propone validar el método optimizado en esta tesis para poder ser incorporado al sistema de calidad (ISO 17025) del laboratorio de Cromatografía del Centro de Investigaciones en Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue (CITAAC). De esta manera, el método se podrá utilizar en ensayos de rutina e investigación.

El método optimizado en este trabajo de tesis podrá ser utilizado en el análisis de muestras reales de aguas de la región de la Confluencia de los ríos Limay y Neuquén, lo que permitirá conocer cuál es la realidad de la región respecto a la presencia de los CE estudiados. Asimismo, puede servir como punto de partida para el futuro análisis de nuevos contaminantes emergentes y como puntapié para el desarrollo de técnicas de tratamiento y remoción de estos contaminantes.



# Bibliografía

## 7. Bibliografía utilizada

- Afonso-Olivares, C., Sosa-Ferrera, Z. y Santana-Rodríguez, J. J. (2012). Analysis of anti-inflammatory, analgesic, stimulant and antidepressant drugs in purified water from wastewater treatment plants using SPE-LC tandem mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47(6), 887-895.
- Arbeláez Salazar, P. A. (2016). Contaminantes emergentes en aguas residuales y de río y fangos de depuradora. Tesis doctoral. Universidad Rovira i Virgili. <https://www.tdx.cat/handle/10803/334397>
- Autoridad interjurisdiccional de las cuencas de los ríos Limay, Neuquén y Negro (2008). Índices de calidad del agua y síntesis de la situación ambiental de la cuenca. Secretaría de gestión ambiental.
- Baranowska, I. y Kowalski, B. (2010). The development of SPE procedures and an UHPLC method for the simultaneous determination of ten drugs in water samples. *Water, Air, & Soil Pollution*, 211(1-4), 417-425.
- Berneri, M. J. (2013) "Identificación de compuestos orgánicos y evaluación del riesgo ambiental en afluentes y efluentes de plantas municipales para tratamiento de líquidos cloacales. Fármacos: ibuprofeno y paracetamol". Facultad de ciencias exactas y naturales.
- Birch, G. F., Drage, D. S., Thompson, K., Eaglesham, G., y Mueller, J. F. (2015). Emerging contaminants (pharmaceuticals, personal care products, a food additive and pesticides) in waters of Sydney estuary, Australia. *Marine Pollution Bulletin*, 97(1-2), 56-66.
- Caban, M., Mioduszevska, K., Łukaszewicz, P., Migowska, N., Stepnowski, P., Kwiatkowski, M., y Kumirska, J. (2014). A new silylating reagent - dimethyl(3,3,3-trifluoropropyl)silyldiethylamine - for the derivatisation of non-steroidal anti-inflammatory drugs prior to gas chromatography-mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*, 1346, 107-116.
- Confederación Farmacéutica Argentina (2017). Recuperado de: <http://www.cofa.org.ar/>

- Fent K., Weston A. y Caminada D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76:122–159.
- Gaffney, V. D. J., Cardoso, V. V., Rodrigues, A., Ferreira, E., Benoliel, M. J. y Almeida, C. M. (2014). Analysis of pharmaceutical compounds in water by SPE-UPLC-ESI-MS/MS. *Química Nova*, 37(1), 138-149.
- García Delgado, F. (2015). Puesta en marcha de una desalinizadora piloto de ósmosis inversa para reducción de contaminantes emergentes. Trabajo de fin de Máster. Universidad de Alicante. <https://iuaca.ua.es/en/master-agua/documentos/-gestadm/end-of-master-work/tfm09/tfm09-francisco-garcia-delgado.pdf>
- García Gómez, C., Gortáres, P. y Drogui, P. (2011). Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción. Instituto Tecnológico de Sonora. *Revista Química Viva*, 10, 96–105.
- Glassmeyer, S. T., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., Batt, A. L., Benson, R., Boone, J. S., ... y Mash, H. E. (2017). Nationwide reconnaissance of contaminants of emerging concern in source and treated drinking waters of the United States. *Science of the Total Environment*, 581, 909-922.
- Gómez Ramos, M. D. M. (2013). Desarrollo y validación de un método analítico mediante LC-QTOF-MS para la caracterización de aguas residuales y estudio de su aplicación en agua de riego para cultivos hortícolas.
- Hoeger, B., Köllner, B., Dietrich, D. R. y Hitzfeld, B. (2005). Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquatic Toxicology*, 75(1), 53-64.
- Jennifer Ebele, A., Abou-Elwafa Abdallah, M. y Harrad, S. (2017). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment, *Emerging Contaminants*, 3, pp. 1–16.
- Lajeunesse, A. y Gagnon, C. (2007). Determination of acidic pharmaceutical products and carbamazepine in roughly primary-treated wastewater by solid-phase extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 87(8), 565-578.

- Macchi, P., Loewy, R. M., Lares, B., Latini, L., Monza, L., Guiñazú, N. y Montagna, C. M. (2018). The impact of pesticides on the macroinvertebrate community in the water channels of the Río Negro and Neuquén Valley, North Patagonia (Argentina). *Environmental Science and Pollution Research*, 25(11), 10668-10678.
- Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos, J. L., Aparicio, I. y Alonso, E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. *Journal of hazardous materials*, 239, 40-47.
- Natural Organic Matter Research (2019). Recuperado de: <http://humic-substances.org/source-materials-for-ihss-samples>
- Patrolecco, L., Ademollo, N., Grenni, P., Tolomei, A., Barra Caracciolo, A. y Capri, S. (2013). Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection. *Microchemical Journal*, 107, 165–171.
- Pérez-Parada, A., Niell, S., Colazzo, M., Besil, N., Cesio, V. y Heinzen, H. (2012). Evaluación preliminar de la ocurrencia de contaminantes emergentes en aguas residuales de Montevideo, Uruguay. In *Actas 7mo Congreso de Medio Ambiente AUGM*, 1-19.
- Petrie, B., Barden, R. y Kasprzyk-Hordern, B. (2015). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water research*, 72, 3-27.
- Phenomenex. (2019). Recuperado de: <https://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata>
- Raynie, D. E. y Majors, R. E. (2016). Trends in sample preparation. *LCGC North Am*, 34, 174-188.
- Reinoso Carrasco, J. D. C., Serrano Delgado, C. Y. y Orellana Cobos, D. F. (2017). Contaminantes emergentes y su impacto en la salud.
- Santos, J. L., Aparicio, I., Alonso, E. y Callejón, M. (2005). Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase

extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors. *Analytica Chimica Acta*, 550(1-2), 116-122.

- Skoog, D., Crouch, S. R., Holler, F. J. y Anzures, M. B. (2008). *Principios de Análisis Instrumental - 5 Edición (Spanish Edition)*.
- Talib, A. y Randhir, T. O. (2017). Managing emerging contaminants in watersheds: need for comprehensive, systems-based strategies. *Sustainability of Water Quality and Ecology*, 9, 1-8.
- Tavares, C., & Sakata, R. K. (2012). Cafeína para el tratamiento del dolor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 62(3), 394-401.
- Togola, A. y Budzinski, H. (2008). Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, 1177(1), 150-158.
- Valls Puig, J. (2004). Extracción en fase sólida (SPE) para tratamiento de muestras de alimentos para análisis por cromatografía. Tesis de postgrado.
- Waters (2019). Recuperado de: [http://www.waters.com/waters/es\\_AR/Waters-Oasis-Sample-Extraction-SPE-products](http://www.waters.com/waters/es_AR/Waters-Oasis-Sample-Extraction-SPE-products)

**Anexos**

## 8. Anexos

### 8.1. Análisis estadístico

#### 8.1.1. Análisis de adsorbente

- Paracetamol

#### MEDIAS Y DESVÍOS

Cell No.	MÉTODO ADSORBENTE; Unweighted Means (DATOS MÉTODOS Y ADSORBENTES PAR.sta) Current effect; F(1,8)=6,6887, p=,03230 Effective hypothesis decomposition						
	MÉTODO	ADSORBENTE	%R Mean	%R Std.Err.	%R -95,00%	%R +95,00%	N
1	M1	Strata X	16,93171	2,380673	11,44187	22,4216	3
2	M1	Oasis HLB	75,61822	2,380673	70,12838	81,1081	3
3	M2	Strata X	48,21650	2,380673	42,72666	53,7063	3
4	M2	Oasis HLB	94,58898	2,380673	89,09914	100,0788	3

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

Effect	Univariate Tests of Significance for %R (DATOS MÉTODOS Y ADSORBENTES PAR.sta). Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. Of Freedom	%R Mean	%R Std.Err.	%R -95,00%
Intercept	41544,13	1	41544,13	2443,368	0,000000
MÉTODO	1894,22	1	1894,22	111,406	0,000006
ADSORBENTE	8278,04	1	8278,04	486,863	0,000000
MÉTODO*ADSORBENTE	113,73	1	113,73	6,689	0,032301
Error	136,02	8	17,00		

#### TEST TUCKEY

Cell No.	Tukey HSD test; variable %R (DATOS MÉTODOS Y ADSORBENTES PAR.sta) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error; Between MS=17,003, df=8,0000					
	MÉTODO	ADSORBENTE	{1} 16,932	{2} 75,618	{3} 48,217	{4} 94,589
1	M1	Strata X		0,000231	0,00027	0,000231
2	M1	Oasis HLB	0,000231		0,000389	0,002340
3	M2	Strata X	0,000270	0,000369		0,000231
4	M2	Oasis HLB	0,000231	0,002340	0,000231	

• Cafeína

**MEDIAS Y DESVÍOS**

CYM; Unweighted Means (Spreadsheet90) Current effect: F(3,6)=1,7060, p=,26429 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	CYM	DV_1 Mean	DV_1 Std.Err.	DV_1 -95,00%	DV_1 +95,00%	N
1	M1STX	71,14706	8,278019	35,52962	106,7645	3
2	M1OHLB	81,13281	3,955180	64,11504	98,1506	3
3	M2STX	75,74773	3,325296	61,44014	90,0553	3
4	M2OHLB	85,19977	1,464530	78,89840	91,5011	3

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

Repeated Measures Analysis of Variance (Spreadsheet90) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. Of Freedom	%R Mean	%R Std.Err.	%R -95,00%
Intercept	73583,54	1	73583,54	792,4231	0,001260
Error	185,72	2	92,86		
CYM	339,93	3	113,31	1,706	0,264290
Error	398,51	6	66,42		

**TEST TUCKEY**

Tukey HSD test; variable DV_1 (Spreadsheet90) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error; Between MS=66,419, df=6,0000					
Cell No.	CYM	{1} 71,147	{2} 81,133	{3} 75,748	{4} 85,200
1	M1STX		0,491774	0,896887	0,250152
2	M1OHLB	0,491774		0,848234	0,924922
3	M2STX	0,896887	0,848234		0,532041
4	M2OHLB	0,250152	0,924922	0,532041	



• Diclofenac

**MEDIAS Y DESVÍOS**

CYM; Unweighted Means (DIC ADSORBENTE Y MÉTODO.sta) Current effect: F(3,6)=1,2583, p=,36952 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	CYM	DV_1 Mean	DV_1 Std.Err.	DV_1 -95,00%	DV_1 +95,00%	N
1	M1STX	91,21767	8,371776	55,19682	127,2385	3
2	M1OHLB	74,14069	8,543094	37,38273	110,8987	3
3	M2STX	89,08856	6,730692	60,12873	118,0484	3
4	M2OHLB	95,90757	5,420442	72,58528	119,2298	3

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

Repeated Measures Analysis of Variance (DIC ADSORBENTE Y MÉTODO.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	92061,20	1	92061,20	4530,643	0,000221
Error	40,64	2	20,32		
CYM	796,41	3	265,47	1,258	0,369519
Error	1265,89	6	210,98		

**TEST TUCKEY**

Tukey HSD test; variable DV_1 (DIC ADSORBENTE Y MÉTODO.sta) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error; Between MS=210,98, df=6,0000					
Cell No.	CYM	{1} 91,218	{2} 74,218	{3} 89,089	{4} 95,908
1	M1STX		0,522130	0,997768	0,977248
2	M1OHLB	0,522130		0,616247	0,344037
3	M2STX	0,997768	0,616247		0,936100
4	M2OHLB	0,977248	0,344037	0,936100	

• Ibuprofeno

**MEDIAS Y DESVÍOS**

METODOCA; Unweighted Means (Spreadsheet1) Current effect: F(3,6)=1,3564, p=,34245 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	CYM	DV_1 Mean	DV_1 Std.Err.	DV_1 -95,00%	DV_1 +95,00%	N
1	M1STX	81,14333	3,292260	66,97788	95,3088	3
2	M1OHLB	79,59667	5,485679	55,99369	103,1996	3
3	M2STX	94,00000	5,507571	70,30284	117,6972	3
4	M2OHLB	90,66667	7,172478	59,80598	121,5273	3

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

Univariate Tests of Significance for %R (DATOS MÉTODOS Y ADSORBENTE IBU.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. Of Freedom	%R Mean	%R Std.Err.	%R - 95,00%
Intercept	92061,20	1,00	92061,20	563,7003	0,000000
MÉTODO	289,23	1	289,23	1,7710	0,219938
ADSORBENTE	78,92	1	78,92	0,4832	0,506647
MÉTODO*ADSORBENTE	428,26	1	428,26	2,6223	0,144031
Error	1306,53	8	163,32		

**TEST TUCKEY**

Tukey HSD test; variable %R (DATOS MÉTODOS Y ADSORBENTES IBU.sta) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error; Between MS=163,32, df=8,0000					
Cell No.	CYM	{1} 81,143	{2} 79,597	{3} 94,000	{4} 90,667
1	M1STX		0,412463	0,996797	0,967949
2	M1OHLB	0,412463		0,515569	0,236077
3	M2STX	0,996797	0,515569		0,911494
4	M2OHLB	0,967949	0,236077	0,911494	

### 8.1.2. Análisis del pH de la muestra

#### • Método 1 - Paracetamol

##### MEDIAS Y DESVÍOS

pH; Unweighted Means (pH MÉTODOS 1 PAR.sta) Current effect; F(2,4)=3,6471, p=,12543 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	pH	DV_1 Mean	DV_1 Std.Err.	DV_1 - 95,00%	DV_1 +95,00%	N
1	M1 pH=3	20,33333	1,666667	13,16225	27,50442	3
2	pH=7	20,66667	1,855921	12,68128	28,65205	3
3	pH=10	18,66667	0,881917	1,87208	22,46125	3

##### ANÁLISIS DE VARIANZA

Repeated Measures Analysis of Variance (pH MÉTODOS 1 PAR.sta). Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	3560,111	1	3560,111	186,2849	0,005325
Error	38,222	2	19,111		
PH	6,889	2	3,444	3,6471	0,125434
Error	3,778	4	0,944		

#### • Método 1 - Cafeína

##### MEDIAS Y DESVÍOS

pH; Unweighted Means (pH MÉTODOS 1 CF.sta) Current effect; F(2,4)=,68203, p=,55608 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	pH	DV_1 Mean	DV_1 Std.Err.	DV_1 -95,00%	DV_1 +95,00%	N
1	M1 pH=3	69,33333	43,47761	43,47761	95,18906	3
2	pH=7	67,33333	7,512952	35,00771	99,65896	3
3	pH=10	72,00000	5,507571	48,30284	95,69716	3

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Effect	Repeated Measures Analysis of Variance (pH MÉTODOS 1 CF.sta). Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	43541,78	1	43541,78	135,8793	0,007279
Error	640,89	2	320,44		
PH	32,89	2	16,44	0,6820	0,556075
Error	96,44	4	24,11		

#### • Método 1 - Diclofenac

### MEDIAS Y DESVÍOS

Cell No.	pH; Unweighted Means (pH MÉTODOS 1 DIC.sta) Current effect; F(2,4)=,68203, p=,55608 Effective hypothesis decomposition					
	pH	DV_1 Mean	DV_1 Std.Err.	DV_1 -95,00%	DV_1 +95,00%	N
1	M1 pH=3	119,3333	8,838049	81,30628	157,3604	3
2	pH=7	120,6667	7,666667	87,67966	153,6537	3
3	pH=10	119,33330	8,838049	81,30628	157,3604	3

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Effect	Repeated Measures Analysis of Variance (pH MÉTODOS 1 DIC.sta). Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	129120,4	1	129120,4	201,0874	0,004936
Error	1284,2	2	642,1		
PH	3,6	2	1,8	1,2308	0,383220
Error	5,8	4	1,4		

#### • Método 1 - Ibuprofeno

### MEDIAS Y DESVÍOS

Cell No.	pH; Unweighted Means (pH MÉTODOS 1 IBU.sta) Current effect; F(2,4)=2,5328, p=,19468 Effective hypothesis decomposition					
	pH	DV_1 Mean	DV_1 Std.Err.	DV_1 -95,00%	DV_1 +95,00%	N
1	M1 pH=3	77,3333	4,807402	56,64875	98,0179	3
2	pH=7	92	3,055050	78,85518	105,1448	3
3	pH=10	89,00000	6,506407	61,00519	116,9948	3

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Effect	Repeated Measures Analysis of Variance (pH MÉTODOS 1 IBU.sta). Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	66736,11	1	66736,11	812,7537	0,001228
Error	164,22	2	82,11		
PH	360,22	2	180,11	2,5328	0,194681
Error	284,44	4	71,11		

• Método 2 - Paracetamol

### MEDIAS Y DESVÍOS

Cell No.	pH; Unweighted Means (pH MÉTODOS 2 PAR.sta) Current effect; F(2,4)=3,8398, p=,11729 Effective hypothesis decomposition					
	pH	DV_1 Mean	DV_1 Std.Err.	DV_1 -95,00%	DV_1 +95,00%	N
1	M2 pH=3	47,66667	4,371626	28,85708	66,47625	3
2	pH=7	46,66667	6,333333	19,41653	73,91680	3
3	pH=10	27,00000	5,000000	5,48674	48,51326	3

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Effect	Repeated Measures Analysis of Variance (pH MÉTODOS 2 PAR.sta). Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	14721,78	1	14721,78	364,0000	0,002736
Error	80,89	2	40,44		
PH	814,89	2	407,44	3,8398	0,117291
Error	3,778	4	106,11		

• Método 2 - Cafeína

### MEDIAS Y DESVÍOS

Cell No.	pH; Unweighted Means (pH MÉTODOS 2 CF.sta) Current effect; F(2,4)=,09831, p=,90849 Effective hypothesis decomposition					
	pH	DV_1 Mean	DV_1 Std.Err.	DV_1 -95,00%	DV_1 +95,00%	N
1	M2 pH=3	96,66667	3,382964	82,11095	111,2224	3
2	pH=7	93,66667	7,423686	61,72512	125,6082	3
3	pH=10	95,33333	3,179797	81,65177	109,0149	3

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Effect	Repeated Measures Analysis of Variance (pH MÉTODOS 2 CF.sta). Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	81605,44	1	81605,44	885,9457	0,001127
Error	184,22	2	92,11		
PH	13,56	2	6,78	0,0983	0,908493
Error	275,78	4	68,94		

• Método 2 - Diclofenac

### MEDIAS Y DESVÍOS

Cell No.	pH; Unweighted Means (pH MÉTODOS 2 DIC.sta) Current effect; F(2,4)=,60484, p=,58952 Effective hypothesis decomposition					
	pH	DV_1 Mean	DV_1 Std.Err.	DV_1 -95,00%	DV_1 +95,00%	N
1	M2 pH=3	110,6667	2,962731	97,91906	123,4143	3
2	pH=7	105,6667	9,938701	62,90389	148,4294	3
3	pH=10	110,66670	4,371626	91,85708	129,4763	3

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Effect	Repeated Measures Analysis of Variance (pH MÉTODOS 2 DIC.sta). Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	106929,0	1	106929,0	359,6267	0,002769
Error	594,7	2	297,3		
PH	50,0	2	25	0,6048	0,589520
Error	165,3	4	41,3		

• Método 2 - Ibuprofeno

### MEDIAS Y DESVÍOS

Cell No.	pH; Unweighted Means (pH MÉTODOS 2 IBU.sta) Current effect; F(2,4)=,87948, p=,48243 Effective hypothesis decomposition					
	pH	DV_1 Mean	DV_1 Std.Err.	DV_1 -95,00%	DV_1 +95,00%	N
1	M2 pH=3	101,0000	5,000000	79,48674	122,5133	3
2	pH=7	90,6667	8,412953	54,46865	126,8647	3
3	pH=10	104,66670	6,333333	77,41653	13,9168	3

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Effect	Repeated Measures Analysis of Variance (pH MÉTODOS 2 IBU.sta). Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	87813,44	1	87813,44	1825,222	0,000547
Error	96,22	2	48,11		
PH	316,22	2	158,11	0,879	0,482427
Error	719,11	4	179,79		

#### • Método 3 - Paracetamol

### MEDIAS Y DESVÍOS

Cell No.	pH; Unweighted Means (pH MÉTODOS 3 PAR.sta) Current effect; F(2,4)=14,086, p=,01546 Effective hypothesis decomposition					
	pH	DV_1 Mean	DV_1 Std.Err.	DV_1 -95,00%	DV_1 +95,00%	N
1	M3 pH=3	44,00000	3,214550	30,16891	57,83109	3
2	pH=7	51,66667	0,881917	47,87208	55,46125	3
3	pH=10	54,66667	0,666667	51,79823	57,53510	3

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Effect	Repeated Measures Analysis of Variance (pH MÉTODOS 3 PAR.sta). Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	22600,11	1	22600,11	1037,760	0,000962
Error	43,56	2	21,78		
PH	181,56	2	90,78	14,086	0,015458
Error	25,78	4	6,44		

### TEST DE TUCKEY

Cell No.	PH	Tukey HSD test; variable DV_1 (pH MÉTODO 3 PAR.sta) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error; Between MS=6,4444, df=4,0000		
		{1} 44,000	{2} 51,667	{3} 54,667
1	M3 pH=3		0,044649	0,014907
2	pH=7	0,044649		0,403192
3	pH=10	0,014907	0,403192	

• Método 3 – Cafeína

**MEDIAS Y DESVÍOS**

pH; Unweighted Means (pH MÉTODOS 3 CF.sta) Current effect; F(2,4)=1,2727, p=,37346 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	pH	DV_1 Mean	DV_1 Std.Err.	DV_1 -95,00%	DV_1 +95,00%	N
1	M3 pH=3	96,3333	1,763834	88,74417	103,9225	3
2	pH=7	99,0000	1,527525	92,42759	105,5724	3
3	pH=10	104,3333	5,456802	80,85418	127,8125	3

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

Repeated Measures Analysis of Variance (pH MÉTODOS 3 CF.sta). Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	89800,11	1	89800,11	3272,069	0,000305
Error	54,89	2	27,44		
PH	99,56	2	49,78	1,273	0,373457
Error	156,44	4	39,11		

• Método 3 – Diclofenac

**MEDIAS Y DESVÍOS**

pH; Unweighted Means (pH MÉTODOS 3 DIC.sta) Current effect; F(2,6)=9,4381, p=,01403 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	pH	DV_1 Mean	DV_1 Std.Err.	DV_1 -95,00%	DV_1 +95,00%	N
1	M3 pH=3	92,0000	2,415229	84,31366	99,6863	4
2	pH=7	103,7500	1,701715	98,33438	109,1656	4
3	pH=10	91,0000	3,894440	78,60615	103,3938	4

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

Repeated Measures Analysis of Variance (pH MÉTODOS 3 DIC.sta). Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	109634,1	1	109634,1	2069,652	0,000023
Error	158,9	3	53,0		
PH	402,2	2	201,1	9,438	0,014032
Error	127,8	6	21,3		



### TEST TUCKEY

	Tukey HSD test; variable DV_1 (pH MÉTODO 3 DIC.sta) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error; Within MS=21,306, df=6,0000			
Cell No.	pH	{1} 44,000	{2} 51,667	{3} 54,667
1	M3 pH=3		0,026531	0,950086
2	pH=7	0,026531		0,018707
3	pH=10	0,950086	0,018707	

#### • Método 3 – Ibuprofeno

### MEDIAS Y DESVÍOS

	pH; Unweighted Means (pH MÉTODOS 3 IBU.sta) Current effect; F(2,6)=,32767, p=,73273 Effective hypothesis decomposition					
Cell No.	pH	DV_1 Mean	DV_1 Std.Err.	DV_1 -95,00%	DV_1 +95,00%	N
1	M3 pH=3	92,5000	8,995369	63,87272	121,1273	4
2	pH=7	100,5000	3,175426	90,39438	110,6056	4
3	pH=10	96,0000	5,000000	80,08777	111,9122	4

### ANÁLISIS DE VARIANZA

	Repeated Measures Analysis of Variance (pH MÉTODOS 3 IBU.sta). Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
Effect	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	111361,3	1	111361,3	1561,140	0,000036
Error	214,0	3	71,3		
PH	128,7	2	64,3	0,328	0,732726
Error	1178	6	196,3		

#### 8.1.3. Efecto de la materia orgánica soluble

##### • Paracetamol

### MEDIAS Y DESVÍOS

	H; Unweighted Means (PAR.sta) Current effect; F(3,6)=512,83, p=,00000 Effective hypothesis decomposition					
Cell No.	HÚMICOS	DV_1 Mean	DV_1 Std.Err.	DV_1 -95,00%	DV_1 +95,00%	N
1	H0	54,44814	0,682203	51,51286	57,38342	3
2	H1	48,88284	0,995537	44,59940	53,16629	3
3	H2	19,46402	0,943560	15,40421	23,52383	3
4	H3	15,88887	0,161974	15,19195	16,58579	3

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Effect	Repeated Measures Analysis of Variance (PAR.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	14424,91	1	14424,91	61921,44	0,000016
Error	0,47	2	0,23		
H	3531,40	3	1177,13	512,83	0,000000
Error	13,77	6	2,30		

### TEST TUCKEY

Cell No.	Tukey HSD test; variable DV_1 (PAR.sta) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error; Within MS=2,2954, df=6,0000				
	HÚMICOS	{1} 54,448	{2} 48,883	{3} 19,464	{4} 15,889
1	H0		0,016200	0,000245	0,000245
2	H1	0,016200		0,000245	0,000245
3	H2	0,000245	0,000245		0,098230
4	H3	0,000245	0,000245	0,098230	

- Caféina

### MEDIAS Y DESVIOS

Cell No.	H; Unweighted Means (CF.sta) Current effect; F(3,6)=,87950, p=,48733 Effective hypothesis decomposition					
	HÚMICOS	DV_1 Mean	DV_1 Std.Err.	DV_1 - 95,00%	DV_1 +95,00%	N
1	H0	98,5000	6,994045	76,24183	120,7582	4
2	H1	98,2500	1,931105	92,10436	104,3956	4
3	H2	102,2500	1,181454	98,49009	106,0099	4
4	H3	92,7500	3,092329	82,90883	102,5912	4

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Effect	Repeated Measures Analysis of Variance (CF.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	153468,1	1	153468,1	3368,298	0,000011
Error	136,7	3	45,6		
H	183,70	3	61,2	0,880	0,487332
Error	626,6	9	69,60		

### TEST TUCKEY

Tukey HSD test; variable DV_1 (CF.sta) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error; Within MS=69,618, df=9,0000					
Cell No.	HÚMICOS	{1} 98,500	{2} 98,250	{3} 102,250	{4} 92,750
1	H0		0,999973	0,917975	0,766942
2	H1	0,999973		0,902045	0,789033
3	H2	0,917975	0,902045		0,420014
4	H3	0,766942	0,789033	0,420014	

- Diclofenac

### MEDIAS Y DESVÍO

H; Unweighted Means (DIC.sta) Current effect; F(3,9)=,58213, p=,64148 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	HÚMICOS	DV_1 Mean	DV_1 Std.Err.	DV_1 - 95,00%	DV_1 +95,00%	N
1	H0	91,00000	3,894440	78,60615	103,3938	4
2	H1	88,00000	4,183300	74,68687	101,3131	4
3	H2	95,50000	2,256250	88,32478	102,6752	4
4	H3	91,50000	5,236093	74,83642	108,1636	4

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Repeated Measures Analysis of Variance (DIC.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	133956,0	1	133956,0	2066,159	0,000023
Error	194,5	3	64,8		
H	114,0	3	38,0	0,582	0,641482
Error	587,5	9	65,3		

### TEST TUCKEY

Tukey HSD test; variable DV_1 (DIC.sta) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error; Within MS=65,278, df=9,0000					
Cell No.	HÚMICOS	{1} 91,000	{2} 88,000	{3} 95,500	{4} 91,500
1	H0		0,999973	0,917975	0,766942
2	H1	0,999973		0,902045	0,789033
3	H2	0,917975	0,902045		0,420014
4	H3	0,766942	0,789033	0,420014	

• Ibuprofeno

**MEDIAS Y DESVÍOS**

Cell No.	H; Unweighted Means (IBU.sta) Current effect; F(3,9)=2,3213, p=,14360 Effective hypothesis decomposition					N
	HÚMICOS	DV_1 Mean	DV_1 Std.Err.	DV_1 - 95,00%	DV_1 +95,00%	
1	H0	96,0000	5,000000	80,08777	111,9122	4
2	H1	103,0000	7,035624	80,60951	125,3905	4
3	H2	97,2500	1,796988	91,53118	102,9688	4
4	H3	84,5000	0,250000	83,95439	85,5456	4

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

Effect	Repeated Measures Analysis of Variance (IBU.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	145161,0	1,0	145161,0	14762,14	0,000001
Error	29,5	3	9,8		
H	699,5	3	233,2	2,32	0,143595
Error	904,0	9	100,4		

**TEST TUCKEY**

Cell No.	Tukey HSD test; variable DV_1 (IBU.sta) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error; Within MS=100,44, df=9,0000				
	HÚMICOS	{1} 91,000	{2} 88,000	{3} 95,500	{4} 91,500
1	H0		0,759952	0,997965	0,431241
2	H1	0,759952		0,847726	0,113420
3	H2	0,997965	0,847726		0,348863
4	H3	0,431241	0,113420	0,348863	