Universidad de Carabobo
Dirección de Estudios de Postgrado
Facultad de Ingeniería
Doctorado en Ingeniería
Área: Ambiente

COMPORTAMIENTO AMBIENTAL DEL IBUPROFENO Y EL DICLOFENAC EN SUELOS VENEZOLANOS

Autora: *Angelina Correia de Soto*

Tutora: *Dra. Lily Marcano*

Bárbula, enero 2018

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE INGENIERIA
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
SECCIÓN DE GRADO

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE INGENIERIA
DIRECCION DE POSTGRADO

ACTA DE DISCUSIÓN DE TESIS DOCTORAL

En atención a lo dispuesto en los Artículos 147, 148 y 149 del Reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, quienes suscribimos como Jurado designado por el Consejo de Postgrado de la Facultad de Ingeniería, de acuerdo a lo previsto en el Artículo 146 del citado Reglamento, para estudiar la Tesis Doctoral titulada:

"COMPORTAMIENTO AMBIENTAL DEL IBUPROFENO Y EL DICLOFENAC EN SUELOS VENEZOLANOS"

Presentada para optar al grado de ***DOCTOR EN INGENIERÍA*** por el (la) aspirante:

ANGELINA CORREIA
V.- 7.088.133

Habiendo leído y escuchada la exposición, decidimos que la Tesis cumple con la rigurosidad académica y científica, por lo que se da por ***APROBADA.***

En Valencia, a los veintiocho (28) días del mes de Noviembre del año dos mil diecisiete.

Prof. Lily Marcano, Dra.
C.I.: 4.452.753

Prof. Yadira Martínez, Dra.
C.I.: 4.875.343

Prof. Celeste Ferrández, Dra.
C.I.: 5385887

Prof. Magaly Ruiz, Dra.
C.I.: 3.987.010

Prof. Carmen Rivero, Dra.
C.I.: 3436957

REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA UNIVERSIDAD DE CARABOBO Facultad de Ingeniería Dirección de Postgrado

FE: 08/11/2017/al.-

DEDICATORIA

A Dios, por darme la fortaleza y la sabiduría para seguir siempre adelante.

A mi esposo, José Gregorio y a nuestros hijos José Gabriel, Mariángela y Diego Jesús, por su amor y motivación.

A mi recordado padre, ejemplo de trabajo y honestidad.

A mis estudiantes, quienes me alientan a ser mejor profesionalmente.

Angelina

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Carabobo por brindarme la oportunidad y el apoyo económico para la realización de los estudios doctorales. A la Dirección General de Asuntos Profesorales de la Universidad de Carabobo, por la subvención otorgada para la compra de los reactivos y materiales necesarios para llevar a cabo la parte experimental de este trabajo.

A la Dra. Lily Marcano, por haber aceptado transitar conmigo este camino que comenzó con sólo una idea, pero que a través de su asesoría, dedicación y paciencia, se canalizó hacia los objetivos concretos plasmados en esta investigación. Gracias por contribuir a mi formación profesional y ser mi apoyo en los momentos difíciles.

Al Instituto de Edafología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela por haber permitido el uso de las instalaciones de los Laboratorios de Física, General y Fertilidad y Biología. Un especial agradecimiento a los profesores Dra. Adriana Florentino de Andréu, Dr. Ricardo Ramírez, Dr. Juan Carlos Aciego, Ing. Audry García e Ing. Adelardo Ospina, por las enseñanzas brindadas en la ciencia del suelo. De igual forma, al Ing. Julio Parra, la T.S.U. Ana Torres, T.S.U. Marilyn Aular y Sr. Ronanson Rosario, quienes con su mística de trabajo me brindaron las herramientas necesarias para la caracterización física, química y biológica del suelo, así como el muestreo del mismo.

A la Dra. Lisbeth Manganiello, jefe del Laboratorio de HPLC, por sus enseñanzas en análisis instrumental y facilitarme el uso del equipo cromatográfico. Gracias a su orientación, apoyo, confianza y estímulo, pude superar los momentos de angustia y decepción que se generaron en el establecimiento de las condiciones experimentales para lograr la separación cromatográfica.

Al Dr. Pablo Baricelli, Director del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo por facilitar el uso de las instalaciones y equipos. De igual forma, deseo expresar mi agradecimiento al personal técnico del CIQ, en especial al T.S.U. Carlos Osal por su ayuda incondicional en el

mantenimiento y reparación de equipos, así como a los T.S.U. Nancy Mendoza, Margarita Borusiak, Ofelia Omaña y Yonny González, por la asistencia técnica prestada.

Al Laboratorio de Investigación y Tecnología de Suelo y Ambiente (LITSA) de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo, donde se realizaron las extracciones de las muestras de suelo y los ensayos de adsorción. Especial agradecimiento a la Dra. Neudis Subero, jefe del LITSA, por su apoyo y sabios consejos en lo académico y en lo personal. A la T.S.U. Herminia Árvelo, por su amable colaboración en determinadas fases del trabajo experimental. Al Dr. Luis Medina, director del Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicada de la Universidad de Carabobo (CIMA-UC), por permitir el almacenaje de las muestras de suelo en el congelador del centro.

Al Comité doctoral integrado por las profesoras: Dra. Celeste Fernández y la Dra. Yadira Martínez, por sus valiosas observaciones en la corrección del manuscrito, compartiendo sus conocimientos con excelente atención y paciencia. De igual forma, a las profesoras: Dra. Ygmar Jiménez y Dra. Zulay Niño, por sus oportunas asesorías y, al Dr. Cristóbal Vega por su orientación en el tratamiento estadístico de los datos. Al Ing. Francisco Blazquez, por su apoyo desinteresado en el diseño de las estructuras de los compuestos y mejoramiento de la calidad de las figuras.

A mis amigos y compañeros de trabajo: Cristina De Sousa, Celeste Fernández, María Cristina Colmenares, Vanessa Altomare, Claudia Velazco, Mario Rosi, Carlos Osal, Carmelina Novellino y Mary Padilla, por su bella amistad y apoyo espiritual.

Finalmente, deseo agradecer a mi familia, sin su soporte esta meta no la hubiera alcanzado. Mi esposo José Gregorio y nuestros hijos José Gabriel, Mariángela y Diego Jesús, gracias por su amor, paciencia, plegarias, estímulo y colaboración con las tareas del hogar, durante este largo tiempo que estuve físicamente ausente y no disponible para ustedes, pero que en mi mente y en mi corazón siempre estuvieron presentes…

A todos mi más sincera gratitud, reconocimiento y respeto...

Angelina Correia

COMPORTAMIENTO AMBIENTAL DEL IBUPROFENO Y EL DICLOFENAC EN SUELOS VENEZOLANOS

RESUMEN

El alto consumo de analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos y su baja remoción en plantas de tratamientos de aguas residuales, trae como consecuencia que residuos de los mismos estén presentes en los efluentes y lodos, los cuales son fuentes importantes de introducción de compuestos farmacéuticos al suelo. El objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento ambiental del ibuprofeno y el diclofenac en dos suelos venezolanos, a través de la valoración del efecto de estos compuestos en la respiración y el carbono de la biomasa microbiana y estimación de la velocidad de degradación y capacidad de adsorción, con el fin de inferir el movimiento potencial de estos fármacos a través del perfil del suelo. Se seleccionaron suelos agrícolas de textura franca y características contrastantes de contenido de materia orgánica (2,30 y 4,38 %) y pH (5,11 y 6,83). La respiración se determinó siguiendo el desprendimiento de CO_2 y el carbono en la biomasa microbiana mediante el método de fumigación-extracción, ambos estudios con dosis de los compuestos de 1 y 5 mg Kg^{-1}suelo. La degradación de los compuestos se siguió a través de la determinación de la cantidad de los fármacos remanentes en los suelos en el tiempo, partiendo de una concentración inicial de 5 mg kg^{-1}suelo. Finalmente, se estimó la capacidad de adsorción de los compuestos en los suelos a través de isotermas de adsorción, las cuales se realizaron mediante pruebas por carga. Para cuantificar la cantidad remanente de los compuestos en el suelo se estableció un procedimiento en tres etapas: extracción asistida por ultrasonido, extracción en fase sólida y análisis por cromatografía. La determinación de la concentración de los compuestos en la solución acuosa, luego de los ensayos de adsorción, se llevó a cabo por medio de las dos últimas etapas anteriormente mencionadas. Para ambas metodologías se alcanzaron coeficiente de determinación superiores a 0,992, porcentajes de recuperación mayores al 91% y límites de cuantificación inferiores a 0,5 mg kg^{-1} (muestras de suelo) y de 0,3 mg L^{-1} (muestras acuosas). Los tratamientos con ibuprofeno y diclofenac provocaron un efecto estimulante sobre la actividad microbiana de ambos suelos y un aumento en la concentración de estos compuestos produjeron una reducción del efecto, que en algunos casos cambió a una condición de estrés; sin embargo, ninguna de las dosis ensayadas provocó inhibición de la respuesta microbiana. La velocidad de degradación de los fármacos se describió a través de una cinética de primer orden, y el diclofenac presentó, en ambos suelos, tiempos de vida media superiores al ibuprofeno; las velocidades de disipación de los dos compuestos fueron más altas en el suelo con mayor actividad microbiana. Los suelos evaluados presentaron mayor afinidad por el diclofenac (porcentajes de adsorción superiores al 60%), que por el ibuprofeno (porcentajes de adsorción inferiores al 40%). Los coeficientes de adsorción fueron mayores en el suelo con pH ácido, debido al incremento de la forma no disociada de los compuestos, lo cual favorece un mayor número de interacciones con las fracciones orgánicas del suelo. Según los índices de lixiviación evaluados, el ibuprofeno presentó un riesgo mayor de movilidad en los suelos y, la velocidad de migración de ambos compuestos fue superior en el suelo con mayor contenido de materia orgánica y pH neutro, donde la adsorción de estos compuestos fue menor.

Palabras clave: analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos, HPLC, adsorción, biodegradación, lixiviación.

ENVIRONMENTAL BEHAVIOR OF IBUPROFEN AND DICLOFENAC IN VENEZUELAN SOILS

ABSTRACT

The high consumption of non-steroidal anti-inflammatory analgesics and their low removal in wastewater treatment plants means that their residues can be found in the effluents and sludge, which constitute an important source of pharmaceutical compounds to the soil. The objective of this work was to evaluate the environmental behavior of ibuprofen and diclofenac in two Venezuelan soils, through the valuation of the effect of these compounds in the respiration and the microbial biomass carbon, and the estimation of the degradation velocity and adsorption capacity; with the objective of infer the potential movement of these compounds through the soil profile. The agricultural soils selected are loamy in texture and have contrasting characteristics of organic matter (2.30 y 4.38 %) and pH (5.11 y 6.83). The respiration was determined by observing the CO_2 generation and the microbial biomass carbon was determined by the fumigation-extraction method; both studies were conducted with compound doses of 1 and 5 mg Kg^{-1} of soil. The degradation of the compounds was monitored by the determination of the remaining medicaments in the soils with time, beginning with an initial concentration of 5 mg kg^{-1} of soil. Finally, the adsorption capacity of the compounds in the soils was estimated by adsorption isotherms, which were determined by batch tests. To determine the quantity of the remaining compounds in the soil a three-step procedure was set: ultrasound assisted extraction, solid phase extraction and chromatography analysis. The determination of the compound concentration in the aqueous solution, after the adsorption analysis, was done by the last two steps previously mentioned. In both methodologies, the determination coefficients were above 0.992, the recoveries were above 91% and the quantification limits were below 0.5 mg kg^{-1} (soil samples) and 0.3 mg L^{-1} (aqueous samples). The treatments with ibuprofen and diclofenac showed a stimulating effect on the microbial activity in both soils and the increasing in the concentration of these compounds showed a reduction of this effect, which in some cases, the effect changed to stress; however, none of the assay doses produced inhibition of the microbial response. The degradation velocity of the compounds was described by a first order kinetic while the diclofenac showed in both soils, half-live times higher than those of the ibuprofen; dissipation velocities of the two compounds were higher in the soil that showed higher microbial activity. The evaluated soils showed higher affinity for the diclofenac (adsorption percentage higher than 60%) compared with ibuprofen (adsorption percentage lower than 40%). Adsorption coefficients were higher in the soil that showed acid pH due to the presence of the non-dissociated form of the compounds, which promotes a higher number of interactions with the organic fraction of the soil. According to the determined lixiviation indexes, ibuprofen showed a higher mobility risk in the soils and the velocity of migration of both compounds was higher in the soil with the higher content of organic matter and neutral pH, where the adsorption of these compounds was lower.

Key words: non-steroidal anti-inflammatory analgesics, HPLC, adsorption, biodegradation, lixiviation.

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN 1
CAPÍTULO 1. EL PROBLEMA 6
1.1 Planteamiento del problema 6
1.2 Objetivos 7
1.3 Justificación 8
1.4 Alcance de la investigación 10
1.5 Aportes al conocimiento 10
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO 11
2.1 Antecedentes 11
2.2 Bases teóricas 15
2.2.1 Compuestos con actividad farmacológica 15
2.2.2 Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos 17
2.2.2.1 Ibuprofeno 20
2.2.2.2 Diclofenac 21
2.2.3 Estudios de ecotoxicidad del ibuprofeno y el diclofenac 23
2.2.4 Procesos de redistribución y acumulación de contaminantes en el suelo 26
2.2.5 Procesos de degradación biológica en el suelo 28
2.2.5.1 Respiración microbiana 32
2.2.5.2 Carbono en la biomasa microbiana 33
2.2.5.3 Cinética de la reacción de degradación 36
2.2.6 Biodegradación de AINE en el ambiente 39
2.2.7 Procesos de adsorción de contaminantes en el suelo 42
2.2.8 Potencial de lixiviación de contaminantes en el suelo 45
2.2.9 Evaluación analítica de fármacos en muestras acuosas y en suelo 48
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL 51
3.1 Reactivos, materiales y equipos 51
3.1.1 Reactivos y solventes 51
3.1.2 Materiales y equipos 51
3.2 Métodos 52
3.2.1 Selección de los suelos según sus propiedades físicas y químicas 52

3.2.1.1 Caracterización física y química de los suelos 53
3.2.2 Establecimiento del método analítico para la determinación de los CF 55
3.2.2.1 Procedimiento para muestras de suelo 55
3.2.2.2 Procedimiento para muestras acuosas 59
3.2.2.3 Establecimiento de los parámetros de desempeño de los métodos 60
3.2.3 Preparación del suelo para los estudios biológicos 66
3.2.4 Valoración del efecto de los CF en la actividad microbiana de los suelos 67
3.2.4.1 Respiración microbiana del suelo 68
3.2.4.2 Carbono de la biomasa microbiana 69
3.2.5 Descripción de la cinética de la reacción de degradación de los CF en los suelos 72
3.2.5.1 Esterilización de los suelos 74
3.2.5.2 Correlación entre los resultados de biodegradación y R_M y C_{BM} 74
3.2.6 Determinación de la capacidad de adsorción de los CF en los suelos 75
3.2.6.1 Preparación de las soluciones 75
3.2.6.2 Isotermas de adsorción 75
3.2.6.3 Determinación de los coeficientes de adsorción 76
3.2.7 Evaluación del comportamiento ambiental de los CF en los suelos estudiados 77
3.2.8 Análisis estadístico. 78
CAPÍTULO 4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS 79
4.1 Selección de los suelos de acuerdo sus propiedades físicas y químicas 79
4.1.1 Descripción de la zona de muestreo 79
4.1.2 Caracterización de los suelos preseleccionados 80
4.1.3 Caracterización física y química final de los suelos seleccionados 81
4.2 Establecimiento del método analítico para la determinación de los CF 86
4.2.1 Selección de las condiciones de operación en el HPLC-UV 86
4.2.2 Establecimiento del método para el análisis de los CF en muestras de suelo 90
4.2.2.1 Definición de las condiciones en la EAU 90
4.2.2.2 Selección de las condiciones en la EFS 91
4.2.2.3 Análisis cromatográfico del extracto del suelo 91
4.2.3 Establecimiento del método para el análisis de los CF en muestras acuosas 102
4.2.4 Establecimiento de los parámetros de desempeño de los métodos 105
4.2.4.1 Parámetros de calidad del método establecido para muestras de suelo 105
4.2.4.2 Parámetros de calidad del método establecido para muestras acuosas 113

4.3 Valoración del efecto de los CF en la actividad microbiana del suelo 122
4.3.1 Respiración microbiana de los suelos 122
4.3.2 Acumulación de CO_2 en el periodo de incubación 125
4.3.3 Carbono en la biomasa microbiana de los suelos 127
4.3.4 Cociente metabólico y análisis gráfico vectorial 129
4.4 Descripción de la cinética de degradación de los CF 134
4.4.1 Curvas de degradación de los compuestos 134
4.4.2 Cinética de degradación lineal de primer orden 136
4.4.3 Cinética de degradación no lineal de primer orden 141
4.4.4 Comparación de los estudios de degradación con la R_M y el C_{BM} 144
4.5 Determinación de la capacidad de adsorción de los CF en los suelos 146
4.5.1 Determinación del tiempo de equilibrio 146
4.5.2 Establecimiento de la relación suelo/solución 147
4.5.3 Isotermas de adsorción 149
4.6 Evaluación del comportamiento ambiental de los CF en los suelos 155
CONCLUSIONES 160
RECOMENDACIONES 161
REFERENCIAS 162
ANEXO A. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES 189
ANEXO B. INFORMACION COMPLEMENTARIA 192
ANEXO C. ANALISIS ESTADÍSTICO 201
ANEXO D. RESULTADOS DEL PROGRAMA ESTADÍSTICO 205

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Propiedades físicas, químicas y farmacológicas de los AINE en estudio. 19
Tabla 2.2 Especificaciones del cartuchos de extracción OASIS® HLB utilizado. 50
Tabla 3.1 Métodos empleados en la caracterización física de los suelos. 53
Tabla 3.2 Métodos utilizados en la caracterización química de los suelos. 54
Tabla 3.3 Tratamientos aplicados en los ensayos de respiración y C en biomasa microbiana. 68
Tabla 3.4 Tratamientos aplicados en los ensayos de cinética de degradación. 73
Tabla 4.1 Caracterización de los suelos preseleccionados. 80
Tabla 4.2 Caracterización física y química de los suelos seleccionados. 82
Tabla 4.3 Parámetros de humificación de los suelos. 86
Tabla 4.4 Solventes ensayados en las etapas de EAU, EFS y HPLC-UV 91
Tabla 4.5 Resultados del análisis cromatográfico del ensayo 5. 97
Tabla 4.6 Resultados del análisis cromatográfico del ensayo 5 empleando 1 mL de solvente de elución en la EFS y 10 g de suelo. 99
Tabla 4.7 Condiciones del método propuesto para la extracción, purificación y cuantificación de los CF en muestras de suelo (ensayos de degradación). 101
Tabla 4.8 Comparación de concentraciones del CF en la EFS empleada en los ensayos de degradación y adsorción. 103
Tabla 4.9 Resultados del análisis cromatográfico en la EFS en los ensayos de adsorción. 103
Tabla 4.10 Condiciones del método propuesto para la purificación y caracterización de los CF en muestras acuosas (ensayos de adsorción). 106
Tabla 4.11 Resultados de tiempo de retención y factor de resolución de las curvas de calibración en muestras de suelo. 110
Tabla 4.12 Evaluación de la exactitud y la precisión en la EFS de soluciones patrones con factor de concentración de 100. 111
Tabla 4.13 Evaluación de la exactitud y la precisión del método propuesto para la determinación del diclofenac y el ibuprofeno en muestras de suelo. 112
Tabla 4.14 Parámetros de desempeño del método propuesto para la determinación de diclofenac en muestras de suelo (usando el factor de concentración). 114
Tabla 4.15 Parámetros de desempeño del método propuesto para la determinación de ibuprofeno en muestras de suelo (usando el factor de concentración). 114
Tabla 4.16 Resultados de tiempo de retención y factor de resolución de las curvas de calibración en muestras acuosas. 118
Tabla 4.17 Evaluación de la exactitud y de la precisión en la EFS empleando soluciones patrones con factor de concentración de 33,333. 119
Tabla 4.18 Evaluación de la exactitud y de la precisión del método propuesto para la determinación de diclofenac e ibuprofeno en muestras acuosas en agitación con el suelo. 120
Tabla 4.19 Parámetros de desempeño del método propuesto para la determinación de diclofenac en muestras acuosas (usando el factor de concentración). 121
Tabla 4.20 Parámetros de desempeño del método propuesto para la determinación de ibuprofeno en muestras acuosas (usando el factor de concentración). 121
Tabla 4.21 Carbono en la biomasa microbiana del suelo SA expuesto a diferentes concentraciones de diclofenac e ibuprofeno. 128
Tabla 4.22 Carbono en la biomasa microbiana del suelo SC expuesto a diferentes concentraciones de diclofenac e ibuprofeno. 128
Tabla 4.23 Cociente metabólico del suelo SA expuesto a diferentes concentraciones de diclofenac e ibuprofeno. 130

Tabla 4.24 Cociente metabólico del suelo SC expuesto a diferentes concentraciones de diclofenac e ibuprofeno. 130
Tabla 4.25 Parámetros cinéticos derivados del ajuste a dos modelos de degradación de primer orden para suelos SA y SC..... 137
Tabla 4.26 Parámetros cinéticos derivados del ajuste a dos modelos de degradación de primer orden para suelos SAE y SCE..... 137
Tabla 4.27 Coeficiente de correlación entre el % de concentración del compuesto remanente en el suelo y las variables biológicas evaluadas. 144
Tabla 4.28 Parámetros de adsorción derivados de los modelos de Freundlich y el lineal..... 149
Tabla 4.29 Coeficientes de adsorción del ibuprofeno y el diclofenac en los suelos..... 152
Tabla 4.30 Resultados obtenidos aplicación la ecuación de Gustafson y factor de reparto. 155
Tabla 4.31 Coeficientes de correlación de Pearson entre las características de los suelos y resultados de los ensayos de degradación (modelo lineal) y de adsorción para el ibuprofeno..... 157
Tabla 4.32 Coeficientes de correlación de Pearson entre las características de los suelos y resultados de los ensayos de degradación (modelo lineal) y de adsorción para el diclofenac 157
Tabla A.1 Preparación de soluciones por dilución de la solución madre del CF para la elaboración de las curvas de calibración de la solución patrón. 189
Tabla A.2 Preparación de soluciones de trabajo por dilución de la solución madre del CF para la elaboración de las curvas de calibración en los ensayos de degradación y adsorción. 189
Tabla A.3 Cantidad de agua para el ajuste de humedad del suelo según su capacidad de retención hídrica. 190
Tabla A.4 Preparación de soluciones madre para los distintos ensayos realizados..... 190
Tabla A.5 Preparación de soluciones de trabajo por dilución de la solución madre del CF para la elaboración de las isotermas de adsorción. 191
Tabla B.1 Revisión bibliográfica de condiciones en el HPLC. 193
Tabla B.1 Revisión bibliográfica de condiciones en el HPLC (Continuación). 194
Tabla B.2 Revisión bibliográfica de condiciones en el LC/MS. 194
Tabla B.3 Resumen de las condiciones cromatográficas de los espectros presentados 198
Tabla B.4 Identificación de los grupos funcionales en los extractos de los suelso en el espectro infrarrojo. 200
Tabla C.1 Efecto del solvente utilizado en el ajuste de humedad sobre la respiración microbiana de los suelos. 201
Tabla C.2 Efecto del solvente utilizado en el ajuste de humedad sobre el carbono en la biomasa microbiana de los suelos. 201
Tabla C.3 Respiración basal de los suelos esterilizados (SAE y SCE). 201
Tabla C.4 Concentraciones remanentes de diclofenac e ibuprofeno en el suelo SA..... 202
Tabla C.5 Concentraciones remanentes de diclofenac e ibuprofeno en el suelo SC. 202
Tabla C.6 Concentraciones remanentes de diclofenac e ibuprofeno en el suelo SAE. 202
Tabla C.7 Concentraciones remanentes de diclofenac e ibuprofeno en el suelo SCE. 202
Tabla C.8 Prueba de múltiples rangos para determinar el tiempo de equilibrio. 203
Tabla C.9 Coeficientes de correlación de Pearson entre las características de los suelos y resultados de los ensayos de degradación (modelo no lineal de primer orden) y de adsorción para el ibuprofeno..... 204
Tabla C.10 Coeficientes de correlación de Pearson entre las características de los suelos y resultados de los ensayos de degradación (modelo no lineal de primer orden) y de adsorción para el diclofenac. 204

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Reacciones de transformación de compuestos farmacéuticos en el organismo..... 17
Figura 2.2 Esquema básico de inhibición de la síntesis de prostaglandinas por los AINE..... 18
Figura 2.3 Principales compuestos formados en las fases I y II del metabolismo del ibuprofeno. 21
Figura 2.4 Principales compuestos formados en la fase I del metabolismo del diclofenac. 22
Figura 2.5 Principales compuestos formados en la fase II del metabolismo del diclofenac. 23
Figura 2.6 Análisis gráfico de la respuesta biológica de los microorganismos. 36
Figura 2.7 Posibles productos de transformación del diclofenac por microorganismos. 40
Figura 2.8 Posibles productos de transformación del ibuprofeno por microorganismos. 41
Figura 3.1 Etapas involucradas en el análisis de muestras de suelo. 55
Figura 3.2 Esquema de la fase experimental de la extracción asistida por ultrasonido (EAU). 56
Figura 3.3 Esquema de la fase experimental de la extracción en fase sólida (EFS). 58
Figura 3.4 Etapas involucradas en el análisis de muestras acuosas. 60
Figura 4.1 Distribución del carbono orgánico total en los suelos SA y SC. 85
Figura 4.2 Cromatogramas de soluciones de diclofenac en diferentes solventes 88
Figura 4.3 Cromatogramas de soluciones de los CF a diferentes longitudes de onda. 89
Figura 4.4 Cromatogramas del diclofenac en metanol (5 mg L^{-1}) y extraído del suelo SA (5 mg Kg^{-1}suelo) utilizando metanol como solvente de elución (Ensayo 1). 92
Figura 4.5 Cromatogramas de diclofenac en fase móvil (5 mg L^{-1}) y extraído del suelo SA (5 mg Kg^{-1}suelo) en fase elución igual a la fase móvil (Ensayo 2). 94
Figura 4.6 Cromatogramas del diclofenac y el ibuprofeno extraídos de los suelos SA y SC (10 mg Kg^{-1}suelo) (Ensayo 5). 96
Figura 4.7 Cromatogramas de los CF extraídos de los suelos SA y SC (5 mg Kg^{-1}suelo), empleando 1 mL de solvente de elución. 100
Figura 4.8 Cromatogramas a una concentración de 5 mg L^{-1} en los ensayos de adsorción. 104
Figura 4.9 Curvas de calibración del diclofenac en solución patrón, suelo SA y suelo SC (Método de muestras de suelo). 108
Figura 4.10 Curvas de calibración del ibuprofeno en solución patrón, suelo SA y suelo SC (Método de muestras de suelo). 109
Figura 4.11 Curvas de calibración del diclofenac en solución patrón, suelo SA y suelo SC (Método de muestras de acuosas). 116
Figura 4.12 Curvas de calibración del ibuprofeno en solución patrón, suelo SA y suelo SC (Método de muestras acuosas). 117
Figura 4.13 Respiración basal del suelo SA expuesto a diferentes concentraciones de diclofenac e ibuprofeno 123
Figura 4.14 Respiración basal del suelo SC expuesto a diferentes concentraciones de diclofenac e ibuprofeno. 124
Figura 4.15 Respiración acumulada para el suelo SA en presencia de diferentes concentraciones del diclofenac y el ibuprofeno. 125
Figura 4.16 Respiración acumulada para el suelo SC en presencia de diferentes concentraciones del diclofenac y el ibuprofeno. 126
Figura 4.17 Análisis gráfico vectorial del efecto del diclofenac e ibuprofeno sobre la actividad microbiana de los suelos. 132
Figura 4.18 Curvas de degradación del diclofenac y el ibuprofeno en el suelo SA y suelo SA esterilizado (SAE). 135
Figura 4.19 Curvas de degradación del diclofenac y el ibuprofeno en el suelo SC y suelo SC esterilizado (SCE). 135

Figura 4.20 Curvas parabólicas de segundo orden del carbono en la biomasa microbiana en función del % de concentración residual del compuesto en el suelo. 145
Figura 4.21 Capacidad de adsorción en los suelos SA y SC de los CF a través del tiempo de contacto con la solución. 147
Figura 4.22 Capacidad de adsorción en los suelos SA y SC de los CF respecto a la relación suelo/solución. 148
Figura 4.23 Isotermas de adsorción del ibuprofeno en los suelos. 150
Figura 4.24 Isotermas de adsorción del diclofenac en los suelos. 150
Figura B.1 Efecto de la esterilización en la respiración microbiana de los suelos SA y SC. 192
Figura B.2 Curvas de absorbancia de los fármacos en diferentes solventes a 10 mg L^{-1}. 195
Figura B.3 Efecto del volumen de inyección en algunas características del pico cromatogáfico: área, ancho y tiempo de retención. 196
Figura B.4 Curvas de absorbancia de los CF en la matriz de los suelos, en solución de fase elución (patrón) y ésta sometida a EFS. 197
Figura B.5 Espectros infrarrojos de las fracciones de suelo solubles en metanol 199

INTRODUCCIÓN

Los productos farmacéuticos pertenecen a un grupo amplio y diverso de compuestos usados para prevenir, aliviar y curar enfermedades, con un consumo en constante aumento, debido principalmente al incremento de la población mundial, al desarrollo de nuevos fármacos y al acceso a medicamentos genéricos de menor costo. La evaluación tradicional de los riesgos asociados al uso de medicamentos incluye los efectos adversos después de su ingesta o aplicación. Sin embargo, durante décadas, la comunidad científica no había considerado los potenciales riesgos ambientales de los fármacos, cuyo continuo consumo ha traído como consecuencia que residuos de los mismos se detecten en el ambiente.

El consumo de los fármacos se considera una de las principales fuentes de entrada de compuestos farmacéuticos (CF) al ambiente, ya que después de su absorción en el organismo, los mismos son metabolizados y excretados, lo que conlleva a una descarga de mezclas complejas de ingredientes activos y sus productos de degradación (metabolitos) en las redes cloacales y, finalmente en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR). En función a las características particulares del compuesto y de los mecanismos de eliminación dominantes en las PTAR, el fármaco puede ser adsorbido en los lodos o distribuido en la fase acuosa dónde es parcialmente removido, por lo que una fracción del mismo es liberada en el efluente y, posteriormente vertidas a los cuerpos de agua (Suárez et al., 2008).

En este sentido, estudios realizados han reportado la presencia de CF en los efluentes de PTAR en América (Spongberg & Witter, 2008; Estados Unidos), (Lee et al. 2005; Canadá), (Stumpf et al., 1999; Brasil) (Correia y Marcano, 2016b; Venezuela); en Europa (Heberer, 2002; Alemania), (Gómez et al., 2007, España), (Roberts & Thomas, 2006; Reino Unido), y en Asia (Sui et. at., 2010; China), (Han et al. 2006; Corea del Sur), (Nakada et al., 2006; Japón). De igual forma se han detectado fármacos en aguas superficiales (Hughes et al., 2012), agua de mar (Weigel, 2003) y agua potable (Benotti et al., 2009), sólo para referenciar algunos de los cientos de trabajos publicados, los cuales han venido en constante incremento desde el año 2000.

La reutilización de aguas residuales con fines de riego, así como la incorporación de lodos como enmiendas orgánicas representan vías importantes de introducción de CF al suelo, que por escorrentía e infiltración pueden llegar a las aguas superficiales (Topp et al., 2008). Es importante resaltar, que la utilización de estos recursos con fines agrícola tiene ciertas limitaciones debido a la presencia de microorganismos patógenos en los mismos, y al contenido de metales pesados y contaminantes orgánicos que pudieran contener (Bouwer, 2000). En este sentido, se han detectado CF en aguas subterráneas de suelos regados con efluentes residuales (Karnjanapiboonwong et al., 2011) y en suelos que han utilizado biosólidos como enmiendas orgánicas (Kinney et al., 2006). Igualmente, el estiércol puede contener residuos de CF, lo que resulta en grandes cantidades dispuestas sobre el suelo debido a las altas dosis de fármacos utilizadas en animales (Martínez-Carballo et al., 2007). En Venezuela, hay estudios que evidencian el reúso en agricultura de aguas residuales tratadas (Trujillo et al., 2000; Araujo y Araujo, 2011) y no tratadas (Ruiz y Paolini, 2004), así como de lodos residuales (Martínez, 2008) y estiércol como abono agrícola (Arrieche y Mora, 2005). Sin embargo, y al igual que en otros países de América Latina, estas prácticas se encuentran muy poco documentadas oficialmente (CEPIS, 2004). Hasta la fecha, los trabajos publicados en Venezuela no se han enfocado en la detección de CF en aguas de riego y lodos.

Otra fuente de introducción de CF al ambiente es el descarte inadecuado de medicamentos vencidos o sin uso, por el desagüe o con la basura común, alcanzando de esta forma las aguas residuales o los vertederos municipales, respectivamente. Glassmeyer et al. (2009) determinaron que el 54% de los medicamentos no usados en Estados Unidos fueron dispuestos junto con la basura común y un 35% en el desagüe, lo que indica que el descarte de productos farmacéuticos con los residuos domésticos representa una vía importante de contaminación del suelo que requiere mayor atención. En función a esta alta proporción de medicamentos descartados hacia los rellenos sanitarios, Masoner et al. (2014) realizaron un estudio en varios vertederos municipales en los Estados Unidos, y detectaron la presencia de hasta ochenta (80) CF en el lixiviado sin tratar, cuyas concentraciones fueron significantemente mayores a las encontradas en los lixiviados de los vertederos que poseen sistemas de tratamiento de dichos lixiviados (Masoner et al., 2016). Los autores

concluyeron, que la presencia de productos farmacéuticos en el flujo de los residuos domésticos y, la disposición final de lodos residuales en rellenos sanitarios, son las principales razones por las cuales algunos CF han sido detectados en lixiviados de vertederos municipales.

En Venezuela, en un trabajo realizado por Correia y Marcano (2016a) estimaron que el 88% de los medicamentos descartados son dispuestos en la basura y, 12% por el desagüe, debido principalmente a la falta de programas de recolección de los residuos farmacéuticos en el municipio estudiado. En el Estado Carabobo, el sitio más importante de disposición final de los desechos sólidos es el vertedero La Guásima, asentado en la Cuenca de Pao Cachinche, que no cuenta con revestimientos de protección ni sistemas de recolección de lixiviados, por lo que, según un estudio realizado por Polo y Guevara (2001), se están movilizando contaminantes orgánicos e inorgánicos hacia las aguas subterráneas del sector. Así mismo, en una caracterización realizada por Reina (2011) en lixiviados del relleno sanitario de La Bonanza, ubicado en el Estado Miranda, se detectaron varios compuestos orgánicos entre ellos un CF, el ibuprofeno.

Como se aprecia, la relevancia de esta problemática ambiental radica en las distintas fuentes de contaminación del suelo por fármacos. Adicionalmente, los productos farmacéuticos cubren una amplia gama de compuestos con diferentes propiedades físicas, químicas y biológicas, de uso continuo, ya que la humanidad, a lo largo de su historia, ha pensado en su bienestar y en aumentar su expectativa de vida. Con este fin, se han desarrollado diferentes medicamentes clasificados según su acción terapéutica. Entre los CF más utilizados destacan los analgésicos y anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), que constituyen uno de los grupos farmacológicos con el más alto consumo mundial (Conaghan, 2012), razón por la cual la comunidad científica ha centrado sus esfuerzos en la detección de los AINE en el ambiente, por lo que es el grupo farmacológico más estudiado y detectado en PTAR (Correia y Marcano, 2015; Strauch, 2011) y en el segundo lugar de reportes de estudios ecotoxicológicos, luego de los antibióticos (Santos et al., 2010).

En Venezuela, los AINE también presentan un consumo elevado debido a su triple acción farmacológica: analgésica, antiinflamatoria y antipirética. Por otra parte, son considerados los fármacos con mayor automedicación debido principalmente a que son comercializados sin prescripción médica (Ortega y Navas, 2015), y es uno de los grupos terapéuticos de mayor frecuencia de uso a nivel doméstico (Correia y Marcano, 2016a). En cuanto a los AINE de mayor consumo, según información suministrada por un importante laboratorio farmacéutico del estado Carabobo, el acetaminofén, ibuprofeno y diclofenac presentan la mayor demanda, seguidos del ketoprofeno y naproxeno. Esta información fue corroborada a través de la consulta a dos asociaciones farmacéuticas, CAVEME (Cámara Venezolana del Medicamento) y CIFAR (Cámara de la Industria Farmacéutica) y a diferentes droguerías y redes de farmacias ubicadas en el Municipio Valencia del estado Carabobo, debido a la falta de datos disponibles por parte de los entes oficiales.

Es importante destacar, que según un monitoreo realizado en una PTAR a nivel nacional, se detectó la presencia de ibuprofeno, acetaminofén y diclofenac en el afluente, en concentraciones medias de 20, 14 y 8 µg L^{-1}, respectivamente. Con respecto al efluente, el acetaminofén se encontró por debajo del límite de detección del método, mientras que el ibuprofeno y diclofenac arrojaron porcentajes de remoción de la fase acuosa de 79 % y 49 %, respectivamente (Correia y Marcano, 2016b). Estos resultados muestran que estos dos CF no son completamente removidos en la PTAR, ya que son resistentes a los procesos convencionales de regeneración de aguas residuales, lo cual está en concordancia con otros trabajos publicados a nivel internacional (Miège et al., 2009). Es por ello, que dichos fármacos pueden continuar dispersándose en el ambiente a través de la descarga de las aguas residuales y lodos a tierras agrícolas, en cuyo caso el problema no se elimina sino que pasa de un compartimiento ambiental a otro: del agua al suelo. Los pocos estudios internacionales disponibles indican que el ibuprofeno y el diclofenac se han encontrado en suelos (Li, 2014; Chen et al., 2011; Karnjanapiboonwong et al., 2011), donde pueden permanecer adsorbidos (Chefetz et al., 2008), degradados por acción de los microorganismos (Lin & Gan, 2011) o ser tan móviles que alcancen las aguas subterráneas (Scheytt et al., 2006).

La posibilidad de ocurrencia de cualquiera de estos procesos, depende marcadamente del comportamiento ambiental del CF en el suelo, entendiéndose como tal los distintos mecanismos biológicos, químicos y físicos (principalmente degradación y adsorción) responsables de la reducción de la concentración del CF en la fase líquida del suelo, provocando así una disminución de su movimiento a través del perfil del suelo. Estos mecanismos de atenuación están fuertemente influenciado por las características del suelo (actividad biológica, materia orgánica, pH, textura) y las propiedades intrínsecas de los fármacos (estructura molecular, solubilidad, hidrofobicidad, constante de acidez, toxicidad) (Jjembra, 2008).

La presente investigación evalúa el comportamiento ambiental del ibuprofeno y diclofenac en dos suelos con diferente contenido de materia orgánica y pH. Los procesos de adsorción y degradación de estos compuestos no han sido evaluados en suelos venezolanos, cuyos resultados permiten la estimación del tiempo de vida media y la capacidad de adsorción en los suelos, como indicadores de la lixiviación potencial de estos fármacos.

Para realizar una adecuada valoración de la problemática derivada de la presencia de CF en el suelo, se requiere contar con métodos analíticos confiables. En los últimos años se ha incrementado el desarrollo de métodos de análisis de CF en aguas residuales, aguas superficiales y en menor grado en el suelo. Las técnicas instrumentales más utilizadas son la Cromatografía Líquida (LC) y Cromatografía Gaseosa (GC), acoplados a detectores selectivos de masa (MS). La disponibilidad de estos equipos para fines de investigación en Venezuela es limitada debido a los costos de adquisición y mantenimiento. Sin embargo, la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés) con detector UV, constituye una alternativa de análisis de CF en muestras ambientales y, por ello, se empleó en este estudio. Debido a las bajas concentraciones ambientales y a la complejidad de la matriz del suelo, se requirió de etapas previas que permitieran purificar el compuesto para su posterior análisis instrumental. Por ello, se establecieron dos metodologías para la determinación de los fármacos, en muestras acuosa y en suelo, según los estudios a evaluar, empleando procesos de extracción en fase sólida (EFS) y finalmente determinación analítica por HPLC-UV.

CAPÍTULO 1. EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

El incremento de la población mundial ha originado un aumento en la producción y el consumo de fármacos que son utilizados ampliamente en medicina humana y veterinaria. El uso continuo de CF ha traído como consecuencia que residuos de los mismos entren en el ambiente y puedan alcanzar diferentes compartimientos ambientales, como cuerpos de agua y suelo.

El crecimiento de la población trae consigo también una mayor demanda de agua y de alimentos para satisfacer las necesidades básicas de los seres vivos. En los últimos años, debido a la creciente escasez de agua para consumo humano, se ha promovido la reutilización de efluentes residuales con fines de riego en campos agrícolas, lo que permite aprovechar los nutrientes que contiene y mejorar así el rendimiento de los cultivos.

Recientemente, se ha demostrado que muchos CF no son completamente degradados en PTAR, por lo que se distribuyen entre el efluente y los lodos. Entre los CF más utilizados en Venezuela destacan los AINE, y son de relevancia ambiental el ibuprofeno y el diclofenac que han sido detectados en aguas residuales tratadas de una instalación ubicada en la zona central del país. Debido al empleo en Venezuela de técnicas de reutilización de aguas residuales como agua de riego y de lodos como abono, tales fármacos pueden ser introducidos al suelo. Por otra parte, existe una insuficiencia en el sistema de recolección de las aguas residuales en el Estado Carabobo (Hidrocentro, 2012), además de un déficit en el tratamiento de las aguas residuales que si son recolectadas a nivel municipal y nacional (Alcaldía de Valencia, 2008; VITALIS, 2013), que causan contaminación ambiental por las descargas directas de estas aguas sin ningún tratamiento en los cauces naturales y en el suelo.

Debido a lo anterior y a la carencia de estudios previos en Venezuela, se evaluó el comportamiento ambiental del ibuprofeno y del diclofenac en dos suelos venezolanos, a fin

de analizar su movilidad y su incidencia en la contaminación potencial de las aguas subterráneas. Para ello se valoró el efecto de estos fármacos en la actividad microbiana de dos suelos, medidos en términos de respiración y carbono asociado a la biomasa microbiana. Por otra parte, se busca conocer cómo serán los mecanismos de atenuación de estos CF en dos suelos venezolanos con diferente contenido de materia orgánica y pH, ya que estas variables influyen marcadamente en los procesos de degradación y adsorción de compuestos orgánicos en el suelo (Muller et al., 2006).

1.2 Objetivos

Objetivo general

Evaluar el comportamiento ambiental del ibuprofeno y el diclofenac en dos suelos venezolanos, determinando su efecto en las comunidades microbianas, cinética de degradación e isotermas de adsorción.

Objetivos específicos

1. Seleccionar los suelos de acuerdo a sus propiedades físicas y químicas.
2. Establecer el método analítico para la determinación de los compuestos farmacéuticos en muestras de suelo y muestras acuosas mediante extracción en fase sólida (EFS) y Cromatografía de Alto Rendimiento (HPLC) con detector UV.
3. Valorar el efecto de los fármacos en la actividad microbiana de los suelos, en términos de respiración y carbono asociado a la biomasa microbiana.
4. Describir la cinética de degradación de los compuestos farmacéuticos en los suelos bajo estudio.
5. Determinar la capacidad de adsorción de los fármacos en los suelos, mediante la elaboración de las isotermas de adsorción.

6. Evaluar el comportamiento ambiental de los compuestos farmacéuticos en los suelos, en función de los parámetros de adsorción y degradación estimados.

1.3 Justificación

Los productos farmacéuticos aplicados en medicina humana y veterinaria son usados en grandes volúmenes a nivel nacional. Según la Cámara Venezolana del Medicamento (CAVEME, 2010), para el año 2010 se vendieron 450 millones de unidades, lo cual representó un consumo per cápita de 19, comparado con el consumo promedio de 9 de los cuatros principales mercados de la región (Brasil, México, Argentina y Colombia). A pesar que para el año 2014 se reportó un incremento, con 700 millones de unidades de medicamentos vendidas, según la Cámara Venezolana de Droguerías (CAVEDRO), para el año 2015 se registró una caída del 35%, con 500 millones de unidades vendidas, y estimaron una reducción mayor para el 2016, debido a los problemas de adquisición de divisas por parte de la industria farmacéutica (Marcano, 2016). Pese a las actuales dificultades en la adquisición de medicamentos, el consumo de AINE en Venezuela continúa siendo alto, ya que los mismos son ampliamente utilizados por la población para atender dolencias menores, además de que son dispensados sin orden médica.

En Venezuela, los niveles de calidad de las aguas destinadas a usos agropecuarios se encuentran regulados por ciertos estándares que fijan los valores mínimos para organismos coliformes, metales, sólidos totales disueltos y biocidas (Decreto No. 883, 1995). Sin embargo, no existe un marco legal para la reutilización de aguas residuales en la agricultura, refiriéndose en muchos casos, a las normas internacionales (U.S. EPA, 2004; WHO, 2006). Al contrario de los contaminantes orgánicos convencionales (herbicidas y fungicidas), cuyos riesgos están bien establecidos, la mayoría de los contaminantes emergentes tales como los CF, están poco estudiados y por tanto no se han establecidos aún criterios de calidad ambiental. Es por ello, que se requiere ampliar las investigaciones en el suelo, especialmente enfocadas en técnicas de purificación y métodos de análisis, mecanismos de transformación y transporte, valoración de efectos ecológicos y humanos potenciales, entre otros.

La preocupación creciente sobre los posibles riesgos ambientales de los medicamentos, ha llevado a los países desarrollados a establecer legislaciones que incluyan la evaluación ambiental a todo medicamento de nuevo desarrollo, como complemento a la valoración de seguridad para paciente (FDA, 1998; EMEA 2006). Además de ensayos ecotoxicológicos, dichas evaluaciones también incluyen estudios sobre la distribución ambiental del fármaco, específicamente ensayos de adsorción y biodegradación en suelos. La importancia en la identificación de tales riesgos, ha sido reconocida por Agencia de Protección Ambiental y del Servicio Geológico del Departamento de Interior de los Estados Unidos (U.S. EPA, 2014; USGS, 2016), al ubicar los estudios sobre CF en el ambiente, entre las líneas estratégicas de investigación de estas agencias, a fin de proteger el ecosistema y la salud humana.

Los medicamentos son elaborados para interactuar con receptores celulares a bajas concentraciones y provocar efectos biológicos específicos. Sin embargo, también pueden interactuar con otros receptores que poseen vías metabólicas similares a la de los humanos, al estar estas sustancias liberadas en el ambiente. El mecanismo de acción terapéutica de los AINE se debe a la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX) que catalizan la síntesis de diferentes prostaglandinas que tienen importantes funciones en el organismo. Las prostaglandinas se forman en una amplia gama de invertebrados (peces, moluscos, artrópodos), por lo que la presencia de trazas de estos inhibidores de la COX en el agua puede potencialmente tener un efecto en la vida acuática (Fent et al., 2006). Los datos más difundidos son los de toxicidad aguda en organismos acuáticos, y son escasos los trabajos sobre los efectos que a largo plazo pudieran provocar los AINE, así como su toxicidad sobre los organismos terrestres (Santos et al., 2010). Esto es de relevancia ambiental y se amerita de más estudios sobre el transporte y transformación de los CF en suelo, ya que los mismos pueden afectar posteriormente a la comunidad microbiana del suelo (Gielen et al. (2011), ser absorbido por las plantas (Tanoure et al., 2012; Wu et al., 2010) o alcanzar las aguas subterráneas (Oppel et al., 2004).

1.4 Alcance de la investigación

Se busca evaluar, bajo condiciones controladas de laboratorio, el comportamiento ambiental del ibuprofeno y diclofenac en dos suelos venezolanos, valorando su efecto en la respiración y el carbono de la biomasa microbiana, velocidad de degradación e isotermas adsorción, con el fin de inferir el movimiento potencial de estos compuestos a través del perfil del suelo.

1.5 Aportes al conocimiento

La presente investigación presenta aportes al conocimiento desde el punto de vista teórico y metodológico. En cuanto al valor teórico, los procesos de degradación y adsorción de compuestos farmacéuticos, específicamente del ibuprofeno y el diclofenac, no han sido evaluados en suelos venezolanos, por lo que se considera un área de investigación emergente en el país, cuyos resultados permiten establecer las relaciones existentes entre las características del suelo y las propiedades físicas y químicas del CF, en los mecanismos de atenuación de estos compuestos en el suelo, principalmente en los procesos de degradación y adsorción.

En cuanto al aporte metodológico, se establecen dos procedimientos para la determinación de ibuprofeno y diclofenac, en muestras de suelo (ensayos de degradación) y en muestras acuosas (ensayos de adsorción). Tales procedimientos se basan en estudios internacionales de determinación CF en suelo, pero adaptados a los reactivos, materiales y equipos disponibles para llevar a cabo la investigación. Por otra parte, la purificación de las muestras y el método de determinación analítico toman en cuenta las características propias de los suelos venezolanos seleccionados, enfocándose en aquellas variables que permitan, en la medida de la posible, minimizar las interferencias de compuestos orgánicos presentes en una matriz tan compleja como el suelo.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

En la siguiente sección se presentan trabajos previos relacionados con la temática en estudio, que permitieron la comparación de los resultados obtenidos, así como la revisión de las distintas técnicas de análisis de CF en el suelo y en muestras acuosas.

En investigaciones recientes, Cycoń et al. (2016) evaluaron el impacto de cuatro AINE de alto consumo en Polonia (diclofenac, naproxeno, ibuprofeno y ketoprofeno) sobre la actividad de los microorganismos de un suelo (pH neutro y CO: 1,1%), aplicados a dos dosis de concentración (1 y 10 mg Kg^{-1}suelo). Para ello, determinaron algunas parámetros tales como: respiración inducida por sustrato, actividades enzimáticas del suelo, cambios en las tasas de nitrificación y amonificación y cuantificación del número de bacterias y hongos. En general, los resultados mostraron un efecto estimulante significativo de los AINE sobre la actividad microbiana, que fue mayor a la concentración del AINE más alta estudiada. El número de bacterias y hongos heterótrofos aumentó significativamente durante el experimento, que atribuyeron a una evolución de los microorganismos que fueron capaces de degradar los AINE y utilizarlos como una fuente adicional de carbono y energía. Sin embargo, al comienzo del experimento se observó un efecto inhibidor de naproxeno, ibuprofeno y ketoprofeno sobre las variables estudiadas, que fueron transitorios a la menor dosis estudiada.

Así mismo, Gielen et al. (2011) estudiaron el efecto de altas dosis (1g Kg^{-1} suelo) de cincos CF (paracetamol, aspirina, carbamazepina, clorpromazina y tetraciclina) sobre algunas propiedades microbianas del suelo, tales como respiración, carbono en biomasa microbiana y estructura de las comunidades. Para ello, se evaluaron dos suelos, uno irrigado durante 12 años con efluentes residuales y otro no irrigado, en dos periodos de tiempo (3 y 13 días). Los suelos seleccionados (Nueva Zelanda) presentan textura franco arenosa con pH cercanos a la neutralidad y carbono elemental entre 5,0-6,5%. A través del análisis gráfico vectorial, los autores concluyeron que la mayoría de los CF investigados produjeron un

estrés en la comunidad microbiana, a juzgar por el aumento de la respiración, disminución del carbono de la biomasa y alteraciones en la utilización de los sustratos. El riego prolongado con efluentes residuales, alteró la huella genética de las comunidades microbianas y, mitigó su respuesta a la exposición a altos niveles de los compuestos farmacéuticos.

Por otra parte, Grossberger et al. (2014) evaluaron la biodegrabilidad de varios CF entre ellos el ibuprofeno y el diclofenac en suelos agrícolas ubicados en Kiryat Gat, Israel, con diferente contenido de MO (1,2 – 2,8 %) y pH básico (8,1). Los CF fueron extraídos de los suelos después de cada tiempo de incubación a través de un sistema de extracción acelerada por solvente (Acetonitrilo:Agua, 70:30 v/v) seguido del análisis cromatográfico por LC-MS. Los resultados se ajustaron al modelo de decaimiento exponencial de primer orden e indicaron una rápida degradación biológica de estos compuestos con tiempos de vida medias entre 1 y 8 d (diclofenac) y entre 3 y 16 d (ibuprofeno). También se obtuvo una reducción en la velocidad de degradación con el aumento de la concentración inicial de los CF de 0,05 mg Kg^{-1} a 5 mg Kg^{-1}. Finalmente, concluyeron que las propiedades físicas y químicas de los CF produjeron mayor efecto en la cinética de biodegradación que las características propias del suelo.

Cabe citar el trabajo de Carter et al. (2014), quienes utilizaron dos modelos cinéticos (modelo lineal de primer orden y modelo no lineal de primer orden) para evaluar la velocidad de degradación de seis CF, entre ellos el diclofenac, en un suelo arenoso del sur de Australia (pH: 6 y CO: 1%). Los CF se cuantificaron en el suelo después de un proceso de extracción, purificación y análisis instrumental empleando LC con doble detector tándem (MS/MS). La velocidad de disipación del diclofenac siguió una cinética lineal de primer orden en muestras de suelo con tiempos de vida media y DT_{90} de 0,5 d y 1,64 d, respectivamente. A diferencia del comportamiento en el suelo, la disipación del diclofenac en el agua de los poros siguió un modelo no lineal con valores de DT_{50} de 20 d y DT_{90} de 7 años. Esto revela que la tasa del cambio en la concentración del diclofenac no fue directamente proporcional a la cantidad del CF remenente en el agua de los poros.

En cuanto a los estudios de adsorción, González-Naranjo et al. (2013) determinaron la movilidad del ibuprofeno en suelos mediante ensayos por carga. Para ello, seleccionaron suelos pertenecientes a una estación experimental de Sevilla, España, de pH básico y con contenido de CO entre 0,9 - 1,7 %. La concentración del ibuprofeno se determinó por HPLC con detector UV. Los autores establecieron que la ecuación de Freundlich es el modelo que mejor describe la adsorción de ibuprofeno en los suelos, en comparación con la ecuación de Langmuir y la isoterma lineal, obteniendo constantes de linealidad entre 0,93-1,32. Además, encontraron que el ibuprofeno se adsorbe moderadamente en los suelos estudiados, con coeficientes de distribución de carbono orgánico (K_{OC}) que oscilan entre 140 y 230 L kg^{-1}.

Estevez et al. (2014) también examinaron el comportamiento de adsorción del ibuprofeno en suelos volcánicos de islas del Archipiélago Canario de pH básico y contenido de MO entre 0,7 - 4,0 %. El ibuprofeno fue cuantificado en los suelos empleando la técnica de HPLC con detector UV/VIS. Se realizaron pruebas por carga a escala de laboratorio trabajando con altas concentración del compuesto (hasta 200 mg L^{-1}), lo que permitió medir la capacidad máxima de adsorción a partir de la ecuación de Langmuir, concluyendo que este modelo puede ser utilizado en sitios donde ocurra una descarga accidental de una alta concentración del compuesto. El coeficiente de distribución (calculado en el rango de concentración menor a 20 mg L^{-1} donde las isotermas tuvieron un comportamiento lineal) y el factor de retardo variaron entre 0,04 - 0,5 kg L^{-1} y entre 1,2 - 1,9, respectivamente. Estos valores bajos obtenidos sugieren un riego potencial de lixiviación y contaminación de las aguas subterráneas.

Es importante destacar, dos investigaciones donde llevaron a cabo conjuntamente ensayos de degradación y adsorción en suelo. Primeramente, Lin y Gan (2011) evaluaron estos procesos en algunos fármacos, entre ellos tres AINE (diclofenac, ibuprofeno y naproxeno) en dos suelos de regiones áridas de Nevada, Estados Unidos, de pH básico, contenido bajo de carbono orgánico (<1%) y texturas diferentes. Se utilizó un sistema de EFS y LC-MS/MS como técnica de análisis. El naproxeno mostró una fuerte sorción en los suelos, mientras que la adsorción del diclofenac y el ibuprofeno fue insignificante en ambos suelos.

Bajo condiciones aeróbicas, los AINE fueron susceptibles a la degradación microbiana con tiempos de vida media que variaron de 5 a 69 d, estimados a través de un modelo cinético de primer orden. En el caso específico del diclofenac, el tiempo de vida media fue de 5 y 30 d, mientras que el ibuprofeno alcanzó valores de 10 y 15 d, y la persistencia de ambos compuestos mayor en el suelo con más alto contenido de carbono orgánico.

De igual forma en China, Xu et al. (2009c) valoraron, bajo condiciones de laboratorio, los procesos de adsorción y degradación de tres AINE (diclofenac, ibuprofeno y naproxeno) en suelos de pH neutro y contenido de CO entre 0,3-3,2 %. La cuantificación de los fármacos se realizó empleando un sistema de EFS seguido del análisis instrumental por GC-MS. Las isotermas de adsorción se ajustaron a la ecuación de Freundlich, y se obtuvo el siguiente orden de adsorción en el suelo: naproxeno > diclofenac > ibuprofeno. Por otra parte, la velocidad de degradación de los compuestos estudiados fue descrita con un modelo lineal de primer orden, con tiempos de vida media de 3 a 20 d y 1 a 6 d, para el diclofenac y el ibuprofeno, respectivamente. La estimación del factor de retardo sugiere que el ibuprofeno tiene un alto riesgo de lixiviación en los suelos evaluados en comparación con los otros compuestos estudiados.

Para el análisis de fármacos en el suelo, se requiere de métodos confiables de extracción y purificación, ya que los componentes propios o intrínsecos de matrices complejas como el suelo, pueden enmascarar e interferir en la respuesta de los compuestos de interés en el análisis cromatográficos. En este sentido, Xu et al., 2008 establecieron un método para la determinación de algunos CF en muestras de suelo, entre ellos algunos AINE como el ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno y diclofenac. La metodología consistió en una extracción asistida por ultrasonido y posterior EFS. Luego de un proceso de derivatización, los analitos fueron cuantificados por GC-MS. Se ensayaron diferentes solventes extractores (acetona, metanol, acetato de etilo, diclometano) y se obtuvieron los mejores resultados con la mezcla acetona-acetato de etilo, con porcentajes de recuperaciones de los compuestos en el rango de 64 a 111%. El método fue empleado para el análisis de muestras de suelo de un campo de golf regado con el efluente de una PTAR de la zona, donde se detectó ácido

clofíbrico, ibuprofeno, naproxeno, triclosán, bisfenol A, y estrona en el rango de 0,5-9,0 ng g^{-1} suelo seco.

De manera similar, Yu y Wu (2012) desarrollaron un método analítico para la determinación de algunos productos farmacéuticos y de cuidado personal, ellos el ibuprofeno y el diclofenac, pero en lodos de PTAR. El procedimiento fue semejante al anteriormente descrito pero utilizaron como solvente de extracción metanol al 1% de ácido fórmico. Los porcentajes de recuperación obtenidos estuvieron entre 58 a 103 % y límites de cuantificación entre 4,7 a 39 ng g^{-1}suelo. El método fue aplicado a una muestra de lodo de PTAR domésticas ubicadas en California, Estados Unidos, encontrándose los compuestos evaluados en el rango de 1502 a 5327 ng g^{-1} de lodo, por lo que recomiendan la disposición adecuada de dichos lodos a fin de evitar la propagación de la contaminación.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Compuestos con actividad farmacológica

Un fármaco (del griego *phármakon:* medicamento, remedio), es aquella sustancia químicamente definida que tras ser administrado a un ser vivo es capaz de producir un efecto biológico, beneficioso o tóxico, según la dosis suministrada (Urbano, 2011). Por otra parte, se define como medicamento a toda sustancia y sus asociaciones y combinaciones, destinadas a prevenir, diagnosticar, aliviar o curar enfermedades en humanos y animales, a los fines de controlar sus estados fisiológicos o fisiopatológicos (Ley de Medicamentos, 2000). El término droga se prefiere utilizar para definir sustancias de abuso o de uso ilícito, generalmente asociada a un riesgo de dependencia. En tanto que fármaco y medicamento se suelen emplear como sinónimos.

Los CF experimentan en el organismo una serie de procesos, que han sido resumidos con las siglas *LADME*: *L*iberación, *A*bsorción, *D*istribución, *M*etabolismo y *E*xcreción. Una vez administrado el fármaco, se produce la liberación del principio activo de la forma farmacéutica en que se encuentra y, posteriormente se absorbe atravesando las membranas celulares para alcanzar el torrente sanguíneo. De allí se distribuye a los distintos órganos y

tejidos donde se producirá la acción farmacológica. Posteriormente, ocurren los procesos de metabolismo y excreción, los cuales son aspectos fundamentales para explicar la presencia de CF en el ambiente.

El metabolismo implica la biotransformación del fármaco, dando origen a sustancias diferentes denominadas metabolitos, los cuales pueden tener una actividad igual o distinta al fármaco original (metabolito activo) o bien carecer de actividad farmacológica (metabolito inactivo). Los procesos metabólicos transforman los fármacos liposolubles en sustancias más polares, con grupos ionizables que favorece su solubilidad en agua y reduce su difusibidad a través de las membranas, características que hacen que el metabolismo sea un proceso fundamental, tanto para condicionar la actividad farmacológica del medicamento, como para favorecer su eliminación. Todos los tejidos tienen la capacidad de metabolizar los fármacos, no obstante, el hígado es el principal órgano donde se transforman los fármacos y otros xenobióticos (Urbano, 2011). Existen ciertos factores que, en general, afectan la capacidad del organismo de metabolizar los fármacos, tales como factores fisiológicos (edad, sexo, embarazo, dieta), patológicos (enfermedades hepáticas, renales, trastornos endocrinos) y ambientales (interacción con otros fármacos, tabaco, café, alcohol, estrés, contaminación). En la mayoría de los fármacos, las reacciones metabólicas ocurren en dos fases secuenciales: Fase I y II (Pascuzzo-Lima, 2008), a saber:

- *Reacciones de Fase I (reacciones de degradación):* Reacciones de óxido-reducción e hidrólisis que convierten las moléculas liposolubles en otras más polares debido a la presencia de grupos funcionales como alcohol, ácido carboxílico, sulfhídrico y amino.

- *Reacciones de Fase II (reacciones de conjugación):* Son aquellas en las cuales el fármaco o los metabolitos generados en la fase I, se combinan enzimáticamente con sustancias endógenas del cuerpo (ácidos, aminoácidos) para formar compuestos de mayor polaridad que facilitan su eliminación. Las reacciones de la fase II más importante son la conjugación con ácido glucurónico (glucuronidación) seguidos por la sulfonación, la acetilación, la conjugación con glutatión y la conjugación con aminoácidos.

Finalmente, ocurre la excreción que es un proceso irreversible mediante el cual un fármaco, sus metabolitos y los compuestos de conjugación formados, son eliminados del organismo. Las principales vías de excreción son la vía renal o urinaria y la vía biliar. El porcentaje de excreción, como fármaco inalterado, va a depender del grado de metabolismo sufrido. En este sentido, algunos fármacos no sufren cambios metabólicos, o muy pocos, por lo tanto se excretan total o mayormente en su estado original, sin modificaciones. Como se aprecia en la figura 2.1, en la excreción pueden estar presentes el principio activo no metabolizado, los metabolitos y los compuestos de conjugación formados con ellos.

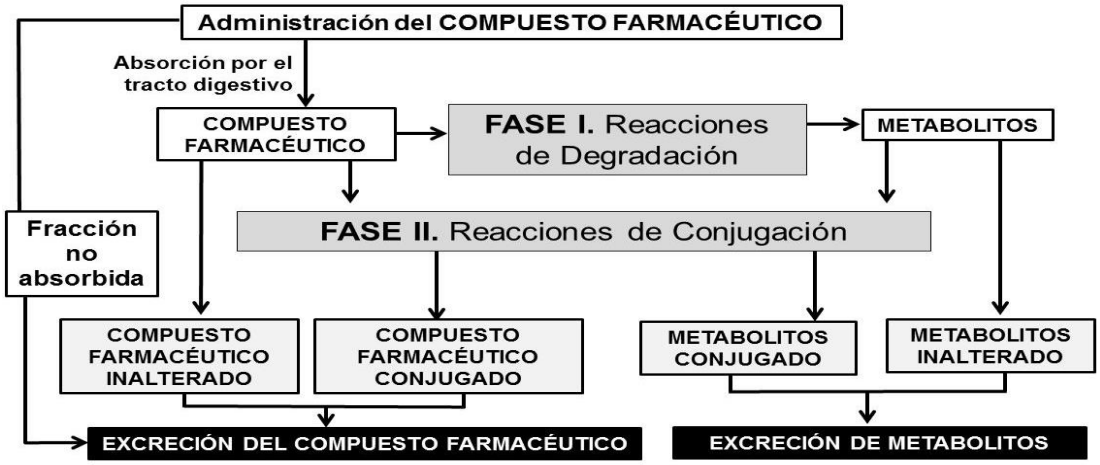


Figura 2.1 Reacciones de transformación de compuestos farmacéuticos en el organismo.

Fuente: Adaptado de Besse et al., 2008.

Existen varias clasificaciones para los medicamentos, siendo la más comúnmente usada aquella que se basa en las principales acciones farmacológicas o usos terapéuticos de los mismos, tales como analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), antibióticos, anticonvulsionantes, antihipertensivos, reguladores de lípidos, entre otros. A continuación se detallan las características generales de los AINE, así como las principales propiedades físicas, químicas y farmacológicas del ibuprofeno y el diclofenac.

2.2.2 Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) constituyen uno de los grupos de fármacos de mayor consumo en todo el mundo (Madridejos, 2012). Se utilizan principalmente en el

tratamiento de la inflamación, dolor y edema, así como también en las osteoartritis, artritis reumatoides y disturbios musculoesqueléticos (Batlouni, 2010).

Según Conoghan (2012), el mecanismo de acción de los AINE fue descrito por primera vez en 1971 cuando Vane y Piper demostraron que este grupo de fármacos inhiben la biosíntesis de prostaglandinas evitando la unión del ácido araquidónico al sitio activo de la enzima ciclooxigenasa (COX). El ácido araquidónico sirve de sustrato para dos vías enzimáticas: ciclooxigenasa (COX) y lipooxigenasa (Figura 2.2). Por la vía de la COX, el primer producto que se forma es la endoperóxido prostanglandina PgG_2, el cual se convierte en PgH_2 y sirve de sustrato para la síntesis del resto de las prostanglandinas y tromboxanos. Por la vía de la lipoxigenasa se forman leucotrienos, lipoxinas y otros productos (Batlouni, 2010).

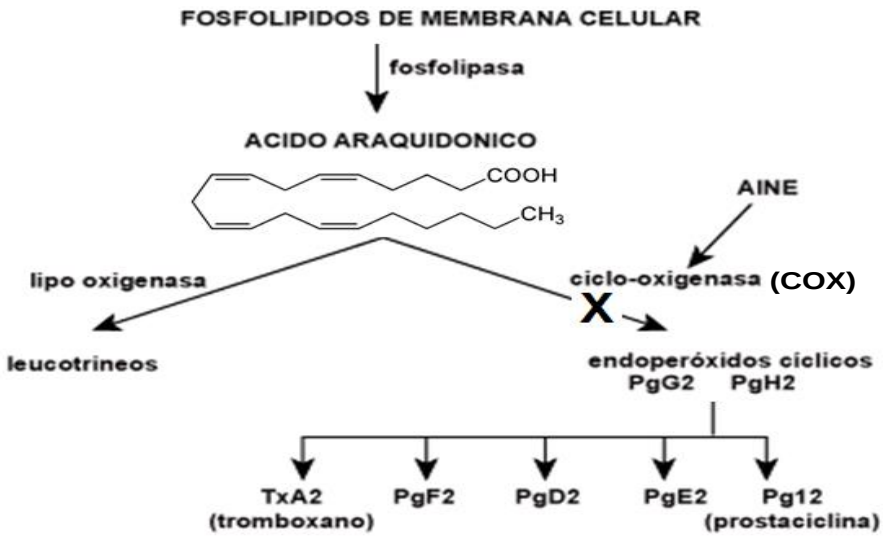


Figura 2.2 Esquema básico de inhibición de la síntesis de prostaglandinas por los AINE.
Fuente: Adaptado de Dagnino y González, 1994.

La enzima COX existe en dos isoformas: COX-1, caracterizada en 1976, y el gen de la isoenzima COX-2 que se descubrió más tarde en 1991 (Conaghan, 2012). La COX-1 se encuentra en forma permanente en la mayoría de los tejidos del organismo (especialmente riñón y tracto gastrointestinal), por lo que se denomina constitutiva, mientras la COX-2 es principalmente inducida en las inflamaciones.

Como se mencionó anteriormente, los AINE objeto de estudio son el ibuprofeno y diclofenac, y se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción en inhibidores no selectivos de la actividad enzimática tanto de la isoforma COX-1 como la COX-2, pero en diferentes grados. Tanto el ibuprofeno y diclofenac son ácidos débiles debido a la presencia en su estructura del grupo carboxílico, cuya proporción de ionización va a depender de su respectivo pKa y del pH del medio. Ambos se caracterizan por su baja solubilidad en agua (Tabla 2.1), por lo que usualmente se formulan como sales de sodio o potasio con el fin de aumentar su disolución y así, su capacidad de absorción. El diclofenac presenta una menor solubilidad en agua y, por tanto, un mayor valor de coeficiente de liposolubilidad también conocido como cociente de partición octanol/agua ($\log K_{OW}$), que indica la distribución de un fármaco entre la grasa y el fluido acuoso corporal (Urbano, 2011). Este coeficiente ($\log K_{OW}$), inicialmente introducido por la industria farmacéutica, también es usado para predecir las características lipofílicas de un compuesto y por tanto su adsorción en la materia orgánica preveniente de lodos residuales, sedimentos y suelos.

Tabla 2.1 Propiedades físicas, químicas y farmacológicas de los AINE en estudio.

CARACTERÍSTICAS	**AINE**	
Denominación Común Internacional (DCI)	Ibuprofeno	Diclofenac
Fórmula molecular	$C_{13}H_{18}O_2$	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$
Peso molecular (g mol^{-1})	206,28	296,15
Punto de fusión (^oC)	75 - 77	283 - 285
Solubilidad en agua (mg L^{-1}) a 25^oC	21	2,37
Constante de disociación (pKa)	5,20	4,15
Coeficiente de partición octanol/agua ($\log K_{OW}$)	3,80	4,71
Dosis clínica (mg d^{-1})	1200 - 3000	100 - 150
Biodisponibilidad (%)	80	50 - 60
Vida media (h)	2	2
Volumen de distribución (L kg^{-1})	0,15	0,15
Unión a proteínas plasmáticas (%)	99	99
Eliminación renal (%)	80	65
Excreción como fármaco inalterado (%)	10	15

Fuente: Conaghan, 2012; Wishart et al. 2006; Jjembra, 2006.

2.2.2.1 Ibuprofeno

El ibuprofeno es un AINE perteneciente al subgrupo de los derivados del ácido propanoico, y es probablemente la molécula más estudiada clínicamente entre todos los AINE. Es considerado un medicamento esencial según el listado de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2015), lo cual significa que es fármaco básico, que cubre las necesidades prioritarias de la población en general y por lo tanto, debe ser accesibles en todo momento. Se utiliza como antipirético y para el tratamiento sintomático del dolor de cabeza, dolor dental, dolor muscular, molestias de la menstruación (dismenorrea), dolor neurológico de carácter leve y dolor postquirúrgico. También se usa para tratar cuadros inflamatorios en pacientes con artritis. Sus efectos antipiréticos se deben a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas hipotalámicas, dando como resultado un aumento del flujo sanguíneo periférico, vasodilatación, y la disipación de calor posterior. Presenta una relación dosis respuesta de comportamiento lineal que facilita enormemente su manejo clínico (Bejarano, 2006).

La absorción del ibuprofeno es casi completa por vía oral, mientras que se absorbe de forma lenta e irregular por la vía rectal. La unión a las proteínas plasmáticas es alta (Tabla 2.1), lo que condiciona la distribución del fármaco en los diferentes tejidos y funciona como órgano de reserva, desde el cual el principio activo se va liberando a medida que disminuye la concentración del fármaco en el torrente sanguíneo (Urbano, 2011).

El ibuprofeno es ampliamente metabolizado en el hígado y como resultado de las reacciones de oxidación de la fase I, se obtienen cuatro metabolitos: 1-hidroxi-ibuprofeno, 2-hidroxi-ibuprofeno y 3-hidroxi-ibuprofeno (productos de la hidroxilación alifática del grupo isobutilo) y carboxi-ibuprofeno (producto de la oxidación del 3-hidroxi-ibuprofeno). Todos estos metabolitos carecen de actividad farmacológica, siendo los productos mayoritarios el 2-hidroxi-ibuprofeno y el carboxi-ibuprofeno, pues se encuentran en la orina en altas concentraciones (Figura 2.3). La glucuronidación es la reacción de fase II más importante en el metabolismo del ibuprofeno en humanos, en consecuencia, se obtienen otros tres posibles productos: un glucurónido del derivado hidroxilado del ibuprofeno, un glucurónido del carboxiibuprofeno y otro glucurónido del propio ibuprofeno

sin modificar (Nortes, 2014). La eliminación del ibuprofeno del organismo tiene lugar principalmente a nivel renal, donde un 10% se excreta en forma inalterada y el resto en forma de metabolitos, principalmente conjugados como glucurónidos.

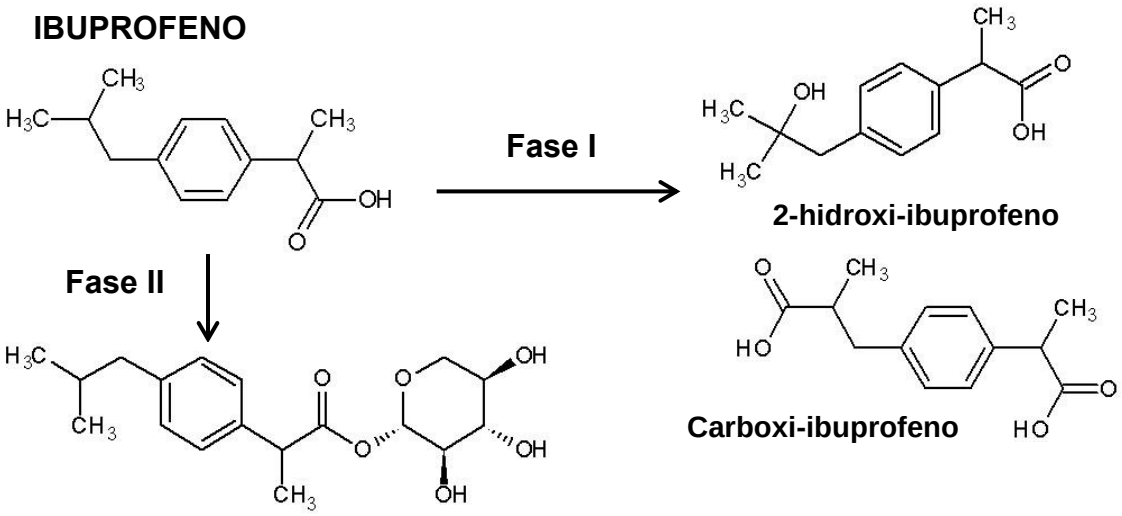


Figura 2.3 Principales compuestos formados en las fases I y II del metabolismo del ibuprofeno.

Fuente: Adaptado de Weigel, 2003.

2.2.2.2 Diclofenac

El diclofenac según su estructura molecular pertenece a la categoría de derivados del ácido fenilacético y como el resto de los AINE, su acción terapéutica consiste en el alivio del dolor y la inflamación. Se utiliza principalmente para tratar los síntomas de artritis (osteoartritis y artritis reumatoide), lumbalgia, esguinces musculares, torceduras, dismenorrea, migrañas, cálculos renales y vesiculares, inflamación ocular, entre otros (Medizzine, 2015).

Su mecanismo de acción es similar a los otros AINE inhibiendo ambas isoformas de la enzima ciclooxigenasa (COX), bloqueando de este modo la conversión de ácido araquidónico a prostanglandinas inductoras de la inflamación. El diclofenac posee una preferencia moderada a bloquear la isoenzima COX-2, y se cree que por eso posee una baja

incidencia de efectos gastrointestinales adversos, en comparación con los mostrados por otros AINE. Por otra parte, existen evidencias de que el diclofenac inhibe las funciones de la lipooxigenasa (Figura 2.2), por lo que reduce la formación de leucotrienos, consideradas sustancias pro-inflamatorias, lo cual explica su alta eficiencia.

El diclofenac, se metaboliza en el hígado y sufre en la fase I reacciones de hidroxilación, tanto en el anillo diclorofenil como en el anillo fenil acético (Figura 2.4). En el primer caso, se forman dos metabolitos: 4-hidroxi-diclofenac (considerado el principal) y 3-hidroxi-diclofenac; y en el segundo caso se genera dos más: 5-hidroxi-diclofenac y 4,5-dihidroxi-diclofenac (usando como sustrato al 4 y 5 hidroxi-diclofenac). Estos compuestos, al igual que el fármaco inalterado, posteriormente pasan a la fase II donde experimentan principalmente reacciones de glucuronidación y en menor grado sulfoconjugación (Kim et al., 2016). En el diclofenac las reacciones de conjugación ocurren en el grupo carboxílico del anillo fenilacético, mientras que sus metabolitos reaccionan por el grupo hidroxi del anillo diclorofenil (Figura 2.5).

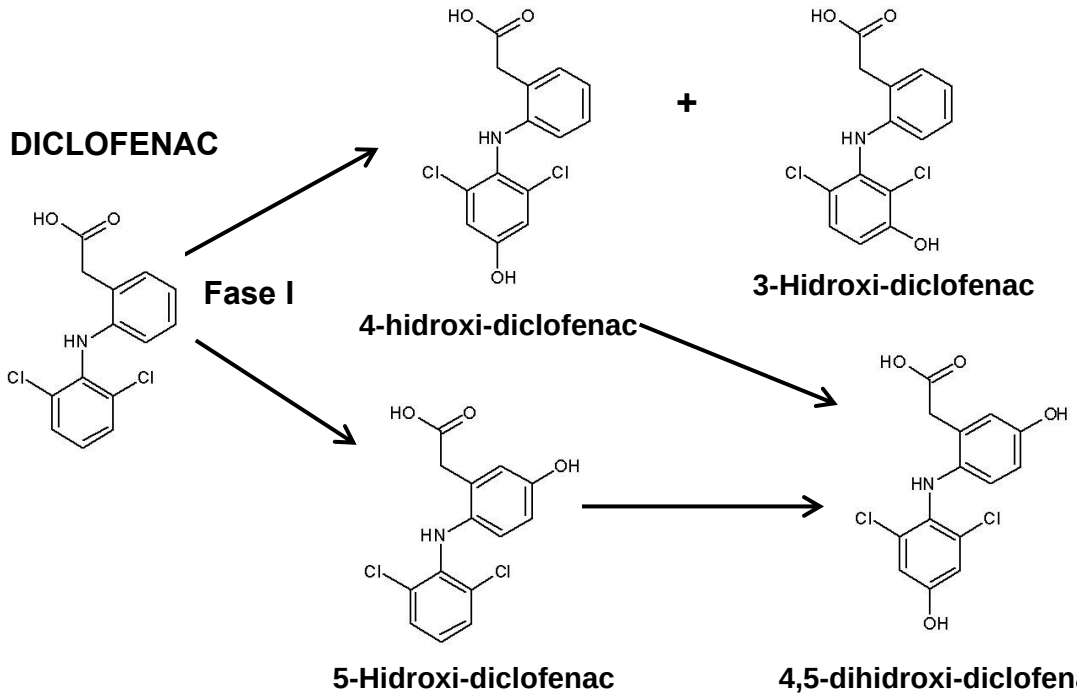


Figura 2.4 Principales compuestos formados en la fase I del metabolismo del diclofenac.

Fuente: Adaptado de Wishart et al., 2006; Kim et al., 2016.

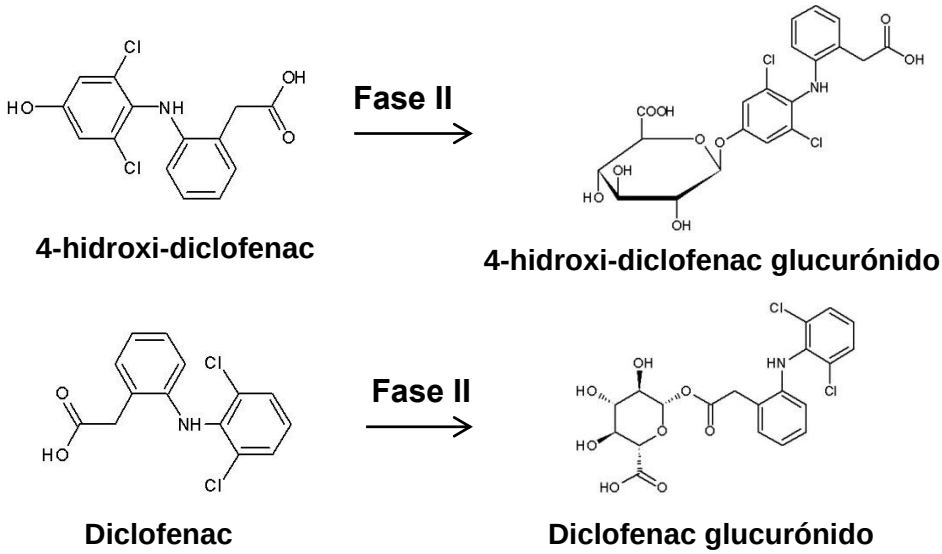


Figura 2.5 Principales compuestos formados en la fase II del metabolismo del diclofenac.
Fuente: Adaptado de Wishart et al., 2006; Kim et al., 2016.

El diclofenac, en sus presentaciones sódica o potásica, se absorbe completamente en el tracto gastrointestinal y, entre un 50-60% de la dosis suministrada, alcanza la circulación sistémica (Tabla 2.1) y de allí se distribuye a los sitos dónde producirá el efecto farmacológico. También se administra vía rectal y percutánea, sin embargo, las concentraciones en el plasma son más bajas en comparación con la administración oral (Wishart et al. 2006). Cabe destacar, que hay estudios que evidencian que el metabolismo del diclofenac es mínimo luego de su aplicación cutánea, en comparación con otras vías de administración (Tanojo et al., 1999). En cuanto a su eliminación del organismo, aproximadamente el 65% de la dosis administrada del diclofenac se excreta en la orina (metabolitos, fármaco inalterado y productos de conjugación) y un 35% en la bilis, donde predominan los metabolitos y fármacos en forma conjugada.

2.2.3 Estudios de ecotoxicidad del ibuprofeno y el diclofenac

Un fármaco tras ser administrado a un ser humano, es capaz de producir un efecto biológico a través de la interacción con receptores específicos, sin embargo, al ser liberado al ambiente también puede interactuar con otros receptores que poseen vías metabólicas similares. Como se mencionó anteriormente, los AINE actúan mediante la inhibición de las

dos isoformas de la enzima ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2), que catalizan la síntesis de diferentes prostaglandinas, mecanismo responsable no sólo de su acción terapéutica, sino también de los efectos adversos reportados tras su administración. Las prostaglandinas se forman en una amplia gama de vertebrados e invertebrados. En peces se ha encontrado un gen que induce la COX-2 y COX-1 con características análogas a los humanos en un 80 y 77 %, respectivamente (Jjembra, 2008), por lo que la presencia de trazas de estos inhibidores de la COX en el agua pueden potencialmente tener un efecto en la vida acuática. En los artrópodos y moluscos, la actividad de una enzima similar a la COX es aparentemente responsable de la formación de prostaglandinas, pero dicha enzima no han sido aún aislada y caracterizada. Por otra parte, las prostaglandinas desempeñan un papel en la biosíntesis de la cáscara de huevo de las aves y el tratamiento con AINE inhibidores de la COX, da como resultado un adelgazamiento de la misma (Fent et al., 2006).

Con respecto al ibuprofeno, Flippin et al. (2007) en un estudio realizado con peces hembras (*Latipes Oryzias*) expuestos a diferentes concentraciones del fármaco durante seis semanas, observaron un aumento significativo en el peso del hígado y una reducción en el número de eventos semanales de desove (puesta de huevos), lo cual fue atribuido a cambios en el proceso de eclosión y en la producción de vitelogenina, un precursor de la glicoproteína en la formación de la yema. Por otra parte, Heckamann et al. (2007) encontraron que la tasa de crecimiento en crustáceos (*Daphnia Magna*) se redujo significativamente y, la reproducción se vio afectada, en el rango de concentración de 10 - 80 mg L^{-1} y, completamente inhibida a niveles más altos del fármaco; mientras que De Lange et al. (2006) hallaron en otra especie de crustáceo (*Gammarus pulex*) evidencias de disminución de su movilidad a concentraciones de ibuprofeno más bajas (entre 1 y 10 mg L^{-1}), lo cual fue atribuido a que este fármaco puede interferir en el patrón normal de contracciones musculares de la *G. pulex,* función que también es controlada por las prostaglandinas.

Se sospecha que el ibuprofeno influye en las hormonas sexuales esteroideas a través de diferentes vías, tanto en vertebrados como invertebrados. En estudio realizado por Han et al. (2010) encontraron un aumento de la producción del 17-β-estradiol (E2) tras la exposición al ibuprofeno en crustáceos (*Daphnia* y *Moina macroscopa*) durante 144 días, y

en peces (*Oryzias latipes*) a 21 días, que revela los posibles efectos de este CF como disruptor endocrino. Además, observaron efectos en la reproducción de peces, menor número de crías y retraso en la eclosión de los huevos (incluso a concentraciones de 0,0001 mg L^{-1}), lo cual es de relevancia ambiental y se amerita de más estudios para elucidar las posibles consecuencias ecológicas de la contaminación ibuprofeno en el medio ambiente acuático.

En cuanto al diclofenac presenta una toxicidad aguda más alta en comparación con el ibuprofeno, con efectos que se observan a concentraciones por debajo 100 mg L^{-1} (Cleuvers, 2003). Por otra parte, ensayos de toxicidad crónica realizados sobre la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) evidenciaron cambios citológicos en el hígado, los riñones y las branquias después de 28 días de exposición a sólo 1 µg L^{-1} de diclofenac (Triebskorn et al., 2004), mientras que a una concentración de 5 µg L^{-1} se apreciaron lesiones renales, así como la bioacumulación del fármaco en el hígado, los riñones, branquias y tejido muscular (Schwaiger et al., 2004).

Existen estudios clínicos que indican que el diclofenac puede causar efectos secundarios sobre el riñón e hígado en los mamíferos; así mismo, hay estudios que han demostrado que tiene el mismo efecto, no sólo en peces (Schwaiger et al., 2004), sino también en buitres, donde causa la muerte debido a insuficiencia renal aguda, gota visceral y la acumulación de ácido úrico dentro de los órganos internos (Oaks et al., 2004). Los buitres al comer restos de animales tratados veterinariamente con diclofenac se envenenan debido a la acumulación del fármaco, lo cual se consideró, fue la causa de una disminución importante en la población de buitres (hasta de un 95 %) en el subcontinente indio en la década de 1990, colocando al buitre oriental (*Gyps bengalensis*) en la lista de especies en peligro de extinción. El gobierno de la India anunció en 2006 la prohibición del diclofenac para uso veterinario, y fue sustituido por el meloxicam que es más seguro (aunque más caro); sin embargo en muchos países de Europa y América siguen administrándose en animales, particularmente en el ganado.

Finalmente, es importante acotar que según el informe de la organización Mundial de la Salud (WHO, 2012), el análisis de los datos disponibles, indica que hay un margen de seguridad entre las concentraciones muy bajas de fármacos que se consumen en el agua potable y las dosis terapéuticas mínimas, lo que sugiere un riesgo muy bajo para la salud humana. Sin embargo, los resultados indican que a pesar de más de dos décadas de esfuerzo de investigación, el conocimiento sobre la presencia de CF y sus efectos en el ambiente es escaso, si se compara con otros contaminantes, por lo que las conclusiones relativas a los riesgos de los mismos podrían ser prematuras. Futuras investigaciones se deben centrar en la evaluación de la toxicidad crónica de mezclas de fármacos y sus metabolitos, así como sus potenciales efectos en poblaciones sensibles, como mujeres embarazadas, niños, ancianos, pacientes con determinadas enfermedades y aquellas sometidas a diferentes tratamientos médicos.

2.2.4 Procesos de redistribución y acumulación de contaminantes en el suelo

Las características intrínsecas del suelo influyen en los distintos mecanismos que regulan el transporte de contaminantes (La Grega et al., 1996), los cuales se pueden dividir en tres, a saber:

- **Advección** (transferencia de masa): Es el movimiento de solutos arrastrados por el flujo de agua. El transporte de un contaminante en el suelo por este medio se hace bajo la influencia de las precipitaciones o irrigaciones que favorecen este proceso.

- **Dispersión:** A nivel del suelo, el medio poroso ejerce una resistencia al flujo que regula su tasa y dirección, ya que las partículas sólidas del mismo alteran su movimiento originando un reparto de las sustancias contaminantes en el suelo. Este proceso se repite varias veces y da como resultado una mezcla o dispersión (vertical y lateral) del flujo de agua**.**

- **Difusión:** Se presentan debido a los gradientes de concentración (movimiento desde áreas de mayor concentración a otras de menor concentración).

Algunos autores consideran que los fenómenos de dispersión y difusión actúan conjuntamente y lo denominan dispersión hidrodinámica y es responsable de esparcir los contaminantes más allá del área que abarcaría tomando sólo en cuenta el fenómeno de advección. Estos mecanismos son de naturaleza física y actúan de manera natural en el suelo, ya que permiten no sólo el movimiento de contaminantes sino de los nutrientes en el suelo, y depende marcadamente de las características del suelo (porosidad, textura, estructura) y la naturaleza del contaminante.

Además de estos mecanismos físicos de transporte, existen otros procesos de naturaleza química y biológica que afectan el destino de los contaminantes en el suelo, los cuales según su efecto en la movilidad del contaminante se califican en (Raymond, 2001):

1. **Redistribución:** Procesos que contribuyen al aumento de la movilidad de las sustancias en el suelo y consiste principalmente en los fenómenos de ionización, disolución y formación de complejos.

2. **Atenuación**: Procesos que provocan una reducción de la concentración del contaminante en la fase líquida del suelo, por lo general produciendo una disminución del movimiento de las sustancias contaminantes respecto a su flujo habitual considerando exclusivamente los fenómenos de advección y dispersión. Opera de dos maneras:

- *Acumulación*: Remoción de los contaminantes del agua del suelo, debido a que son inmovilizados pero no son transformados y por tanto el proceso es reversible. Es por ello, que las sustancias contaminantes inmovilizadas pueden volver a su estado soluble tras un cierto tiempo provocando contaminación. Entre estos procesos se encuentran el intercambio iónico, la precipitación y la adsorción, siendo este último el mecanismo de atenuación más importante para el caso de compuestos orgánicos.

- *Transformación:* Puede ocurrir por remoción irreversible (volatilización) y por transformación del compuesto, el cual se produce a través de procesos abióticos (químicos) y bióticos (microbios). Las reacciones químicas más importantes que pueden tener lugar en la transformación de compuestos orgánicos en general son:

hidrólisis, oxidación-reducción, sustitución, eliminación, deshalogenación y fotólisis. En cuanto a la transformación microbiana se pueden distinguir dos tipos: (i) poca o ninguna degradación por la exposición inmediata al contaminante, pero después de una fase de retardo, los microbios se adaptan y utilizan el compuesto añadido como una fuente de carbono y energía; (ii) bioacumulación en el que el compuesto químico es incorporado y acumulado por los organismos del suelo (absorción).

2.2.5 Procesos de degradación biológica en el suelo

Se entiende por biodegradación o degradación biológica a la ruptura molecular de un compuesto orgánico resultante de la acción enzimática de microorganismos que utilizan el sustrato como alimento El nivel de biodegradación final (mineralización) se alcanza cuando el compuesto es totalmente utilizado por los microorganismos dando como resultado la producción de dióxido de carbono, agua y sales minerales. El organismo responsable del proceso típicamente se beneficia de las reacciones de mineralización y por tanto se espera crecimiento bacteriano y una porción del carbono de las moléculas es usualmente incorporada a la biomasa para formar nuevos constituyentes celulares microbianos (Guevara y Álvarez, 2003). En algunos casos la degradación no es total sino que la molécula se divide en segmentos más pequeños o se produce sólo una biodegradación primaria que modifica la estructura química del compuesto, lo que puede resultar en la pérdida de una propiedad específica de ese compuesto. La biodegradación se puede llevar a cabo a diferentes niveles ambientales de oxigeno (Nimer, 2007):

- Condiciones aerobias, donde el flujo de oxígeno excede a la demanda de este gas que se requiere para llevar a cabo la actividad biológica.

- Condiciones anaerobias, son aquellas donde la velocidad de consumo de oxígeno excede a su velocidad de difusión (condiciones anóxicas) o aquellas donde el oxígeno es totalmente excluido (condiciones estrictamente anaerobias). Los procesos anaeróbicos se caracterizan por ser oxidaciones incompletas y liberan menos energía.

La degradación aeróbica es una reacción redox donde la materia orgánica (MO) se oxida por acción enzimática de los microorganismos en presencia de oxígeno (actúa como un aceptor de electrones) según la siguiente reacción:

$$MO + O_2 + Acción\ de\ microorganismos \rightarrow\ CO_2\ +\ H_2O\ +\ Energía + (N, S, P, K, Ca, Mg\ \ldots) \quad (R.1)$$

En este proceso parte del carbono pasa a la atmósfera como dióxido de carbono, el nitrógeno es transformado en formas aprovechables por las plantas, y otros elementos (fósforo, azufre y microelementos) son liberados y por tanto disponibles para las plantas. Otra parte del carbono puede ser asimilado en los tejidos microbianos (biomasa microbiana) o se transforma en sustancias húmicas estables. Es por ello que, y según lo establece Sánchez et al. (2005), la mineralización parcial de la materia orgánica ejerce una serie de efectos beneficiosos sobre la fertilidad del suelo y el crecimiento de las plantas, no sólo a través de la suplencia de nutrimentos, sino además por sus efectos favorables sobre las propiedades físicas (tiende a mejorar la estructura del suelo, aumenta la capacidad de retención de agua), químicas (aumenta la capacidad de intercambio catiónico, mejora la capacidad amortiguadora de pH) y sobre las propiedades biológicas ya referidas del suelo (fuente de nutrientes y energía).

En este proceso de mineralización, en la materia orgánica del suelo se distingue una fracción lábil, disponible como fuente energética, y una fracción húmica, más estable, constituida por ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) y huminas (Hum) (Galantini, 2002). La clasificación de estas fracciones se basa en su solubilidad en distintos solventes. La fracción soluble en medio básico (0,5 N NaOH), denominado carbono extraíble total (CET), constituye el carbono asociado a la fracción de la materia orgánica del suelo que contiene los AH, AF y parte de las sustancias no húmicas (SNH: azúcares, polisacáridos, aminoácidos, proteínas). Los AF se solubilizan en medio ácido (pH: 2), permitiendo así su separación de los AH, los cuales se caracterizan por ser insoluble bajo estas condiciones. Anderson y Schoenau (1993), establecen que alrededor del 30 al 60% de las sustancias

húmicas del suelo se extraen en medio alcalino. Las huminas, por su parte, representan la fracción insoluble en medio básico y presentan baja reactividad, con una estructura compleja e irregular difícilmente mineralizable e íntimamente ligada a los coloides minerales del suelo (Armado et al., 2009; Porta et al., 1999).

Los AF presentan un tamaño molecular menor con predominio de grupos carboxílicos y alcohólico, mientras que los AH son macromoléculas caracterizadas por su carácter más aromáticos y menos oxidado, con una distribución más equitativa entre grupos carboxílicos, fenólicos, quinónicos y cetónicos (Porta et al., 1999). Según Zamboni et al (2006), los AH están compuestos por grupos ácidos más homogéneos, producto de los procesos evolutivos que han sufrido; por el contrario, los AF, al tener grupos carboxilos libres, son sustancias más susceptibles de sufrir procesos de transformación.

Ruiz y Paolini (2005) determinaron a través de los valores del fraccionamiento de la MO del suelo, distintos parámetros de humificación, tales como el grado de humificación (GH, %), tasa de humificación (TH, %) y relación entre los ácidos húmicos y fúlvicos (AH/AF), y para ello emplearon las siguientes ecuaciones:

$$GH = \frac{(CAH + CAF)}{CET}.100 \qquad (E.1)$$

$$TH = \frac{(CAH + CAF)}{COT}.100 \qquad (E.2)$$

$$\frac{AH}{AF} = \frac{CAH}{CAF} \qquad (E.3)$$

Donde:
CAH = carbono asociado a los ácidos húmicos (%).
CAF = carbono asociado a los ácidos fúlvicos (%).
COT = carbono orgánico total (%).
CET = carbono extraíble en medio alcalino (%).

Estos parámetros están muy relacionados entre sí, ya que altos valores de GH y TH indican características húmicas más acentuadas (Armado et al., 2009). Según Rivero (1999), los

suelos y enmiendas orgánicas que presentan valores de GH superiores al 60 % se consideran materiales bien humificados que contienen materiales estabilizados. Por otra parte, si la relación CAH/CAF es mayor de la unidad, refleja suelos evolucionados, con un predominio de compuestos orgánicos con un alto grado de transformación y estabilidad (Brito, 1976; Hayes & Clapp, 2001).

Para que ocurra esta transformación de la MO, se requiere de la acción de los microorganismos, que no sólo degradan el COT del suelo, sino también el carbono presente en compuestos xenobióticos, incluidos los compuestos farmacéuticos. Por tanto, las comunidades microbianas naturales del suelo son actores clave en el destino de la contaminación liberada al ambiente. La persistencia ambiental de los fármacos depende de una variedad de factores, tales como propiedades fisicoquímicas (solubilidad, acidez, hidroficidad), factores ambientales (luz, temperatura, pH, humedad, oxígeno) y lo más importante la presencia y actividad de microorganismos con la capacidad de degradarlos a través de vías metabólicas y/o co-metabólicas (Caracciolo et al., 2015). La biodegradación por vías metabólica se refiere al uso de un compuesto como fuente de energía, carbono, nitrógeno u otros nutrientes. El co-metabolismo hace referencia a la descomposición de un compuesto por una enzima o cofactor que se produce durante el metabolismo microbiano de otro compuesto, tal como fue demostrado con el ibuprofeno que es capaz de metabolizarse más fácilmente cuando se dispone de otras fuentes de carbono (Quintana et al., 2005). No obstante, tales procesos metabólicos sólo pueden tener lugar si la toxicidad de las moléculas no inhibe la actividad microbiana. Hasta la fecha el conocimiento sobre la biodegradación de los fármacos y sus efectos sobre los microorganismos es muy escaso.

Los microorganismos, incluyendo bacterias, actinomicetos, hongos y algas son los principales agentes involucrados en la degradación biológica (Coyne, 2000). Los microorganismos son sensibles a los cambios adversos en el ambiente, por lo que cualquier alteración en su abundancia y actividad bioquímica puede proporcionar información valiosa para la evaluación de los riesgos potenciales que pueden estar relacionados con la presencia de productos farmacéuticos en los suelos. Todavía hay poca información sobre el efecto de los AINE en las propiedades microbiológicas del suelo expuesto a estos fármacos.

Experimentalmente, la degradación biológica de un compuesto en el suelo se puede evaluar estudiando el efecto del mismo en la actividad microbiana, medidos en términos de respiración y carbono en la biomasa, y determinando la disminución de la concentración del contaminante en el tiempo (cinética de la reacción). A continuación se presentan los fundamentos teóricos de estos estudios biológicos.

2.2.5.1 Respiración microbiana

La respiración del suelo es un proceso que refleja la actividad biológica del mismo. Todos los organismos heterótrofos (bacterias, hongos, algas y protozoos) tienen la propiedad de degradar la materia orgánica, a través de los procesos de digestión, asimilación y metabolismo, obteniendo la energía que necesitan para su desarrollo (Casanova, 2005). Es importante resaltar la diferencia entre la respiración microbiana y la respiración del suelo. Este último término hace referencia a la actividad biológica global del suelo, incluyendo los microorganismos, macroorganismos (lombrices, insectos) y las raíces de las plantas, mientras que la respiración microbiana refleja exclusivamente la actividad metabólica de los microorganismos. Por otra parte, la respiración basal es la respiración de un suelo sin adición de sustratos orgánicos, a diferencia de la respiración inducida donde se añaden sustancias orgánicas (glucosa, aminoácidos) (García et al., 2003).

Los microorganismos respiran continuamente y la tasa de respiración es un índice confiable de su crecimiento. La determinación de la respiración microbiana, consiste en la cuantificación de la cantidad de CO_2 desprendido, o del oxígeno consumido en la reacción redox (reacción 1) en el tiempo establecido para el ensayo. Puede medirse directamente en el campo (refleja la actividad biológica global del suelo) o en laboratorio bajo condiciones controladas, donde se busca medir la actividad microbiana.

A nivel de laboratorio, la respiración se puede determinar empleando el método descrito por Alef y Nannipieri (1995), que consiste en la incubación del suelo en frascos cerrados provistos de una trampa con solución de NaOH para capturar el CO_2 desprendido. La incubación se realiza bajo condiciones controladas de humedad del suelo (entre el 60 -70% de la capacidad de retención de agua de los suelos), así como condiciones ambientales

constante de temperatura y humedad. Al cabo de cierto periodo de tiempo, el CO_2 generado en el proceso reacciona con la solución de NaOH según la siguiente reacción:

$$CO_2 + 2NaOH \rightarrow Na_2CO_3 + H_2O \qquad (R.2)$$

La cantidad de CO_2 adsorbido es equivalente a la cantidad de NaOH consumido. Para determinar esto, se precipita el carbonato con $BaCl_2$ y se titula el remanente NaOH con una solución estándar de HCl en presencia de fenolftaleína como indicador.

$$Na_2CO_3 + BaCl_2 \rightarrow 2NaCl + BaCO_3\downarrow \qquad (R.3)$$

$$NaOH + HCl \rightarrow NaCl + H_2O \qquad (R.4)$$

La respiración microbiana (R_M) se suele expresar en mgC-CO_2 por kilogramos de suelo. La tasa de la respiración se obtiene mediante el cociente entre la cantidad de C-CO_2 desprendido y el tiempo de duración del ensayo. Otros métodos para la determinación de CO_2 se basan en los cambios de conductividad eléctrica de la solución de NaOH o el uso de métodos instrumentales tales como cromatografía gaseosa.

2.2.5.2 Carbono en la biomasa microbiana

Se define como biomasa microbiana a la parte viva de la materia orgánica del suelo, excluyendo raíces de plantas y animales de tamaño superior a $3x10^{-3}$ μm^3 (Grace et al., 2006). La biomasa microbiana del suelo, generalmente comprende entre el 2 y 5 % de la materia orgánica del suelo, sin embargo, como se discutió anteriormente, es un agente importante en el control de la actividad biológica del mismo, ya que actúa como un factor de transformación de la materia orgánica del suelo. El carbono contenido dentro de la biomasa microbiana es energía almacenada que se puede utilizar para los procesos microbianos, por lo tanto es un indicativo de la actividad potencial de los microorganismos y cuya medida es un procedimiento básico para los estudios ecológicos del suelo.

La importancia de los microorganismos en el funcionamiento de los ecosistemas ha llevado a un mayor interés en la estimación del C en la biomasa microbiana (C_{BM}) del suelo. Como

resultado, se han desarrollado varias metodologías para su determinación, tales como: 1) Métodos basados en siembra en placa con medios de cultivo; 2) Métodos empleando microscopía, 3) Respiración inducida por carbohidratos; 4) Método de fumigación-extracción, y 5) Método empleando biología molecular (Gómez-Jorrin et al., 2012). Entre esta diversidad de técnicas, el método de fumigación-extracción (FE) se ha empleado ampliamente en el estudio del efecto de compuestos orgánicos xenobióticos en el suelo, tales como pesticidas, herbicidas y fármacos (Perucci et al., 2000; Thiele-Bruhn & Beck, 2005; Gielen et al., 2011).

El método de FE se basa en la fumigación del suelo con un agente biocida, usualmente cloroformo, que produce la muerte de los microorganismos por lisis celular, liberando citoplasma al medio. Estudios realizados por Vance et al. (1987), demostraron que la fumigación del suelo incrementa la cantidad de C que puede ser extraído con una solución de sulfato de potasio (K_2SO_4), y posteriormente cuantificado analíticamente por medio de una titulación redox con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) o empleando analizadores de carbono orgánico total. La estimación del C_{BM} se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$C_{BM} = \frac{C_E}{K_{EC}} \qquad (E.4)$$

Donde C_E es la diferencia entre el C extraído del suelo fumigado menos el C extraído del suelo no fumigado. El valor de K_{EC} recomendado es de 0,38 cuando se utiliza el método de oxidación con dicromato y de 0,45 cuando se emplea analizador de carbono orgánico total (Jenkinson et al., 2004).

La respiración y el C en biomasa microbiana son propiedades biológicas del suelo que suelen combinarse para obtener el cociente metabólico (qCO_2), que relaciona la cantidad de $C\text{-}CO_2$ producida (R_M) por unidad de C de la biomasa (C_{BM}), el cual fue descrito por primera vez por Anderson y Domsch (1990) como un índice de la actividad biológica del suelo y está basado en la teoría ecológica de Odum (1985) sobre la optimización energética de los ecosistemas y la eficiencia metabólica de los microorganismos.

El cociente metabólico también ha sido usado en estudios ambientales, ya que es una herramienta útil para evaluar el efecto de compuestos xenobióticos sobre el metabolismo de la biomasa microbiana, donde un incremento en el qCO_2 con respecto al control puede ser considerado como un efecto perjudicial de los tratamientos, el cual puede forzar a los microorganismos a gastar más energía para sus requerimientos de mantenimiento, reduciendo su eficiencia en la utilización de los sustratos para la síntesis de biomasa. En este sentido, se ha establecido que los suelos bajo estrés presentan mayores valores de qCO_2 que los suelos no estresados (Perucci et al., 2000). Así mismo, la respiración por unidad de biomasa tiende a aumentar a medida que los organismos hacen frente al trastorno creado por perturbaciones exógenas, asociada a condiciones ambientales adversas, tales como toxicidad de metales y herbicidas (Godley, 2004).

Es importante señalar que algunos autores sugieren que un aumento del qCO_2 puede indicar también un incremento en la actividad microbiana (Gielen et al, 2011; Fernandes et al., 2005). Por ello, adicionalmente al uso del cociente metabólico, se puede emplear el análisis gráfico vectorial para valorar la respuesta de las comunidades microbiana a la exposición de compuestos xenobióticos, el cual tienen la ventaja de que las respuestas de respiración y biomasa pueden ser considerados en conjunto en comparación con el cálculo del cociente metabólico, que algunas veces tienden a dar valores de difícil interpretación, lo cual también ha sido reportado por otros autores (Wardle & Ghani, 1995).

En este sentido, Gielen et al. (2011) utilizaron un gráfico vectorial para analizar el efecto de la exposición a CF sobre la actividad microbiana del suelo, colocando los valores de R_M en el eje ¨y¨, el C_{BM} en el eje ¨x¨ y los respectivos valores del control en el origen. En la figura 2.6, se indica el tipo de efecto en función al cuadrante donde se ubica la respuesta biológica de los microorganismos debido a la exposición a contaminantes antropogénicos. Según el análisis gráfico, una mayor distancia desde el origen significa un mayor efecto, mientras que la dirección del vector califica el tipo de respuesta. Así, una respuesta positiva tanto para la respiración como para la biomasa, con relación al control, fue interpretada como un efecto estimulante sobre la comunidad microbiana. Por otra parte, una respuesta positiva para la respiración y negativa para la biomasa se considera una condición de estrés y una

respuesta negativa para variables sugiere una inhibición que afecta seriamente la comunidad microbiana y su funcionamiento.

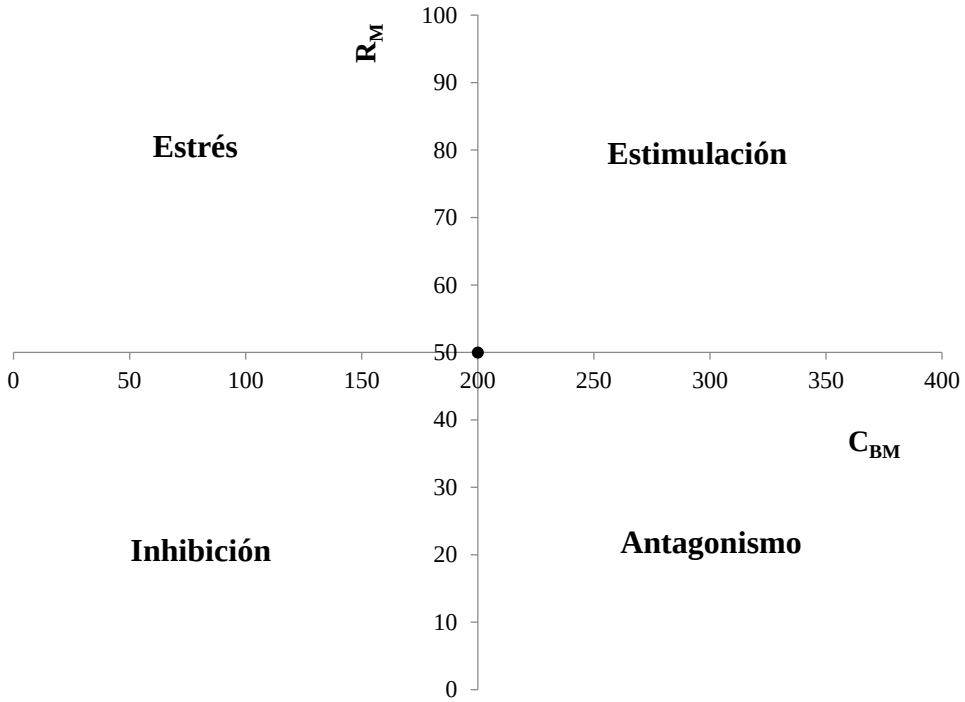


Figura 2.6 Análisis gráfico de la respuesta biológica de los microorganismos.

Fuente: Adaptado de Gielen et al., 2011.

2.2.5.3 Cinética de la reacción de degradación

La cinética de una reacción se refiere a la velocidad de reacción, que es el cambio de la concentración de un reactivo o producto con respecto al tiempo. El modelo matemático más utilizado para explicar la degradación de compuestos farmacéuticos en el suelo es el modelo de decaimiento exponencial basado en una cinética de primer orden (Yu et al., 2013; Lin & Gan, 2011; Monteiro & Boxall., 2009; Xu et al., 2009a,b), cuya expresión diferencial e integrada de la velocidad de reacción (*v*), así como el tiempo necesario para disminuir en un 50% y 90% la cantidad inicial añadida, se representan en las ecuaciones E.5, E.6, E.7 y E.8, respectivamente.

$$v = -\frac{\partial C}{\partial t} = kC \qquad (E.5) \qquad\qquad C_t = C_0 e^{-kt} \qquad (E.6)$$

$$t_{1/2} = \frac{ln2}{k} \qquad (E.7) \qquad\qquad DT_{90} = \frac{ln10}{k} \qquad (E.8)$$

Donde:
C_t = concentración del compuesto remanente en el suelo en tiempo *t* (mg Kg^{-1} suelo).
C_0 = concentración inicial del compuesto en el suelo (mg Kg^{-1} suelo).
k = constante de la reacción (d^{-1})
$t_{½}$ = tiempo de vida media (d).
DT_{90} = tiempo para disminuir en un 90% la cantidad añadida (d).

La expresión de la velocidad de la reacción depende de la concentración de las especies reaccionantes, a excepción de las reacciones que sigue una cinética de orden cero que son independiente de esta variable. Por otra parte, la constante de la velocidad de reacción (*k*) depende de la temperatura, cuya relación se expresa por medio de la ecuación de Arrhenius (OECD, 2002):

$$k = Ae^{-E_a/RT} \qquad (E.9)$$

Donde *A* es una constante que representa el factor de frecuencia de las colisiones (mismas unidades que k); E_a es la energía de activación de la reacción (J mol^{-1}); *R* es la constante de los gases (8,314 J mol^{-1}) y *T* la temperatura absoluta (K). La ecuación anterior muestra que la constante de la velocidad disminuye cuando aumenta la E_a de la reacción y se acrecienta al incrementarse la temperatura. Es por ello, que cuando se realizan estudios de degradación se debe controlar la temperatura ya que es una variable que afecta el proceso.

Los estudios de cinética de degradación de pesticidas en suelo, han demostrado que la disipación de compuestos orgánicos en el suelo, a veces, no sigue una cinética lineal de primer orden, la cual supone, que la tasa de cambio en la concentración del contaminante es en todo momento, directamente proporcional a la concentración real que queda en el sistema. Como el suelo es un medio heterogéneo, es posible que la degradación no se produzca a la misma velocidad en las distintas regiones de la muestra de suelo. Por ello, Gustafson y Holden (1990) propusieron un modelo dividiendo el suelo en sub-compartimientos, cada uno con una constante de velocidad de degradación de primer orden

diferente (cinética no lineal de primer orden), cuya expresión integrada de la velocidad de reacción se representa en la ecuación E.10.

$$C = C_0(1 + \beta t)^{-\alpha} \qquad (E.10)$$

Donde β es una medida de variabilidad espacial del suelo (d^{-1}) y α un parámetro relacionado con la forma de la curva de degradación (adimensional). Se deben utilizar métodos numéricos iterativos (regresión no lineal) para la estimación de estos parámetros. El modelo no lineal supone una constante de velocidad de primer orden variable en el espacio, que se reduce a una cinética lineal cuando la constante de velocidad es uniforme espacialmente, es decir cuando β se aproxima a cero. La constante de velocidad (*k*) es una función de α y β, según la ecuación E.11:

$$k = \alpha * \beta \qquad (E.11)$$

donde α > 0, β > 0, de lo contrario el compuesto se estaría produciendo en lugar de disipando. Al igual que la cinética de primer orden lineal, en el modelo no lineal, los tiempos de disipación son independientes de la concentración inicial añadida. Sin embargo, el tiempo para que la concentración del compuesto disminuya en un cierto porcentaje ya no es constante y es una función de los parámetros α y β que describen la variabilidad espacial de la constante de velocidad, tal como lo establecen las ecuaciones E.12 y E.13.

$$DT_{50} = \frac{[0{,}5^{-\left(\frac{1}{\alpha}\right)} - 1]}{\beta} \qquad (E.12) \qquad DT_{90} = \frac{[0{,}1^{-\left(\frac{1}{\alpha}\right)} - 1]}{\beta} \qquad (E.13)$$

Gustafson y Holden (1990) demostraron que el modelo cinético no lineal de primer orden propuesto se ajustó bien a una base de datos de disipación de 45 pesticidas en el suelo, realizados bajo condiciones de laboratorio y en campo. Las estimaciones de los parámetros α y β para los datos de laboratorio estuvieron en el mismo rango de magnitud que los datos de campo, lo que indica que la variabilidad espacial debe tener una escala de longitud muy pequeña, posiblemente del orden de las dimensiones del tamaño del poro.

2.2.6 Biodegradación de AINE en el ambiente

Algunos autores han establecido la capacidad de ciertos microorganismos para degradar los AINE. En este sentido, se ha confirmado un potencial de degradación de ciertas cepas bacterianas de los géneros *Bacillus* (Marchlewicz et al., 2016), *Nocardia* (Chen y Rosazza, 1994), *Patulibacter* (Almeida et al., 2013), *Sphingomonas, Variovorax* (Murdoch & Hay, 2005; 2015), *Stenotrophomonas* (Zhang et al., 2013) y cepas de hongos de los géneros *Bjerkandera, Phanerochaete chrysosporium* (Rodarte-Morales et al., 2011), *Ganoderma, Irpex, Trametes versicolor* (Marco-Urrea et al., 2009; 2010), *Phanerochaete* (Hata et al., 2010). Estas investigaciones fueron realizadas en medios de cultivos acuosos o en sedimentos, pero poco se sabe sobre la degradación de los AINE en el suelo, particularmente porque los escasos trabajos publicados describen las etapas iniciales de la transformación del compuesto y no llevan a cabo un seguimiento a los productos intermedios que se generan en el proceso, ya que sólo cuantifican la pérdida del compuesto original.

La biotransformación microbiana de los AINE, principalmente por hongos, se lleva a cabo en dos fases que comienza con la unión superficial a la célula fúngica (adsorción), seguida de una fase dependiente del metabolismo en la que los compuestos son transportados dentro de la célula y/o biotransformados fuera de la célula por enzimas extracelulares (lacasas y peroxidasas) (Domaradzca et al., 2015). De igual forma, los hongos poseen enzimas análogas a las empleadas por los mamíferos en la fase I del metabolismo (sistema de enzimas citocromo P-450) y en la fase II que son responsables de la conjugación de fármacos con ácido glucurónico o ácido sulfúrico (Asha & Vidyavathi, 2009).

Los estudios realizados por Marco-Urrea et al. (2010) confirmaron la formación del producto de biodegradación no acetilado (Figura 2.7, Compuesto 1) como producto de transformación mayoritario en la degradación del diclofenac en medio acuoso en presencia de enzimas lacasas. Por otra parte, según una investigación realizada por Gröning et al. (2007), la degradación del diclofenac por la microflora autóctona de los sedimentos de los ríos condujo a la formación de una p-benzoquinona como producto principal de la biotransformación (Figura 2.7, compuesto 2), así como los compuestos 4´-

hidroxidiclofenac (compuesto 3) y el 5-hidroxidiclofenac (compuesto 4). Marco-Urrea et al., (2010) detectaron a su vez la presencia de los compuestos 4 y 5, los cuales también se producen en el metabolismo humano después de la absorción del diclofenac, al igual que el compuesto 3.

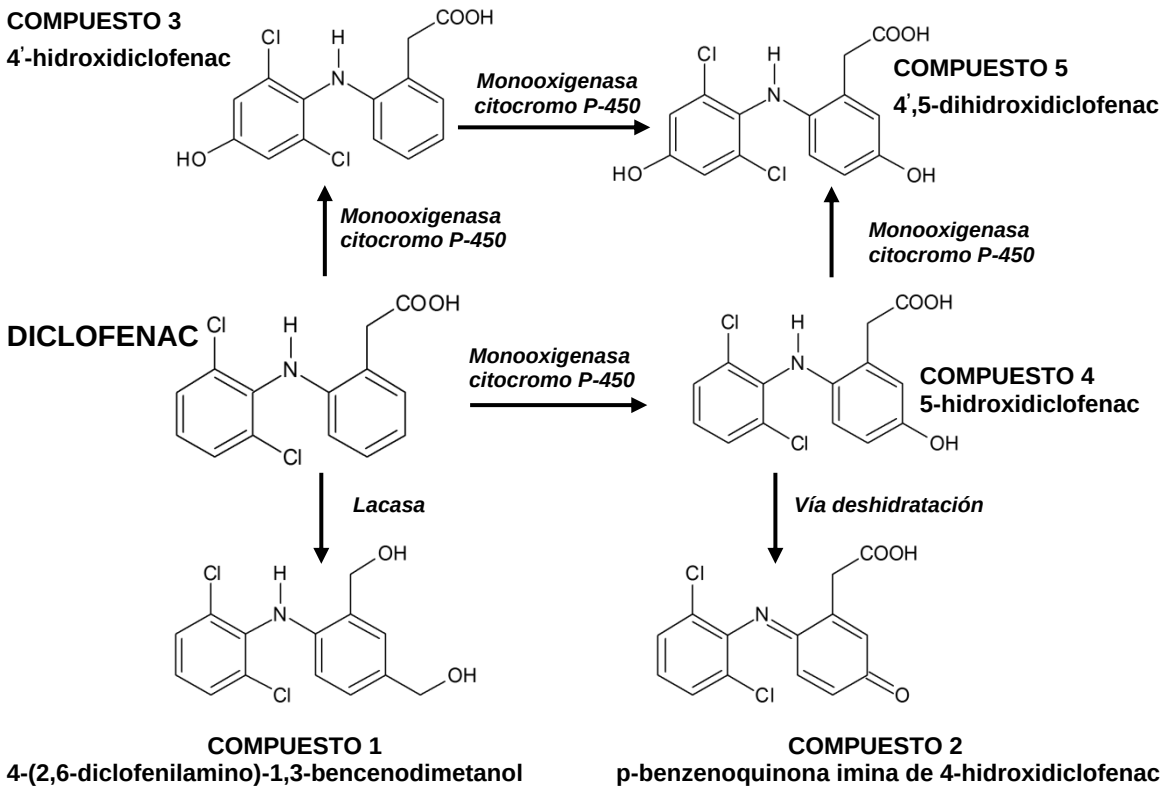


Figura 2.7 Posibles productos de transformación del diclofenac por microorganismos.

Fuente: Adaptado de Domaradzka et al., 2015.

En cuanto al ibuprofeno, Marco-Urrea et al. (2009) ensayaron el usos de distintos especies de hongos para degradar al ibuprofeno en medio acuoso, y encontraron inicialmente dos productos de transformación que corresponden a los compuestos hidroxilados en la cadena isopropílica de ibuprofeno (Figura 2.8: Compuestos 1 y 2), los cuales se transforman para producir el compuestos dihidroxilado (compuesto 3). Por su parte, un estudio de degradación microbiana del ibuprofeno en lodos activados ha sugerido también la formación de estos productos monohidroxilados (Quintana et al., 2005). El 2-hidroxiibuprofeno también se ha encontrado en estudios de degradación en suelos (Girardi

et al., 2013), y es considerado un metabolito en humano (Weigel, 2003.), razón por lo cual posiblemente se ha encontrado también en aguas residuales sin tratar.

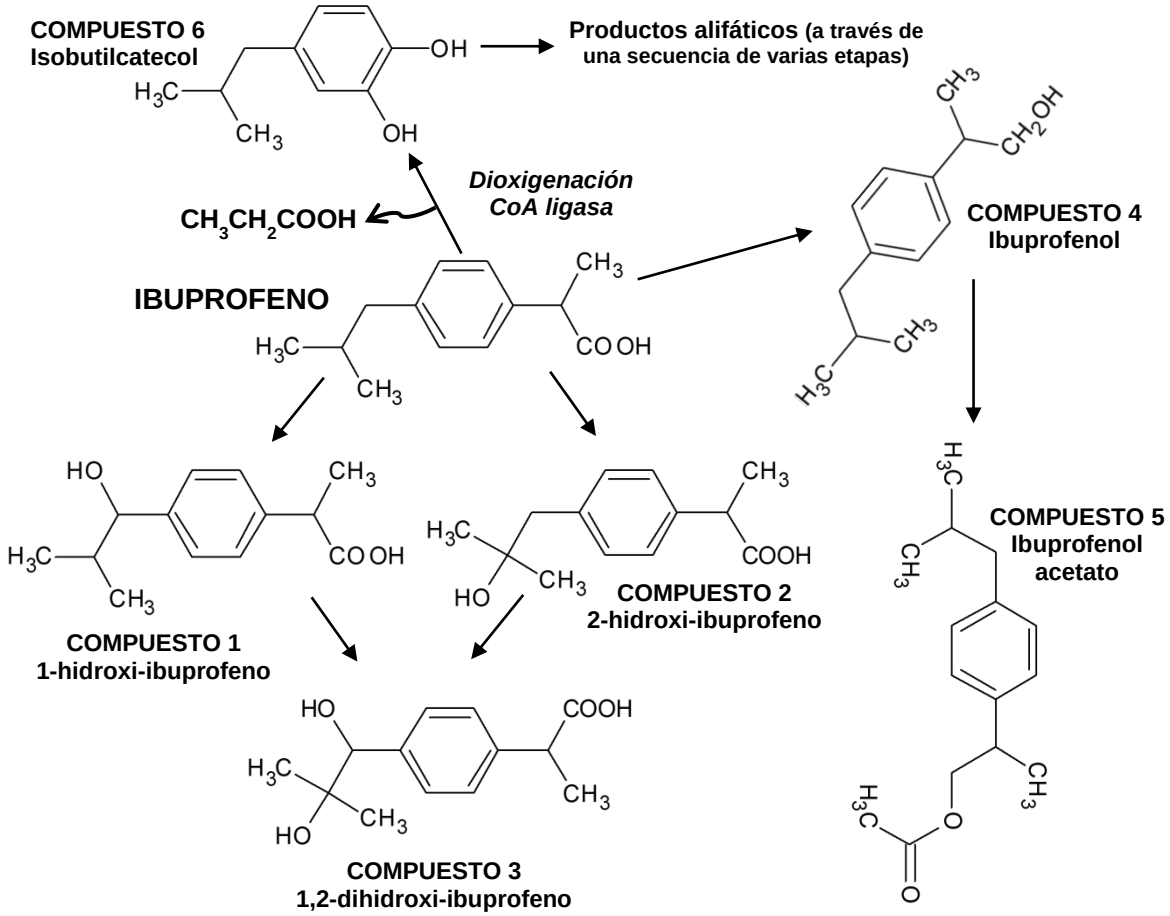


Figura 2.8 Posibles productos de transformación del ibuprofeno por microorganismos.

Fuente: Adaptado de Marchlewicz et al., 2015; Guzik et al., 2014.

Durante la degradación del ibuprofeno por la bacteria *Nocardia* sp. se identificaron dos productos de transformación, el ibuprofenol y acetato de ibuprofenol (Figura 2.8; compuestos 4 y 5), los cuales fueron susceptible de experimentar una mayor mineralización (Chen y Rosazza 1994). Por su parte, Murdoch y Hay (2005) caracterizaron una de las vías de degradación del ibuprofeno empleando bacterias *Sphingomonas*, cuya cepa se asiló de una planta de tratamiento de aguas residuales, identificándose la formación del isobutilcatecol (Figura 2.8, compuesto 6) a través de un mecanismo que sugiere la eliminación de la cadena lateral del ácido propiónico y la di-oxigenación del anillo en las

posiciones 1,2. Posteriormente ocurre la abertura del anillo para formar compuestos alifáticos (Guzik et al., 2014).

Se ameritan de más estudios para elucidar el mecanismo de la biodegradación del ibuprofeno y el diclofenac y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos en el suelo. Por otra parte, los compuestos de transformación derivados de estos compuestos pueden ser más tóxicos que el compuesto original y pueden acumularse en el medio ambiente (Caracciolo; et al., 2015; Marco-Urrea et al., 2009).

2.2.7 Procesos de adsorción de contaminantes en el suelo

La adsorción es un proceso de transferencia de una determina especie química (adsorbato) presente en una fase fluida (líquida o gaseosa), a la superficie de otra fase (adsorbente) sobre la cual se concentra o acumula. De manera general, la adsorción de un contaminante en la matriz del suelo restringe su movilidad hacia las aguas subterráneas (ya que queda retenido) y su disponibilidad para ser asimilado por los microorganismos, disminuyendo así su toxicidad.

Los procesos de adsorción originan una partición de los componentes de la fase acuosa a la superficie de las fracciones sólidas del suelo (minerales y materia orgánica), la cual tienden a alcanzar el equilibrio a una temperatura dada. La relación entre la concentración del contaminante en la matriz del suelo y la concentración remanente en la fase acuosa en el equilibrio se conoce como isotermas de adsorción (U.S. EPA, 2008), y se determina experimentalmente, a nivel de laboratorio, mediante pruebas de carga o experimentos en columnas de suelo. Estos últimos consisten en empacar el suelo en una columna de plástico o vidrio y se hace pasar agua a través de ella, previa adición de cierta cantidad del compuesto de interés. Se mide la concentración del contaminante en el efluente (C_e) a diferentes intervalos de tiempo, y se grafica la concentración normalizada, es decir respecto a la concentración inicial (C_e/C_0), en función del tiempo o el volumen de poro (Scheytt et al., 2006).

Los experimentos por carga, por su parte, consisten en mezclar una cantidad determinada de suelo con soluciones de diferentes concentraciones del compuesto en estudio y se agitan durante el tiempo necesario hasta que el sistema alcance el estado de equilibrio. Posteriormente se determina la cantidad del compuesto adsorbido por masa de suelo (C_s, $mg\ Kg^{-1}$) en función a la concentración en equilibrio del mismo remanente en la fase acuosa (C_{aq}, $mg\ L^{-1}$), a una temperatura determinada (U.S. EPA, 2008; OECD, 2000). Cuando no se obtiene experimentalmente una relación lineal entre estas dos variables, se debe recurrir a otras aproximaciones para describir la distribución del contaminante entre el suelo y la solución. Los modelos matemáticos más utilizados son los propuestos por Langmuir y Freundlich, los cuales se representan en las ecuaciones E.14 y E.15, respectivamente (Hörsing et al., 2011¸ U.S. EPA, 2008).

$$C_s = \frac{C_{max} K_L C_{aq}}{1 + K_L C_{aq}} \qquad (E.14) \qquad C_s = K_F {C_{aq}}^{1/n} \qquad (E.15)$$

donde:
C_{max} = concentración máxima adsorbida ($mg\ Kg^{-1}$).
K_L = constante de Langmuir (L mg^{-1}).
K_F = constante de Freundlich ($mg^{1-1/n}\ L^{1/n}\ Kg^{-1}$).
n = exponente de Freundlich (Adim.).

La isoterma de Langmuir, propone un modelo en monocapa donde los sitios de adsorción son finitos y equivalentes, por lo que supone una cantidad máxima de compuesto adsorbido (Porta et al., 1999). La constante de Langmuir (K_L) puede interpretarse como una constante de equilibrio del proceso de adsorción a una temperatura dada y está relacionada con la energía libre de Gibbs de adsorción (Satterfield, 1996). El modelo de Freundlich, por el contrario, no establece un máximo de adsorción y supone un número infinito de sitios de adsorción en relación con el número de moléculas del compuesto, las cuales se acumulan sobre la superficie heterogénea del adsorbente (Doretto et al., 2014).

La mayoría de los estudios de isotermas de adsorción de fármacos en suelo se han descrito empleando el modelo de Freundlich (Kodešová et al., 2015; Doretto et al., 2014; Zhang et al., 2014; Lin & Gan, 2011; Xu et al., 2009a,c), donde a través del análisis de regresión se

ajustan los datos a la ecuación propuesta, permitiendo estimar la constante K_F, la cual indica la capacidad de adsorción y la afinidad entre el adsorbato y el adsorbente. Al igual que con otros compuestos, los factores claves que regulan la adsorción de fármacos dependen de las características propias del suelo tales como textura, materia orgánica, el pH, temperatura, contenido de agua; y de factores estructurales de los contaminantes como el tamaño molecular, hidrofobicidad, solubilidad, constante de acidez, entre otros.

La aplicación de las isotermas de adsorción permite también la estimación de otros parámetros que reflejan la capacidad de adsorción, tales como el coeficiente de distribución (*Kd*) y el coeficiente de adsorción normalizado al contenido de carbono orgánico del suelo (K_{OC}), los cuales se pueden determinar empleando las ecuaciones E.16 y E.17, respectivamente (U.S. EPA, 2008). La ecuación E.15 representa el modelo lineal de adsorción cuando el valor de *1/n* del modelo de Freundlich, que describe la curvatura de la isoterma, se iguala a la unidad.

$$K_d = \frac{C_s}{C_{aq}} \qquad (E.16) \qquad\qquad K_{oc} = \frac{K_d}{COT}.100 \qquad (E.17)$$

donde:
K_d = expresado en L kg^{-1}
K_{OC} = expresado en L kg^{-1}
COT = porcentaje de carbono orgánico en el suelo (%).

El K_d indica el grado de asociación o interacción entre el analito y las fracciones sólidas del suelo. El K_{OC} representa la partición de compuestos orgánicos entre el carbono orgánico del suelo y el agua. Ello supone que la materia orgánica es el factor principal que influye en la adsorción del compuesto en el suelo y que las interacciones involucradas son principalmente no polares (U.S. EPA, 2008). Frecuentemente se correlaciona el K_{OC} con el K_{OW}, sin embargo, esto es sólo válido para compuestos hidrofóbicos y, por tanto, más propensos a distribuirse en la materia orgánica o en organismos vivos (bioacumulación). En el caso de compuestos orgánicos con grupos polares con cierto grado de ionización dependiente del pH, debe considerarse la contribución de las posibles interacciones entre

las formas ionizadas de los compuestos y los grupos polares de la materia orgánica del suelo (Martínez-Hernández et al., 2014).

2.2.8 Potencial de lixiviación de contaminantes en el suelo

Para la evaluación del destino ambiental de un contaminante en el suelo, se han desarrollado modelos matemáticos basados en ecuaciones de transporte (advección y dispersión), conjuntamente con datos sobre la cinética de degradación. En la mayoría de los casos, no se dispone de información suficiente sobre el comportamiento ambiental del compuesto, para llevar a cabo la simulación del movimiento de un contaminante en el suelo, a través del empleo de estos modelos. Por otra parte, existen indicadores, que relacionan las propiedades físicas y químicas del contaminante con su transporte ambiental. Para el caso de los pesticidas, se han utilizado una serie de índices para estimar su potencial de lixiviación en el suelo y, por consiguiente, el riesgo de contaminación de los acuíferos (Aparicio et al., 2015).

La adsorción y la persistencia son, por lo general, los dos factores más importantes que influyen en la lixiviación de compuestos orgánicos en el suelo. En este sentido, Gustafson, (1989), a través de información disponible del coeficiente de adsorción normalizado al contenido de carbono orgánico del suelo (K_{OC}), y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de 22 pesticidas en suelo, estableció una relación parabólica entre ambos parámetros, que sirvió de base para definir un índice de lixiviación hacia las aguas subterráneas conocido como índice GUS, el cual puede ser calculado usando la siguiente ecuación:

$$GUS = Logt_{1/2}(4 - \log K_{OC}) \qquad (E.18)$$

El modelo clasifica a los pesticidas según su potencial de lixiviación, con un alto riego para aquellos compuestos con índices de GUS > 2,8; y bajo riesgo si presentan valores < 1,8. Los compuestos con valores entre 2,8 y 1,8 exhiben un potencial de lixiviación medio.

Por otra parte, Cohen et al. (1984) indicaron que los pesticidas que tienen un alto riesgo de contaminación de las aguas subterráneas son aquellos que presentan carga negativa al pH

del suelo, un K_{OC}, menor de 300-500 L kg^{-1}suelo, y $t_{1/2}$ en suelo mayor de 2-3 semanas. Los criterios de Cohen son muy similares a los propuestos por el Departamento de Alimentación y Agricultura de California, Estados Unidos (CDFA) (Wilkerson & Kim, 1986). Las diferencias sustanciales radican en que la CDFA establece cuatro variables ambientales, cuyos valores críticos son los siguientes: K_{OC} < 512 L kg^{-1} suelo; $t_{1/2}$ en agua > 13 d; $t_{1/2}$ en suelo > 11d y solubilidad en agua > 7 mg L^{-1}. Los pesticidas que reúnen estas características presentan un alto riesgo de lixiviación en el suelo.

Los modelos de Gustafson (1989) y Cohen et al. (1984) han sido utilizados también para evaluar la lixiviación potencial de CF en los suelos, ya que éstos presentan estructuras químicas similares al grupo de pesticidas (compuestos organoclorados, carbamatos y triazinas) que sirvieron para la validación de los modelos propuestos, tales como anillos bencénicos con grupos carboxilato, hidroxilo, amino y átomos de cloro. La presencia de tales afinidades químicas les imparte características ácido-base y la posibilidad de interacciones polares y no polares análogas.

En este sentido, Xu et al. (2009a) estimaron el índice de GUS de un AINE (Ketoprofeno), en cuatro suelos con diferente contenido de carbono orgánico (CO) y pH neutro. Se obtuvieron valores de GUS de 1,33 (CO: 0,4%), 1,08 (CO: 0,6%), 1,80 (CO: 1,4%) y 2,28 (CO: 3,2%). Los autores concluyeron que en los dos primeros suelos, el ketoprofeno es poco probable que se percole a través del suelo al agua subterránea; mientras que en los dos últimos, su riesgo es incierto, lo que significa puede ocurrir lixiviación bajo eventos de lluvia o riego. Empleando el criterio de Cohen et al. (1984), encontraron valores de K_{OC} inferiores a 500 L kg^{-1} suelo en los cuatro suelos estudiados, con tiempos de vida media de 15,4 d (CO: 1,4%) y 27,4 (CO: 3,2%), lo que indica un alto potencial de lixiviación en estos dos suelos. En los otros suelos, los $t_{1/2}$ fueron menores, por lo que se predice un riesgo bajo. De igual forma, Xu et al. (2009b) clasificaron los CF en estudio, según su potencial de lixiviación empleando los criterios de Cohen et al. (1984), en los siguientes cuatro grupos: Alto (K_{OC} <300 L kg^{-1} suelo y $t_{1/2}$ > 21 d), moderadamente alto (K_{CO} <300 L kg^{-1} suelo o $t_{1/2}$ > 21 d), medio (K_{OC}= 300-500 L kg^{-1} suelo y $t_{1/2}$ = 14-21 d), moderadamente bajo (K_{OC} > 500 L kg^{-1} suelo o $t_{1/2}$ <14 d), y bajo (K_{OC} > 500 L kg^{-1} suelo y $t_{1/2}$ <14 d).

Estos criterios o modelos de lixiviación, buscan predecir la movilidad de un compuesto, la cual se ve afectada cuando el compuesto es adsorbido o reacciona con los componentes del suelo. Sin embargo, esta movilidad también depende de las características físicas del suelo, principalmente de la densidad aparente del suelo y de su porosidad, variables que están incluidas en la determinación del factor de retardo (F_R), entendiéndose como tal, la diferencia entre la velocidad promedio de lixiviación del agua en el suelo y la velocidad de migración del compuesto y puede determinarse a través de la siguiente ecuación (U.S. EPA, 1999):

$$F_R = 1 + \frac{D_a}{\theta} K_d \qquad (E.19)$$

donde:
D_a = Densidad aparente (kg L^{-1}).
K_d = Coeficiente de distribución (L Kg^{-1}).
θ = Porosidad (Adim.).

La ecuación E.19, aplica bajo condiciones de equilibrio con procesos de adsorción lineales y en medios saturados, y asume que el entorno químico, a lo largo del trayecto del flujo del soluto, no varía ni en el espacio ni en el tiempo (transporte uniforme) (Muller et al., 2006). Aunque estos supuestos rara vez se cumplen en el entorno natural, el factor de retardo estima la movilidad de compuestos con base a su comportamiento de adsorción en el suelo, y permite realizar comparaciones entre suelos que presentan diferentes características de porosidad y densidad. Para compuestos reactivos (que interactúan con los componentes del suelo), el valor del retardo es mayor a 1, mientras que para solutos no reactivos es igual a la unidad. Por otra parte, un aumento en el F_R indica un mayor tiempo de permanencia del compuesto en el suelo y un menor riesgo de lixiviación.

La ecuación E.19 ha sido utilizada también para estimar el coeficiente de distribución en ensayos con columnas de suelos, mediante la estimación del factor de retardo del analito de interés en comparación con compuestos inertes (trazadores), cuyo movimiento es lo más parecido posible al movimiento del agua, como por ejemplo el bromuro de potasio (KBr) (Chefetz et al., 2008).

2.2.9 Evaluación analítica de fármacos en muestras acuosas y en suelo

A partir del año 2000, se ha incrementado el desarrollo de métodos de análisis de CF en aguas residuales y aguas superficiales, y en menor grado en muestras más complejas como el suelo. Distintas técnicas de análisis han sido empleadas en la determinación de fármacos en muestras ambientales, tales como Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia o Resolución (HPLC con detector UV, arreglo de diodos DAD, o fluorescencia), Cromatografía Líquida (LC) y Gaseosa (GC) acopladas a detectores selectivos de masa (MS), las cuales presentan diferentes niveles de detección y cuantificación. También se han reportaron estudios que emplean más de un analizador másico (tándem o MS/MS), que son muy utilizados para el estudio de analitos que se encuentran en matrices complejas. Aunque las técnicas cromatográficas con acoplamiento a espectrometría de masas simple (MS) o tándem (MS/MS), son métodos analíticos robustos, que permiten la cuantificación de analitos a niveles trazas, la disponibilidad de estos equipos para fines de investigación en Venezuela es limitada.

La cromatografía líquida de alta eficacia o rendimiento (HPLC), constituye una alternativa de análisis de fármacos, y es ampliamente usada en la industria farmacéutica, tanto para el análisis de materias primas, como para establecer el control de calidad del producto terminado (Jana et al, 2011; Reddy-Battu & Reddy, 2009). Según la IUPAC (1995) la cromatografía, es un método físico de separación, en la cual los componentes se distribuyen entre dos fases inmiscibles, una de las cuales se mantiene fija (fase estacionaria), mientras que la otra (la fase móvil) se mueve a través de la primera. En la técnica de HPLC, la muestra es inyectada en el seno de la fase móvil, donde es soluble, y es transportada a través de una columna por el flujo continuo del mismo, a alta presión. La columna constituye la fase estacionaria y está formada por partículas de diámetro pequeño, lo cual le confiere una gran superficie de interacción. La velocidad a la que un analito se mueve a través de la columna, con respecto a los demás componentes, va a depender de las interacciones entre la fase móvil y la muestra, y entre la muestra y la fase estacionaria. Como resultado de estas diferencias en la movilidad de los componentes de una muestra se logra la separación de los mismos (Hernández, 2005).

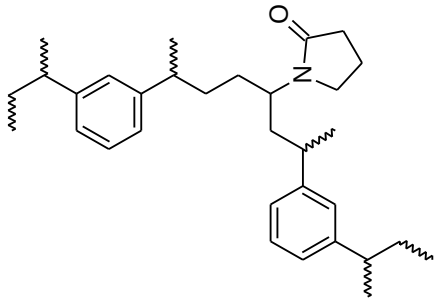
Una característica importante del análisis por HPLC es que es una técnica específica para cada analito en particular, cuya identificación y cuantificación depende de sus propiedades fisicoquímicas (solubilidad, tamaño, polaridad, entre otros), las cuales le otorgan diferente comportamiento frente a la fase móvil y la estacionaria. Además de la elección adecuada de estas fases, la separación también depende del flujo, el volumen de inyección y de la temperatura a la que se va a realizar la cromatografía. La técnica de HPLC ha sido ampliamente utilizada para la determinación de fármacos en muestras ambientales (Montagner & Jardim, 2011; Karnjanapiboonwong et al., 2011; Chefetz et al., 2008; Santos et al., 2005), donde la principal problemática para su uso se origina en las bajas concentraciones encontradas y en la complejidad química de la matriz ambiental en la cual se encuentra el analito (aguas residuales o suelo), que suele contener otros compuestos que pueden interferir en el análisis y por ende dificultan la cuantificación del fármaco.

Para solventar estas dificultades, se incluyen etapas previas de preparación de la muestra, como la extracción en fase sólida (EFS), que permite aislar y purificar el compuesto de interés, desde la matriz donde se encuentran, y su posterior análisis por técnicas instrumentales. La EFS se basa en la partición de los compuestos entre una fase líquida (muestra acuosa) y una fase sólida (adsorbente) gobernada por fuerzas intermoleculares entre ambas fases. Los compuestos a ser extraídos deben tener mayor afinidad por la fase sólida que por la matriz de la muestra (fase acuosa). El analito retenido es luego eluído con un pequeño volumen de solvente, proporcionando extractos concentrados. En este sentido, la EFS se realiza por tres razones fundamentales: eliminar interferencias de la matriz de la muestra, concentrar los analitos, y por tanto mejorar el rendimiento del sistema analítico.

Los adsorbentes poliméricos son los más empleados en la actualidad para la extracción de compuestos farmacéuticos, en muestras biológicas y acuosas, por su capacidad de retener analitos en una gama muy amplia de polaridades y su gran estabilidad en todo el rango de pH (1-14). Estos adsorbentes suelen empacarse en cartuchos, y uno de los más utilizados el cartucho comercial OASIS ® HLB (Waters), constituido por un co-polímero formado por dos monómeros, uno hidrofílico (N-vinilpirrolidona), que imparte propiedades humectantes

y de retención de analitos polares, y otro lipofílico (divinilbenceno), el cual confiere propiedades de retención de compuestos en fase reversa (Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Especificaciones del cartuchos de extracción OASIS® HLB utilizado.

Especificaciones	**Valores**
Tamaño del cartucho (mL)	3
Modo	Fase reversa
Tamaño de partícula (µm)	30
Tamaño de poro (Å)	80
Sustrato adsorbente	Co-polímero formado entre la N-vinilpirrolidona y el divinilbenceno
Estructura del adsorbente	
Peso de adsorbente (mg)	60
Rango de pH (adim)	0 - 14

Fuente: Waters Corporation, 2014.

El proceso de EFS se realiza de manera general en cinco etapas:

- ***Etapa 1. Acondicionamiento:*** Consiste en solvatar el adsorbente con solventes apropiados. Usualmente se inicia con solventes orgánicos seguido de mismo solvente de la matriz donde se encuentra el analito.

- ***Etapa 2. Carga:*** Se transfiere la muestra al cartucho de extracción, a un flujo lo suficientemente bajo, para asegurar una adsorción eficiente de los analitos en el adsorbente.

- ***Etapa 3. Lavado:*** Permite eliminar las interferencias de compuestos no deseados o débilmente retenidos. Debe utilizarse un solvente que no elimine el analito de interés.

- ***Etapa 4: Secado:*** Opcional y se realiza normalmente con un flujo de nitrógeno, para eliminar la mayor parte del agua (también puede utilizarse vacío).

- ***Etapa 5. Elución*****:** Se utiliza una solución que rompa las interacciones entre el analito y el adsorbente, pero que deje retenidas las impurezas que no pudieron eliminarse en la fase de lavado. El eluato se recolecta para su posterior análisis.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos, materiales y equipos

3.1.1 Reactivos y solventes

Se utilizaron patrones certificados de ibuprofeno y diclofenac sódico de alta pureza, 98 y 99%, respectivamente (Sigma-Aldrich). Los reactivos y solventes utilizados en el análisis cromatográfico, extracciones, estudios biológicos y ensayos de adsorción son de grado analítico suministrados por diferentes casas comerciales: metanol grado HPLC, (CH_3OH) - Merck, , ácido acético (CH_3COOH) - Merck, ácido fórmico (HCOOH) – Merck, ácido clorhídrico (HCl) - Riedel de Haën, hidróxido de sodio (NaOH) – Merck, cloruro de bario ($BaCl_2$) – Riedel-de Haën, fenolftaleína - Merck, cloroformo ($CHCl_3$) – Fisher Scientific, sulfato de potasio (K_2SO_4) – Prolabo Venezolana, ácido sulfúrico (H_2SO_4) – Fulka, dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) – Meyer, ácido fosfórico (H_3PO_4) – Merck, sal de Mohr [$Fe(NH_4)_2SO_4.6H_2O$] – Merck, ferroína– Merck, cloruro de calcio ($CaCl_2$) – Riedel-de Haën, azida de sodio (NaN_3) – Fisher Scientific.

3.1.2 Materiales y equipos

Espectrómetro UV-Visible Diode Array, marca Hewlett-Packard, modelo HP 8452A. Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), marca Hewlett Packard, modelo 1050 con detector UV/Vis de longitud de onda variable, acoplado a una computadora con el programa Agilent ChemStation de Systems Agilent Technologies para el procesamiento de los datos. Cartuchos de EFS marca Oasis HLB. Balanza analítica Denver Instrument modelo APX-200 y otra marca Citizen modelo CY360. Medidor de pH, marca ORION. Estufa marca Precision Scientific. Tamices de 2 mm y 4 mmm, marca Fischer. Centrifuga, marca Thermo IEC CL30Damon/IEC Division. Autoclave, marca Boekel., modelo 710A. Bomba de vacío, marca Fisatam modelo 820 y otra marca AEG tipo ADEB71N4R3. Agitador horizontal marca IKA, modelo KS 130. Filtros porosos de vidrio marca Sartorius. Ultrasonido, marca Branson modelo 8510. Micropipetas marca Eppendorf Research serie 2100 (10-100 µL y 100-1000 µL). Macropipetas marca Socovex (0,5 – 5,0 mL). Sistema de obtención de agua desionizada (>18 MΩ), modelo Milli-Q plus Millipore, marca Waters.

3.2 Métodos

3.2.1 Selección de los suelos según sus propiedades físicas y químicas

Este objetivo se llevó a cabo bajo la asesoría del Instituto de Edafología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (UCV), y se escogieron suelos ubicados en el Campo Experimental de dicha facultad (El Limón, estado Aragua). Para la selección de los suelos se establecieron los siguientes criterios: dos suelos de uso agrícola con características diferentes en cuanto al contenido de materia orgánica y pH, ya que según la investigación bibliográfica previamente realizada, estos parámetros son las variables más influyentes en los procesos de degradación y adsorción de compuestos orgánicos en el suelo.

Para ello, se realizó un muestreo preliminar, a fin de verificar que los suelos cumplieran con los criterios establecidos. En este sentido, se preseleccionaron cinco (5) suelos de la Serie Maracay mediante el uso de mapas en escala 1:7500. Seguidamente, se delimitó un área de 1 m^2 y se limpió la superficie del suelo removiendo residuos como piedras, raíces, hojas secas y vegetación presente, y se fijaron los puntos de muestreo siguiendo un patrón en zigzag. Las muestras se recolectaron a 20 cm de profundidad, de acuerdo a lo establecido por U.S. EPA (2008) y OECD (2002) y publicaciones internacionales de estudios de fármacos en suelos (Yu et al., 2013; Monteiro & Boxall., 2009). Posteriormente se obtuvo una muestra compuesta, la cual se secó al aire en el invernadero. Finalmente se realizaron los análisis físico-químicos (textura, pH y MO) según la metodología establecida (Tablas 3.1 y 3.2), y en función a los criterios fijados se seleccionaron los dos suelos.

Una vez seleccionados los suelos, se procedió a realizar el muestreo definitivo. Para ello, se limpió la superficie del suelo del área delimitada en el muestreo preliminar (1 m^2) y primeramente se recolectaron al azar cinco muestras no alteradas del suelo, mediante un tomamuestras tipo Uhland según lo descrito por Pla, 1977. Seguidamente se fijó una profundidad de 20 cm y se procedió a retirar con una pala el suelo siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito (muestreo sistemático en un patrón en zigzag y formando una muestra compuesta). Las muestras alteradas del suelo se almacenaron en

bolsas plásticas, se trasladaron al invernadero y se dividió en dos partes. La primera de ellas se utilizó en los ensayos biológicos y se conservó con la humedad de campo, almacenándola bajo refrigeración a 4ºC hasta su uso, esto con el fin de mantener la humedad del suelo y así conservar la biomasa microbiana original (Aciego, 2007; OECD, 2002). El suelo restante se secó al aire en el invernadero y se sometió a un proceso de tamizado a < 2mm; esta parte se empleó para la caracterización física y química y para los ensayos de adsorción.

3.2.1.1 Caracterización física y química de los suelos

La caracterización física y química de los suelos se realizó en los laboratorios de la Facultad de Agronomía UCV (Física de Suelos, General de Suelos y Química de Suelos), siguiendo las metodologías establecidas por estos laboratorios, las cuales están basadas en procedimientos estándares internacionales. Las tablas 3.1 y 3.2 muestran los parámetros físicos y químicos evaluados, respectivamente, así como las características que debe presentar la muestra para el análisis. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, reportándose el valor medio con su respectiva desviación estándar empleando el programa de Microsoft Excel® (año). Los parámetros de humificación de los suelos se determinaron empleando las ecuaciones E.1, E.2 y E.3.

Tabla 3.1 Métodos empleados en la caracterización física de los suelos.

Parámetros	Método	Referencia
Humedad [a] (%)	Método gravimétrico en horno por 24 h a 105ºC o hasta peso constante	Topp, 1993
Distribución del tamaño de partícula [a] (%)	Método de Bouyoucos	Gee & Bauder, 1986
Capacidad de retención de agua [a] (CRA, %)	Método de cámara de presión (a -33 kPa)	Pla, 1977 [c]
Densidad aparente [b] (g cm^{-3})	Método de plato poroso	
Espacio poroso total [b] (%)		
Conductividad hidráulica saturada [b] (cm h^{-1})	Método del permeámetro de carga constante modificado	Reynolds, 1993

Nota: [a] Muestras alteradas de suelo < 2mm. [b] Muestras no alteradas de suelo. [c] Metodologías descritas en esta fuente.

Tabla 3.2 Métodos utilizados en la caracterización química de los suelos.

Parámetros	Método de determinación	Referencia
pH	Método potenciométrico en suspensión suelo/agua (1:1) y suelo/0,01 M $CaCl_2$, (1:1)	UCV, 1993[a]
Conductividad eléctrica (dS m^{-1})	Método conductimétrico en suspensión suelo/agua (1:1)	
Cationes intercambiables (cmol Kg^{-1})	Extracción con CH_3COONH_4 y determinación de cada catión (K^+, Ca^{2+}, Na^+, Mg^{2+}) por adsorción atómica	
Capacidad de intercambio catiónico (cmol Kg^{-1})	Extracción con CH_3COONH_4 seguido de lavado con alcohol, desplazamiento del amonio con una solución ácida de KCl y posterior destilación. Determinación por titulación ácido-base	Hendershot et al., 1993
H y Al intercambiable (cmol Kg^{-1})	Se utiliza una solución 1N de KCl para extraer los iones H^+ y Al^{3+} del suelo, a través de un intercambio catiónico de la fase sólida del suelo, obteniéndose HCl y $AlCl_3$. Posterior titulación con NaOH 0,1 N (acidez intercambiable). Adición de NaF al 4% y titulación con HCl 0,1 N (Al^{3+} intercambiable). El H^+ intercambiable se calcula como la diferencia entre la acidez intercambiable (Al^{3+} y H^+) y el aluminio intercambiable	UCV, 1993[a]
Nitrógeno total (%)	Oxidación seguida de una destilación Kjeldhal Determinación por titulación ácido-base	
Fósforo, (mg kg^{-1})	Método Mehlich 1 (Solución extractante HCl 0,05 N y H_2SO_4 0,025 N). Determinación colorimétrica	Olsen & Sommers, 1982
Contenido de materia orgánica (%)	Oxidación de la materia orgánica con $K_2Cr_2O_7$ y H_2SO_4 (Método de Walkey- Black). Determinación fotocolorimétrica	UCV, 1993[a]
Fraccionamiento de materia orgánica, (%)	Extracción con 0,1 M NaOH y 0,1 M $Na_4P_2O_7$ (50:50), separación de las distintas fracciones por solubilidad en ácidos y fraccionamiento mediante el uso de columnas de polivinilpirrolidona. Posterior oxidación de cada fracción por el Método de Walkey- Black	Ciavatta et al., 1990

Nota: Para los análisis químicos se utilizaron muestras alteradas de suelo a < 2mm. [a] Metodologías descritas en esta fuente.

3.2.2 Establecimiento del método analítico para la determinación de los CF

De acuerdo con la revisión realizada (Yu & Wu, 2012; Xu et al., 2008; Yu et al., 2013; Xu et al., 2009c; U.S. EPA, 2007), el procedimiento para la cuantificación de los CF depende del estado físico en que se encuentra la muestra. En este sentido, se analizaron muestras de suelo para los ensayos de cinética de degradación y, muestras acuosas para los estudios de adsorción, por lo que se establecieron dos procedimientos de análisis. Es importante acotar que las referencias consultadas reportan técnicas de análisis (GC-MS; LC-MS/MS) diferentes a la que fue utilizada en esta investigación (HPLC-UV), pero sirvieron de base para definir las etapas previas al análisis cromatográfico.

3.2.2.1 Procedimiento para muestras de suelo

Las muestras de suelo (con y sin aplicación del CF) se sometieron primero a una Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU) y luego se realizaron las etapas de limpieza y concentración de la muestra mediante una Extracción en Fase Sólida (EFS) y finalmente se inyectaron al HPLC-UV (Figura 3.1).

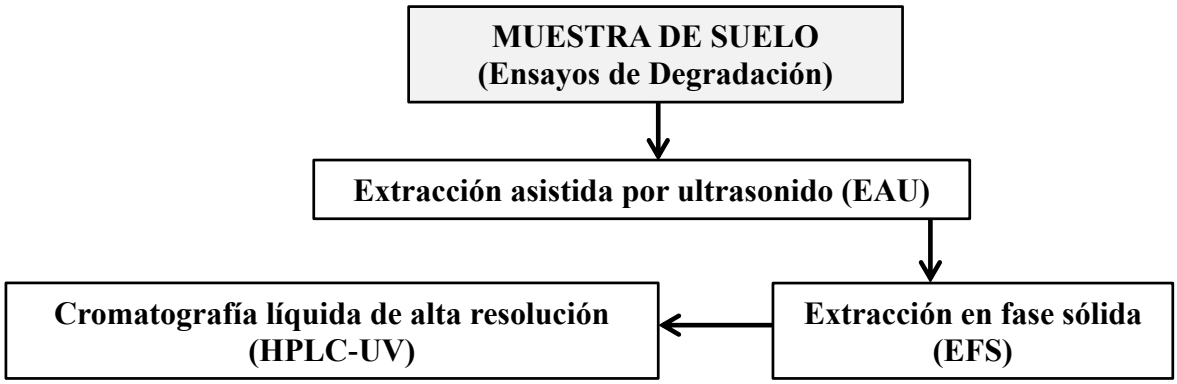


Figura 3.1 Etapas involucradas en el análisis de muestras de suelo.

A continuación se indican las distintas fases que incluyen la EAU, EFS y el análisis cromatográfico.

a) **Extracción asistida por ultrasonido (EAU)**: Incluye los siguientes pasos (Figura 3.2):

- ***Extracción con solventes***. Se colocaron las muestras de suelo (con y sin aplicación del CF) en tubos de centrífuga, se añadió el solvente orgánico escogido y se mezclaron en un agitador horizontal. Posteriormente, los tubos se colocaron en un ultrasonido donde a través de ondas sonoras de alta frecuencia se favorece una adecuada penetración del disolvente al interior del sólido, y como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente. Seguidamente se llevó a cabo la etapa de centrifugación para separar ambas fases (suelo y la solución) y finalmente, la decantación para retirar la fase orgánica.

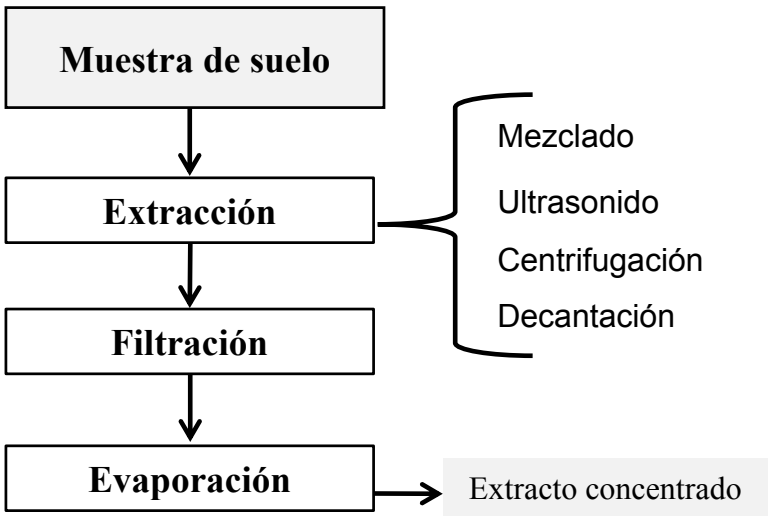


Figura 3.2 Esquema de la fase experimental de la extracción asistida por ultrasonido (EAU).

En esta etapa se establecieron las diferentes condiciones de extracción en cuanto a las siguientes variables: tipo de solvente extractor a utilizar (o combinación de solventes); volumen del mismo; tiempo en las etapas de: mezclado, ultrasonido y centrifugación; y número de ciclos de extracción necesarios. Para ello se realizó una recopilación bibliográfica de los trabajos anteriormente citados y ensayos experimentales, y se definieron las mejores condiciones. En función a esta revisión, se preseleccionaron los solventes de extracción e inicialmente se establecieron las siguientes condiciones: extracciones múltiples de tres ciclos, donde cada ciclo comprende 5 min de agitación en un mezclador horizontal, 15 min en el ultrasonido, 10 min en la centrífuga a 4000 rpm y utilizando 5 mL de solvente extractor en cada ciclo.

- ***Filtración.*** El líquido decantado se filtró para eliminar residuos de suelo. La filtración se realizó por gravedad utilizando un filtro de vidrio poroso ya que presentó menos pérdidas de los analitos que utilizando filtros de papel Whatman número 42, según estudios previos realizados por la autora.

- ***Evaporación***. Se realizó para disminuir en lo posible el volumen del solvente orgánico, lo cual se realizó empleando vacío mediante el uso de una bomba. El extracto concentrado se almacenó congelado (- 5^{o}C) hasta la siguiente etapa.

b) **Extracción en fase sólida (EFS).** En la figura 3.3 se presenta de manera esquemática las fases involucradas en la EFS. Una vez obtenido el extracto orgánico concentrado se lleva a un volumen de 100 mL con agua desionizada para obtener una solución predominantemente acuosa. El proceso de EFS consta de cinco etapas (acondicionamiento, carga, lavado, secado y elución) y se utilizaron cartuchos OASIS HLB 60 mg de 3 mL (30µm), ampliamente empleados para analizar fármacos en muestras ambientales. El acondicionamiento del cartucho se efectuó con 3 mL de solvente orgánico, seguido por 3 ml de solución acuosa, según las recomendaciones establecidas por el fabricante (Waters Corporation, 2014). El lavado de los cartuchos se realizó con agua desionizada, ya que empleando mezclas de solventes orgánico/agua (5/95 v/v), disminuyó el porcentaje de recuperación de los CF en las muestras de suelo. El secado se llevó a cabo por 15 min con vacío. Se corroboró que bajo estas condiciones se obtuvieron porcentajes de recuperación (ecuación E.26) cercanos al 100 %, en estudios previos realizados por la autora, con soluciones de los CF en los solventes preseleccionados.

A través de la revisión bibliográfica, se preseleccionaron los solventes a utilizar en las fases de acondicionamiento y elución. Posteriormente se realizaron ensayos para seleccionar aquel solvente o mezclas de solventes (fase de elución) que permitiera extraer el compuesto de interés del cartucho y en la medida de lo posible, minimizar el arrastre de otros compuestos orgánicos de la matriz del suelo, que pudieran interferir en el análisis cromatográfico.

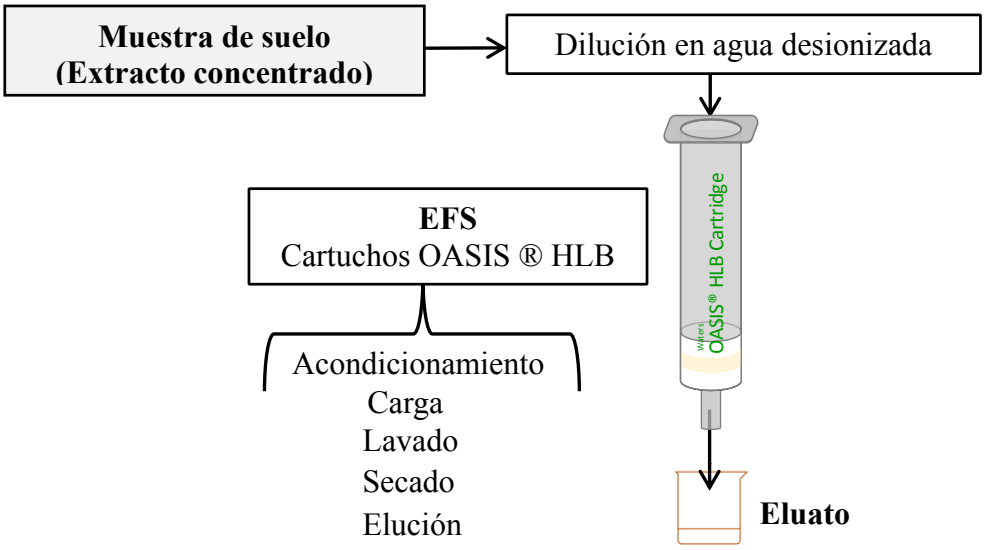


Figura 3.3 Esquema de la fase experimental de la extracción en fase sólida (EFS).

También fue necesario definir el factor de concentración (FC), el cual es una relación entre el volumen inicial de muestra que se hace pasar por el cartucho y el volumen del solvente de elución. Se suelen usar volúmenes pequeños de solventes de elución a fin de obtener extractos concentrados que permitan la cuantificación de los fármacos en el análisis cromatográfico (Waters Corporation, 2014). Para ello, inicialmente se partió de 3 g suelo y empleando 3 mL del solvente de elución.

c) **Análisis cromatográfico.** El eluato obtenido se inyectó en el HPLC para determinar la concentración del fármaco. Para definir las condiciones de operación en el equipo se realizaron primero ensayos con las soluciones patrones de los fármacos y posteriormente, se ajustó el método con muestras del analito en la matriz del suelo. Para ello, se establecieron previamente las siguientes variables:

- ***Longitud de onda:*** Se realizó un barrido en un espectrofotómetro entre 200-400 nm y se seleccionó la longitud de onda donde ocurre la absorción máxima (λmax) de cada CF, ya que el HPLC poseer un detector UV. Para ello se prepararon soluciones patrones de los CF de 10 mg L^{-1} en diferentes solventes. Posteriormente se analizaron las longitudes

obtenidas en el sistema HPLC-UV y se determinó la λ de trabajo que proporcionó la mejor señal cromatográfica, con el menor ruido de la línea base.

- ***Fase móvil:*** A través de una revisión bibliográfica efectuada (Tablas B.1 y B.2), se preseleccionaron diferentes fases móviles y se realizaron ensayos donde se modificaron las proporciones de los componentes de la misma a fin de lograr la mejor separación del CF de otros componentes de la matriz del suelo.

- ***Volumen de inyección:*** Se ensayaron dos volúmenes de inyección (10 y 20 µL), en función a la investigación realizada (Tabla B.1 y B.2), a fin de obtener una señal aceptable de adsorción UV, que permitiera una fácil integración.

- ***Flujo de inyección:*** Se realizaron pruebas a tres diferentes flujos (0,5; 0,7 y 1,0 mL min^{-1}, Tablas B.1 y B.2) ya que la velocidad es una variable que condiciona el contacto de los compuestos orgánicos con la fase estacionaria y por tanto, se puede mejorar la resolución de los distintos picos a flujos más bajos.

3.2.2.2 Procedimiento para muestras acuosas

Para establecer el método de análisis de los fármacos remanentes en la fase acuosa luego del contacto con el suelo, fue necesario primero definir las condiciones en los estudios de adsorción en cuanto a tiempo de equilibrio y relación suelo/solución (objetivo 5). Para ello, se realizaron las pruebas preliminares para establecer estas variables, determinando la concentración de los fármacos a través de la ecuación de regresión de las soluciones patrones. Una vez establecida la ecuación de regresión de las soluciones acuosas provenientes del suelo SA y SC se recalcularon estas concentraciones.

El procedimiento que se realizó fue el siguiente: las mezclas suelo/solución se colocaron en agitación en el tiempo y relación previamente definidos en los estudios de adsorción y posteriormente se llevó a cabo la etapa de centrifugación para separar ambas fases (suelo y la solución). La solución acuosa decantada se filtró a través de un filtro de vidrio poroso para eliminar residuos de suelo. Seguidamente, esta solución se llevó a un volumen de 100

mL con agua desionizada y sometió al proceso de EFS y análisis cromatográfico (Figura 3.4). Los procedimientos de EFS y HPLC-UV son los mismos anteriormente descritos para muestras de suelo, pero se ajustó el factor de concentración.

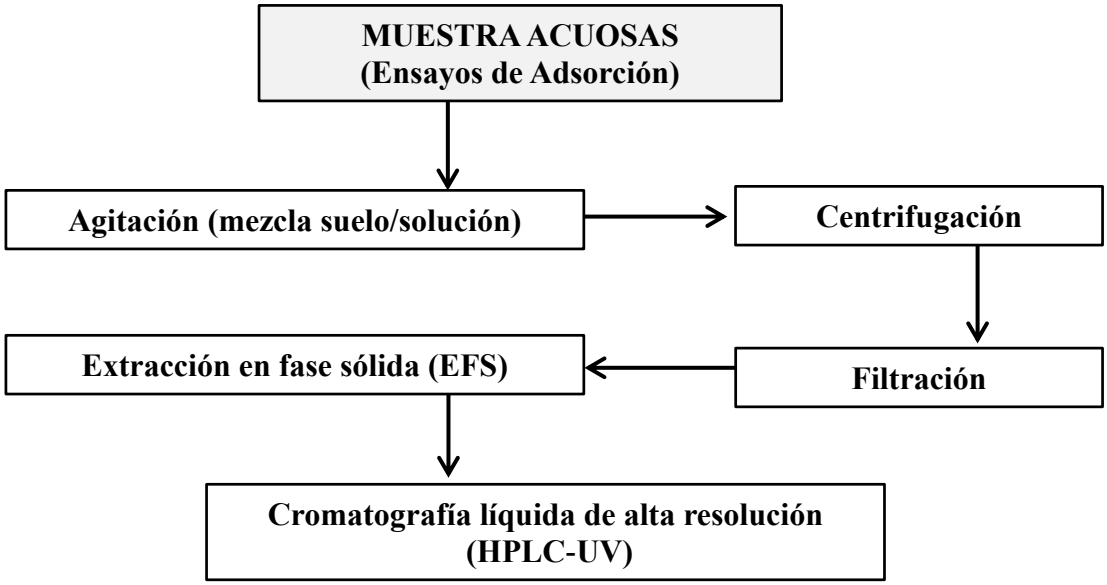


Figura 3.4 Etapas involucradas en el análisis de muestras acuosas.

3.2.2.3 Establecimiento de los parámetros de desempeño de los métodos

La verificación de la metodología analítica establecida se realizó a través de la determinación de los parámetros de desempeño o calidad (UNODC, 2010), los cuales se indican a continuación:

- ***Linealidad:*** Se refiere a la relación lineal que debe existir entre la variable dependiente (área bajo el pico cromatográfico) y la variable independiente (concentración). Para ello, se realizó el siguiente procedimiento: Una vez establecidas las condiciones en la EFS y HPLC-UV, se prepararon soluciones de cada CF de 500 mg L^{-1} en la fase de elución seleccionada (solución patrón) y se almacenó a -5^{o}C en la oscuridad. Las soluciones de trabajo se prepararon, a seis niveles de concentración, por dilución de la solución patrón en la fase de elución definida (Tabla A.1). Posteriormente, se realizó el análisis por HPLC y se verificó el área bajo el pico cromatográfico para cada concentración.

Con estos datos (área y concentración) se realizó el análisis de regresión mediante el software Statgraphics Centurion XVI, en su versión DEMO, a través de los siguientes comandos: *Mejorar – Análisis de regresión – Un factor – Regresión simple (modelo lineal)*. El programa suministra el modelo matemático entre las variables en estudio, el coeficiente de determinación (R^2 ajustado) que mide la proporción de la variabilidad en la variable dependiente ("y") que puede ser explicado por el modelo de regresión, y el valor de P. Para un nivel de confianza del 95%, un valor de $P < 0,05$ indica que el área bajo el pico cromatográfico es un buen predictor para estimar la concentración, y por tanto el modelo de regresión es significativo. El análisis de regresión suministra también la curva de calibración y la gráfica de los residuos, la cual refleja las diferencias entre los valores observado de "y" y los valores predicho por el modelo. La línea generada por el método de mínimos cuadrados (curva de calibración), es aquella que reduce al mínimo la suma de los cuadrados de los residuos de todos los puntos.

Es importante señalar, que se realizaron también curvas de calibración en las dos matrices estudiadas (muestras de suelo y solución acuosa de los estudios de adsorción). Para las muestras de suelo, se pesó la cantidad de suelo definida y se agregó el volumen de agua desionizada necesaria, para llevar al 70 % de su capacidad de retención hídrica, a la cual previamente se había añadido una alícuota de 100 µL de la solución de trabajo del CF en metanol. Dichas soluciones de trabajo, se prepararon por dilución de la solución madre del CF de 500 mg L^{-1} en metanol, en el rango entre 50 y 400 mg L^{-1} (Tabla A.2). Esto se realizó con la finalidad de mantener el mismo volumen de la alícuota de la solución de trabajo (100 µL) en el rango de concentración estudiado para la construcción de las curvas de calibración (seis valores de concentración). Posteriormente las muestras fortificadas con el CF se sometieron a todo el proceso para el análisis de muestras de suelo (EAU, EFS y HPLC).

En el caso de los ensayos de adsorción, se sometieron las muestras de suelo al proceso de mezclado (en el tiempo y relación suelo/solución definidas) y antes de realizar la EFS se fortificaron las muestras con el CF. Para ello, a partir de la solución madre del CF de 2000 mg L^{-1} en metanol se prepararon las soluciones de trabajo entre 150 y 1500 mg L^{-1} (Tabla

A.2) a fin de mantener el mismo volumen de la alícuota en la fortificación de las muestras (100 µL). Se añadió dicha alícuota a la solución filtrada para alcanzar el rango de concentración estudiado (seis valores de concentración), luego se diluyó con 100 mL de agua desionizada y se sometió a la EFS.

En ambos casos (muestras de suelo y acuosas), se determinó el área a través del análisis por HPLC para cada concentración ensayada, y se realizó el análisis de regresión mediante el software Statgraphics Centurion XVI, en su versión DEMO, según el procedimiento descrito para las soluciones de los patrones. Estas curvas de calibración se compararon con las curvas obtenidas con las soluciones patrones a fin de corroborar si existe un efecto debido a la matriz del suelo. Para el estudio de la linealidad, se realizaron 2 réplicas (tres ensayos) para cada concentración.

Para determinar la concentración de una muestra problema se tomó el valor del área bajo la curva en el HPLC-UV y se sustituyó en el modelo matemático planteado por la regresión lineal. La ecuación general para la determinación de la concentración de una muestra por medio de las curvas de calibrado, se presenta a continuación:

$$C_x = \frac{y_x - b}{m} \qquad (E.20)$$

donde:
C_x = Concentración desconocida (mg L^{-1}).
y_x = Área del pico de la muestra a la C_x (cm^{-2}).
b = Ordenada al origen de la curva de calibración (cm^{-2}).
m = Pendiente de la curva de calibración (cm^{-2} L mg^{-1}).

Por otra parte, la desviación estándar de los resultados obtenidos a partir de la curva de calibración, para la concentración (C_x), se determinó a partir del siguiente modelo (Skoog et al, 2008):

$$S_c = \frac{S_r}{m}\sqrt{\frac{1}{M} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{y_c} - \bar{y})^2}{m^2 S_{xx}}} \qquad (E.21)$$

donde:
S_c = Desviación estándar en la concentración obtenida de la curva de calibración (mg L^{-1}).
S_r = Desviación estándar con respecto a la regresión (cm^{-2}).
M = Cantidad de resultados reproducidos (Adim.).
N = Cantidad de puntos en la curva de calibración (Adim.).
$\overline{y_c}$ = Respuesta media para la incógnita (área) (cm^{-2}).
$\bar{y}$ = Valor medio de área para los resultados de la calibración (cm^{-2}).
S_{xx} =Suma de las desviaciones al cuadrado de los valores de x con respecto a la media de sus valores individuales (mg^2 L^{-2}).

Para la determinación de la desviación estándar con respecto a la regresión (S_r), se empleó el siguiente modelo:

$$S_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - m^2 S_{xx}}{N-2}} \qquad (E.22)$$

La suma de las desviaciones al cuadrado de los valores de y con respecto a la media de sus valores individuales (S_{yy}) y la suma de las desviaciones al cuadrado de los valores de x, con respecto a la media de sus valores individuales (S_{xx}) se determinaron empleando las ecuaciones E.23 y E.24, respectivamente.

$$S_{yy} = \sum {y_i}^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N} \qquad (E.23) \qquad S_{xx} = \sum {x_i}^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N} \qquad (E.24)$$

- ***Selectividad:*** La capacidad del método propuesto para determinar los fármacos en estudio sin interferencias de la matriz se midió a través del factor de resolución, el cual se calculó empleando la E.25 (IUPAC, 1995):

$$R_S = \frac{(T_{R2} - T_{R1}) * 2}{(W_{b1} + W_{b2})} \qquad (E.25)$$

donde:
R_S = Factor de resolución (min cm^{-1}).
T_R = Tiempo de retención de dos picos cercanos 1 y 2 (min), con $T_{R2} > T_{R1}$.
W_b = Ancho de la base de dos picos cercanos 1 y 2 (cm).

Se considera que dos señales contiguas se encuentran separadas si se alcanza un factor de resolución superior a 1,5 (Dong, 2006).

- ***Exactitud***: Se midió mediante ensayos de recuperación de muestras fortificadas a tres niveles del fármaco (Kazusaki et al., 2012). Las muestras se fortifican siguiendo el mismo procedimiento descrito en el estudio de linealidad en las tres matrices (soluciones patrones, muestras de suelo y acuosas) y seguidamente se realizaron las etapas de purificación y preconcentración anteriormente descrita según el tipo de muestra y finalmente se realizó el análisis cromatográfico y se determinó la concentración del fármaco empleando las curvas de calibración.

Se compararon los valores de las concentraciones añadidas a las muestras (Concentración teórica) con los valores de las concentraciones que reporta el método (Concentración encontrada), a través de un análisis de varianza (ANOVA) que permite determinar si hay (o no) diferencias significativas entre estas dos concentraciones. Para ello desde el menú principal del programa Statgraphics Centurion XVI, en su versión DEMO, se selecciona los siguientes comandos: *Analizar – Datos continuos – Comparación de dos muestras – Muestras independientes*. Se contrasta la hipótesis de que la media de las dos poblaciones es la misma (hipótesis nula), lo cual se comprueba si el valor de p > 0,05.

El porcentaje de recuperación se determinó empleando la E.26 (UNODC, 2010).

$$R = \frac{C_{enct.}}{C_{añad.}} \times 100 \qquad (E.26)$$

donde:
R = Porcentaje de recuperación (%).
$C_{enct.}$ = Concentración encontrada o experimental (mg L^{-1}).
$C_{añad.}$ = Concentración añadida al sistema en estudio (mg L^{-1}).

- ***Precisión***: Se midió en términos de desviación estándar relativa (DER) de los resultados analíticos obtenidos de las muestras fortificadas en los ensayos de recuperación, empleando la ecuación E.27 (Skoog et al., 2008). Por otra parte, se evaluó también la

repetitividad instrumental a través de la determinación por HPLC-UV de una misma muestra en cada matriz, inyectada en forma consecutiva 11 veces y calculando la DER en dichas señales empleando la ecuación E.27.

$$DER = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% \qquad (E.27)$$

donde:
$\bar{x}$ = Media en la concentración (mg L^{-1}).
s = Desviación estándar en la concentración (mg L^{-1}).

- ***Rango de determinación:*** Se estableció como el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual se demostró la correcta precisión, exactitud y linealidad del método propuesto (Kazusaki et al., 2012).

- ***Límite de detección (LD)***: Corresponde a la mínima concentración de analito en una muestra que puede ser detectada. Para su determinación se empleó la ecuación E.28 (Skoog et al., 2008).

$$LD = \frac{S_m - \overline{S_{bl}}}{m} \qquad (E.28)$$

donde:
LD = Límite de detección (mg L^{-1}).
S_m = Mínima señal analítica distinguible (cm^{-2}).
$\overline{S_{bl}}$ = Media de la señal del blanco (cm^{-2}).
m = Pendiente de la curva de calibración (cm^{-2} L mg^{-1}).

La media de la señal del blanco ($\overline{S_{bl}}$) se estimó con tres mediciones de las muestras sin adición de los fármacos, sometidas a todas las etapas involucradas en el análisis de muestras de suelo y las muestras acuosas, según sea el caso. Por otra parte, la mínima señal distinguible (S_m) se estimó utilizando la ecuación E.29, donde a *k* se le asigna un valor de 3, para un nivel de confianza en la detección de un 95% (ICH, 2005).

$$S_m = \overline{S_{bl}} + k \cdot s_{bl} \qquad (E.29)$$

donde:
S_m = Mínima señal analítica distinguible (cm^{-2}).
$\overline{S_{bl}}$ = Media de la señal del blanco (cm^{-2}).
s_{bl} = Desviación estándar del blanco (cm^{-2}).
k = Múltiplo de la desviación estándar del blanco (Adim.).

- ***Límite de cuantificación (LC)***: Se calculó empleando las mismas ecuaciones E.28 y E.29, utilizando un valor de *k* igual a 10 para un nivel de confianza en la detección de un 95% (ICH, 2005).

Finalmente es importante señalar que todos los parámetros de desempeño anteriormente explicados (linealidad, exactitud, precisión, rango de determinación, límite de detección y límite de cuantificación) se determinaron para las dos metodologías establecidas según los objetivos planteados: cinética de la degradación (muestras de suelo) y estudios de adsorción (muestras acuosas).

3.2.3 Preparación del suelo para los estudios biológicos

Se realizaron tres tipos de estudios biológicos: Respiración microbiana (R_M), carbono asociado a la biomasa microbiana (C_{BM}) y cinética de la degradación (C_D). Para ello, se utilizó el suelo que se almacenó bajo refrigeración luego del muestreo, y se sometió a un proceso de limpieza, tamizado y preparación, según la metodología establecida por Aciego, 2007 y OECD, 2002.

- ***Limpieza y tamizado del suelo.*** Se realizó con la finalidad de remover restos de material vegetal (raíces, hojas, paja), animal y grava. El suelo fue tamizado a < 2 mm y almacenado a 4^{o}C hasta su uso. Se tomó una muestra para la determinación de humedad.

- ***Ajuste inicial de la humedad del suelo.*** Se ajustó el suelo al 40% de su capacidad de retención hídrica. Para ello, se pesó 1100 g del SA y 1150 del suelo SC por cada tratamiento, se extendió en forma de una capa delgada sobre una superficie impermeable y se roció de manera uniforme la cantidad de agua destilada estimada (Tabla A.3).

- ***Pre-incubación del suelo.*** El suelo humedecido de cada tratamiento se colocó en bolsas plásticas y se insertó un pedazo de servilleta mojada en el tope de la bolsa para permitir el intercambio de aire y agua. Posteriormente, dichas bolsas se colocaron en la oscuridad en el cuarto de incubación del Laboratorio de Fertilidad y Biología de Suelos de la Facultad de Agronomía de la UCV a 25ºC por 6 días). La pre-incubación permite la germinación de cualquier semilla que pudiera haber quedado y así proceder a su remoción. Además, permite re-establecer el equilibrio metabólico microbiano debido a cambios provocados durante el muestreo y almacenamiento (OECD, 2002).

- ***Aplicación de los tratamientos.*** El suelo de cada tratamiento se extendió en forma de una capa delgada sobre una superficie impermeable y roció con la cantidad de agua destilada necesaria para completar el 70 % de la capacidad de retención (Tabla A.3), a la cual previamente se había añadido una alícuota de 1mL de la solución madre del CF de 1.000 mg L^{-1} y 5.000 mg L^{-1} en metanol, para la dosis mayor y menor, respectivamente, a fin de mantener la misma alícuota de estas soluciones a los dos niveles de concentración ensayados (Tabla A.4).

3.2.4 Valoración del efecto de los CF en la actividad microbiana de los suelos

El efecto del diclofenac y el ibuprofeno, en la actividad microbiana de los suelos, se estudió en términos de la respiración (R_M) y carbono asociado a la biomasa microbiana (C_{BM}). Se seleccionaron dos dosis de los fármacos (1 y 5 mg Kg^{-1}suelo), según fuentes consultadas (Cui et al., 2014; Monteiro & Boxall, 2009; Xu et al., 2009a,c; OECD, 2002). La dosis más alta (5 mg Kg^{-1} suelo) se escogió como la concentración inicial en la evaluación de la cinética de la degradación de los fármacos (Objetivo 4), en función de los límites de cuantificación obtenidos en el método de análisis propuesto para muestras de suelo (Objetivo 2). De esta forma, se correlacionaron los resultados de la R_M y C_{BM} con los ensayos de degradación. Por su parte, se seleccionó otra concentración, a una menor dosis, para estudiar el efecto de la concentración de los fármacos en la actividad microbiana de los suelos y en la posible inhibición de su degradación. En este sentido, se realizaron diez (10) tratamientos, ocho (8) con adición del fármaco y dos controles (sin aplicación del CF), tal como se indica en la Tabla 3.3. Se realizaron tres repeticiones para cada tratamiento.

Tabla 3.3 Tratamientos aplicados en los ensayos de respiración y C en biomasa microbiana.

Número	Tratamientos	Tipo de Fármaco	Concentración (mg Kg $^{-1}$suelo)	Tipo de suelo
1	D1SA	Diclofenac	1	SA
2	I1SA	Ibuprofeno	1	SA
3	D5SA	Diclofenac	5	SA
4	I5SA	Ibuprofeno	5	SA
5	D1SC	Diclofenac	1	SC
6	I1SC	Ibuprofeno	1	SC
7	D5SC	Diclofenac	5	SC
8	I5SC	Ibuprofeno	5	SC
9	Control 1	--	0	SA
10	Control 2	--	0	SC

Nota: SA: suelo con cultivo de algodón; SC: suelo con cultivo de cítricos.

A continuación se describe el procedimiento a realizado para la estimación de R_M y C_{BM}.

3.2.4.1 Respiración microbiana del suelo

La determinación de la respiración microbiana se realizó a través de la estimación de la cantidad de CO_2 desprendido durante la incubación de los suelos en un sistema cerrado, el cual es atrapado en una disolución de NaOH, según la metodología descrita por Alef y Nannipieri (1995). El procedimiento consistió en pesar 50 g del suelo preparado (que incluye las etapas de limpieza, tamizado, ajuste de humedad, pre-incubación y aplicación del tratamiento) en un recipiente y posteriormente se introdujo en un frasco de vidrio de 4 L de capacidad y de boca ancha, al cual previamente se había añadido 10 mL de agua destilada en el fondo del mismo (a fin de mantener la humedad del medio). Luego, se colocó otro frasco, con 25 mL de una solución de NaOH 1 M y, se cerró el frasco grande de forma hermética.

Seguidamente, el frasco de vidrio contentivo del suelo, NaOH y agua (Unidad experimental), se colocó bajo condiciones controladas de humedad y temperatura, en el

cuarto de incubación ubicado en el Laboratorio de Fertilidad y Biología de Suelos de la Facultad de Agronomía de la UCV a 25ºC. La humedad ambiental se mantuvo entre 70-80%. Simultáneamente se incubaron unidades con la solución de NaOH pero sin suelo (blanco). Las unidades experimentales se realizaron por triplicado. En los tiempo de incubación establecidos (1, 3, 7, 15, 30 y 45 días), se retiraron los frascos de NaOH, se sustituyeron por otros nuevos y se continuó el experimento. Antes de la titulación del NaOH, se añadió 2 mL de solución de cloruro de bario ($BaCl_2$) 0,5 M y posteriormente se tituló con una solución de HCl 1 M, en presencia de fenolftaleína como indicador.

El CO_2 liberado en la respiración, se calculó de la diferencia entre el valor obtenido de la titulación del blanco y el de la muestra (ecuación E.30), según la ecuación descrita por Guerrero-Ortiz et al. (2012). El valor de 6 corresponde al peso equivalente del carbono y 1000 el factor de conversión de las unidades de masa.

$$C - CO_2 = \frac{M_{HCl} * (Vb_{HCl} - Vm_{HCl}) * 6 * 1000}{PSH * c_{ms}} \qquad (E.30)$$

donde:

$C\text{-}CO_2$ = mg C-CO_2 Kg^{-1} suelo seco
N_{HCl} = concentración de HCl titulante (N)
Vb_{HCl} = volumen HCl al titular el blanco (mL)
Vm_{HCl} = volumen HCl al titular la muestra (mL)
PSH = peso del suelo húmedo incubado (g).
c_{ms} = contenido de masa seca del suelo (Adim.).

La acumulación del $C0_2$ se determinó sumando la respiración producida en el día de incubación establecido, con la contabilizada en los días anteriores.

3.2.4.2 Carbono de la biomasa microbiana

Para la determinación del carbono de la biomasa microbiana (C_{BM}) se utilizó el método Fumigación-Extracción (FE) propuesto por Vance et al. (1987). Para ello, se pesaron 25 g del suelo preparado por cada tratamiento (luego de las etapas de limpieza, tamizado, ajuste de humedad, pre-incubación y aplicación de la dosis del CF) en bolsas plásticas y, se colocaron en el cuarto de incubación del Laboratorio de Fertilidad y Biología de Suelos de la Facultad de Agronomía de la UCV. En el tiempo establecido para el ensayo (1, 3, 7, 15,

30 y 45 días) se retiraron las muestras (tres por cada tratamiento) y, posteriormente se dividieron en dos submuestras: muestras fumigadas y muestras no fumigadas, según el procedimiento establecido por la determinación de C_{BM}, que consta de cuatro etapas.

La primera fase consistió en la fumigación de las muestras, para lo cual se pesó 10 g de suelo en cápsulas de Petri y se colocó dentro de un desecador que además contenía un beaker con 20 mL de cloroformo. Se aplicó vacío hasta la ebullición vigorosa del cloroformo, y se mantuvo por 2 min. Posteriormente, las muestras, bajo la atmósfera del cloroformo contenida en el desecador, se colocaron en el cuarto de incubación en la oscuridad a 25ºC por 24 h. Paralelamente se pesó 10 g de suelo, para las muestras que no fueron sometida al proceso de fumigación (muestras no fumigadas).

Transcurrido el tiempo de fumigación, se procedió a la etapa de extracción, para lo cual ambas muestras (fumigados y no fumigados) se transfirieron a frascos plásticos, se añadió 40 mL de K_2SO_4 0,5M y se sometió a un proceso de agitación por 30 min. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min y se filtró el sobrenadante en papel de filtro Wathman No. 42. Los extractos filtrados se preservaron en la nevera a -5ºC hasta su posterior procesamiento subsiguiente.

La tercera etapa del procedimiento comprendió la digestión de las muestras. Se tomó una alícuota de 5 mL del extracto (previamente descongelado) y se llevó a sequedad en una estufa a 60ºC. Una vez secas las muestras, se añadió 10 mL de H_2SO_4 concentrado y 5 mL de $K_2Cr_2O_7$ 0,25 N y se sometió a un proceso de calentamiento a 110ºC por 90 min en un bloque digestor. Se colocaron también en el digestor muestras de blanco (muestra con las mismas cantidades extractantes y agentes oxidantes, pero sin suelo).

Finalmente, se realizó la titulación redox. Una vez frías las muestras, se transfirieron a envases de vidrio y se añadiendo 100 ml de agua destilada, 5 gotas de H_3PO_4 y 3 gotas de ferroína como indicador. Seguidamente se llevó a cabo la titulación de la solución anterior con una solución 0,25 N de sal de Mohr [$Fe(NH_4)_2SO_4.6H_2O$], previamente valorada con una solución de $K_2Cr_2O_7$ de concentración conocida.

La cantidad de C extraído se calculó mediante la siguiente ecuación (Grace et al., 2006):

$$C_E = \frac{(V_b - V_m) * N * 3 * A * 1000}{PSH * c_{ms}} \qquad (E.31)$$

donde:

C_E = carbono extraído (mg C Kg^{-1} suelo seco).
Vb = volumen de sal de Mohr al titular el blanco (mL).
Vm = volumen de sal de Mohr al titular la muestra (mL).
c_{ms} = contenido de masa seca del suelo (Adim.).
N = normalidad de la sal de Mohr (N).
A = alícuota del extracto (40/5 = 8)
PSH = peso suelo húmedo (g).

El valor de 3 corresponde al número de electrones transferidos en la reducción de dicromato. Posteriormente se utiliza la ecuación E.4 para estimar el C_{BM}, utilizando el valor de 0,38 para la constante (K_{EC}).

Posteriormente, con los resultados de respiración y biomasa se determinó el cociente metabólico de cada tratamiento y se compararon entre sí y con respecto al control, empleando para su cálculo la ecuación E.32 (Sánchez et al., 2005; Mogollón y Martínez, 2009).

$$qCO_2 = \frac{R_M}{C_{BM}} \qquad (E.32)$$

donde:

qCO_2 = cociente metabólico (mg C-CO_2 mg^{-1} C).
R_M = respiración microbiana (mg C-CO_2 Kg^{-1} suelo).
C_{BM} = C en la biomasa microbiana (mg C Kg^{-1} suelo).

Adicionalmente, se utilizó el análisis grafico vectorial propuesto por Gielen et al. (2011), para evaluar el tipo de respuesta de los microorganismos a la presencia de los fármacos en el suelo, según lo establecido en la figura 2.6. Al igual que en la estimación del qCO_2 se emplearon los valores de C_{BM} de cada día, así como los valores de respiración acumulada correspondiente a ese día.

Es importante señalar, que previo a la realización de los estudios biológicos, se verificó en estudios preliminares que la adición de soluciones de agua/metanol no produjera ningún efecto en las variables respuesta (respiración y C de la biomasa). Para ello, se llevaron a cabo ensayos donde se midió la R_M y C_{BM} de muestras de suelo sin fármaco (Control), con el ajuste de humedad con agua (SA/H_2O y SC/H_2O) y con la misma proporción agua/metanol utilizados en los tratamientos (SA/H_2O-CH_3OH y SC/H_2O-CH_3OH). Se realizó el análisis de varianza y se verificó que no existen diferencias significativas en la respiración de los suelos ni en el contenido de la biomasa microbiana entre ambos tratamientos para cada suelo ($p > 0,05$; Tablas C.1 y C.2).

3.2.5 Descripción de la cinética de la reacción de degradación de los CF en los suelos

El estudio de la cinética de degradación de los CF, se realizó a través de la determinación de la cantidad de los fármacos remanentes en los suelos en los tiempos de incubación establecidos para el ensayo. Se partió de una concentración inicial de 5 mg kg^{-1}suelo y se evaluó la cinética de degradación en los suelos, bajo dos condiciones diferentes: dos suelos sin esterilizar (SA y SC) y los mismos suelos pero esterilizados (SAE y SCE) (Tabla 3.4). Estos dos últimos fueron utilizados como controles abióticos, con la finalidad de verificar otros mecanismos de degradación de los fármacos en los suelos, distintos de los fenómenos bióticos.

El procedimiento se basó en una recopilación de estudios internacionales de degradación de fármacos y otros compuestos orgánicos en suelos (Yu et al., 2013; Lin & Gan, 2011; Xu et al., 2009a; Monteiro et al., 2009; OECD; 2002). Para ello, se pesaron 20 g del suelo preparado (luego de las etapas de limpieza, tamizado, ajuste de humedad, pre-incubación y aplicación de la dosis del fármaco) en bolsas plásticas y se colocaron en el cuarto de incubación del Laboratorio de Fertilidad y Biología de Suelos de la Facultad de Agronomía de la UCV. En el tiempo establecido (Día: 1, 3, 7, 15, 30 y 45), se retiraron las muestras (tres por cada tratamiento). Dichas muestras fueron inmediatamente trasladadas bajo refrigeración al Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicadas (CIMA) de la Universidad de Carabobo y se conservaron en nevera a - 40^oC y en la oscuridad hasta su

procesamiento subsiguiente. Antes de realizar la determinación analítica, se descongelaron las muestras y se siguió el procedimiento establecido para las muestras de suelo (Figuras 3.1, 3.2 y 3.3). Se determinó la concentración remanente del fármaco en el suelo empleando las curvas de calibración y seguidamente se graficó dicha concentración en función del tiempo.

Tabla 3.4 Tratamientos aplicados en los ensayos de cinética de degradación.

Número	**Tratamientos**	**Tipo de Fármaco**	**Tipo de suelo**
1	DSA	Diclofenac	SA
2	ISA	Ibuprofeno	SA
3	DSAE	Diclofenac	SA Esterilizado
4	ISAE	Ibuprofeno	SA Esterilizado
5	DSC	Diclofenac	SC
6	ISC	Ibuprofeno	SC
7	DSCE	Diclofenac	SC Esterilizado
8	ISCE	Ibuprofeno	SC Esterilizado

Nota: SA: suelo con cultivo de algodón; SC: suelo con cultivo de cítricos.

Posteriormente se aplicaron los modelos matemáticos propuestos para evaluar la cinética de degradación de cada CF (modelo lineal de primer orden y modelo no lineal de primer orden). Para ello, primeramente se realizó la transformación lineal del modelo cinético de primer orden (E.6) calculando Ln (C_t/C_O) para cada tiempo y se realizó el análisis de regresión mediante el software Statgraphics Centurion XVI, en su versión DEMO, a través de los siguientes comandos: *Mejorar – Análisis de regresión – Un factor – Regresión simple (modelo lineal).* Para un nivel de confianza del 95%, un valor de $P < 0,05$ indica que el modelo de regresión es significativo. También se verificó la calidad de ajuste del modelo a los datos experimentales a través del coeficiente de determinación (R^2ajustado) y, el coeficiente de correlación (R), que mide la intensidad de la relación lineal entre las dos variables. La constante de la velocidad de reacción se obtuvo de la pendiente del modelo lineal y mediante las ecuaciones E.7 y E.8 se determinaron el $t_{1/2}$ y DT_{90}, respectivamente.

Para la regresión no lineal se utilizó la función Solver de Microsoft Excel (2013), colocando como objetivo minimizar la suma de los cuadrado de la función obtenida de la E.10, con las restricciones de α y $\beta > 0$. Una vez estimado α y β se calculan DT_{50} y DT_{90} empleando las ecuaciones E.12 y E.13, respectivamente. Finalmente se compararon ambos modelos (lineal y no lineal) través del coeficiente de determinación y la suma al cuadrado de los residuales.

3.2.5.1 Esterilización de los suelos

Para la esterilización de las muestras de suelo se siguió la metodología establecida por Yu et al. (2013) y Acosta et al. (2013). En tal sentido, se colocaron las muestras de suelo (luego del proceso de limpieza y tamizado) en la autoclave a 121ºC, 1,5 bar por 45 min. Se repitió el paso anterior tres días consecutivos. Entre cada ciclo de esterilización, el suelo se incubó a 25ºC.

La esterilización efectiva de los suelos se corroboró midiendo la respiración microbiana de los mismos en el tiempo de duración del ensayo (45 días). En la figura B.1 se muestran las curvas de respiración de los suelos esterilizados, las cuales reflejan su baja actividad en comparación con los suelos SA y SC. A través del análisis de varianza se encontró que no existen diferencias significativas en la respiración de los suelos esterilizados, y aunque al final del periodo de muestreo se apreció un incremento en la actividad respiratoria, aún se encuentran por debajo de los suelos SA y SC (Tabla C.3).

3.2.5.2 Correlación entre los resultados de biodegradación y R_M y C_{BM}

Los resultados obtenidos en los estudios de cinética de degradación (% concentración remanente en los suelos) se relacionaron con las variables biológicas estudiadas (R_M y C_{BM}). Se empleó el software Statgraphics Centurion XVI, en su versión DEMO, a través de los siguientes comandos: *Analizar – Datos continuos – Métodos multivariados – Análisis multivariado (correlaciones).* Se empleó el coeficiente de correlación (r) de Pearson, el cual es un número entre -1 y +1, que mide la intensidad de la relación lineal entre las dos variables, siendo el valor máximo 1. El signo de la correlación indica su dirección, siendo positiva si "y" aumenta cuando "x" incrementa y negativo si "y" disminuye cuando "x"

aumenta (Statgraphics, 2010). Aquellas correlaciones que resultaron significativas a un nivel de confianza de 0,05 se representaron con un asterisco.

3.2.6 Determinación de la capacidad de adsorción de los CF en los suelos

3.2.6.1 Preparación de las soluciones

Para le elaboración de las isotermas de adsorción, se prepararon soluciones madre en metanol de 2.000 µg mL^{-1} y 4.000 µg mL^{-1} para el ibuprofeno y diclofenac, respectivamente. Las soluciones de trabajo se prepararon por dilución de la solución madre en metanol (Tabla A.5).

3.2.6.2 Isotermas de adsorción

El procedimiento a seguir se basó en una recopilación de estudios de adsorción establecidos por la U.S. EPA (2008) y la OECD (2000) para pesticidas y otras sustancias tóxicas, así como investigaciones internacionales de adsorción de fármacos en suelos (Kodesova et al., 2015; Yu et al., 2013; Xu et al., 2009c). La prueba permite evaluar la adsorción de un compuesto en suelos, mediante pruebas por carga a escala de laboratorio y, comprende las siguientes etapas:

1. Pruebas preliminares

Se realizaron para definir las condiciones para la elaboración de las isotermas de adsorción, tales como: el tiempo de contacto necesario para que el sistema alcance el equilibrio, la relación suelo/solución a utilizar, así como la evaluación de la posible adsorción de los CF en las superficies de los tubos de centrífugas.

- **Determinación del tiempo de equilibrio**

Se pesaron 6 g de cada suelo en tubos de centrífuga de 50 mL y se agregaron 30 mL de solución 0,01 M $CaCl_2$/ 200 mg L^{-1} NaN_3. Posteriormente se añadió una alícuota de 100 µL de la solución de trabajo de 1.500 mg L^{-1} del CF en metanol para alcanzar una concentración de 5 mg L^{-1}. El procedimiento se realizó por separado para cada fármaco. Los tubos se forraron con papel de aluminio y se agitaron en un mezclador horizontal a 480 rpm en los tiempos de agitación establecidos (2, 4, 8, 12 y 16 h) a temperatura ambiental de

25ºC. Posteriormente se centrifugan a 6000 rpm por 10 min y los sobrenadantes se filtraron, utilizando filtro de vidrio poroso. La concentración del fármaco se determinó según la metodología propuesta para muestras acuosas.

- **Establecimiento de la relación suelo/solución**

Se realizó con la finalidad de conocer si la concentración remanente del CF en la solución, luego del proceso de adsorción con diferentes cantidades de suelo, pudiera ser detectada, según de los límites de cuantificación alcanzados con la metodología establecida. En función a ello, y al porcentaje de adsorción de los CF en los suelos, se definió el rango de concentraciones para la elaboración de las isotermas de adsorción. Se ensayaron tres relaciones suelo/solución: 1/10; 1/5 y 1/2, según otros estudios realizados (Kodesova et al., 2015; Yu et al, 2013, Lin & Gan, 2011), para lo cual se pesaron 3, 6 y 15 g de cada suelo a fin de mantener el mismo volumen de la solución (30 mL de solución 0,01 M $CaCl_2$/200 mgL^{-1} NaN_3), y con una dosis de 5 mg L^{-1} del CF. Se repitió el procedimiento anteriormente descrito para el tiempo en equilibrio, colocando las muestran en agitación en el tiempo seleccionado.

2. Elaboración de las isotermas de adsorción

De cada suelo se pesaron 15 g en tubos de centrífuga de 50 mL y se agregaron 30 mL de solución 0,01 M $CaCl_2$/ 200 mg L^{-1} NaN_3, según la relación suelo/solución seleccionada. De cada solución de trabajo del CF en metanol (Tabla A.5) se tomó una alícuota de 100 µL y se añadió a la solución en contacto con el suelo, a fin de alcanzar cada una de las seis concentraciones estudiadas, de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mg L^{-1} para el ibuprofeno y de 2, 4, 6, 8, 10 y 12 mg L^{-1} para el diclofenac. De esta forma se garantizó el mismo volumen de metanol para cada concentración. Se siguió el procedimiento descrito anteriormente, colocando en agitación los tubos en el tiempo de equilibrio definido.

3.2.6.3 Determinación de los coeficientes de adsorción

Según los ensayos realizados con la solución 0,01 M $CaCl_2$/ 200 mg L^{-1} NaN_3 mg L^{-1} (sin suelo) con una dosis de 5 mg L^{-1} de los CF y, sometido al proceso de agitación en el tiempo de equilibrio definido, se comprobó una adsorción despreciables de los analitos en los tubos

de centrífugas o pérdidas de los mismos por volatilización, comprobándose así la estabilidad de los CF. Por ello, la concentración del fármaco adsorbida en el suelo (*Cs*) se estimó por diferencia entre su concentración inicial (C_i) y la concentración remanente en la solución acuosa luego del tiempo de equilibrio (C_{aq}) (Ecuación E.33). Por su parte, el porcentaje de la adsorción (A, %) se calculó como la relación entre la masa adsorbida (m_{ads}, mg) después del respectivo tiempo de contacto y la masa inicial del fármaco (m_i, mg), empleando la ecuación E.34 (U.S. EPA, 2008):

$$C_S = \frac{V_0}{m_s}\left(C_i - C_{aq}\right) \qquad (E.33) \qquad\qquad A = \frac{m_{ads}}{m_i}100 \qquad (E.34)$$

donde, V_0 (mL) es el volumen inicial de la solución, m_s (g) es la masa del suelo.

Los resultados de la adsorción de los fármacos, en cada suelo, se analizaron empleando las isotermas de Langmuir y Freundlich (E.14 y E.15). Con los datos experimentales y la transformación lineal de estas ecuaciones, se realizó el análisis de regresión mediante el software Statgraphics Centurion XVI, en su versión DEMO, a través de los siguientes comandos: *Mejorar – Análisis de regresión – Un factor – Regresión simple (modelo lineal)*. Para un nivel de confianza del 95%, un valor de P < 0,05 indica que el modelo de regresión es significativo. Se compararon las distintas isotermas (lineal, Langmuir y Freundlich) través del coeficiente de determinación (R^2 ajustado) y la suma al cuadrado de los residuales. Finalmente se determinó el coeficiente de distribución (K_d), y el coeficiente de adsorción (K_{OC}), empleando las ecuaciones 16 y 17, respectivamente.

3.2.7 Evaluación del comportamiento ambiental de los CF en los suelos estudiados

Se estimaron los índices de Gustafson (1989) (E.18) y se aplicaron los criterios de Cohen et al. (1984) a fin de predecir la lixiviación del ibuprofeno y el diclofenac en los suelos estudiados. Para ello se utilizaron los valores del tiempo de vida media ($t_{1/2}$) en los suelos, obtenidos en los estudios de degradación y, el coeficiente de adsorción normalizado al contenido de carbono orgánico del suelo (K_{OC}). También se determinó el factor de retardo (F_R) empleando la ecuación E.19 para valorar el movimiento de estos CF a horizontes más

profundos, según las características de los suelos (densidad, porosidad) y los valores de los coeficientes de distribución obtenidos de los estudios de adsorción.

Finalmente, los resultados obtenidos en los ensayos de degradación ($t_{1/2}$ y DT_{50}) y adsorción (*Kd, F_R y GUS)* se relacionaron con el contenido de COT, CAH/CE, GH y pH del suelo. Para ello se empleó el software Statgraphics Centurion XVI, en su versión DEMO, a través de los siguientes comandos: *Analizar – Datos continuos – Métodos multivariados – Análisis multivariado (correlaciones).* Aquellas correlaciones que resultaron significativas a un nivel de confianza de 0,05 se representaron con un asterisco, y con dos asteriscos si la correlación fue significativa a un nivel de confianza de 0,01.

3.2.8 Análisis estadístico.

El tratamiento estadístico de los datos se realizó a través de en un análisis de varianza (prueba ANOVA). Cuando se rechaza la hipótesis nula y se concluye que no hay igualdad entre las medias poblacionales de los tratamientos (o variabilidad en el tiempo en el caso de comparaciones entre muestreos, tiempos de agitación, entre otras variables estudiadas), las diferencias observadas se pueden considerar significativas y por tanto generada por los propios tratamientos y no por la variabilidad de los datos. En estos casos se procedió a realizar la Prueba de Múltiples Rangos basada en el concepto de Diferencia Mínima Significativa (LSD), que es la diferencia mínima que debe existir entre dos o más medias para considerar que los tratamientos correspondientes son significativamente diferentes (Gutiérrez y De La Vara, 2008). Los resultados se indicaron mediante el uso de letras, aquellos valores que llevan la misma letra no se consideran que presentes diferencias asociadas a los tratamientos; sin embargo, para aquellos valores que no compartan una letra se concluyó con una probabilidad del 95% que son estadísticamente diferentes y no debidos a errores experimentales.

CAPÍTULO 4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Selección de los suelos de acuerdo sus propiedades físicas y químicas

4.1.1 Descripción de la zona de muestreo

Los suelos seleccionados pertenecen a la Cuenca del Río Güey, la cual está ubicada al norte del Lago de Valencia, en el lado sur de la rama litoral de la Cordillera de la Costa, en el estado Aragua. Cubre un área aproximada de 1.922 ha y forma parte del Parque Nacional Henri Pittier. El 67% de la cuenca corresponde a montañas de las formaciones geológicas Las Brisas (al norte con una extensión de 1.109 ha), constituido por una secuencia de esquistos cuarzo-feldespáticos-micáceos de edad jurásico-cretácico, y Las Mercedes (al sur con una extensión de 168 ha), donde predominan esquistos cuarzo moscovíticos-grafitosos-calcáreos, con inclusiones de plagioclasas de edad Mesozoica (Sucre, 2013; Viloria et., 2009). También presenta un área plana de sedimentos aluviales con un área aproximada de 635 ha, desarrollada a partir de depósitos provenientes principalmente de la formación Las Brisas, transportada en su mayor parte por el Río Güey (Núñez, 2007).

Según Viloria et al. (2009), en la cuenca del río Güey se identificaron ocho tipos de paisajes diferentes, con zonas de vida entre bosque seco premontano (parte alta de la cuenca) a bosque seco tropical (parte baja de la cuenca). Presenta un clima biestacional con periodo lluvioso de mayo a octubre, en donde se descarga el 90% de la precipitación total, presentando valores medios anuales de temperatura, precipitación y evaporación de 25°C, 1.000 mm y 1.080 mm, respectivamente. En cuanto a la vegetación de la cuenca, destacan los herbazales arbustivos con predominio de gramíneas y chaparros (formación Las Brisas) y bosques semideciduos (formación Las Mercedes).

El río Güey nace al este de las montañas Pico La Mesa y Chimborazo de la Fila Güey, al cual confluyen varias quebradas, pasando a través del valle por la ciudad de Maracay y finalmente desemboca en el Lago de Valencia (Lugo y Fernández-Badillo, 1994). Los suelos presentes en la zona baja de la cuenca (donde se efectuó el muestreo) son de texturas medias (Fa, F, FA, FAL), algunos con ciertos problemas de drenajes y se clasifican como

suelos del orden Mollisol, presentando un buen desarrollo de los horizontes y una capa superficial (horizonte A) con gran concentración de materia orgánica y nutrientes, por lo que poseen una alta fertilidad, donde se desarrollan actividades agrícolas y pecuarias. En la zona alta de la cuenca los suelos presentan texturas medias a gruesas, bien drenados, muy propensos a erosionarse y donde se pueden encontrar órdenes de suelo de Entisol e Inceptisol (Viloria et al., 2009; Núñez, 2007).

4.1.2 Caracterización de los suelos preseleccionados

La tabla 4.1 muestra las clasificaciones texturales y los resultados de los análisis químicos de MO y pH, de los cinco (5) suelos preseleccionados. Los suelos dedicados al pastoreo (SP1 y SP2) presentan textura similar (franco arenosa) con contenido medio de materia orgánica y pH moderadamente ácido. El suelo con cultivo de cacao (SCa) presenta características similares de MO y pH con respecto a los suelos SP1 y SP2, pero con un contenido mayor de partículas de limo y menor de arena, por lo que presentan una textura franco limosa. Por su parte, el suelo con cultivo de algodón (SA) presenta el contenido más bajo de MO, mientras que el suelo con cultivo de cítricos (SC) resultó con el valor más alto de MO. Ambos suelos (SA y SC) se caracterizan por exhibir una textura franca y además del contenido diferente de MO, el suelo de algodón presenta un pH moderadamente ácido, mientras que el suelo de cítrico resultó con un pH neutro.

Tabla 4.1 Caracterización de los suelos preseleccionados.

Análisis	**Muestras**				
	SP1	**SA**	**SP2**	**SCa**	**SC**
Arcilla (A ± 0,1) %	9,9	13,1	10,1	12,0	13,2
Limo (L ± 0,1) %	37,7	39,8	34,7	51,2	47,6
Arena (a ± 0,1) %	52,4	47,1	55,2	37,0	39,2
Arena muy fina (amf ± 0,1) %	20,0	11,7	17,5	21,0	12,8
Arena fina (af ± 0,1) %	24,8	23,8	29,8	12,5	16,9
Arena media (am ± 0,1) %	5,2	9,5	4,7	2,7	5,7
Arena gruesa (ag ± 0,1) %	1,4	1,2	1,4	0,5	2,1
Arena muy gruesa (amg ± 0,1) %	1,0	0,9	1,8	0,3	1,7
Textura	Fa	F	Fa	FL	F
Materia orgánica (MO ± 0,05) %	2,57	2,30	3,49	3,65	4,38
pH (pH ± 0,04)	5,14	5,11	5,24	5,39	6,83
Tipo de cultivo	Pasto	Algodón	Pasto	Cacao	Cítrico

Nota: Fa: franco arenoso; F: franco; FL: franco limoso.

En vista de las características contrastante de pH y MO entre los suelos SA y SC, las cuales resultaron ser estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Anexo D), se escogieron estos suelos para el desarrollo de la presente investigación. Dichos suelos presentan textura similar, lo cual permite mantener constante esta variable y estudiar el efecto del pH y la materia orgánica en los procesos de degradación y adsorción en los suelos de los compuestos en estudio. Cabe destacar que según Thomson y Treoh (1988), los suelos con textura franca son los más recomendado, no sólo para fines agrícolas sino también para estudios ambientales, ya que presentan una mezcla de arena, limo y arcilla en proporciones que les confieren al suelo propiedades equilibradas de las tres fracciones. La cantidad de arcilla que posee un suelo franco, le imparte una apropiada capacidad de almacenar agua y nutrientes; la de arena, proporciona una adecuada aireación y permeabilidad y el limo, permite formar gradualmente más arcilla que reemplace las pérdidas por lixiviación y erosión y libere nutrientes cuando se meteoriza. Debido a estas características, la mayoría de los suelos de importancia agrícola normalmente pertenecen a este grupo textural (Casanova, 2005).

Una vez seleccionado los dos suelos, se procedió al muestreo definitivo. La ubicación geográfica del sitio de muestreo del suelo SA fue: 10º 16´ 40,07´´ de latitud norte y 67º 36´ 35,03´´ de longitud oeste; mientras que el sitio del muestro del SC corresponde a 10º 16´ 53,20´´ de latitud norte y 67º 36´24,92´´ de longitud oeste. Es importante destacar, que el suelo SA presentaba una apariencia seca y con pocos restos de vegetación sobre su superficie (algunas raíces y restos de algodón), mientras que el SC, destinado al cultivo de naranjas y mandarinas, se encontraba húmedo y con importante vida animal (hormigas y lombrices), así como abundante cobertura vegetal.

4.1.3 Caracterización física y química final de los suelos seleccionados

La tabla 4.2 muestra los resultados de la caracterización física y química de los dos suelos seleccionados. El SC presentó un contenido de humedad más alto, lo cual se corroboró visualmente en campo, posiblemente debido a la mayor cobertura vegetal existente en este suelo al momento del muestreo. Por otra parte, a pesar de que ambos suelos son de clase textural franca, el suelo SA tiene un predominio de la fracción arena (Tabla 4.1) lo cual le

confiere una mayor permeabilidad que se refleja en una menor capacidad de retención de agua.

Tabla 4.2 Caracterización física y química de los suelos seleccionados.

Parámetros	**SA**	**SC**
Humedad (H ± 0,1) %	11,8	27,2
Capacidad de retención de agua (CRA ± 1) %	34	38
Densidad aparente (Da ± 0,01) g cm^{-3}	1,10	1,04
Espacio poroso total (EPT ± 0,01) %	34,67	48,03
Espacio poroso >15 µm (EPr ± 0,01) %	10,83	7,28
Conductividad hidráulica saturada (CHS ± 0,01) cm h^{-1}	0,21	0,56
(pH ± 0,05), Agua (1:1)	5,11	6,83
(pH ± 0,05), 0,1 M KCl (1:1)	4,76	6,15
(pH ± 0,05), 0,01 M $CaCl_2$ (1:1)	4,91	6,21
Conductividad eléctrica (CE ± 0,01) dS m^{-1}	0,27	0,21
Calcio intercambiable (Ca ± 0,01) cmol Kg^{-1}	10,37	24,70
Magnesio intercambiable (Mg ± 0,01) cmol Kg^{-1}	1,94	1,33
Potasio intercambiable (K ± 0,01) cmol Kg^{-1}	0,26	0,27
Sodio intercambiable (Na ± 0,01) cmol Kg^{-1}	0,07	0,05
Capacidad de intercambio catiónico (CIC ± 0,01) cmol Kg^{-1}	7,0	11,6
Aluminio (Al ±,1) cmol Kg^{-1}	0	Nd
H (H ± 1) cmol Kg^{-1}	1	Nd
Nitrógeno (N ± 0,001) %	0,138	0,224
Fósforo (P ± 0,01) mg Kg^{-1}	84,13	476,10
Carbono orgánico total (COT ± 0,03) %	1,33	2,54
Carbono extraíble total (CET ± 0,04) %	0,41	0,58
Carbono en ácidos húmicos (CAH ± 0,03) %	0,27	0,51
Carbono en ácidos fúlvicos (CAF ± 0,02) %	0,06	0,07
Carbono en sustancias no húmicas (CSNH ± 0,02) %	0,04	0,05

Nota: Nd: no determinado (pH del suelo > 5,5).

Si se toma en consideración los resultados de las pruebas de índices estructurales se encuentra que ambos suelos presentaron valores de densidad aparente (Da) por debajo del valor mínimo de 1,6 mg cm^{-3} reportado por Florentino (1998) para suelos de textura franca. Sin embargo, se sabe que los suelos con alto contenido de materia orgánica presentan densidades aparentes más bajas debido a que este material es menos pesado que la fracción

mineral del suelo, además la materia orgánica aumenta la estabilidad de los agregados del suelo (Casanova, 2005). En el caso particular del suelo SA, se apreció, durante el muestreo, la superficie compactada, debido posiblemente al paso de la maquinaria (tractor) por la zona. Por otra parte, el suelo SC presenta un mayor espacio poroso total, lo cual le confiere también una menor densidad aparente, mientras que el suelo SA presentó un mayor porcentaje de macroporos (EPr > 15 µm) que puede ser atribuido al mayor contenido de arena presente en este suelo.

En ambos suelos existe un predominio de los microporos (EPr < 15 µm), los cuales son importantes en las capas superficiales ya que este tipo de poros son reservorios de agua que puede ser posteriormente liberado a las plantas; sin embargo, la menor proporción de macroporos, puede afectar la aireación, limitar el desarrollo de las raíces y el crecimiento de las plantas, así como el movimiento del agua y sustancias disueltas en ella a través del perfil del suelo. En este último aspecto, el suelo SC, presentó una mayor conductividad hidráulica saturada, lo cual posiblemente se debió a la presencia en los cilindros de las muestras de suelo de grietas y huecos (muchos de ellos producidos por la fauna presente, según lo observado en campo), los cuales producen flujos preferenciales, entendiéndose como tal, al movimiento desigual y relativamente rápido del agua a través del suelo, con implicaciones agrícolas (disponibilidad de agua y nutrientes) y ambientales, ya que favorece el transporte de contaminantes a las aguas subterráneas disminuyendo su interacción con las fracciones orgánicas y minerales del suelo (Allaire et al., 2009).

En cuanto a las características químicas, los resultados de conductividad eléctrica de los suelos, indicaron una baja concentración de sales solubles, por lo que se pueden clasificar como suelos no salinos ya que presentan valores de CE < 2 dS m^{-1} (Carter, 1993). Por otra parte, el SA presenta una menor CIC, posiblemente debido al menor contenido de MO o a las pérdidas potenciales de cationes por lavado, aunque en ambos suelos se encontraron cantidades medias de magnesio y altas de calcio, considerados ambos macroelementos esenciales, que pueden ser absorbidos por las plantas en forma catiónica, cumpliendo funciones metabólicas y estructurales (Casanova, 2005). Los niveles de fósforo en ambos suelos son altos, presentando el suelo SA valores medios de nitrógeno, mientras que el

suelo SC arrojó valores altos en este parámetro; ambos elementos son considerados esenciales para el crecimiento de las plantas.

El suelo SC presentó valores más altos de COT, lo cual puede ser atribuido a la mayor cantidad de residuos orgánicos observados en campo al momento de realizar el muestreo. La extensión del cultivo de naranjas y mandarinas es más grande, lo cual origina una abundante vegetación aledaña al sitio de muestreo, en comparación con el Suelo SA donde la vegetación es más dispersa. Los valores de COT se encuentran en el rango reportado en otras investigaciones realizadas en suelos de la cuenca del Lago de Valencia. En este sentido, Sánchez et al (2005) reportaron valores de COT entre 0,88 y 2,52 % (Cuenca del Río Maracay) y Viloria et al. (1996), indican valores comprendidos entre 1,75 y 3,53% (suelos entre Guacara y el Lago de Valencia).

En el fraccionamiento de la MO, como muestra la figura 4.1a, el carbono asociado a las huminas representa, dentro de la fracción húmica, la porción más abundante del COT del suelo (69 y 77%), los cuales están en el rango obtenidos en otras investigaciones (Sánchez et al., 2005; Brito, 1976). Por otra parte, se encontraron valores de CET/COT de 31 y 23 % para el suelo SA y SC, respectivamente, ligeramente inferiores al rango establecido por Anderson y Schoenau (1993), pero similares a las obtenidos por Sánchez et al. (2005). Cabe destacar que las relaciones CHum/COT y CET/COT no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos suelos (Anexo D).

La proporción de CAH en el extracto alcalino del suelo SC presentó un valor significativamente más alto con respecto al suelo SA (Figura 4.1b), siendo ésta la fracción predominante en el CET de ambos suelos. Según Zamboni et al. (2006) el predominio de los AH sobre los AF es característico de suelos con un alto grado de evolución y buen contenido de bases como calcio, que favorece la permanencia y estabilidad de las sustancias húmicas. Por otra parte, se encontraron proporciones ligeramente superiores de CAF y CSNH en el extracto alcalino del suelo SA, las cuales no resultaron ser significativas entre ambos suelos (Anexo D).

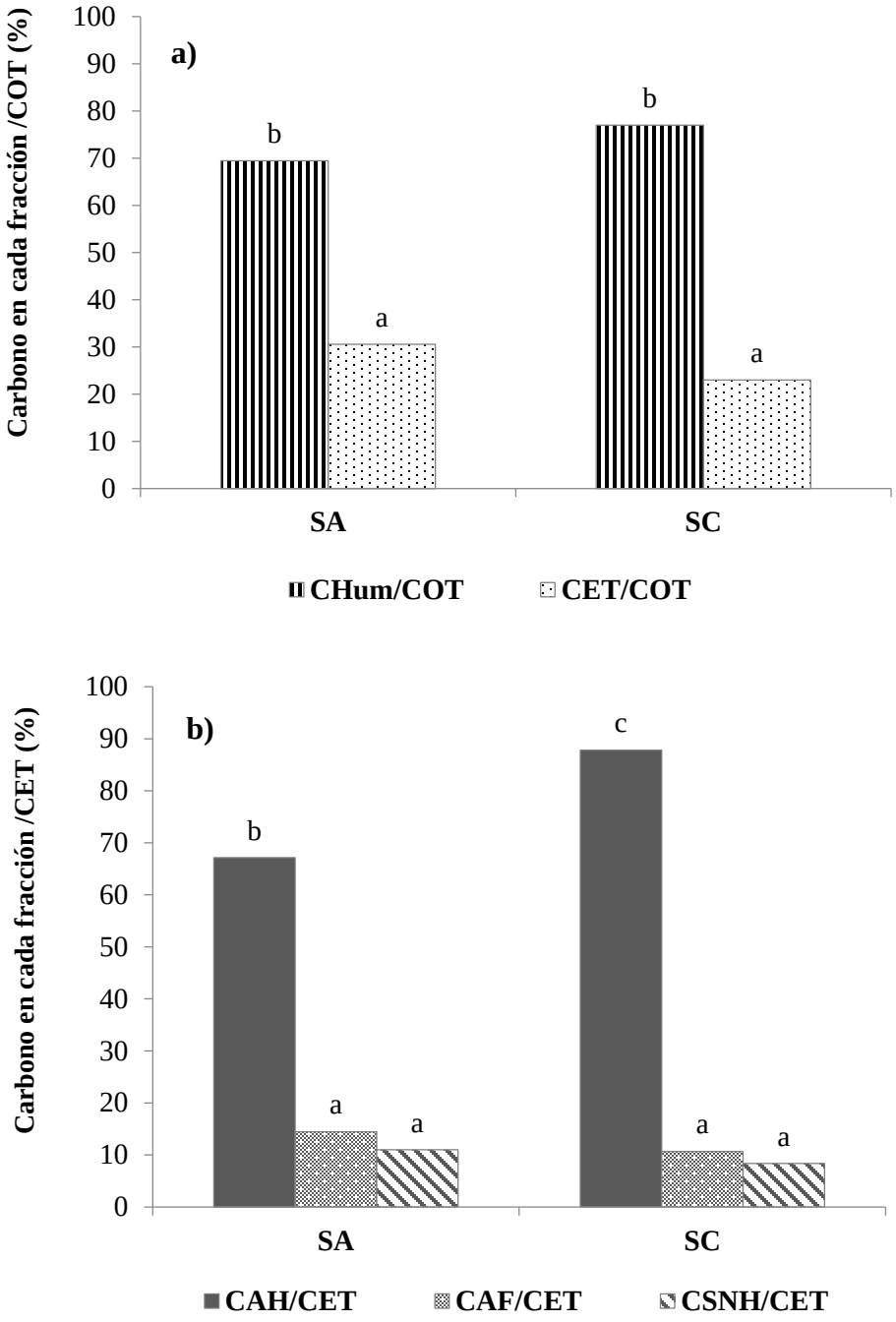


Figura 4.1 Distribución del carbono orgánico total en los suelos SA y SC.

Nota: a) Porcentaje de cada fracción con respecto al COT del suelo. b) Porcentaje de cada fracción con respecto al CET del suelo. Nota: COT: carbono orgánico total; CHum: carbono de huminas; CET: carbono extraíble total; CAH: carbono en ácidos húmicos; CAF: carbono en ácidos fúlvicos; CSNH: carbono en sustancias no húmicas. Medias con superíndices distintos por columna indican diferencias significativas entre ellas (Prueba de múltiples rangos, $P < 0,05$).

La tabla 4.3 muestra los parámetros de humificación de ambos suelos. El suelo SC presentó una relación HA/FA más alta, lo cual refleja un mayor grado de humificación, producto de una mayor actividad microbiana, atribuible a mejores condiciones de humedad, pH, materia orgánica, nutrientes, entre otros. Sin embargo, las tasas de humificación de ambos suelos fueron estadísticamente similares, debido a que los porcentajes de CAH y CAF con respecto al COT fueron también semejantes en los suelos (Anexo D). Las proporciones de las fracciones húmicas/COT fueron comparables a los obtenidos por Sánchez et al. (2005), probablemente porque se trata de suelos geográficamente cercanos.

Tabla 4.3 Parámetros de humificación de los suelos.

Suelos	Relación CAH/CAF	Grado de humificación (GH)	Tasa de humificación (TH)
SA	5 [a]	82 [a]	25 [a]
SC	8 [b]	98 [b]	23 [a]

Nota: Medias con superíndices distintos en una misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

Finalmente, cabe señalar que los suelos en estudio no han sido regados con aguas residuales tratadas o no tratadas, ni tampoco se han aplicado biosólidos como enmiendas orgánicas. En el análisis de los suelos no se detectaron ibuprofeno y diclofenac. Las propiedades físicas y químicas de los suelos (textura, pH, macroelementos, N, P, MO) están dentro de los rangos establecidos para el desarrollo de la actividad microbiana (Coyne, 2000) y por lo tanto existen condiciones ambientales favorables para la degradación de compuestos xenobióticos, como lo son los AINE en estudio.

4.2 Establecimiento del método analítico para la determinación de los CF

4.2.1 Selección de las condiciones de operación en el HPLC-UV

De la revisión bibliográfica realizada (Tablas B.1 y B.2) se seleccionó una columna del tipo octadecilsilano C_{18} Odshypersil (125 x 4) mm de 5 µm de tamaño de partícula, de forma que se trabajó en fase reversa. En cuanto a la longitud de onda, según el barrido realizado

en el espectrofotómetro con soluciones de los CF en metanol y acetonitrilo, el ibuprofeno presentó absorbancia máxima entre 220-225 nm y, el diclofenac presentó un λ_{max} entre 278-284 nm (Figura B.2a,b). Se realizó el análisis cromatográfico de los CF disueltos en estos solventes a estos λ_{max}, con una fase móvil 80% Acetonitrilo/20% agua, según las referencias bibliográficas consultadas, encontrándose que el pico cromatográfico de los solventes estaban muy cercanos a la señal del diclofenac (Figura 4.2), situación que también se presentó con el ibuprofeno. Debido a ello se ensayó cambiando el solvente por la fase móvil, observándose ausencia de interferencias debida a los disolventes (Figura 4.3).

Es importante destacar que al utilizar la mezcla acetonitrilo/agua como solvente se mantienen las mismas longitudes de absorbancia máximas (Figura B.2c). Se observó que a valores superiores a 230 nm disminuye la intensidad de la señal del ibuprofeno y sobre los 260 nm no se detecta ninguna señal. El diclofenac, sin embargo, presentó buena señal, con una línea base estable, a λ por encima de los 270 nm, mientras que a valores cercanos a 220 nm, a pesar de que se obtienen señales con valores más altos de absorbancia, la línea base presenta mucho ruido. Debido a esto, se seleccionó una λ de 225 nm para el ibuprofeno y 280 nm para el diclofenac. Los valores de λ de trabajo seleccionada coincide con la utilizadas en otros estudios (Karnjanapiboonwong et al, 2011; Avilés et al, 2008; Santos et al., 2005). Los resultados de este ensayo se presentan en la figura 4.3 y en la tabla B.3 un resumen de las condiciones cromatográficas de los espectros presentados en este trabajo.

Seguidamente se estudió el efecto del volumen de inyección en la cuantificación de los fármacos, para lo cual se ensayaron valores de 10 y 20 μL, y se encontró que un incremento del volumen, provocó un aumento en el área del pico sin cambios sustanciales en su anchura ni en el tiempo de retención (Figura B.3), por lo que se seleccionó un volumen de 20 μL, ya que permitió una mejor definición de los picos cromatográficos. Por otra parte, se fijó el flujo en 1 mL min^{-1}, debido a que a valores más bajos se produjo un incremento en el tiempo de retención (factor importante cuando se procesa un gran número de muestras) y se obtuvieron señales cromatográficas más anchas y con colas.

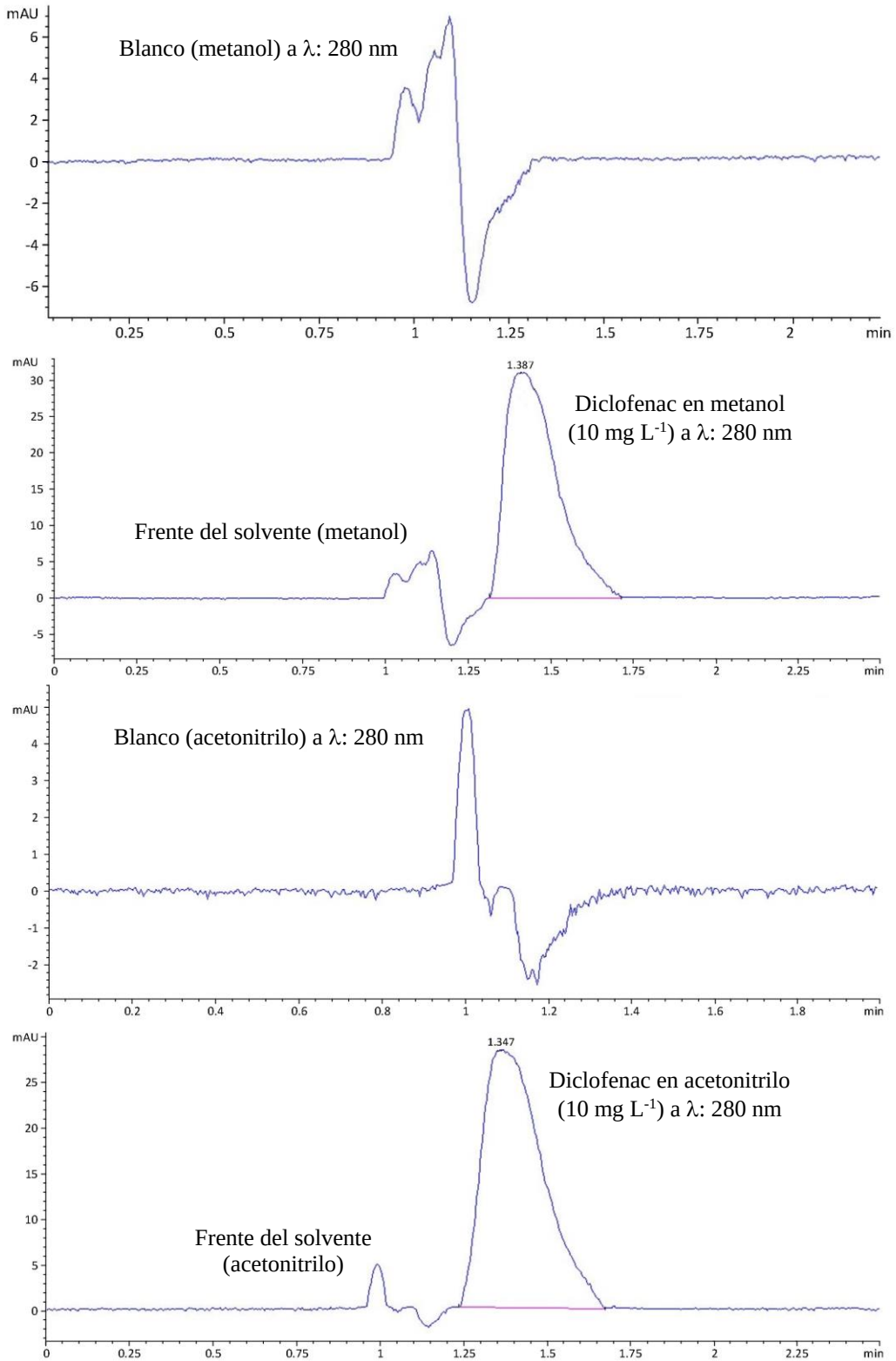


Figura 4.2 Cromatogramas de soluciones de diclofenac en diferentes solventes

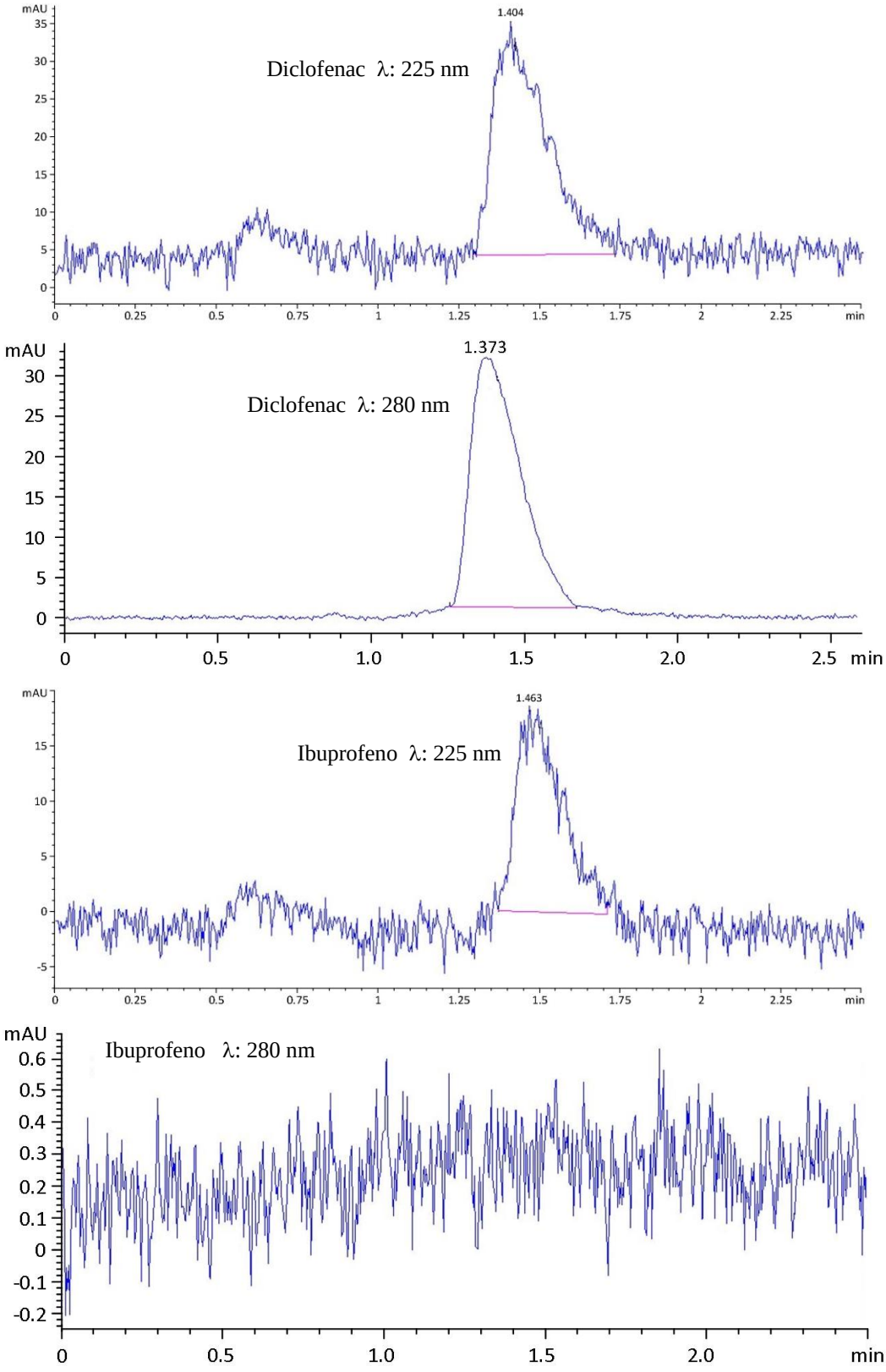


Figura 4.3 Cromatogramas de soluciones de los CF a diferentes longitudes de onda.

En cuanto a la fase móvil, en función a las revisiones realizadas (Tablas B.1 y B.2) se ensayaron diferentes combinaciones binarias de solventes (Acetonitrilo/H_2O, Metanol/H_2O y Acetonitrilo/Metanol) y una mezcla ternaria de acetonitrilo, metanol y agua. Por otra parte, al acidificar el agua de la fase móvil a valores de pH menores al pKa de los fármacos, se mejoró la forma del pico cromatográfico, ya que en estas condiciones de acidez se incrementa la proporción del compuesto no ionizado lo cual propicia una mayor interacción con la columna no polar. Por ello, se ajustó el pH del agua de la fase móvil a 3 con ácido acético. Luego de los diferentes ensayos con estas fases móviles se preseleccionaron mezclas de acetonitrilo y agua acidificada a diferentes proporciones para los ensayos en las muestras de suelo y muestras acuosas. Es importante señalar que al incrementar la proporción de acetonitrilo en la fase móvil se produjo un aumento en el área de absorción y una disminución en el tiempo de retención de los fármacos, lo cual indica una mayor afinidad de los fármacos con este solvente orgánico.

4.2.2 Establecimiento del método para el análisis de los CF en muestras de suelo

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la selección de las condiciones de operación en las distintas etapas involucradas en la cuantificación de la concentración de los fármacos en muestras de suelos (Figura 3.1) que permitió establecer el método para su determinación en los estudios de cinética de la degradación.

4.2.2.1 Definición de las condiciones en la EAU

Una de las variables más importantes a definir en la EAU es el solvente o combinación de ellos, que permita extraer el fármaco del suelo. Según las revisiones realizadas (Lin & Gan, 2011; Xu et al., 2008; U.S. EPA, 2007), los solventes más utilizados son acetona, metanol, acetato de etilo y acetonitrilo. En Venezuela la compra de acetona y acetato de etilo se encuentra regulada (RESQUIMC, 2015), por lo que se descartaron estos solventes, y se realizaron los ensayos con metanol y acetonitrilo. Es importante señalar que cuando se trata de analitos con características ácidas, se suele combinar el solvente de extracción con pequeñas cantidades de ácido orgánicos (fórmico o acético) o con soluciones buffer de fosfato a pH 2, lo cual suele aumentar la efectividad de las recuperaciones. En este sentido,

se ensayaron con dos solventes extractores: metanol al 1% de ácido fórmico (v/v) y acetonitrilo al 1% de ácido fórmico (v/v) (Tabla 4.4).

4.2.2.2 Selección de las condiciones en la EFS

En esta etapa se ensayó con los solventes disponibles (metanol y acetonitrilo), por lo que la elución se realizó con estos disolventes y las fases móviles preseleccionadas con las soluciones patrones. La Tabla 4.4 muestra los ensayos realizados para la selección de los solventes a utilizar en las etapas de EAU, EFS y HPLC.

Tabla 4.4 Solventes ensayados en las etapas de EAU, EFS y HPLC-UV

Ensayo	EAU (solvente extractor)	EFS (solvente de elución)	HPLC-UV (fase móvil)
1	Metanol (1% ácido fórmico, v/v)	Metanol	Acetonitrilo/agua al 0,1 % ácido acético (80/20 v/v)
2		Acetonitrilo/agua al 0,1 % ácido acético (80/20 v/v)	
3	Acetonitrilo (1% ácido fórmico, v/v)	Acetonitrilo	Acetonitrilo/agua al 0,2 % ácido acético (60/40 v/v)
4	Metanol (1% ácido fórmico, v/v)	Acetonitrilo	
5		Acetonitrilo/agua al 0,1 % ácido acético (80/20 v/v)	

4.2.2.3 Análisis cromatográfico del extracto del suelo

Bajo las condiciones establecidas en el ensayo 1 (Tabla 4.4: metanol como solvente en la EAU y en la EFS y fase móvil acetonitrilo/ agua al 80/20 v/v), la señal cromatográfica de la solución de diclofenac en metanol está muy cerca del frente del solvente (Figura 4.4a). Al realizar la EFS de esta solución patrón del diclofenac, se alcanzó un valor de recuperación de 98% y valores de tiempos de retención cercanos (1,44 y 1,47 min) (Figura 4.4b). En cuanto a las muestras de suelo, se extrajeron tres fracciones (tres picos cromatográficos), los cuales se pudieron diferenciar pero no separar con la fase móvil utilizada (Figura 4.4c). Tampoco fue posible separar el diclofenac de los otros componentes del suelo extraídos en la EFS (Figura 4.4d), lo que revela que esta fase móvil presenta una alta fuerza eluyente. Es importante resaltar que en este ensayo se obtuvieron las mismas tendencias en ambos CF, tanto en el suelo SA como el suelo SC.

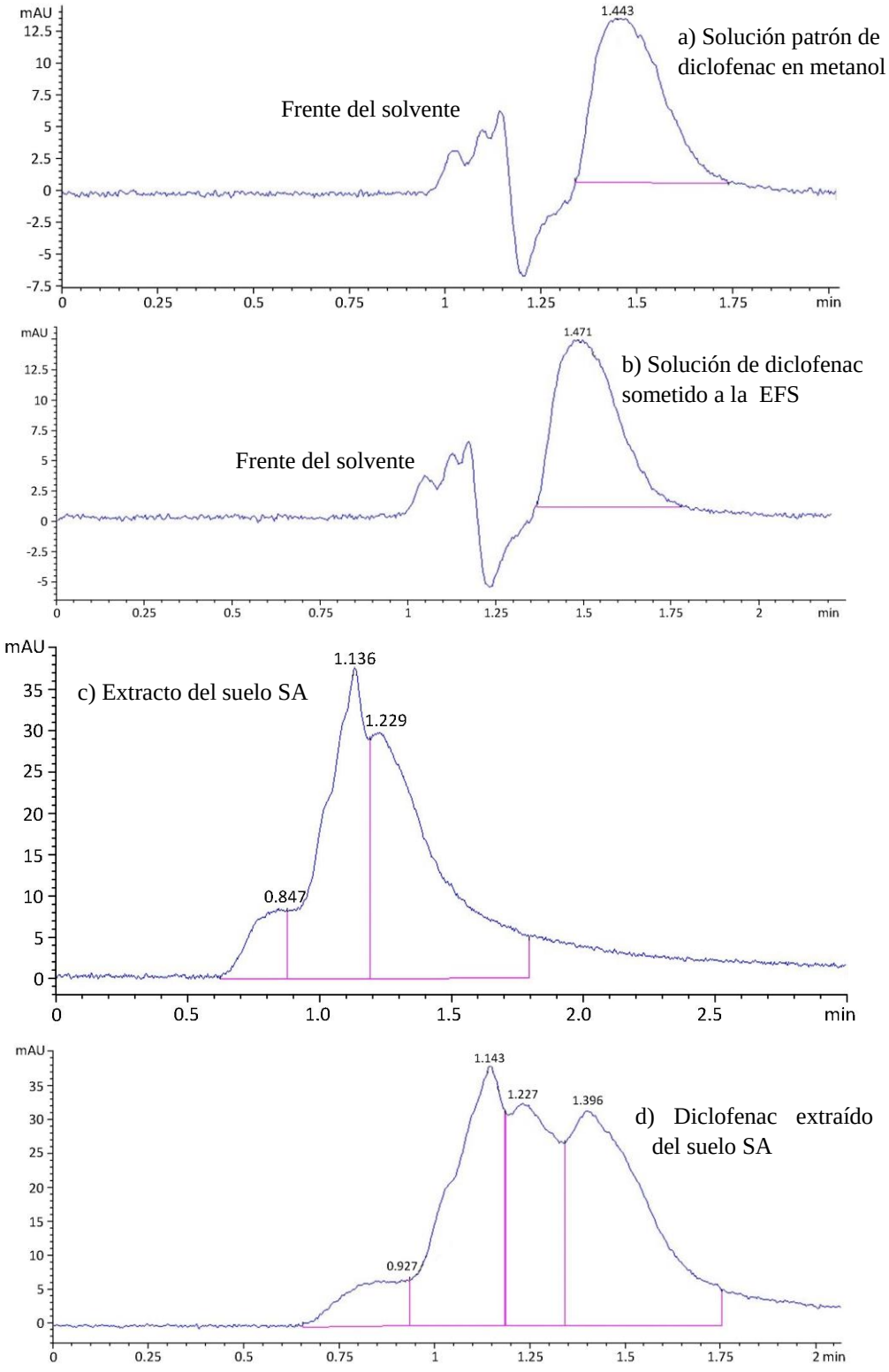


Figura 4.4 Cromatogramas del diclofenac en metanol (5 mg L^{-1}) y extraído del suelo SA (5 mg Kg^{-1}suelo) utilizando metanol como solvente de elución (Ensayo 1).

En el ensayo 1 se estudió también el efecto de la acidificación del agua en la carga de la muestra en la EFS (a pH 3 con HCl 1 M), obteniéndose picos cromatográficos de mayor intensidad tanto para los compuestos propios del suelo como para los fármacos (entre 21-26%), con respecto a las mismas muestras sin el ajuste del pH a 3. La acidificación de las muestras permite suprimir la ionización de los compuestos con características ácidas y por tanto, mejora la retención de los mismos en el adsorbente; por ello, es recomendable ajustar el pH de la muestra al menos dos unidades por debajo del pKa de los analitos ácidos, según especificaciones de los fabricantes de los cartuchos de extracción (Waters Corporation, 2014).

En función a los resultados obtenidos en el ensayo 1, se decidió cambiar el solvente de elución en la EFS por la fase móvil, la cual posee una menor fuerza eluyente (Harris, 2010) y además se elimina la interferencia del frente del solvente (Tabla 4.4: Ensayo 2). La EFS de soluciones de los CF con esta fase de elución acidificada (Ensayo 2), mostró que las señales cromatográficas aumentaron ligeramente en absorbancia (~10-20%) (Figuras 4.5a,b) con respecto al ensayo 1 (Figuras 4.4a,b), con porcentaje de recuperación en la EFS similares (96-110%). El pH de 3,5 de esta fase de elución permite mantener una mayor proporción de los fármacos en forma molecular y de esta forma ser arrastrados por el solvente orgánico acetonitrilo. La utilización de los mismos solventes tanto en la EFS como en el análisis cromatográfico tiene la ventaja de que se reduce el número de interferencias ya que sólo se detectaron dos señales debidas a la matriz del suelo y por otra parte, se reduce la intensidad de su absorción (Figura 4.5c). Sin embargo, con esta fase móvil tampoco se logró la separación de la señal del fármaco de los otros componentes extraídos de la matriz del suelo (Figura 4.5d).

Debido a la no resolución de las muestras, se decidió variar la proporción de los componentes de la fase móvil por una mezcla más polar, aumentando la proporción de agua de 20 a 40 % (fase móvil acetonitrilo/agua al 0,1 % ácido acético, 60/40 v/v) (ensayos 3, 4 y 5), con la finalidad de que los fármacos presenten un mayor tiempo de retención en la fase estacionaria y lograr así la separación de la mezcla (Harris, 2010).

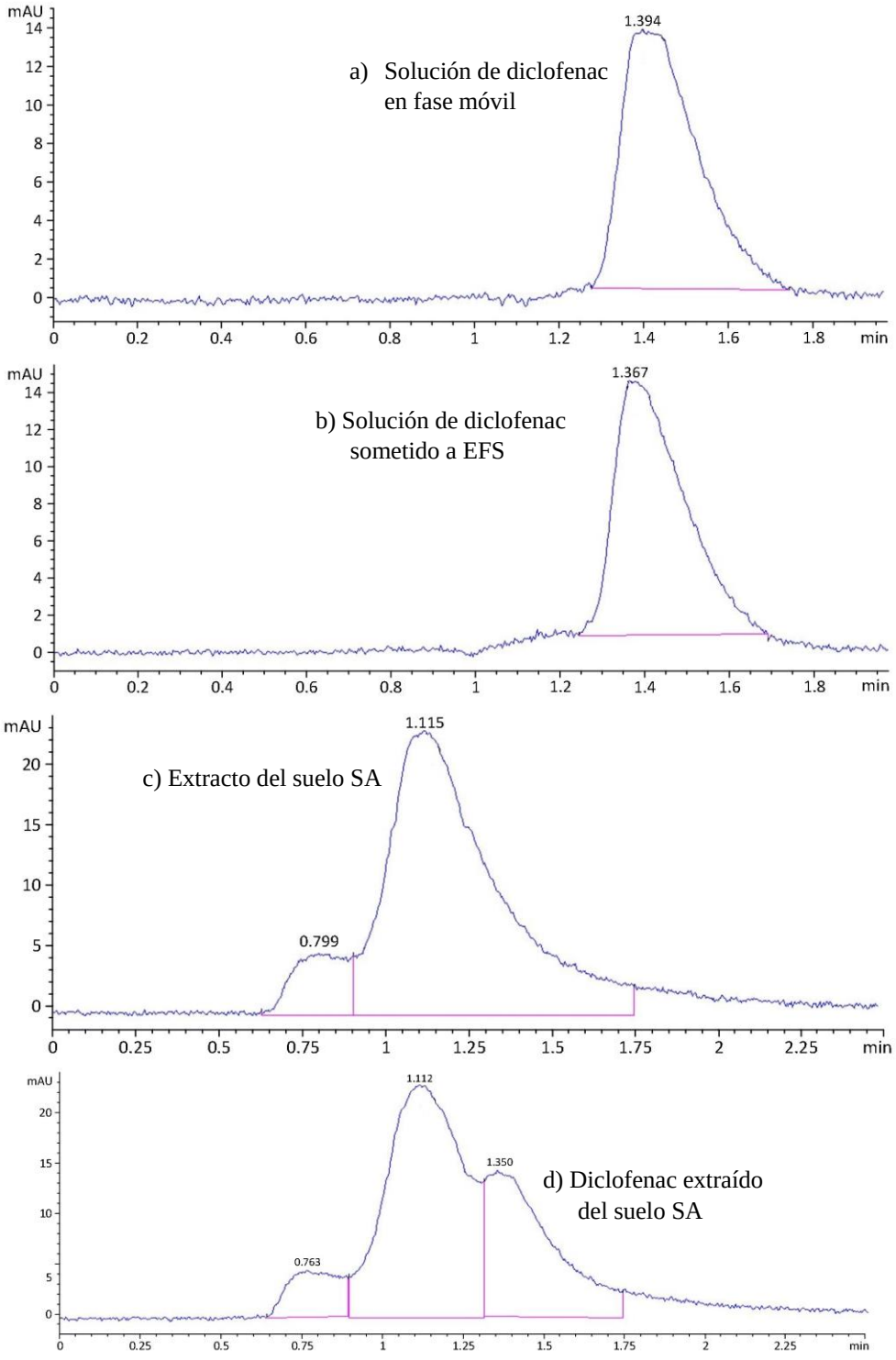


Figura 4.5 Cromatogramas de diclofenac en fase móvil (5 mg L^{-1}) y extraído del suelo SA (5 mg Kg^{-1}suelo) en fase elución igual a la fase móvil (Ensayo 2).

Con esta fase móvil más polar, se logró la separación de las fracciones orgánicas del suelo del CF, con factores de resolución mayores al 1,5, lo cual sugiere una separación aceptable entre dos picos cercanos, según lo establecido por Dong (2006). Sin embargo, se obtuvieron porcentaje de recuperación menores del 50%, con acetonitrilo como solvente de elución (Ensayo 4). Los valores obtenidos fueron aún más bajos utilizando acetonitrilo como solvente en la EAU (Ensayo 3), el cual se ensayó según referencia de la U.S. EPA, 2007 (Tabla 4.4). Es importante señalar, que la metodología de la U.S. EPA (2007), emplea una solución amortiguadora a base de fosfatos (pH 2), para el ajuste del pH de los analitos ácidos, la cual no se utilizó debido a que el fosfato monobásico de potasio es poco soluble pudiendo precipitar y obstruir la columna cromatográfica. Por ello, se mantuvo el reactivo de acidificación (ácido fórmico).

Los mejores porcentaje de recuperación (> 85%) se obtuvieron empleando metanol como solvente en la EAU, fase de elución de 80 % acetonitrilo y 20 % agua desionizada (0,1% en ácido acético) y fase móvil 60 % acetonitrilo y 40 % agua desionizada (0,2% en ácido acético), con una buena resolución entre la señal del CF y de los compuestos extraídos del suelo (Ensayo 5). El metanol es un solvente polar prótico que favorece un mayor número de interacciones con los CF en la EAU. Por otra parte, según el comportamiento observado de las fracciones orgánicas extraídas de los suelos, éstas presentan tiempos de retención menores que los CF, lo cual indica que son compuestos más polares, que fueron separados en el análisis cromatográfico al aumentar la proporción de agua en la fase móvil. La figura 4.6 muestra los cromatogramas bajo estas condiciones y en la tabla 4.5 se presentan los resultados del ensayo seleccionado (Ensayo 5).

Es importante destacar, que las fracciones solubles en metanol extraídas del suelo SC en la EAU y en la EFS presentan valores de absorbancia más alta con respecto al suelo SA, lo cual se ve reflejado en el espectro UV (Figura B.4) y en los cromatogramas. Esto es debido al mayor contenido de materia orgánica en el suelo SC. Por otra parte, se aprecia que los extractos de los dos suelos presentaron una mayor absorbancia a una longitud de onda de 225 nm con respecto a 280 nm.

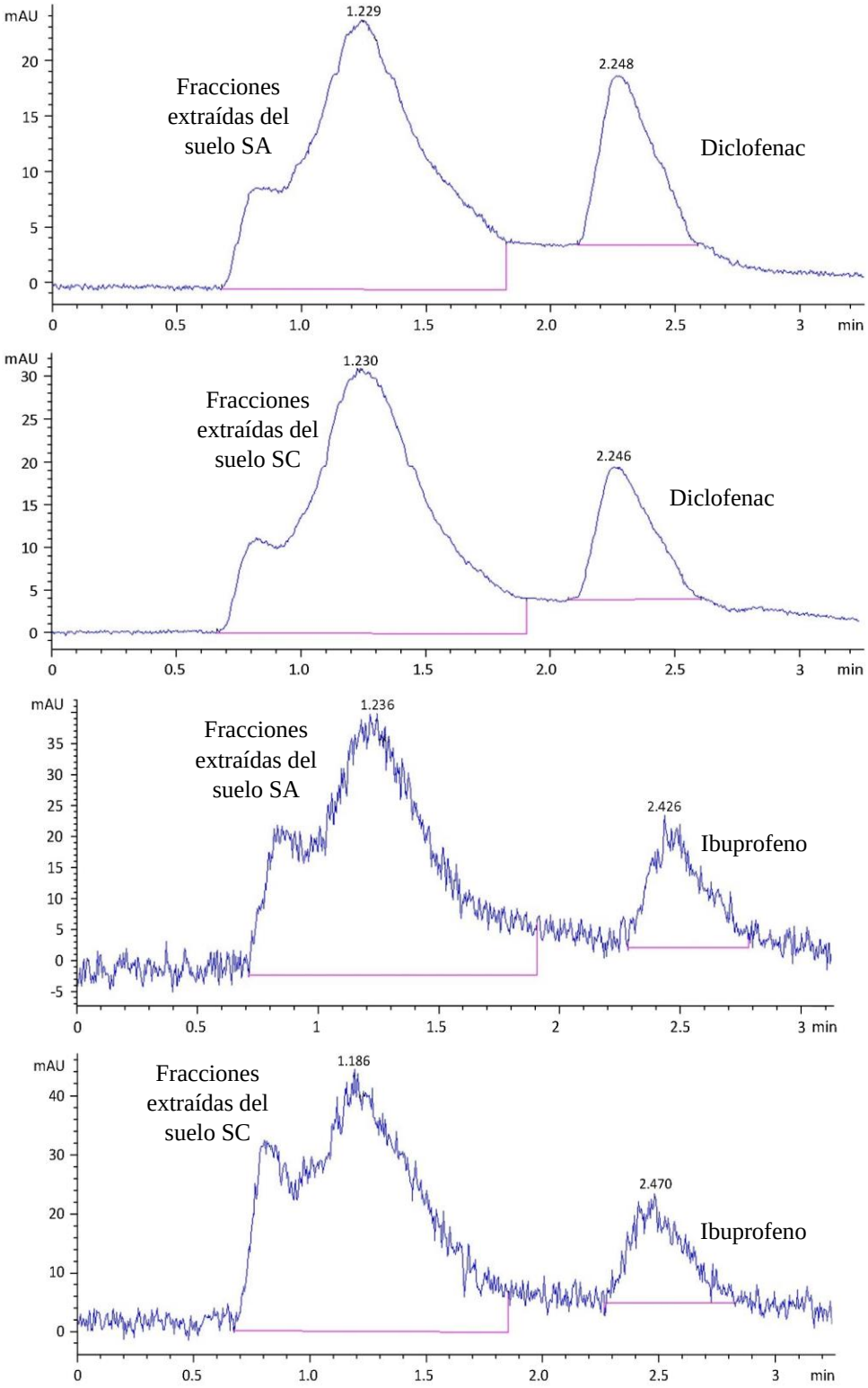


Figura 4.6 Cromatogramas del diclofenac y el ibuprofeno extraídos de los suelos SA y SC (10 mg Kg^{-1}suelo) (Ensayo 5).

Tabla 4.5 Resultados del análisis cromatográfico del ensayo 5.

Muestras	Factor de resolución (R_S)	Recuperación* (%)
DSA	2,46	92
DSC	2,42	88
ISA	2,86	95
ISC	2,98	93

Nota: DSA: Diclofenac en suelo SA, DSC: Diclofenac en suelo SC, ISA: Ibuprofeno en suelo SA, ISC: Ibuprofeno en suelo SC.EAU con metanol 1% ácido fórmico (v/v) y EFS con acetonitrilo (80%) y agua desionizada (20%) (0,2% en ácido acético). Todos los ensayos a 10 mg Kg^{-1} de los CF en suelo a las siguientes condiciones de operación: Flujo: 1 mL min^{-1}; volumen de inyección: 20 µL; λ = 280 nm (diclofenac); 225 nm (ibuprofeno); fase móvil: 60 % acetonitrilo y 40 % agua desionizada (0,2% en ácido acético).

En cuanto a las características de los compuestos orgánicos extraídos del suelo en la EAU, según el espectro IR (Figura B.5 y Tabla B.4) se aprecian vibraciones debidas al estiramiento del enlace OH de grupos alcohol alifático (metanol utilizado como solvente extractor), fenol o ácido carboxílico. La presencia de una banda alrededor de los 1650 cm^{-1} sugiere la tensión C=C de aromáticos, así como el estiramiento del enlace C=O en carboxilatos, ácidos arilcetónicos, quinonas y ácidos carboxílicos. Este último grupo funcional presenta también vibraciones de deformación del enlace O-H alrededor de 930 cm^{-1}, que observó en ambas muestra de suelo, y que también pueden ser debidas a deformaciones fuera del plano del enlace C-H de aromáticos. Aunque se aprecia una señal muy débil a ~ 800 cm^{-1}, posiblemente debida a deformaciones fuera del plano de enlace C-H de compuestos aromáticos sustituidos, no se observan vibraciones de tensión debidas al enlace C-H aromático, las cuales suelen presentase sobre los 3000 cm^{-1}, posiblemente debido a la baja concentración de la solución del extracto analizado.

Si se comparan los espectros IR de las fracciones orgánicas extraídas de los suelos con otros estudios realizados de caracterización de sustancias húmicas de sedimentos acuáticos y lodos, se aprecian las mismas bandas características en las regiones donde ocurren vibraciones de grupos funcionales tipo alcoholes, fenoles y ácidos carboxílicos (Samios et al., 2007; Amir et al., 2003). Estos investigadores concluyeron que los espectros IR de las

sustancias húmicas y fúlvicas evaluadas no presentaron diferencias importantes en la posición de las principales bandas de absorción, sino en la relación de intensidad entre los principales picos. En este sentido, el Suelo SC presentó una mayor intensidad en la bandas ubicadas en ~ 3400 cm^{-1} y 1650 cm^{-1} y menores absorciones en las bandas en ~ 2800 cm^{-1} y 2900 cm^{-1}, con respecto al suelo SA, lo cual sugiere una mayor proporción de compuestos con grupos funciones tipo fenólicos y quinonas, así como de la presencia compuestos más insaturados (provenientes de enlaces C=C o aromáticos), lo cual posiblemente se deba a la mayor proporción de ácidos húmicos presentes en el suelo bajo cítricos (SC) (Figura 4.1).

Se debe resaltar, que según el procedimiento establecido, estas fracciones solubles en metanol fueron posteriormente sometidas a un proceso de purificación mediante EFS, utilizando una fase 80% acetonitrilo/20% agua, por lo que es probable que se eluyan las fracciones más polares formadas por compuestos de bajo peso molecular. La polaridad de las fracciones del suelo eluídas en la EFS se verificó en el análisis cromatográfico, ya que las mismas presentaron una mayor afinidad por la fase móvil (polar) que por la fase estacionaria (apolar), presentando tiempos de retención más bajos en comparación con el ibuprofeno y el diclofenac.

Una vez lograda la separación de los fármacos de los otros componentes de la matriz del suelo, se procedió a variar el factor de concentración (FC) en la EFS. El ensayo 5, presenta un FC en la EFS de 33,333 (100 mL solución a 3 mL de solvente de elución); sin embargo no se logró ningún factor de concentración de los fármacos en el suelo (relación entre la concentración del fármaco obtenida en la EFS y la concentración del fármaco en el suelo). Posteriores eluciones con 3 mL adicionales del solvente permitió corroborar que no se aprecian señales cromatográficas propias de los fármacos, lo cual también se verificó por los altos porcentajes de recuperación obtenidos (Tabla 4.5). Debido a ello, se ensayó la EFS empleando 1mL de solvente de elución, lográndose en este caso un FC en la EFS de 100 y un FC en el suelo de 3, con lo cual se alcanzó una concentración mínima detectable de 1,7 mg Kg^{-1}. Seguidamente, se ensayó con una cantidad mayor de suelo (10 g) manteniendo el mismo FC en la EFS (100), y se consiguió un FC en el suelo de 10, por lo que se logró

detectar una cantidad mínima de 0,5 mg Kg^{-1}. Los resultados de este ensayo se reportan en la tabla 4.6 y la separación cromatográfica se muestra en la figura 4.7.

Tabla 4.6 Resultados del análisis cromatográfico del ensayo 5 empleando 1 mL de solvente de elución en la EFS y 10 g de suelo.

Muestras	**Factor de resolución (R_S)**	**Recuperación* (%)**
DSA	2,55	80
DSC	2,40	89
ISA	2,69	110
ISC	2,68	104

Nota: DSA: Diclofenac en suelo SA, DSC: Diclofenac en suelo SC, ISA: Ibuprofeno en suelo SA, ISC: Ibuprofeno en suelo SC. Ensayo 5: EAU con metanol 1% ácido fórmico (v/v) y EFS con acetonitrilo (80%) y agua desionizada (20%) (0,2% en ácido acético). Concentración: 5 mg CF Kg^{-1}suelo.

El manual de uso del fabricante de los cartuchos (Waters Corporation, 2014) establece que si se obtienen porcentajes de recuperación mayores al 90% no es necesario realizar más ajuste, siempre que se trabaje con muestras biológicas o muestras de agua pura. Sin embargo, en el caso de una matriz tan compleja como el suelo, los porcentaje de recuperación obtenidos en las referencias suelen ser más bajos y en algunos casos se aprecian señales cromatográficas de mayor intensidad que los patrones debido al efecto de la matriz (Xu et al., 2009c; Lin & Gan, 2011; Xu et al., 2008). Finalmente, en la tabla 4.7 se muestran las condiciones seleccionadas en las etapas de extracción, purificación y cuantificación de los fármacos en muestras de suelo.

Es importante destacar que si se ensaya con una concentración inicial de 1 mg Kg^{-1} de suelo en los estudios de cinética de degradación, se podrían detectar los fármacos en los primeros días del estudios, pero no se garantiza su detección a lo largo del tiempo de incubación establecido (45 d). Por otra parte, a concentraciones por debajo de 0,5 mg Kg^{-1} se presentan muchas interferencias debido al ruido del equipo, sobre todo a bajas longitudes de onda (225 nm). Debido a ello, se decidió trabajar en el rango de concentración de 0,5 – 5 mg Kg^{-1} para la construcción de las curvas de calibración y realizar los estudios de cinética de degradación con una concentración inicial de 5 mg Kg^{-1}.

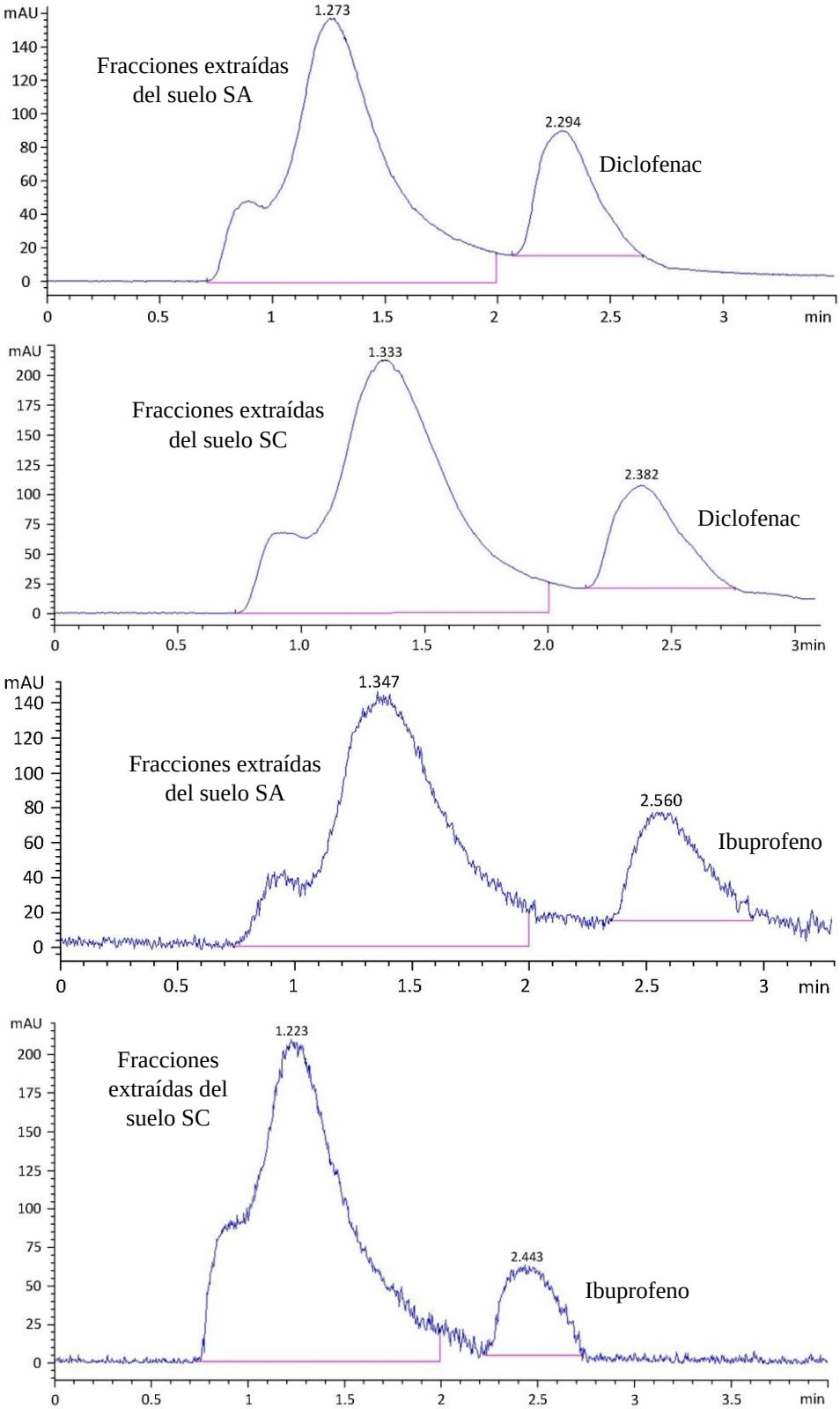


Figura 4.7 Cromatogramas de los CF extraídos de los suelos SA y SC (5 mg Kg^{-1}suelo), empleando 1 mL de solvente de elución.

Tabla 4.7 Condiciones del método propuesto para la extracción, purificación y cuantificación de los CF en muestras de suelo (ensayos de degradación).

Etapa	Parámetros	Condiciones / Valores
	Cantidad de suelo (g)	10
EAU	Solvente	99 % Metanol / 1 % ácido fórmico (v/v)
	Número de ciclos de extracción (adim)	3
	Volumen de solvente en cada ciclo (mL)	10 (ciclo 1)*, 5 (ciclo 2 y 3)
	Tiempo de mezclado (min)	5
	Velocidad de mezclado (vueltas x min)	400
	Tiempo de ultrasonido (min)	15
	Tiempo de centrifugación (min)	10
	Velocidad de centrifugación (rpm)	4000
	Filtración	Por gravedad con filtro de vidrio poroso
	Evaporación	Con vacío a 35 ^{o}C hasta 1 mL. Se mantienen el extracto congelado hasta la siguiente etapa
EFS	Acondicionamiento	3 mL acetonitrilo + 3 mL de agua desionizada a pH 3 (0,1 % HCl 1 M) (por gravedad)
	Carga	Se diluye el extracto concentrado del suelo a 100 mL con agua desionizada a pH 3 (0,1 % HCl 1 M) y se agita por 15 min. Luego se hace pasar la solución por succión (con vacío) a través del cartucho a un flujo de 5 mL min^{-1}
	Lavado	3 mL de agua desionizada por succión
	Secado	Con vacío por 15 min
	Elución	1 mL de fase elución: 80 % acetonitrilo / 20 % agua desionizada (0,2% en ácido acético) (v/v) (con succión manual). Se mantienen el extracto de elución congelado hasta la siguiente etapa.
HPLC	Columna	C_{18} ODS Hypersil 5 µm (125 x 4)mm
	Flujo de bomba (mL min^{-1})	1
	Volumen de inyección (µL)	20
	Longitud de onda (nm)	225 (ibuprofeno) y 280 (diclofenac)
	Fase móvil	60 % acetonitrilo / 40 % agua desionizada (0,1% en ácido acético) (v/v)

Nota: * Se utilizó una cantidad mayor de solvente extractor en el primer ciclo a fin de favorecer la humectación del suelo ya que se está utilizando con una cantidad mayor de suelo que los ensayos previos que se realizaron con 3 g de suelo.

4.2.3 Establecimiento del método para el análisis de los CF en muestras acuosas

El rango de concentración que se seleccionó para la construcción de las isotermas de adsorción dependió de los porcentajes de adsorción de cada fármaco en los suelos. En este sentido, en los estudios preliminares de adsorción, el diclofenac alcanzó % adsorción más altos (~70%), mientras que los suelos mostraron una baja afinidad hacia el ibuprofeno (~30%). Por otra parte, se realizó una recopilación bibliográfica sobre el rango de concentraciones de diferentes fármacos en los estudios de adsorción, y las fuentes consultadas realizaron los ensayos en el rango entre 0,1 – 10 mg L^{-1} (Chefetz et al., 2008; Xu et al. 2009c; Kodesova et al., 2015; Zhang et al, 2014), 1,5 – 15 mg L^{-1} (Srinivasan et al., 2014); 2,5 – 50 mg L^{-1} (Vithanage et al., 2014) y entre 0,5 – 70 mg L^{-1} (Doretto et al., 2014). Los autores establecen que tales rangos de concentraciones fueron escogidos para cubrir la forma no lineal de las isotermas de adsorción de los fármacos en estudio, además que coinciden con los rangos empleados en otros trabajos, lo cual permite la comparación de resultados.

En función a los porcentajes de adsorción en los suelos de los AINE en estudio y a la revisiones realizadas se escogió un rango de concentraciones en solución acuosa para la elaboración de las isotermas de adsorción de 1-6 mg L^{-1} y 2-12 mg L^{-1}, para el ibuprofeno y diclofenac, respectivamente (objetivo 5). En este sentido, las curvas de calibración se construyeron con seis concentraciones entre 0,5 – 5 mg L^{-1}, ya que después del tiempo de contacto con el suelo, la concentración del CF remanente en la solución se prevé que estará en ese rango en función a los porcentaje de adsorción en el suelo presentado por cada fármaco. Es importante señalar, que la finalidad del método es cuantificar la cantidad de fármaco remanente en la solución acuosa (no adsorbido) después del contacto con el suelo.

Para definir el método que permitiera cuantificar esta concentración, se partió de las condiciones establecidas en la EFS y HPLC para muestras de suelo (Tabla 4.7). Como se aprecia en la tabla 4.8, bajo el rango de concentraciones de estudio en los ensayos de adsorción y empleando el mismo volumen de carga de la solución en la EFS, se obtienen concentraciones iniciales 3 veces mayores en los ensayos de adsorción con respecto a los de degradación. Debido a ello, se siguió el mismo procedimiento de EFS pero empleando 3

mL de fase elución, en lugar de 1 mL, y manteniendo las mismas fases elución y móvil y demás condiciones cromatográficas. Los resultados de la separación cromatográfica y porcentajes de recuperación de este ensayo se presentan en la tabla 4.9 y los cromatogramas en la figura 4.8.

Tabla 4.8 Comparación de concentraciones del CF en la EFS empleada en los ensayos de degradación y adsorción.

Ensayos de degradación			**Ensayos de adsorción**		
***C* en suelo (mg Kg^{-1})**	**Masa * (mg)**	***Ci* en la EFS^ (mg L^{-1})**	***C* en solución (mg L^{-1})**	**Masa ** (mg)**	***Ci* en la EFS^ (mg L^{-1})**
0,5	0,005	0,05	0,5	0,015	0,15
1,0	0,010	0,10	1,0	0,030	0,30
2,0	0,020	0,20	2,0	0,060	0,60
3,0	0,030	0,30	3,0	0,090	0,90
4,0	0,040	0,40	4,0	0,120	1,20
5,0	0,050	0,50	5,0	0,150	1,50

Nota: *C*: concentración, *Ci*: concentración inicial. *Masa del compuesto en 10 g de suelo (en base seca). ** Masa del compuesto en 30 mL de solución y 15 g de suelo (en base seca) y volumen de solución: 30 mL. ^ Volumen inicial en la EFS: 100 mL.

Tabla 4.9 Resultados del análisis cromatográfico en la EFS en los ensayos de adsorción.

Muestras	**Factor de resolución (R_S)**	**Recuperación* (%)**
DSA	2,43	93
DSC	2,27	90
ISA	3,33	104
ISC	2,60	103

Nota: Empleando 3 mL de solvente de elución y concentración de los fármacos de 5 mg L^{-1}

Las fracciones orgánicas presentes en la matriz acuosa bajo las condiciones de los ensayos de adsorción, presentaron valores de absorbancia menores en comparación con las fracciones extraídas directamente del suelo. Los ensayos de adsorción se llevaron a cabo en solución acuosa sin adición de solventes orgánicos y además se emplearon mayores volúmenes de elución. Por otra parte, estas fracciones del suelo solubles en agua presentaron tiempos de retención menores.

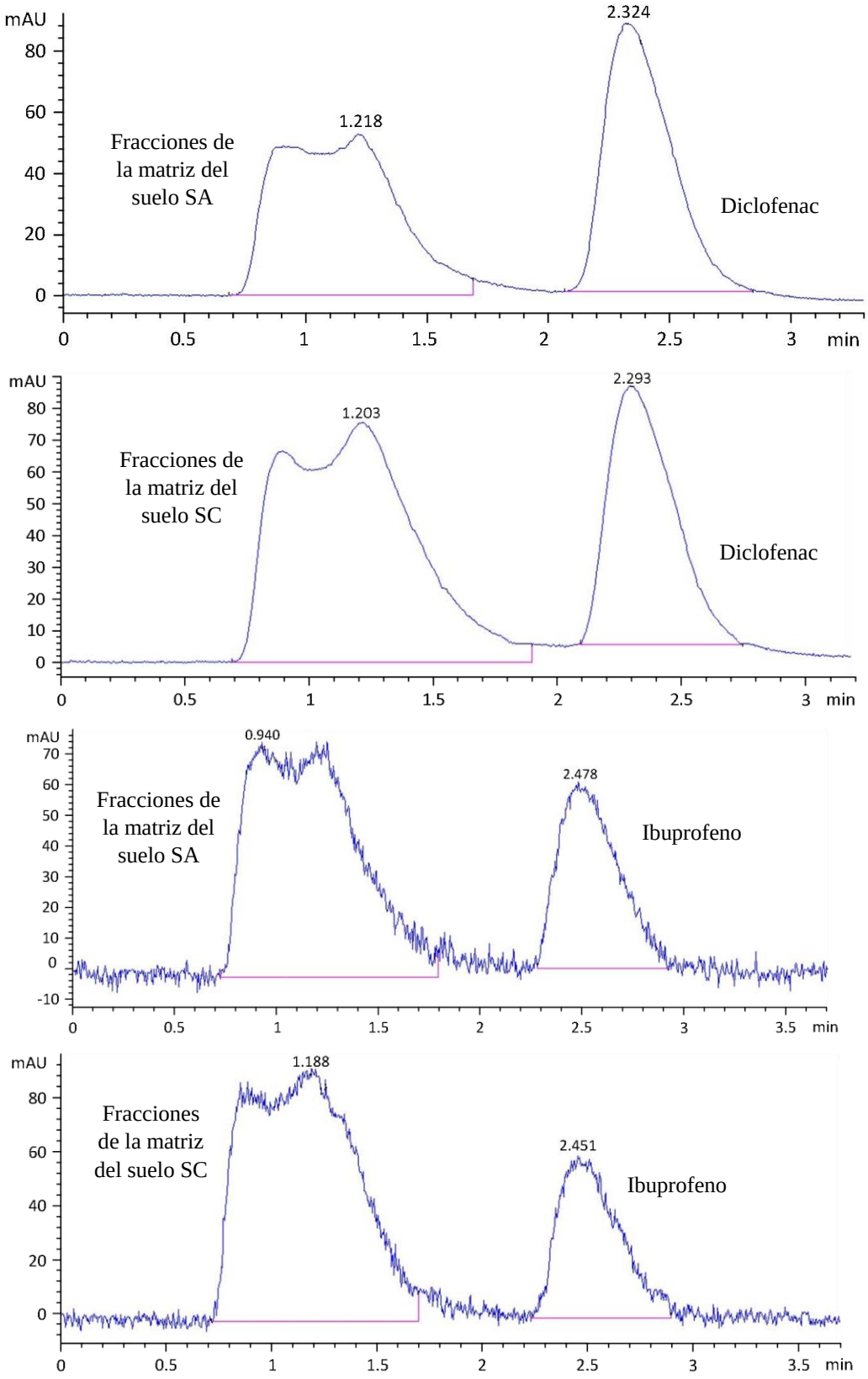


Figura 4.8 Cromatogramas a una concentración de 5 mg L^{-1} en los ensayos de adsorción.

Al igual que las fracciones orgánicas extraídas mediante el método propuesto para muestras de suelo, las fracciones del suelo SC solubles en agua y posteriormente extraídas en la EFS presentan una absorbancia más alta con respecto al suelo SA, y tales fracciones (tanto del suelo SA como del suelo SC) presentan una mayor absorbancia a menores longitudes de onda, lo cual probablemente ocasionó un mayor efecto de la matriz del suelo en la cuantificación del ibuprofeno, obteniéndose porcentajes de recuperaciones mayores al 100 %, debido a que este compuesto se detectó una λmax más baja que el diclofenac.

Como la solución acuosa en contacto con el suelo se estableció en 30 mL (objetivo 5) y se realiza la elución en la EFS con 3 mL de solvente, se alcanzó un factor de concentración de 10. A fin de verificar posibles pérdidas del analito por adsorción en los tubos se colocaron soluciones del fármaco sin suelo, encontrándose valores por debajo del 1%. Por otra parte, como blancos se colocaron en agitación muestras de suelo con la solución sin fármaco, para comprobar posibles compuestos en la matriz del suelo que pudieran interferir en el análisis y para la determinación de los límites de detección del método.

Finalmente, la tabla 4.10 muestra las condiciones seleccionadas en las etapas purificación y caracterización de los CF en las muestras acuosas.

4.2.4 Establecimiento de los parámetros de desempeño de los métodos

En la presente sección se describen los parámetros de desempeño de las metodologías propuestas para el análisis de muestras de suelos y muestras acuosas que permitieron la cuantificación de los CF en los estudios de cinética de degradación y adsorción, respectivamente.

4.2.4.1 Parámetros de calidad del método establecido para muestras de suelo

Se realizó a través de la determinación de la linealidad, exactitud, precisión, selectividad y límites de detección y cuantificación.

Tabla 4.10 Condiciones del método propuesto para la purificación y caracterización de los CF en muestras acuosas (ensayos de adsorción).

Etapa	Parámetros	Condiciones / Valores
Agitación*	Cantidad de suelo (g)	15 (se pesa en tubos de centrífuga)
	Volumen de agua (mL)	30
	Velocidad de mezclado (vueltas x min)	480
	Tiempo de mezclado (h)	8
Centrifugación	Tiempo (min)	10
	Velocidad (rpm)	6000
Filtración		Por gravedad con filtro de vidrio poroso
EFS	Acondicionamiento	3 mL acetonitrilo + 3 mL de agua desionizada a pH 3 (0,1 % HCl 1 M) (por gravedad)
	Carga	Se diluye el extracto concentrado del suelo a 100 mL con agua desionizada a pH 3 (0,1 % HCl 1 M) y se agita por 15 min. Luego se hace pasar la solución por succión (con vacío) a través del cartucho a un flujo de 5 mL min^{-1}
	Lavado	3 mL de agua desionizada por succión
	Secado	Con vacío por 15 min
	Elución	3 mL de fase elución: 80 % acetonitrilo / 20 % agua desionizada (0,2% en ácido acético) (v/v) (con succión manual). Se mantienen el extracto de elución congelado hasta la siguiente etapa.
HPLC	Columna	C_{18} ODS Hypersil 5 µm (125 x 4)mm
	Flujo de bomba (mL min^{-1})	1
	Volumen de inyección (µL)	20
	Longitud de onda (nm)	225 (ibuprofeno) y 280 (diclofenac)
	Fase móvil	60 % acetonitrilo / 40 % agua desionizada (0,1% en ácido acético) (v/v)

Nota: *Las condiciones de agitación de la mezcla suelo/solución se definieron en el objetivo 5 en las pruebas preliminares de las isotermas de adsorción.

a) ***Linealidad:*** En primer lugar, se construyeron las curvas de calibración a partir de soluciones de los CF en la fase de elución seleccionada (solución patrón). Posteriormente, a partir de las condiciones del método establecidas en la tabla 4.7, se procedió a la construcción de las curvas de calibración para el diclofenac e ibuprofeno en la matriz de los dos suelos. Los ensayos se realizaron en el rango de concentración de 0,5 - 5 mg Kg^{-1}, equivalentes a 5 - 50 mg L^{-1} según el factor de concentración alcanzado por el método. Las curvas de calibración del diclofenac y el ibuprofeno en las diferentes matrices, se presentan en las figuras 4.9 y 4.10, respectivamente. Los valores de R y R^2 muestran una buena correlación entre las concentraciones de los CF en la matriz del suelo y las áreas, indicando que el modelo de regresión es significativo ($p < 0,05$. Anexo D).

La separación entre la curva de calibración de soluciones de los CF en la fase elución (patrón) y, la obtenida de las soluciones de los CF extraída de los suelos, indica el efecto de la matriz, la cual se hace mayor a medida que la concentración del fármaco aumenta. En el caso del diclofenac, la matriz de los suelos ejerció un efecto positivo sobre la concentración, ya que para una misma área se obtiene una concentración más alta en los suelos en comparación con el patrón. Por su parte, se observó un efecto negativo de la matriz de los suelos en la concentración del ibuprofeno, lo cual puede explicarse en función a la más alta absorción en el UV de las sustancias orgánicas del suelo y al mayor ruido de la línea base a la longitud de trabajo de este fármaco (225 nm).

Cabe destacar, que el efecto de la matriz fue mayor en el SA (15% DSA y -14% ISA) con respecto al SC (6% DCS y -6% ISC), lo cual parece contradictorio debido a la mayor absorción en el UV de las sustancias orgánicas extraídas del suelo SC mediante los procesos de EAU y EFS, a las dos longitudes de trabajo. Sin embargo, al ser mayor la intensidad de la señal de las fracciones del suelo SC, se minimiza el ruido de la línea base y ello favorece una señal del fármaco de más fácil integración.

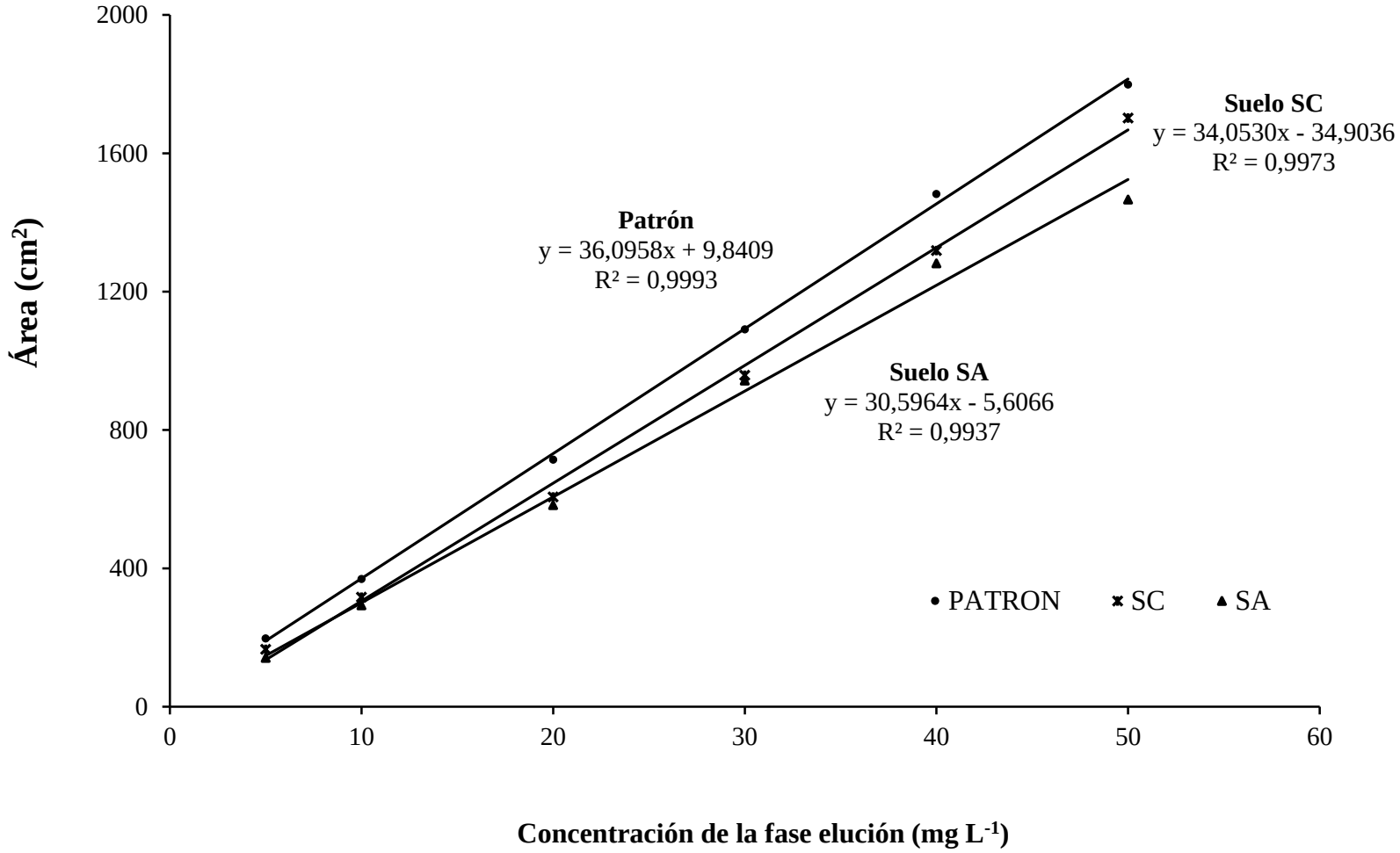


Figura 4.9 Curvas de calibración del diclofenac en solución patrón, suelo SA y suelo SC (Método de muestras de suelo).

Nota: Las soluciones patrones se prepararon a la concentración correspondiente del CF en la fase elución para cada nivel ensayado.

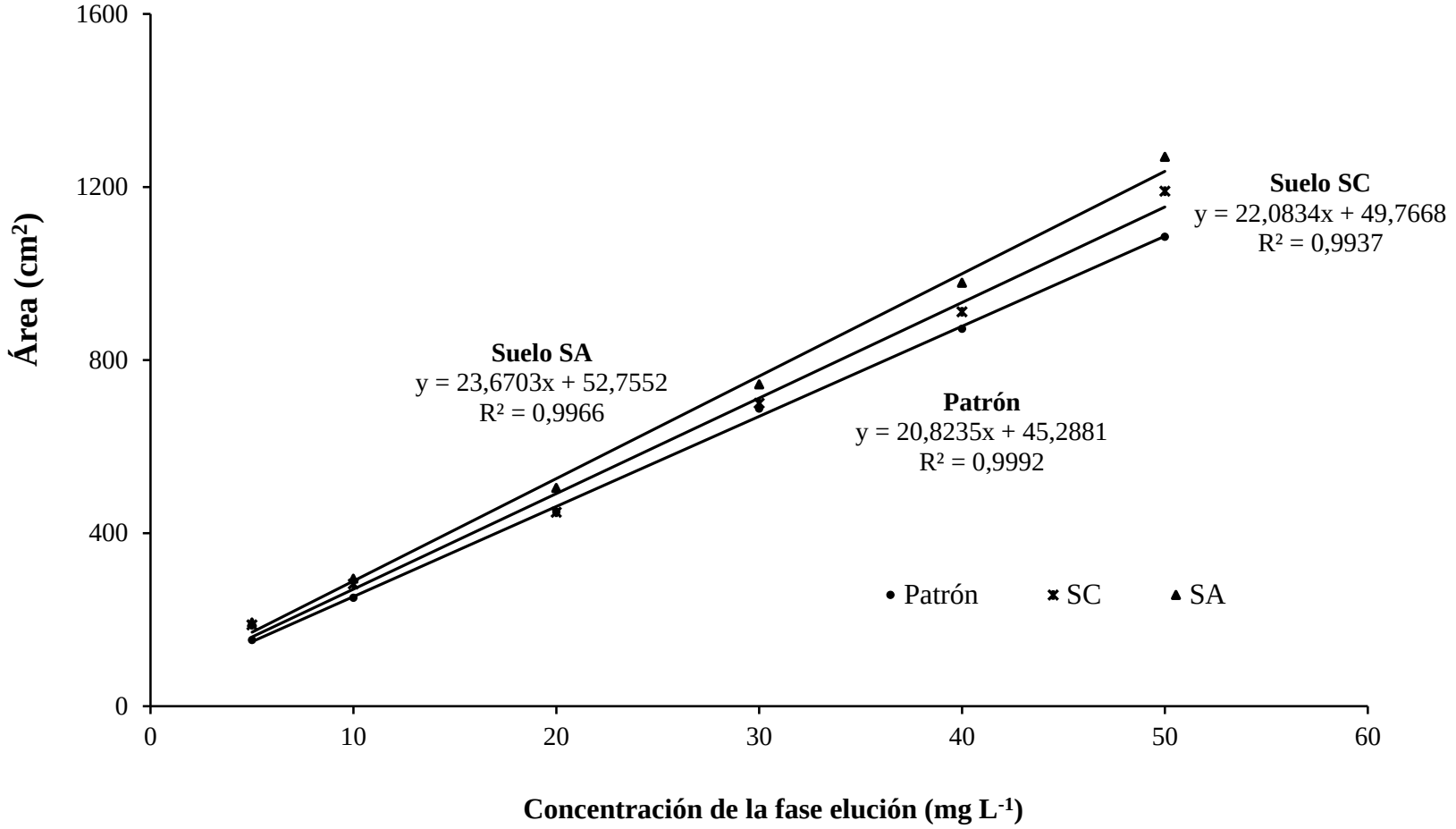


Figura 4.10 Curvas de calibración del ibuprofeno en solución patrón, suelo SA y suelo SC (Método de muestras de suelo).

Nota: Las soluciones patrones se prepararon a la concentración correspondiente del CF en la fase elución para cada nivel ensayado.

b) *Selectividad:* Debido a las características químicas similares entre los compuestos orgánicos extraídos del suelo y los fármacos en estudio (grupos carboxílicos, alcoholes, cadenas carbonadas y aromáticas) no se encontró un solvente de elución que pudiera eliminar en su totalidad estas interferencias, sin pérdidas importantes de los analitos de interés. No obstante, se logró minimizar la cantidad de sustancias extraídas en la EFS y su posterior separación cromatográfica con factores de resolución superiores a 2,3 (Tabla 4.11) con un efecto de la matriz de los suelos menores al 16%.

Tabla 4.11 Resultados de tiempo de retención y factor de resolución de las curvas de calibración en muestras de suelo.

Muestras	**T_R fármaco (min)**	**T_R fracciones del suelo (min)**	**R_S (min cm^{-1})**
DSA	2,32 (0,02)	1,27 (0,01)	2,46 (0,04)
DSC	2,39 (0,02)	1,34 (0,01)	2,38 (0,03)
ISA	2,55 (0,03)	1,38 (0,02)	2,8 (0,2)
ISC	2,45 (0,04)	1,24 (0,01)	2,9 (0,1)

Nota: Valores promedio con a la desviación estándar (entre paréntesis). Los tiempos de retención (T_R) de las soluciones patrones fueron 2,35 (0,01) min y 2,52 (0,06) min para el diclofenac e ibuprofeno, respectivamente. R_S: factor de resolución.

Por otra parte, la desviación estándar relativa (DER) obtenida como resultado de la estimación del T_R promedio del fármaco en el solvente de elución y en la matriz del suelo fue menor de 2 % (diclofenac) y 5 % (ibuprofeno) (Tabla 4.11), lo cual revela la baja interferencia de los compuestos de la matriz y por tanto la selectividad del método propuesto.

c) *Exactitud y precisión:* La tabla 4.12 presenta los resultados de recuperación en la EFS empleando soluciones patrones a los tres niveles de concentración de los compuestos. Como se aprecia la fase elución seleccionada permite extraer los fármacos adsorbidos en el cartucho con porcentajes de recuperación promedios mayores al 92 %.

Tabla 4.12 Evaluación de la exactitud y la precisión en la EFS de soluciones patrones con factor de concentración de 100.

Fármaco	Concentración añadida (mg L^{-1})	Concentración encontrada* (mg L^{-1})	Recuperación** (%)
Diclofenac	0,050	0,048	96
		0,046	92
	Valor medio	**0,047**	**94 (2)**
	0,200	0,194	97
		0,203	102
	Valor medio	**0,199**	**99 (2)**
	0,500	0,440	88
		0,432	86
	Valor medio	**0,436**	**87 (1)**
		% recuperación promedio	**93 (2)**
Ibuprofeno	0,050	0,056	112
		0,047	94
	Valor medio	**0,052**	**103 (9)**
	0,200	0,195	98
		0,214	107
	Valor medio	**0,205**	**102 (5)**
	0,500	0,582	116
		0,550	110
	Valor medio	**0,566**	**113 (3)**
		% recuperación promedio	**106 (6)**

Notas: * Desviación estándar de la concentración obtenida de la curva de calibración 0,006 mg L^{-1}.
** El valor entre paréntesis corresponde a la desviación estándar relativa.

En el caso de las muestras de suelo (Tabla 4.13), se obtuvieron porcentajes de recuperación promedios superiores al 87%, manteniéndose la misma tendencia que en los ensayos con soluciones patrones (Tabla 4.12), alcanzando el ibuprofeno valores más altos en comparación con el diclofenac. Estos resultados están en concordancia con otros estudios donde reportan % de recuperación promedios de 89% (diclofenac) y 103 % (ibuprofeno) (Xu et al, 2009c), mientras que Lin y Gan (2011), obtuvieron 88 % (diclofenac) y 106 % (ibuprofeno), pese a que ambos trabajos emplearon otros solventes en la EAU y EFS y distinta técnica de cuantificación de los fármacos. Esto revela que la recuperación está influenciada por las características físicas y químicas del fármaco y su comportamiento frente a los diferentes solventes ensayados.

Tabla 4.13 Evaluación de la exactitud y la precisión del método propuesto para la determinación del diclofenac y el ibuprofeno en muestras de suelo.

Muestra	Concentración añadida (mg Kg^{-1})	Concentración encontrada* (mg Kg^{-1})	Recuperación** (%)
DSA	0,50	0,43	86
		0,47	94
	Valor medio	**0,45**	**90 (4)**
	2,00	1,76	88
		1,87	94
	Valor medio	**1,82**	**91 (3)**
	5,00	4,37	87
		4,22	84
	Valor medio	**4,295**	**86 (2)**
		% recuperación promedio	**89 (3)**
DSC	0,50	0,44	88
		0,46	92
	Valor medio	**0,45**	**90 (2)**
	2,00	1,74	87
		1,80	90
	Valor medio	**1,77**	**89 (2)**
	5,00	4,27	85
		4,41	88
	Valor medio	**4,34**	**87 (2)**
		% recuperación promedio	**88 (2)**
ISA	0,50	0,43	86
		0,51	102
	Valor medio	**0,47**	**94 (9)**
	2,00	1,79	90
		1,89	95
	Valor medio	**1,84**	**92 (3)**
	5,00	4,63	93
		4,9	98
	Valor medio	**4,77**	**95 (3)**
		% recuperación promedio	**94 (5)**
ISC	0,50	0,45	90
		0,51	102
	Valor medio	**0,48**	**96 (6)**
	2,00	1,92	96
		1,80	90
	Valor medio	**1,86**	**93 (3)**
	5,00	4,57	91
		4,95	99
	Valor medio	**4,76**	**95 (5)**
		% recuperación promedio	**95 (4))**

Notas: * Desviación estándar de la concentración obtenida de la curva de calibración 0,01 mg L^{-1}

** El valor entre paréntesis corresponde a la desviación estándar relativa.

La desviación estándar relativa en los ensayos de recuperación fueron menores del 10%, lo cual es bajo si se toma en consideración que se está trabajando con una matriz compleja como el suelo y lo laborioso del método propuesto. Los valores más altos de desviación estándar relativa se obtuvieron en el ibuprofeno, debido posiblemente al mayor ruido en la línea base a la longitud de absorción de este fármaco (225 nm) que trae consigo mayores errores al momento de integrar la señal. Esta limitación es más instrumental que del proceso de extracción y purificación propuesto.

El análisis de varianza comprobó que no existen diferencias significativas entre las concentraciones añadidas y las obtenidas por las curvas de calibración tanto para las soluciones patrones como para los suelos SA y SC (Anexo D), por lo tanto, el método propuesto para determinar la concentración de los fármacos en ambos suelos es apropiado en términos de exactitud.

Por otra parte, se obtuvo una alta precisión instrumental con desviación estándar relativa entre 1-3 %, tal como se presenta en las tablas 4.14 y 4.15, donde se muestran un cuadro resumen de los parámetros de desempeño del método para la cuantificación del diclofenac y el ibuprofeno en los suelos, respectivamente. Finalmente, se obtuvieron límites de detección y cuantificación más bajos para el diclofenac, principalmente debido al menor ruido de la línea base obtenida a la longitud de trabajo de este fármaco (280 nm).

4.2.4.2 Parámetros de calidad del método establecido para muestras acuosas

Se realizó igualmente determinando la linealidad, exactitud, precisión, selectividad y límites de detección y cuantificación del método propuesto.

a) ***Linealidad:*** A partir de las condiciones del método establecidas en la tabla 4.10, se procedió a la construcción de las curvas de calibración para el diclofenac e ibuprofeno en la solución acuosa luego de la agitación de los suelos. Para ello se realizaron los ensayos para cada fármaco en concentraciones de 0,5 - 5 mg L^{-1}, equivalentes a 5 - 50 mg L^{-1} según el factor de concentración alcanzado por el método.

Tabla 4.14 Parámetros de desempeño del método propuesto para la determinación de diclofenac en muestras de suelo (usando el factor de concentración).

Parámetros	**Suelo SA**	**Suelo SC**
Ecuación* (n = 18)	y = 30,5964x – 0,5607	y = 34,0530x – 3,4904
Coeficiente de regresión lineal (R)	0,9968	0,9986
Coeficiente de determinación del test ANOVA (R^2, %)	99,31	99,70
DER (%)	1,57	1,33
Rango de determinación (mg Kg^{-1})	0,5 – 5,0	0,5 – 5,0
Límite de detección (mg Kg^{-1})	0,01	0,03
Límite de cuantificación (mg Kg^{-1})	0,05	0,1

Notas: *y = variable dependiente (área); x = variable independiente (concentración de diclofenac, mg Kg^{-1} suelo). DER = desviación estándar relativa (n = 11; P = 0,05). Tiempo de retención: 2,32 min (SA); 2,39 min (SC).

Tabla 4.15 Parámetros de desempeño del método propuesto para la determinación de ibuprofeno en muestras de suelo (usando el factor de concentración).

Parámetros	**Suelo SA**	**Suelo SC**
Ecuación* (n = 18)	y = 23,6703 + 5,2755	y = 22,0834x + 4,9767
Coeficiente de regresión lineal (R)	0,9967	0,9960
Coeficiente de determinación del test ANOVA (R^2, %)	99,30	99,16
DER (%)	2,87	2,93
Rango de determinación (mg Kg^{-1})	0,5 – 5,0	0,5 – 5,0
Límite de detección (mg Kg^{-1})	0,1	0,1
Límite de cuantificación (mg Kg^{-1})	0,4	0,2

Notas: *y = variable dependiente (área); x = variable independiente (concentración de ibuprofeno, mg Kg^{-1}). DER = desviación estándar relativa (n = 11; P = 0,05). Tiempo de retención: 2,55 min (SA); 2,45 min (SC).

En las figuras 4.11 y 4.12 se presentan las curvas de calibración del ibuprofeno y diclofenac en las soluciones patrones y en la matriz extraída de la solución acuosa en contacto con el suelo luego de la EFS. Los valores de coeficiente de correlación lineal (R) y coeficiente de determinación (R^2) demuestran que el área del pico cromatográfico es directamente proporcional a la concentración, y por tanto el modelo de la regresión es significativo ($p < 0,05$. Anexo D).

El paralelismo entre las curvas de calibración de los patrones en la fase de elución y en la matriz de las muestras acuosas (Figuras 4.11 y 4.12) indica que la señal medida está menos influenciada por las interferencias de la matriz en comparación con las muestras de suelo (Figuras 4.9 y 4.10), debido a que el eluato de las muestras acuosas se encuentra más diluido. El efecto de la matriz fue menor para el diclofenac (4 % SA y 3 % SC) con respecto al ibuprofeno (SA: -9% y SC: -8%) y se mantienen el mismo tipo de efecto, positivo para el diclofenac y negativo en el caso del ibuprofeno, ya que para una misma área se obtienen concentraciones mayores o menores en los suelos en comparación con el patrón, respectivamente. Las señales cromatográficas del diclofenac presentan una línea base estable (λ_{max}: 280 nm) que permiten su integración con menos errores, en comparación con la longitud de trabajo del ibuprofeno (λ_{max}: 225 nm).

b) *Selectividad:* El método propuesto logró minimizar la cantidad de sustancias extraídas en la EFS y su posterior separación cromatográfica con factores de resolución superiores a 2,3 (Tabla 4.16) y con un efecto de la matriz del suelo menor al 10%. Por otra parte, la desviación estándar relativa (DER) obtenida como resultado de la estimación del T_R promedio del fármaco en el solvente de elución y en la matriz del suelo fue menor de 3 % (diclofenac) y 4 % (ibuprofeno), lo cual revela la baja interferencia de los compuestos de la matriz y por tanto la selectividad en el análisis cromatográfico.

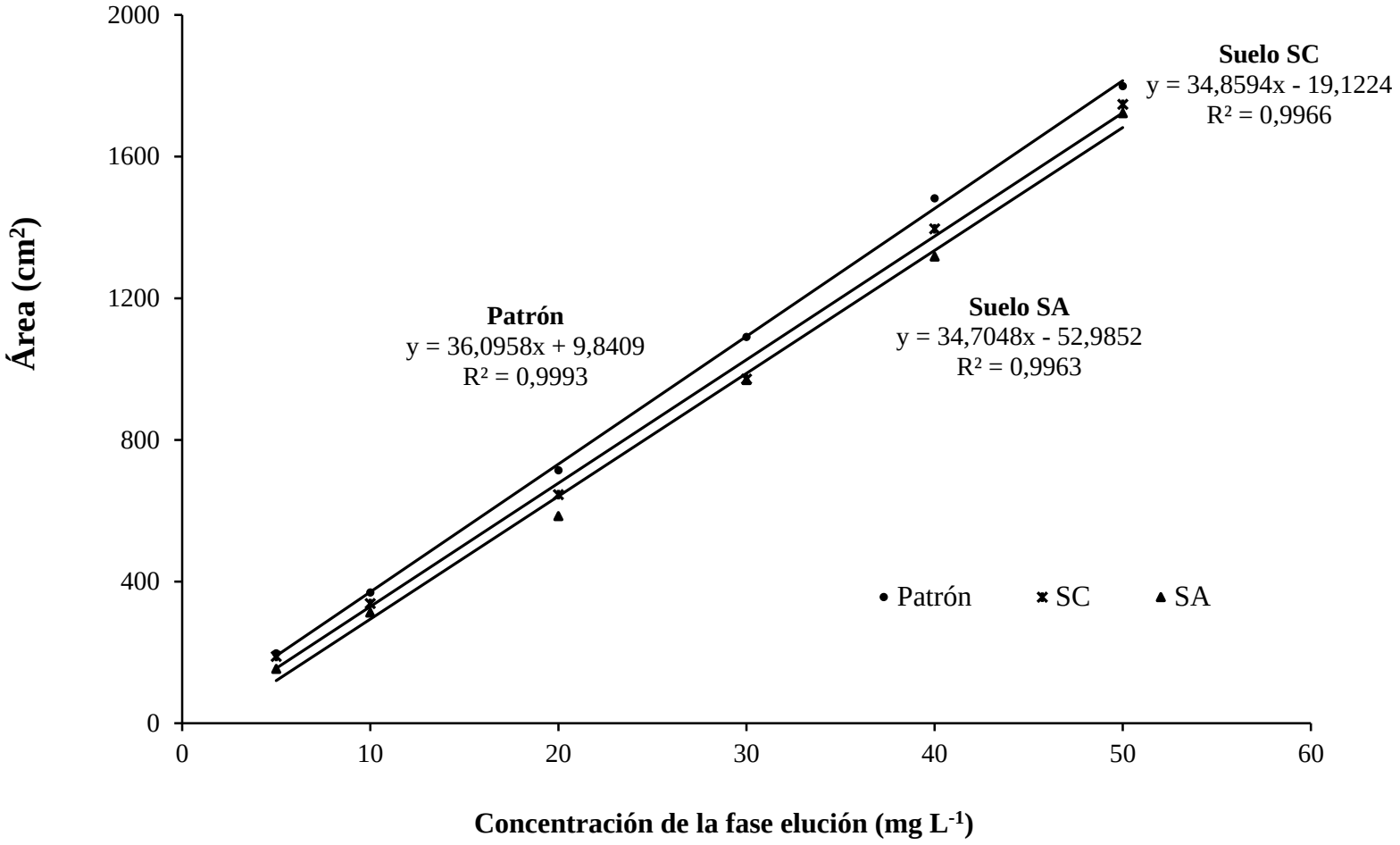


Figura 4.11 Curvas de calibración del diclofenac en solución patrón, suelo SA y suelo SC (Método de muestras de acuosas).

Nota: Las soluciones patrones se prepararon a la concentración correspondiente del CF en la fase elución para cada nivel ensayado.

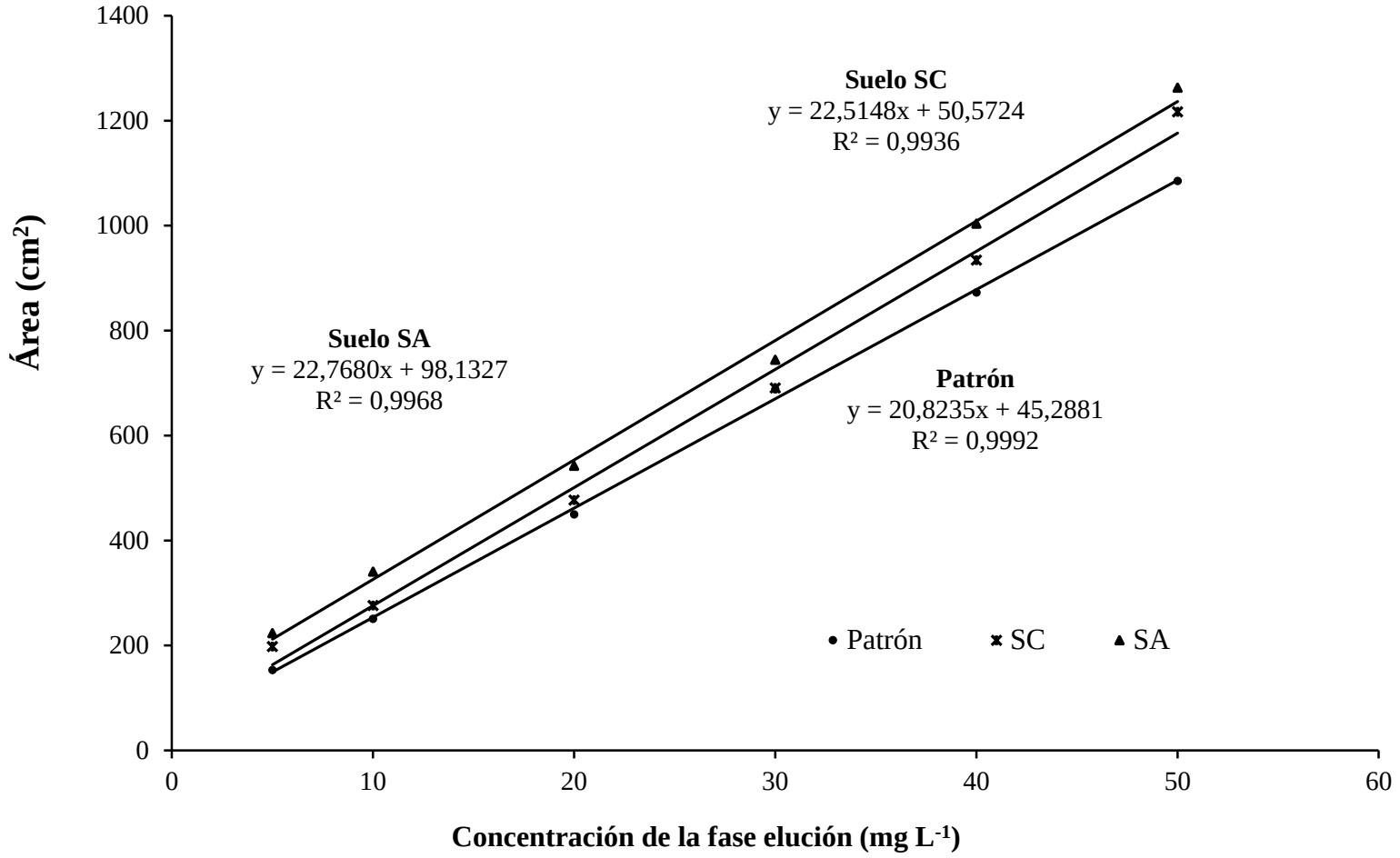


Figura 4.12 Curvas de calibración del ibuprofeno en solución patrón, suelo SA y suelo SC (Método de muestras acuosas).

Nota: Las soluciones patrones se prepararon a la concentración correspondiente del CF en la fase elución para cada nivel ensayado.

Tabla 4.16 Resultados de tiempo de retención y factor de resolución de las curvas de calibración en muestras acuosas.

Muestras	T_R fármaco (min)	T_R fracciones del suelo (min)	R_S (min cm^{-1})
DSA	2,31 (0,02)	1,21 (0,01)	2,40 (0,05)
DSC	2,29 (0,02)	1,21 (0,01)	2,32 (0,05)
ISA	2,50 (0,04)	1,0 (0,1)	3,3 (0,3)
ISC	2,47 (0,02)	1,1 (0,1)	3,0 (0,4)

Nota: Valores promedio con a la desviación estándar (entre paréntesis). Los tiempos de retención (T_R) de las soluciones patrones fueron 2,35 (0,01) min y 2,52 (0,06) min para el diclofenac e ibuprofeno, respectivamente.

c) *Exactitud y precisión:* En el caso de las soluciones patrones, la fase elución seleccionada permitió extraer los fármacos adsorbidos en el cartucho con porcentajes de recuperación promedios de 96% (diclofenac) y 101 % (ibuprofeno) (Tabla 4.17), y para las muestras acuosas en contacto con suelo (Tabla 4.18), se obtuvieron porcentajes de recuperación promedios menores (92 y 94%, para el diclofenac e ibuprofeno, respectivamente), debido al efecto de la matriz.

El ibuprofeno presentó valores más altos de recuperación en comparación con el diclofenac, por lo que se mantuvo la misma tendencia que en el caso de las soluciones patrones y en los ensayos de degradación (Tablas 4.12 y 4.13). La desviación estándar relativa en los ensayos de recuperación estuvo por debajo del 10%. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre las medias de las concentraciones añadidas y las obtenidas empleando las curvas de calibración (Anexo D); por lo tanto, el método propuesto se puede emplear para determinar la concentración de los fármacos remanente en la solución después del contacto con el suelo en los ensayos de adsorción.

Las tablas 4.19 y 4.20 muestran un resumen de los parámetros de desempeño del método propuesto para determinar la concentración de los fármacos remanente en la solución acuosa luego de los ensayos de adsorción, tomando en cuenta el factor de concentración. Como se aprecia, se obtuvieron desviaciones estándar relativas debidas al instrumento por

debajo de 4% y al igual que el método de muestras de suelos se alcanzaron límites de detección y cuantificación menores para el diclofenac.

Tabla 4.17 Evaluación de la exactitud y de la precisión en la EFS empleando soluciones patrones con factor de concentración de 33,333.

Fármaco	**Concentración añadida (mg L^{-1})**	**Concentración encontrada* (mg L^{-1})**	**Recuperación (%)****
Diclofenac	0,150	0,135	90
		0,139	93
	Valor medio	**0,137**	**91 (2)**
	0,600	0,520	87
		0,564	94
	Valor medio	**0,542**	**90 (4)**
	1,500	1,603	107
		1,585	106
	Valor medio	**1,594**	**106 (1)**
		% recuperación promedio	**96 (2)**
Ibuprofeno	0,150	0,148	99
		0,163	109
	Valor medio	**0,156**	**104 (5)**
	0,600	0,585	98
		0,564	94
	Valor medio	**0,575**	**96 (2)**
	1,500	1,485	99
		1,585	106
	Valor medio	**1,535**	**102 (3)**
		% recuperación promedio	**101 (3)**

Notas: * Desviación estándar de la concentración obtenida de la curva de calibración 0,005 mg L^{-1}
** El valor entre paréntesis corresponde a la desviación estándar relativa.

Tabla 4.18 Evaluación de la exactitud y de la precisión del método propuesto para la determinación de diclofenac e ibuprofeno en muestras acuosas en agitación con el suelo.

Muestra	Concentración añadida (mg L^{-1})	Concentración encontrada* (mg L^{-1})	Recuperación** (%)
DSA	0,50	0,55	110
		0,47	94
	Valor medio	**0,51**	**102 (8)**
	2,00	1,53	77
		1,65	83
	Valor medio	**1,59**	**80 (4)**
	5,00	4,55	91
		4,73	95
	Valor medio	**4,64**	**93 (2)**
		% recuperación promedio	**91 (5)**
DSC	0,50	0,47	94
		0,50	100
	Valor medio	**0,49**	**97 (3)**
	2,00	1,75	88
		1,86	93
	Valor medio	**1,81**	**90 (3)**
	5,00	4,66	93
		4,49	90
	Valor medio	**4,58**	**92 (2)**
		% recuperación promedio	**93 (3)**
ISA	0,50	0,48	96
		0,55	110
	Valor medio	**0,52**	**103 (7)**
	2,00	1,72	86
		1,88	94
	Valor medio	**1,80**	**90 (4)**
	5,00	4,52	90
		4,92	98
	Valor medio	**4,72**	**94 (4)**
		% recuperación promedio	**96 (5)**
ISC	0,50	0,47	94
		0,42	84
	Valor medio	**0,45**	**89 (6)**
	2,00	1,80	90
		1,91	96
	Valor medio	**1,86**	**93 (3)**
	5,00	4,68	94
		4,54	91
	Valor medio	**4,61**	**92 (2)**
		% recuperación promedio	**91 (4)**

Notas: * Desviación estándar de la concentración obtenida de la curva de calibración 0,05 mg L^{-1}

** El valor entre paréntesis corresponde a la desviación estándar relativa.

Tabla 4.19 Parámetros de desempeño del método propuesto para la determinación de diclofenac en muestras acuosas (usando el factor de concentración).

Parámetros	**Suelo SA**	**Suelo SC**
Ecuación* (n = 18)	y = 34,7048x -5,2985	y = 34,8594x -1,9122
Coeficiente de regresión lineal (R)	0,9980	0,9981
Coeficiente de determinación del test ANOVA (R^2, %)	99,58	99,61
DER (%)	2,16	2,71
Rango de determinación (mg L^{-1})	0,5 – 5,0	0,5 – 5,0
Límite de detección (mg L^{-1})	0,01	0,03
Límite de cuantificación (mg L^{-1})	0,04	0,05

Notas: *y = variable dependiente (señal medida, área); x = variable independiente (concentración de diclofenac, mg L^{-1}). DER = desviación estándar relativa (n = 11; P = 0,05). Tiempo de retención: 2,31min (SA); 2,29 min (SC).

Tabla 4.20 Parámetros de desempeño del método propuesto para la determinación de ibuprofeno en muestras acuosas (usando el factor de concentración).

Parámetros	**Suelo SA**	**Suelo SC**
Ecuación* (n = 18)	y = 22,7680x + 9,8133	y = 22,5148x + 5,057
Coeficiente de regresión lineal (R)	0,9975	0,9961
Coeficiente de determinación del test ANOVA (R^2, %)	99,48	99,18
DER (%)	3,54	3,21
Rango de determinación (mg L^{-1})	0,5 – 5,0	0,5 – 5,0
Límite de detección (mg L^{-1})	0,05	0,04
Límite de cuantificación (mg L^{-1})	0,2	0,1

Notas: *y = variable dependiente (área); x = variable independiente (concentración de ibuprofeno, mg L^{-1}). DER = desviación estándar relativa (n = 11; P = 0,05). Tiempo de retención: 2,50 min (SA) y 2,47 (SC).

4.3 Valoración del efecto de los CF en la actividad microbiana del suelo

4.3.1 Respiración microbiana de los suelos

La figura 4.13 muestra una comparación de la respiración del suelo SA con los distintos tratamientos aplicados a este suelo, en cada día de incubación. Los resultados obtenidos, demuestran que existen diferencias significativas ($P < 0,05$) en la respiración del SA en el tiempo (Anexo D), para todos los tratamientos, con valores máximos entre los días 7 y 15 de incubación, y posteriormente comienzan a disminuir la R_M, posiblemente debido a que los nutrientes y los compuestos de fácil degradación comienzan a agotarse, tal como ha sido reportado en investigaciones con otros sustratos (Guerrero-Ortiz et al., 2012; García y Rivero, 2008). Para el día 1, sólo los tratamientos con ibuprofeno presentaron un incremento significativo ($P < 0,05$) en la respiración, en comparación con el suelo control, por lo cual se infiere que los microorganismos pudieran estar degradando este fármaco, incluso a la dosis más alta ensayada. En el caso de los tratamientos con diclofenac, aun cuando se obtuvieron valores similares al control en el día 1, tampoco se observó una disminución de la respiración, lo cual pudiera sugerir una mayor resistencia a la degradación del diclofenac con respecto al ibuprofeno, coincidiendo con datos reportados por Xu et al. (2009c).

Con respecto a los días 3 y 7 de incubación, los tratamientos con ibuprofeno continúan respirando significativamente más que el control, siendo mayor la R_M de los suelos con la dosis más baja (I1SA) que el tratamiento a mayor concentración (I5SA). Los tratamientos con diclofenac, por su parte, en el día 3 de incubación comienzan a observarse diferencias significativas entre las dos concentraciones y en el día 15 de incubación se encontraron incrementos en la respiración con respecto al control. Para el día 7 de incubación, los tratamientos con ibuprofeno presentaron una mayor respiración con respecto a los tratamientos con diclofenac, presentando este último tratamiento la máxima respiración para el día 15 de incubación. A partir de este día, disminuye la respiración, posiblemente debido al agotamiento del sustrato orgánico y a la disminución de los niveles de oxígeno en la cámara de ensayo; sin embargo, se apreciaron diferencias significativas en la R_M con

respecto al control en el día 30, lo cual indica que los microorganismos continúan degradando los CF.

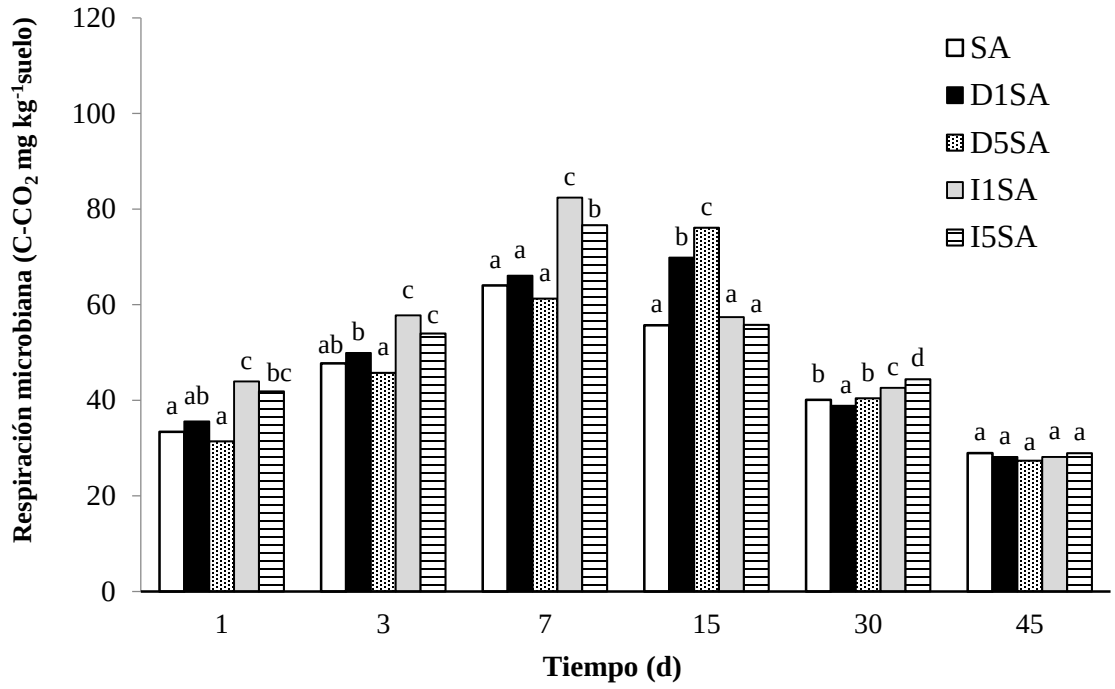


Figura 4.13 Respiración basal del suelo SA expuesto a diferentes concentraciones de diclofenac e ibuprofeno

Nota: Medias con superíndices distintos en un mismo día indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

En cuanto al suelo SC, la figura 4.14 muestra los resultados de la respiración. En principio se aprecia que el suelo SC arrojó valores significativamente más altos con respecto al suelo SA (Tabla C.1), lo cual se debe al mayor contenido de materia orgánica presente en el SC, que proporciona más fuente de nutrientes para los microorganismos, lo cual contribuye a una actividad microbiana más alta, que se refleja en una mayor producción de CO_2. La relación directa entre estas dos variables ha sido establecida en varios estudios (Fernandes et al., 2005; Sánchez et al., 2005; Mogollón y Martínez, 2009).

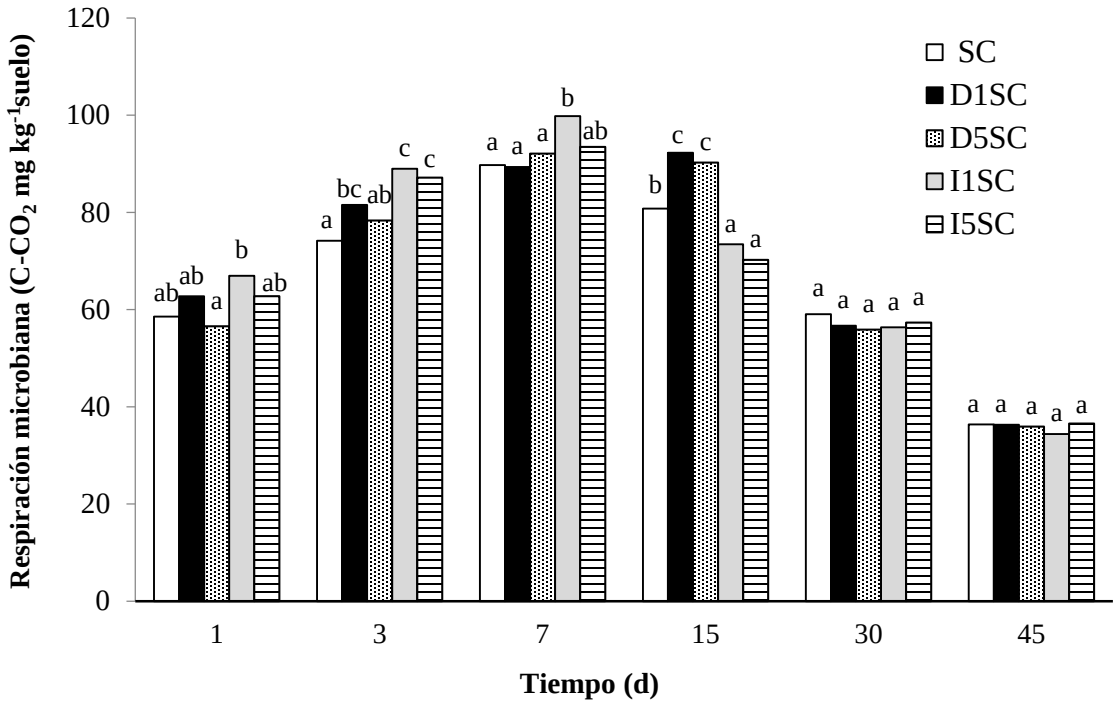


Figura 4.14 Respiración basal del suelo SC expuesto a diferentes concentraciones de diclofenac e ibuprofeno.

Nota: Medias con superíndices distintos en un mismo día indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

El suelo SC expuesto al diclofenac presentó los valores más altos de respiración los días 7 y 15, pero no ocurrió así con el tratamiento con ibuprofeno, donde los valores más altos en la producción de CO_2 ocurrieron los días 3 y 7, con incrementos significativos el día 3 y sólo la dosis más baja el día 7, con respeto al suelo control (Figura 4.14). En los tratamientos con diclofenac se apreciaron incrementos significativos en la respiración con respecto al control SC, con la dosis más baja en los días 3 y 15, y con la dosis más alta el día 15 solamente. En el caso del diclofenac se aprecia que la R_M se incrementa en mayor medida a partir del día 3 (con respecto al suelo SA), lo cual sugiere una degradación más rápida de este CF en el suelo SC. Por otra parte, en el día 15, el suelo SC expuesto al ibuprofeno, presentó una disminución significativa en la producción de CO_2 con respecto al control, lo cual sugiere algún efecto negativo de este fármaco sobre actividad metabólica de los microorganismos del suelo. Hay evidencias de que el ibuprofeno presenta un efecto antibacteriano significativo contra bacterias Gram-positivas y también un efecto antifúngico (Caracciolo et al., 2015; Elvers & Wright, 1995).

4.3.2 Acumulación de CO_2 en el periodo de incubación

La respiración acumulada de los suelos expuestos al diclofenac y al ibuprofeno se presenta en las figuras 4.15 y 4.16. En el caso del suelo SA (figura 4.15), los tratamientos con ibuprofeno provocaron una estimulación significativa de la respiración con respeto al control, desde el primer día de incubación, a ambas dosis del compuesto; mientras que en los tratamientos con diclofenac se observó tal efecto sólo a la dosis más baja y a partir del día 15 de incubación. Estos resultados sugieren una mayor resistencia a la degradación del diclofenac con respecto al ibuprofeno.

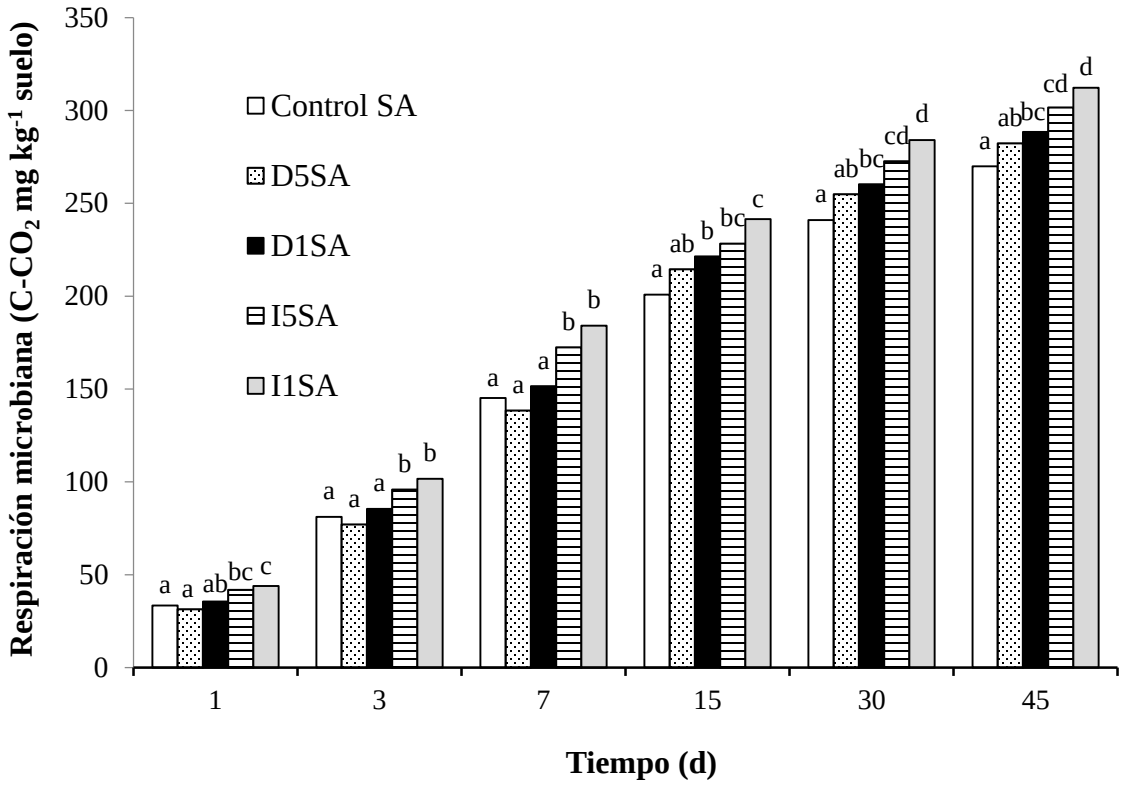


Figura 4.15 Respiración acumulada para el suelo SA en presencia de diferentes concentraciones del diclofenac y el ibuprofeno.

Nota: Medias con superíndices distintos en un mismo día indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

En el suelo SC (Figura 4.16), los tratamientos con ibuprofeno, al igual que en el suelo SA, presentaron desde el día 1 valores de respiración acumulada superiores al control; sin

embargo, en este suelo tal efecto se comenzó a apreciar para los tratamientos con diclofenac a partir del día 3, sugiriendo una más rápida asimilación de este CF en el suelo SC. La respiración de todos los tratamientos se mantuvo igual o superior al control, resultando en valores de respiración mayores que los encontrados en el suelo SA; no obstante, comparando los tratamientos con el control de cada suelo, a excepción del D1SA, todos los demás tratamientos (D5SA, I1SA y I5SA) arrojaron una diferencia mayor que los tratamientos correspondientes al suelo SC. Al final del periodo de incubación, los tratamientos que resultaron con valores de respiración acumulada significativamente superiores al control corresponden a los de menor dosis de los compuestos (I1SC y D1SC) y dichos valores fueron similares para los tratamientos de ambos fármacos.

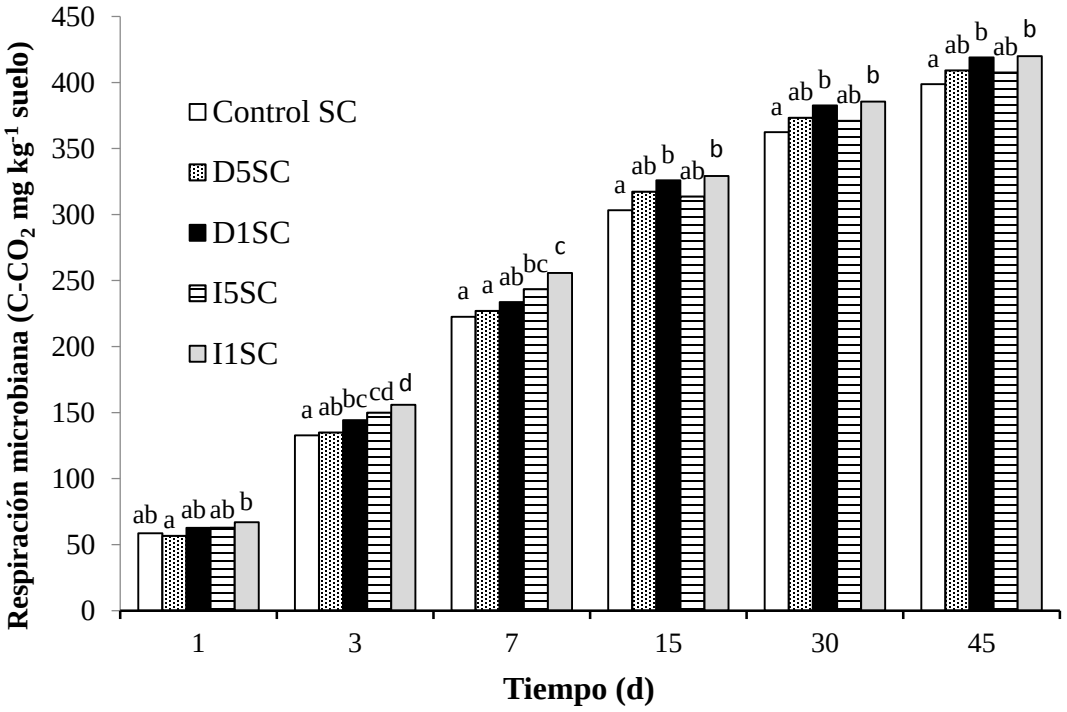


Figura 4.16 Respiración acumulada para el suelo SC en presencia de diferentes concentraciones del diclofenac y el ibuprofeno.

Nota: Medias con superíndices distintos en un mismo día indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

Comparando los tratamientos del ibuprofeno y el diclofenac con dosis diferentes, se observó que en ambos suelos (Figuras 4.15 y 4.16), un aumento en la concentración del CF

produjo una disminución en la respiración acumulada, sin embargo las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas.

Hasta donde se ha podido investigar, son escasos los estudios publicados sobre el efecto de los AINE en la respiración de los microorganismos del suelo expuestos a estos fármacos, por lo que resulta difícil realizar comparaciones. En trabajo realizado por Cycoń et al. (2016) encontraron que el diclofenac mostró un efecto estimulador en la respiración del suelo, mientras que el ibuprofeno exhibió un efecto inhibidor durante los primeros 15 días de muestreo a la dosis más alta ensayada (10 mg Kg^{-1}) y tales efectos fueron insignificantes a la concentración más baja del AINE (1 mg Kg^{-1}). En la presente investigación se apreció una disminución significativa de la respiración en el tratamiento I5SC para el día 15 de incubación (Figura 4.14); sin embargo, al igual que el estudio realizado por Cycoń et al. (2016), la respiración microbiana se estabilizó en los días de incubación subsiguientes.

4.3.3 Carbono en la biomasa microbiana de los suelos

En las tablas 4.21 y 4.22 se presentan los resultados del carbono contenido en la biomasa microbiana en cada día de incubación por los suelos SA y SC, respectivamente. De forma similar a los resultados obtenidos en la respiración, el suelo SC presentó valores de C_{BM} significativamente superiores a los encontrados en el suelo SA ($p < 0,05$) (Tabla C.2), lo cual se corresponde con el nivel más alto de carbono orgánico presente en el SC. Diversos autores han reportado una correlación positiva entre la materia orgánica y el carbono de la biomasa microbiana (Gómez-Jorrin et al., 2012; Sparling, 1992).

En cuanto a la influencia de los fármacos, se detectaron incrementos relevantes en C_{BM} con respecto al suelo SA sólo en los días 7 (Tratamientos: D1SA, I1SA, I5SA) y 15 (Tratamientos: D1SA, D5SA, I1SA). Los tratamientos con ibuprofeno exhibieron los valores más altos para el día 7; mientras que los tratamientos con diclofenac presentaron valores máximos para el día 15 (Tabla 4.21). Esto indica que el ibuprofeno fue asimilado más rápidamente por los microorganismos, lo que provocó una estimulación de la actividad biológica. La aplicación de la dosis más alta de los CF produjo una disminución en la C_{BM}, que sólo fue significativa con respecto a la concentración más baja evaluada, en el

tratamiento I5SA del día 15, que posteriormente, en los días siguientes, se iguala con el tratamiento I1SA y con el suelo control SA, por lo que se puede concluir que los CF no presentaron un efecto inhibidor sobre la biomasa microbiana del suelo.

Tabla 4.21 Carbono en la biomasa microbiana del suelo SA expuesto a diferentes concentraciones de diclofenac e ibuprofeno.

Tratamientos	**C_{BM} (mg C Kg^{-1} suelo)**					
	Tiempo (días)					
	1	**3**	**7**	**15**	**30**	**45**
SA (Control)	287 ^{a}	295 ^{ab}	300 ^{a}	321 ^{a}	280 ^{a}	265 ^{a}
D1SA	287 ^{a}	287 ^{ab}	368 ^{bc}	392 ^{c}	272 ^{a}	255 ^{a}
D5SA	251 ^{a}	251 ^{a}	336 ^{ab}	389 ^{c}	271 ^{a}	291 ^{a}
I1SA	324 ^{a}	323 ^{ab}	405 ^{c}	354 ^{b}	271 ^{a}	254 ^{a}
I5SA	259 ^{a}	333 ^{b}	374 ^{bc}	319 ^{a}	281 ^{a}	266 ^{a}

Medias con superíndices distintos en una misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

Tabla 4.22 Carbono en la biomasa microbiana del suelo SC expuesto a diferentes concentraciones de diclofenac e ibuprofeno.

Tratamientos	**C_{BM} (mg C Kg^{-1} suelo)**					
	Tiempo (días)					
	1	**3**	**7**	**15**	**30**	**45**
SC (Control)	431 ^{ab}	469 ^{abc}	361 ^{ab}	342 ^{a}	404 ^{b}	435 ^{a}
D1SC	465 ^{bc}	431 ^{a}	398 ^{bc}	467 ^{b}	426 ^{b}	400 ^{a}
D5SC	394 ^{a}	472 ^{bc}	324 ^{a}	419 ^{b}	427 ^{b}	435 ^{a}
I1SC	504 ^{c}	507 ^{c}	422 ^{c}	350 ^{a}	387 ^{a}	397 ^{a}
I5SC	430 ^{ab}	436 ^{ab}	421 ^{c}	309 ^{a}	385 ^{a}	436 ^{a}

Medias con superíndices distintos en una misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

Con respecto al suelo SC, el tratamiento con ibuprofeno en su dosis baja (I1SC) provocó aumentos significativos de la biomasa con respecto al control desde el primer día de incubación, y para el día 7 se iguala con los valores de C_{BM} obtenidos a la mayor dosis (I5SC). Esto indica que el posible efecto causado por la aplicación de la dosis alta de este compuesto pudo haber sido superado y que una vez que los microorganismos se adaptaron a su presencia y concentración, éstos procedieron a degradarlo, lo cual también fue

observado en los experimentos realizados por Cycorí et al. (2016). Por su parte, para los tratamientos con diclofenac se obtuvieron, para ambas dosis ensayadas, valores de biomasa superiores al control sólo para el día 15. De manera general, se mantienen las mismas tendencias en ambos suelos, una más rápida degradación del ibuprofeno con respecto al diclofenac. Los valores similares a los suelos controles, tanto de biomasa como de respiración, a partir del día 30 sugiere una disminución de la tasa de degradación de estos fármacos al final del periodo de incubación.

La evaluación de la repetitividad de la metodología empleada para la determinación del C_{BM}, medidos en términos de la desviación estándar, dieron valores más altos a los obtenidos en los ensayos de respiración. Esto posiblemente se deba a las diferentes etapas involucradas en la determinación de la biomasa (fumigación, extracción, digestión, titulación), cada una de las cuales generan fuentes de errores. En algunos casos, la variabilidad obtenida no permitió juzgar las diferencias significativas entre los tratamientos y el control. Por otra parte, se observó que en ambos suelos el contenido de C en la biomasa microbiana tendió a retornar a sus valores iniciales al final del periodo de incubación, lo cual fue también reportado en un estudio sobre el efecto de herbicidas en el C_{BM} (Vischetti et al., 2002). Esto puede explicarse tomando en cuenta la teoría ecológica de Odum (1985) que establece que el estrés pone en acción un mecanismo que les da a los organismos la capacidad de mantener una condición interna estable compensando los cambios en su entorno mediante el intercambio regulado de materia y energía con el exterior.

4.3.4 Cociente metabólico y análisis gráfico vectorial

Los valores de qCO_2 de los suelos SA y SC expuestos a los fármacos, presentaron diferencias significativas en el tiempo (Anexo D), y como era de esperarse, por los resultados de R_M y C_{BM}, se evidenciaron diferencias importantes con respecto al control en los días 7 y 15 (Tablas 4.23 y 4.24), en cuyos días se obtuvieron valores distintos de qCO_2, en los suelos controles SA y SC. En cuanto al suelo SA, los tratamientos D1SA y D5SA exhibieron en estos días valores de qCO_2 por debajo del control (Tabla 4.23), que sugiere un efecto estimulante ya que hubo un incremento de la biomasa, manteniendo la respiración

baja, lo cual indica mejor utilización de la energía metabólica (Anderson & Domsh, 1990; Odum 1985).

Tabla 4.23 Cociente metabólico del suelo SA expuesto a diferentes concentraciones de diclofenac e ibuprofeno.

Tratamientos	qCO_2 (mg C-CO_2 mg^{-1} C)					
	Tiempo (días)					
	1	**3**	**7**	**15**	**30**	**45**
SA (Control)	0,12 ^{a}	0,29 ^{a}	0,48 ^{b}	0,63 ^{bc}	0,87 ^{a}	1,03 ^{ab}
D1SA	0,13 ^{a}	0,30 ^{a}	0,41 ^{a}	0,57 ^{ab}	0,96 ^{a}	1,15 ^{ab}
D5SA	0,14 ^{a}	0,31 ^{a}	0,42 ^{a}	0,55 ^{a}	0,95 ^{a}	0,97 ^{a}
I1SA	0,14 ^{a}	0,32 ^{a}	0,45 ^{ab}	0,68 ^{cd}	1,06 ^{a}	1,25 ^{b}
I5SA	0,16 ^{a}	0,29 ^{a}	0,46 ^{ab}	0,72 ^{d}	0,98 ^{a}	1,15 ^{ab}

Medias con superíndices distintos en una misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

Tabla 4.24 Cociente metabólico del suelo SC expuesto a diferentes concentraciones de diclofenac e ibuprofeno.

Tratamientos	qCO_2 (mg C-CO_2 mg^{-1} C)					
	Tiempo (días)					
	1	**3**	**7**	**15**	**30**	**45**
SC (Control)	0,14 ^{a}	0,28 ^{a}	0,62 ^{a}	0,89 ^{b}	0,90 ^{ab}	0,92 ^{a}
D1SC	0,14 ^{a}	0,33 ^{b}	0,59 ^{a}	0,70 ^{a}	0,90 ^{ab}	1,06 ^{a}
D5SC	0,14 ^{a}	0,29 ^{a}	0,70 ^{b}	0,76 ^{a}	0,88 ^{a}	0,96 ^{a}
I1SC	0,13 ^{a}	0,31 ^{a}	0,61 ^{a}	0,95 ^{bc}	1,00 ^{c}	1,06 ^{a}
I5SC	0,15 ^{a}	0,34 ^{b}	0,58 ^{a}	1,01 ^{c}	0,96 ^{bc}	0,94 ^{a}

Medias con superíndices distintos en una misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

En el caso de los tratamientos con ibuprofeno en el suelo SA, a pesar de que se obtuvieron valores de qCO_2 similares a los tratamientos con diclofenac para el día 7 (Tabla 4.23), no se detectó una disminución significativa con respecto al control, posiblemente debido a la variabilidad registrada en los resultados de C_{BM}. Para el día 15, se aprecia valores de qCO_2 estadísticamente superiores al suelo control (I5SA), lo cual refleja una mayor pérdida de C en forma de CO_2 y una menor asimilación del C en el protoplasma microbiano (Knoepp et

al., 2000) y por consiguiente una condición de estrés. Esto puede ocurrir por un posible efecto tóxico del ibuprofeno sobre los microorganismos, situación que fue superada ya que se obtuvieron valores de qCO_2 similares al control en los dos últimos días de muestreo, lo cual indica un retorno al estado sin estrés, según las teorías propuestas por Odum (1985) que establecen que para reparar el daño causado se requiere desviar la energía del crecimiento hacia el mantenimiento.

Por su parte, en el suelo SC comenzaron a detectarse condiciones de estrés (valores de qCO_2 mayores al control) desde el día 3, específicamente en los tratamientos D1SC y I5SC, donde dicho efecto se iguala (Tabla 4.24). Esto sugiere una mayor toxicidad del diclofenac, ya que se requiere aumentar cinco veces la dosis del ibuprofeno para alcanzar el mismo efecto obtenido en el tratamiento D1SC. Sin embargo, para el día 15 los tratamientos a ambos dosis del diclofenac (D1SC y D5SC) presentaron una disminución en el cociente metabólico con respecto al control, lo que indica la utilización energéticamente eficiente de estos sustratos, es decir, menos C del sustrato orgánico se canaliza hacia el metabolismo energético y más C se fija en las células microbianas (Anderson & Domsch, 1993). Contrariamente, a partir del día 15, los tratamientos con ibuprofeno arrojaron valores de qCO_2 altos con respecto al control, lo cual indica un mayor gasto de carbono en CO_2 y por tanto un estrés microbiano, situación que se mantuvo hasta el día 30.

En la figura 4.17 se muestran el análisis gráfico vectorial donde se valora la respuesta microbiana de los suelos SA y SC a la presencia de ibuprofeno y diclofenac, medidos en términos de respiración y biomasa, representándose sólo los días 7 y 15 donde se encontraron las mayores diferencias significativas con respecto a los suelos controles. En el caso del suelo SA, para el día 7 (Figura 4.17a), las dos dosis del ibuprofeno y la menor del diclofenac presentaron un efecto estimulante sobre la comunidad microbiana, en el siguiente orden: I1SA > I5SA > D1SA. La respuesta del tratamiento D5SA se ubicó en el cuadrante antagónico cerca del control, debido a que no se encontraron diferencias significativas con respecto al suelo SA, tanto en los valores de respiración (Figura 4.15) como en el carbono de la biomasa (Tabla 4.21).

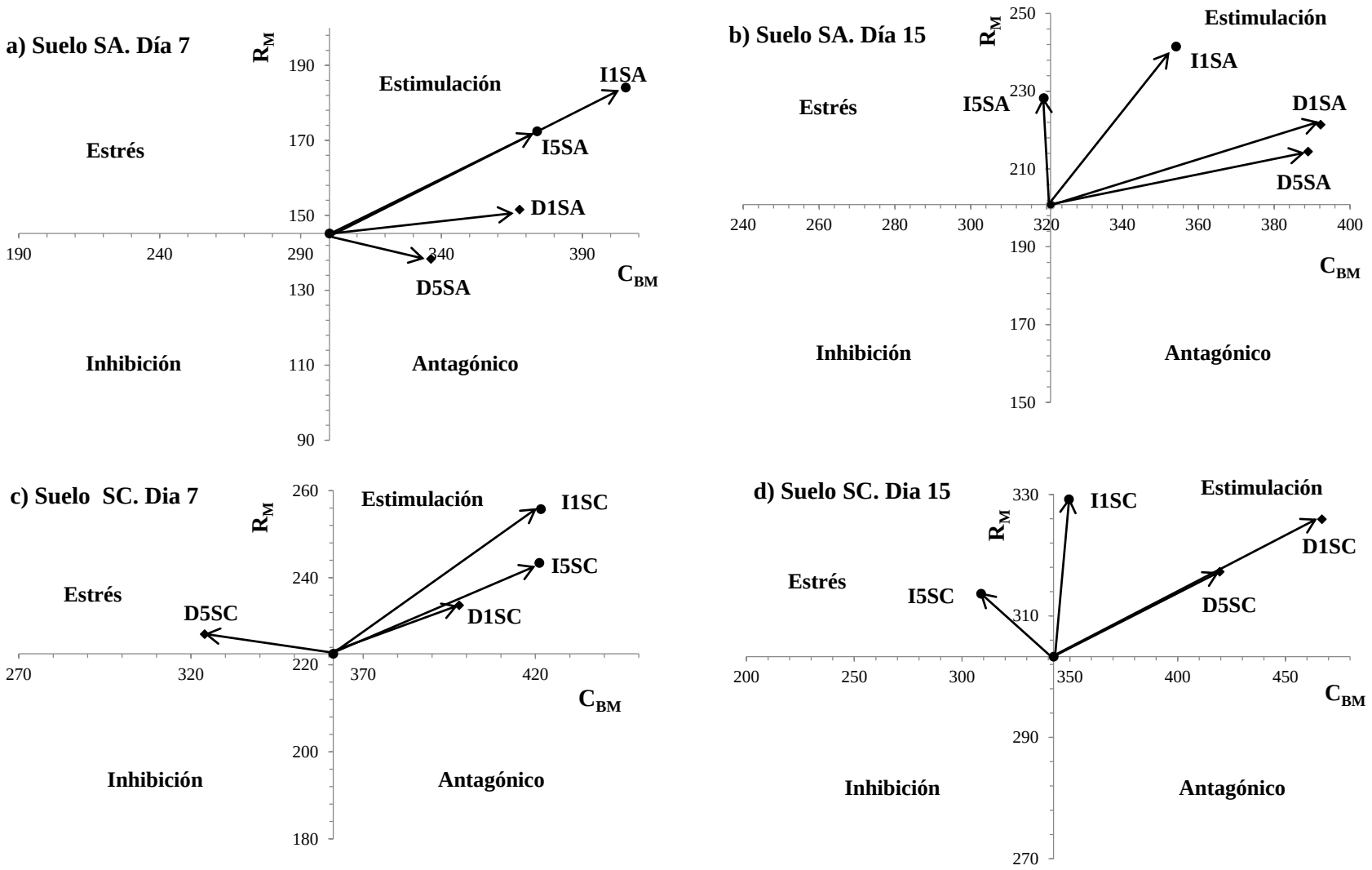


Figura 4.17 Análisis gráfico vectorial del efecto del diclofenac e ibuprofeno sobre la actividad microbiana de los suelos.

Nota: Los valores de R_M (acumulado) están expresado en mg C-CO_2 Kg^{-1} suelo y C_{BM} en mg C Kg^{-1} suelo.

Para el día 15 (Figura 4.17b), el efecto estimulante presentó el siguiente orden: D1SA > D5SA > I1SA. El tratamiento I5SA se situó en el cuadrante de estrés, en la frontera con la sección de estimulación, ya que los valores de C en la biomasa se encontraron por debajo del control, y aunque tal reducción no fue significativa (Tabla 4.21), si la mayor generación de CO_2 acumulada hasta este día (Figura 4.15). Estos resultados concuerdan con la interpretación que se deriva de los valores de qCO_2 (Tabla 4.23), a excepción del tratamiento I1SA que presentó un valor de cociente metabólico similar al control.

Con respecto al suelo SC, para el día 7 (Figura 4.17c), todos los tratamientos a excepción del D5SC, presentaron una estimulación de la actividad microbiana, en el mismo orden que el encontrado en el suelo SA, pese a que los cocientes metabólicos obtenidos por estos tratamientos (I1SC, I5SC Y D1SC) fueron estadísticamente similares al control (Tabla 4.24). El tratamiento D5SC se ubicó en el cuadrante de estrés, y concuerda con el menor valor qCO_2 obtenido, debido a una respuesta positiva en la respiración con respecto al control, pero negativa en la producción de biomasa microbiana.

Para el día 15, la magnitud de las respuestas de los tratamientos de diclofenac en el suelo SC (Figura 4.17d), refleja una diferencia mayor entre las dos dosis en comparación con el suelo SA, lo cual indica una mejor utilización de este sustrato, donde el efecto estimulante superó al ibuprofeno, presentando el siguiente orden: D1SC > D5SC > I1SC. El tratamiento I5SC produjo un estrés que está en concordancia con el mayor qCO_2 (Tabla 4.24).

Finalmente, y según el análisis gráfico vectorial, la magnitud de la estimulación microbiana fue mayor el día 7 para los tratamientos con ibuprofeno y el día 15 para los tratamientos con diclofenac, en ambos suelos; y un aumento en la concentración de estos compuestos, produjo una reducción de tal efecto. Ninguna de las dosis ensayadas provocó una inhibición de la respuesta microbiana, por lo que a pesar de las condiciones de estrés detectadas en los tratamientos I5SA (Día 15), D5SC (Día 7) y I5SC (Día 15), según los resultados de R_M acumulada (Figuras 4.15 y 4.16) y C_{BM} (Tablas 4.21 y 4.22) al final del periodo de incubación (Día 45), no se apreciaron diferencias significativas entre las dos dosis ensayadas de los CF.

4.4 Descripción de la cinética de degradación de los CF

4.4.1 Curvas de degradación de los compuestos

La figura 4.18 muestra las curvas de degradación del diclofenac y el ibuprofeno en el suelo SA. Se apreciaron diferencias significativas, a partir del día 1, en la concentración remanente de los CF en el suelo SA con respecto al tiempo de incubación (Tabla C.4). De igual forma, a partir del día 3, se evidenciaron discrepancias entre las concentraciones del diclofenac y el ibuprofeno. Con respecto al suelo SC (Figura 4.19), las concentraciones del diclofenac y el ibuprofeno remanentes también variaron significativamente con el tiempo de incubación, con importantes diferencias entre los dos compuestos en los días 3, 7 y 15 (Tabla C.5).

Las curvas de degradación (Figuras 4.18 y 4.19) revelan que la disminución de la concentración del ibuprofeno y el diclofenac en ambos suelos comenzó a partir del primer día de incubación, sin ninguna fase de retardo, y la velocidad de degradación de ambos compuestos fue más alta en el suelo SC con respecto al suelo SA. A partir del día 30 el proceso se hizo más lento en ambos suelos, lo cual está en concordancia con los menores valores de respiración microbiana generados a partir de este día (Figuras 4.13 y 4.14).

En cuanto a los suelos esterilizados, la disminución de la concentración de los fármacos en el tiempo de incubación fue más suave (Tablas C.6 y C.7), con diferencias significativas entre los suelos esterilizados y los no esterilizados (Anexo D), evidenciándose que la acción microbiana ejerció un efecto importante en la degradación del ibuprofeno y el diclofenac. Al final de periodo de incubación (45 d) el porcentaje de los CF que persisten en los suelos SA y SC fueron menores del 20% y 10%, respectivamente, mientras que en los controles esterilizados la concentración remanente de ambos compuestos superó el 50%. Otras investigaciones han demostrado también que la esterilización de los suelos da como resultado una disminución de la velocidad de degradación de los compuestos farmacéuticos (Yu et al., 2013; Al-Rajab et al., 2010; Xu et al., 2009c).

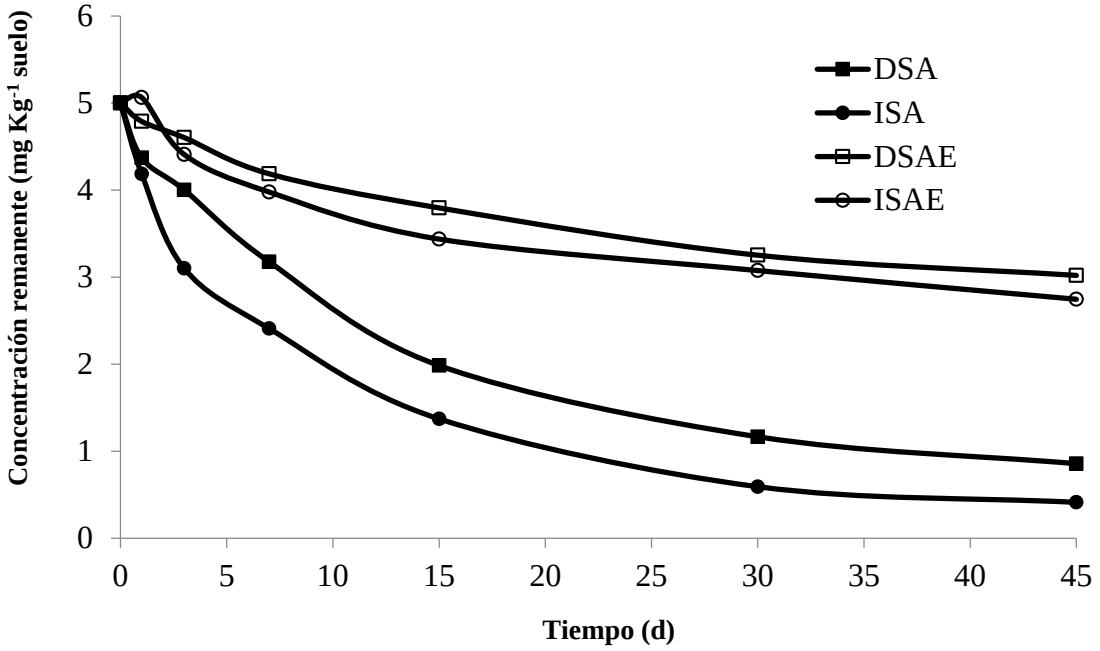


Figura 4.18 Curvas de degradación del diclofenac y el ibuprofeno en el suelo SA y suelo SA esterilizado (SAE).

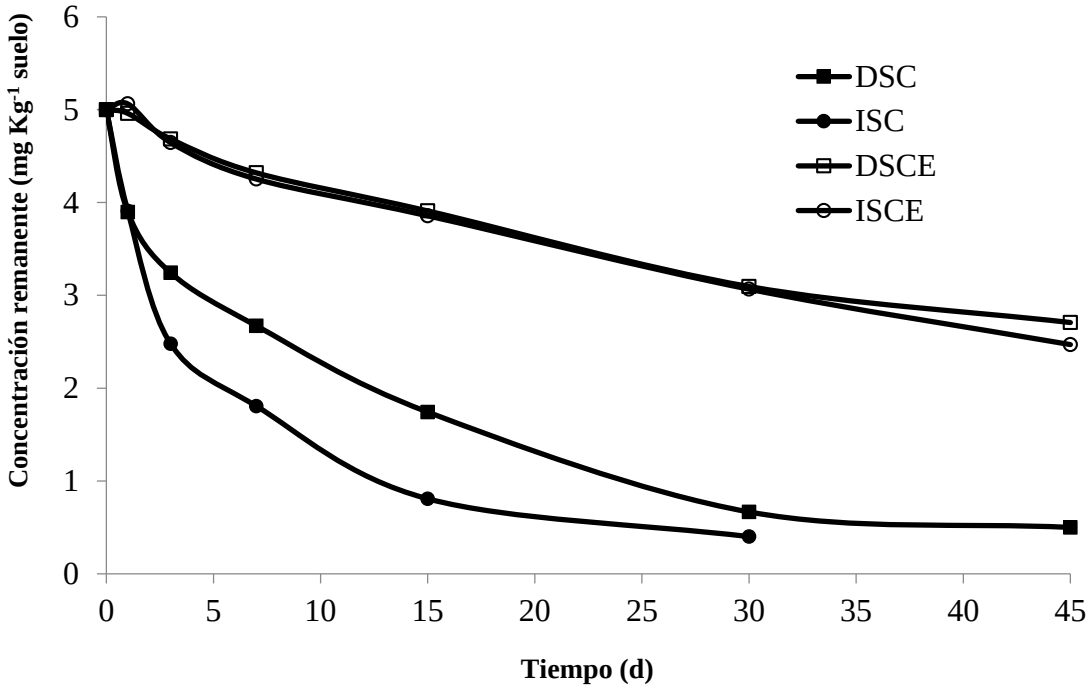


Figura 4.19 Curvas de degradación del diclofenac y el ibuprofeno en el suelo SC y suelo SC esterilizado (SCE).

La reducción de la concentración del ibuprofeno (suelos SA y SC) en el tiempo fue más pronunciada con respecto al diclofenac, y para el día 45, en el suelo SC, se encontró por debajo del límite de cuantificación del método (Figura 4.19). Esto revela que el ibuprofeno es más susceptible a la degradación biológica. La mayor resistencia a la degradación del diclofenac se ha atribuido a la presencia en su estructura de dos anillos aromáticos y dos átomos de cloro (Jelic et al., 2012; Yu et al., 2006), lo cual concuerda con estudios realizados con pesticidas clorados (Chowdhury et al., 2008). Las curvas de degradación de los CF en los suelos se ajustaron a dos modelos cinéticos de primer orden. A continuación se discuten los resultados obtenidos en la aplicación del modelo lineal y no lineal.

4.4.2 Cinética de degradación lineal de primer orden

El análisis de la regresión del modelo cinético lineal de primer orden fue significativa ($P < 0,05$. Anexo D), con coeficientes de correlación entre 0,944 - 0,953 para los suelos SA y SC (Tabla 4.25) y entre 0,850 - 0,957 para suelos esterilizados (Tabla 4.26). Por ello, se aplicó este modelo para estimar los tiempos en los cuales la concentración de los CF se reducen al 50% ($t_{1/2}$) y al 90% (DT_{90}). Se obtuvieron diferencias significativas en estos parámetros entre fármacos y suelos, las cuales se discuten a continuación.

- ***Diclofenac***

El diclofenac presentó un $t_{1/2}$ de 17 d en el suelo SA, con un aumento en su velocidad de degradación en un 22% en el suelo SC, arrojando un $t_{1/2}$ más bajo y significativamente diferente con respecto al suelo SA. Los valores de $t_{1/2}$ obtenidos están en el rango de los resultados reportados por Lin y Gan (2011) y Xu et al. (2009c), con $t_{1/2}$ de 5 y 30 d y entre 3 a 20 d, respectivamente. Cabe destacar que Xu et al (2009c) encontraron una correlación inversamente proporcional entre los valores de k y el contenido de MO de los suelos evaluados; no obstante, en la presente investigación se encontró que el suelo SC, con un contenido mayor de MO, presentó una velocidad de degradación más alta, lo cual se atribuye al pH neutro del suelo, donde predomina la forma ionizada del diclofenac que al presentar una mayor solubilidad, está más disponible para ser asimilado por los microorganismos.

Tabla 4.25 Parámetros cinéticos derivados del ajuste a dos modelos de degradación de primer orden para suelos SA y SC.

Tratamiento	Modelo cinético lineal de primer orden				Modelo cinético no lineal de primer orden				
	Constante de velocidad, k (d^{-1})	DT_{50} (d)	DT_{90} (d)	R^2	α (adim)	β (d^{-1})	DT_{50} (d)	DT_{90} (d)	R^2
DSA	0,040	17,3 [c]	58	0,953	1,27	0,07	10,4 [c]	73	0,988
ISA	0,055	12,6 [b]	42	0,944	1,22	0,11	7,0 [b]	51	0,988
DSC	0,051	13,6 [b]	45	0,950	1,58	0,07	7,9 [b]	47	0,975
ISC	0,074	9,4 [a]	31	0,952	1,89	0,10	4,4 [a]	24	0,983

Tabla 4.26 Parámetros cinéticos derivados del ajuste a dos modelos de degradación de primer orden para suelos SAE y SCE.

Tratamiento	Modelo cinético lineal de primer orden				Modelo cinético no lineal de primer orden				
	Constante de velocidad, k (d^{-1})	DT_{50} (d)	DT_{90} (d)	R^2	α (adim)	β (d^{-1})	DT_{50} (d)	DT_{90} (años)	R^2
DSAE	0,011	63 [b]	209	0,922	0,82	0,02	66 [b]	2,1	0,954
ISAE	0,013	53 [ab]	177	0,850	0,59	0,04	56 [ab]	3,3	0,910
DSCE	0,014	50 [ab]	164	0,957	0,78	0,03	48 [ab]	1,7	0,969
ISCE	0,016	43 [a]	144	0,922	0,69	0,04	43 [a]	1,9	0,920

Notas para ambas tablas:

- DT_{50}: Tiempo en el cual la concentración del compuesto se reduce al 50%, y es igual al tiempo de vida medio ($t_{1/2}$) cuando la transformación se describe con una cinética lineal de primer orden (OECD, 2002). DT_{90}: Tiempo en el cual la concentración del compuesto se reduce al 90%.
- Medias con superíndices distintos en una misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

Por otra parte, Grossberger et al. (2014), obtuvieron $t_{1/2}$ entre 1 y 8 d en suelos alcalinos y con contenido medio de MO, no encontrándose una influencia significativa del porcentaje de MO en la velocidad de degradación del diclofenac, sino el efecto del periodo en el cual se realizó el muestreo de los suelos (antes y después del cultivo). Al-Rajab et al. (2010) hallaron $t_{1/2}$ similares (entre 1 y 4 d), los cuales se llevaron a cabo con diclofenac marcado en el grupo carboxil [^{14}C], el cual presumen fue removido rápidamente de la molécula durante la transformación. Los valores de $t_{1/2}$ calculados en estas dos últimas investigaciones son más bajos que los reportados en otros estudios (Lin & Gan, 2011; Xu et al. 2009c) y, a los obtenidos en la presente investigación. Las discrepancias pueden ser atribuibles a diferencias propias de las comunidades microbianas de los suelos evaluados, a las características fisicoquímicas de los mismos (pH, MO, textura, etc.) y a las condiciones (temperatura, humedad, tratamiento del suelo) en las que se llevaron a cabo los experimentos, que pueden afectar la degradación (Domaradzka et al., 2015; Caracciolo et al., 2015).

En este sentido, Grossberger et al. (2014) sugieren que las condiciones de almacenamiento y pretratamiento del suelo tienen una influencia marcada en la actividad biológica, indicando que los valores bajos de $t_{1/2}$ obtenidos, se deben a que trabajaron con los suelos pocas horas después de su muestreo. En el estudio de Lin y Gan (2011), los suelos se almacenaron a 4ºC hasta su uso; mientras que los realizados por Xu et al. (2009c) fueron secados al aire y luego re-humectados. Según los lineamientos establecidos por la OECD (2002), los suelos se pueden almacenar a 4ºC, pero se debe realizar una pre-incubación de los mismos previo a los ensayos, con la finalidad de re-establecer el equilibrio del metabolismo microbiano perturbado durante el muestreo y almacenaje, tal como se realizó en la presente investigación. Por otra parte, Lee et al. (2007), demostraron que muchas propiedades microbianas del suelo son sensibles a los efectos del almacenamiento, siendo las mejores condiciones, el uso inmediato del suelo muestreado o en su defecto la refrigeración del mismo a 4ºC o -20ºC, y que el tratamiento de secado y re-humectación es el método menos indicado para la evaluación de parámetros microbiológicos.

Otra factor a considerar, cuando se compara con otras fuentes los resultados de los ensayos de degradación, es el nivel de la concentración inicial empleado. Xu et al., (2009c) encontraron que el aumento de la concentración del diclofenac en el suelo (de 0,1 mg kg^{-1} a 1 mg Kg^{-1}) redujo la velocidad de degradación, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos por Grossberger et al. (2014) (de 0,05 mg kg^{-1} a 5 mg kg^{-1}). Similares resultados han sido reportados con otros fármacos (Cui et al., 2014; Yang et al., 2012). Estos autores establecen que el aumento de la persistencia del fármaco puede ser atribuido a la inhibición de la actividad de los microorganismos por efecto de la concentración. Según la valoración de la actividad microbiana realizada en la presente investigación, el aumento de la concentración produjo una reducción del efecto estimulante y en algunos casos una condición de estrés, pero no se alcanzó un nivel de inhibición en los dos niveles de concentración ensayados (Figura 4.17).

- ***Ibuprofeno***

Al igual que el diclofenac, el ibuprofeno presentó una constante de la velocidad de reacción más alta en el suelo SC (26% superior con respecto al suelo SA), lo cual concuerda con la mayor actividad microbiana del suelo SC, medidos en términos de R_M y C_{BM}. Además, se obtuvieron menores tiempos de vida media, que confirman que el ibuprofeno es más susceptible a la degradación en los suelos evaluados con respecto al diclofenac, lo cual también está acorde con el comportamiento exhibido en los otros estudios biológicos (R_M y C_{BM}).

Xu et al. (2009c) reportaron que el $t_{1/2}$ de ibuprofeno varió de 1 a 6 d, siendo estos valores menores a los encontrados para el diclofenac, y al igual que en este último compuesto, se encontró una correlación negativa entre la constante de velocidad y el contenido de MO del suelo, que no se evidenció en la presente investigación debido posiblemente al efecto del pH de los suelos. Por otra parte, Lin y Gan (2011) obtuvieron tiempos medios de 10 y 15 d, donde se produjo una disminución importante de la concentración durante los primeros 14 d con pequeñas reducciones a partir de entonces, tal como se observó en la presente

investigación a partir del día 15, principalmente en el suelo SC, obteniéndose $t_{1/2}$ cercano a los reportados por estos investigadores.

Por su parte, Girardi et al. (2013), obtuvieron $t_{1/2}$ de ibuprofeno de 130 días, el cual es un valor alto comparado con los otros estudios reportados, sin embargo, en esta investigación, trabajaron con $^{13}C_6$-ibuprofeno, marcado en un carbono del anillo aromático, que se considera la parte más estable de la molécula, y por tanto menos propensa a la degradación; a diferencia de los estudios realizados por Richter et al. (2007) que reportaron $t_{1/2}$ de 1 y 6 d ya que partieron de $^{14}C_3$-ibuprofeno, marcado en el C_3 de la cadena alquílica, cuya ruptura de los enlaces requiere de menos etapas en comparación con los pasos adicionales que se necesitan para abrir el anillo aromático (Figura 2.8).

Grossberger et al. (2014) también estudiaron la degradación del ibuprofeno en suelos, encontrando $t_{1/2}$ entre 3-16 d, y a diferencias de la mayoría de los trabajos consultados, este compuesto presentó una velocidad de degradación menor que el diclofenac. Para ambos CF, las tasas de biodegradación fueron estadísticamente similares en los tres suelos estudiados, por lo que concluyen que las diferencias en el contenido de arcilla y MO del suelo no ejercieron un efecto significativo, posiblemente debido a que trabajaron con suelos de pH básico (8,1).

- ***Suelos esterilizados***

Los tiempos de vida media ($t_{1/2}$) y DT_{90} de ambos compuestos aumentaron en promedio cuatro veces en los suelos esterilizados, lo cual corrobora que la biodegradación es la vía dominante de eliminación del ibuprofeno y el diclofenac en los suelos SA y SC. Se encontró que para ambos compuestos, estos aumentos en los tiempos de reacción, producto de la esterilización, fueron mayores en el suelo SC, especialmente para el ibuprofeno. Esto ratifica que el ibuprofeno es más susceptible a la degradación biológica que el diclofenac y que el suelo SC, al presentar una mayor actividad microbiana, se ve más afectado por el proceso de esterilización, razón por lo cual el tratamiento ISCE arrojó tiempos de vida ($t_{1/2}$ y DT_{90}) significativamente diferentes al tratamiento DSAE (Tabla 4.26).

La disminución de la concentración de los CF en los suelos esterilizados se puede atribuir a dos razones. La primera de ellas, al aumento de la actividad microbiana de estos suelos en el tiempo, tal como se evidenció a partir del día 15 de incubación (Figura B.1), aun cuando fueron significativamente menores que los suelos sin esterilizar. Por otra parte, se han propuestos mecanismos no bióticos de eliminación de fármacos en aguas residuales, aguas superficiales y en el suelo, tales como la fotolisis, hidrólisis, hidroxilación, oxidación, reducción, eliminación y deshalogenación (Kummerer, 2009). La fotodegradación juega un papel importante en la transformación química de CF sistemas acuáticos, la cual ocurre bajo un mecanismo vía radical libre y en presencia de la luz solar (Yin et al., 2017; Arnold & McNeill, 2007) y ha sido ha sido atribuida como la principal causa de la disminución de la concentración del diclofenac en aguas superficiales (Buser et al., 1998). Sin embargo, no se considera un vía importante de transformación de CF en el suelo (Monteiro & Boxall, 2010). Otros autores establecen que en la transformación químicas de CF en el suelo predominan las reacciones redox, hidroxilación y deshalogenación en el caso de los compuestos clorados (Jjembra, 2008), sin embargo, hasta la fecha, son escasas las investigaciones publicadas al respecto.

4.4.3 Cinética de degradación no lineal de primer orden

El fórum para la **c**oordinación de modelos del destino de plaguicidas y su usos (FOCUS, 2006), establece que el coeficiente de correlación en el estudio de cinéticas de degradación de estos compuestos en el suelo debe estar en un rango entre 0,85 y 1,0. Aplicando estos mismos criterios, ya que no hay nada estableció para CF, se obtuvieron R^2 altos mediante el uso del modelo lineal de primer orden (> 0,850); sin embargo, se aplicó el modelo no lineal para corroborar si se obtienen una mejora en la correlación, sobre todo en los suelos esterilizados donde se obtuvieron los valores más bajos (Tabla 4.26).

A excepción del tratamiento ISCE, se obtuvieron R^2 mayores con el modelo no lineal de primer orden, encontrándose que en los suelos esterilizados los valores de DT_{50} son similares en los dos modelos (con desviaciones promedios < ± 6 %), mientras que los valores de DT_{90} son sustancialmente más altos en el modelo no lineal. Por el contrario, los

suelos SA y SC presentaron valores de DT_{90} cercanos en los dos modelos, mientras que los resultados de DT_{50} son en promedio 45% más bajos en el modelo no lineal.

Comparando los resultados de DT_{50} con las curvas de degradación, se aprecia que el modelo no lineal se ajusta mejor al comportamiento observado, ya que el tiempo para la disminución del 50% de la cantidad añadida de los fármacos se aproxima a los valores obtenidos mediante la regresión no lineal. En cuanto a los valores DT_{90} en la mayoría de los casos se encuentran por encima del tiempo de incubación final ensayado (45 d), sin embargo, en el caso de los suelos SA y SC, y principalmente los tratamientos ISA, ISC y DSC, los valores estimados por ambos modelos son muy cercanos y se corresponden a los tiempos obtenidos en las curvas de degradación cuando sólo queda el 10% del compuesto (Figuras 4.18 y 4.19).

Otra característica importante es que la relación DT_{90}/DT_{50} calculados por el modelo lineal permaneció constante en los ocho (8) tratamientos (con un valor de 3), independientemente del tipo de suelo y fármaco, lo cual está en concordancia con una cinética lineal. No obstante, la relación DT_{90}/DT_{50} estimada a través de una cinética no lineal arroja valores diferentes por grupos: los tratamientos evaluados en los suelos SA y SC, con un valor promedio de seis (6) y, los tratamientos en los suelos esterilizados, con un valor promedio de quince (15). Esto muestra las diferencias en las cinéticas de degradación de estos grupos de tratamientos (esterilizados y no esterilizados), lo cual se ve reflejado en la forma de las curvas de degradación de los compuestos en los suelos (Figuras 4.18 y 4.19), e indica que las transformaciones abióticas del ibuprofeno y diclofenac en los suelos evaluados son más lentas que las reacciones de biodegradación.

Gustafson y Holden (1990), en una evaluación sobre una base de datos de estudios de la disipación en suelos de varios pesticidas (con grupos funcionales similares a los CF en estudio), encontraron mayores discrepancias en los valores de β con respecto a los de α, siendo este último parámetro cercano a 1. En la presente investigación, los suelos SA y SC presentaron variabilidad espacial muy similar ($\beta \sim 0{,}1\ d^{-1}$) y valores de α también cercanos a la unidad. Como se aprecia en las figuras 4.18 y 4.19, las curvas de degradación del

ibuprofeno y el diclofenac en los suelos SA y SC se caracterizan por una rápida disminución de la concentración de estos compuestos en los primeros días de incubación, seguida por una etapa más lenta. Esta disminución en la velocidad de degradación puede ser atribuida a cambios en las condiciones de temperatura, humedad, disponibilidad de nutrientes, así como los procesos de adsorción que pueden causar desviaciones de la cinética de primer orden.

Comparando ambos suelos, el SC presentó valores de α más altos, lo cual indica que la velocidad de disipación de los dos compuestos fue mayor en este suelo obteniéndose por tanto valores menores de DT_{50} y DT_{90} (Tabla 4.25). En cuanto a los suelos esterilizados, presentaron valores de α menores que los suelos SA y SC, que revela una disminución menos pronunciada de la concentración en el tiempo. Por otra parte, los valores de β de los suelos SAE y SCE son más pequeños (Tabla 4.26), indicativo de una mayor uniformidad espacial en la disipación de los compuestos, debido posiblemente a una actividad microbiana disminuida, lo cual originó una velocidad de degradación biótica más lenta. Es importante señalar que a medida que β se aproxima a cero, el comportamiento cinético tiende a la linealidad.

Carter et al. (2014) utilizaron estos dos modelos cinéticos de primer orden para el estudio de la degradación del diclofenac en un suelo arenoso. La velocidad de disipación del diclofenac siguió una cinética de primer orden con tiempos de vida medio y DT_{90} de de 0,5 d y 1,64 d, respectivamente, más bajos que los reportados en este estudio, debido posiblemente al bajo contenido de CO del suelo. En el agua de los poros, la disipación del diclofenac siguió un modelo no lineal de primer orden, con valores de α y β de 0,79 y 0,34, respectivamente; obteniendose un DT_{50} de 20 d. Cabe destacar el valor alto de DT_{90} reportado (7 años), situación que también se evidenció en la presente investigación en los suelos esterilizados con DT_{90} promedio de 2,3 años, lo cual podría revelar las fallas de este método en el cálculo de este parámetro, especialmente en compuestos que presentan valores de β muy pequeños. Hasta donde se ha podido investigar, no se han encontrado otros trabajos donde estudien la disipación de CF en suelo con cinéticas diferentes a la de primer orden.

4.4.4 Comparación de los estudios de degradación con la R_M y el C_{BM}

Los resultados de la correlación lineal entre el porcentaje del ibuprofeno y el diclofenac remanentes en el suelo (C/C_0) con las variables biológicas evaluadas (Respiración y carbono en la biomasa microbiana), en el tiempo de incubación de los suelos, se presenta en la tabla 4.27. Sólo la R_M se correlacionó significativamente con la cantidad de fármaco remanente en los suelos, y dicha relación fue negativa, es decir, a medida que aumenta la respiración de los suelos la concentración remanente de los CF va disminuyendo producto de la utilización de estos sustratos por parte de los microorganismos.

Tabla 4.27 Coeficiente de correlación entre el % de concentración del compuesto remanente en el suelo y las variables biológicas evaluadas.

	Coeficiente correlación de Pearson por tratamiento							
	DSA		**ISA**		**DSC**		**ISC**	
	R_M	***C_{BM}***	***R_M***	***C_{BM}***	***R_M***	***C_{BM}***	***R_M***	***C_{BM}***
Concentración remanente en el suelo % (C/C_0)	-0,994*	-0,255	-0,991*	0,143	-0,975*	-0,155	-0,983*	0,400

Nota: * indica que la correlación es significativa a un nivel de 0,05.

En un estudio realizado por Vischetti et al. (2002), encontraron una relación no lineal que vincula la disminución de la C_{BM} con la concentración residual de dos herbicidas (Imazamox y Benfluralin) en el suelo. Tales herbicidas presentan en su estructura química anillos aromáticos con grupos aminos, carboxílicos, alquílicos y halógenos, al igual que los CF en estudio, por lo que se evaluó la regresión polinómica entre el C_{BM} y la concentración remanentes de los fármacos en los suelos. Como se muestra en la figura 4.20, se obtuvo una regresión polinómica de segundo orden entre el C_{BM} y el porcentaje de C/C_0 del diclofenac y el ibuprofeno en el suelo SA con R^2 de 0,789 y 0,943, respectivamente. Se apreciar que la adición de los CF al suelo SA produjo un aumento en la C_{BM} que alcanza su máximo cuando se ha degradado el 50% de la dosis inicial añadida de estos compuestos.

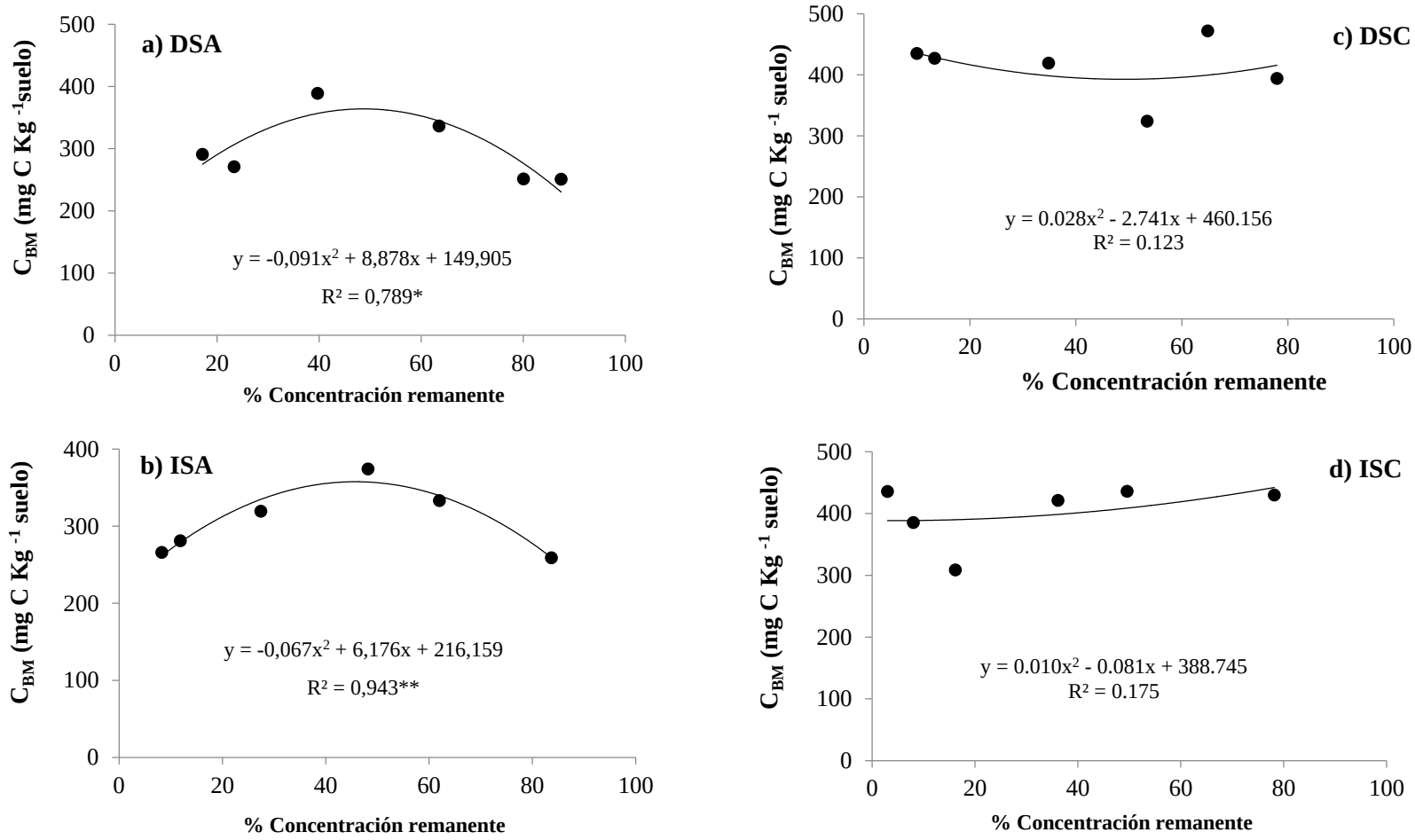


Figura 4.20 Curvas parabólicas de segundo orden del carbono en la biomasa microbiana en función del % de concentración residual del compuesto en el suelo.

Nota: * indica que la correlación es significativa a un nivel de 0,10 y ** indica que la correlación es significativa a un nivel de 0,05.

En el suelo SC no se encontró una correlación significativa y por otra parte, la tendencia fue contraria, es decir, una reducción del carbono en la biomasa microbiana a medida que disminuía la concentración de los CF en el suelo. Tal efecto fue reportado por Vischetti et al. (2002), y fue atribuido al efecto inhibidor de los herbicidas estudiados, lo cual puede tener efectos indirectos sobre la actividad microbiana del suelo, encontrándose también una disminución máxima de la biomasa microbiana cuando la concentración de los herbicidas fueron aproximadamente la mitad de la dosis inicial.

La valoración de la actividad biológica del suelo SC no reveló un efecto inhibidor de los CF (Figura 4.17), además tal reducción en el C_{BM} se observó también durante el tiempo de incubación del suelo SC control (Tabla 4.22). Posiblemente la mayor actividad biológica del suelo SC, reflejada en los valores más altos de grado de humificación (Tabla 4.3), no permitieron discernir el efecto de los fármacos en el C_{BM} e incluso, la correlación lineal entre la R_M y el porcentaje de los compuestos remanentes en los suelos (Tabla 4.27) fue más baja en este suelo en comparación con el suelo SA. Se requiere ampliar las investigaciones a fin de evaluar la relación existente entre el C_{BM} y la degradación de estos CF en el suelo SC (con alto contenido de MO), ya que la baja correlación obtenida no permitió establecer conclusiones al respecto. La estimación de estas relaciones podría ser útil para evaluar el comportamiento del ibuprofeno y el diclofenac, a través de variables biológicas tales como la respiración y el carbono de la biomasa microbiana, y de esta forma monitorear la cinética de la degradación de estos CF en el suelo.

4.5 Determinación de la capacidad de adsorción de los CF en los suelos

4.5.1 Determinación del tiempo de equilibrio

En la figura 4.21 se presenta el porcentaje de adsorción del ibuprofeno y el diclofenac en ambos suelos en función del tiempo de contacto con la solución acuosa. La adsorción de los CF en los suelos aumenta con el tiempo, observándose diferencias significativas entre los tiempos de agitación y su efecto en la adsorción de cada compuesto en los suelos (Tabla C.8). No obstante, a partir de las 8 h el porcentaje de adsorción de los fármacos y, por tanto

la cantidad de fármaco adsorbido en el suelo, se mantienen constante en ambos suelos, por lo que se seleccionó dicho tiempo para la construcción de las isotermas de adsorción.

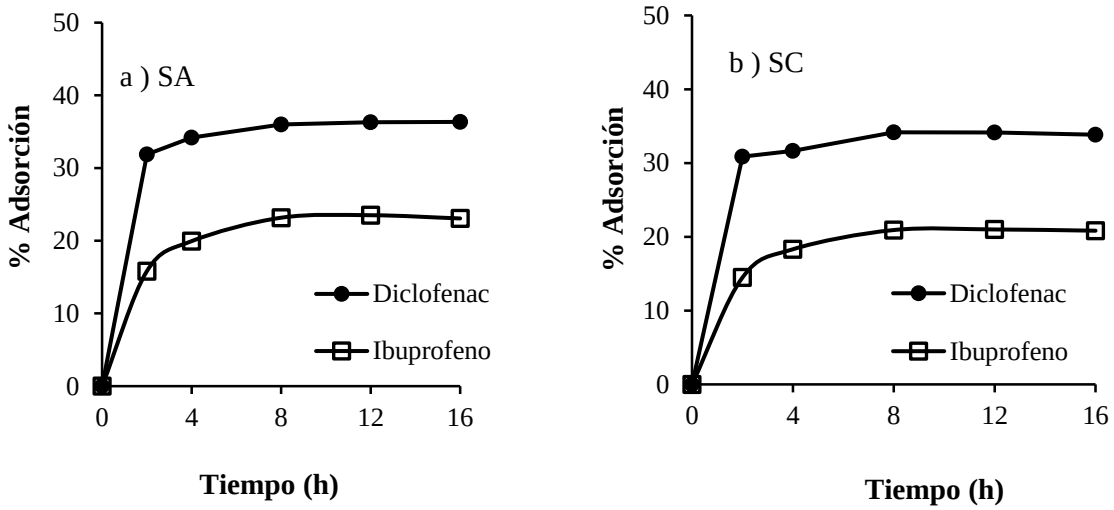


Figura 4.21 Capacidad de adsorción en los suelos SA y SC de los CF a través del tiempo de contacto con la solución.

4.5.2 Establecimiento de la relación suelo/solución

La capacidad de adsorción en los suelos del ibuprofeno y el diclofenac aumentó al incrementar la relación suelo/solución, siendo más pronunciada esta tendencia en el caso del diclofenac (Figura 4.22). Para el ibuprofeno no se aprecia esta dependencia tan marcada, posiblemente debido a que los suelos estudiados presentaron una menor capacidad de adsorber este fármaco. En este sentido, Estevez et al. (2014) encontraron una baja adsorción del ibuprofeno en la mayoría de los suelos volcánicos estudiados, con constantes de adsorción similares en las dos relaciones suelo/solución de trabajo (1/1 y 1/5); sin embargo, reportaron una mayor intensidad de adsorción a una relación 1/5 en un suelo con un alto contenido de minerales (Al, Fe), lo cual atribuyeron a una mayor estabilidad de los agregados del suelo.

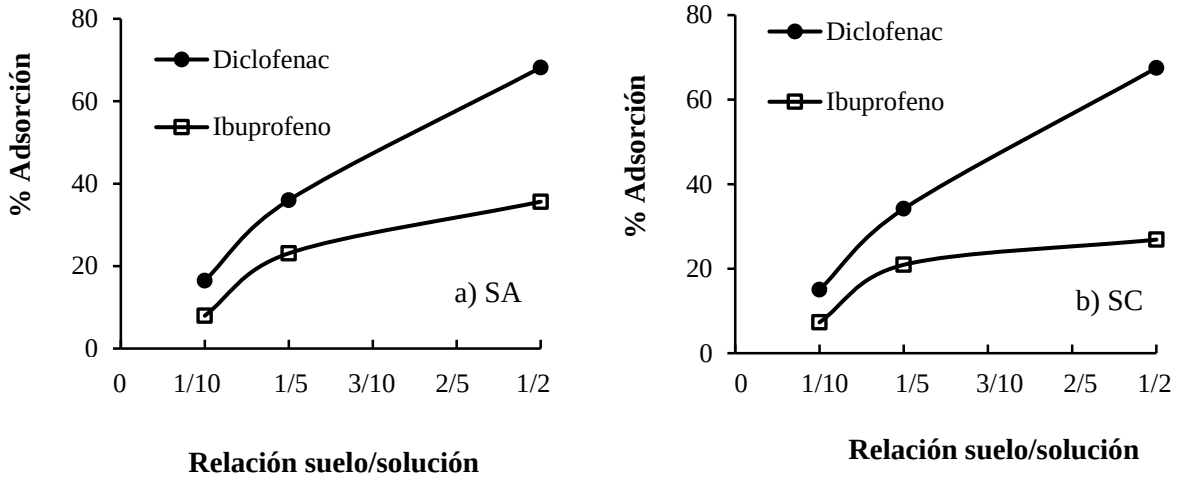


Figura 4.22 Capacidad de adsorción en los suelos SA y SC de los CF respecto a la relación suelo/solución.

El efecto de la proporción de suelo/solución en la intensidad de la adsorción está relacionado con los fenómenos de agregación-desagregación, que influyen en la cantidad de superficie disponible para llevar a cabo la adsorción y a su vez, en el contenido de carbono orgánico disuelto (COD) en la solución. El aumento en la cantidad de sitios de interacción en el suelo se traduce en un incremento de la adsorción, mientras que una mayor cantidad de COD en la solución favorece la solubilidad del compuesto (O´Connor & Connolly, 1980; Estevez et al., 2014). Los resultados obtenidos se consideran un balance entre estas dos fuerzas y depende de las características del adsorbente y el adsorbato.

La selección de las proporciones adecuadas entre el suelo y la solución depende del coeficiente de distribución (K_d) de cada fármaco y del grado de adsorción deseado. En este sentido, la U.S. EPA (2008), recomienda porcentajes de adsorción superiores al 20%, y preferiblemente > 50%, teniendo cuidado de mantener la concentración del compuesto en la fase acuosa lo suficientemente alta que permita su medición con precisión, sobretodo en el caso de altos porcentajes de adsorción. En función a ello, se seleccionó la relación 1/2 y un rango de concentraciones en solución acuosa para la elaboración de las isotermas de adsorción de 1-6 mg L^{-1} y 2-12 mg L^{-1}, para el ibuprofeno y el diclofenac, respectivamente.

4.5.3 Isotermas de adsorción

En las figuras 4.23 y 4.24 se presentan las isotermas de adsorción de los CF, donde se aprecia que el ibuprofeno presentó mayores discrepancias en su comportamiento de adsorción en los suelos SA y SC, en comparación con el diclofenac. Para ambos fármacos, la adsorción se ajustó al modelo de Freundlich con $R^2 > 0,96$ (Tabla 4.28), obteniéndose valores de *1/n* cercanos a 1, lo que indica una afinidad de adsorción lineal con el incremento de la concentración del compuesto en la fase acuosa. Esto fue corroborado con la aplicación del modelo lineal, obteniéndose valores de K_F y K_{Li} estadísticamente similares, con un mejor ajuste de los datos empleando con la isoterma de Freundlich, según los valores de R^2, ya que se minimizan la suma de los cuadrados de los residuos.

Tabla 4.28 Parámetros de adsorción derivados de los modelos de Freundlich y el lineal.

Tratamiento	**Isoterma de Freundlich**			**Isoterma lineal**	
	K_F ($mg^{1-1/n} L^{1/n} Kg^{-1}$)	*1/n*	R^2	K_{Li} ($L\ Kg^{-1}$)	R^2
ISA	1,14 [b]	1,02 [a]	0,978	1,16 [b]	0,907
ISC	0,70 [a]	1,00 [a]	0,964	0,68 [a]	0,900
DSA	4,14 [d]	1,01 [a]	0,985	4,09 [d]	0,906
DSC	3,88 [c]	0,99 [a]	0,991	3,77 [c]	0,906

Nota: K_{Li}: Constante de la isoterma lineal. Medias con superíndices distintos en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

El comportamiento lineal se presenta cuando la concentración del adsorbato es baja con respecto a la capacidad de adsorción del sólido, es decir, en condiciones de adsorción muy por debajo de la saturación (Doretto et al., 2014; Vithanage et al., 2014), tal como se realizó en la presenta investigación, donde se emplearon bajas concentraciones de los CF.

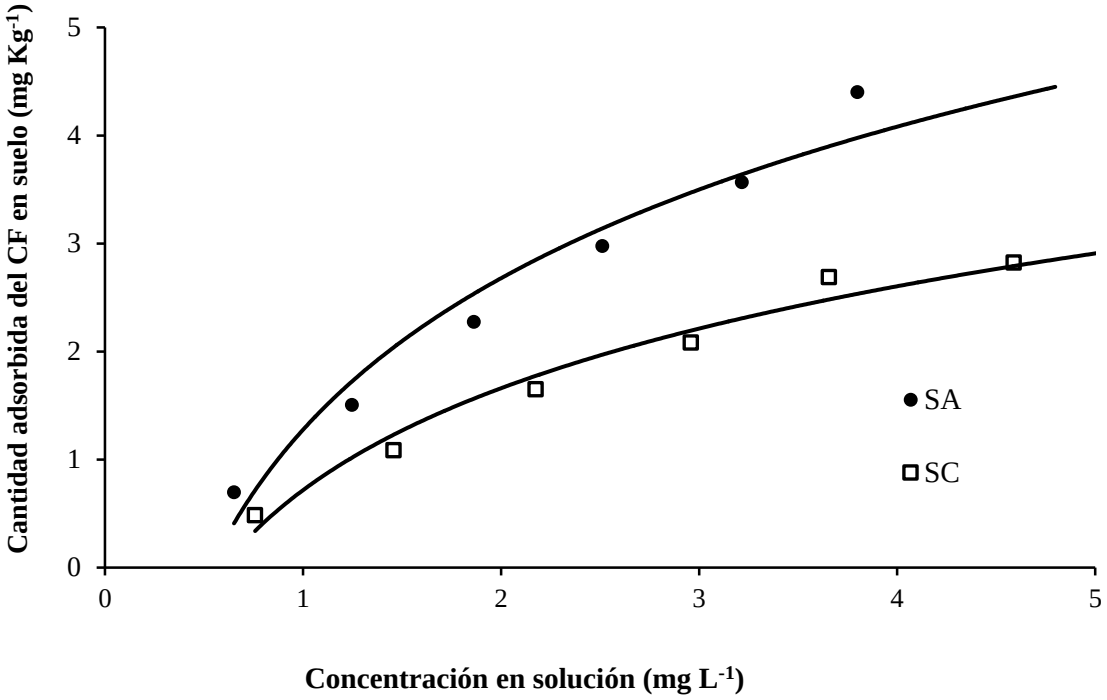


Figura 4.23 Isotermas de adsorción del ibuprofeno en los suelos.

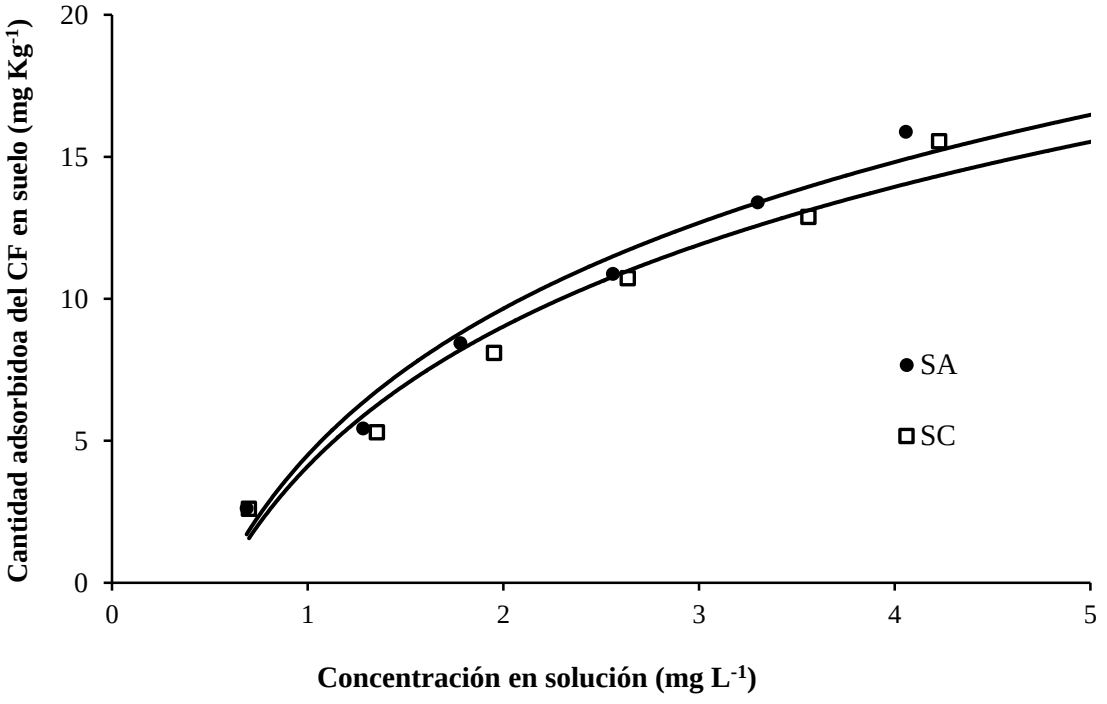


Figura 4.24 Isotermas de adsorción del diclofenac en los suelos.

Los estudios consultados describen el fenómeno de adsorción del ibuprofeno y el diclofenac en el suelo empleando el modelo de Freundlich, con valores de *1/n* muy variables. Xu et al (2009c) reportaron valores de *1/n* entre 1,03-1,51 para el ibuprofeno, y entre 0,74-1,10 para el diclofenac. Por su parte, Chefetz et al., 2008 trabajaron el proceso de adsorción del diclofenac alcanzando valores de *1/n* entre 0,89-0,92, mientras que Gonzáles-Naranjo et al. (2013) reportaron constantes de linealidad entre 0,93-1,08, para el caso del ibuprofeno. Existen diferencias importantes en las características de los suelos utilizados en estos trabajos; sin embargo, y al igual que la presente investigación, se encontró un comportamiento de adsorción casi lineal del ibuprofeno y el diclofenac, posiblemente debido a que los experimentos se realizaron en el mismo rango de concentraciones de los CF en la solución acuosa en contacto con el suelo (0,5 -10 mg L^{-1}).

Es importante resaltar que se obtuvieron coeficientes de determinación (R^2) muy bajos empleando el modelo de Langmuir (R^2 entre 0,019 y 0,127). Estudios llevados a cabo con otros CF han también demostrado que la adsorción lineal y la de Freundlich se adaptan mejor a los datos experimentales que la isoterma de Langmuir (Zhang et al., 2014; Thiele-Bruhn et al., 2004), la cual suele ajustarse a aquellos casos donde el adsorbente se satura con altas concentraciones del adsorbato (Hörsing et al., 2011) por lo que puede emplearse esta isoterma en sitios donde ocurra una descarga accidental de una alta concentración de estos compuesto (Estevez et al., 2014). González-Naranjo et al. (2013) también concluyeron que el modelo de Freundlich presentó un mejor ajuste para describir la adsorción del ibuprofeno en suelos, en comparación con el modelo de Langmuir.

El diclofenac exhibió porcentajes de adsorción y coeficientes de adsorción (K_d y K_{OC}) más altos con respecto al ibuprofeno (Tabla 4.29), lo cual es consistente con los mayores valores de K_F (Tabla 4.28). Por otra parte, el grado de partición de los dos CF fue mayor en el suelo SA, que tiene un contenido más bajo de materia orgánica y pH ácido. Las diferencias observadas entre los dos fármacos se explican en función a la mayor lipoficidad del diclofenac (log K_{OW} más alto, Tabla 2.1), que favorece la formación de interacciones no polares con la MO del suelo. El diclofenac presenta en su estructura dos anillos aromáticos que permiten un mayor número de interacciones π-π con las fracciones aromáticas de la

MO del suelo, tal como se ha reportado con otros compuestos farmacéuticos (Chefetz et al., 2008). En el caso del ibuprofeno, presenta un solo anillo aromático, lo que se traduce en un menor número de interacciones π-π con la MO del suelo, pero contiene además dos cadenas carbonadas que permiten la formación de interacciones tipo Van der Waals con las fracciones alquílicas de la MO del suelo, sin embrago, estas últimas se caracterizan por ser de menor intensidad.

Tabla 4.29 Coeficientes de adsorción del ibuprofeno y el diclofenac en los suelos.

Tratamiento	***A*** (%)	K_d (L Kg^{-1})	K_{OC} (L Kg^{-1})
ISA	37 [b]	1,16 [b]	87 [b]
ISC	26 [a]	0,70 [a]	28 [a]
DSA	68 [d]	4,17 [d]	313 [d]
DSC	66 [c]	3,85 [c]	152 [c]

Notas: *A*: Porcentaje de adsorción; K_d: coeficiente de distribución: K_{OC}: coeficiente de adsorción normalizado al COT del suelo. Los valores de A, K_d y K_{OC} corresponden al promedio obtenido de las seis concentraciones ensayadas. Medias con superíndices distintos en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Estudios internacionales confirman la mayor capacidad de adsorción en los suelos del diclofenac con respecto al ibuprofeno (Durán-Álvarez et al., 2014; González y Naranjo et al., 2013; Xu et al., 2009c; Chefetz et al., 2008; Drillia et al., 2005). En cuanto a los valores obtenidos en los coeficientes de adsorción, se aprecian similitudes en algunos casos y diferencias en otros, debido principalmente a las características de los suelos evaluados, así como de las condiciones de los ensayos realizados en cuanto a rango de concentración y relación suelo/solución.

En este sentido, Xu et al. (2009c) obtuvieron valores de K_d en el rango de 1,21-17,72 L Kg^{-1} para el diclofenac y de 0,56-3,71 L Kg^{-1} para el ibuprofeno y concluyeron que la adsorción de estos compuestos está principalmente gobernada por el contenido de MOS del suelo; sin embargo, en el presente trabajo no se encontró esta tendencia. El comportamiento

observado por estos investigadores se debe a que trabajaron con suelos con diferente contenido de MO pero con el mismo pH. La adsorción de ácidos orgánicos no puede ser sólo descrita por su partición en la fracción hidrofóbica de la MOS, ya que también pueden presentarse interacciones polares, las cuales son dependientes del pH del suelo (Monteiro & Boxall, 2010; Choedhury et al., 2008).

Según sus valores de pka y el pH de los suelos estudiados, el diclofenac y el ibuprofeno existen parcialmente en forma aniónica, cuya proporción se incrementa cuando aumenta el pH del suelo, según lo establecido por la ecuación de Henderson-Hasselbach. Estudios realizados por Tülp et al. (2009), demostraron que los aniones de compuestos orgánicos con características acídicas se adsorben menos fuertemente sobre la MO del suelo que sus respectivas formas neutras, debido principalmente a repulsiones electrónicas entre los compuestos cargados negativamente y las superficies de las partículas del suelo también cargadas negativamente. Debido a esto, se obtuvieron coeficientes de adsorción (K_F, K_d y K_{OC}) menores en el suelo SC (Tablas 4.28 y 4.29), a pesar de presentar un contenido más alto de MO y una mayor proporción de AH. A pH 5 (suelo SA), se promueve la protonación de los grupos carboxilatos (tanto de los fármacos como de los AH y AF), lo que facilita las interacciones intra e intermoleculares, formando una estructura más condensada que proporcionan mejores sitios de adsorción para compuestos hidrofóbicos (Maoz & Chefetz, 2010), pudiendo presentarse también interacciones con las fracciones cargadas positivamente (aminas protonadas) de la MO del suelo y la proporción de los ácidos disociados.

A pH 7 (suelo SC), la fracción ionizada de los CF aumenta (Monteiro & Boxall, 2010), sin embargo en el diclofenac pueden presentarse interacciones polares tipo puente de hidrógeno entre los grupos carboxilatos y fenólicos de los AH y AF y los hidrógenos del grupo amino del fármaco. Este último grupo funcional también puede actuar como como aceptor de protones (de grupos OH y/o COOH no disociados de la materia orgánica) a través del par de electrones localizado en el átomo de nitrógeno. Tales interacciones no están presentes a pH ácido, debido a la protonación del grupo amino, sin embargo, se favorecen las atracciones electrostáticas con las sustancias orgánicas ionizadas del suelo. Es

importante destacar que Klepsch et al. (2011) demostraron la formación de interacciones tipo puentes de hidrógeno de débil a moderada intensidad entre aminas aromáticas y la MO del suelo. La posibilidad de formación de algunos de estos tipos de interacciones, tanto a pH ácido como neutro, puede ser la razón por la cual, las diferencias observadas en la adsorción del diclofenac en los suelos SA y SC fueron menores en comparación con el ibuprofeno.

La adsorción de compuestos orgánicos ionizables alcanza un máximo a un valor de pH del suelo cercano al *pKa* del compuesto (Muler et al., 2006). Esta condición se cumple con el ibuprofeno en el suelo SA, razón por la cual se encontraron mayores diferencias en la adsorción de este fármaco entre los dos suelos. Es importante señalar que el ibuprofeno, no contiene otros grupos polares en su estructura que pudieran promover interacciones con las fracciones polares de las sustancias orgánicas del suelo.

En este sentido, Lin y Gan (2011) encontraron muy baja adsorción del ibuprofeno y diclofenac en suelos con bajo contenido de materia orgánica (0,5 %) y pH básico, donde predominan la forma ionizada de ambos fármacos, y concluyeron que la matriz inorgánica del suelo (entre 4 y 25 % de arcilla) no desempeñó un papel importante en la adsorción de estos compuestos, posiblemente debido a la carga negativa presente en las mismas. Martínez-Hernández et al. (2014) también reportaron la baja capacidad de adsorción de CF ionizables en forma aniónica sobre superficies inorgánicas, considerando la sorción en la materia orgánica del suelo como el proceso predominante.

En los estudios de adsorción llevados a cabo en esta investigación, a pesar de que el suelo SC presentó un mayor contenido de MO y una proporción de AH más alta en comparación con el suelo SA, que favorecería un mayor número de interacciones con los fármacos, se encontraron coeficientes de adsorción más bajos, debido a que el pH del suelo ejerce un efecto en la disociación de los distintos compuestos orgánicos presentes, tanto del suelo como los propios fármacos, que influyó en las diferentes interacciones que pueden ocurrir con la MO del suelo, y por ende, en la adsorción.

4.6 Evaluación del comportamiento ambiental de los CF en los suelos

Con los resultados de los estudios de degradación y adsorción se estimó el potencial de lixiviación del ibuprofeno y el diclofenac en los suelos usando la ecuación de Gustafson (1989) y el factor de reparto (F_R), cuyos resultados se presentan en la tabla 4.30. Según el índices de GUS, calculados con los valores de $t_{1/2}$ obtenidos del modelo lineal (el más utilizado en la literatura consultada), el diclofenac y el ibuprofeno presentan un potencial de lixiviación medio en los suelos SA y SC, lo que significa que bajo ciertas condiciones (lluvia o riego) los CF pueden moverse a través del perfil de estos suelos hasta llegar a las aguas subterráneas. Con respecto a los índices de GUS, empleando los valores de tiempos de vida media del modelo no lineal, se obtuvieron valores más bajos, ya que los DT_{50} estimados por este modelo fueron menores, resultando sólo el ibuprofeno con riesgo medio de lixiviación.

Tabla 4.30 Resultados obtenidos aplicación la ecuación de Gustafson y factor de reparto.

Tratamientos	**ÍNDICE DE GUS**		**Factor de reparto (F_R)**
	A partir de DT_{50} lineal	**A partir de DT_{50} no lineal**	
DSA	1,9 [a]	1,5 [a]	14,0 [d]
DSC	2,1 [b]	1,6 [b]	9,2 [c]
ISA	2,3 [c]	1,8 [c]	4,7 [b]
ISC	2,5 [d]	1,7 [bc]	2,5 [a]

Nota: Medias con superíndices distintos en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

En cuanto al factor de reparto, se mantienen las mismas tendencias obtenidas con la aplicación del índice de GUS, una mayor movilidad del ibuprofeno en comparación con el diclofenac, y la velocidad de migración de ambos compuestos es superior en el suelo SC con respecto al SA (Tabla 4.30), por lo que el riesgo de lixiviación sigue el siguiente orden: ISC > ISA > DSC > DSA. Esto se debe a la baja adsorción del ibuprofeno en los suelos

estudiados, ya que este compuesto presentó porcentajes de adsorción 46% y 61 % menores que el diclofenac en los suelos SA y SC, respectivamente (Tabla 4.29).

El potencial de lixiviación también puede evaluarse con los criterios de Cohen et al. (1984). En este sentido, ambos compuestos poseen predominantemente carga negativa al pH de los suelos y presentaron valores de K_{OC} menores de 300 L Kg, a excepción del diclofenac en el suelo SA (Tabla 4.29). De esta forma el ibuprofeno en ambos suelos y el diclofenac en el suelo SC presentan un potencial moderadamente alto de lixiviación. El diclofenac en el suelo SA por presentar mayores valores de K_{OC} y $t_{1/2}$ entre 14 y 21 d (modelo lineal), resultó con un potencial medio de lixiviación. Estos resultados son consistentes con el resultado aplicando el modelo GUS y el factor de reparto, donde el DSA arrojó el menor riesgo de lixiviación.

A fin de estudiar la relación existente entre los resultados de los ensayos de degradación y adsorción ($t_{1/2}$, Kd, GUS y F_R) y las características de los suelos (COT, GH, CAH/CE, pH) se evaluó la correlación lineal entre ellas. En las tablas 4.31 y 4.32 se muestran los resultados obtenidos para el ibuprofeno y el diclofenac, respectivamente. Como se aprecia existe una correlación alta entre el contenido de COT del suelo, la proporción de CAH extraído y el grado de humificación (GH) del mismo. También se encontró una correlación significativamente alta ($p< 0,01$) y positiva entre el COT y el pH del suelo. Estos resultados son cónsonos cuando se realiza la correlación con pocos suelos.

En general para el ibuprofeno y el diclofenac se encontraron el mismo tipo de correlaciones en los suelos estudiados. Los $t_{1/2}$ se correlacionaron negativamente con el contenido de COT y el pH del suelo, lo cual indica que estos fármacos exhibieron una velocidad de degradación superior, y por ende tiempos de vida media menores, en el suelo con los valores más altos de contenido de materia orgánica y pH. En cuanto al coeficiente de distribución K_d, se presentó también una relación negativa con estas variables, indicando una menor capacidad de adsorción del ibuprofeno y el diclofenac, a medida que aumenta el COT y el pH del suelo.

Tabla 4.31 Coeficientes de correlación de Pearson entre las características de los suelos y resultados de los ensayos de degradación (modelo lineal) y de adsorción para el ibuprofeno.

	COT	**CAH/CET**	**GH**	**pH**	**$t_{1/2}$**	**K_d**	**GUS**
COT	1						
CAH/CET	0,9850**	1					
GH	0,9084*	0,9382**	1				
pH	0,9998**	0,9868**	0,9166*	1			
$t_{1/2}$	-0,9959**	-0,9879**	-0,9239**	-0,9968**	1		
K_d	-0,9982**	-0,9834**	-0,9131*	-0,9987**	0,9963**	1	
GUS	0,9907**	0,9686**	0,8823*	0,9901**	-0,9792**	-0,9927**	1
F_R	-0,9989**	-0,9851**	-0,9104*	-0,9991**	0,9963**	0,9998**	-0,9930**

Tabla 4.32 Coeficientes de correlación de Pearson entre las características de los suelos y resultados de los ensayos de degradación (modelo lineal) y de adsorción para el diclofenac

	COT	**CAH/CET**	**GH**	**pH**	**$t_{1/2}$**	**K_d**	**GUS**
COT	1						
CAH/CET	0,9850**	1					
GH	0,9084*	0,9382**	1				
pH	0,9998**	0,9868**	0,9166*	1			
$t_{1/2}$	-0,9200**	-0,9159*	-0,7490	-0,9140*	1		
K_d	-0,9646**	-0,9304**	-0,8711*	-0,9653**	0,8876*	1	
GUS	0,9158*	0,8855*	0,8863*	0,9202**	-0,6906	-0,9793**	1
F_R	-0,9980**	-0,9818**	-0,9071*	-0,9982**	0,9006*	0,9771**	-0,9354**

Nota para ambas tablas: * indica que la correlación es significativa a un nivel de 0,05 y ** indica que la correlación es significativa a un nivel de 0,01.

El K_d se correlacionó negativamente con el índice de GUS y positivamente con el F_R, ya que cuando la adsorción de un compuesto en el suelo aumenta, el riesgo de lixiviación disminuye, originando un retardo en su velocidad de migración a través del perfil del suelo. Finalmente es importante destacar, que las correlaciones encontradas entre las distintas variables son en general más bajas empleando los valores de DT_{50} del modelo cinético no lineal (Tablas C.9 y C.10). Esto se debe a que las diferencias obtenidas en los valores de DT_{50} de cada fármaco en los suelos, fueron menores, lo cual originó que en algunos casos no se detectaran diferencias significativas al compararlos con las otras variables.

Según los resultados obtenidos, el suelo SC presenta un riesgo mayor de contaminación de las aguas subterráneas por diclofenac e ibuprofeno, principalmente debido a que este suelo, a pesar de tener un contenido más alto de MO, exhibió una menor capacidad de adsorber ambos compuestos, lo cual fue atribuido a la influencia del pH del suelo SC en la ionización de estos compuestos. Tal efecto, fue más evidente en el ibuprofeno con una disminución en el porcentaje de adsorción en el suelo SC del 30%, en comparación con un 3% en el caso del diclofenac; lo cual resultó en correlaciones más altas entre los valores del K_d y los índices de lixiviación para el caso del ibuprofeno. Por otra parte, ambos compuestos resultaron ser menos persistentes en el suelo SC, lo cual puede deberse al mayor contenido de materia orgánica presente en este suelo que favoreció una adecuada actividad microbiana, que se corresponde con los valores más altos de R_M y C_{BM} encontrados, con respecto al suelo SA (Figuras 4.13 y 4.14 y tablas 4.21 y 4.22).

Estos resultados permiten corroborar que los procesos de adsorción tienen una influencia importante en la lixiviación potencial de los fármacos, ya que el suelo SC a pesar de poseer una mayor capacidad de degradar ambos compuestos, presentó un riesgo más alto de contaminación de las aguas subterráneas (El coeficiente de correlación entre K_d y los índice de lixiviación, GUS y F_R, fueron más altos en comparación con los obtenidos entre estas últimas dos variables y el $t_{1/2}$). La tasa de transformación de un contaminante en el suelo depende directamente de la adsorción, ya que este proceso determina la concentración de un compuesto en la solución del suelo, siendo ésta una de las razones por las cuales el ibuprofeno presentó tiempos de vida media inferiores al diclofenac. Al presentar el

diclofenac una mayor adsorción en los suelos se redujo su biodisponibilidad, y dio lugar a una la tasa de degradación más lenta con respecto al ibuprofeno (correlación positiva entre K_d y $t_{1/2}$). Adicionalmente, hay que tomar en cuenta las características físicas y químicas del diclofenac (Tabla 2.1), principalmente su mayor peso molecular, valor más alto de Log K_{OW}, menor solubilidad, y la complejidad de su estructura química (con dos anillos aromáticos y dos átomos de cloro), las cuales le imparten resistencia a la biodegradación.

Tales características intrínsecas del ibuprofeno y el diclofenac, así como las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos, determinaron su capacidad de adsorción y su persistencia, y en función a ellas el riesgo de ser transportados hacia las aguas subterráneas. La aplicación de los criterios GUS y de Cohen et al. (1984), así como la determinación del F_R permiten alertar sobre el riesgo de lixiviación de estos compuestos en los suelos con las características evaluadas. Debido a ello, se requieren de estudios adicionales, como el transporte en columnas de suelo, parcelas experimentales y en campo, ya que otros procesos (como por ejemplo, la absorción por las raíces de las plantas), pueden alterar el comportamiento ambiental de del ibuprofeno y el diclofenac, además de la heterogeneidad propia del suelo y la posibilidad de flujos preferenciales. Es importante señalar la relevancia de haber realizado los ensayos a nivel de laboratorio, ya que permitieron la estimación de algunos parámetros de transporte ($t_{1/2}$, K_d, F_R), que no se habían evaluado antes en suelos venezolanos, y según los resultados obtenidos se puede continuar las investigaciones en aquellos compuestos que presentaron mayor riesgo de lixiviación en los suelos, particularmente el ibuprofeno.

CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos de linealidad, exactitud, precisión y selectividad indican que los métodos establecidos son adecuados para la cuantificación del ibuprofeno y el diclofenac en muestras de suelos y acuosas.

2. Según los resultados de respiración y carbono en la biomasa microbiana, el ibuprofeno fue asimilado más rápidamente por los microorganismos de los suelos en comparación con el diclofenac.

3. De acuerdo al análisis gráfico vectorial, los tratamientos con ibuprofeno y diclofenac estimularon la actividad microbiana de los suelos. Un aumento en la concentración de estos compuestos produjo una reducción de tal efecto, que en algunos casos cambió a una condición de estrés. Ninguna de las dos dosis ensayadas provocaron una inhibición de la respuesta microbiana.

4. La biodegradación es la vía dominante de transformación del ibuprofeno y el diclofenac en los suelos evaluados y fue descrita por una cinética de primer orden. El diclofenac exhibió, en ambos suelos, mayor resistencia a la degradación y el tiempo de vida media de los dos compuestos fue inferior en el suelo con un mayor contenido de materia orgánica y una actividad microbiana más alta (suelo bajo cultivo de cítricos).

5. El diclofenac presentó coeficientes de adsorción más altos que el ibuprofeno, en ambos suelos. Los dos compuestos exhibieron una mayor capacidad de adsorción en el suelo con pH ácido y menor contenido de materia orgánica (suelo bajo cultivo de algodón).

6. Según los índices de lixiviación evaluados, el ibuprofeno presentó mayor riesgo de movilidad en los suelos, en comparación con el diclofenac. La velocidad de migración de ambos compuestos fue superior en el suelo con el contenido más alto de materia orgánica y pH neutro, donde la adsorción de estos compuestos fue menor.

7. Los procesos de adsorción influyeron en mayor medida en el comportamiento ambiental del ibuprofeno y el diclofenac, ya que redujeron la biodisponibilidad y la movilidad de estos compuestos en los suelos.

RECOMENDACIONES

- Realizar un seguimiento de los productos de transformación del ibuprofeno y el diclofenac en los suelos, para comprender las distintas etapas involucradas en la degradación de estos compuestos.

- Evaluar los procesos de desorción del ibuprofeno y el diclofenac en los suelos a fin de verificar la reversibilidad de la adsorción.

- Estudiar la movilidad de los compuestos estudiados en columnas de suelos.

- Valorar el efecto de las aguas residuales como fuente de riego en los procesos de degradación y adsorción del ibuprofeno y diclofenac en los suelos.

- Extender estos estudios a compuestos farmacéuticos pertenecientes a otros grupos terapéuticos de alto consumo en Venezuela y con antecedentes de presencia en el ambiente en otros países.

REFERENCIAS

Aciego, J. C. (2007). *Curso teórico-práctico*: *Muestreo y pre-tratamiento del suelo para su análisis microbiológico*. (Trabajo no publicado). Laboratorio de Fertilidad y Biología de Suelos. Instituto de Edafología. Facultad de Agronomía. Maracay. Universidad Central de Venezuela.

Acosta, G., Palacios, D., Carvajal, L. (2013). Evaluación de la esterilización húmeda y la esterilización por microondas de dos tipos de suelos. *Ciencia e ingeniería*, *17*, 87-93.

Alcaldía de Valencia (2008). *Programa de gobierno socialista para la Alcaldía de Valencia 2009-2012.* Siete líneas estratégicas para el gobierno municipal socialista. Valencia: Autor.

Alef, K. & Nannipieri, P. (1995). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London, U.K.: Academic Press.

Allaire, S. E., Roulier, S., Cessna, A. J. (2009). Quantifying preferential flow in soils: A review of different techniques. *Journal of Hydrology*, *378*(1-2), 179-204.

Almeida, B., Kjeldal, H., Lolas, I., Knudsen, A. D., Carvalho, G., Nielsen, K.L., Barreto Crespo M.T., Stensballe A., Nielsen J. L. (2013). Quantitative proteomic analysis of ibuprofen-degrading *Patulibacter* sp. strain I11. *Biodegradation*, *24*(5), 615-630.

Al-Rajab, A. J., Sabourin, L., Lapen, D. R., Topp, E. (2010). The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac is readily biodegradable in agricultural soils. *Science of the Total Environment*, *409*(1), 78-82.

Amir, S., Hafidi, M., Bailly, J-R., Revel, J. C. (2003). Characterization of humic acids extracted from sewage sludge during composting and of their Sephadex® gel fractions. *Agronomie*, *23*, 269–275.

Anderson, D. W. & Schoenau J. J. (1993). Soil Humus fractions. En M. R. Carter (Ed), *Soil sampling and methods of analysis* (pp. 391-395). London: Canadian Society of Soil Science, Lewis Publishers.

Anderson, T-H. & Domsch, K. H. (1990). Application of eco-physiological quotients ($qC0_2$ and qD) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. *Soil Biology and Biochemistry, 22*(2), 251-255.

Anderson, T-H. & Domsch, K.H. (1993). The metabolic quotient for CO_2 (qCO_2) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology and Biochemistry, 25,* 393-395.

Aparicio, V., De Gerónimo, E., Hernández, K., Pérez, D., Portocarrero, R., Vidal, C. Compiladores. (2015). *Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el ambiente*. Balcarce, Buenos Aires: Ediciones INTA.

Araujo, D. y Araujo, Y. (2011). *Alternativas para el manejo de las aguas residuales municipales en la parroquia La Puerta, Municipio Valera, Estado Trujillo*. (Tesis de Ingeniería Agrícola). Universidad de Los Andes, Núcleo Universitario Rafael Rangel. Venezuela

Armado, A., Contreras, F., García, P. (2009). Fraccionamiento químico de carbono orgánico y su relación con la actividad microbiológica, biomasa microbiana y cantidad de ADN en suelos cacaoteros venezolanos. *Revista de la Sociedad Química del Perú, 75*(1), 44-52.

Arnold, W. A., & McNeill, K. (2007). Transformation of pharmaceuticals in the environment: Photolysis and other abiotic processes. En M. Petrović. & D. Barceló. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 50 (pp. 361-385). Poland: Elservier B. V.

Arrieche, I. y Mora, O. (2005). Efecto de la aplicación de residuos orgánicos sobre el cultivo del maíz en suelos degradados del Estado Yaracuy, Venezuela. *Bioagro, 17*(3), 155-159.

Asha, S. & Vidyavathi, M. (2009). Cunninghamella-a microbial model for drug metabolism studies-a review. *Biotechnology Advances, 27*(1), 16-29.

Avilés, F. M., Sánchez, Z. M., González, E. L., Aguilar, A. E. (2008). Validación de método analítico para diclofenaco en agua por cromatografía gases-líquido. *Setac*, 1-9.

Batlouni, M. (2010). Antiinflamatorios No Esteroides: Efectos Cardiovasculares, Cerebrovasculares y Renales. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 94*(4), 538-546.

Bejarano, P. (2006). Ibuprofeno y analgesia. *Revisión Concisa, 5,* 39-42.

Benotti, M. J., Trenholm, R. A., Vanderford, B .J., Holady, J. C., Stanford, B. D., Snyder, S.A. (2009). Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environmental Science & Technology, 43,* 597-603.

Besse, J. P., Barreto, K., Garric, J. (2008). Human pharmaceuticals in surface waters. Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. *Toxicology Letters, 176,* 104-123.

Bouwer, H., 2000. Groundwater problems caused by irrigation with sewage effluent. *Environmental Health, 10,* 17–20.

Brito, J. G. Caracteres de la materia orgánica de algunos suelos del estado Yaracuy (1976). *Agronomía Tropical, 26*(4), 337-351.

Caracciolo, A. B., Topp, E., Grenni, P. (2015). Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities. A Review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 106,* 25–36.

Carter, L. J., Harris, E., Williams, M., Ryan, J. J., Kookana, R. S., Boxall, A. B. A. (2014). Fate and uptake of pharmaceuticals in soil−plant systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62,* 816-825.

Carter, M. R. Ed. (1993). *Soil sampling and methods of analysis*. London: Canadian Society of Soil Science, Lewis Publishers.

Casanova, E. (2005). *Introducción a la ciencia del suelo*. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas: Colección Estudios.

CAVEME, Cámara Venezolana de Medicamentos (2010). Mercado farmacéutico venezolana. Cierre 2010. Disponible en: http://www.caveme.org/documentos/Estadisticas%202010.pdf [Consulta: Octubre, 2012].

CEPIS, Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (2004). *Avances del inventario regional de la situación de las aguas residuales domésticas en América Latina*. Sistemas integrados de tratamiento y uso de aguas residuales en América Latina: realidad y potencial. Lima, Perú: Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (POS/OMS).

Ceppi, S., Velasco, M., De Pauli, C. (1999). Differential scanning potentiometry: surface charge development and apparent dissociation constants of natural humic acids. *Talanta, 50*, 1057-1063.

Chefetz, B., Mualen, T., Ben-Ari, J. (2008). Sorption and mobility of pharmaceutical compounds in soil irrigated with reclaimed wastewater. *Chemosphere, 73*,1335-1343.

Chen, F., Ying, G. G., Kong, L. X., Wang, L., Zhao, J. L., Zhou, L. J., Zhang, L .J. (2011). Distribution and accumulation of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals in wastewater irrigated soils in Hebei, China. *Environmental Pollution, 159*, 1490-1498.

Chen, Y. & Rosazza, J. P. N. (1994). Microbial transformation of ibuprofen by a *Nocardia* species. *Applied and Environmental Microbiology, 60*(4), 1292-1296.

Chiérice V. (2011). *Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de fármacos em amostras de agua, superficial e tratada, utilizando a cromatografia de ultra performance acoplada a espectrometria de massas tandem (UPLC-MS/MS).* (Teses de mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Autarquia associada à Universidade de São Paulo.

Chowdhury, A., Pradhan, S., Saha, M., Sanyal, N. (2008). Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. Review. *Indian Journal of Microbiology, 48*, 114–127.

Ciavatta, C. M., Govi, L., Antisari, V., Sequi, P. (1990). Characterization of humified compounds by extraction and fractionation on solid polyvinylpyrrolidone. *Journal of Chromatography A, 509,* 141-146.

Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters, 142,* 185-194.

Cohen, S. Z., Creeger, S. M., Carsel, R. F., Enfield, C. G. (1984). Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses. En R. F., Krueger & J. N., Seiber (Eds), *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes* (pp. 297 – 325). Washington, DC: American Chemical Society.

Conaghan, P. (2012). A turbulent decade for NSAIDs: update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy, and toxicity. *Rheumatology International, 32,* 1491-1502.

Correia, A. y Marcano, L. (2015). Presencia y eliminación de compuestos farmacéuticos en plantas de tratamientos de aguas residuales. Revisión a nivel mundial y perspectiva nacional. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental, 55*(1), 1-18.

Correia, A. y Marcano, L. (2016a). Evaluación de las rutas de entrada de compuestos farmacéuticos de uso doméstico al ambiente. Caso estudio: Municipio Valencia, Estado Carabobo, Venezuela. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 32*(1), 77-86.

Correia, A. y Marcano, L. (2016b). Presencia y remoción de analgésicos antiinflamatorios no esteroideos en una planta de tratamiento de aguas residuales en Venezuela. *Revista Ingeniería y Sociedad UC, 11*(1), 8-21.

Coyne, M. (2000). *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Madrid: Editorial Paraninfo.

Cui, H., Wang, S-P., Fu, J., Zhou, Z-Q., Zhang, N., Guo, L. (2014). Influence of ciprofloxacin on microbial community structure and function in soils. *Biology and Fertility of Soils, 50,* 939-947.

Cycoń, M., Borymski, S., Żołnierczyk, B., Piotrowska-Seget, Z. (2016). Variable effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS) on selected biochemical processes mediated by soil microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, *7,* 1-19.

Dagnino, J. y González, A. (1994). Analgésicos narcóticos. *Boletín de la escuela de medicina, 23*(3), 159-163.

De Lange, H. J., Noordoven, W., Murk, A. J., Lürling, M., Peeters, E. T. H. M. (2006). Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology, 78*, 209-216.

Decreto Nº 883 (1995). *Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos*. Gaceta Oficial Extraordinaria de la República de Venezuela Nº 5021 de fecha 18 de diciembre de 1995.

Domaradzka, D., Guzik, U., Wojcieszyńska, D. (2015). Biodegradation and biotransformation of polycyclic non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 14*, 229-239.

Dong, M. W. (2006). Modern HPLC for practicing scientists. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Doretto, K. M., Maneiro, L., Rath, S. (2014). Sorption and desorption of sulfadimethoxine, sulfaquinoxaline and sulfamethazine antimicrobials in Brazilian soils. *Science of the Total Environment, 476–477*, 406–414.

Drillia, P., Stamatelatou, K., Lyberatos, G. (2005). Fate and mobility of pharmaceuticals in solid matrices. *Chemosphere, 60*(8), 1034-1044.

Durán–Álvarez, J. C., Prado, B., Ferroud, A., Juayerk, N., Jiménez-Cisneros, B. (2014). Sorption, desorption and displacement of ibuprofen, estrone, and 17β-estradiol in wastewater irrigated and rainfed agricultural soils. *Science of the Total Environment, 473–474*, 189–198.

Elvers, K. T. & Wright, S. J. (1995). Antibacterial activity of the anti-inflammatory compound ibuprofen. *Letters in Applied Microbiology, 20*, 82-84.

EMEA, European Medicines Agency (2006). *Guideline on the environmental risk of medicinal product for human*. Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/4447/00. Disponible en http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500003978.pdf [Consulta: Septiembre, 2015].

Estevez, E., Hernandez-Moreno, J. M., Fernandez-Vera, J. R., Palacios-Diaz, M. P. (2014). Ibuprofen adsorption in four agricultural volcanic soils. *Science of the Total Environment*, *468–469*, 406–414.

FDA, Food and Drug Administration (1998). *Guidance for Industry Environmental Assessment of Human Drug and Biologics Applications.* U.S. Department of Health and Human Services (US DHHS), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Disponible en: http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070561.pdf [Consulta: Enero, 2015].

Fent, K., Weston, A., Caminada, D. (2006). Review: Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, *76*, 122–159.

Fernandes, S. A. P., Wagner Bettiol, W., Cerri, C. C. (2005). Effect of sewage sludge on microbial biomass, basal respiration, metabolic quotient and soil enzymatic activity. *Applied Soil Ecology*, *30*, 65–77.

Fernández, C., González-Doncel, M., Pro, J., Carbonell, G., Tarazona, J. V. (2010). Occurrence of pharmaceutically active compounds in surface waters of the henares-jarama-tajo river system (Madrid, Spain) and a potential risk characterization. *Science of the Total Environment*, *408*, 543–551.

Flippin, J.L., Huggett, D., Foran, C. M. (2007). Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquatic Toxicology*, *81*(1), 73-78.

Florentino, A. (1998). *Guía para la evaluación de la degradación del suelo y de la sostenibilidad del uso de la tierra: Selección de indicadores físicos. Valores críticos*. (Trabajo no publicado). Instituto de Edafología. Facultad de Agronomía. Maracay. Universidad Central de Venezuela.

FOCUS, **FO**rum for the **C**o-ordination of pesticide fate models and their **US**e (2006). *Guidance document on estimating persistence and degradation kinetics from environmental fate studies on pesticides in EU registration*. Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics. EC Document Reference Sanco/10058/2005

version 2.0. Disponible en: http://esdac.jrc.ec.europa.eu/public_path/projects_data/focus/dk/docs/finalreportFOCDegKinetics.pdf [Consulta: Marzo, 2017].

Galantini, J. A. (2002). Contenido y calidad de las fracciones orgánicas del suelo bajo rotaciones con trigo en la región semiárida pampeana. *RIA, 30*(1), 125–146.

García, C., Gil, F., Hernández, T., Trasar, C. (2003). *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelo: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. Madrid: Mundi-Prensa Lithos S.S.

Gee, G.W. & Bauder, J.W. (1986) Particle-size analysis. En: A. Klute (Ed), *Methods of soil analysis, Part 1. Physical and mineralogical methods* (pp. 383-411). Agronomy Monograph 9.2. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy/Soil Science Society of America.

Gielen, G., Clinton, P., Van Den Heuvel, M., Kimberley, M., Greenfieldk, L. (2011). Influence of sewage and pharmaceuticals on soil microbial function. *Environmental Toxicology and Chemistry, 30*(5), 1086–1095.

Girardi, C., Nowak, K. M., Carranza-Diaz, O., Lewkow, B., Miltner, A., Gehre, M., Schäffer, A., Kästner, M. (2013). Microbial degradation of the pharmaceutical ibuprofen and the herbicide 2,4-D in water and soil - use and limits of data obtained from aqueous systems for predicting their fate in soil. *Science of the Total Environment, 444*, 32-42.

Glassmeyer, S. T., Hinchey, E. K., Boehme, S. E., Daughton, C .G., Ruhoy, I. S., Conerly, O., Daniels, R. L., Lauer, L., McCarthy, M., Nettesheim, T. G., Sykes, K., Thompson, V. G. (2009). Disposal practices for unwanted residential medications in the United States. *Environment International, 35*(3), 566-72.

Godley, A. R. (2004). Factors affecting the soil microbial quality measurements of biomass quotient and respiration quotient. *The Journal, 18*(2), 73-79.

Gómez, M. J., Martinez, M. J., Lacorte, S., Fernández-Alba, A. R, Agüera, A. (2007). Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere, 66,* 993-1002.

Gómez-Jorrin, L. A., Morales-Valdes, A., Dueñas-Vega, G., Dantin-Martínez, J. M., Chávez-González, N., Torres-Leblanch, M. (2012). Contenido de carbono y nitrógeno de la biomasa microbiana en suelos de la Habana. *Agronomía Mesoamericana, 23*(1), 179-187.

González-Naranjo, V., Boltes, K., Biel, M. (2013). Mobility of ibuprofen, a persistent active drug, in soils irrigated with reclaimed water. *Plant, Soil and Environment, 59*(2), 68-73.

Grace, C., Hart, M., Brookes, P. C. (2006). *Laboratory manual of the soil microbial biomass group*. (Compilers). London: Rothamsted Research.

Gröning, J., Held, C., Garten, C., Claussnitzer, U., Kaschabek, S. R., Schlömann, M. (2007). Transformation of diclofenac by the indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate. *Chemosphere, 69*(4), 509-516.

Gros, M., Petrovic, M., Barcelo, D. (2009). Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching. *Analytical Chemistry, 281,* 898–912.

Grossberger, A., Hadar, Y., Borch, T., Chefetz, B. (2014). Biodegradability of pharmaceutical compounds in agricultural soils irrigated with treated wastewater. *Environmental Pollution, 185,* 168-177.

Guerrero-Ortiz, P. L., Quintero-Lizaola, R., Espinoza-Hernández, V., Benedicto-Valdés, G. S., Sánchez-Colín, M. J. (2012). Respiración de CO_2 como indicador de la actividad microbiana en abonos orgánicos de Lupinus. *Terra Latinoamericana, 30,* 355-362.

Guevara, E. y Álvarez, P. (2003). *Biorremediación y atenuación natural de acuíferos contaminados con sustancias químicas peligrosas*. Valencia, Venezuela: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo.

Gustafson, D. & Holden, L. R. (1990). Nonlinear pesticide dissipation in soil: a new model based on spatial variability. *Environmental Science & Technology, 24*, 1032-1038.

Gustafson, D.I. 1989. Groundwater ubiquity score: A simple method for assessing pesticide leachability. *Environmental Toxicology and Chemistry, 8*, 339-357.

Gutiérrez, H. y De La Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. (Segunda edición). México, D. F.: McGraw-Hill/Interamericana Editores, S. A.

Guzik, U., Hupert-Kourek, K., Wojcieszyńska, D. (2014). Microbial degradation non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Postepy Mikrobiologii*, *53*(1), 61–69.

Han, G. H., Hur, H. G., Kim, S. D. (2006). Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry, 25*(1), 265-271.

Han, S., Choia, K., Kima, J., Ji, K., Kima, S., Ahnb, B., Yunc, J., Choic, K., Khimd, J. S., Zhange, X., John, P., Giesye, J. P. (2010). Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquatic Toxicology, 98*, 256–264.

Harris, D. C. (2010). *Quantitative chemical analysis* (Eighth edition). New York: W. H. Freeman and Company.

Hata, T., Kawai, S., Okamura, H., Nishida, T. (2010). Removal of diclofenac and mefenamic acid by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 and identification of their metabolites after fungal transformation. *Biodegradation, 21*, 681–689.

Hayes, M. H. B. & Clapp, C. E. (2001). Humic substances: considerations of compositions, aspects of structure, and environmental influences. *Soil Science, 166*, 723 – 737.

Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters, 131*, 5–17.

Heckamann, L. H., Callaghan, A., Hooper, H.L., Connon, R., Hutchinson, T.H., Maund S.J., Sibly R.M. (2007). Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: effects on life history traits and population dynamics. *Toxicology Letters, 172*, 137–145.

Hendershot, W. H., Lalande, H, Duquette, M. (1993). Ion exchange and exchangeable cations. En M. R. Carter (Ed), *Soil sampling and methods of analysis* (pp. 173-175). London: Canadian Society of Soil Science, Lewis Publishers.

Hernández, J. M. (2005). Cromatografía líquida de alta eficiencia. *Educación continuada en el laboratorio clínico, 8*, 44-62.

Hidrocentro, Hidrológica del Centro C.A. (2012). *Logros en cuanto a la recolección de aguas servidas a la población. Ministerio del Poder Popular para el Ambiente***.** Disponible en: http://www.hidrocentro.gob.ve/hc/sispro/proyectos/logros/ [Consulta: Julio, 2014].

Hörsing, M., Ledin, A., Grabic, R., Fick, J., Tysklind, M., Jansen, J.l.C., Andersen. H. R. (2011). Determination of sorption of seventy-five pharmaceuticals in sewage sludge. *Water Research, 45*, 4470-4482.

Hughes, S., Kay, P., Brown, L. (2012). Critical review: Global synthesis and critical evaluation of pharmaceutical data sets collected from river systems. *Environmental Science & Technology, 47,* 661−677.

ICH, International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (2005). *Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1)*. USA: ICH harmonized tripartite guideline.

IUPAC (1995), *Nomenclatura para la cromatografía*. División de Química Analítica. Comisión para Cromatografía y otras Separaciones Analíticas, Comisión para Nomenclatura Analítica. Madrid, España: FARESO, S.A.

Jana, K., Adhikari, l., Moitra, S. K., Behera, A. (2011). Analysis of multicomponent drug formulations (diclofenac and paracetamol). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 4*(2), 41-43.

Jelic, A., Gros, M., Ginebreda, A., Cespedes-Sánchez, R., Ventura, F., Petrovic, M., Barcelo, D. (2012). Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water Research, 45*(3), 1165-1176.

Jenkinson, D., Brookes, P., Powlson, D. (2004). Measuring soil microbial biomass. *Soil Biology & Biochemistry, 36*, 5–7.

Jjembra, P. (2006). Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care product in the environmental. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *63*, 113-130.

Jjembra, P. (2008). *Pharma-ecology. The occurrence and fate of pharmaceuticals and personal care product in the environment*. USA: Wiley & Sons.

Karnjanapiboonwong, A., Suski, J. G., Shah, A. A., Cai, Q., Morse, A. N., Anderson, T. A. (2011). Occurrence of PPCPs at a wastewater treatment plant and in soil and groundwater at a land application site. *Water, Air and Soil Pollution, 216*, 257-273.

Kazusaki, M., Ueda, S., Takeuchi, N., Ohgami, Y. (2012). Validation of analytical procedures by high-performance liquid chromatography for pharmaceutical analysis. Review. *Chromatography*, *33*(2), 65-73.

Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, J., He, J., He, S., H. Shoemaker, B. A., Wang, J., Yu, B., Zang, J., Bryant, S. (2016). PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Research, 44*, D1202–D1213.

Kinney, C., Furlong, E., Zaugg, S., Burkhardt, M., Werner, S., Cahill, J., Jorgensen, G. (2006). Survey of organic wastewater contaminants in biosolids destined for land application. *Environmental Science & Technology, 40*, 7207-7215

Klepsch, S., Aquino, A. J., Haas, U., Tunega, D., Haberhauer, G., Gerzabek, M.H., Lischka, H. (2011). Sorption of selected aromatic substances- Application of kinetic concepts and quantum mechanical modeling. *Water, Air and Soil Pollution, 215*, 449-464.

Knoepp, J. D., Colemana, D. C., Crossley, Jr. D. A., Clark, J. S. (2000). Biological indices of soil quality: an ecosystem case study of their use. *Forest Ecology and Management, 138*, 357-368.

Kodešová, R., Grabic, R., Kočárek, M., Klement, A., Golovko, O., Fér, M., Nikodema, A., Jakšík, O. (2015). Pharmaceuticals' sorptions relative to properties of thirteen different soils. *Science of the Total Environment, 511*, 435-443.

Kummerer, K. (2009). The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use. Present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management, 90,* 2354-2366.

La Grega, M., Buckingham, P., Evans, J. (1996). *Gestión de residuos tóxicos: Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos.* Madrid: McGraw-Hill.

Lacey, C., McMahon, G., Bones, J., Morrissey, A., Tobin, J. M. (2008). An LC-MS method for the determination of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plant influent and effluent samples. *Talanta, 75,* 1089-1097.

Lee, H. B., Peart, T.E., Svoboda, M.L. (2005). Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, 1094,* 122-129.

Lee, Y. B., Lorenz, N., Dick, L. K., Dick, R. P. (2007). Cold storage and pretreatment incubation effects on soil microbial properties. *Soil Science Society of America Journal, 71,* 1299-1305.

Ley de Medicamentos (2000). Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 37.006 de fecha 03 de agosto de 2000.

Li, W. C. (2014). Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. Review. *Environmental Pollution, 187,* 193-201.

Lin, K. & Gan, J. (2011). Sorption and degradation of wastewater-associated non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics in soils. *Chemosphere, 83,* 240-246.

Lugo, M. y Fernández-Badillo, A. (1994). Cambios en composición y diversidad de la entomofauna del río Güey, Parque Nacional Henry Pittier, Estado Aragua, Venezuela. *Boletín de Entomología Venezolana, 9*(1), 25-32.

Madridejos, R. (2012). AINE y riesgo cardiovascular. *Atención Primaria*, *44*(1), 3-4.

Maoz, A. & Chefetz, B. (2010). Sorption of the pharmaceuticals carbamazepine and naproxen to dissolved organic matter: Role of structural fractions. *Water Research, 44,* 981-989.

Marcano, P. (2016, 08 de febrero). Consumo de medicamentos cayó 35% en 2015. La Razón. Disponible en: http://www.larazon.net/2016/02/08/consumo-de-medicamentos-cayo-35-en-2015/ [Consulta, Julio, 2016].

Marchlewicz, A., Domaradzka, D., Guzik, U., Wojcieszyńska, D. (2016). *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) is a gram-positive bacteria able to degrade naproxen and ibuprofen. *Water, Air and Soil Pollution, 227*, 197.

Marchlewicz, A., Guzik, U., Wojcieszyńska, D. (2015). Over-the-counter monocyclic non-steroidal anti-inflammatory drugs in environment—sources, risks, biodegradation. *Water, Air and Soil Pollution, 226*, 355, 1-13.

Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Cruz-Morató, C., Caminal, G., Vicent, T. (2010). Degradation of the drug sodium diclofenac by Trametes versicolor pellets and identification of some intermediates by NMR. *Journal of Hazardous Materials, 176*(1-3), 836-842.

Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T., Caminal, G. (2009). Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by Trametes versicolor. *Chemosphere*, *74*(6), 765-772.

Martínez, D. A. (2008). *Aplicación de lodos residuales provenientes de planta de tratamiento de aguas servidas como acondicionador de suelo con fines agrícolas.* (Tesis de maestría). Universidad del Zulia. Venezuela.

Martínez-Carballo, E., González-Barreiro, C., Scharf, S., Oliver Gans, O. (2007). Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution*, *148*, 570-579.

Martínez-Hernández, V., Meffe, R., Herrera, S., Arranz, E., De Bustamante, I. (2014). Sorption/desorption of non-hydrophobic and ionisable pharmaceutical and personal care products from reclaimed water onto/from a natural sediment. *Science of the Total Environment, 472*, 273–281.

Masoner, J. R., Kolpin, D. W. Furlong, E. T. Cozzarelli, I. M., Gray, J. L., Schwab, E. A. (2014). Contaminants of emerging concern in fresh leachate from landfills in the

conterminous United States. *Environmental Science: Processes & Impacts 16,* 2335-2354.

Masoner, J. R., Kolpin, D.W. Furlong, E.T. Cozzarelli, I. M., Gray, J. L., Schwab, E. A. (2016). Landfill leachate as a mirror of today´s disposable society: Pharmaceuticals and other contaminants of emerging concern in final leachate from landfill in the conterminous United States. *Environmental Toxicology and Chemistry, 35*(4), 906–918.

Medizzine, (2015). Portal hispano de medicina, medicamentos y plantas medicinales. Disponible en: http://www.medizzine.com/ [Consulta: Diciembre, 2015].

Miège, C., Choubert, J.M., Ribeiro, L., Eusèbe, M., Coquery, M. (2009). Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants - Conception of a database and first results. *Environmental Pollution, 157,* 1721-1726.

Mogollón, J. P. y Martínez, A. (2009). Variación de la actividad biológica del suelo en un transecto altitudinal de la sierra de San Luís, Estado Falcón. *Agronomía Tropical*, *59*(4), 469-479.

Montagner, C. & Jardim, W. (2011). Spatial and Seasonal Variations of Pharmaceuticals and Endocrine Disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). *Journal of the Brazilian Chemical Society, 22*(8), 1452-1462.

Monteiro, S. C. & Boxall, A. B. A. (2009). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Factors affecting the degradation of pharmaceuticals in agricultural soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *28*(12), 2546-2554.

Monteiro, S. C., & Boxall, A. B. A. (2010). Occurrence and fate of human pharmaceuticals in the environment. En D. M. Whitacre (Ed.), *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 202 (pp. 53-154). New York: Springer.

Muller, K., Magesan, G. N., Bolan, N. S. (2006). A critical review of the influence of effluent irrigation on the fate of pesticides in soil. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *120* (2-4), 93-116.

Murdoch, R. W. & Hay, A. G. (2005). Formation of catechols via removal of acid side chains from ibuprofen and related aromatic acids. *Applied and Environmental Microbiology, 71*(10), 6121-6125.

Murdoch, R. W. & Hay, A. G. (2015). The biotransformation of ibuprofen to trihydroxyibuprofen in activated sludge and by Variovorax Ibu-1. *Biodegradation*, 26(2), 105-113

Nakada, N., Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K. Takada, H. (2006). Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Research, 40,* 3297–3303.

Nimer, M. (2007). Estudio del comportamiento ambiental del sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS) en una parcela agrícola de la Vega de Granada. (Tesis doctoral). Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica. 507 p. Disponible en https://hera.ugr.es/tesisugr/16684163.pdf [Consulta: Enero 2016].

Nortes, R. (2014). *Estudio del metabolismo del ibuprofeno en orina humana mediante HPLC-MS de alta resolución.* (Tesis de pregrado). Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén. España. Disponible en: http://tauja.ujaen.es/handle/10953.1/553 [Consulta: Abril, 2016].

Núñez, Y. 2007. *Relación suelo-paisaje en un sector de la cuenca alta del río Güey, correspondiente a la formación geológica Las Brisas*. (Trabajo de grado). Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.

O´Connor, D. J. & Connolly, J. P. (1980). The effect of concentration of adsorbing solids on the partition coefficient. *Water Research, 14*, 1517-1523.

Oaks, J. L., Gilbert, M., Virani, M. Z., Watson, R. T., Meteyer, C. U., Rideout, B. A., Shivaprasad, H. L., Ahmed, S., Chaudhry, M. J. I., Arshad, M., Mahmood, S., Ali, A., Khan, A. A. (2004). Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature, 427*(6975), 630–633.

Odum, E. P. (1985). Trends Expected in Stressed Ecosystems. *BioScience, 35*(7), 419-422.

OECD, Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (2000). *Guideline for testing of chemical. Adsorption - Desorption Using a Batch Equilibrium Method.* Disponible en: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-106-adsorption-desorption-using-a-batch-equilibrium-method_9789264069602-en [Consulta: Septiembre, 2016].

OECD, Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (2002). *Guidelines for the testing of chemicals. Aerobic and anaerobic transformation in soil.* OECD Guideline 307. Disponible en: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-307-aerobic-and-anaerobic-transformation-in-soil_9789264070509-en [Consulta, Julio, 2016].

Olsen, S. R. & Sommers, L. E. (1982). Phosphorus. En A. L. Page (Ed), *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties.* Agronomy Monograph 9.2. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy/Soil Science Society of America.

Oppel, J., Broll, G., Loffler, D., Meller, M., Rombk, J., Ternes, T. (2004). Leaching behavior of pharmaceuticals in soil-testing-systems: a part of an environmental risk assessment for groundwater protection. *Science of the Total Environment, 328,* 265-273.

Ortega, N. y Navas, T. (2015). Automedicación y prescripción de analgésicos en pacientes con enfermedad cardiovascular. *Academia Biomédica Digital, 61,* 1-9.

Pascuzzo-Lima, C. (2008). *Farmacología básica.* Editorial Carmine Pascuzzo-Lima.

Perucci, P., Dumontet, S., Bufo, S. A. Mazzatura, A., Casucci, C. (2000). Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass. *Biology and Fertility of Soils, 32,* 17-23.

Pla, I. (1977). *Metodología para la caracterización física con fines de diagnóstico de manejo y conservación de suelos en condiciones tropicales.* Curso de postgrado en Ciencias del Suelo. Universidad Central de Venezuela. Maracay: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.

Polo, M. y Guevara, E. (2001). Contaminación de acuíferos por efecto de los lixiviados en el área adyacente al vertedero de desechos sólidos La Guásima, Municipio Libertador, Estado Carabobo. *Ingeniería UC, 8*, 1-11.

Porta, J., López-Acevedo, M., Roquero, C. (1999). *Edafología para la agricultura y el medio ambiente.* (Segunda edición). Barcelona: Ediciones Mundi-Prensa.

Programa Microsoft Excel (2013). *Función Solver.* Microsoft Office.

Quintana, J. B., Weiss, S., Reemtsma, T. (2005). Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Research, 39*(12), 2654-2664.

Raymond, N. (2001). *Geoenvironmental Engineering. Contaminated soils, pollutants fate and migration.* Boca Raton: CRC Press.

Reddy-Battu, P. & Reddy, M. S. (2009). RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Paracetamol and Ibuprofen in Tablets. *Asian Journal of Research in Chemistry, 2*(1), 70-72.

Reina, V. (2011). *Caracterización química inorgánica y orgánica de los lixiviados del relleno sanitario "La Bonanza"*. (Trabajo especial de grado). Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Universidad Central de Venezuela.

RESQUIMC, Registro Nacional Único de Operadores de Sustancias Químicas Controladas (2015). Ministerio del Poder popular para Economía y Finanza. Disponible en: http://resquimc.gob.ve/index.php/sustancias-controladas [Consulta: mayo, 2015).

Reynolds, W. D. (1993). Saturated hydraulic conductivity: laboratory measurement. En M. R. Carter (Ed), *Soil sampling and methods of analysis* (pp. 589-593). London: Canadian Society of Soil Science, Lewis Publishers.

Richter, O., Kullmer, C., Kreuzig, R. (2007). Metabolic fate modeling of selected human pharmaceuticals in soils. *Clean*, *35*(5), 495 -503.

Rivero, C. (1999). La materia orgánica estable del suelo y su caracterización. *Venesuelos*, 9(1-2), 5-15.

Roberts, P.H. & Thomas, K.V. (2006). The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of the Total Environment, 356,* 143–153.

Rodarte-Morales, A. I., Feijoo, G., Moreira, M. T., Lema, M. J., Lema, J. M., Morales García, A. I. (2011). Degradation of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by white-rot fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27*, 1839-1846.

Ruiz, M. y Paolini, J. (2004). El cultivo y el agua de riego sobre el carbono de la biomasa microbiana. *Agronomía Tropical*, *54*(2), 161-178.

Ruiz, M. y Paolini, J. (2005). Parámetros de humificación en suelos cultivados bajo riego. *Agrochimica*, *49*(1-2), 79-86.

Samios, S., Lekkas, T., Nikolaou, A., Golfinopoulos, S. (2007). Structural investigations of aquatic humic substances from different watersheds. *Desalination, 210,* 125–137.

Sánchez, B., Ruiz, M., Ríos, M. (2005). Materia orgánica y actividad biológica del suelo en relación con la altitud, en la cuenca del río Maracay, estado Aragua. *Agronomía Tropical,* 55(4), 507-534.

Santos, H. M. L. M., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue, C., Montenegro, M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials, 175,* 45-95.

Santos, J. L., Aparicio, I., Alonso, E., Callejón, M. (2005). Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors. *Analytica Chimica Acta, 550,* 116–122.

Satterfield, C. (1996). *Heterogeneous catalysis in industrial practice*. (Second edition). Malabar: Krieger Publishing Company.

Scheytt, T.J., Mersmann, P., Heberer, T., 2006. Mobility of pharmaceuticals carbamazepine, diclofenac, ibuprofen, and propyphenazone in miscible displacement experiments. *Journal of Contaminant Hydrology, 83,* 53-69.

Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., Negele, R. D. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology, 68,* 141–150.

Skoog, D., Holler, F., Crouch, S. (2008). *Principios de análisis instrumental*. Ciudad de México: Editorial Cengage Learning.

Sparling, G. P. (1992). Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Australian Journal of Soil Research, 30,* 195-207.

Spongberg, A. L. & Witter, J. D. (2008). Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio. *Science of the Total Environment, 397,* 148-157.

Srinivasan, P., Sarmah, A. K., Manley-Harris, M. (2014). Sorption of selected veterinary antibiotics onto dairy farming soils of contrasting nature. *Science of the Total Environment, 472,* 695-703

Statgraphics® Centurion XVI (2010). *Manual de usuario*. USA: StatPoint Technologies, Inc.

Strauch, K. A. (2011). Invisible Pollution.The Impact of Pharmaceuticals in the Water Supply. *AAOHN Journal, 59*(12), 525-532.

Stumpf, M., Ternes, T., Wilken, R. D., Rodrigues, S. V., Baumann, W. (1999). Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *The Science of the Total Environment, 25*(1-2), 135-141.

Suárez, S., Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M. (2008). How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 7,* 125-138.

Sucre, D. (2003). *Delimitación de áreas ecogeográficas del estado Aragua*. Fundación para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología en el Estado Aragua. Maracay: Fundacite Aragua.

Sui, Q., Huang, J., Deng, S., Yu, G., Fan, Q. (2010). Occurrence and removal of pharmaceuticals, caffeine and DEET in wastewater treatment plants of Beijing, China. *Water Research, 44*, 417-426.

Tanojo, H, Wester, R.C., Shainhouse, J.Z., Maibach, H. I. (1999). Diclofenac metabolic profil following in vitro percutaneous absorption through viable human skin. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetic, 24*(4), 345-51.

Tanoure, R., Sato, Y., Motoyama, M., Nakagawa, S., Shinohara, R., Nomiyama, K. (2012). Plant uptake of pharmaceutical detected in recycled organic manure and reclaimed wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60*, 10203-10211.

Thiele-Bruhn, S. & Beck, I-C. (2005). Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere, 59*, 457–465

Thiele-Bruhn, S., Seibicke, T., Schulten, H-R., Leinweber, P. (2004). Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. Journal of Environmental Quality, *33*, 1331-1342.

Thompson, L. y Troeh, F. (1988). *Los suelos y su fertilidad*. (Cuarta edición). Barcelona: Editorial Reverté. Disponible en: http://books.google.co.ve/books?id=AegjDhEIVAQC [Consulta: Enero, 2016].

Topp, E., Monteiro, S. C., Beck, A., Coelho, B. B., Boxall, A. B. A., Duenk, P. W., Kleywegt, S., Lapen, D. R., Payne, M., Sabourin, L., Li, H., Metcalfe, C. D. (2008). Runoff of pharmaceuticals and personal care products following application of biosolids to an agricultural field. *Science of the Total Environment, 396*, 52-59.

Topp, G. C. (1993). Soil water content. En M. R. Carter (Ed), *Soil sampling and methods of analysis* (pp. 541-544). London: Canadian Society of Soil Science, Lewis Publishers.

Triebskorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Köhler, H-R, Schwaiger, J. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology, 68*, 151-166.

Trujillo, A., Cárdenas de Flores, C., Valbuena, M., Herrera, L., Araujo, I., Saules, L. (2000). Tratamiento de aguas residuales en el trópico mediante lagunas de estabilización y su reuso para riego agrícola. Resumen presentado en: XXVII *Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental*. AIDIS/ABES, Porto Alegre.

Tülp, H. C., Fenner, K., Schwarzenbach, R. P., Goss, K. U. (2009). pH-dependent sorption of acidic organic chemicals to soil organic matter. *Environmental Science & Technology, 43,* 9189-9195.

UCV, Universidad Central de Venezuela (1993). *Métodos de análisis de suelo y plantas utilizadas en el Laboratorio General del Instituto de Edafología.* Cuadernos de Agronomía. Año 1, Nº 6. Maracy: Facultad de Agronomía, UCV.

UNODC, Oficina de las Nacionales Unidas contra la Droga y el Delito (2010). *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos.* Nueva York: Sección de laboratorio y asuntos científicos Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito.

Urbano, G. (2011). *Principios básicos de farmacología: Farmacocinética*. San Cristóbal: Lito-Formas.

U.S. EPA, United States Environmental Protection Agency (1999). *Understanding variation in partition coefficient, kd, values. Volume I: The Kd model, methods of measurement, and application of chemical reaction codes.* EPA 402-R-99-004A. Disponible en: https://nepis.epa.gov [Consulta: Mayo, 2016]

U.S. EPA, United States Environmental Protection Agency (2004). *Guidelines for Water Reuse*. EPA/625/R-04/108. Disponible en: http://www.waterboards.ca.gov/water_issues/programs/grants_loans/water_recycling/docs/econ_tskfrce/14.pdf [Consulta: Octubre, 2015].

U.S. EPA, United States Environmental Protection Agency (2007). *Method 1694: Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS.* EPA 821-R-08-002. Disponible en:

https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/method_1694_2007.pdf [Consulta: Enero, 2015].

U.S. EPA, United States Environmental Protection Agency (2008). *Fate, transport and transformation test guidelines (OPPTS 835.1230). Adsorption/desorption (Batch equilibrium).* EPA 712-C-08-009. Disponible en: http://www.EPA-Methods/PDF/EPA-Method-835-1230.pdf [Consulta: Febrero, 2015].

U.S. EPA, United States Environmental Protection Agency (2014). *Pharmaceuticals*. Disponible en: https://search.epa.gov/epasearch/epasearch?querytext=pharmaceuticals&areaname=&areacontacts=&areasearchurl=&typeofsearch=epa&result_template=2col.ftl [Consulta: Mayo, 2015].

USGS, United States Geological Survey (2016). *Contaminants of Emerging Concern in the Environment.* United States Department of the Interior. Disponible en: http://toxics.usgs.gov/investigations/cec/index.php [Consulta: Octubre, 2015].

Vance, E. D., Brookes, P. C., Jenkinson, D. S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry, 19*, 703-707.

Viloria, J., C. Alvarado, C., Pineda, C., Miquilena, O. (1996). *Los suelos de la Finca Torumo, Guacara, estado Carabobo. Estudio con fines de diseño y monitoreo de riego con aguas servidas.* Maracay, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía.

Viloria, J., Núñez, Y., Machado, G., Elizalde, G. Pineda, M. (2009). Variación espacial del suelo y el paisaje en la cuenca alta del río Güey, estado Aragua, Venezuela. *Revista. Facultad de Agronomía (UCV), 35*(2), 67-78.

Vischetti, C., Casucci, C., Perucci, P. (2002). Relationship between changes of soil microbial biomass content and imazamox and benfluralin degradation. *Biology and Fertility of Soils, 35*, 13-17.

VITALIS (2013). *Situación ambiental de Venezuela 2012. Análisis de percepción del sector*. Editores y Compiladores: D. Díaz Martín, Y. Frontado, M. Da Silva, A.

Lizaraz, I. Lameda, V. Valera, C. Gómez., E. Monroy, Z. Martínez, J. Apostólico y G. Suárez. 42 pp. Disponible online en: www.vitalis.net [Consulta: Abril, 2015].

Vithanage, M., Rajapaksha, A. U., Tang, X., Thiele-Bruhn, S., Kim, K. H., Lee, S-E., Ok, Y. S. (2014). Sorption and transport of sulfamethazine in agricultural soils amended with invasive-plant-derived biochar. *Journal of Environmental Management*, *141*, 95-103.

Wardle, D. A. & Ghani, A. (1995). A critique of the microbial metabolic quotient (qCO_2) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development. *Soil Biology and Biochemistry, 27*(12), 1601-1610.

Waters Corporation (2014). OASIS ® HLB cartridges and 96-well plates. Care and use manula. 715000109EN KP-PDF. Disponible en: http: www.waters.com [Consulta: Marzo, 2016].

Weigel, S. (2003). *Occurrence, distribution and fate of pharmaceuticals and further polar contaminants in the marine environment.* (PhD thesis). University of Hamburg, Germany.

Weigel, S., Kallenborn, R., Hühnerfuss, H. (2004). Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, 1023*, 183–195

WHO, World Health Organization (2006). *Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater . Volume 2. Wastewater use in agriculture. Volume 4. Excreta and greywater use in agriculture* 3rd edition. World Health Organization. France. Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/gsuweg2/en/ [Consulta: Febrero, 2016].

WHO, World Health Organization (2012). Pharmaceuticals in Drinking-water. Technical report, ISBN 978 9241502085, p. 52. Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2012/pharmaceuticals/en/ [Consulta: Septiembre, 2016].

WHO, World Health Organization (2015). 19th WHO Model List of Essential Medicines. pp. 51. Disponible en: http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML2015_8-May-15.pdf [Consulta: Abril, 2015].

Wilkerson, M. R. & Kim, K. D. (1986). *The Pesticide contamination prevention act: setting specific numerical values.* California Department of Food and Agriculture (CDFA). EH 86-02. Environmental hazard assessment program, Sacramento, CA. Disponible en: http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/ehapreps/eh8602.pdf [Consulta: Mayo, 2016].

Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Shrivastava S., Hassanali M., Stothard P., Chang Z., Woolsey, J. (2006). DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Research*, *34*(1), D668–D672.

Wu, C., Sponberg, A. L., Witter, J. D., Fang, M., Czajkowski, K. P. (2010). Uptake of pharmaceutical and personal care products by soybean plants from soils applied with biosolids and irrigated with contaminated water. *Environmental Science & Technology*, *44*, 6157-6161.

Xu, J., Chen, W., Wu, L., Chang, A. C. (2009a). Adsorption and degradation of ketoprofen in soils. *Journal of Environmental Quality*, *38*, 1177-1182.

Xu, J., Chen, W., Wu, L., Green, R., Chang, A. C. (2009b). Leachability of some emerging contaminants in reclaimed municipal wastewater-irrigated turf grass fields. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *28*(9), 1842-1850.

Xu, J., Wu, L., Chang, A. C. (2009c). Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils. *Chemosphere*, *77*, 1299–1305.

Xu, J., Wu, L., Chen, W., Chang A. (2008). Simultaneous determination of pharmaceuticals, endocrine disrupting compounds and hormone in soils by chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1202*, 189-195.

Yang, J-F., Ying, G-G., Liu, S, Zhou, L-J., Zhao, J-L., Tao, R., Peng, P-A. (2012). Biological degradation and microbial function effect of norfloxacin in a soil under different conditions. *Journal of Environmental Science and Health, Part B, 47*(4), 288-295.

Yin, L., Wang, B., Yuan, H., Deng, S., Huang, J., Wang, Y., Yu, G. (2017). Pay special attention to the transformation products of PPCPs in environment. *Emerging Contaminants, 3*(2), 69-75.

Yu, J. T., Bouwer, E. J., Coelhan, M. (2006). Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. *Agricultural Water Management, 86*, 72–80.

Yu, Y. & Wu, L. (2012). Analysis of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta, 89*, 258–263.

Yu, Y., Liu, Y., Wu, L. (2013). Sorption and degradation of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in soils. *Environmental Science and Pollution Research International, 20*(6), 4261-4267.

Zamboni, I., Ballesteros, M., Zamudio, A. (2006). Caracterización de ácidos húmicos y fúlvicos de un mollisol bajo dos coberturas diferentes. *Revista Colombiana de Química, 35*(2), 191-203.

Zhang, L., Hu, J., Zhu, R., Zhou, Q., Chen, J. (2013). Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium. *Applied Microbiology and Biotechnology, 97*(8), 3687-3668.

Zhang, Y-L., Lin, S-S., Dai, C-M., Shi, L., Zhou, X-F. (2014). Sorption–desorption and transport of trimethoprim and sulfonamide antibiotics in agricultural soil: effect of soil type, dissolved organic matter, and pH. *Environmental Science and Pollution Research, 21*(9), 5827-5835.

ANEXOS

ANEXO A. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Tabla A.1 Preparación de soluciones por dilución de la solución madre del CF para la elaboración de las curvas de calibración de la solución patrón.

Concentración de la solución (mg L^{-1})	Alícuota de la solución madre (µL)
5	100
10	200
20	400
30	600
40	800
50	1000

Nota: Concentración de la solución madre de 500 mg L^{-1} en fase de elución (80% acetonitrilo/20% agua desionizada al 0,2 % en ácido acético) y volumen de la solución de trabajo de 10 mL.

Tabla A.2 Preparación de soluciones de trabajo por dilución de la solución madre del CF para la elaboración de las curvas de calibración en los ensayos de degradación y adsorción.

Ensayos	Concentración (mg L^{-1}) de la solución madre en metanol	Alícuota de la solución madre (µL)	Concentración (mg L^{-1}) de las soluciones de trabajo en metanol
Degradación	500	200	50
		400	100
		800	200
		1.200	300
		1.600	400
Adsorción	2.000	150	150
		300	300
		600	600
		900	900
		1.200	1.200
		1.500	1.500

Nota: Volumen de la solución de trabajo de 2 mL. De cada solución de trabajo se toma una alícuota de 100 µL para realizar la fortificación de las muestras con el CF en el rango de concentraciones estudiadas.

Tabla A.3 Cantidad de agua para el ajuste de humedad del suelo según su capacidad de retención hídrica.

Variables	**Suelo A (SA)**	**Suelo C (SC)**
Peso de suelo húmedo de cada tratamiento (PSH ± 0,1) %	1100,0	1150,0
Porcentaje de masa seca (P_{MS} ± 0,01) %	93,36	89,62
Porcentaje de humedad[a] (P_H ± 0,01) %	6,64	10,38
Capacidad de retención hídrica, (CRH ± 1) %	34	38
Cantidad de agua para ajuste al 40% de CRH (V_1 ± 0,05 mL)	96,7	86,9
Cantidad de agua para ajuste al 30% de CRH (V_2 ± 005 mL)	72,50	65,2

Nota: [a] El suelo con la humedad de campo se secó en el laboratorio hasta un contenido de agua que permitió su tamizado.

Tabla A.4 Preparación de soluciones madre para los distintos ensayos realizados.

Concentración solución madre (mg L^{-1})	**Característica de la solución**	**Masa del compuesto (m ± 0,0001) g**
500	Diclofenac en metanol	0,0251
	Ibuprofeno en metanol	0,0252
	Diclofenac en fase móvil	0,0252
	Ibuprofeno en fase móvil	0,0253
1.000	Diclofenac en metanol	0,0503
	Ibuprofeno en metanol	0,0502
2.000	Diclofenac en metanol	0,1002
	Ibuprofeno en metanol	0,1003
4.000	Diclofenac en metanol	0,2002
5.000	Diclofenac en metanol	0,2502
	Ibuprofeno en metanol	0,2501

Nota: Volumen de la solución madre de 50 mL. Las soluciones se mantuvieron refrigeradas a -5ºC y en la oscuridad por un tiempo no mayor de 2 meses.

Tabla A.5 Preparación de soluciones de trabajo por dilución de la solución madre del CF para la elaboración de las isotermas de adsorción.

Fármaco	Concentración solución madre (mg L^{-1}) en metanol	Alícuota de la solución madre (µL)	Concentración de las soluciones de trabajo (mg L^{-1}) en metanol
Diclofenac	4.000	300	600
		600	1.200
		900	1.800
		1.200	2.400
		1.500	3.000
		1.800	3.600
Ibuprofeno	2.000	300	300
		600	600
		900	900
		1.200	1.200
		1.500	1.500
		1.800	1.800

Nota: Volumen de la solución de trabajo de 2 mL. De cada solución de trabajo se tomó una alícuota de 100 µL para realizar la fortificación de las muestras con el CF para cada una de las seis concentraciones estudiadas.

ANEXO B. INFORMACION COMPLEMENTARIA

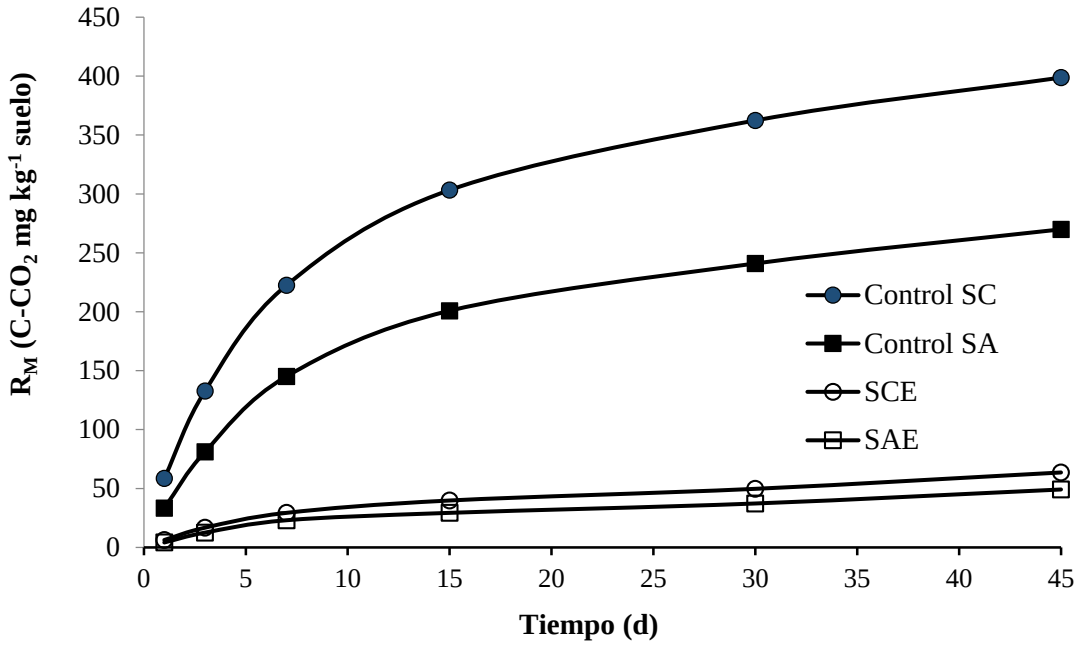


Figura B.1 Efecto de la esterilización en la respiración microbiana de los suelos SA y SC.

Tabla B.1 Revisión bibliográfica de condiciones en el HPLC.

Analitos de interés	Condiciones en el HPLC	Referencia/Matriz
Diclofenac Ibuprofeno	**Columna:** LiChrospher (Merk), 100 RP-18 (125 mm x 4 mm; i.d. 5 µm). **Solvente A:** metanol; **Solvente B**: acetonitrilo; **Sovente C:** 50 mM de solución de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4: pH: 4,5). **Flujo:** 1 ml/min. Volumen: 20 µL. **Flujo en gradiente: Tiempo= 0 min.** A (15%), B (0%) y C (85%). **Tiempo= 4,5 min**. A (15%), B (0%) y C (85%). **Tiempo= 12,5 min.** A (0%), B (20%) y C (80%). **Tiempo= 18,0 min.** A (0%), B (25%) y C (75%). **Tiempo= 27,0 min.** A (0%), B (45%) y C (55%). **Tiempo= 45,0 min**. A (0%), B (45%) y C (55%). **Detector:** UV. Diclofenac e ibuprofeno a λ: 220nm. T_R ibuprofeno: 33 min y T_R diclofenac: 30 min.	Santos et al, 2005 (Aguas residuales)
Ibuprofeno	**Columna:** Ibuprofeno: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C_8 columna (15 mm x 4,6mm, (5µm). Para los otros compuestos se utilizó una columna C_{18}. **Fase móvil:** acetonitrilo:acetonitrilo-ácido fosfórico. Esta última solución se preparó mezclando 0,5 mL de ácido fosfórico y 340 mL de acetonitrilo y ajustando el volumen a 1000 mL con agua. **Flujo:** 1 ml/min. Condiciones isocráticas (80:20 v/v). **Detector:** UV. Ibuprofeno a λ: 214 nm. No reportan los T_R.	Karnjanapiboonwong et al, 2011 (118) (Aguas residuales, lodos y suelo)
Diclofenac Ibuprofeno	**Columna:** LiChrosper 100 RP-18 (5µm) (Merck) **Flujo:** 0,5 ml/min. **Fase móvil:** Metanol/agua (10 mM acetato de amonio, 0,1 % trietilamina, ácido acético a pH 5). **Volumen:** 50 µL. **Gradiente programado: Tiempo de 0-1 min:** 20% metanol. **Tiempo de 2-5 min**: De 20 a 40 % metanol. **Tiempo de 5-25 min**: 45 % metanol **Tiempo de 25-40 min**: De 45 a 70 % metanol. **Tiempo de 40-50 min**: De 70 a 100 % metanol. **Detector: UV/DAD.** Todos a λ: 230 nm a excepción del acetaminofén a λ: 254 nm. T_R ibuprofeno: 46 min y T_R diclofenac: 41 min.	Weigel et al, 2004 (Aguas superficiales)
Diclofenac	**Columna:** LiChrospher RP-18 (25 cm x 4,0 mm; i.d. 5 µm). **Fase móvil:** Acetonitrilo**:**0,1 % ácido fórmico (75:25 v/v). **Flujo:** 1 ml/min. Condiciones isocráticas. **Detector:** Photo diode-array. Diclofenac a λ: 276 nm. T_R no reportado.	Chefetz et al, 2008 (Aguas residuales y en suelo para los ensayos de adsorción)
Diclofenac	**Columna:** Thermo C_{18} columna (25 cm x 4,6 mm, 5 µm). **Fase móvil:** Solución amortiguadora de fofatos 0,25 M a pH 4,7:Acetonitrilo (30:70 v/v) **Flujo:** 1 ml/min. Condiciones isocráticas **. Volumen de inyección**: 10 µL **Detector: UV/Vis.** A λ: 280 nm. T_R no reportado.	Avilés et al, 2008 **(**Aguas residuales)

Tabla B.1 Revisión bibliográfica de condiciones en el HPLC (Continuación).

Analitos de interés	Condiciones en el HPLC	Referencia/Matriz
Ibuprofeno	**Columna:** Inertsil C_{18} 150mm x 4,6mm (5µm). **Fase móvil:** Acetonitrilo: buffer de fosfato (60:40 v/v, pH: 7) (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4). **Flujo:** 0,7 ml/min. Condiciones isocráticas. **Volumen inyectado**: no reportado. **Detector:** UV. Ibuprofeno a λ: 260 nm y T_R: 2,48 min.	Reddy Battu & Reddy, 2009 **(**Medicinas)
Diclofenac	**Columna:** ODS C_{18} RP Intersite (250 x 4,6mm). **Fase móvil:** Acetonitrilo: metanol (90:10 v/v). **Flujo:** 1 ml/min. Condiciones isocráticas. **Volumen inyectado**: 20 µL. **Detector:** UV 2010 LP plus photo diode array. Diclofenac a λ: 254 nm y T_R: 3,97 min.	Jana et al, 2011 **(**Medicinas)

Tabla B.2 Revisión bibliográfica de condiciones en el LC/MS.

Analitos de interés	Condiciones en el LC	Referencia/Matriz
Analitos	**Condiciones en el LC**	**Referencia**
Diclofenac Ibuprofeno	**Columna:** Zorbax Eclipse XDB (4,4x150mm; 5µm) (40°C). **Solvente A**: solución acuosa al 0,04% ácido acético glacial y **solvente B**: Acetonitrilo. **Flujo:** 0,5 ml/min. **Volumen**: 20 µL. **Flujo en gradiente:** 1 min: 0% B. 2 min: 40%B. 3 min: 52%B. 4 min: 70%B. De 6 a13 min: 100%B. 14min: 0%B. T_R ibuprofeno: 4,273 min y T_R diclofenac: 4,173 min.	Fernández et al, 2010 (Aguas superficiales)
Diclofenac Ibuprofeno	**Columna:** Purospher Star RP-18 (125mm×2,0 mm, 5 µm). **Fase móvil: Solvente A**: Acetonitrilo: Metanol (1:1) y **Solvente B:** Agua. **Volumen**: 20 µL. **Flujo:** 0,2 ml/min. Comenzó con 20% A, incrementándose a 80% en 20min, subiendo a 90% en un gradiente de 4 min, y luego regresa a las condiciones iniciales en 3 min T_R ibuprofeno:19,2 min y T_R diclofenac: 19,9 min.	Gross et al, 2009 (Aguas residuales)
Diclofenac Ibuprofeno	**Columna:** Waters Sunfire C18 (150mm×2,1 mm, 3,5 µm). **Flujo:** 0,3 ml/min. **Sovente A**: Acetonitrilo:Agua con 0,1 % de acetato de amonio (v/v) a pH 6,2 (20:80). **Solvente B:** Acetonitrilo:Agua con 0,1 % de acetato de amonio (v/v) (80:20). **Volumen:** 10 µL. **Gradiente programado:** De 100% de A a 100 % de B. T_R ibuprofeno: 24,5 min y T_R diclofenac: 23,5 min.	Lacey et al, 2008 (Aguas residuales)
Diclofenac Ibuprofeno	**Columna:** BEH C18 (50mm×2,1 mm, 1,7 µm). **Solvente A**: Metanol y **solvente B:** Agua. 50:50 v/v con adición de 1 mL de ácido fórmico a 1 Litro de fase móvil. **Flujo:** 0,5 ml/min. Condiciones isocráticas. T_R ibuprofeno: 3,93 min y T_R diclofenac: 1,93 min.	Chiérice, 2011 (aguas superficiales y tratadas)

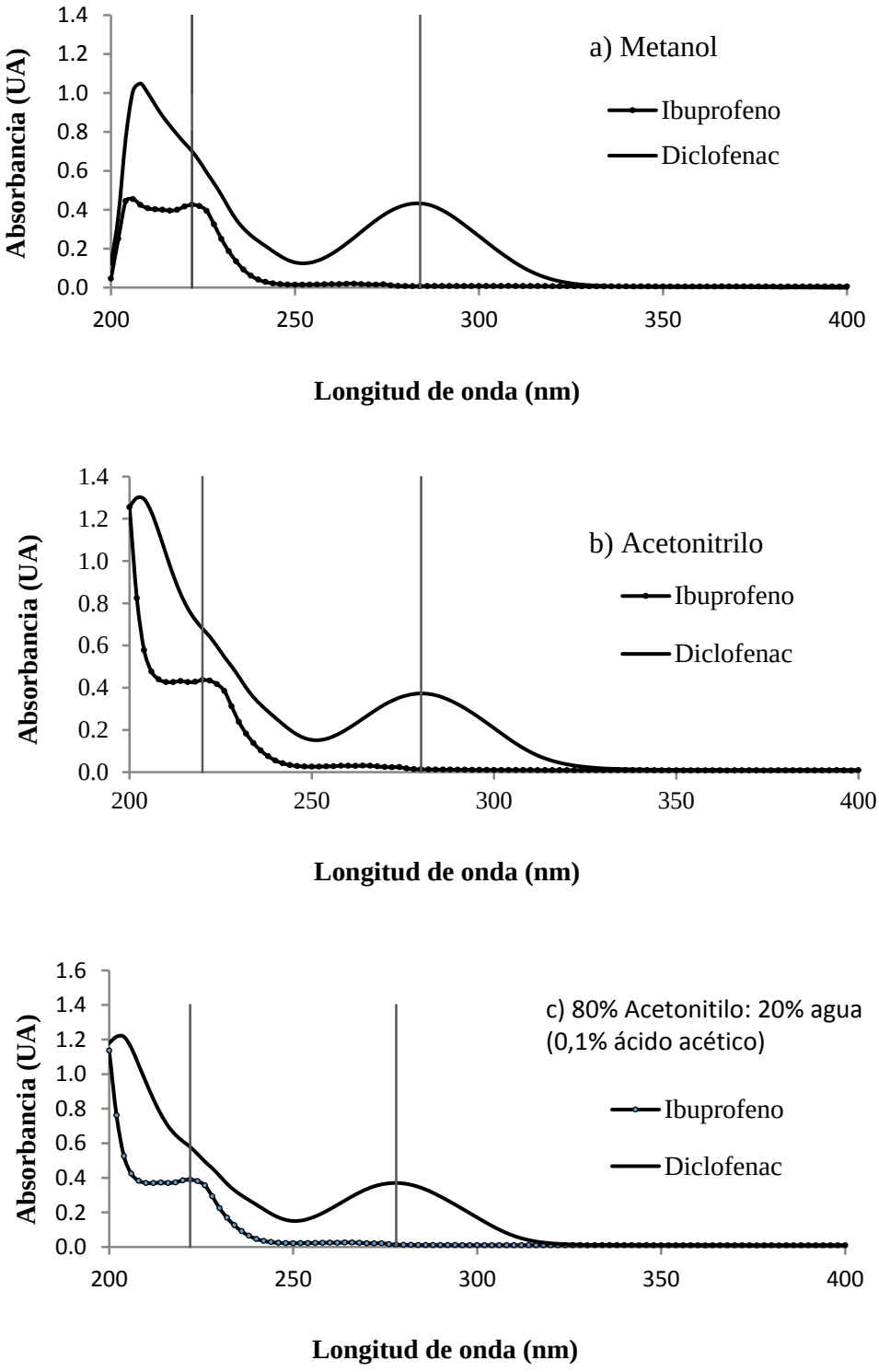


Figura B.2 Curvas de absorbancia de los fármacos en diferentes solventes a 10 mg L^{-1}.

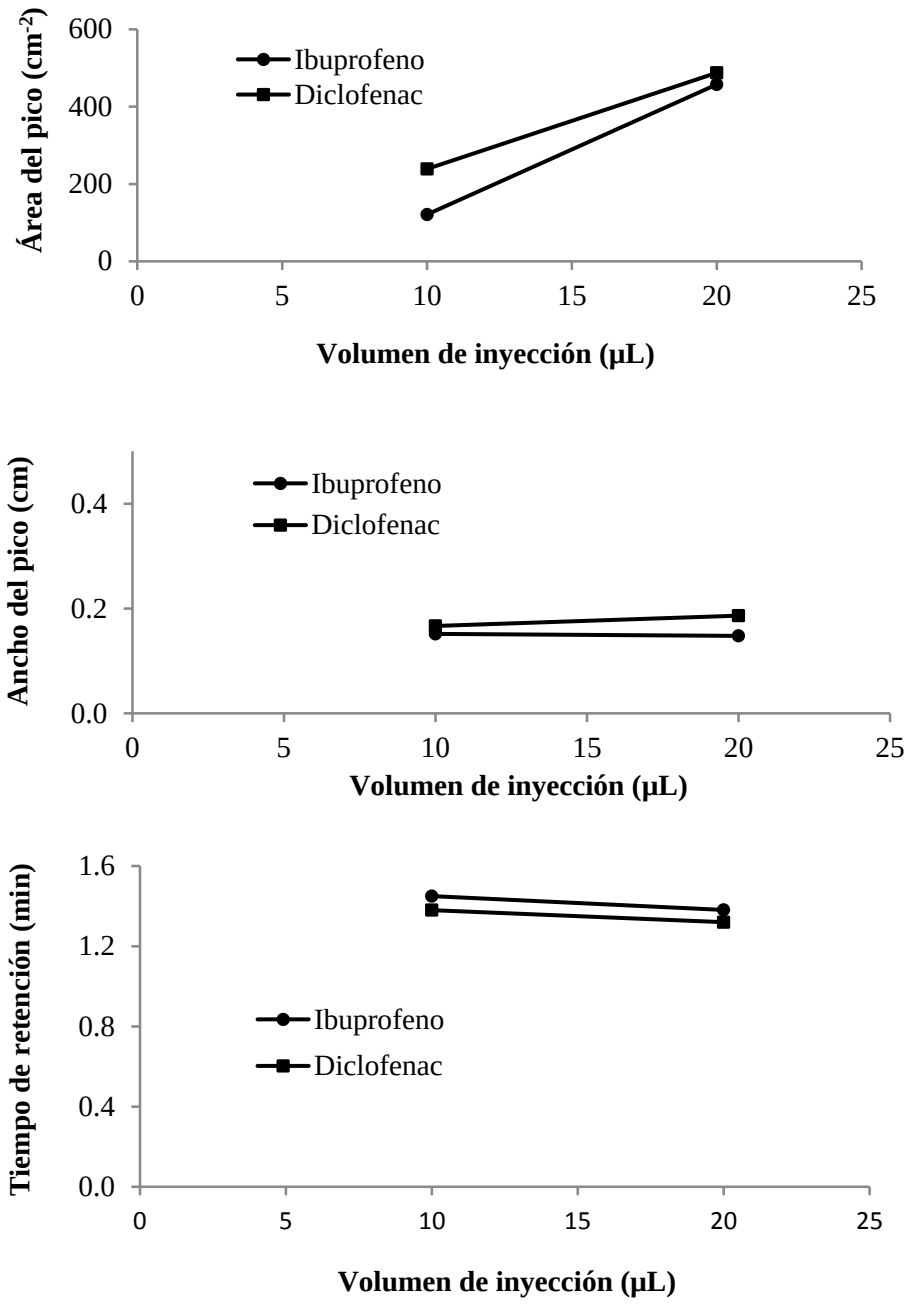


Figura B.3 Efecto del volumen de inyección en algunas características del pico cromatográfico: área, ancho y tiempo de retención.

Nota: Soluciones patrones de diclofenac e ibuprofeno a 10 mg L^{-1} en fase móvil a las siguientes condiciones de operación: Flujo: 1 mL min^{-1}; λ = 225 nm (ibuprofeno) y λ = 280 nm (diclofenac); fase móvil: 80 % acetonitrilo y 20 % agua desionizada (0,1% en ácido acético).

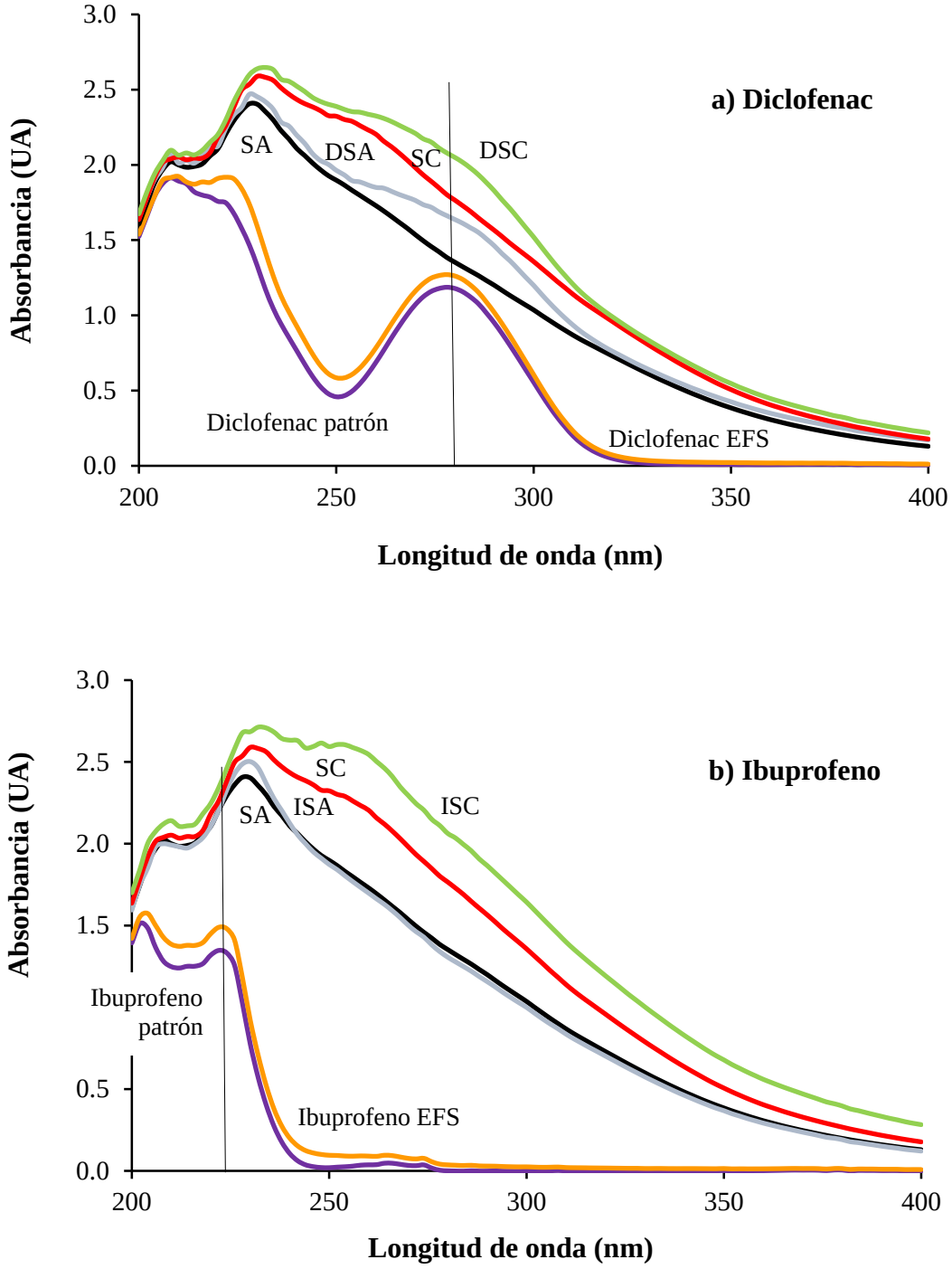


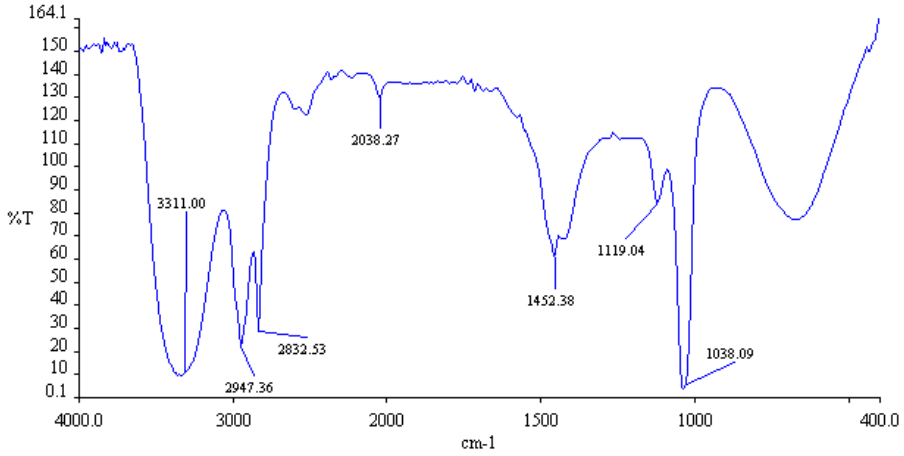
Figura B.4 Curvas de absorbancia de los CF en la matriz de los suelos, en solución de fase elución (patrón) y ésta sometida a EFS.

Nota: Solvente: Fase de elución [acetonitrilo (80%) y agua desionizada (20%) (0,2% en ácido acético)].Concentración: 6 mg L^{-1} (solución patrón) y 6 mg Kg^{-1} (suelos).

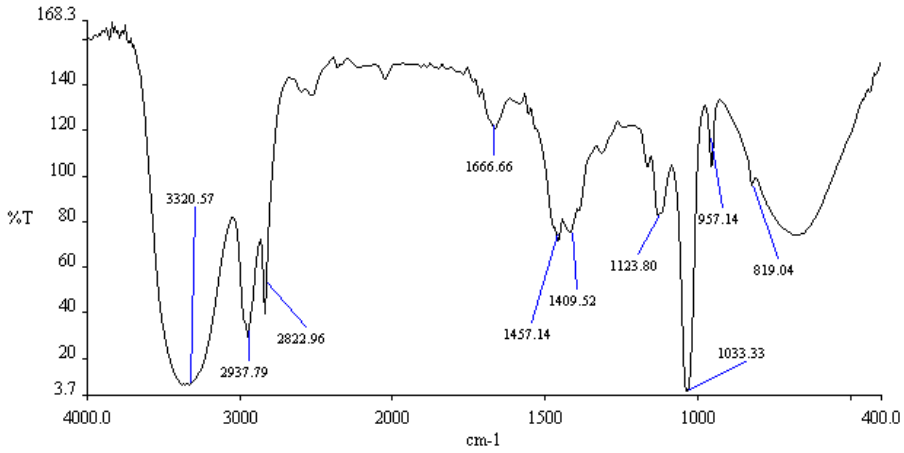
Tabla B.3 Resumen de las condiciones cromatográficas de los espectros presentados

Figura	Condiciones cromatográficas
4.2	Cromatogramas de soluciones de diclofenac en diferentes solventes. Flujo: 1 mL min-1; volumen de inyección: 20 μL; λ = 280 nm; fase móvil: 80 % acetonitrilo /20 % agua desionizada (0,1% en ácido acético); concentración del CF: 10 mg L-1 en los solventes ensayados (metanol y acetonitrilo).
4.3	Cromatogramas de soluciones de los CF a diferentes longitudes de onda. Condiciones de operación: Flujo: 1 mL min-1; volumen de inyección: 20 μL; fase móvil: 80 % acetonitrilo/20 % agua desionizada (0,1% en ácido acético); concentración del CF: 10 mg L-1 en fase móvil.
4.4	Cromatogramas del diclofenac en metanol (5 mg L-1) y extraído del suelo SA (5 mg Kg-1) utilizando metanol como solvente de elución (Ensayo 1). Flujo: 1 mL min-1; volumen de inyección: 20 μL; λ = 280 nm; fase móvil: 80 % acetonitrilo y 20 % agua desionizada (0,2% en ácido acético) (Ensayo 1).
4.5	Cromatogramas de diclofenac en fase móvil (5 mg L-1) y extraído del suelo SA (5 mg Kg-1) en fase elución igual a la fase móvil (Ensayo 2). Flujo: 1 mL min-1; volumen de inyección: 20 μL; λ = 280 nm; fase móvil: 80 % acetonitrilo y 20 % agua desionizada (0,2% en ácido acético) (Ensayo 2).
4.6	Cromatogramas del diclofenac y el ibuprofeno extraídos de los suelos SA y SC (10 mg Kg^{-1}suelo) (Ensayo 5). Se utilizaron los siguientes solventes: Metanol/1% ácido fórmico (v/v) (EAU) y 3 mL de la mezcla 80 % acetonitrilo / 20 % agua desionizada (0,2% en ácido acético) (EFS), bajo las siguientes condiciones cromatográficas: Flujo: 1 mL min-1; volumen de inyección: 20 μL; λ = 225 nm (ibuprofeno) y λ = 280 nm (diclofenac); fase móvil: 60 % acetonitrilo / 40 % agua desionizada (0,1% en ácido acético) (Ensayo 5). DSA: Diclofenac en suelo SA, DSC: Diclofenac en suelo SC, ISA: Ibuprofeno en suelo SA, ISC: Ibuprofeno en suelo SC. Concentración: 10 mg CF kg -1suelo.
4.7	Cromatogramas de los CF extraídos de los suelos SA y SC (5 mg Kg^{-1}suelo), empleando 1 mL de solvente de elución. Solventes: Metanol/1% ácido fórmico (v/v) en la EAU y en la EFS 1 mL de la mezcla 80 % acetonitrilo / 20 % agua desionizada (0,2% en ácido acético), bajo las siguientes condiciones cromatográficas: Flujo: 1 mL min-1; volumen de inyección: 20 μL; λ = 225 nm (ibuprofeno) y λ = 280 nm (diclofenac); fase móvil: 60 % acetonitrilo / 40 % agua desionizada (0,1% en ácido acético). Concentración: 5 mg CF Kg-1suelo.
4.8	Cromatogramas a una concentración de 5 mg L^{-1} en los ensayos de adsorción. Se empleó 3 mL de la mezcla 80 % acetonitrilo / 20 % agua desionizada (0,2% en ácido acético) en la EFS, bajo las siguientes condiciones cromatográficas: Flujo: 1 mL min-1; volumen de inyección: 20 μL; λ = 225 nm (ibuprofeno) y λ = 280 nm (diclofenac); fase móvil: 60 % acetonitrilo / 40 % agua desionizada (0,1% en ácido acético). DSA: Diclofenac en suelo, DSC: Diclofenac en suelo C, ISA: Ibuprofeno en suelo A, ISC: Ibuprofeno en suelo C.

a) Metanol



b) Suelo SA



b) Suelo SC

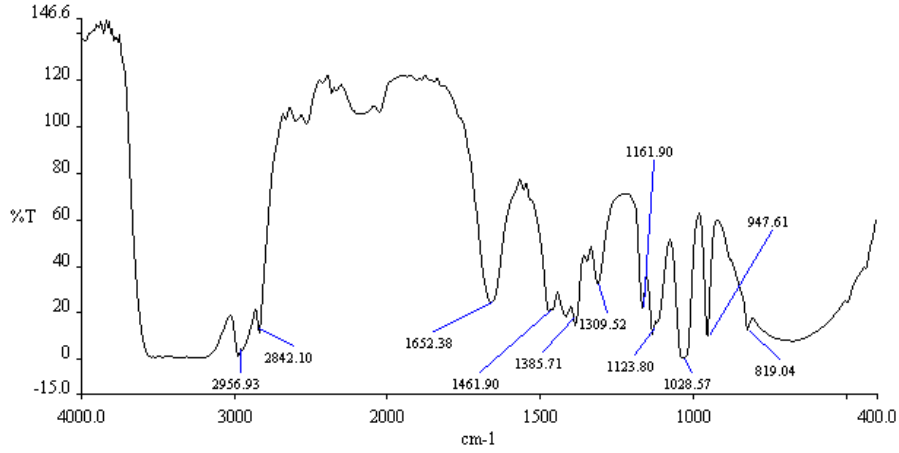


Figura B.5 Espectros infrarrojos de las fracciones de suelo solubles en metanol

Nota: Condiciones: A partir de 3 g de suelo y sometidas a EFS utilizando metanol (1% ácido fórmico) como solvente de elución. a) Metanol, b) Suelo SA y c) Suelo SC.

Tabla B.4 Identificación de los grupos funcionales en los extractos de los suelos en el espectro infrarrojo.

Solvente	Señal (cm^{-1})	Muestra	Señal (cm^{-1})	Muestra	Señal (cm^{-1})	Tipo de vibración y grupo funcional [a]
Metanol	3.311,00 [b]	Suelo SA	3.320,57 [b]	Suelo SC	3.800-3.200 [b]	Tensión O-H de fenoles, alcoholes y ácidos carboxílicos Tensión de los N-H de amidas y aminas
	2.947,36		2.937,79		2.956,93	Tensión C-H de CH_3- y -CH_2- (asimétrico)
	2.832,53		2.822,96		2.842,10	Tensión C-H de CH_3- y -CH_2- (simétrico)
	-		1.666,66		1.652,38 [c]	Tensión C=C de aromáticos y tensión C=O quinonas, ácidos cetónicos, carboxilatos (COO^-) y amidas primarias
	1.452,30		1.457,14		1.451,90	Deformación O-H Deformación C-H asimétrica
			1.409,52		1.385,71	Deformación O-H, tensión O-H de fenoles y carboxilatos. Tensión asimétrica COO^- y deformación C-H en alifáticos.
	1.119,04 [d]		1.123,80		1.123,80[b]	Vibraciones de O-H
	1.038,09		1.033,33		1.028,57	Tensión C-O. Tensión C-O de estructuras polisacáridas
	-		957,14		947,61	Deformación OH proveniente de ácidos carboxílicos Deformación fuera del plano C-H de aromáticos
	-		819,04		819,04	Deformación fuera del plano C-H de aromáticos

Nota: Fracciones solubles en metanol (1% ácido fórmico) a partir de 3 g de suelo y sometidas a EFS utilizando metanol como solvente de elución. [a] Fuente: Amir et al., 2003; Samios et al., 2007. [b] Banda ancha, presentando el suelo SC la mayor intensidad y se solapa con la señal siguiente a 2856,93 cm^{-1}. [c] Señal de mayor intensidad con respecto al suelo SA. [d] Señal de menor intensidad con respecto a las muestras de suelo.

ANEXO C. ANALISIS ESTADÍSTICO

Tabla C.1 Efecto del solvente utilizado en el ajuste de humedad sobre la respiración microbiana de los suelos.

Tratamientos	Respiración microbiana, CB_M (mg C-CO_2 Kg^{-1} suelo)					
	Tiempo (días)					
	1	**3**	**7**	**15**	**30**	**45**
SA (H_20)	36 ^{a}	52 ^{a}	69 ^{a}	59 ^{a}	38 ^{a}	28 ^{a}
SA (H_20/ CH_3OH)	33 ^{a}	48 ^{a}	64 ^{a}	56 ^{a}	40 ^{a}	29 ^{a}
SC (H_20)	56 ^{b}	77 ^{b}	92 ^{b}	78 ^{b}	63 ^{b}	40 ^{b}
SC (H_20/ CH_3OH)	59 ^{b}	74 ^{b}	90 ^{b}	81 ^{b}	59 ^{b}	36 ^{ab}

Nota: Medias con letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

Tabla C.2 Efecto del solvente utilizado en el ajuste de humedad sobre el carbono en la biomasa microbiana de los suelos.

Tratamientos	Carbono en la biomasa microbiana, C_{BM} (mg C Kg^{-1} suelo)					
	Tiempo (días)					
	1	**3**	**7**	**15**	**30**	**45**
SA (H_20)	286 ^{a}	298 ^{a}	335 ^{a}	322 ^{a}	279 ^{a}	266 ^{a}
SA (H_20/ CH_3OH)	287 ^{a}	295 ^{a}	300 ^{a}	321 ^{a}	280 ^{a}	265 ^{a}
SC (H_20)	430 ^{b}	468 ^{b}	364 ^{a}	340 ^{a}	426 ^{b}	471 ^{b}
SC (H_20/ CH_3OH)	431 ^{b}	469 ^{b}	361 ^{a}	342 ^{a}	404 ^{b}	435 ^{b}

Nota: Medias con letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

Tabla C.3 Respiración basal de los suelos esterilizados (SAE y SCE).

Tratamientos	Respiración, R_M (mg C-$C0_2$ Kg^{-1} suelo)					
	Tiempo (días)					
	1	**3**	**7**	**15**	**30**	**45**
SAE	4 ^{aA}	8 ^{aAB}	10 ^{aAB}	6 ^{aAB}	8 ^{aAB}	12 ^{aB}
SCE	6 ^{aA}	10 ^{aA}	13 ^{aA}	10 ^{aA}	10 ^{aA}	14 ^{aA}

Nota: Medias con letras distintas en minúsculas en una misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos y medias con letras distintas en mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas en el tiempo ($P < 0,05$).

Tabla C.4 Concentraciones remanentes de diclofenac e ibuprofeno en el suelo SA.

Tratamientos	**Concentración remante en suelo, C (mg Kg^{-1} suelo)**					
	Tiempo (días)					
	1	**3**	**7**	**15**	**30**	**45**
DSA	4,37 ^{aF}	4,00 ^{bE}	3,18 ^{bD}	1,98 ^{bC}	1,17 ^{bB}	0,86 ^{aA}
ISA	4,19 ^{aE}	3,10 ^{aD}	2,41 ^{aC}	1,37 ^{aB}	0,59 ^{aA}	0,41 ^{aA}

Nota: Medias con letras distintas en minúsculas en una misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos y medias con letras distintas en mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas en el tiempo ($P < 0,05$).

Tabla C.5 Concentraciones remanentes de diclofenac e ibuprofeno en el suelo SC.

Tratamientos	**Concentración remante en suelo, C (mg Kg^{-1} suelo)**					
	Tiempo (días)					
	1	**3**	**7**	**15**	**30**	**45**
DSC	3,90 ^{aE}	3,24 ^{aD}	2,67 ^{bC}	1,74^{bB}	0,67^{aA}	0,50 ^{A}
ISC	3,91 ^{aC}	2,49 ^{aB}	1,81 ^{aB}	0,81 ^{aA}	0,41^{aA}	< LC

Nota: Medias con letras distintas en minúsculas en una misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos y medias con letras distintas en mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas en el tiempo ($P < 0,05$).

Tabla C.6 Concentraciones remanentes de diclofenac e ibuprofeno en el suelo SAE.

Tratamientos	**Concentración remante en suelo, C (mg Kg^{-1} suelo)**					
	Tiempo (días)					
	1	**3**	**7**	**15**	**30**	**45**
DSAE	4,79 ^{aD}	4,60 ^{aD}	4,19 ^{aC}	3,80 ^{aB}	3,25 ^{aA}	3,02 ^{aA}
ISAE	5,06 ^{bE}	4,41 ^{aD}	3,98 ^{aCD}	3,44 ^{aBC}	3,08 ^{aAB}	2,75 ^{aA}

Nota: Medias con letras distintas en minúsculas en una misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos y medias con letras distintas en mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas en el tiempo ($P < 0,05$).

Tabla C.7 Concentraciones remanentes de diclofenac e ibuprofeno en el suelo SCE.

Tratamientos	**Concentración remante en suelo, C (mg Kg^{-1} suelo)**					
	Tiempo (días)					
	1	**3**	**7**	**15**	**30**	**45**
DSCE	4,96 ^{aD}	4,68 ^{aCD}	4,32 ^{aBC}	3,91 ^{aB}	3,09 ^{aA}	2,71 ^{aA}
ISCE	5,06 ^{aD}	4,65 ^{aCD}	4,25 ^{aCD}	3,86 ^{aBC}	3,07 ^{aAB}	2,47 ^{aA}

Nota: Medias con letras distintas en minúsculas en una misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos y medias con letras distintas en mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas en el tiempo ($P < 0,05$).

Tabla C.8 Prueba de múltiples rangos para determinar el tiempo de equilibrio.

Tratamiento	Tratamiento Tiempo de agitación (horas)	Cantidad promedio de fármaco adsorbido (mg Kg^{-1}suelo)	Grupos homogéneos
DSA	0	0,00	a
	2	7,96	b
	4	8,54	c
	8	8,99	d
	12	9,07	d
	16	9,09	d
DSC	0	0,00	a
	2	7,72	b
	4	7,91	b
	8	8,54	c
	12	8,53	c
	16	8,46	c
ISA	0	0,00	a
	2	3,95	b
	4	4,99	bc
	8	5,79	c
	12	5,88	c
	16	5,76	c
ISC	0	0,00	a
	2	3,62	b
	4	4,58	c
	8	5,23	c
	12	5,25	c
	16	5,21	c

Nota: Medias con letras distintas en un mismo tratamiento indican diferencias significativas en la cantidad adsorbida en el tiempo ($P < 0,05$).

Tabla C.9 Coeficientes de correlación de Pearson entre las características de los suelos y resultados de los ensayos de degradación (modelo no lineal de primer orden) y de adsorción para el ibuprofeno.

	COT	**CAH/CET**	**GH**	**pH**	**DT_{50}**	**K_d**	**GUS**
COT	1						
CAH/CET	0,9850**	1					
GH	0,9084*	0,9382**	1				
pH	0,9998**	0,9868**	0,9166*	1			
DT_{50}	-0,9552**	-0,9792**	-0,9521**	-0,9592**	1		
K_d	-0,9982**	-0,9834**	-0,9131*	-0,9987**	0,9558**	1	
GUS	-0,4818	-0,5820	-0,6484	-0,4904	0,7082	0,4726	1
F_R	-0,9989**	-0,9851**	-0,9104*	-0,9991**	0,9559**	0,9998**	0,4745

Tabla C.10 Coeficientes de correlación de Pearson entre las características de los suelos y resultados de los ensayos de degradación (modelo no lineal de primer orden) y de adsorción para el diclofenac.

	COT	**CAH/CET**	**GH**	**pH**	**DT_{50}**	**K_d**	**GUS**
COT	1						
CAH/CET	0,9850**	1					
GH	0,9084*	0,9382**	1				
pH	0,9998**	0,9868**	0,9166*	1			
DT_{50}	-0,9860**	-0,9966*	-0,9152*	-0,9866**	1		
K_d	-0,9646**	-0,9304**	-0,8711*	-0,9653**	0,9400**	1	
GUS	0,7019	0,5910	0,5324	0,6997	-0,5921	-0,7881	
F_R	-0,9980**	-0,9818**	-0,9071*	-0,9982**	0,9840**	0,9771**	-0,7231

Nota para ambas tablas: * indica que la correlación es significativa a un nivel de 0,05 y ** indica que la correlación es significativa a un nivel de 0,01.

ANEXO D. RESULTADOS DEL PROGRAMA ESTADÍSTICO

El contenido de este anexo se encuentra en el CD que se adjunta a este trabajo.