

DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA ACOPLADA A MASAS DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS, HORMONAS Y DISRUPTORES ENDOCRINOS EN EFLUENTES DOMÉSTICO-PLUVIALES

Gomez, B. M.⁽¹⁾, Perez Hernandez F.⁽¹⁾ y Graziano M.⁽²⁾

(1) Laboratorio Experimental de Tecnologías Sustentables, Subgerencia Centro de Tecnología del Uso del Agua, Instituto Nacional del Agua, Argentina.

(2) Laboratorio de Limnología, Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires. Universidad de Buenos Aires - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina

E-mail: bmgomez.ina@gmail.com

Introducción

Los contaminantes emergentes representan un gran número de sustancias químicas utilizadas en la vida cotidiana incluidos los medicamentos, los productos cosméticos y de higiene personal. Dado que pueden llegar a generar un efecto en la biota y/o en la salud humana a concentraciones muy bajas, se han dedicado grandes esfuerzos al desarrollo de nuevas técnicas analíticas que permitan su detección. Existen diversas técnicas para su determinación, entre ellas la cromatografía gaseosa acoplada a masas (CG-MS). El reto de la CG-MS para analizar estos compuestos radica en la baja volatilidad de los analitos y la presencia de grupos funcionales polares con hidrógenos activos, como -OH, aminos y amidas, que requieren el uso de derivatización para reducir la polaridad y aumentar su volatilidad.

El objetivo de este trabajo consistió en el desarrollo de un método analítico que permitiese la determinación simultánea de nueve principios activos y productos de cuidado personal (ácido clófrico, ibuprofeno, paracetamol, naproxeno, ketoprofeno, diclofenac, carbamazepina, acetilsalicílico y gemfibrozil), dos compuestos disruptores endocrinos (nonilfenol y bisfenol A) y un compuesto estrogénico (estrógeno) en efluentes domiciliarios.

Materiales y métodos

Muestreo y procesamiento de las muestras

Para poner a prueba la metodología de extracción empleando un efluente, se tomaron dos muestras de agua provenientes de desagües doméstico-pluviales en el barrio Mariano Moreno, Claypole (Almirante Brown, Buenos Aires), cuya composición hemos caracterizado previamente (Gomez et al. 2023). Se colectó 1 L de muestra de dos descargas separadas 300 m entre sí. Las muestras fueron transportadas a 4°C hasta el laboratorio en botellas de plástico y luego preservadas en freezer a -18°C hasta su medición. Descongelada la muestra, se centrifugó durante 15 min a 4000 rpm. El sobrenadante fue filtrado empleando una membrana de fibra de vidrio (*free blender*) de 0.7 µm de poro.

Procedimiento de extracción y clean-up

Se emplearon cartuchos de SPE C18 (500 mg) los cuales fueron previamente acondicionados con 3 x 2 ml de acetato de etilo, 3 x 2 ml de metanol y 3 x 2 ml de agua ultrapura y por último, 4 ml de agua ultrapura acidificada (pH 2.5) a un flujo de 0.5 ml min⁻¹ sin aplicar vacío. Una vez acondicionado el cartucho, se procedió a pasar 100 ml de muestra (acondicionada a pH 2.5) empleando vacío mediante una estación de 12 posiciones a un flujo de 0.5 ml min⁻¹. Posteriormente, se realizó un enjuague con 2 ml de agua ultrapura (pH 2.5) y se dejó secar al vacío el cartucho durante 60 min. Los analitos fueron eluidos con 3 x 2 ml de etil acetato por gravedad en un tubo cónico de vidrio de 15 ml. Finalmente, el

eluato fue evaporado a sequedad empleando un baño a 37°C y una corriente suave de N₂. Se re-disolvió con 900 µl de acetato de etilo y homogeneizó durante 1 min empleando un vortex. Se transfirió a un vial de CG y se le adicionó 100 µl de N-metil-N-(tert-butildimetilsilil) trifluoroacetamida (MTBSTFA). El vial se colocó en estufa a 70°C por 60 min para favorecer la derivatización previa al análisis por CG-MS (Figura 1). Para validación y optimización del método de extracción se empleará como estándar aditivo BPA-d16¹.

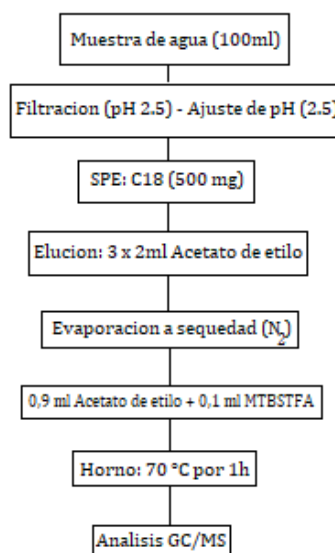


Figura 1.- Diagrama de flujo de la extracción y clean-up de las muestras.

Análisis por cromatografía gaseosa con espectrometría de masas

Las sustancias químicas presentes en las muestras preparadas se determinaron utilizando un GC Agilent 6890N conectado a un MSD 5975C, equipado con un muestreador automático de líquidos Agilent 7683B. La columna utilizada fue la HP-5MS (30 m x 0.25 mm de diámetro interno x 0,25 m de espesor de película) empleando helio (pureza > 99,999%) como gas carrier a un caudal constante de 1,2 mLmin⁻¹. La temperatura del inyector fue de 250°C. La temperatura del horno CG se programó de 70°C (mantenida durante 1 min) a 120°C a 20 °C/min, se elevó a 250°C a 10 °C/min y después a 280°C a 5 °C/min y se mantuvo durante 3 min. Se inyectó 1 µl de muestra en modo *splitless*. El tiempo total de análisis fue de 25 min.

El detector de masa fue operado con una energía de ionización de 70 eV en modo SIM y con un tiempo de retardo del disolvente de 11 min. Las temperaturas de la interfaz CG-MS, la fuente de iones y la cuádruple se fijaron en 280, 230 y 150°C, respectivamente. Los tiempos de retención de cada compuesto se determinaron inyectando compuestos estándar individuales. La cuantificación se realizó mediante regresión lineal (R²>0,995).

¹ En estas muestras no fue empleado dado que la entrega del reactivo se encuentra pendiente.

Los iones primarios y secundarios utilizados para la identificación y cuantificación así como los tiempos de retención obtenidos se encuentran en la **Tabla 1**.

Tabla 1.- Compuestos analizados por CG MS con sus respectivos tiempos de retención e iones primarios y secundarios empleados para la identificación y cuantificación.

ID	Compuesto	Tiempos de retención (min)	Iones Primarios	Iones Secundarios
1	Ácido Acetilsalicílico	11.68	195	237 - 196
2	Ácido Clofibrico	12.28	143	273 - 271
3	Ibuprofeno	12.68	263	264 - 161
4	Nonilfenol	14.1	277	278 - 334
5	Gemfibrozilo	15.84	243	179 - 307
6	Naproxeno	17.02	287	185 - 288
7	Ketoprofeno	18.29	311	295 - 312
8	Carbamazepina	18.91	193	194 - 293
9	Diclofenac	19.36	352	214 - 409
10	BPA	20.97	441	207 - 442
11	Estrógeno	23.39	327	328 - 384

Resultados y discusión

Las condiciones cromatográficas empleadas permitieron resolver todos los compuestos analizados (**Figura 2**). A su vez, se obtuvieron curvas de calibración con $R^2 > 0.995$.

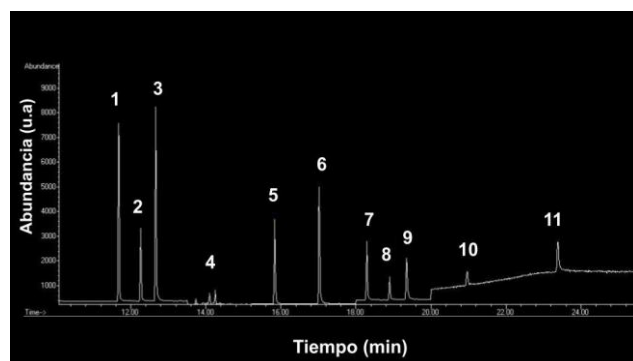


Figura 2.- Cromatograma de la corrida. Los números corresponden a los ID de los compuestos (tabla 1).

Por otro lado, el método de *clean-up* y extracción empleado permitió analizar las muestras de efluentes domésticos. En ambas muestras se halló ibuprofeno (4.71 y $4.82 \mu\text{gL}^{-1}$) y ketoprofeno (4.82 y $3.05 \mu\text{gL}^{-1}$), ambos antiinflamatorios no esteroideos (de sus siglas en inglés, AINE). El uso continuado de AINE conduce a su liberación persistente en el agua, por lo que su impacto potencial en los organismos acuáticos es una preocupación importante. El ketoprofeno es ampliamente utilizado con un consumo mundial comparable o incluso superior al del diclofenac y presenta un riesgo potencial para las especies terrestres y acuáticas en el medio ambiente (Wang et al. 2018). Praskova et al. (2013) informaron alteraciones en la función reproductora de peces expuestos a concentraciones de $3 \mu\text{gL}^{-1}$ de ketoprofeno. Por otro lado, Praskova et al. (2011) también reportaron un efecto

tóxico del ketoprofeno en embriones de zebrafish (*Danio rerio*).

Similares concentraciones a las encontradas fueron reportadas por otros autores en cuencas urbanas de la provincia de Buenos Aires. Elorriaga et al (2012) informaron concentraciones de ibuprofeno en agua superficial en un rango entre 0.4 - $13 \mu\text{gL}^{-1}$ mientras que Mastrángelo et al. (2022) encontraron este compuesto no solo en agua superficial (12.7 - $47.1 \mu\text{gL}^{-1}$) si no que también bioacumulado en organismos vivos como biofilm ($63 \text{ ng g}^{-1}\text{ps}$). En cuanto al ketoprofeno, no fue analizado en cuerpos de agua de la Argentina pero en otros estudios (Verlicchi et al. 2012; Mendoza et al. 2015) reportaron valores medios de ketoprofeno de $1.0 \mu\text{gL}^{-1}$ en efluentes crudos.

Conclusiones

El método empleado permitió el análisis de contaminantes emergentes en el orden de las trazas. Aunque no se analizaron efluentes cloacales y se contó con una muestra limitada de descargas, se encontraron concentraciones alarmantes de AINE en las dos muestras analizadas, lo que indica una entrada directa de estos compuestos a un cuerpo de agua superficial urbano. Dada la complejidad asociada al tratamiento de estos compuestos y su impacto en la biota, es crucial intensificar los esfuerzos de monitoreo para determinar las concentraciones en el ambiente y evaluar alternativas de tratamiento.

En este sentido, el desarrollo de esta técnica nos permitirá evaluar la presencia de los contaminantes en aguas superficiales y efluentes domésticos, al mismo tiempo que evaluar la eficiencia de remoción de los mismos mediante el uso de humedales construidos.

Referencias

- Elorriaga, Y., Marino, D.J., Carriquiriborde, P. et al. (2013). "Human Pharmaceuticals in Wastewaters from Urbanized Areas of Argentina". *Bull Environ Contam Toxicol* 90, 397-400. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0919-x>
- Gomez, B. M., Diaz, N. S., Saraceno, M., Sinistro, R., & Graziano, M. (2023). Co-production of just nature-based solutions to mitigate the impact of domestic effluents on stream water quality in an informal urbanization in Latin America: Diagnosis and a pilot study. *Earth ArXiv*. Preprint.
- Mastrángelo, M. M., Valdés, M. E., Eissa, B., Ossana, N. A., Barceló, D., Sabater, S., ... & Giorgi, A. D. N. (2022). "Occurrence and accumulation of pharmaceutical products in water and biota of urban lowland rivers". *Science of the Total Environment*, 828, 154303.
- Mendoza, A., Acena, J., Pérez, S. López de Alda, M., Barceló, D., Gil, A., Valcárcel, Y., (2015). "Pharmaceuticals and iodinated contrast media in a hospital wastewater: a case study to analyse their presence and characterise their environmental risk and hazard". *Environ. Res.* 140, 225e241.
- Praskova, E., St ep anov a, S., Chromcov a, L., Plhalova, L., Voslarova, E., Pistekov a, V., Prokes, M., Svobodova, Z., (2013). "The effects of subchronic exposure to ketoprofen on early developmental stages of common carp". *Acta. Veterinaria Brno* 82, 343e347.
- Praskova, E., Voslarova, E., Siroka, Z., Macova, S., Plhalova, L., Bedanova, I., Marsalek, P., Pistekova, V., Svobodova, Z., (2011). "Comparison of acute toxicity of ketoprofen to juvenile and embryonic stages of *Danio rerio*". *Neuro. Endocrinol. Lett.* 32 (Suppl. 1), 117e120.
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Galletti, A., Petrovic, M., Barcelo, D., (2012). "Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment". *Sci. Total Environ.* 430, 109e118.
- Wang, J., Zhao, S. Q., Zhang, M. Y., & He, B. S. (2018). "Targeted eco-pharmacovigilance for ketoprofen in the environment: Need, strategy and challenge". *Chemosphere*, 194, 450-462.