



Centro de Investigación en
Materiales Avanzados, S.C.



Universitat
de les Illes Balears

Dispositivo impreso en 3D para el muestreo *in situ* de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en agua y su determinación mediante técnicas cromatográficas

Tesis

Para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AMBIENTAL
(CIMAV)**

**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA
(UIB)**

Presenta:

César Castro García

ASESORES:

CIMAV: Dr. Rogelio Rodríguez Maese

UIB: Dra. Laura Ferrer Trovato

Agradecimientos

Quiero darle las gracias a las instituciones que han permitido el desarrollo de este trabajo cuyo resultado es, además de mi amplia formación en la ciencia, esta tesis, por el apoyo económico brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) que a través de la beca proporcionada (beca nacional) hizo posible la experiencia de trabajar y contribuir en el Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV, México) y en la Universidad de las Islas Baleares (UIB, España), instituciones a quienes agradezco profundamente por haberme recibido y brindado de tantas facilidades para mi grato desarrollo. También agradezco el soporte financiero a través del proyecto de investigación “Materiales y tecnologías de fabricación avanzadas para la monitorización y eliminación de contaminantes emergentes en aguas: hacia una economía circular del agua (CE3DMAT)”, Ref. PID2019-107604RB-I00, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (España).

De forma muy especial quiero agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Rogelio Rodríguez y la Dra. Laura Ferrer, y a quienes tutorizaron esta tesis de maestría en ambas instituciones, la Dra. Luz Leal y el Dr. Guillermo González, por siempre tener su puerta abierta, que gracias a sus consejos proporcionaron su experiencia y amplios conocimientos para ayudarme en el desarrollo de este trabajo, y así tuviera un final exitoso. De igual forma quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis compañeros y amigos del Grupo de Química Analítica Ambiental de la UIB, tanto Brenda, Jhon, Andreu, Dany, Marta, Neus y Ale que siempre me apoyaron y contribuyeron notablemente al proceso de madurez de este proyecto.

A mi familia por siempre apoyarme y animarme a seguir con mis estudios y estar siempre a una llamada de distancia y darme fuerzas para continuar haciendo lo que más me gusta hacer.

Por último, quiero agradecer profundamente a Mabel, tú sabes que sin tu ayuda esto jamás hubiera sido posible, y que eres esa motivación para salir adelante día a día, gracias por todo tu apoyo, tanto en lo profesional como en lo personal, por siempre estar ahí cuando te necesito y por creer en mí y hacerme ver que los sueños son posibles, gracias por esta experiencia juntos, espero que no sea la única.

A mis padres Jorge y Delia

A mi hermano Coco

A mis sobrinas Sofia y Harumi

A mi prometida Mabel

Índice

Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de Abreviaturas	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tablas	ix
Capítulo 1: Introducción	1
1.1. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)	2
1.1.1. Interés ambiental de los AINEs	6
1.1.2. Consumo de AINEs	10
1.1.3. Toxicidad	14
1.1.4. Normatividad	15
Capítulo 2: Metodología analítica.....	18
2.1. Extracción en fase sólida (SPE).....	19
2.2. Impresión en 3D	21
2.3. Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD)	23
2.4. Cromatografía de gases con detector de masas (GC/MS)	24
2.5. Espectrofotometría UV-Vis	26
Capítulo 3: Hipótesis y Objetivos	28
3.1. Hipótesis.....	28
3.2. Objetivo General	28
3.3. Objetivos específicos.....	29
Capítulo 4: Desarrollo experimental	30
4.1. Reactivos y material de laboratorio	30
4.2. Preparación y tratamiento de muestras	31
4.3. Planta de tratamiento de agua residual	32
4.4. Condiciones analíticas para la determinación de AINEs	34
4.4.1. Espectroscopía Uv-Vis	34
4.4.2. HPLC-DAD	34
4.4.3. GC/MS.....	35

4.5. Diseño e impresión del dispositivo de extracción	35
4.5.1. Software Rhinoceros 3D 6.....	35
4.5.2. Software PreForm.....	36
4.5.3. Características de las impresoras 3D	37
4.6. Métodos de recubrimiento	39
4.7. Diseño de experimentos	40
Capítulo 5: Resultados y discusión	42
5.1. Evaluación de las resinas para la impresión en 3D	42
5.2. Diseño e impresión del dispositivo impreso en 3D	47
5.3. Evaluación de las resinas de extracción	50
5.4. Incorporación del dispositivo impreso en 3D a un sistema de bombeo	55
5.5. Optimización del sistema	56
5.6. Validación del método propuesto	63
5.7. Aplicación de la metodología en el análisis de muestras reales	68
Capítulo 6: Conclusiones	74
Recomendaciones	76
Referencias bibliográficas.....	77

Resumen

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son compuestos ampliamente utilizados en medicina humana y veterinaria. Se trata de medicamentos de venta libre que, por sus propiedades antiinflamatorias y antipiréticas presentan una gran demanda en su consumo. Dentro de éstos, los más utilizados son el ibuprofeno, el diclofenaco y el naproxeno, cuyo constante uso ocasiona la generación y liberación de residuos hacia el medio ambiente. En este sentido, se ha registrado su presencia en los efluentes de las Plantas Tratadoras de Agua Residual (PTAR), en ríos, lagos, mares e incluso en océanos. Por lo expuesto, la monitorización de AINEs en el medio ambiente es de suma relevancia, ya que incluso son clasificados como contaminantes emergentes.

En la presente tesis de maestría se presenta una nueva metodología para la extracción *in situ* de AINEs (paracetamol, ibuprofeno, ketoprofeno y diclofenaco) en agua, para su posterior determinación mediante técnicas cromatográficas, i.e. GC, HPLC. Se ha diseñado e impreso en 3D (resina Rigid 10k) un dispositivo que sirve de soporte para recubrirlo con una resina de extracción en fase sólida (Oasis Hlb) altamente selectiva para este tipo de compuestos. El método desarrollado permite alcanzar un factor de preconcentración de 33, límites de detección y de cuantificación de $0.86 \mu\text{g L}^{-1}$ y $2.58 \mu\text{g L}^{-1}$ de diclofenaco, respectivamente, contando con precisiones inter e intradía inferiores al 5% en términos de desviación estándar relativa. Para validar la metodología propuesta se realizaron ensayos de adición/recuperación en agua desionizada, de grifo, y agua residual, obteniéndose recuperaciones del 90%. El dispositivo de extracción *in situ* se puede reutilizar hasta 8 veces sin perder eficiencia de extracción. Además, se realizó un estudio en la PTAR del municipio de Calviá (Mallorca, España), donde se encontraron concentraciones de diclofenaco de $15.39 \pm 0.07 \mu\text{g L}^{-1}$ a la entrada del proceso de decantación primaria, $4.48 \pm 0.03 \mu\text{g L}^{-1}$ a la salida de la decantación secundaria y $0.090 \pm 0.001 \mu\text{g L}^{-1}$ a la salida del tratamiento terciario, demostrando tanto la viabilidad de la extracción *in situ* en un amplio rango de concentraciones y que la remoción de este tipo de contaminantes en la PTAR no es completa, liberándolos al medio ambiente.

Abstract

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are compounds widely used in human and veterinary medicine. These are over-the-counter medicines that, due to their anti-inflammatory and antipyretic properties, are in great demand in their consumption. Among these, the most used are ibuprofen, diclofenac and naproxen, whose constant use causes the generation and release of waste into the environment. In this sense, its presence has been recorded in the effluents of the Wastewater Treatment Plants (WWTP), in rivers, lakes, seas and even in oceans. Therefore, the monitoring of NSAIDs in the environment is of utmost relevance since they are even classified as emerging pollutants.

In this thesis presents a new methodology for the extraction in site of NSAIDs (paracetamol, ibuprofen, ketoprofen and diclofenac) in water, for subsequent determination exploiting chromatographic techniques, i.e., GC and HPLC. A device has been designed and printed in 3D (Rigid 10k resin) that serves as support to coat it with a highly selective solid phase extraction resin (Oasis Hlb) for this type of compounds. The method developed allows to reach a preconcentration factor of 33, detection and quantification limits of $0.86 \mu\text{g L}^{-1}$ and $2.58 \mu\text{g L}^{-1}$ of diclofenac, respectively, with inter and intraday accuracies of less than 5% in terms of relative standard deviation. To validate the proposed methodology, addition/recovery tests were carried out on deionized water, tap water, and wastewater, obtaining 90% recoveries. The on-site extraction device can be reused up to 8 times without losing extraction efficiency. In addition, a study was carried out in the WWTP of the municipality of Calviá (Mallorca, Spain), where diclofenac concentrations of $15.39 \pm 0.07 \mu\text{g L}^{-1}$ at the entrance of the primary decantation process, $4.48 \pm 0.03 \mu\text{g L}^{-1}$ at the exit of secondary decantation and $0.090 \pm 0.001 \mu\text{g L}^{-1}$ were found. at the exit of the tertiary treatment, demonstrating both the viability of in situ extraction in a wide range of concentrations and that the removal of this type of contaminants in the WWTP is not complete, releasing them into the environment.

Lista de Abreviaturas

3D. *Tres dimensiones*

ANOVA. Análisis de varianza

CAD. Diseño asistido por computadora

CE50. Concentración efectiva al 50%

CL50. Concentración letal al 50%

COX. Ciclooxygenasas

DBO. demanda bioquímica de oxígeno

DHD. Por mil habitantes al día

DOE. Diseño de experimentos

EMA. Agencia europea de medicamentos

ERA. Environmental risk assessment

FDA. Food and Drug Administration

FDM. Modelado por deposición fundida

GC. Cromatografía de gases

GC/MS. Cromatografía de gases con detector de masas

GC/MS/MS. Cromatografía de gases con espectrometría de masas en tandem

HPLC-DAD. Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos

LC-ES-MS/MS. Cromatografía líquida con electro spray acoplada a espectrometría de masas en tandem

LGEEPA. Ley general del equilibrio ecológico y de la protección al ambiente

MEC. Concentración ambiental media

NOEC. Concentración sin efectos observados

PEC. Concentración ambiental prevista

PNEC. Concentración ambiental prevista sin efectos

PPCP. Productos farmacéuticos y de cuidado personal

PTV. Inyector con temperatura programada

RP-HPLC-DAD. Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con detector de arreglo de diodos

SLA. Estereolitografía

SLS. Sinterizado selectivo por láser

SPE. Extracción en fase sólida

SPME. Micro extracción en fase sólida

Lista de Figuras

Figura 1. Fuentes de contaminación ambiental con AINEs.....	7
Figura 2. Consumo de AINEs en España entre 2013 y 2016. a) Total; b) Derivados del ácido propiónico; c) Coxibs; d) Derivados del ácido acético; e) Oxicams; f) Otros AINEs; g) Fenamatos; h) Butilpirazolidinas. Datos expresados por mil habitantes al día (DHD).	11
Figura 3. Consumo de derivados del ácido propiónico em España entre 2013 y 2016.	12
Figura 4. Consumo de coxibs (panel izquierdo) y derivados del ácido acético (panel derecho) en España entre el 2013 y 2016.	13
Figura 5. Principios activos más consumidos en España entre 2013 y 2016 (DHD).	14
Figura 6. Pasos básicos de una SPE.....	19
Figura 7. Ejemplos de dispositivos utilizados en SPE. A) Tipo cartucho; B) Tipo filtro.	20
Figura 8. Estructura química de resinas de SPE utilizadas.....	21
Figura 9. Diagrama de HPLC-DAD	23
Figura 10. Esquema de un sistema de GC convencional.....	25
Figura 11. Ubicación de PTAR Bendinat, Calviá, Mallorca, España. Los números indicados en círculos de colores indican a detalle la ubicación.....	33
Figura 12. Diagrama esquemático de la PTAR que indica la localización de puntos de muestreo. (A: Entrada a tratamiento primario; B: Salida de decantación secundaria; C: Salida de tratamiento terciario.).....	33
Figura 13. Interfaz del software Rhinoceros 3D. Vista de pantalla a través del monitor de una computadora.	36
Figura 14. Ejemplo de interfaz de usuario del software PreForm.	37
Figura 15. Impresoras Form 2 (A) y Form 3 (B).	38
Figura 16. Procedimiento de fijación de resina de extracción con la técnica Stick and cure.....	39

Figura 17. Procedimiento de fijación de resina de extracción con la técnica de tintado con PVDF.	40
Figura 18. Izq.: Comportamiento de las resinas de impresión inmersas en metanol al 100%; Der: Fotografía de cubos de 1 cm ³ ,24 horas de exposición; resinas de impresión a) Durable, b) Clear y c) Rigid 10k	44
Figura 19. Izq.: Comportamiento de las resinas de impresión inmersas en metanol al 50%; Der: Fotografía de cubos de 1 cm ³ ,24 horas de exposición; resinas de impresión a) Durable, b) Clear y c) Rigid 10k	44
Figura 20. Comportamiento de las resinas de impresión inmersas en metanol y acetato de etilo al 50%; Der: Fotografía de cubos de 1 cm ³ ,24 horas de exposición; resinas de impresión a) Durable, b) Clear y c) Rigid 10k	45
Figura 21. Comportamiento de las resinas de impresión inmersas en acetona y acetato de etilo al 50%; Der: Fotografía de cubos de 1 cm ³ ,24 horas de exposición; resinas de impresión a) Durable, b) Clear y c) Rigid 10k	45
Figura 22. Comportamiento de las resinas de impresión inmersas en metanol 98% e hidróxido de amonio al 2%; Der: Fotografía de cubos de 1 cm ³ ,24 horas de exposición; resinas de impresión a) Durable, b) Clear y c) Rigid 10k	46
Figura 23 Fotografía del dispositivo impreso en 3D para la extracción in situ de AINEs.	48
Figura 24 Tapa del dispositivo 3D. a: Pieza modelada en 3D con vista superior; b: Pieza modelada en 3D con vista frontal; c y d: Fotografías de distintas vistas de la tapa impresa mediante 3D.....	49
Figura 25 Red de Cubos interconectados. a: Pieza modelada en 3D en vista frontal; b: Vista en perspectiva de la pieza modelada en 3D; c: Vista superior de la pieza modelada en 3D; d) Fotografía a la pieza impresa en 3D.	49
Figura 26 Tubería con rosca externa a: Vista frontal del dispositivo modelado en 3D; b: Vista superior del dispositivo; c: Vista en perspectiva; d: Fotografía de la impresión en 3D del dispositivo.	50
Figura 2727. Capacidad de carga de las resinas de extracción en fase sólida. DIC: diclofenaco, PARA: paracetamol, IBU: ibuprofeno y KETO: ketoprofeno.....	52
Figura 28 Diagrama e imagen de dispositivo adaptado a sistema de bombeo preliminar. Uso de bomba peristáltica dentro del laboratorio.	55
Figura 29 Sistema de extracción para estudio en campo. Empleo en campo de una bomba de pulsos a un caudal de 2.5 L min ⁻¹	56

Figura 30. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados.....	60
Figura 31. Gráfica de superficie de respuesta: Área de pico vs volumen de derivatizante y volumen de eluyente.	60
Figura 32. Optimización de respuesta.....	61
Figura 33. Optimización de eluyente mediante ensayo univariante.	62
Figura 34. Perfiles cromatográficos característicos del paracetamol (1), ketoprofeno (2), diclofenaco (3) e ibuprofeno (4).	64
Figura 35. Gradiente utilizado en la determinación de AINEs por RP-HPLC.	64
Figura 36. Perfil cromatográfico de diclofenaco por GC/MS.....	65
Figura 37. Curva de calibración para diclofenaco en GC/MS.	66
Figura 38. Calibración de diclofenaco en agua ultrapura y en agua residual.	69
Figura 39. Rampa de temperatura de cromatografía de gases	70
Figura 40. Reutilización del dispositivo impreso en 3D recubierto con resina de SPE, para la extracción de diclofenaco.....	72

Lista de Tablas

Tabla 1 Clasificación de los AINEs según su estructura química.	3
Tabla 2 Fármacos antiinflamatorios habituales y sus parámetros fisicoquímicos.....	5
Tabla 3. Presencia de AINEs reportados en agua residual, superficial, subterránea y potable.....	8
Tabla 4. Reactivos utilizados.	30
Tabla 5 Especificaciones técnicas de las impresoras Form 2 y Form 3.....	38
Tabla 6. Concentraciones remanentes de AINEs para evaluar la adsorción sobre el material de impresión (resinas de impresión 3D).	46
Tabla 7. Procedimiento de extracción en fase sólida para cada resina de extracción.	51
Tabla 8. Resultados de extracción en fase sólida.....	52
Tabla 9. Eficiencia de extracción utilizando diferentes modalidades de recubrimiento de los dispositivos impresos en 3D.	54
Tabla 10. Factores y niveles evaluados.....	57
Tabla 11. Configuración aleatorizada del diseño experimental y su respuesta.	58
Tabla 12. Análisis de varianza (ANOVA).....	59
Tabla 13 Tiempos de retención de los 4 analitos analizados.....	63
Tabla 14. Áreas de picos correspondientes a patrones de diclofenaco de 10 y 70 $\mu\text{g L}^{-1}$ para calcular la precisión intradía del método.	67
Tabla 15. Áreas de picos correspondientes a un patrón de diclofenaco 70 $\mu\text{g L}^{-1}$ para calcular la precisión interdía del método.	68
Tabla 16. Recuperación de diclofenaco mediante el dispositivo impreso en 3D usando GC.	71
Tabla 17. Recuperación de diclofenaco mediante el dispositivo impreso en 3D al contacto con agua procedente de una PTAR.....	72

Capítulo 1: Introducción

La generación de residuos derivados del uso de fármacos, actualmente es considerada como un problema en el medio ambiente de contaminación emergente [1]. Cada año se consumen por encima de las 100,000 t de fármacos en todo el mundo, tanto en medicina humana como veterinaria, lo que ocasiona una elevada generación de residuos y su liberación hacia el medio ambiente, sobre todo hacia los ecosistemas acuáticos [2].

Entre los fármacos más utilizados se encuentran los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), como el ibuprofeno, el naproxeno y el diclofenaco, cuya demanda ha crecido considerablemente por su fácil accesibilidad y sus propiedades coadyuvantes en la reducción del dolor y la fiebre. Además de ingerirse en cápsulas o granulados, su uso se ha generalizado en ungüentos (cremas o geles) y parches transdérmicos.

Una vez que estos fármacos y/o sus metabolitos son excretados principalmente en orina [3], ingresan fácilmente al medio ambiente a través de las aguas residuales. Debido a que las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) no están diseñadas para la remoción de estas sustancias, la presencia de las mismas se ha detectado en aguas superficiales, subterráneas e incluso potables [2,4]. Por ejemplo, algunos autores han reportado concentraciones de ibuprofeno y naproxeno de hasta 669 y 2.15 ng L⁻¹, respectivamente, mientras que el diclofenaco está reportado entre 0.6 y 411 µg L⁻¹, [5–7]. Estos contaminantes son considerados emergentes por su alta persistencia y baja degradación en el medio ambiente, que incluso a muy bajas concentraciones, pueden ser potencialmente tóxicos para los organismos acuáticos, afectando el sistema endocrino de los peces o promoviendo el desarrollo de cepas de microorganismos multirresistentes, y que además pueden llegar a afectar la salud de la población humana si no son regulados y controlados [8].

1.1. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Los AINEs son un grupo de fármacos que se emplean como antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos ya que reducen los síntomas de la inflamación, el dolor y la fiebre, respectivamente. Para ello basan su mecanismo de acción en la inhibición de las enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), tanto de forma reversible (la mayoría de los AINEs) o irreversible (ácido acetilsalicílico). Estas enzimas son las encargadas de regular la producción de ácido araquidónico y su conversión en prostaglandinas y tromboxanos, presentes en los procesos inflamatorios, febriles o dolorosos [9].

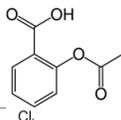
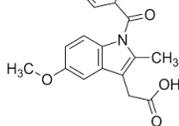
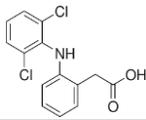
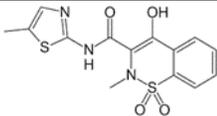
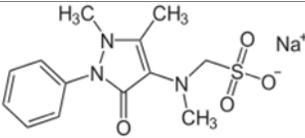
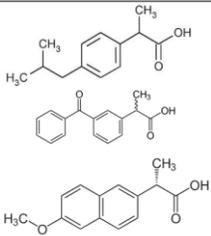
El desarrollo de los AINEs tiene su origen en el año 1763, cuando el reverendo E. Stone realizó el primer estudio clínico sobre los efectos del extracto de sauce como tratamiento antifebril. Más tarde en 1828, J. A. Buchner descubrió que el ingrediente activo de la corteza de sauce es la salicina, un glucósido que mediante hidrólisis libera glucosa y alcohol salicílico. Éste último podía ser convertido en ácido salicílico (antecesor de la aspirina), un compuesto que presenta propiedades analgésicas y antiinflamatorias, sintetizado por primera vez en 1859 por Kolbe. Ya en 1897, F. Hoffmann descubrió el ácido acetilsalicílico, el cual constituye el principio activo de la aspirina [10]. Tras el descubrimiento de la aspirina se impulsó el desarrollo de toda una familia de fármacos, los AINEs. Más de 30 millones de personas consumen diariamente AINEs en el mundo y este consumo se irá incrementando año tras año debido al aumento de la población y al gran consumo que tienen estos medicamentos, en su mayoría, de venta libre [11].

En el desarrollo posterior de otros AINEs, los factores considerados fueron el transporte de estos fármacos a través de las membranas biológicas, la estructura atómica, electrónica y espacial de la molécula. Además, para aumentar su eficacia debe tener una constante de acidez entre 4 y 5, un coeficiente de partición de aproximadamente 10 y dos anillos aromáticos retorcidos entre sí. Como resultado se obtuvo el diclofenaco sódico, que tiene una constante de acidez de 4.0 y un coeficiente de partición de 13.4. Los elementos estructurales incluyen un grupo ácido fenil acético, un grupo amino secundario y un anillo fenilo que contiene átomos de cloro, que causan la máxima torsión del anillo. Los hallazgos

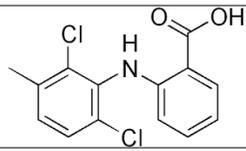
experimentales y clínicos obtenidos hasta la fecha han indicado que el diclofenaco sódico se sintetizó sobre principios bien fundados [12].

Según su estructura química, los AINEs se clasifican en diversos grupos terapéuticos o familias (Tabla 1). Entre los AINEs detectados con mayor frecuencia en el medio ambiente se incluyen el diclofenaco, ibuprofeno y naproxeno, todos ellos reconocidos como contaminantes emergentes, los cuales tienen un coeficiente de partición alto en octanol y valores bajos de pK_a como se puede observar en la Tabla 2, junto con otros AINEs que son de uso habitual [13].

Tabla 1 Clasificación de los AINEs según su estructura química.

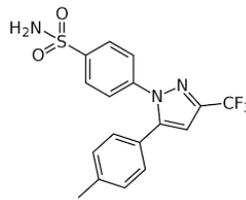
Grupo terapéutico	Estructura química	Fármaco
Salicilatos		Ácido acetilsalicílico
Derivados indolacéticos		Indometacina
Derivados arilo-acéticos		Diclofenaco
Ácidos enólicos: Oxicanes		Meloxicam
Ácidos enólicos: Pirazolonas		Metamizol
Derivados aril- propiónicos		Ibuprofeno Ketoprofeno Naproxeno

Fenamatos



Ácido meclofenámico

**Inhibidores selectivos de
la COX-2**



Calecoxib

Tabla 2 Fármacos antiinflamatorios habituales y sus parámetros fisicoquímicos.

AINE	pK _a	Solubilidad (mg L ⁻¹) (20°C)	Log K _{ow}	K _{Hi} (atm m ³ mol ⁻¹)	Destino ambiental	Forma metabólica en el agua
Ibuprofeno	4.38	21	3.97	1.5 x10 ⁻⁷	Biodegradación, sedimentación	Ácido 2- [4- (2-hidroxil-2metilpropil) fenil] propiónico, ácido 2- [4- (2-carboxipropil) fenil] propiónico, ácido carboxihidratrópico (carboxi-HA)
Naproxeno	4.15	144	3.18	3.4 x10 ⁻¹⁰	Foto degradación, biodegradación	NPX, metabolito 6-O-desmetilado, DM-naproxeno
Diclofenaco	4.24	2	4.51	3.1 x10 ⁻¹⁴	Foto degradación, biodegradación parcial	4'-Hdroxi DCF, 4'5-dihidroxi DCF, 3'-hidroxi DCF, 5'-hidroxi DCF, 3 ' hidroxi-4'-metoxi DCF
Ketoprofeno	4.07	51	3.12	2.1 x10 ⁻¹¹	Foto degradación, biodegradación parcial	Ácido 2- (3-benzoilfenil) propanoico, ácido 2- [3-(3hidroxibenzoil) fenil] propanoico, ácido 2- [3-(4hidroxibenzoil) fenil] propanoico, 2- [3 (hidroxi (fenil) metilo) ácido fenil] -propanoico
Paracetamol	9.38	12900	0.46	N.D.	Biodegradación	Conjugados de sulfato, paracetamol cisteína, mercapturato
Aspirina	3.5	4600	1.20	N.D.	Biodegradación	ACA, ácido salicílico, ácido orto-hidroxi-hipúrico, ácido gentísico

N.D. (No detectado), K_{Hi} (Constante de Henry), Log K_{ow} (Coeficiente de reparto octanol-agua).

1.1.1. Interés ambiental de los AINEs

Actualmente, la liberación doméstica de estos fármacos al medio ambiente y su ineficiente eliminación a través del tratamiento convencional de aguas residuales, han provocado un aumento en el interés de su monitoreo y análisis [14]. Estudios recientes han revelado la presencia de bajas concentraciones de AINEs en cuerpos de agua dulce, pero dado a que sus metabolitos son biológicamente activos, éstos pueden llegar a afectar a los organismos acuáticos, especialmente a los peces [15]. Otra de las fuentes de emisión al medio ambiente es la industria farmacéutica, que, aunque cuenten con PTAR propias, sus efluentes descargan directamente a las PTAR municipales; ahí, los AINEs pueden ser concentrados en los lodos, que posteriormente se depositan en el suelo o se utilizan como fertilizantes. Además, la mala disposición de los residuos generados de estos fármacos dentro del uso veterinario ocasiona su emisión directa al medio ambiente, ya sea de manera líquida o sólida contaminando el suelo o pudiendo llegar al agua subterránea por lixiviación, representando así una amenaza para el agua potable y pudiendo ingresar incluso en las cadenas tróficas, tal y como se observa en la Figura 1 [16].

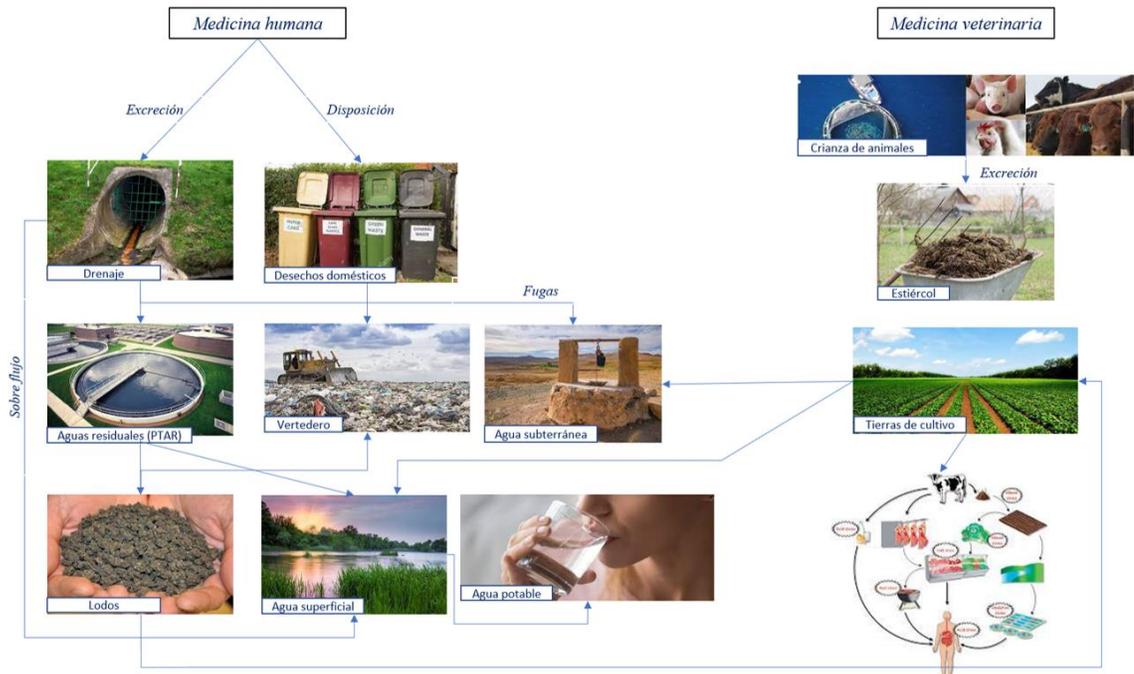


Figura 1. Fuentes de contaminación ambiental con AINEs.

Se estima que la cantidad de este tipo de contaminantes que ingresa al medio ambiente se encuentra en el orden de millones de toneladas al año [17,18]. Los niveles de concentración varían de un país a otro según el patrón de consumo y de los principios activos, la población y la eficiencia de las plantas de tratamiento [19]. Además, como se puede observar en la Tabla 3, los AINEs han sido reportados en una multitud de países, no solo en el agua residual, sino también en diferentes cuerpos de agua [20].

Tabla 3. Presencia de AINEs reportados en agua residual, superficial, subterránea y potable.

AINEs	Agua residual				Agua superficial		Agua subterránea		Agua potable	
	País o Continente	Influyente $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente $\mu\text{g L}^{-1}$	% Remoción	País o continente	Concentración $\mu\text{g L}^{-1}$	País o continente	Concentración $\mu\text{g L}^{-1}$	País o continente	Concentración $\mu\text{g L}^{-1}$
Diclofenaco	EE. UU	0.001-94.2	0.001-0.69	0-81	Costa Rica,	ND-1043	Europa, Francia, Alemania, España	0-3050	Alemania	1-1935
	Canadá	-	4	-	Francia, Grecia, Reino Unido.					
	Taiwán	-	10-100	-	Reino Unido	<0.5-154	España	0.001-0.225	Francia	2.5
	Reino Unido	69-1500	58-599	<96	Alemania	4.6				
Ibuprofeno	China, EE. UU, Grecia, Corea.	0.004-603	ND-55	72-100	Canadá, China, Costa Rica, Francia.	ND-1417	Europa, España, EE.UU.	0.311-185	Alemania	3
	Reino unido	1681- 33764	143-4239	<99	Inglaterra	1-2370	Portugal	1825	EE. UU	1350
Ketoprofeno	China, EE. UU, España, Corea.	0.004-8.56	0.003-3.92	11-100	Costa Rica, Francia, Grecia,	ND-190	Europa, Francia.	2.8-26	Finlandia	8

					Reino Unido.					
	Reino Unido	28-102	16-23	<84	Inglaterra	14	Portugal	0.09	Francia	3
Naproxeno	Grecia, Corea, España, Suiza, Reino Unido	0.002-52.9	0.002-5.09	43-98	Reino Unido	1-59	Francia, España	1.2-204	Francia	<0.005
	Reino Unido	838	170	<85	China, Canadá, Francia.	ND-328	España	0-0.004		
Ácido acetilsalicílico	Grecia, España, Reino Unido.	0.58-63.7	ND-0.5	89-100	China.	0.009-2.09	China	0.0473	ND	ND
Acetaminofén	Corea, España.	1.57-56.9	ND-0.03	98-100	España	0.14	EE. UU	1.89	Francia	210.1
Indometacina	EE. UU, Corea, España.	0.017-1.27	0.005-0.39	0-70	España	0.001	ND	ND	ND	ND

N.D.: No determinado.

Los AINEs se consideran contaminantes hidrófilos, por lo que son capaces de atravesar los procesos de tratamiento de las PTARs, y por ello son liberados al medio ambiente alcanzando las masas acuáticas en concentraciones considerables de 0.03 a 0.25 $\mu\text{g g}^{-1}$ de lodos, debido a su alta solubilidad en agua [21].

En la mayoría de los casos, las concentraciones de AINEs son menores en las aguas subterráneas y superficiales en comparación con el efluente de agua residual, debido a procesos naturales como la biotransformación, fotólisis, sorción, volatilización y dispersión. En un estudio realizado en el sureste de la India en el 2021, se encontraron estos compuestos en afluentes y efluentes de una PTAR, revelando que una amplia variedad en los parámetros encontrados dependían ampliamente de la localización geográfica, tamaño de la PTAR, consumo de agua de la población y si estaba cerca de una fábrica de medicamentos [7].

1.1.2. Consumo de AINEs

En lo que respecta a España, la agencia española de medicamentos y productos sanitarios realizó un estudio donde se detalla un aumento en el uso de fármacos AINEs en España durante el periodo del 2013 al 2016. En él se presenta el consumo de productos antiinflamatorios dispensados tanto con receta médica del Sistema Nacional de Salud, como los consumidos sin incluir datos de recetas en la atención médica privada o en el ámbito hospitalario [22].

El consumo de AINEs en España ha pasado de 43.12 por mil habitantes al día (DHD) en el año 2013 a 37.89 DHD en el año 2016, lo que supone un descenso del 12% (Figura 2a), observándose este decremento en todos los subgrupos. En el subgrupo de derivados del ácido propiónico destaca el ibuprofeno, que continúa siendo el principio activo de mayor demanda (51% del subgrupo en 2016) también a pesar de la disminución de su consumo a lo largo del periodo de estudio (18.27 DHD en 2013– 13.67 DHD en 2016). El naproxeno, el segundo de mayor consumo, ha experimentado un aumento del 39% (6.12 DHD en 2013 a 8.56 en 2016), al igual que dexketoprofeno (2.51–2.99 DHD)

y la combinación de naproxeno con esomeprazol (1.29 – 1.33 DHD), aunque para estos últimos el incremento en términos absolutos no ha sido significativo (Figura 3).

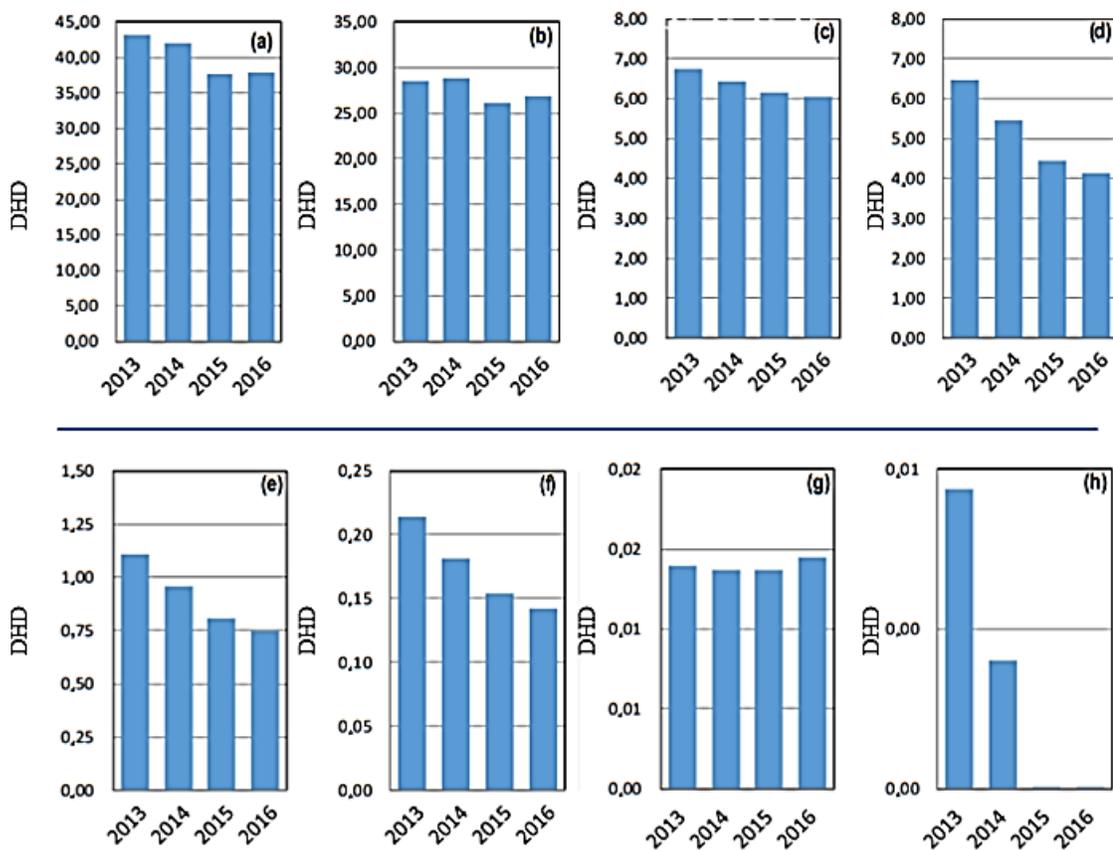


Figura 2. Consumo de AINEs en España entre 2013 y 2016. a) Total; b) Derivados del ácido propiónico; c) Coxibs; d) Derivados del ácido acético; e) Oxicams; f) Otros AINEs; g) Fenamatos; h) Butilpirazolidinas. Datos expresados por mil habitantes al día (DHD).

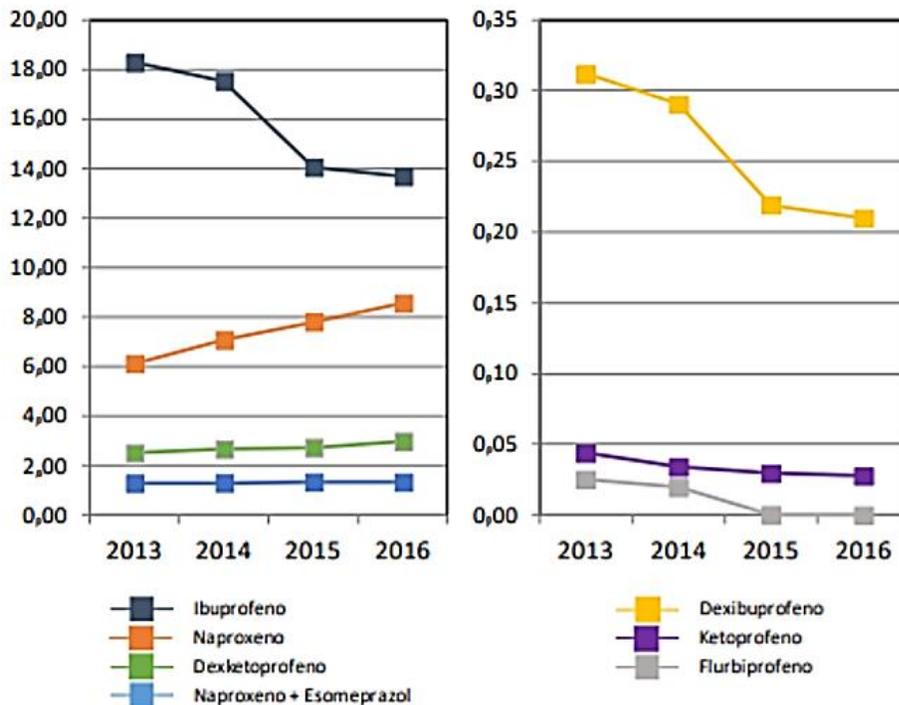


Figura 3. Consumo de derivados del ácido propiónico en España entre 2013 y 2016.

El siguiente subgrupo más utilizado ha sido el de los coxibs (que incluye etoricoxib y celecoxib) (16% del consumo de 2016), con una ligera disminución en este período (6.75 DHD en 2013 a 6.06 DHD en 2016). El consumo de etoricoxib se ha mantenido prácticamente estable durante el periodo, siendo el tercer principio activo más utilizado en 2016 desplazando al diclofenaco. Por su parte, el consumo de celecoxib ha disminuido (3.22 DHD a 2.46 DHD) en este período (Figura 4, panel izquierdo).

Los derivados del ácido acetil salicílico, corresponden al tercer subgrupo de AINEs más utilizado (11% del total del grupo en 2016) con una disminución en su demanda del 36% (6.46 DHD en 2013 y 4.12 DHD en 2016). Destaca la reducción del diclofenaco (4.88 a 3.15 DHD), el de mayor consumo del subgrupo con el 76% en 2016, pasando de un 11% en el 2013 a un 8% del consumo en el 2016 respecto al total de AINEs (Figura 4, panel derecho). El aceclofenaco es el segundo derivado del ácido acético de mayor consumo (13% en 2016), y también presenta disminución en su consumo (1.01 a 0.57 DHD) (Figura 4, panel derecho).

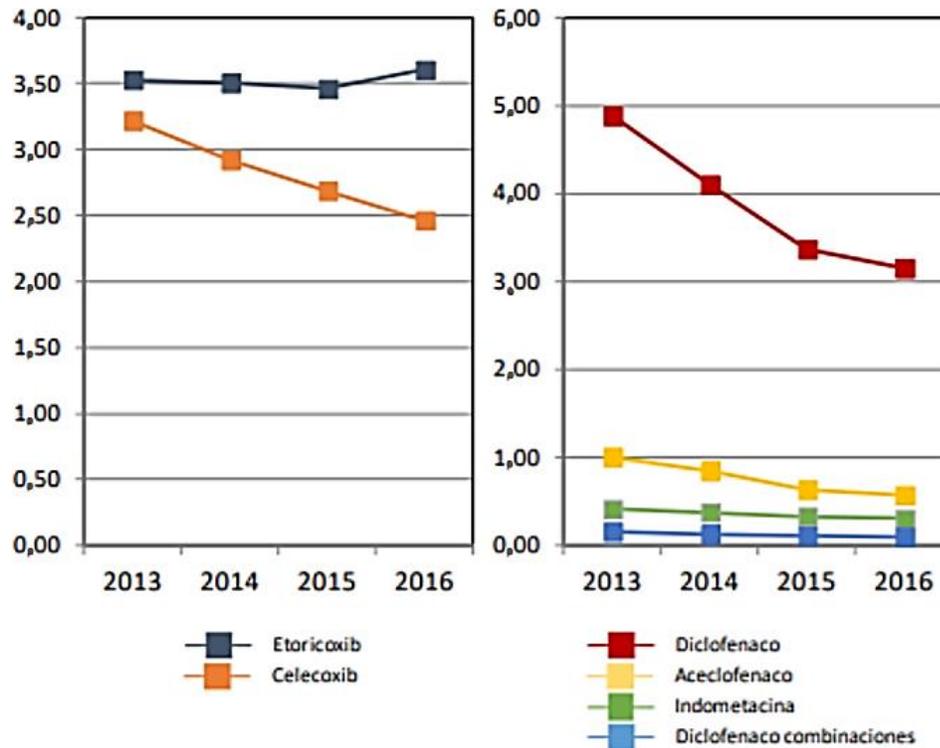


Figura 4. Consumo de coxibs (panel izquierdo) y derivados del ácido acético (panel derecho) en España entre el 2013 y 2016.

Entre los principios activos, los más utilizados han sido el ibuprofeno con un 36% del total de consumo de AINEs en el año 2016, seguido por el naproxeno (22%) y el etoricoxib (9%), a diferencia del año 2013 donde fueron ibuprofeno (42%), naproxeno (14%) y diclofenaco (11%) (Figura 5). Las variaciones de los tres principios activos de mayor consumo en 2013 (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco) en comparación con 2016, podrían tener relación con la revisión de la seguridad de los AINEs en 2012 en la que el ibuprofeno y el naproxeno se postulaban como los medicamentos del grupo más seguros mientras que para diclofenaco se encontraba un pequeño aumento del riesgo de efectos adversos cardiovasculares en comparación con otros AINEs [23], lo cual se confirmó en una evaluación posterior (2013), estableciéndose restricciones en su uso [24]. Posteriormente, en la evaluación de la seguridad de ibuprofeno y dexibuprofeno realizada en 2015, se establecieron también recomendaciones de uso para estos medicamentos en pacientes con patología cardiovascular [25].

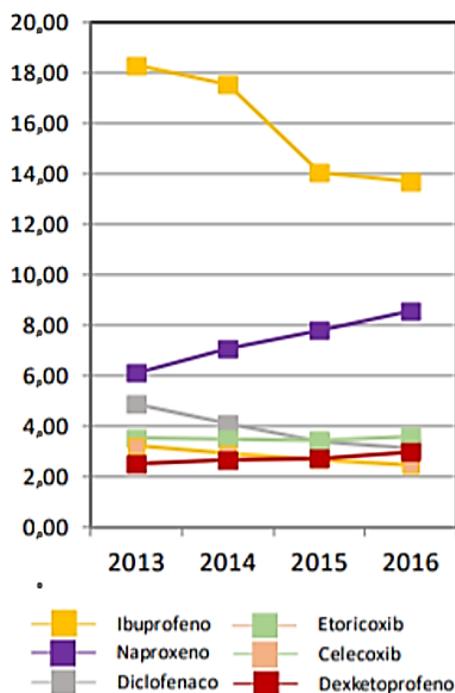


Figura 5. Principios activos más consumidos en España entre 2013 y 2016 (DHD).

En México se han realizado pocos estudios sobre el consumo de AINEs, sin embargo, estos señalan que existe un aumento en su consumo. La Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo realizó un estudio en el 2015 en donde encontraron que, por orden de ventas, se comercializan sin prescripción médica el naproxeno, paracetamol, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico y diclofenaco. En comparación, el orden de ventas por prescripción es paracetamol, naproxeno, ácido acetilsalicílico, diclofenaco e ibuprofeno. En lo que respecta a las ventas en farmacias, éstas oscilan entre 6 y 30 kg al año, mientras que por prescripción se venden desde menos de un kilo hasta 22 kg al año [26].

1.1.3. Toxicidad

La principal preocupación acerca de las implicaciones tóxicas de los AINEs es que fueron diseñados específicamente para maximizar su actividad biológica en dosis bajas. Un estudio reveló que el diclofenaco en el agua a niveles de 5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ afecta en los peces

la integridad de los riñones, las branquias y algunos parámetros inmunitarios seleccionados [27].

En general, la toxicidad de los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCP), y en particular de los AINEs, varía según el organismo expuesto, la duración de la exposición y la concentración a la que se expone [28]. Dado que muchos de los contaminantes que provienen de productos farmacéuticos se introducen al medio ambiente después del uso en humanos o en animales, las concentraciones de sus metabolitos pueden ser más significativas que las de los compuestos originales. Por ejemplo, se encontró que algunos metabolitos acetilados de antibióticos (como N4-acetilsulfapiridina) eran más tóxicos que el compuesto original (sulfapiridina) para las algas, mientras que los productos de fotodegradación del naproxeno tienen efectos más dañinos que el compuesto original en las algas, rotíferos y microcrustáceos [29,30].

1.1.4. Normatividad

Por propia definición, los contaminantes emergentes, entre los que se encuentran los AINEs, no están incluidos en ninguna regulación y no existe normatividad que regule su concentración en el medio ambiente y su alcance en las evaluaciones del riesgo al medio ambiente, tanto de los fármacos como de sus metabolitos. Sin embargo, es importante empezar a trabajar en lineamientos que favorezcan el establecimiento de medidas de control y mitigación del riesgo identificado o potencial a través de la solicitud de estudios de evaluación del riesgo en el medio ambiente (ERA, por sus siglas en inglés) de los medicamentos que se encuentren solicitando un nuevo registro, así como del requerimiento de un monitoreo al medio ambiente post-comercialización. Lo anterior, debería complementarse con políticas sanitarias e institucionales que apunten al uso racional, sobre todo de aquellos fármacos que representan un mayor riesgo para el medio ambiente.

Actualmente, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, por sus siglas en inglés) y la Agencia de Alimentos y Medicamentos de EUA (FDA, por sus siglas en inglés), al ser

organismos con carácter legal internacional en lo que respecta a evaluar el impacto en el medio ambiente de medicamentos, solicitan que se realice una ERA para todo nuevo producto farmacéutico. En una primera fase de evaluación, se pide calcular la concentración prevista (PEC, por sus siglas en inglés) para el principio activo y/o sus metabolitos principales en el compartimento acuático. Si la PEC es menor que 0.01 mg L^{-1} no se requieren más evaluaciones, pero si la PEC supera este umbral, entonces se solicita estimar, en una segunda fase de evaluación, la concentración prevista sin efectos (PNEC, por sus siglas en inglés) por medio de ensayos de ecotoxicidad aguda en algas (en el caso de las regulaciones de la EMA) o en dafnias y peces (para la FDA).

La PNEC se extrapola al dividir el valor más bajo de concentración efectiva 50 (CE50), concentración letal 50 (CL50), o concentración sin efectos observados (NOEC) por un factor de evaluación (normalmente 1000). Si el cociente entre las concentraciones PEC/PNEC es menor que 1, se considera poco probable que el principio activo presente un riesgo para el medio ambiente. Si, por el contrario, resulta superior a 1, existe un riesgo importante que requiere una tercera fase de evaluación donde se realizan consideraciones específicas para cada caso. Si en esta fase se descubre un riesgo residual inaceptable, el fármaco no se prohíbe, puesto que el beneficio hacia los pacientes predomina sobre el riesgo al medio ambiente, sin embargo, se adoptan medidas preventivas de seguridad; por ejemplo, su uso clínico restringido (exclusivo en hospitales) y su monitoreo post-comercialización. Con la aplicación de estos lineamientos se ha encontrado que el paracetamol y el ibuprofeno, tienen un cociente de riesgo PEC/ PNEC menor a 1; mientras que para el diclofenaco se ha calculado un cociente PEC/PNEC mayor a 1. Sin embargo, algunos autores reconocen que este indicador del riesgo al medio ambiente aún es perfectible ya que el parámetro PNEC se calcula usualmente con base en datos de mortalidad, dejando de lado el riesgo ante exposiciones crónicas y efectos subletales. Una alternativa podría ser el uso de la concentración en el medio ambiente medida (MEC), pero para muchos AINEs aún no se cuenta con esos datos.

En lo que respecta a la toxicidad en organismos, desde hace varios años la normatividad europea ha pautado un sistema de clasificación de sustancias con base en su categoría de riesgo de acuerdo con su CL50 en organismos acuáticos. Los compuestos con

una CL50 menor a 1 mg L^{-1} se clasifican como extremadamente tóxicos, aquellos con CL50 entre 1 y 10 mg L^{-1} son tóxicos y valores entre 10 y 100 mg L^{-1} corresponden a sustancias catalogadas como peligrosas. Cabe señalar que estos requerimientos europeos establecidos hace casi una década, se aplican específicamente a los riesgos previstos como consecuencia del uso, almacenamiento y la disposición de productos farmacéuticos y no de aquellos riesgos que pudieran surgir de la síntesis o manufactura de estos. Así mismo, para fármacos altamente lipofílicos ($\log K_{ow} > 4.5$) o con potencial de actuar como disruptores endocrinos, se requieren forzosamente estudios ERA independientemente de la cantidad en que se prevea que entrarán al medio ambiente. Los reportes deben incluir datos de consumo estimados para el fármaco en cuestión, su $\log K_{ow}$, los resultados de los estudios de toxicología acuática y datos de emisión, destino y efectos al medio ambiente, entre otros. También, deberán presentar en detalle la evaluación de los riesgos, así como las medidas de control y mitigación del riesgo que se habrán de considerar. La EMA también pide a la industria farmacéutica reportar las evaluaciones de los coeficientes de partición de los productos farmacéuticos entre el agua y lodos/sedimento/suelo/materia en suspensión, los procesos de adsorción en superficies sólidas, los estudios de biodegradación en agua, suelo y sedimento y, los estudios donde se simulen las condiciones de una planta de tratamiento [31]. Cabe resaltar que en el año 2018 bajo la directiva europea 2018/840, se retiró al diclofenaco de la lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento.

Por su parte, el marco regulatorio mexicano es un área de oportunidad importante para reforzar acciones que reduzcan el posible impacto al medio ambiente ocasionado por la generación de este tipo de desechos. En materia de disposición de residuos, en general se cuenta con la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA), la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos y las Normas Oficiales Mexicanas 052, 055, 056, 057, 058, 083, 087, entre otras, que en conjunto omiten a este tipo de compuestos ya que no están incluidos.

Capítulo 2: Metodología analítica

A continuación, se presentan los procedimientos analíticos utilizados para la determinación de los AINEs. Se exponen de manera breve los diferentes métodos para su extracción y separación, los avances en el diseño de dispositivos con tecnología en 3D para un eficiente pretratamiento de muestra y finalmente los sistemas de detección que utilizados para su determinación.

El tratamiento de la muestra es de suma importancia, ya que de esto depende en gran medida el desempeño de la cuantificación del analito de interés. Si este paso no se hace bajo las condiciones adecuadas, puede repercutir en un error en los resultados.

Recientemente se han desarrollado varios métodos para la extracción de AINEs y sus metabolitos a muy bajas concentraciones (inferiores a ng L^{-1}). La mayoría de ellos, incluyen la extracción o microextracción en fase sólida (SPME) [32] y posterior derivatización, para realizar su separación y determinación a través de métodos cromatográficos, dentro de los cuales destacan, la cromatografía de gases-masas (GC/MS) [33], la cromatografía con espectrometría de masas en tándem (GC/MS/MS) [34], cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) utilizada comúnmente en fase reversa (RP-HPLC-DAD) y la cromatografía líquida con *electro spray* acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-ES-MS/MS)[35].

La espectrofotometría UV-Vis, si bien puede ser utilizada para la detección de AINEs, no cuenta con la resolución necesaria para detectar estos compuestos a niveles traza, por lo que el pretratamiento de la muestra es un factor relevante para alcanzar un factor de preconcentración elevado. Para garantizar límites de detección y cuantificación adecuados, el papel del pretratamiento toma suma importancia ya que, entre más se logre eliminar interferencias a la muestra se mejora la eficiencia de la señal analítica del compuesto de interés, lo cual traerá como resultado llegar a límites de detección y cuantificación más bajos y efectivos para el análisis de muestras del medio ambiente.

2.1. Extracción en fase sólida (SPE)

La extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés), es una de las técnicas de extracción más utilizadas ya que, mediante el uso de resinas selectivas, permite la extracción de los analitos de interés desde matrices complejas. Esta técnica se basa en la distribución de los analitos en dos fases: una estacionaria sólida y otra móvil líquida.

La SPE comprende cuatro pasos principales: (i) el acondicionamiento de la fase sólida o resina, (ii) la carga o paso de la muestra por la fase sólida y la retención selectiva del compuesto de interés, (iii) el enjuague o lavado para la eliminación de los interferentes y (iv) finalmente la elución del analito o compuestos extraídos de la matriz de la muestra, donde para un volumen de elución menor que el de la muestra, además tiene lugar la preconcentración (Figura 6).

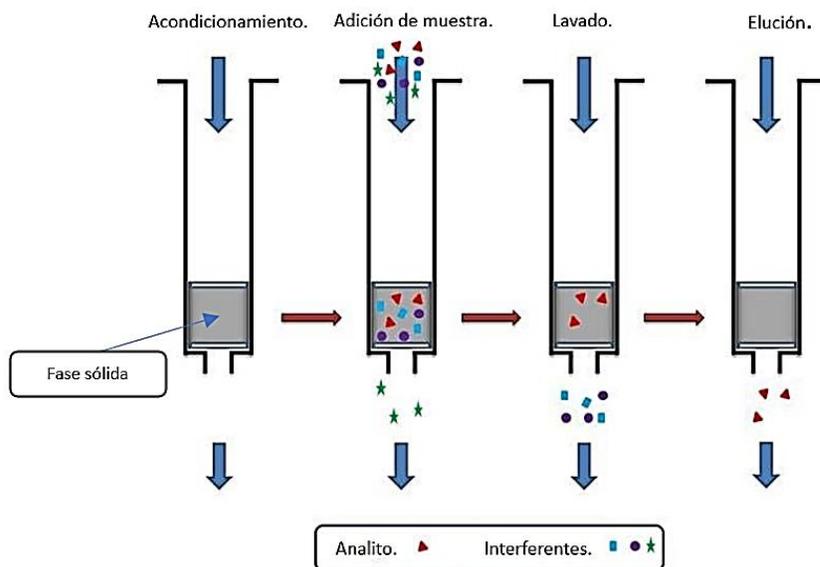


Figura 6. Pasos básicos de una SPE.

En estudios previos se ha utilizado satisfactoriamente la SPE para la extracción de los AINEs, empleando las resinas tC18 de Sep-Pak, Oasis Hlb y Oasis MCX [5, 36, 37].

La SPE con resinas puede llevarse a cabo en varias modalidades, (i) como SPE dispersiva, en la cual la resina debe ser recuperada luego de la extracción mediante filtración o centrifugación, (ii) en columna, que es la comúnmente utilizada, en la cual la resina se empaqueta en columnas o cartuchos, y (iii) soportada, en la cual las resinas de extracción recubren un soporte inerte. Otra manera de llevar a cabo la SPE es mediante filtros de membrana que contienen los grupos funcionales que permiten la extracción. Estos filtros tienen forma de disco, con un espesor de alrededor de 1 mm y diámetros variables. El disco permite emplear caudales más elevados y realizar extracciones más rápidas (Figura 7).

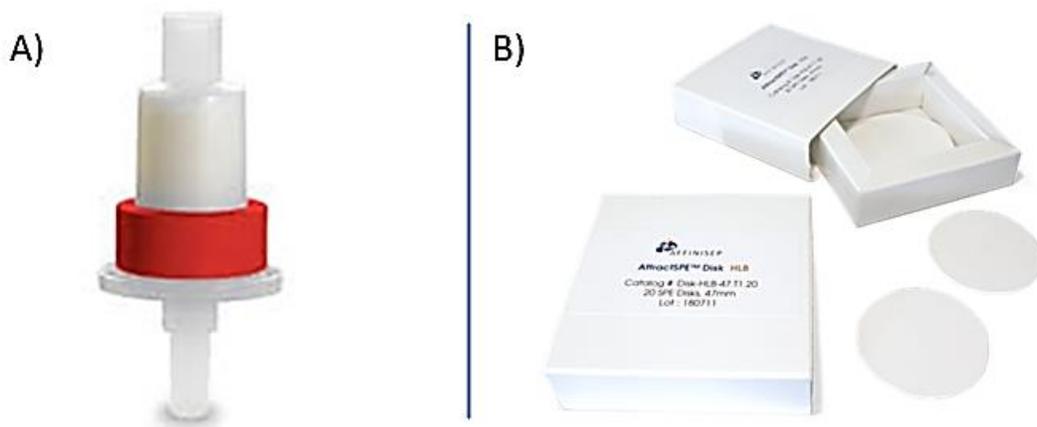


Figura 7. Ejemplos de dispositivos utilizados en SPE. A) Tipo cartucho; B) Tipo filtro.

Las resinas de extracción se conforman de sorbentes (grupos funcionales que permiten la interacción soluto-fase estacionaria) que están soportados sobre esferas de sílice rígidas, que se comercializan en varios diámetros. En el caso de la resina tC18, el grupo funcional es una cadena de 18 carbonos, muy utilizada para realizar SPE por su amplia afinidad hacia distintas especies químicas y además debido a su hidrofobicidad es útil en la retención de compuestos medianamente polares. La Hlb es un copolímero compuesto de poli (N-vinil

pirrolidona di vinyl benceno), esta resina es un poco más específica, ya que es afín solo a compuestos que sean lipofílicos o hidrofílicos. Finalmente, la MCX es prácticamente la misma molécula que la resina Hlb solo que en ésta, se realiza una sulfonación para hacerla una resina mixta entre extracción por fase reversa e intercambio catiónico (Figura 8).

Con esta técnica de extracción, se reduce la cantidad de disolventes empleados en extracciones líquido-líquido, reduciendo en consecuencia la generación de residuos y fomentando así el desarrollo de la química verde.

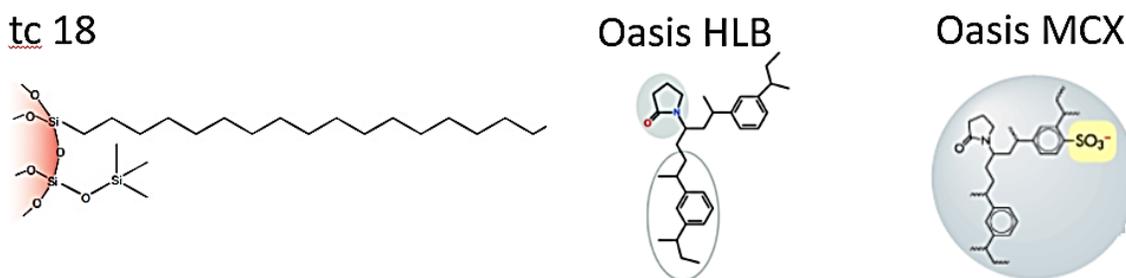


Figura 8. Estructura química de resinas de SPE utilizadas

2.2. Impresión en 3D

Gracias a los avances en la tecnología y con el desarrollo de nuevos materiales, el diseño y fabricación mediante impresión en tres dimensiones (3D) de nuevas configuraciones usadas como soporte para la extracción en fase sólida, han permitido adecuar los tratamientos de muestras según las características propias de cada análisis.

La técnica de fabricación por adición, también conocida como impresión 3D, se ha convertido en una tecnología esencial para la evolución de múltiples campos científicos, incluyendo medicina, biología, química, bioquímica y nanotecnología, entre otros [38]. El proceso de diseño e impresión en 3D de dispositivos se inicia con la creación de un modelo, mediante el uso de un software de diseño asistido por computadora. Una vez que se tiene el diseño, se elige el tipo de formato digital, que para el caso de la impresión 3D, se utiliza

el de mallado (mallas de elementos triangulares- *.STL). Finalmente, se fabrica el prototipo físico mediante el software específico de la impresora [39,40].

En la actualidad, se han desarrollado diferentes técnicas de impresión 3D basadas en los siguientes métodos: estereolitografía (SLA), modelado por deposición fundida (FDM), sinterizado selectivo por láser (SLS), y tecnología PolyJet, entre otros [41].

En el área de la química analítica, la técnica de impresión 3D se ha estado utilizando específicamente en el diseño de dispositivos fluidicos novedosos y de bajo costo, cuyas geometrías complejas, han permitido la automatización de diferentes metodologías analíticas obteniendo diversas ventajas como, mejor reproducibilidad y disminución de tiempo y costos y versatilidad en el análisis [42,43].

Gracias a la evolución de los materiales empleados en el diseño 3D, se ha logrado una tendencia hacia la miniaturización y portabilidad de los sistemas analíticos, lo que ha permitido un crecimiento exponencial de su aplicación en el análisis al medio ambiente [44-46].

La estereolitografía (o SLA por sus siglas en inglés) o impresión capa por capa, es una de las técnicas de impresión en 3D más utilizada, debido a su velocidad y simplicidad de producción de prototipos. Esta técnica está basada en la fotopolimerización o curado de resinas fotosensibles, utilizando luz ultravioleta y provocando que la resina pase de estado líquido a sólido mediante un proceso de entrecruzamiento de los polímeros presentes en la resina, lo que resulta en estructuras o unidades no porosas funcionales en la manipulación de fluidos [47]. Dicho procedimiento se repite un número determinado de veces hasta formar el objeto deseado, el cual puede someterse a procesos posteriores para una mayor curación del polímero, incrementando la robustez del material impreso. Para este procedimiento, se requiere una cámara UV aparte de la impresora 3D.

Para la fabricación de dispositivos en 3D, se utiliza un software especializado en el diseño asistido por computadora (CAD). En este trabajo, para el modelado se utilizó el programa Rhinoceros 6 (McNeel and Associates), el cual está basado en representaciones matemáticas de geometría proyectadas en tres dimensiones y es capaz de hacer una descripción detallada de las mismas con una amplia precisión. Para el caso de la impresión es requerido un software adicional propio de la marca de la impresora.

2.3. Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD)

La cromatografía es una técnica de separación, basada en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una estacionaria y otra móvil. Entre las diferentes modalidades, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es ampliamente utilizada debido a su sensibilidad y su fácil adaptación en determinaciones cuantitativas, además es ideal para la separación de especies no volátiles o termolábiles.

El HPLC utiliza una bomba tipo pistón para impulsar la fase móvil a través de la columna, en la cual los analitos se inyectan en de forma manual o automática, y se separan en función de su interacción con la fase móvil y la fase estacionaria. Posteriormente un detector en línea registra los picos y proporciona un gráfico de respuesta en función del tiempo (cromatograma) a través de una computadora (Figura 9).

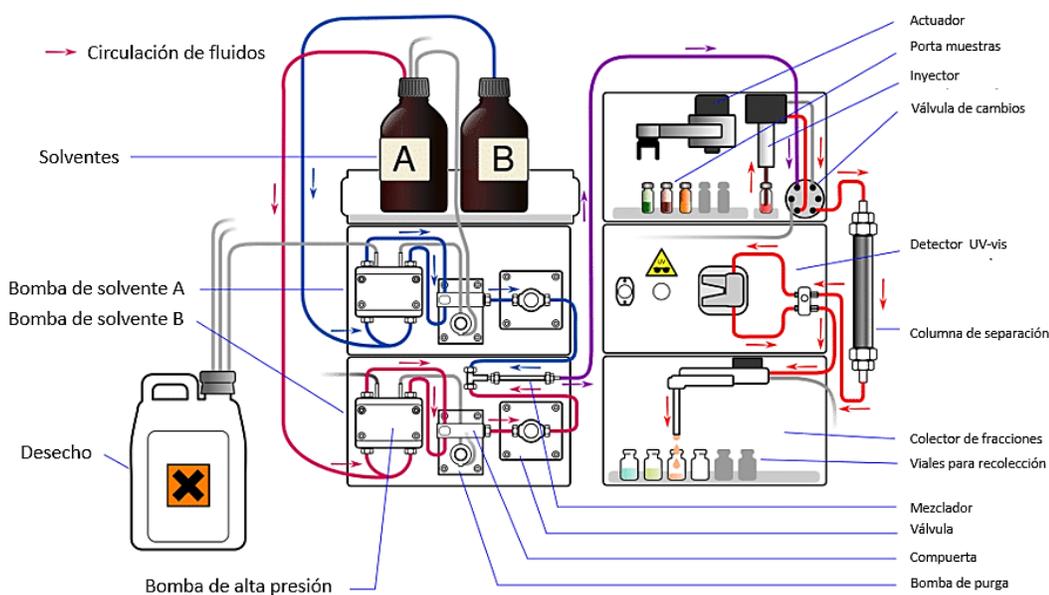


Figura 9. Diagrama de HPLC-DAD

En este trabajo de maestría se utilizó un HPLC-DAD de la marca JASCO, modelo MD-4017 con un detector de arreglo de diodos, en la modalidad de fase reversa y en modo de elución por gradiente. La columna empleada para la separación fue la C18 (Core Shell Fortis) que ofrece facilidad de interacción con la fase estacionaria, ya que a medida que los solutos viajan en la fase móvil por los poros de sílica, son atraídos y retenidos por el hidrocarburo mediante una débil interacción hidrofóbica y por fuerzas de Van der Waals, por lo que es útil para los AINEs que son de naturaleza de mediana polaridad.

El funcionamiento de los espectrofotómetros de arreglo de diodos se basa en que un haz de radiación que ha atravesado la celda de detección es dispersado por medio de una red de difracción fija, siendo recogidas simultáneamente todas las longitudes de onda dispersadas mediante una matriz de fotodiodos. Utilizan una óptica invertida respecto del HPLC convencional por lo que, toda la luz de la fuente atraviesa la muestra y luego es dispersada. En lugar de una ranura de salida, tiene en el plano focal un dispositivo que integra en un pequeño circuito varios cientos de detectores tipo fotodiodo de silicio.

Para efectos del presente trabajo, se seleccionaron cuatro longitudes de onda características, 3 que son específicas para diclofenaco, ibuprofeno y ketoprofeno (229, 235 y 275 nm, respectivamente) y una con la que se logra una absorción máxima para compuestos orgánicos (200 nm).

2.4. Cromatografía de gases con detector de masas (GC/MS)

En esta técnica, la fase estacionaria líquida se adsorbe sobre la superficie de un sólido inerte mientras que, la fase móvil (generalmente gases inertes como He y N₂) fluye través de la columna a alta presión. Los componentes contenidos en la muestra se reparten entre la fase móvil y la estacionaria. La cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés) es una técnica simple, multifacética, altamente sensible y de aplicación rápida para la separación de moléculas pequeñas. Se utiliza en la separación de los analitos a nivel traza [48]. La GC utiliza un gas portador para transportar los componentes de una muestra a través de columnas empaquetadas o columnas capilares huecas que contienen la fase estacionaria.

En la mayoría de los casos, las columnas GC tienen un diámetro interno más pequeño y son más largas que las columnas de HPLC, lo que la hace capaz de separar mezclas muy complejas de analitos volátiles. Los principales elementos de un sistema GC convencional se muestran en la Figura 10.

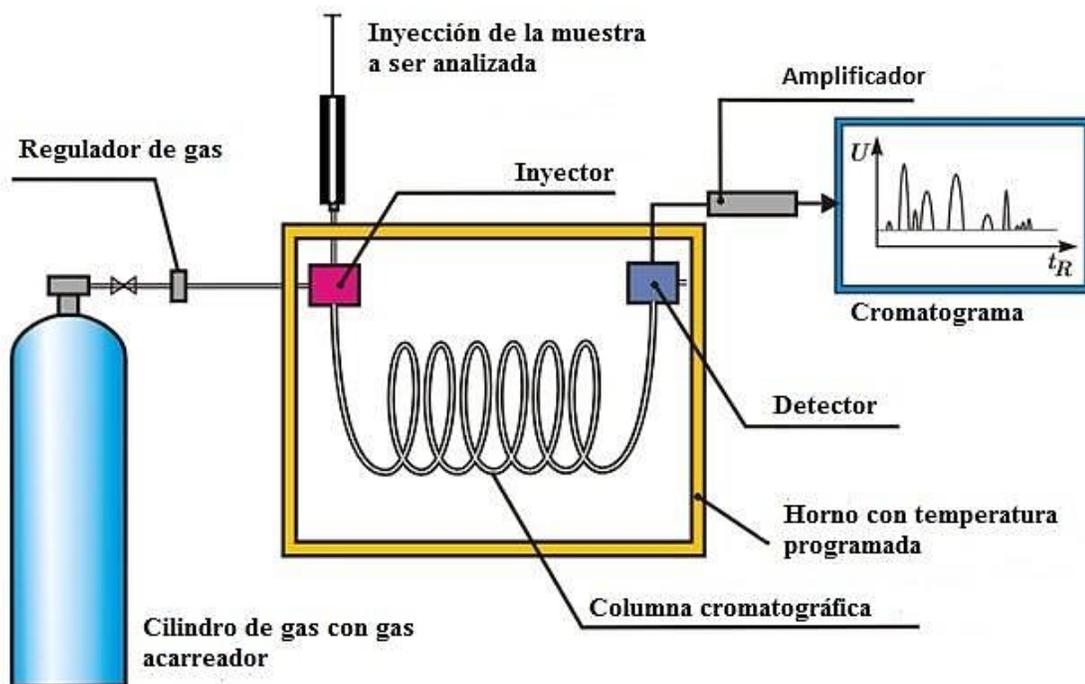


Figura 10. Esquema de un sistema de GC convencional.

En este trabajo se utilizó un cromatógrafo de gases de la marca Agilent, modelo 7890A equipado con un sistema de inyección automático, se utilizó una columna no polar modelo HP-5MS de la marca Agilent, de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y funcionalizada con 5% -fenil -metilpolisiloxano. Además, se programó un gradiente de temperatura y se utilizó la inyección a temperatura programable (PTV). Se utilizó también una técnica de derivatización para aumentar la volatilidad de los compuestos a analizar.

La GC es una de las técnicas más eficientes para realizar una separación, que al combinarse con un detector de alto rendimiento puede llegar a ser de gran utilidad para la química del medio ambiente, por lo que en este trabajo se seleccionó utilizar un detector de masas.

La espectrometría de masas se basa en la obtención de iones a partir de compuestos orgánicos en fase gas, los cuales son separados de acuerdo con su masa y su carga para su posterior detección. Esto en consecuencia, nos trae como resultado información de la abundancia de los iones en función de su masa/carga (m/z). Esta técnica es de un amplio poder cualitativo, utilizada frecuentemente para la determinación de estructuras orgánicas que, debido a la alta reproducibilidad en la señal obtenida por sus detectores, es posible también utilizarla como una técnica cuantitativa [50]. En este trabajo, se empleó un cromatógrafo de gases en el cual se tiene acoplado a un detector de masas de la casa comercial Agilent modelo 5975C. Cabe destacar que la técnica de derivatización fue una modificación a una metodología específica para hacer una derivatización de siliación, la cual es apta para AINEs, donde a la elución (mezcla de acetato de etilo y metanol) se le añade el derivatizante (MSTFA, N-metil-N-trimetilsilil trifluoroacetamida) y se calienta a 80°C catalizando la reacción por un tiempo estimado de 30 min [33].

2.5. Espectrofotometría UV-Vis

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en disolución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida es proporcional a la concentración (Ley de Lambert-Beer). Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una disolución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma.

Las mediciones espectrofotométricas con radiación ultravioleta son útiles para detectar grupos funcionales que absorben radiación en la región ultravioleta y visible (cromóforos), debido a que grandes porciones de las moléculas orgánicas aún más complejas son transparentes a la radiación de longitud de onda mayor que 180 nm. La aparición de una o más bandas de absorción en la región de 200 a 400 nm, es un claro indicio de la presencia de grupos insaturados o de átomos como azufre o halógenos. Sin

embargo, por lo general esta técnica de detección no es selectiva, ya que, al tener una mezcla de componentes en una matriz, no se puede asegurar que un analito sea identificado o cuantificado de una manera eficiente. Por ello, es necesario llevar a cabo pretratamientos de muestra o métodos de separación, lo que hace que ésta sea comúnmente acoplada a equipos que funcionan en base a la separación de analitos como el HPLC, ya sea con una longitud de onda fija o haciendo un barrido del espectro [49].

En este trabajo, se empleó el espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis de la marca Agilent para trabajar con identificación de espectros de absorción característicos de nuestros AINEs de interés y también se utilizó para realizar cuantificaciones a concentraciones a niveles de mg L^{-1} .

Capítulo 3: Hipótesis y Objetivos

Considerando la importancia de desarrollar metodologías para la determinación de AINEs en muestras de agua, como quedó de manifiesto en el capítulo 1, y las técnicas presentadas en el capítulo 2, se presentan a continuación la hipótesis de partida y el objetivo general que se pretende alcanzar en este trabajo de maestría y los objetivos específicos que permitirán su logro.

3.1. Hipótesis

El desarrollo de dispositivos por impresión en 3D conforman excelentes soportes inertes con geometrías complejas para la contención o el recubrimiento con resinas de SPE, lo que resulta en métodos de extracción *in situ* de alta selectividad para fármacos AINEs en cuerpos de agua, otorgando beneficios de flexibilidad en el diseño para adaptarse a distintas situaciones de muestreo, y portabilidad para estudios directamente en campo, evitando el transporte de grandes volúmenes de muestra para ser tratadas en el laboratorio.

3.2. Objetivo General

Analizar resinas de impresión en 3D, que, en conjunto con resinas de extracción en fase sólida, se logre desarrollar un dispositivo mediante impresión en 3D, para la extracción *in situ* de fármacos AINEs en agua, para su posterior cuantificación mediante técnicas cromatográficas, obteniendo una metodología que sea útil en distintas matrices ambientales.

3.3. Objetivos específicos

1. Evaluar las resinas comerciales de impresión en 3D, compuestas de diferentes monómeros y aditivos, para la fabricación de dispositivos de extracción. Se estudiarán la fragilidad y resistencia química de los prototipos fabricados con las diferentes resinas de impresión.
2. Diseño y construcción de un dispositivo con impresión en 3D, utilizando la resina seleccionada en el objetivo anterior, que servirá de soporte para ser recubierto con resinas de extracción comerciales.
3. Evaluar las resinas utilizadas para la extracción en fase sólida y seleccionar la que presente mayor eficiencia de extracción de AINEs una vez soportada en el dispositivo 3D.
4. Incorporar el dispositivo impreso en 3D recubierto a un sistema de bombeo y realizar pruebas para la extracción de AINEs.
5. Optimizar el método analítico propuesto mediante el desarrollo de un diseño de experimentos, considerando variables como volumen de eluyente y de reactivos necesarios para la determinación de los AINEs.
6. Validar el método propuesto, incluyendo las etapas de separación y detección a través del análisis de material de referencia certificado o por ensayos de adición/recuperación y caracterizarlo mediante parámetros analíticos (límites de detección y cuantificación, linealidad, repetibilidad, entre otros).
7. Estudiar su aplicación al análisis de AINEs en muestras de agua naturales y residuales.

Capítulo 4: Desarrollo experimental

4.1. Reactivos y material de laboratorio

Para la preparación de todas las disoluciones, se utilizó agua ultrapura con una resistividad de $18.2 \mu\Omega \text{ cm}$ y un contenido de carbono total menor a $2 \mu\text{g L}^{-1}$. Se utilizaron reactivos aptos para HPLC-GC (Tabla 4).

Tabla 4. Reactivos utilizados.

Nombre común	Casa comercial	Calidad
Acetato de etilo	Sharlab, España	99.9% \geq
Acetona	Sharlab, España	99.9% \geq
Acetonitrilo	Merck, España	99.9% \geq
Amonio	Sharlab, España	70%
Diclofenaco	Merck, España	96.6%
Difosfato de potasio	Merck, España	96.4%
Di-metil-acetamida	Merck, España	99.9% \geq
Filtros de jeringa de nylon 0.22 μm	-	-
Filtros de jeringa de nylon 0.45 μm	-	-
Fluoruro de poli vinilideno	Merck, España	99.9% \geq
Hexano	Merck, España	99.9% \geq
Ibuprofeno	Sharlab, España	99%
Isopropanol	Sharlab, España	90% $>$
Jeringas de plástico 10 mL	-	-
Ketoprofeno	Sharlab, España	99%
Metanol	Merck, España	99.9% \geq
Naproxeno	Sharlab, España	99%
N-metil-N-trimetilsilil trifluoroacetamida	Sharlab, España	99.9% \geq
Paracetamol	Sharlab, España	99%
Resina de impresión Clear	FormLabs	-
Resina de impresión Durable	FormLabs	-
Resina de impresión Rigid 10k	FormLabs	-
Resina SPE H1b	OASIS	-
Resina SPE MCX	OASIS	-
Resina SPE tC18	Sep-Pak	-

Todo el material de cristal utilizado fue previamente lavado y enjuagado tres veces con acetona, para posteriormente ser sometido a una temperatura de 500 °C en el interior de una mufla por una hora, para eliminar cualquier posible contaminación.

4.2. Preparación y tratamiento de muestras

Para los ensayos de optimización se prepararon disoluciones con concentraciones conocidas de diclofenaco en agua ultrapura.

Además, en el laboratorio se analizaron muestras de agua de grifo y agua residual proveniente de una PTAR. Esta última, por su alto contenido de sólidos disueltos, fue previamente filtrada con un filtro de jeringa de un tamaño de poro de 0.45 μm .

Todas las muestras fueron sometidas a una SPE siguiendo las pautas analíticas indicadas por el fabricante para la resina Oasis Hlb:

- a) Acondicionamiento: 2 mL de agua ultrapura y 2 mL de metanol;
- b) Adición de muestra: Se hacen pasar un volumen de 10 mL;
- c) Lavado: Enjuague con 5 mL de agua ultrapura;
- d) Elución: 2 mL de metanol (eluato).

Al eluato resultante se le añadieron 40 μL de MSTFA para derivatizar y finalmente, se colocó en estufa a 80°C por 30 min.

Para los estudios hechos en campo, el dispositivo se escaló para que permita el análisis de volúmenes más grandes de muestra de agua residual (4 L), y por lo tanto los volúmenes de las diferentes etapas de la SPE también aumentaron. Para el acondicionamiento se usaron 10 mL de agua ultrapura y 10 mL de metanol; el enjuague o lavado requirió de 50 mL de agua ultrapura y para la elución se utilizaron 85 mL de metanol. Finalmente, al eluato obtenido se le agregaron 60 μL de MSTFA, y se aplicó el mismo tratamiento térmico mencionado.

Las curvas de calibración para los estudios de linealidad fueron realizadas preparando disoluciones en agua ultrapura con adición de AINEs a partir de estándares de paracetamol, ibuprofeno, ketoprofeno y diclofenaco.

4.3. Planta de tratamiento de agua residual

Las muestras de agua residual analizadas fueron extraídas de la PTAR situada en la zona residencial de Bendinat, en el municipio de Calviá en Mallorca, España (Figura 11). Esta depuradora es una de las cuatro presentes en esta localidad, tiene una capacidad de procesamiento de $370 \text{ m}^3 \text{ día}^{-1}$, lo que permite depurar el 11% del agua residual generada en el municipio. Esta planta cuenta con un sistema de pretratamiento de agua de desarenado, desengrasado, desbaste fino y grueso, tratamiento primario, secundario y terciario, siendo así eficaz en la eliminación de sólidos suspendidos, DBO y nitrógeno, además de contar con un sistema de desinfección ultravioleta.

El muestreo se realizó a la entrada de la decantación primaria, a la salida de la decantación secundaria y a la salida del tratamiento terciario (Figura 12).



Figura 11. Ubicación de PTAR Bendinat, Calviá, Mallorca, España. Los números indicados en círculos de colores indican a detalle la ubicación.

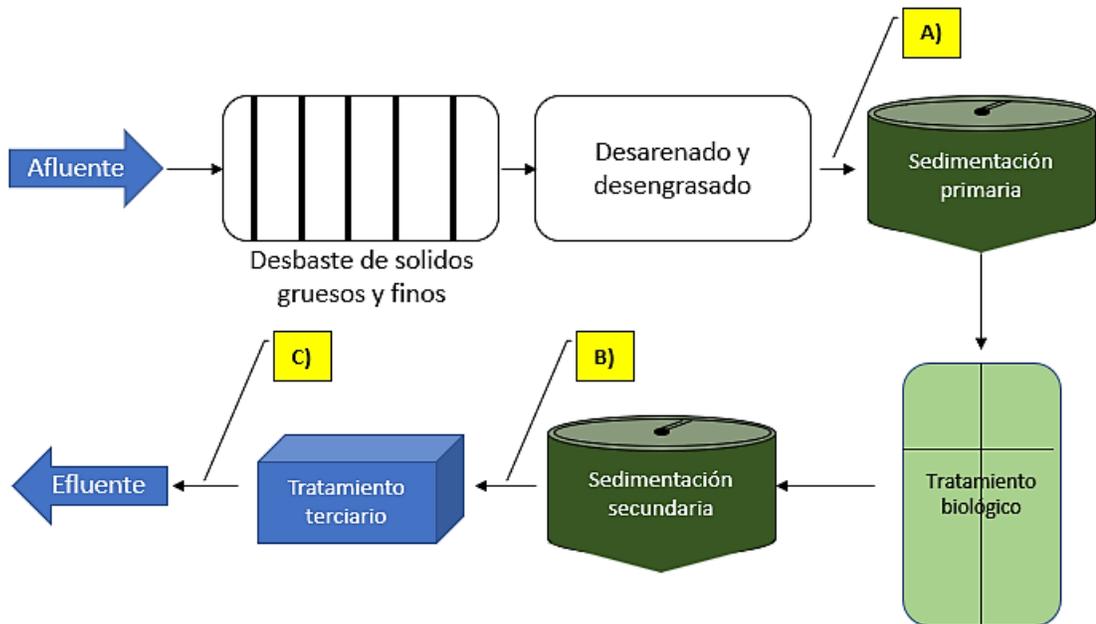


Figura 12. Diagrama esquemático de la PTAR que indica la localización de puntos de muestreo. (A: Entrada a tratamiento primario; B: Salida de decantación secundaria; C: Salida de tratamiento terciario.)

4.4. Condiciones analíticas para la determinación de AINEs

4.4.1. Espectroscopía Uv-Vis

Se hace uso de esta técnica para analizar la liberación de resina de impresión sin polimerizar ya que ésta pudiera ocasionar problemas al momento de fijar la resina de extracción o bien que el propio material desprendido cause una interferencia al momento de realizar el análisis en el espectro UV. Las medidas se realizaron a 250 nm, ya que es la longitud de onda de absorción máxima del metacrilato.

4.4.2. HPLC-DAD

Antes de hacer uso de la cromatografía de gases, el HPLC-DAD permitió realizar un análisis preliminar de la eficiencia de extracción de las resinas de SPE. Para ello, se prepararon estándares de paracetamol, ibuprofeno, ketoprofeno y diclofenaco en un rango de concentraciones de 1 a 10 mg L⁻¹, lo que permitió evaluar la capacidad de carga de las resinas de extracción seleccionadas (Hib, tC18 y MCX) y su afinidad por los analitos de interés. Además, mediante HPLC-DAD también se evaluaron los ensayos de las diferentes modalidades de recubrimiento (*stick and cure* y fluoruro de poli vinilideno, PVDF) y su adhesión a las resinas de SPE.

Se utilizó una columna C18 de un tamaño de partícula de 2.6 µm, un área superficial de 140 m² g⁻¹ y un tamaño de poro de 80 Å. La fase móvil en modo gradiente consistió en mezclas de acetonitrilo y buffer de fosfatos entre 90:10 % a 10:90 % acetonitrilo: buffer. Se utilizó un flujo de 0.7 mL min⁻¹, y se emplearon las longitudes de onda de 220, 240, 260 y 276 nm en el detector de fotodiodos, específicas para los analitos analizados. Para este análisis, las inyecciones de muestras, blancos y patrones se realizaron por medio de un inyector manual.

4.4.3. GC/MS

Como prueba de concepto, se determinó el diclofenaco mediante GC/MS en distintas matrices acuosas (agua desionizada, agua de grifo y agua proveniente de la PTAR). Las curvas de calibración para el análisis de linealidad se fijaron en un rango de 0.5 a 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ y se utilizó un vaporizador de temperatura programada PTV (por sus siglas en inglés), el cual requiere de nitrógeno líquido para enfriar el inyector al finalizar cada ensayo y así controlar la temperatura inicial (100°C). El PTV fue operado en el modo “Solvent Vent” a un flujo de 3 mL min^{-1} , manteniendo una presión constante en la columna de 10.52 psi y conservando un flujo de fase móvil (helio) de 1 mL min^{-1} . El tiempo de retraso se fijó en 10 min para evitar el sobre trabajo del filamento de excitación, pues el analito de interés (diclofenaco) consume un tiempo de retención de 12.3 min. En el modo SIM, se configuró al detector con los valores de m/z de 179, 214.1 y 242 y, ya que en análisis previos se observó que los fragmentos mayoritarios característicos del diclofenaco derivatizado se encontraban en estos valores. Así, el tiempo de análisis resultante para el diclofenaco fue de 30 min, para evitar la contaminación cruzada de muestras de la columna. La columna utilizada en este experimento fue la HP-5MS de la marca Agilent de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro, funcionalizada con 5% -fenil -metilpolisiloxano.

4.5. Diseño e impresión del dispositivo de extracción

4.5.1. Software Rhinoceros 3D 6

Este software permite el modelado en tres dimensiones basado en NURBS, a través del diseño asistido por computadora. El programa es comúnmente usado para el diseño industrial, la arquitectura, el diseño naval, el diseño de joyas, el diseño automovilístico, CAD/CAM de prototipos rápidos, ingeniería inversa, así como en la industria del diseño gráfico y multimedia (Figura 13). Los diseños generados se guardan con extensión *.STL compatibles con el software de impresión (que se menciona a continuación).

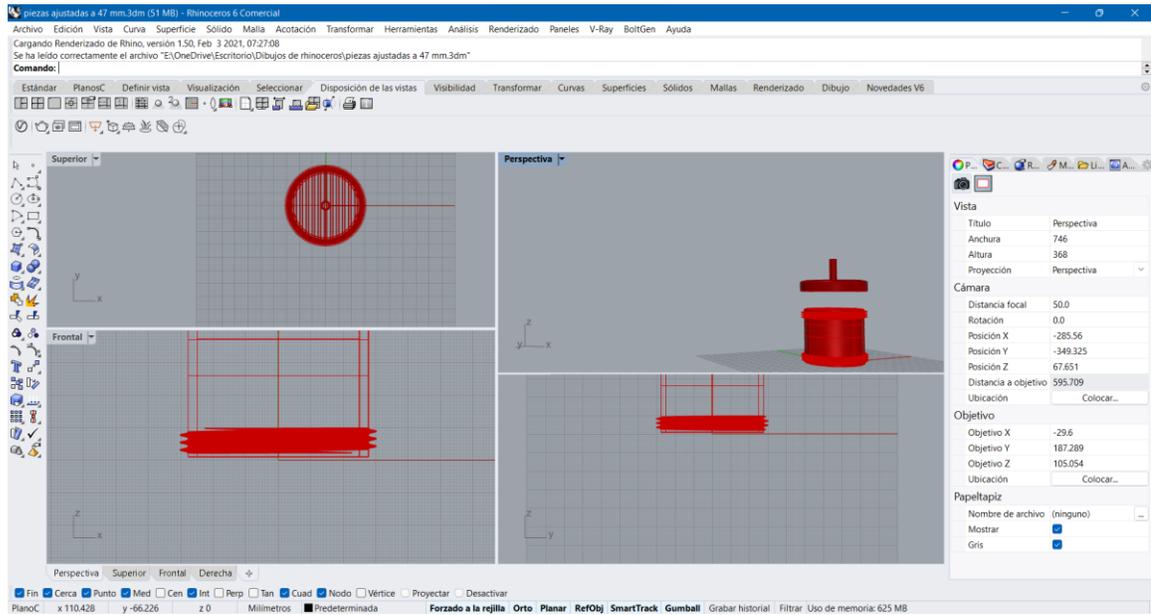


Figura 13. Interfaz del software Rhinoceros 3D. Vista de pantalla a través del monitor de una computadora.

4.5.2. Software PreForm

Este software es una herramienta gratuita provista por la misma casa comercial de las impresoras 3D utilizadas, permite a través del modelo virtual, realizar la optimización de los diseños en 3D generados y generar soportes para los prototipos, que, al momento de imprimir, puedan mantenerse de la misma forma en la que se diseñaron (ejemplo de interfaz de usuario en Figura 14), además define los parámetros de impresión adecuados como la cantidad de capas que serán realizadas para formar el prototipo, el tipo de resina para impresión, entre otras.

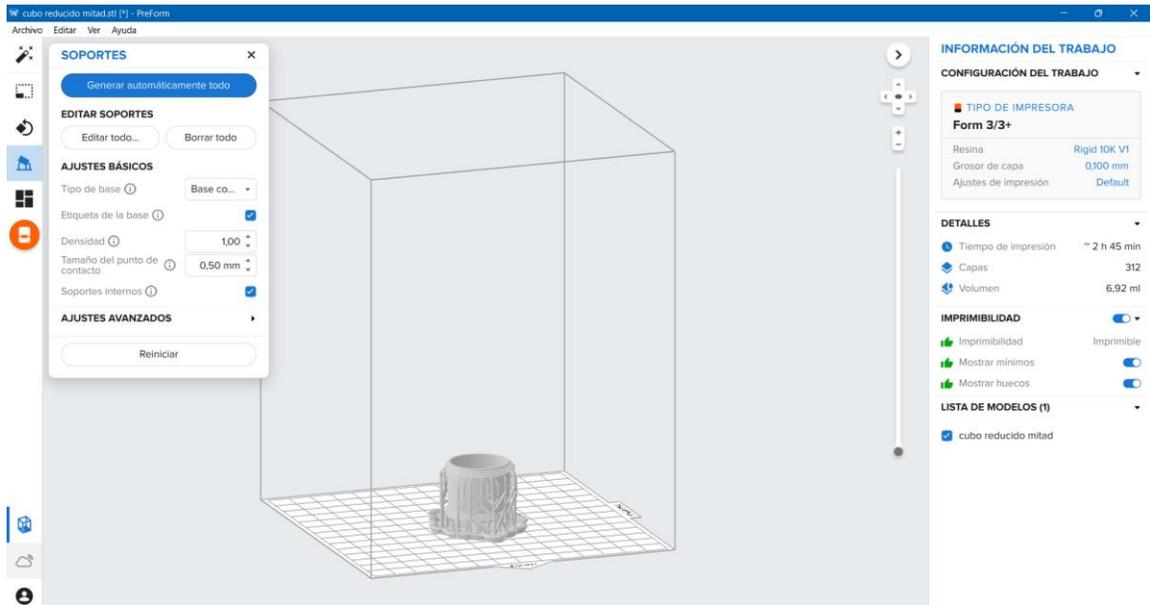


Figura 14. Ejemplo de interfaz de usuario del software PreForm.

4.5.3. Características de las impresoras 3D

En esta tesis de maestría se emplearon las impresoras de la casa comercial Formlabs, específicamente los modelos Form 2 y Form 3 (Figura 15), y las resinas de impresión propias de la casa comercial. En la Tabla 5 se pueden apreciar sus especificaciones técnicas.

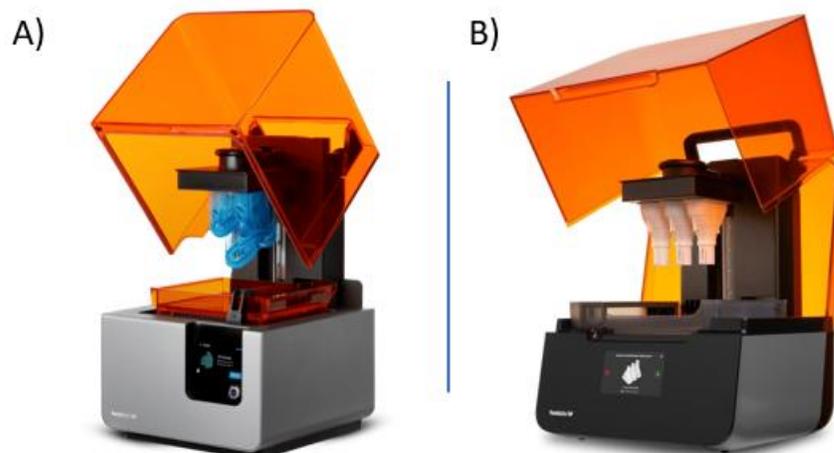


Figura 15. Impresoras Form 2 (A) y Form 3 (B).

Tabla 5 Especificaciones técnicas de las impresoras Form 2 y Form 3.

Especificaciones técnicas		
Impresora	Form 2	Form 3
Dimensiones	35 x 33 x 52 cm	40 x 53 x 78 cm
Peso	13 kg	17.2 kg
Temperatura de funcionamiento	35 °C	35 °C
Control de temperatura	Tanque de resina auto calefactado	Cámara de impresión con calefacción por aire
Requisitos de alimentación	100-240 V 1.5 A 50/60 Hz 65 W	100-240 V 2.5 A 50/60 Hz 220 W
Especificaciones laser	Certificación EN 60825-1:2007	Light Processing Unit (LPU)
Conectividad	Wi-Fi, Ethernet y USB	Wi-Fi, Ethernet y USB
Trayectoria óptica	Protegida	Protegida
Control de la impresora	Pantalla táctil interactiva y botón de inicio	Pantalla táctil interactiva
Tecnología	Stereolithography (SLA)	Low Force Stereolithography (LFS)
Mecanismo de separación de capas	Proceso de separación transversal con limpiador	Proceso de separación transversal con limpiador
Sistema de llenado de resina	Automático	Automático
Volumen de impresión	145 x 145 x 175 mm	145 x 145 x 185 mm
Grosor de capa	25, 50, 100 micras	25, 50, 100 micras
Diámetro del punto focal del laser	140 micras	80 micras
Soportes	Autogenerados	Autogenerados

4.6. Métodos de recubrimiento

El recubrimiento de los dispositivos impresos en 3D con resinas de extracción es de vital importancia, ya que es imperativo que ésta permanezca adherida (de lo contrario provocaría una disminución en la eficiencia de extracción). La técnica “Stick and cure” es utilizada para aprovechar la resina de impresión que permanece en la superficie del dispositivo impreso sin polimerizar por completo como un fijador para la resina de extracción (Figura 16).

Otra técnica que se utiliza para la fijación con PVDF consiste en recubrir el dispositivo impreso con una mezcla de PVDF y la resina de extracción, que con ayuda de un disolvente se esparce sobre el dispositivo impreso en 3D obteniendo una capa que deja expuesta a la resina de SPE (Figura 17).

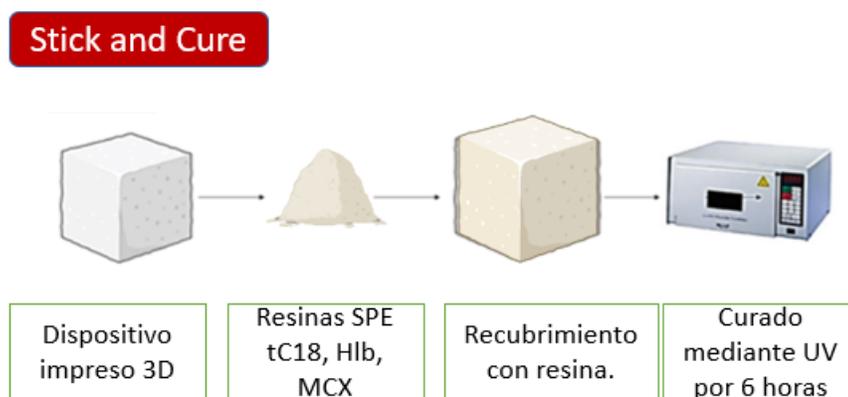


Figura 16. Procedimiento de fijación de resina de extracción con la técnica Stick and cure.

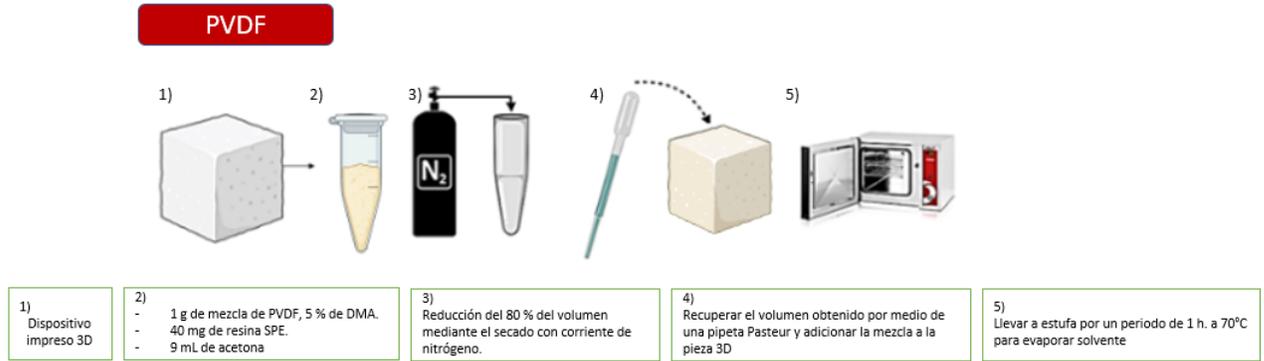


Figura 17. Procedimiento de fijación de resina de extracción con la técnica de tintado con PVDF.

4.7. Diseño de experimentos

El diseño de experimentos (DOE) es un procedimiento sistemático para el análisis de datos y obtención de información. Permite, a través de ensayos experimentales, variar de forma simultánea las variables que pueden afectar, bajo estrictas condiciones controladas y examina si los cambios efectuados tienen un efecto significativo sobre la(s) respuesta(s) según el propósito de la investigación. Las variables o factores sólo pueden asumir un número limitado de valores posibles, conocidos como niveles de factor. La idea fundamental es variar todos los factores importantes simultáneamente en un conjunto de experimentos planificados, y conectar los resultados con la variable respuesta mediante un modelo matemático. Se pueden utilizar herramientas informáticas actualmente disponibles para crear los diseños experimentales, obtener un modelo y visualizar la información generada. Dentro de los softwares más utilizados se encuentran Minitab, Statistica, Origin, PSPP, entre otros. Un enfoque de DOE permite determinar en primera instancia cuáles son las variables significativas y si la interacción entre éstas tiene un efecto trascendental en la respuesta; así como también, establecer los niveles de los factores que dan lugar a condiciones óptimas.

En el presente trabajo se realizó un diseño central compuesto (DCC) con 4 puntos de cubo, 4 puntos axiales y 3 puntos centrales, dándonos un total de 11 corridas experimentales, con una distancia axial (α) igual a 0.5, donde los puntos (vértices) de cubo, permiten la estimación de efectos lineales y de interacción. Los puntos centrales permiten verificar la curvatura, pero no los términos cuadráticos individuales y los puntos axiales estiman los términos cuadráticos. Los factores que se evaluarán son: el volumen de derivatizante a utilizar, ya que debe estar controlado, pues su exceso podría causar interferencias, lo que subestimaría la concentración real, y el volumen de eluyente.

Se realizó un análisis de superficie de respuesta, para obtener los valores óptimos de las variables bajo estudio, con el objetivo de maximizar la concentración en el eluato y aumentar así el área del pico cromatográfico. Con los resultados del diseño experimental, se fijarán los valores de los parámetros de extracción para poder realizar su aplicación en campo con las condiciones óptimas.

También se generó un diagrama de Pareto para observar la importancia relativa de los efectos individuales y de sus interacciones, colocando los valores absolutos de los efectos en orden decreciente. La línea de referencia en la gráfica indica cuáles efectos son significativos y corresponde a un α del 5%, por lo tanto, indica el efecto mínimo significativo para un nivel de confianza del 95%. La longitud de las barras horizontales es proporcional a los valores de t-Student para cada efecto, cualquier efecto o interacción que exceda dicha línea es considerado significativo.

Las demás variables como la cantidad de resina, caudal de los fluidos y tamaño del dispositivo fueron evaluados de manera individual.

Capítulo 5: Resultados y discusión

5.1. Evaluación de las resinas para la impresión en 3D

Para la impresión en 3D, se ensayó con las tres resinas de la casa comercial FormLabs: la resina Clear, la Durable y la Rigid 10K. Estas 3 resinas fueron seleccionadas debido a que la resina Clear ya estaba reportada en trabajos previos, la resina Durable debido a que proporciona características de elasticidad y resistencia que pueden ser de utilidad al momento de llevar el dispositivo a campo y la Rigid 10K, porque en su composición contiene un porcentaje de fibra de vidrio (no conocido debido a que la marca tiene patentada su composición) la cual brinda beneficios de resistencia a solventes orgánicos, una mayor dureza y resistencia a altas temperaturas.

Para evaluar las resinas de impresión 3D, se realizaron análisis de fragilidad y de resistencia química a los solventes utilizados. Los solventes estudiados se seleccionaron en función de los pasos de SPE (acondicionamiento, lavado y elución) que son utilizados para cada resina seleccionada (Oasis Hlb, Oasis MCX y tC18):

- a) Metanol al 100%
- b) Metanol y acetato de etilo al 50% v/v
- c) Metanol y agua al 50% v/v
- d) Metanol e hidróxido de amonio al 98% de metanol v/v
- e) Acetato de etilo y acetona al 50% v/v

Se imprimieron dispositivos con forma de cubos de 1 cm^3 con cada tipo de resina de impresión. Los cubos impresos fueron sumergidos varias veces durante tres segundos en 2-propanol al 90% para eliminar los restos de resina no polimerizada, posteriormente se sumergen en otra cubeta llena del mismo disolvente durante 10 min con el fin de hacer un lavado más efectivo de la resina de impresión residual que no se logró polimerizar.

Para que la polimerización de las resinas de impresión sea completa, inmediatamente después de imprimirlos, los dispositivos deben exponerse a una luz ultravioleta, lo que se conoce como etapa de curado. Así, los cubos se secaron y

posteriormente se curaron en un reactor UV (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, $\lambda= 365$ nm) durante un tiempo aproximado de entre 4 y 6 h, tiempo en el que la resina completa su polimerización catalizada por la luz UV.

El ensayo consistió en sumergir los cubos resultantes en los diferentes solventes, durante periodos de tiempo comprendidos entre los 5 min y las 2 h, más un ensayo control sin exposición (0, 5, 20, 35, 55, 90 y 120 min), para evaluar la posible liberación del polímero empleado para la impresión en 3D, lo que implicaría pérdida de material y su deterioro. Una vez que se retiran los dispositivos de los solventes, éstos se analizan con espectrofotometría UV-Vis a 250 nm para cuantificar la presencia de polímeros provenientes de la degradación de las resinas de impresión 3D en función del tiempo y poder seleccionar la resina de impresión que presente una mejor estabilidad y resistencia. Por otra parte, los dispositivos se sumergieron durante 24 h en cada uno de los solventes ensayados para observar si se producía un deterioro.

En las Figuras 18 a 22 se observan los resultados de estos experimentos. En todos los ensayos, a medida que transcurre el tiempo se observaron aumentos en la absorbancia, indicando la liberación de polímeros que absorben en el UV. El material que presentó mejor resistencia sin deteriorarse fue el cubo impreso con la resina Rigid 10 K. Para el primer ensayo experimental, usando como solvente metanol al 100%, tras un día de exposición al disolvente, el dispositivo que fue impreso con las resinas Durable (Figura 18 a) y Clear (Figura 18 b) sufrieron fracturas, mientras que el cubo impreso con la resina Rigid 10k no sufrió daños (Figura 18 c).

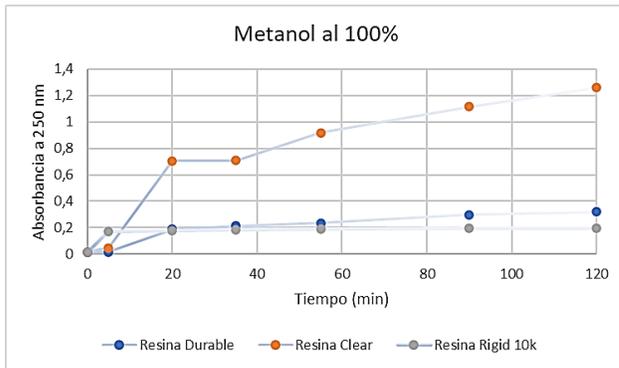


Figura 18. Izq.: Comportamiento de las resinas de impresión inmersas en metanol al 100%; Der: Fotografía de cubos de 1 cm³, 24 horas de exposición; resinas de impresión a) Durable, b) Clear y c) Rigid 10k

En el segundo experimento, con metanol al 50%, los resultados obtenidos reflejaron que la resina Clear continúa siendo la menos estable (Figura 19) presentando fracturas tras un día de exposición (Figura 19 a) y en cuanto a las resinas Durable y Rigid 10k, una aumentó su tamaño en un 10% (Figura 19 b) y la otra quedó intacta (Figura 19 c).

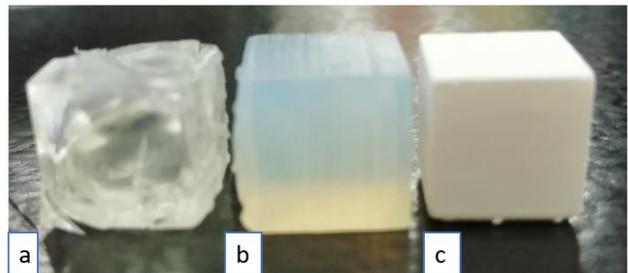
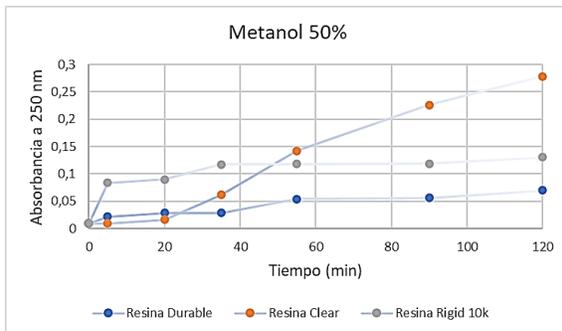


Figura 19. Izq.: Comportamiento de las resinas de impresión inmersas en metanol al 50%; Der: Fotografía de cubos de 1 cm³, 24 horas de exposición; resinas de impresión a) Durable, b) Clear y c) Rigid 10k

En el tercer ensayo experimental se llevó a cabo con metanol-acetato de etilo al 50%, los tres materiales mostraron una buena resistencia, ya que para un día de exposición ninguno de los 3 cubos registró ni aumento de tamaño y ni fracturas visibles (Figura 20).

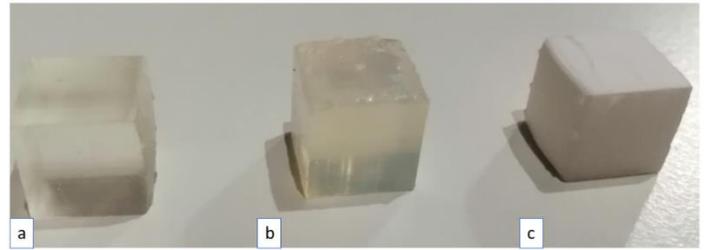
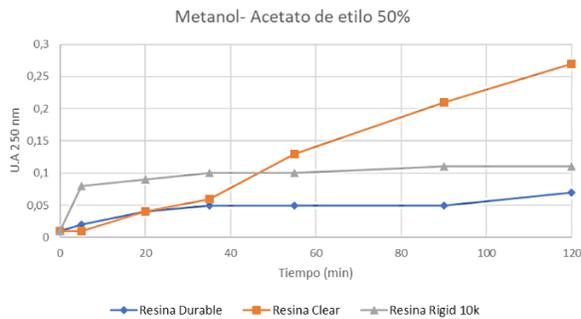


Figura 20. Comportamiento de las resinas de impresión inmersas en metanol y acetato de etilo al 50%; Der: Fotografía de cubos de 1 cm³, 24 horas de exposición; resinas de impresión a) Durable, b) Clear y c) Rigid 10k

El cuarto experimento se realizó con acetato de etilo y acetona al 50%, y se observó un comportamiento similar que con la mezcla anterior (Figura 21).

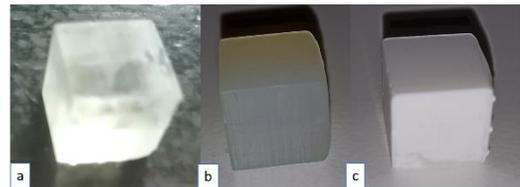
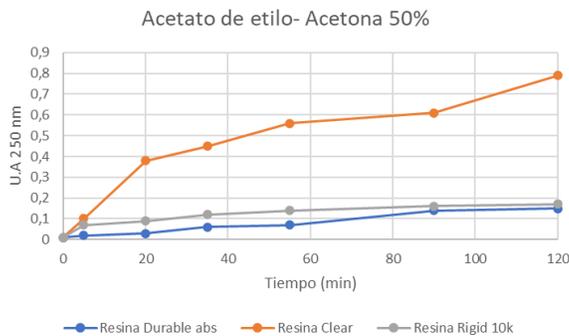


Figura 21. Comportamiento de las resinas de impresión inmersas en acetona y acetato de etilo al 50%; Der: Fotografía de cubos de 1 cm³, 24 horas de exposición; resinas de impresión a) Durable, b) Clear y c) Rigid 10k

Finalmente, se evaluó el comportamiento con la disolución de metanol al 98% con un 2% de hidróxido de amonio, mostrando una tendencia en la absorbancia muy similar al primer ensayo (metanol 100%), solo que en esta ocasión los cubos que fueron impresos con las distintas resinas de impresión no sufrieron un daño estructural tan drástico (Figura 22).

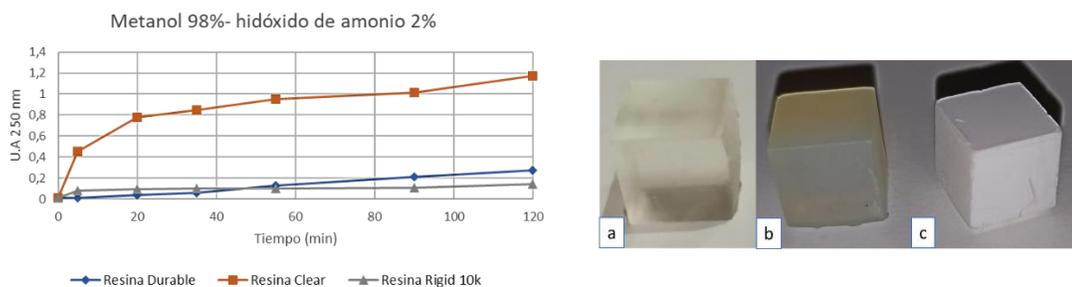


Figura 22. Comportamiento de las resinas de impresión inmersas en metanol 98% e hidróxido de amonio al 2%; Der: Fotografía de cubos de 1 cm³, 24 horas de exposición; resinas de impresión a) Durable, b) Clear y c) Rigid 10k

Para evaluar la posible adsorción sobre el material de impresión (sin recubrir con la resina de extracción), se realizaron ensayos con dispositivos impresos con las 3 resinas en los que fueron sometidos a pruebas de contacto con los distintos AINEs (paracetamol, ketoprofeno, ibuprofeno y diclofenaco). Los dispositivos impresos en 3D permanecieron sumergidos durante 120 min en disoluciones con una concentración de 10 mg L⁻¹ del fármaco bajo estudio. Una vez transcurrido el tiempo de exposición, los dispositivos fueron separados, y se analizó la concentración restante en las disoluciones. En la Tabla 6 pueden observarse los resultados obtenidos, cuantificados mediante espectrofotometría UV. El aumento de concentración observado en distintos ensayos seguramente se deba a la liberación de polímeros (metacrilato lixiviado) con absorción en el UV. Cabe destacar, que con estos ensayos se evidencia que los AINEs no se retienen sobre los materiales de impresión de los dispositivos.

Tabla 6. Concentraciones remanentes de AINEs para evaluar la adsorción sobre el material de impresión (resinas de impresión 3D).

Resina	Paracetamol	Ketoprofeno	Ibuprofeno	Diclofenaco
	mg L ⁻¹			
Clear	10.04± 0.03	10.43± 0.02	13.84± 0.04	12.42± 0.03
Rigid 10K	9.88± 0.02	10.23± 0.03	10.12± 0.03	11.37± 0.04
Durable	9.86± 0.02	10.53± 0.03	11.02± 0.02	10.59± 0.03

Los resultados son expresados como el valor medio ± la desviación estándar (n=3).

Considerando los resultados obtenidos para evaluar las resinas de impresión en 3D, la resina seleccionada para los futuros ensayos fue la Rigid 10K, debido a su menor grado de desprendimiento de resina no polimerizada, y a la resistencia mecánica a todos los solventes ensayados.

5.2. Diseño e impresión del dispositivo impreso en 3D

El diseño del dispositivo, realizado por medio del software Rhinoceros 6, se centró en un formato que pueda acoplarse fácilmente a la salida de una bomba de aspiración de caudal variable ($1- 4.5 \text{ L min}^{-1}$) para llevar a cabo la extracción de los AINEs *in situ*, evitando así el traslado de grandes volúmenes de muestra al laboratorio. El dispositivo debe contener en su interior una estructura con canales, con una gran relación superficie/volumen para ser recubierta con resinas de extracción.

En este contexto, se diseñó un dispositivo que permita la conexión con mangueras flexibles para facilitar el muestreo con bomba; con tapas a rosca para su fácil apertura y remplazo de la parte interna del dispositivo funcionalizada con la resina de extracción. Esta parte interna está conformada por una red de cubos interconectados en cuya superficie se adhiere la resina de SPE, y un cuerpo externo que da cabida y protección al dispositivo de extracción (Figura 23).

La impresión de los dispositivos se realizó usando el software PreForm propio de las impresoras Form 2 y Form 3 que se usaron en esta tesis de maestría.



Figura 23 Fotografía del dispositivo impreso en 3D para la extracción in situ de AINEs.

El dispositivo consta de las siguientes partes:

- a) Tapa del dispositivo (Figura 24): son dos piezas que tienen por un lado una toma para acoplar a una manguera de 0.7 cm de diámetro interno, y por el otro una rosca interna de 3.5 vueltas para ensamblar con el cuerpo del dispositivo, donde se alojará el soporte para la red de cubos interconectados.
- b) Red cubos interconectados: sirven para soportar la resina de extracción en fase sólida, aportando una mayor área de contacto con los analitos de interés (Figura 25).
- c) Cilindro con rosca externa o cuerpo del dispositivo: protege a la red de cubos interconectados, y une a las tapas (Figura 26).

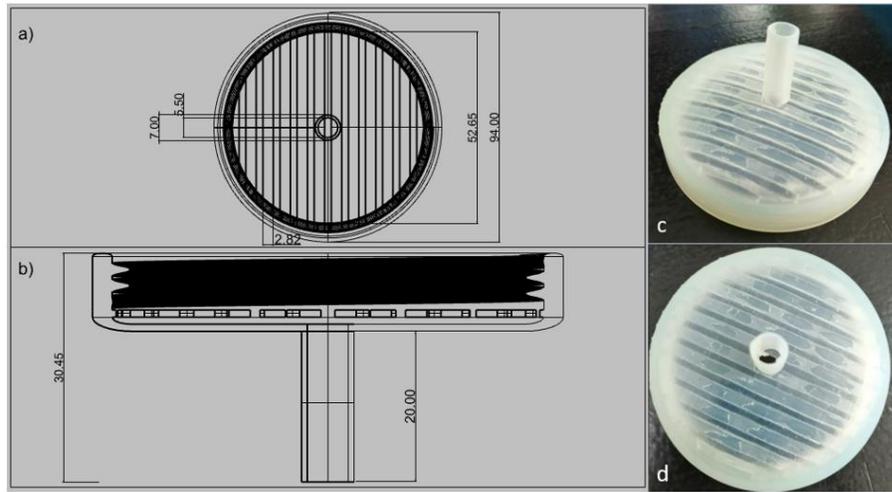


Figura 24 Tapa del dispositivo 3D. a: Pieza modelada en 3D con vista superior; b: Pieza modelada en 3D con vista frontal; c y d: Fotografías de distintas vistas de la tapa impresa mediante 3D.

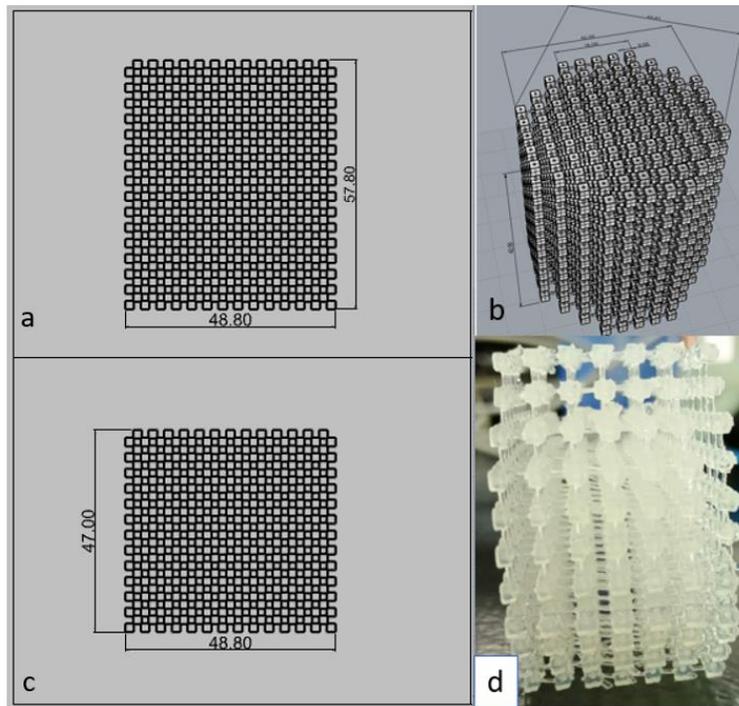


Figura 25 Red de Cubos interconectados. a: Pieza modelada en 3D en vista frontal; b: Vista en perspectiva de la pieza modelada en 3D; c: Vista superior de la pieza modelada en 3D; d) Fotografía a la pieza impresa en 3D.

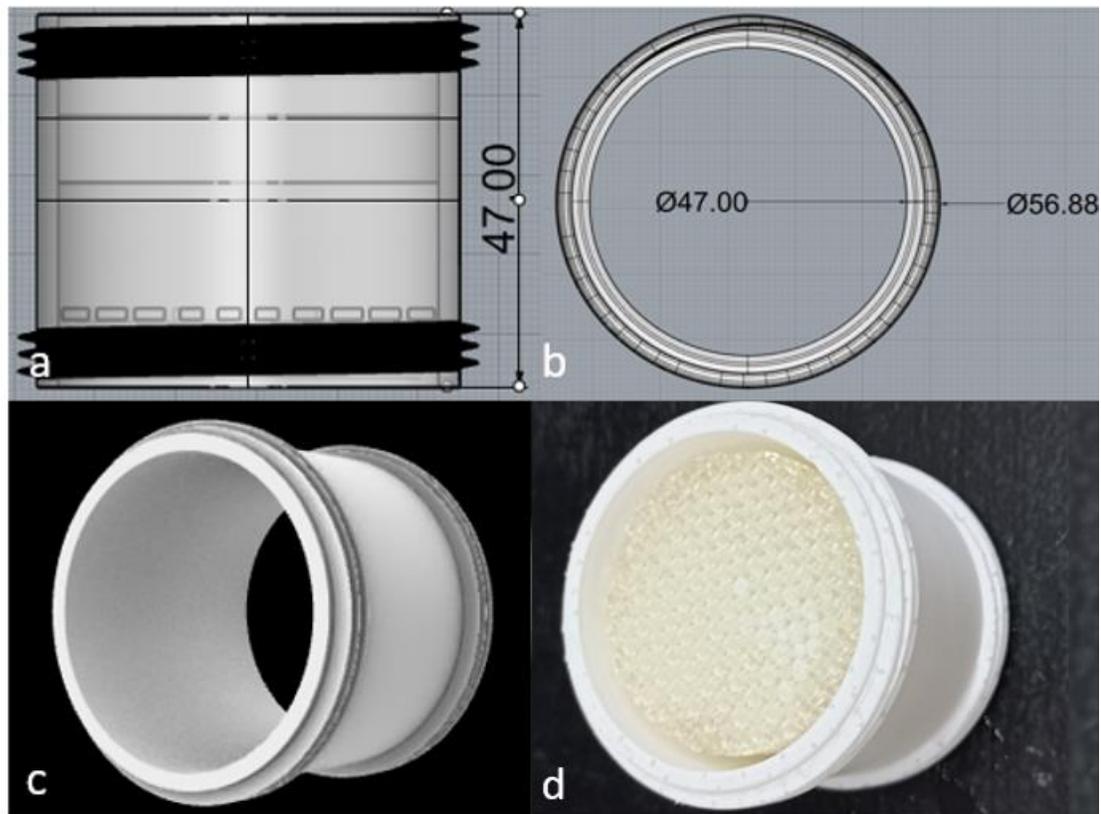


Figura 26 Tubería con rosca externa a: Vista frontal del dispositivo modelado en 3D; b: Vista superior del dispositivo; c: Vista en perspectiva; d: Fotografía de la impresión en 3D del dispositivo.

Los ensayos preliminares en el laboratorio se realizaron con un prototipo a escala 1:10 del dispositivo anteriormente descrito, con la finalidad de evitar un alto consumo de reactivos y tiempo de impresión.

Una vez que se optimizó el prototipo, se imprimió con la resina Rigid 10k para los futuros ensayos.

5.3. Evaluación de las resinas de extracción

La afinidad de las resinas de extracción hacia los analitos de interés fue evaluada mediante el análisis de disoluciones estándar de 50 mg L^{-1} preparadas en agua desionizada para cada

uno de los AINEs seleccionados para este estudio, i.e. diclofenaco, ketoprofeno, ibuprofeno y paracetamol. Para evaluar la capacidad de retención de tres resinas de SPE que han sido reportadas en estudios previos para extraer AINEs, se realizaron pruebas manuales, empleando cartuchos comerciales de cada resina. Los protocolos de extracción se llevaron a cabo empleando una jeringa y una bomba de vacío, con el objetivo de evaluar las eficiencias de extracción de cada una. En la Tabla 7 se puede apreciar el procedimiento para la SPE de cada resina utilizada.

Tabla 7. Procedimiento de extracción en fase sólida para cada resina de extracción.

Etapa SPE	tC18	Hlb	MCX
Acondicionamiento	3 mL Acetato de etilo y 3mL de metanol	2 mL Agua ultrapura y 2 mL de metanol	2 mL Agua ultrapura y 2 mL de metanol
Carga de muestra	10 mL de muestra acidificada a pH 3	10 mL de muestra	10 mL de muestra acidificada a pH 2
Lavado	5 mL de agua ultrapura	5 mL de agua ultrapura	5 mL de agua ultrapura
Elución	5 mL Acetato de etilo y 5 mL de metanol	2 ml de metanol	2 mL de metanol con un 2% de hidróxido de amonio
Masa resina	400 mg	380 mg	380 mg

Las disoluciones resultantes (eluatós) fueron recogidas y llevadas a un volumen final de 100 mL, para posteriormente realizar su análisis por medio de espectrofotometría UV-Vis. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8, donde se puede observar que la resina de extracción Oasis Hlb presenta los mayores porcentajes de extracción para paracetamol, ketoprofeno y diclofenaco, y un porcentaje aceptable para el ibuprofeno.

Tabla 8. Resultados de extracción en fase sólida.

Resina	Paracetamol ^a		Ketoprofeno ^b		Ibuprofeno ^c		Diclofenaco ^d	
	mg L ⁻¹	% de extracción	mg L ⁻¹	% de extracción	mg L ⁻¹	% de extracción	mg L ⁻¹	% de extracción
tC18	4.35 ±0.15	87	4.11 ±0.12	82	4.15±0.11	83	4.05±0.11	81
MCX	4.45 ±0.19	89	4.34 ±0.13	86	4.55±0.14	91	4.25±0.14	85
Hlb	4.55 ±0.11	91	4.41 ±0.09	88	4.31±0.10	86	4.85±.10	97

a, b, c y d; se utilizó una curva de calibrado individual para cada AINE (1, 10, 50 y 100 mg L⁻¹) obteniendo r > 0.99 en todos los casos. Los resultados son expresados como el valor medio ± la desviación estándar (n=3).

Por otra parte, se realizaron ensayos para evaluar la capacidad de carga de las 3 resinas de extracción en fase sólida. Para ello, 40 mg de cada una fueron utilizadas para las extracciones de los AINEs a diferentes concentraciones (10, 20, 50 y 100 mg L⁻¹) (Figura 27).

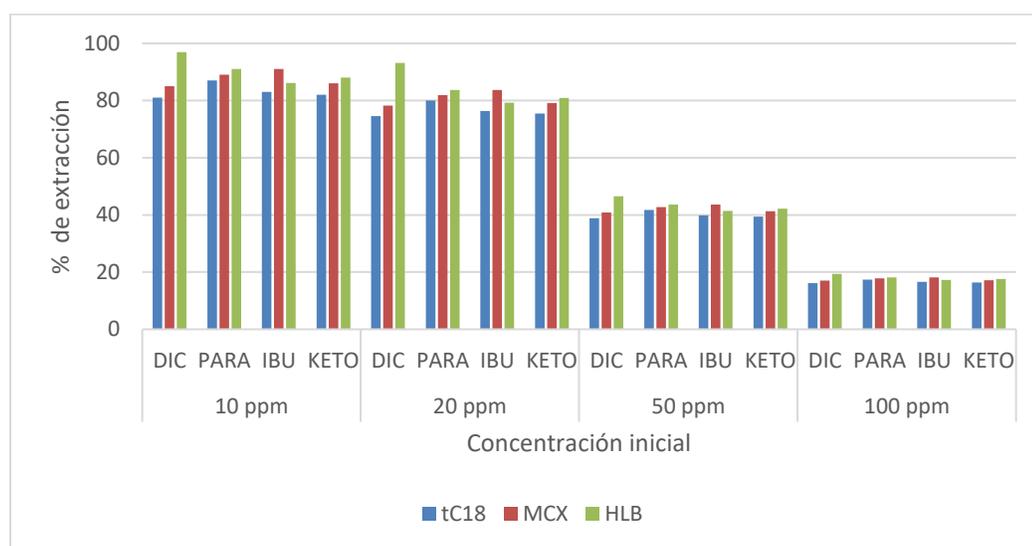


Figura 27. Capacidad de carga de las resinas de extracción en fase sólida. DIC: diclofenaco, PARA: paracetamol, IBU: ibuprofeno y KETO: ketoprofeno.

Los resultados obtenidos mostraron que para concentraciones superiores a 20 mg L⁻¹ la capacidad de extracción empieza a disminuir, debido a la saturación de los grupos funcionales de la resina de extracción. Por esto, se estableció como concentración máxima de retención 25 mg L⁻¹.

Con el objetivo de evaluar el porcentaje de extracción para cada uno de los AINEs mediante la resina de extracción adherida a la superficie del dispositivo impreso en 3D, se llevaron a cabo ensayos utilizando dos modalidades para recubrir los soportes empleando HPLC-DAD para su determinación.

Las modalidades de recubrimiento bajo estudio fueron *stick and cure*, el revestimiento post impresión con PVDF y una mezcla de ambos. Cada soporte se recubrió empleando 40 mg de resina de extracción (tC18, Hlb y MCX) y el procedimiento de SPE se llevó a cabo sobre 100 mL de una disolución estándar de 25 mg L⁻¹.

En la Tabla 9 se presentan los resultados obtenidos, donde se puede observar que el mayor porcentaje de extracción se obtiene con la resina de extracción Hlb de Oasis empleando el método de recubrimiento *stick and cure*.

Tabla 9. Eficiencia de extracción utilizando diferentes modalidades de recubrimiento de los dispositivos impresos en 3D.

	Paracetamol			Ketoprofeno			Diclofenaco			Ibuprofeno		
	Concentración (mg L ⁻¹)	Área de pico	% de extracción	Concentración (mg L ⁻¹)	Área de pico	% de extracción	Concentración (mg L ⁻¹)	Área de pico	% de extracción	Concentración (mg L ⁻¹)	Área de pico	% de extracción
Stick and cure tC18	8.99 ±0.03	305491	64.032	10.85 ±0.04	215605	56.58	7.30 ±0.03	632150	70.79	8.20 ±0.02	230777	67.20
Stick and cure MCX	8.62 ±0.02	292646	65.504	10.16 ±0.03	200625	59.34	6.42 ±0.03	546832	74.29	6.58 ±0.03	183273	73.67
Stick and cure H1b	8.26 ±0.02	279801	66.976	9.82 ±0.02	193135	60.72	2.88 ±0.02	200923	88.46*	7.55 ±0.04	211776	69.79
PVDF tC18	25.00 ±0.01	864234	0	25.00 ±0.01	522708	0	25 ± 0.01	2359843	0	25.00 ±0.01	723632	0
PVDF MCX	25.00 ±0.01	864234	0	25.00 ±0.01	522708	0	25 ± 0.01	2359843	0	25.00 ±0.01	723632	0
PVDF H1b	25.00 ±0.01	864234	0	25.00 ±0.02	522708	0	25 ± 0.01	2359843	0	25.00 ±0.01	723632	0
Recubrimiento mixto tC18	24.75 ±0.02	855508	1	24.77 ±0.02	517823	0.9	24.42 ±0.02	2303712	2.30	24.76 ±0.02	716518	0.97
Recubrimiento mixto MCX	24.69 ±0.03	853326	1.25	24.81 ±0.02	518637	0.75	24.70 ±0.02	2330557	1.20	24.48 ±0.02	708230	2.10
Recubrimiento mixto H1b	24.67 ±0.02	852715	1.32	25.00 ±0.01	522708	0	24.69 ±0.03	2329825	1.23	25.00 ±0.01	723632	0

* Combinación de técnica de fijación y resina de SPE que mejor % de extracción obtuvo. Los resultados son expresados como el valor medio ± la desviación estándar (n=3).

Como resultado de estos ensayos, se seleccionó la resina de SPE Oasis Hlb debido a que presenta los mayores porcentajes de extracción para paracetamol, ketoprofeno y diclofenaco, y un porcentaje aceptable para el ibuprofeno. Además, esta resina continúa presentando los mayores porcentajes de extracción cuando se adhiere al soporte impreso en 3D mediante la técnica *stick and cure*.

5.4. Incorporación del dispositivo impreso en 3D a un sistema de bombeo

Con la finalidad de desarrollar una metodología de extracción portátil y de aplicación en campo, se realizaron pruebas preliminares con un prototipo de uso dentro del laboratorio. Para tal efecto se realizó un modelado a escala.

Este ensayo consistió en acoplar el dispositivo impreso en 3D y recubierto según se explicó en los apartados anteriores, a una bomba peristáltica de flujo programable ($1-10 \text{ ml min}^{-1}$), para analizar una disolución de diclofenaco de $20 \mu\text{g L}^{-1}$, preparada en agua ultrapura. Las determinaciones fueron llevadas a cabo a través de GC/MS.

En la Figura 28 se muestra el esquema del modelo a escala y el sistema de extracción.



Figura 28 Diagrama e imagen de dispositivo adaptado a sistema de bombeo preliminar. Uso de bomba peristáltica dentro del laboratorio.

Para la aplicación en campo del sistema desarrollado, se hicieron pruebas empleando una bomba de pulsos a un caudal de 2.5 L min^{-1} . Los pasos del procedimiento de extracción fueron los mismos que para el modelo desarrollado a escala, solo variaron los volúmenes que fueron colectados y con los cuales se realizó la SPE. En la Figura 29 se muestra el esquema del sistema de extracción desarrollado para el estudio en campo.



Figura 29 Sistema de extracción para estudio en campo. Empleo en campo de una bomba de pulsos a un caudal de 2.5 L min^{-1} .

5.5. Optimización del sistema

Los ensayos experimentales anteriormente realizados, fueron planteados con la finalidad de definir el tipo de resina de impresión 3D, resina SPE y el recubrimiento de adhesión, lo que nos permitió seleccionar a Rigid 10 K, Oasis H1b y el procedimiento *stick and cure*, respectivamente, ya que estos, fueron los que mejores resultados presentaron. Debido a la naturaleza de los procedimientos implicados en el análisis de cada una de estas variables, el procedimiento experimental se realizó analizando de forma independiente cada uno de los factores bajo estudio.

Una vez definidas estas variables, se procedió directamente con la búsqueda de los valores óptimos para el volumen de elución y volumen de derivatizante, factores que

en conjunto afectan la eficiencia de extracción *in situ* de AINEs con la metodología propuesta, por lo que estos fueron sometidos a un análisis multivariante usando un diseño de experimentos central compuesto, metodología estadística cuyo procedimiento nos encamina a la obtención de los valores óptimos para cada una de las variables bajo estudio, cada resultado del arreglo experimental se obtuvo a través de un CG con detector MS. En la Tabla 10 se presentan los factores y niveles que se estudiaron.

Tabla 10. Factores y niveles evaluados.

Factores	+	-	Unidades
Volumen derivatizante (MSTFA)	70	30	μL
Volumen eluyente (Metanol)	75	45	mL

El orden, la configuración y la respuesta expresada como el área del pico cromatográfico se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Configuración aleatorizada del diseño experimental y su respuesta.

Corrida	Eluyente (mL)	Derivatizante (μL)	Respuesta (Área de pico)
1	60	50	5.35E+10
2	60	50	5.34E+10
3	75	70	5.89E+10
4	45	50	5.34E+10
5	60	70	5.31E+10
6	75	50	6.21E+10
7	75	30	4.45E+10
8	60	50	5.30E+10
9	45	30	3.97E+10
10	45	70	4.38E+10
11	60	30	4.30E+10

Las respuestas obtenidas fueron analizadas a través del software Minitab 19, donde a través de un análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 12), se pudo verificar que los factores, efectivamente ejercían una influencia significativa sobre las respuestas obtenidas, y esto puede observarse gracias al grado de significancia de los efectos de cada factor y sus interacciones. Para este caso, a través del *P-Value* (nivel de probabilidad límite) un factor es considerado significativo si *P* es menor que el 5% y con el indicativo falta de ajuste, se permitió dar veracidad a los resultados, ya que es un índice que para $P > 0.05$ señala que el modelo matemático propuesto por Minitab para la obtención de los valores óptimos de los factores se ajusta adecuadamente a los datos.

Tabla 12. Análisis de varianza (ANOVA).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	4.75900E+20	9.51799E+19	21.66	0.002
Lineal	2	2.72289E+20	1.36144E+20	30.99	0.002
Eluyente (ml)	1	1.36017E+20	1.36017E+20	30.96	0.003
Derivatizante (uL)	1	1.36272E+20	1.36272E+20	31.01	0.003
Cuadrático	2	1.77114E+20	8.85572E+19	20.15	0.004
eluyente (ml)*eluyente (ml)	1	4.99338E+18	4.99338E+18	1.14	0.335
derivatizante(uL)*derivatizante(uL)	1	1.75306E+20	1.75306E+20	39.90	0.001
Interacción de 2 factores	1	2.64962E+19	2.64962E+19	6.03	0.058
eluyente (ml)*derivatizante(uL)	1	2.64962E+19	2.64962E+19	6.03	0.058
Error	5	2.19693E+19	4.39386E+18		
Falta de ajuste	3	2.18613E+19	7.28710E+18	134.95	0.007
Error puro	2	1.07996E+17	5.39981E+16		
Total	10	4.97869E+20			

Factores resaltados en color negro, muestran un efecto significativo sobre la respuesta

Además, en el diagrama de Pareto de efectos estandarizados (Figura 30) se puede apreciar que ambos factores, tanto el volumen del eluyente como el del derivatizante, ejercen un efecto positivo sobre la respuesta, es decir que al aumentar el valor de ambas variables aumenta el porcentaje de extracción (vol. de eluyente) y el de detección (vol. de derivatizante). En la Figura 31 se puede observar el diagrama de superficie de respuesta para las variables evaluadas.

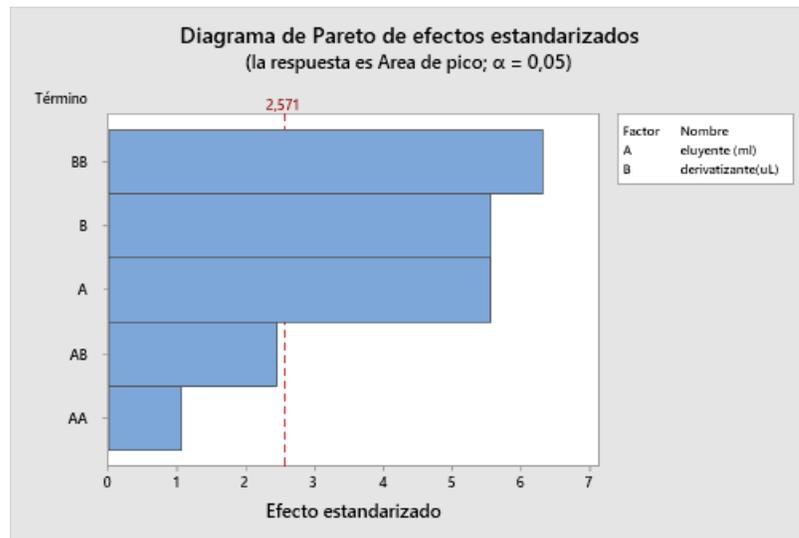


Figura 30. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados.

Finalmente, con el uso de la herramienta “optimizador de respuesta” del software Minitab, se obtuvo un gráfico resumen que refleja el arreglo de valores de las variables para lograr la máxima respuesta dentro del dominio experimental estudiado.

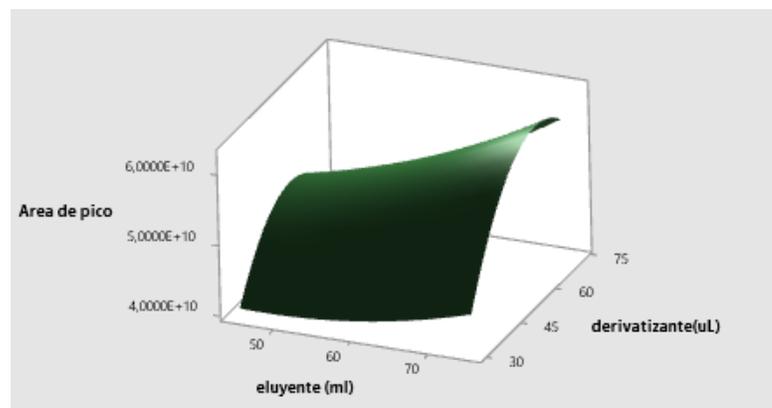


Figura 31. Gráfica de superficie de respuesta: Área de pico vs volumen de derivatizante y volumen de eluyente.

En la Figura 32, se muestran en rojo (los números entre corchetes y la línea vertical) los valores codificados de los niveles de las variables en los que se logra la

máxima señal de diclofenaco, alcanzando como máximo predictivo (línea punteada azul), el valor de Y que se encuentra en azul.

La letra D mostrada en la parte superior izquierda señala la deseabilidad, la cual evalúa la efectividad con la que la combinación de variables de entrada o factores satisface la meta de optimización que se haya definido para la respuesta (maximizar). D toma valores de 0 a 1, donde cero indica que existe una muy baja efectividad en esa combinación de valores para alcanzar el máximo, mientras que el 1 constituye el valor más deseado y el indicativo de que se ha alcanzado el óptimo buscado. Por lo tanto, podemos concluir que para un valor de D=1, la configuración de valores para nuestras variables es la óptima en lo que a maximizar la respuesta se refiere.

Dado que se obtuvo un valor óptimo para el volumen de derivatizante de 58.68 μL , por cuestiones prácticas, este se fijó en 60 μL . Sin embargo, el factor eluyente no alcanza a mostrar su valor óptimo, solo muestra una tendencia al alza, aun y cuando llega al nivel más alto analizado, por lo que se someterá a un estudio univariante.

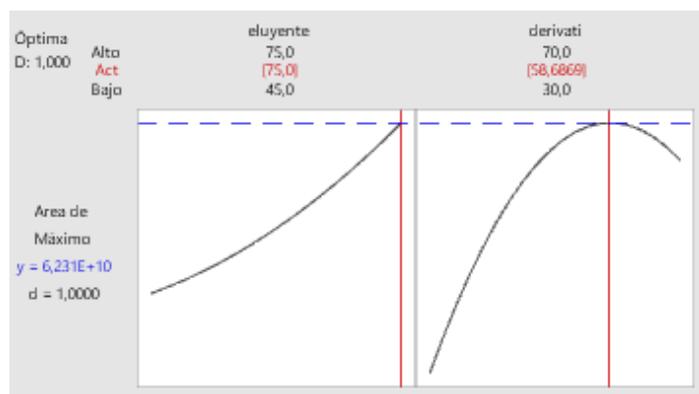


Figura 32. Optimización de respuesta.

Para el análisis univariante, el valor del derivatizante se fijó en 60 μL y para el eluyente se seleccionaron 4 niveles por encima del máximo ensayado en la superficie de

respuestas (75, 85, 95 y 105 mL respectivamente). Cada ensayo se realizó por triplicado (Figura 33).

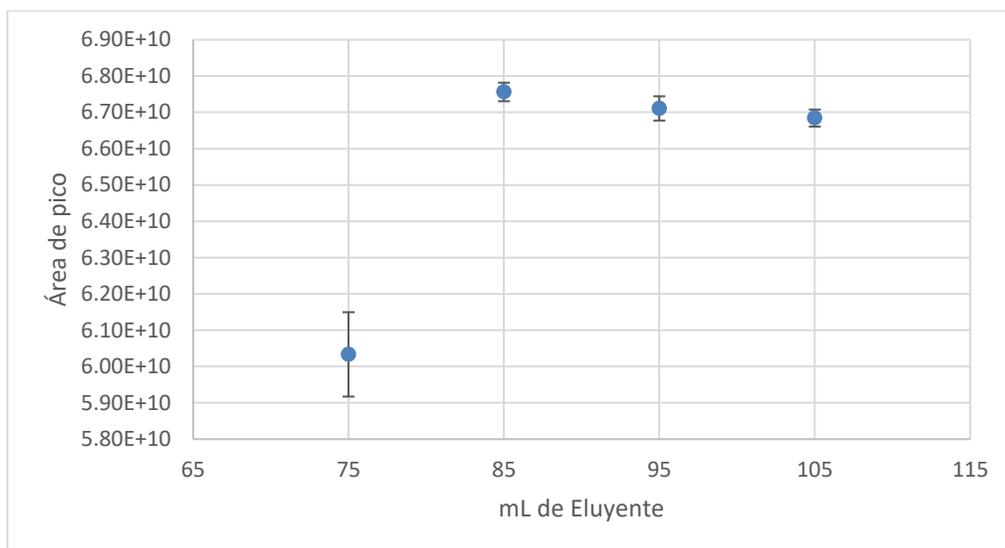


Figura 33. Optimización de eluyente mediante ensayo univariante.

En la Figura 33, se puede observar que con un volumen de 85 mL se alcanza el área de pico máximo y esto nos indica el valor indicado para realizar las eluciones posteriores en el método propuesto.

Así, como resultado de estos ensayos los volúmenes de elución para la extracción en fase sólida y el volumen de derivatizante para realizar la determinación de AINEs mediante GC/MS, fueron de 85 mL y 60 μ L, respectivamente.

5.6. Validación del método propuesto

En esta tesis de maestría se han utilizado dos técnicas cromatográficas, HPLC-DAD y GC/MS, mostrando la versatilidad de la técnica de extracción *in situ* de AINEs para adaptarse a ambos tipos de cromatografía.

Para trabajar con HPLC-DAD, primero se han identificado los tiempos de retención de cada uno de los fármacos (Tabla 13). En la Figura 34, se muestra un cromatograma del análisis de una disolución que contenía la mezcla de los 4 AINEs (1 mg L⁻¹ de cada uno).

Tabla 13 Tiempos de retención de los 4 analitos analizados.

Analito	Tiempo de retención (min)
(1) Paracetamol	1.22
(2) Ketoprofeno	3.61
(3) Diclofenaco	4.08
(4) Ibuprofeno	4.44

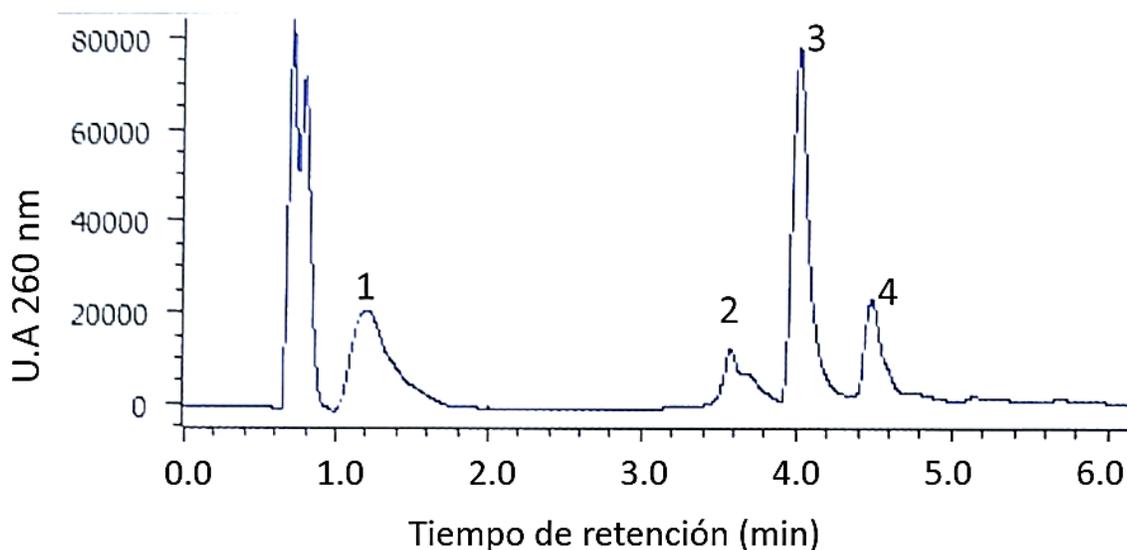


Figura 34. Perfiles cromatográficos característicos del paracetamol (1), ketoprofeno (2), diclofenaco (3) e ibuprofeno (4).

Estos ensayos se realizaron utilizando una columna C18 de tecnología Core Shell. La separación se llevó a cabo en gradiente, variando la composición entre una disolución de buffer de fosfato a un pH de 4 y acetonitrilo (ACN) (entre 90:10 y 10:90 buffer: acetonitrilo) a un flujo de 0.75 mL min^{-1} siguiendo una rampa como se muestra en la Figura 35.

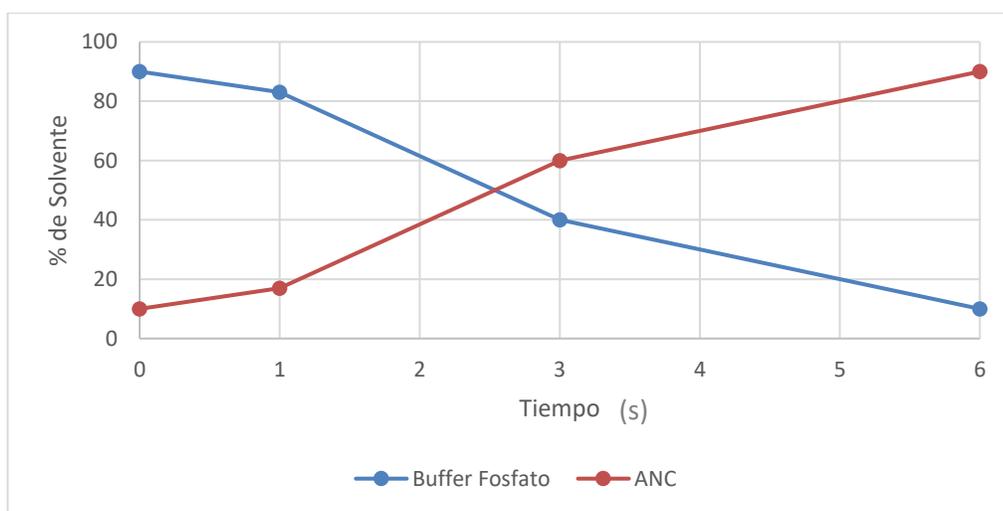


Figura 35. Gradiente utilizado en la determinación de AINEs por RP-HPLC.

En el caso de la GC/MS, se estudió el diclofenaco como prueba de concepto, usando los parámetros instrumentales indicados en el apartado 4.4.3. Con el objetivo de validar el método propuesto, se evaluaron distintos parámetros analíticos que se presentan a continuación.

- Tiempo de retención

En la Figura 36 se muestra un cromatograma de un patrón de diclofenaco, extraído mediante el dispositivo propuesto, en el que se puede observar el tiempo de retención.

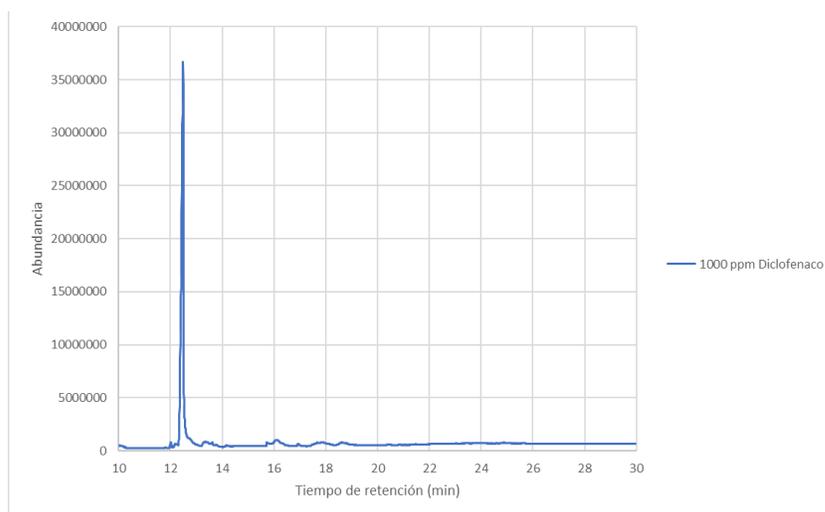


Figura 36. Perfil cromatográfico de diclofenaco por GC/MS.

- Linealidad

Se refiere al intervalo de concentraciones en el cual la respuesta es lineal. En el caso de este estudio se comprobó la linealidad en un rango de 0.5 a 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de diclofenaco ($R^2=0.9984$).

En la Figura 37 se puede observar la representación de la curva de calibrado y la ecuación de la recta.

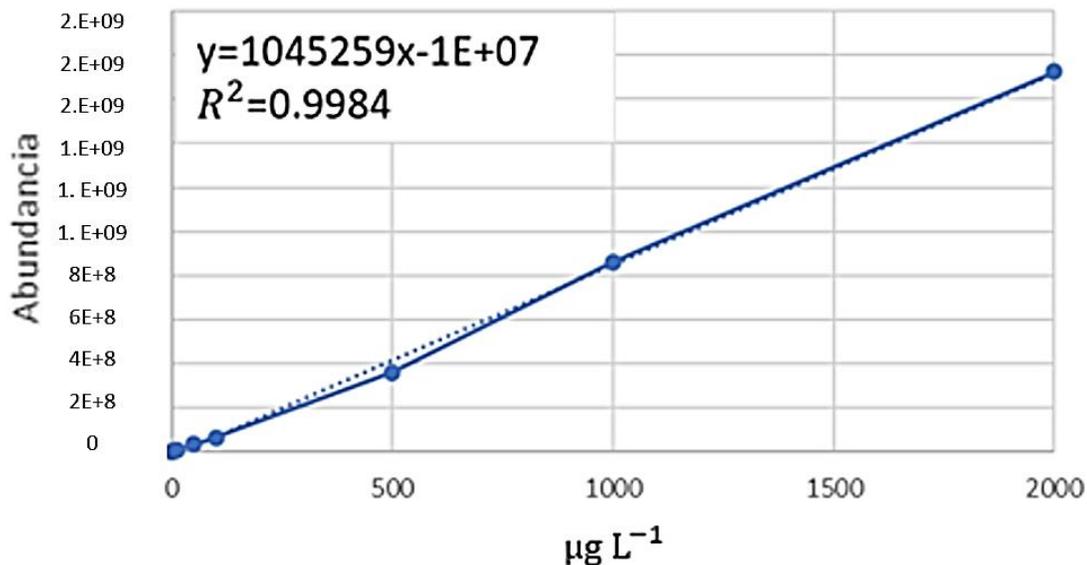


Figura 37. Curva de calibración para diclofenaco en GC/MS.

- Límite de detección

El límite de detección (LOD) es la concentración más baja de un determinado compuesto que puede ser detectado de manera fiable, es decir que presenta una señal significativamente diferente a la señal del blanco. Según la IUPAC [51], el LOD se calcula como tres veces la desviación estándar de la señal del blanco de reactivos dividido entre la pendiente de la recta de calibrado. El LOD alcanzado para el diclofenaco es de $0.86 \mu\text{g L}^{-1}$.

- Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LOQ) es la concentración más baja de un determinado compuesto que puede ser cuantificada de manera fiable. Según la IUPAC [51], se calcula como 10 veces la desviación estándar de la señal del blanco de reactivos dividido entre la pendiente de la recta de calibrado. El LOQ obtenido para el diclofenaco es de $2.86 \mu\text{g L}^{-1}$.

- Precisión

La precisión indica el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el mismo proceso experimental repetidas veces sobre la misma muestra bajo condiciones constantes establecidas. Se calculó la precisión intradía en dos niveles de concentración (10 y 70 $\mu\text{g L}^{-1}$), a partir de la señal analítica de los patrones y se obtuvo una desviación estándar relativa de 0.04 %, considerándose satisfactoria ya que no excede del 5% en la señal obtenida (Tabla 14).

Tabla 14. Áreas de picos correspondientes a patrones de diclofenaco de 10 y 70 $\mu\text{g L}^{-1}$ para calcular la precisión intradía del método.

n	Área 10 $\mu\text{g L}^{-1}$	Área 70 $\mu\text{g L}^{-1}$
1	8.22E+06	4.07E+07
2	8.22E+06	4.07E+07
3	8.23E+06	4.07E+07
4	8.22E+06	4.07E+07
5	8.23E+06	4.07E+07
6	8.22E+06	4.07E+07
7	8.22E+06	4.07E+07
8	8.22E+06	4.07E+07
9	8.22E+06	4.07E+07
10	8.22E+06	4.07E+07
DSTD	3.89E+03	1.69E+04
RSD %	0.047	0.042

De igual manera, se calculó la precisión interdía para 5 días consecutivos con una concentración de 70 $\mu\text{g L}^{-1}$, obteniendo de nuevo una desviación estándar menor al 5% (Tabla 15).

Tabla 15. Áreas de picos correspondientes a un patrón de diclofenaco 70 µg L⁻¹ para calcular la precisión interdía del método.

n	Área 70 µg L ⁻¹
1	40699196
2	40700417
3	40675997
4	40666637
5	40667450
DSTD	16723
RSD %	0.041

- Factor de enriquecimiento

Este parámetro es muy importante a la hora de realizar preconcentraciones, entre más se preconcentra la muestra, mejor desempeño tendrá la determinación en cualquier técnica a utilizar. En el caso de este trabajo, se analizó un volumen de muestra de 100 mL y se eluyó con un volumen de 10 mL, este volumen a su vez fue llevado a 2 mL mediante la evaporación con un flujo de gas nitrógeno. Posteriormente, se le adicionaron 0.9 mL de acetato de etilo y 0.1 mL de agente derivatizante, por lo que el factor de enriquecimiento (FE) llega a una preconcentración de 33 veces.

$$FE = \frac{V_{muestra}}{V_{eluato}} = \frac{100\text{mL}}{3\text{mL}} = 33.33$$

5.7. Aplicación de la metodología en el análisis de muestras reales

Los efectos interferentes fueron analizados por medio de la sensibilidad analítica entre 2 curvas de calibrado, una preparada en agua ultrapura y otra en agua residual, la cual fue previamente analizada para comprobar que no presentaba diclofenaco. El análisis de la muestra de agua residual, con una elevada complejidad de la matriz, permite evaluar la

metodología propuesta. Las curvas de calibración obtenidas mediante GC se muestran en la Figura 38.

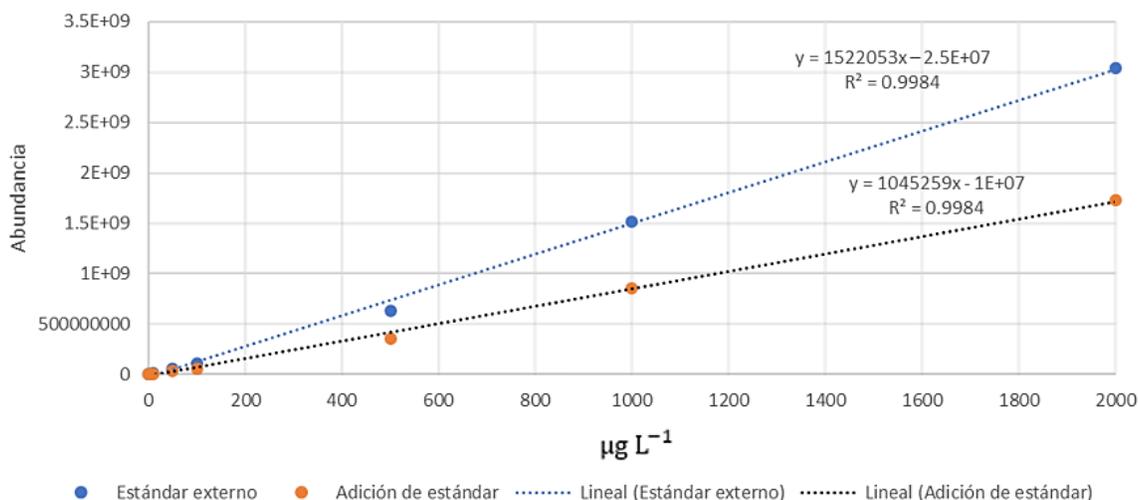


Figura 38. Calibración de diclofenaco en agua ultrapura y en agua residual.

Como se puede apreciar en la Figura 38, para el caso de las muestras preparadas en agua ultrapura se obtiene una mayor sensibilidad (Figura 38 azul) en comparación con la curva de calibrado preparada en agua residual (Figura 38 naranja). Sin embargo, el uso de un derivatizante permite reducir el error que pueda darse por la competición entre el diclofenaco y los otros compuestos de la matriz, por lo que la respuesta sigue respondiendo de una manera lineal, pero con una menor sensibilidad (una pendiente de menor valor).

La aplicación del método se realizó mediante la cromatografía de gases, con un sistema de temperatura de vaporización programable (PTV), lo que permitió aumentar la cantidad de muestra inyectada para una mayor señal analítica. En la Figura 39, se muestra la rampa de temperatura utilizada.

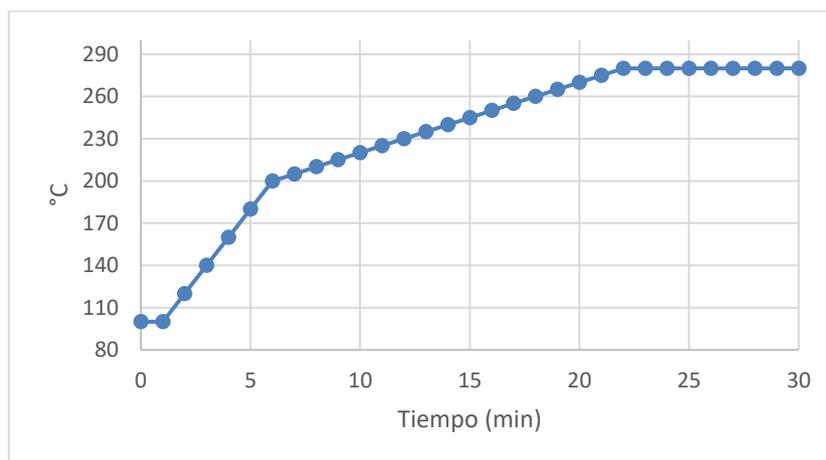


Figura 39. Rampa de temperatura de cromatografía de gases

Dado que para llevar a cabo la separación mediante PTV/GC/MS se inyectó un volumen de 25 μL , el método necesitó de nitrógeno para enfriar el inyector al finalizar cada ensayo y así ajustar a la temperatura inicial del método (100°C). Este método PTV fue operado en el modo “Solvent Vent” a un flujo de 3 mL min^{-1} , manteniendo una presión constante en la columna de 10.52 psi y manteniendo también un flujo de fase móvil (Helio) de 1 mL min^{-1} , se trabajó con un tiempo de retraso de 10 min para no sobrecargar el filamento de excitación ya que, para el diclofenaco, su tiempo de retención es de 12.3 min. En el modo SIM se configuró al detector con los valores de m/z de 214.1, 242 y 179, ya que previos análisis indicaron que, esos eran los fragmentos mayoritarios característicos del diclofenaco ya derivatizado. Por lo tanto, en resumen, el analito eluye a un tiempo de retención de 12.3 min y requiere de un tiempo de análisis de 30 min, duración suficiente para no tener una contaminación en la columna y evitar algún error en mediciones posteriores.

Se realizó una adición de $200\ \mu\text{g L}^{-1}$ de diclofenaco a muestras de agua desionizada y agua de grifo con la finalidad de estimar el porcentaje de recuperación del método propuesto (Tabla 16). Una curva de calibrado para el GC/MS de 6 puntos (0, 50, 100, 200, 300 y $500\ \mu\text{g L}^{-1}$) fue preparada para los fines de análisis.

Tabla 16. Recuperación de diclofenaco mediante el dispositivo impreso en 3D usando GC.

Muestra	n	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% Recuperación
Agua desionizada	1	184.95 \pm 0.03	92
	2	181.91 \pm 0.02	91
	3	183.48 \pm 0.02	92
Agua de grifo	1	178.42 \pm 0.01	89
	2	177.92 \pm 0.02	89
	3	179.52 \pm 0.03	90

Los resultados son expresados como el valor medio \pm la desviación estándar (n=3).

De la Tabla 16 podemos observar que, el porcentaje de recuperación obtenido es satisfactorio para las dos matrices analizadas, entre el 89 y el 92%.

También se realizó el análisis a muestras de agua tomadas de la PTAR de Bendinat, Calviá, Mallorca, España. El muestreo se realizó en tres sitios diferentes: entrada a decantación primaria (EDEP1), salida de decantación secundaria (SDEP2) y salida de tratamiento terciario (STER). A todas las muestras se les aplicó la metodología desarrollada y se hizo una determinación de diclofenaco por medio de GC/MS. Las muestras se analizaron sin y con adición de diclofenaco ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) para calcular el porcentaje de recuperación, obteniendo los resultados que se presentan en la Tabla 17.

Tabla 17. Recuperación de diclofenaco mediante el dispositivo impreso en 3D al contacto con agua procedente de una PTAR

Muestra	$\mu\text{g L}^{-1}$	% Recuperación
EDEP1	15.39 ± 0.07	-
EDEP1*	33.38 ± 0.09	90
SDEP2	4.48 ± 0.03	-
SDEP2*	22.60 ± 0.05	91
STER	0.0992 ± 0.001	-
STER*	18.14 ± 0.08	90

*Adicionados con $20 \mu\text{g L}^{-1}$ para calculo de porcentaje de recuperaci3n. Los resultados son expresados como el valor medio \pm la desviaci3n est3ndar (n=3).

Se puede observar que el porcentaje de recuperaci3n contin3a siendo satisfactorio, aun analizando matrices tan complejas como el agua residual. Este hecho demuestra que el dispositivo dise1ado es 3til para realizar muestreos en campo, siendo capaz de recuperar por encima del 90% del analito de inter3s, en este caso diclofenaco.

Por 3ltimo, se realiz3 un ensayo de reutilizaci3n del dispositivo dise1ado, empleando la misma metodolog3a un total de 10 veces (n=10) sobre la misma muestra con un solo dispositivo y se compar3 con el 3rea de pico que arroja el cromat3grafo en cada uno de los ensayos, obteniendo los resultados que se muestran en la Figura 40.

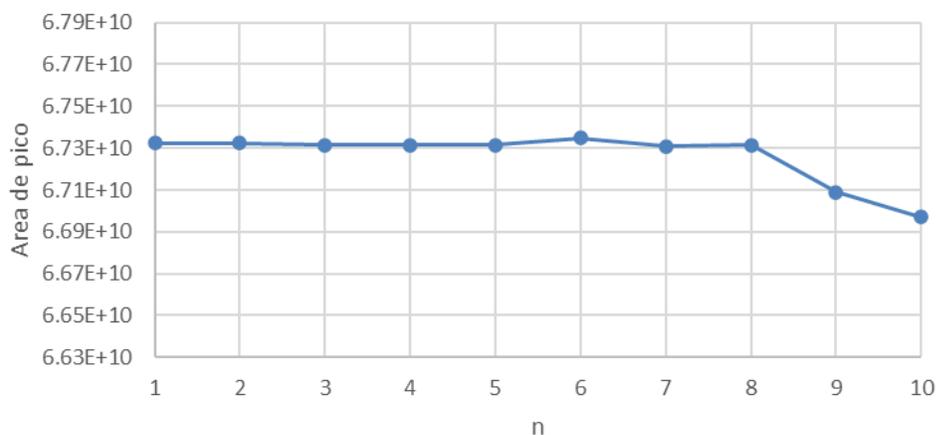


Figura 40. Reutilizaci3n del dispositivo impreso en 3D recubierto con resina de SPE, para la extracci3n de diclofenaco.

De la Figura 40, se puede observar que utilizar hasta 8 veces el mismo dispositivo para un análisis es factible ya que, para valores de utilización superiores, ocasiona una caída en la intensidad de la señal cromatográfica, lo cual puede deberse a un efecto mecánico con la resina de extracción que está fijada al dispositivo impreso, es decir que, por efectos físicos como la misma fricción, pueda causar un desprendimiento de la resina y así se dé una pérdida de eficiencia.

Capítulo 6: Conclusiones

Se desarrolló un dispositivo mediante impresión en 3D, para realizar la extracción *in situ* de fármacos AINEs en agua, los cuales fueron posteriormente cuantificados mediante técnicas cromatográficas, específicamente cromatografía de gases acoplada a un detector de masas, y cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de arreglo de diodos.

Se encontró que los dispositivos impresos en 3D son excelentes soportes para la SPE, ya que son soportes inertes en los que se pueden obtener geometrías complejas que ayudan a mejorar las condiciones de la extracción. Considerando los resultados obtenidos al evaluar las resinas de impresión en 3D, la resina seleccionada fue la Rigid 10k, debido a su menor grado de desprendimiento de resina no polimerizada y a la resistencia mecánica a todos los solventes ensayados.

Se diseñó y construyó un dispositivo impreso en 3D, que sirvió de soporte para ser recubierto por una resina de extracción selectiva

Se evaluaron distintas resinas de extracción reportadas en la bibliografía y a su vez, la forma de recubrir los dispositivos con las resinas de SPE. Los resultados permiten concluir que la resina de SPE Oasis Hlb fijada al dispositivo mediante la técnica *stick and cure*, presenta los mayores porcentajes de extracción para paracetamol, ketoprofeno y diclofenaco, y un porcentaje aceptable para el ibuprofeno.

Se incorporó el dispositivo impreso en 3D recubierto con resina de SPE en un sistema de bombeo y se analizaron muestras arrojando resultados satisfactorios. Se optimizó el método propuesto mediante diseño de experimentos, estudiando las variables volumen de eluyente y volumen de derivatizante. Se encontró que es muy importante que el volumen del eluyente sea el suficiente para alcanzar un porcentaje de extracción superior al 90%, por lo que se fijó en 85 mL. El volumen de derivatizante fue optimizado, debido a que una elevada concentración puede dar lugar a una pérdida en la señal analítica, fijándose en 60 μ L.

Se validó el método propuesto, usando el diclofenaco como modelo para su cuantificación por medio de GC/MS, previa derivatización. Los parámetros analíticos que

presenta el método propuesto son: un rango lineal de 0.5 a 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$, un LOD y un LOQ de 0.86 y 2.86 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, suficientes para analizar muestras de agua residual ya que los valores promedio reportados de diclofenaco están cerca de los 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

El comportamiento del dispositivo impreso en 3D en el análisis de distintas muestras de agua (agua desionizada, de grifo y residual) fue satisfactorio, alcanzando en todos los casos porcentaje de recuperación de 90%. Este hecho demuestra que las potenciales interferencias de matriz fueron minimizadas y de la elevada capacidad que presenta el dispositivo para retener al analito y posteriormente realizar su correcta determinación.

Por último, el dispositivo impreso en 3D se aplicó a la extracción *in situ* de diclofenaco en muestras de la PTAR de Bendinat (Calvià, Mallorca, España). Los resultados indicaron la presencia de diclofenaco en el agua de la entrada al tratamiento primario, en la salida del tratamiento secundario y en la salida del tratamiento terciario en concentraciones que concuerdan con las reportadas en la bibliografía, y que permite observar que el tratamiento convencional (primario y secundario) no es suficiente para una óptima remoción de este tipo de contaminantes siendo necesario un tratamiento adicional o terciario.

Recomendaciones

- Contemplar el uso de una bomba de aspiración que sea independiente de la electricidad, manual o solar, que permitiría realizar análisis *in situ* en sitios remotos.
- Implementar la misma metodología para el muestreo a campo y el análisis de otros medicamentos, por ejemplo, antibióticos, o al análisis de productos de la industria alimentaria, como Bisfenol A, cafeína, o de la industria del cuidado personal como los parabenos, triclosán e incluso protectores solares, ya que estos también están considerados como CE. Fuera de los CE se pudiera proponer un muestreo de metales, utilizando resinas específicas que retengan metales de interés.
- Automatizar el proceso de derivatización ya que se lograría ahorrar tiempo y cantidad de reactivos utilizados, así como también disminuir el error humano.

Referencias bibliográficas

- [1] B. D. Blair, J. P. Crago, C. J. Hedman, and R. D. Klaper, "Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern," *Chemosphere*, vol. 93, no. 9, pp. 2116–2123, 2013, doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.07.057.
- [2] T. Ternes and A. Joss, "Human pharmaceuticals, hormones and fragrances: The micropollutant challenge for urban water management", no. DEC. 2006.
- [3] M. Scheurell, S. Franke, R. M. Shah, and H. Hühnerfuss, "Occurrence of diclofenac and its metabolites in surface water and effluent samples from Karachi, Pakistan," *Chemosphere*, vol. 77, no. 6, pp. 870–876, Oct. 2009, doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2009.07.066.
- [4] X. M. Chen, D. R. da Silva, and C. A. Martínez-Huitle, "Application of advanced oxidation processes for removing salicylic acid from synthetic wastewaters," *Chinese Chem. Lett.*, vol. 21, no. 1, pp. 101–104, 2010, doi: 10.1016/j.ccllet.2009.08.001.
- [5] N. Nakada, T. Tanishima, H. Shinohara, K. Kiri, and H. Takada, "Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment," *Water Res.*, vol. 40, no. 17, pp. 3297–3303, 2006, doi: 10.1016/j.watres.2006.06.039.
- [6] G. Shanmugam, S. Sampath, K. K. Selvaraj, D. G. J. Larsson, and B. R. Ramaswamy, "Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Indian rivers," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 21, no. 2, pp. 921–931, 2014, doi: 10.1007/s11356-013-1957-6.
- [7] Y. Praveenkumarreddy, K. Vimalkumar, B. Ramaswamy, R. Kumar, V. Singhal, R. K. Basu, H. Gopal, C. M. Vandana, K. E. Bhat, K. Udayashankar, and K. Balakrishna. "Assessment of non-steroidal anti-inflammatory drugs from selected wastewater treatment plants of Southwestern India". *Emerging Contaminants*, vol. 7, pp. 43–51. (2021). <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2021.01.001>
- [8] W. L. Chou, C. T. Wang, K. Y. Huang, and T. C. Liu, "Electrochemical removal

- of salicylic acid from aqueous solutions using aluminum electrodes,” *Desalination*, vol. 271, no. 1–3, pp. 55–61, 2011, doi: 10.1016/j.desal.2010.12.013.
- [9] N. Voilley, J. De Weille, J. Mamet, and M. Lazdunski, “Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors,” *J. Neurosci.*, vol. 21, no. 20, pp. 8026–8033, 2001, doi: 10.1523/jneurosci.21-20-08026.2001.
- [10] E. Stone. "An account of the success of the bark of the willow in the cure of agues. In a letter to the Right Honourable George Earl of Macclesfield, President of RS from the Rev. Mr. Edward Stone, of Chipping-Norton in Oxfordshire". *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, vol. 53, pp. 195-200, doi: <https://doi.org/10.1098/rstl.1763.0033>
- [11] M. V. Bielsa-Fernández, J. L. Tamayo-de la Cuesta, J. Lizárraga-López, J.M. Remes-Troche, R. Carmona-Sánchez, J.M. Aldana-Ledesma, J.M. Avendaño-Reyes, M.A. Ballesteros-Amozorrutia, M. De Ariño, L. De Giau-Triulzi, R. Flores-Rendón, H. Huerta-Guerrero, J.A. González-González, A. Hernández-Guerrero, E. Murcio-Pérez, J.O. Jáquez-Quintana, A. Meixueiro-Daza, J.R. Nogueira-de Rojas, H. Rodríguez-Hernández, and F. Zamarripa-Dorsey. "Consenso mexicano sobre diagnóstico, prevención y tratamiento de la gastropatía y enteropatía por antiinflamatorios no esteroideos". *Revista de gastroenterología de Mexico*, vol. 85, no 2, pp. 190–206. (2020). doi: <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2019.11.003>
- [12] A. R. Sallmann, “The history of diclofenac,” *Semin. Arthritis Rheum.*, vol. 15, no. 2, pp. 57–60, 1985, doi: 10.1016/S0049-0172(85)80011-1.
- [13] G. A. Green, “Understanding NSAIDs: From aspirin to COX-2,” *Clin. Cornerstone*, vol. 3, no. 5, pp. 50–59, 2001, doi: 10.1016/S1098-3597(01)90069-9.
- [14] S. A. Snyder, “Occurrence, treatment, and toxicological relevance of EDCs and pharmaceuticals in water,” *Ozone Sci. Eng.*, vol. 30, no. 1, pp. 65–69, 2008, doi: 10.1080/01919510701799278.
- [15] C. Mimeault, A. J. Woodhouse, X. S. Miao, C. D. Metcalfe, T. W. Moon, and V. L. Trudeau, “The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces

- testosterone in the goldfish, *Carassius auratus*,” *Aquat. Toxicol.*, vol. 73, no. 1, pp. 44–54, 2005, doi: 10.1016/j.aquatox.2005.01.009.
- [16] A. M. Peck, “Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 386, no. 4, pp. 907–939, 2006, doi: 10.1007/s00216-006-0728-3.
- [17] K. Fent, A. A. Weston, and D. Caminada, “Ecotoxicology of human pharmaceuticals,” *Aquat. Toxicol.*, vol. 76, no. 2, pp. 122–159, 2006, doi: 10.1016/j.aquatox.2005.09.009.
- [18] U. G. J. Zur, A. Pinski, A. Marchlewicz, K. Hupert-Kocurek, D. Wojcieszynska, “Organic micropollutants paracetamol and ibuprofen—toxicity, biodegradation, and genetic background of their utilization by bacteria,” *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 25, No. 2 pp. 21498-21524, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2517-x>
- [19] J. O. Tijani, O. O. Fatoba, and L. F. Petrik, “A review of pharmaceuticals and endocrine-disrupting compounds: Sources, effects, removal, and detections,” *Water. Air. Soil Pollut.*, vol. 224, no. 11, 2013, doi: 10.1007/s11270-013-1770-3.
- [20] M. Williams, R. S. Kookana, A. Mehta, S. K. Yadav, B. L. Tailor, and B. Maheshwari, “Emerging contaminants in a river receiving untreated wastewater from an Indian urban centre,” *Sci. Total Environ.*, vol. 647, pp. 1256–1265, 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.084.
- [21] J. AntoniĆ and E. Heath, “Determination of NSAIDs in river sediment samples,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 387, no. 4, pp. 1337–1342, 2007, doi: 10.1007/s00216-006-0947-7.
- [22] S. sociales e igualdad Ministerio de Sanidad and A. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, “Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in Spain during the period 2013-2016,” 22 *Septiembre*, pp. 1–5, 2017, [Online]. Available: <https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/docs/antiinflamatorios-AINEs-periodo-2013-2016.pdf>.
- [23] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), “Seguridad

cardiovascular de los AINE tradicionales: conclusiones de la revisión de los últimos estudios publicados,” *Nota Inf. Segur. los Medicam.*, pp. 1–4, 2012, [Online]. Available:

https://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosUsoHumano/seguridad/2012/docs/NI-MUH_FV_15-2012.pdf.

- [24] A. Espa and P. S. Aemps, “Aceclofenaco y riesgo cardiovascular: Nuevas restricciones de uso,” *Gac. Medica Bilbao*, vol. 111, no. 4, pp. 121–122, 2014.
- [25] A. Espa and P. S. Aemps, “Riesgo cardiovascular de dosis altas de ibuprofeno odexibuprofeno: recomendaciones de uso,” *Gac. Medica Bilbao*, vol. 112, no. 2, pp. 141–142, 2015.
- [26] A. Rodríguez-Anaya, P. Octavio-Aguilar, and J. C. Gaytán-Oyartzún, “Consumo de fármacos antiinflamatorios no esteroideos en Pachuca, Hidalgo,” *Salud Publica Mex.*, vol. 57, no. 5, pp. 365–366, 2015.
- [27] B. Hoeger, B. Köllner, D. R. Dietrich, and B. Hitzfeld, “Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*),” *Aquat. Toxicol.*, vol. 75, no. 1, pp. 53–64, 2005, doi: 10.1016/j.aquatox.2005.07.006.
- [28] J. L. Wilkinson, P. S. Hooda, J. Barker, S. Barton, and J. Swinden, “Ecotoxic pharmaceuticals, personal care products, and other emerging contaminants: A review of environmental, receptor-mediated, developmental, and epigenetic toxicity with discussion of proposed toxicity to humans,” *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, vol. 46, no. 4, pp. 336–381, 2016, doi: 10.1080/10643389.2015.1096876.
- [29] A. J. Ebele, M. Abou-Elwafa Abdallah, and S. Harrad, “Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment,” *Emerg. Contam.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–16, 2017, doi: 10.1016/j.emcon.2016.12.004.
- [30] M. J. García-Galán, S. González Blanco, R. López Roldán, S. Díaz-Cruz, and D. Barceló, “Ecotoxicity evaluation and removal of sulfonamides and their acetylated metabolites during conventional wastewater treatment,” *Sci. Total Environ.*, vol. 437, pp. 403–412, 2012, doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.08.038.
- [31] L. Castro-Pastrana, M. I. Baños-Medina, M. A. López-Luna, B. L. Torres-García,

- “Ecofarmacovigilancia en México: perspectivas para su implementación,” *Rev. Mex. Ciencias Farm.*, vol. 46, no. 3, pp. 16–40, 2015.
- [32] Y. Zhou, J. Xu, N. Lu, X. Wu, Y. Zhang, and X. Hou, “Development and application of metal-organic framework@GA based on solid-phase extraction coupling with UPLC-MS/MS for the determination of five NSAIDs in water,” *Talanta*, vol. 225, p. 121846, Apr. 2021, doi: 10.1016/J.TALANTA.2020.121846.
- [33] Z. Hanafiah, W. H. M. Mohtar, A. Manan, T. S. B. Bachi’, N. A. Abdullah, N. A. A. Hamid, H. H. Beddu, S. Mohd Kamal, N. L. Ahmad, A., & Wan. Rasdi, "The occurrence of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Malaysian urban domestic wastewater." *Chemosphere*, 287(132134), 132134, (2022) <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132134>
- [34] E. Waraksa, M. K. Woźniak, L. Banaszekiewicz, E. Kłodzińska, M. Ozimek, R. Wrzesień, B. Bobrowska-Korczak, & J. Namieśnik., "Quantification of unconjugated and total ibuprofen and its metabolites in equine urine samples by gas chromatography–tandem mass spectrometry: Application to the excretion study." *Microchemical Journal, Devoted to the Application of Microtechniques in All Branches of Science*, 150(104129), 104129. (2019). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104129>
- [35] M. Hassan and U. Alshana, “Switchable-hydrophilicity solvent liquid–liquid microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from biological fluids prior to HPLC-DAD determination,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 174, pp. 509–517, Sep. 2019, doi: 10.1016/J.JPBA.2019.06.023.
- [36] Y. Li, C. Huang, J. Yang, J. Peng, J. Jin, H. Ma, and J. Chen, "Hyperbranched mixed-mode anion-exchange polymeric sorbent for highly selective extraction of nine acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs from human urine." *Talanta*, vol. 190, 15–22. (2018). Dooi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.033>
- [37] Y. Li, C. Huang, J. Yang, J. Peng, J. Jin, H. Ma, and J. Chen, "Multifunctionalized mesoporous silica as an efficient reversed-phase/anion exchange mixed-mode sorbent for solid-phase extraction of four acidic nonsteroidal anti-inflammatory drugs in environmental water samples." *Journal of Chromatography A*, vol. 1527,

- pp. 10–17. (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.051>
- [38] K. B. Anderson, S. Y. Lockwood, R. S. Martin, and D. M. Spence, “A 3D printed fluidic device that enables integrated features,” *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 12, pp. 5622–5626, 2013, doi: 10.1021/ac4009594.
- [39] A. Ambrosi and M. Pumera, “3D-printing technologies for electrochemical applications,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 45, no. 10, pp. 2740–2755, 2016, doi: 10.1039/c5cs00714c.
- [40] P. J. Bártolo, *Stereolithography*. 2011.
- [41] R, Amin., S, Knowlton., A, Hart., B, Yenilmez., F, Ghaderinezhad., S, Katebifar., M, Messina., A, Khademhosseini., and S, Tasoglu., "3D-printed microfluidic devices". *Biofabrication*, vol. 8. no. pp. 022001 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/2/022001>
- [42] M.D. Symes, P.J. Kitson, J. Yan., C.J. Richmond, G.J.T. Cooper, R.W. Bowman, T. Vilbrandt, and L. Cronin. "Integrated 3D-printed reactionware for chemical synthesis and analysis". *Nature Chemistry*, vol. 4, no. 5, pp. 349–354. (2012). <https://doi.org/10.1038/nchem.1313>
- [43] N. P. Macdonald, J. M. Cabot, P. Smejkal, R. M. Guijt, B. Paull, and M. C. Breadmore, “Comparing Microfluidic Performance of Three-Dimensional (3D) Printing Platforms,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 7, pp. 3858–3866, 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.7b00136.
- [44] B. Gross, S. Y. Lockwood, and D. M. Spence, “Recent advances in analytical chemistry by 3D printing,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 1, pp. 57–70, 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.6b04344.
- [45] V. Katseli, A. Economou, and C. Kokkinos, “A novel all-3D-printed cell-on-a-chip device as a useful electroanalytical tool: Application to the simultaneous voltammetric determination of caffeine and paracetamol,” *Talanta*, vol. 208, no. July 2019, p. 120388, 2020, doi: 10.1016/j.talanta.2019.120388.
- [46] I. Šrámková, L. Carbonell-Rozas, B. Horstkotte, M. Háková, J. Erben, J. Chvojka, F. Švec, P. Solich, A.M. García-Campaña, and D. Šatínský. "Screening of extraction properties of nanofibers in a sequential injection analysis system using

- a 3D printed device". *Talanta*, vol. 197, pp. 517–521 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.050>
- [47] A. K. Au, N. Bhattacharjee, L. F. Horowitz, T. C. Chang, and A. Folch, “3D-printed microfluidic automation,” *Lab Chip*, vol. 15, no. 8, pp. 1934–1941, 2015, doi: 10.1039/c5lc00126a.
- [48] O. Coskun, “Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY,” *North. Clin. Istanbul*, vol. 3, no. 2, pp. 156–160, 2016, doi: 10.14744/nci.2016.32757.
- [49] J. Holler and D. A. S. Crouch, Stanley R, *Fundamentos de Química Analítica*, vol. 5, no. 4. 1982.
- [50] B. Shrestha, “Fundamentals of imaging mass spectrometry,” *Introd. to Spat. Mapp. Biomol. by Imaging Mass Spectrom.*, pp. 1–10, Jan. 2021, doi: 10.1016/B978-0-12-818998-6.00014-0.
- [51] Casado, A. G., Rodriguez, L. C., Hernandez, E. A., & Vilchez, J. L. (1996). Estimate of gas Chromatographic blanks application to detection limits evaluation as recommended by IUPAC. *Journal of Chromatography A*, 726(1–2), 133–139. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)01051-3](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)01051-3).