



**Somos calidad,
somos USC**

Determinación de acetaminofén, naproxeno e ibuprofeno en aguas residuales por cromatografía líquida (HPLC)

Autores

**Sebastian Benavides Meneses
Gersson Hernan Herrera Sierra**

**Título por el que opta
Químico**

Director (a)

Ph.D. Jhon Jairo Ríos Acevedo

Grupo de Investigación:

GIEMA Grupo de Investigación en Electroquímica y Medio Ambiente

Línea de Investigación:

Solución a problemas ambientales

**Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Química
Universidad Santiago de Cali
Santiago de Cali - Colombia
2025**

IMPACTOS

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico	Disminución de gastos asociados al análisis de contaminantes mediante técnicas optimizadas	Empresas de análisis ambiental, autoridades de saneamiento, instituciones gubernamentales.
Responsabilidad social	Mejora en la calidad del agua residual y reducción de riesgos para la salud pública asociados a contaminantes emergentes.	Población urbana, comunidades rurales, consumidores de agua, administradores de recursos hídricos públicos.
Científico	Generación de nuevo conocimiento sobre la detección y cuantificación de acetaminofén, naproxeno e ibuprofeno en matrices de agua.	Comunidad académica e investigativa, universidades, centros de investigación de química y ambiental
Indicadores de Gestión	Elaboración de un método SPE-HPLC accesible, eficiente y escalable para el análisis de AINEs en aguas residuales	Empresas del sector de análisis ambiental, laboratorios de química analítica, desarrolladores tecnológicos, laboratorios de investigación.
Tecnológico	Optimización de procesos analíticos para el tratamiento y monitoreo de aguas residuales contaminadas	Personal técnico en análisis químicos, ingenieros ambientales, gestores de PTAR
Técnico	Protocolos de monitoreo sostenibles para la detección de contaminantes farmacéuticos	Entidades ambientales, unidades residenciales, organismos de conservación, ecosistemas acuáticos, fauna local
Ambiental	Difusión de datos actualizados a la población y con acceso a información sobre calidad del agua en entornos urbanos	Población general, Organizaciones no gubernamentales, medios de comunicación
Social	Divulgación de prácticas responsables en el manejo de residuos farmacéuticos y conciencia ambiental	Comunidad en general, centros educativos y organizaciones culturales ambientales
Cultural	Disminución de gastos asociados al análisis de contaminantes mediante técnicas optimizadas	Empresas de análisis ambiental, autoridades de saneamiento, instituciones gubernamentales.

DETERMINACIÓN DE ACETAMINOFÉN, NAPROXENO E IBUPROFENO EN AGUAS RESIDUALES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA (HPLC)

Sebastian Benavides Meneses ^{1,*}, Gersson Hernan Herrera Sierra ^{2,*}

¹Tecnólogo químico aplicado a la industria, Sena-ASTIN, sebastian.benavides00@usc.edu.co

²gersson.herrera00@usc.edu.co *Estudiante de Química, Grupo de Investigación GIEMA de la USC, Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Santiago de Cali. Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali. Colombia

RESUMEN

La presencia de fármacos en aguas residuales constituye un reto ambiental y sanitario por su persistencia y efectos ecotóxicos. En este estudio se desarrolló y validó un método por cromatografía líquida de alta eficiencia junto con la optimización de la extracción SPE para la determinación de acetaminofén, naproxeno e ibuprofeno en muestras de aguas residuales. El método HPLC mostró una linealidad aceptable ($R^2 > 0,995$), límites de detección y cuantificación que aportaron buena sensibilidad; resultados de precisión con %RSD $<2\%$ y porcentajes de recuperación mayores 80%. En la extracción, se evaluaron variables como fase estacionaria de los cartuchos, volumen de muestra, flujo y pH, identificándose como óptimas: cartucho C₁₈, 250 mL de muestra, flujo de 5 mL/min y pH 7, debido a que arrojaron mayores valores de áreas cromatográficas. La cuantificación de las muestras provenientes de las plantas de tratamiento de aguas, presentaron bajas concentraciones e incluso no detectables para la mayoría de los analitos; sin embargo, para la muestra de agua hospitalaria, se obtuvo una concentración de acetaminofén de 582,1 ppb. Los resultados evidencian la utilidad del método SPE-HPLC para el monitoreo de contaminantes emergentes y su aplicación en gestión ambiental.

Palabras clave: Contaminantes emergentes; extracción en fase sólida (SPE); fármacos; aguas residuales

DETERMINATION OF ACETAMINOPHEN, NAPROXEN AND IBUPROFEN IN WASTEWATER BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

ABSTRACT

The presence of drugs in wastewater poses an environmental and health challenge due to their persistence and ecotoxic effects. In this study, a high-performance liquid chromatography method was developed and validated, together with the optimization of SPE extraction for the determination of acetaminophen, naproxen, and ibuprofen in wastewater samples. The HPLC method showed acceptable linearity ($R^2 > 0.995$), detection and quantification limits that provided good sensitivity, precision results with %RSD $<2\%$, and recovery percentages greater than 80%. In the extraction, variables such as the stationary phase of the cartridges, sample volume, flow, and pH were evaluated, and the following were identified as optimal: C₁₈ cartridge, 250 mL sample, 5 mL/min flow, and pH 7, as they yielded higher chromatographic area values. The quantification of samples from water treatment plants showed low concentrations and even undetectable levels for most analytes; however, for the hospital water sample, an acetaminophen concentration of 582.1 ppb was obtained. The results demonstrate the usefulness of the SPE-HPLC method for monitoring emerging contaminants and its application in environmental management.

Keywords: Emerging contaminants; solid-phase extraction (SPE); HPLC; pharmaceuticals; wastewater.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la presencia de contaminantes emergentes en los cuerpos de agua constituye una preocupación creciente para la salud pública y el medio ambiente. Entre ellos, los productos farmacéuticos se destacan por su uso masivo, persistencia y baja biodegradabilidad, lo que favorece su acumulación en aguas residuales y superficiales [1]. Estos compuestos, incluso en concentraciones de ppb o ppt, pueden ocasionar efectos adversos en los ecosistemas acuáticos, como alteraciones genéticas, daños celulares y afectaciones en procesos fisiológicos de organismos acuáticos [2], [3].

Los contaminantes emergentes abarcan una amplia gama de sustancias de origen antropogénico, entre ellos hormonas, pesticidas, detergentes, nanopartículas y, de manera destacada, los productos farmacéuticos [4]. El consumo masivo de analgésicos y antiinflamatorios hace que sus residuos se encuentren en aguas residuales domésticas, descargas hospitalarias e incluso efluentes de plantas de tratamiento, donde no siempre se eliminan de forma completa [5]. Debido a su persistencia y potencial de bioacumulación, se han convertido en un problema prioritario de investigación ambiental [6].

En Colombia, la situación es aún más preocupante, dado que solo el 60,4% de las aguas residuales recibe un tratamiento adecuado [7]. Esto implica que una fracción importante de los residuos farmacéuticos es liberada directamente a ríos y quebradas, incrementando los riesgos ambientales y sanitarios asociados. Dentro de los fármacos más consumidos y detectados en aguas residuales se encuentran los analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), como el acetaminofén, naproxeno e ibuprofeno [8], [9].

El acetaminofén es uno de los medicamentos más usados a nivel mundial por sus propiedades analgésicas y antipiréticas. Su estructura química (**Figura 1**) presenta un anillo aromático con un grupo hidroxilo (fenol) y un grupo funcional amida, lo que le confiere una polaridad relativamente alta ($\log P \approx 0.46$), facilitando su solubilidad en agua (aproximadamente 14 g/L a 25°C). Aunque se considera de rápida biodegradación, su presencia recurrente en aguas residuales refleja su elevado consumo, y su polaridad permite interacciones hidrofílicas que pueden influir en su comportamiento ambiental [10].

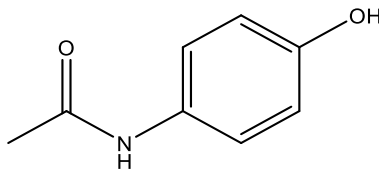


Figura 1. Estructura química del acetaminofén (N-(4-hidroxifenil)acetamida).

El naproxeno, por su parte, es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) con una estructura que incluye un sistema de anillos naftalénicos, un grupo metoxi (éter) y un ácido carboxílico (**Figura 2**). Estas características le otorgan una polaridad moderada ($\log P \approx 3.18$), con baja solubilidad en agua (alrededor de 16 mg/L a 25°C), pero mayor afinidad por fases orgánicas debido a sus porciones hidrofóbicas. Esto contribuye a su persistencia ambiental, capacidad de acumularse en organismos acuáticos y generación de alteraciones metabólicas y hepáticas [11].

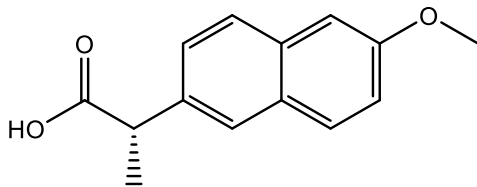


Figura 2. Estructura química del naproxeno (ácido (S)-6-metoxi- α -metil-2-naftalenacético).

Finalmente, el ibuprofeno se ha posicionado como uno de los AINEs más consumidos globalmente, con propiedades analgésicas y antiinflamatorias. Su estructura molecular (**Figura 3**) consta de un anillo aromático, un grupo ácido carboxílico y cadenas alquil ramificadas, resultando en una polaridad baja ($\log P \approx 3.97$) y solubilidad

limitada en agua (cerca de 21 mg/L a 25°C). Esta naturaleza lipofílica favorece su bioacumulación en ecosistemas acuáticos, donde puede inducir efectos tóxicos como estrés oxidativo y alteraciones en el sistema endocrino de organismos [12], [13]. La Comisión Europea ha propuesto límites de 0,22 ppb en aguas continentales y 0,022 ppb en aguas costeras para garantizar un buen estado ecológico [14].

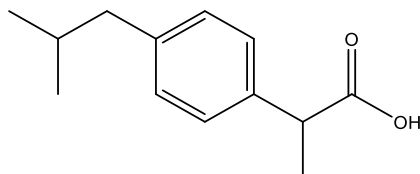


Figura 3. Estructura química del ibuprofeno (ácido (RS)-2-(4-isobutilfenil) propanoico).

La detección de estos compuestos requiere técnicas de extracción sensibles para preconcentrar analitos en trazas dentro de matrices complejas. Entre las disponibles, la extracción en fase sólida (SPE) se destaca por su adaptabilidad, bajo consumo de solventes, alta selectividad y compatibilidad con automatización, ideal para muestras acuosas como efluentes [15], [16]. Técnicas competitivas incluyen la extracción líquido-líquido (LLE), versátil para volúmenes grandes pero con alto uso de solventes orgánicos y riesgo de emulsiones [17]; la microextracción en fase sólida (SPME), que minimiza solventes y es portátil para analitos volátiles, aunque limitada en capacidad de sorción para matrices complejas [18]; y la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME), rápida con bajo volumen de extractante y eficiente en trazas, pero sensible a interferencias en aguas residuales [19].

Si bien las técnicas de extracción como LLE, SPME y DLLME son cruciales para el pretratamiento, la cuantificación final exige una técnica instrumental de alta sensibilidad y selectividad. Para la detección de estos compuestos farmacéuticos, existen diversas técnicas analíticas; una de ellas, la espectroscopía (p.ej., UV-Vis) la cual puede ser accesible; sin embargo, a menudo carece de la selectividad y sensibilidad necesarias para cuantificar analitos en trazas dentro de matrices tan complejas como las aguas residuales, donde las interferencias son numerosas [1]. Por su parte, la cromatografía de gases (GC), aunque robusta, generalmente requiere procesos de derivatización para analitos polares y no volátiles como los AINEs y el acetaminofén, lo que añade pasos, complejidad y tiempo al análisis. En este contexto, la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es una técnica más robusta para este tipo de contaminantes, ya que, ofrece alta selectividad y sensibilidad; volviéndola ideal para la separación de compuestos tanto polares como no polares, asimismo, en moléculas con propiedades termolábiles, como los estudiados, sin necesidad de un proceso de derivatización [20]. Su compatibilidad directa con la extracción en fase sólida (SPE) permite un acoplamiento eficiente de la preconcentración de la muestra con la cuantificación [21].

De acuerdo con la técnica SPE aplicada, para la extracción de contaminantes farmacéuticos, se evaluaron cartuchos C₁₈ y HLB por su versatilidad en matrices acuosas complejas. El sorbente C₁₈, compuesto de sílice modificada con cadenas octadecilo, facilita interacciones hidrofóbicas (Van der Waals) con grupos no polares, como anillos aromáticos en naproxeno e ibuprofeno, logrando recuperaciones elevadas (>85%) en muestras con interferentes [15], [16]. En contraste, el HLB, un copolímero de divinilbenceno y N-vinilpirrolidona, soporta interacciones multifuncionales (hidrofóbicas, π-π, dipolo-dipolo y enlaces de hidrógeno), optimizando la retención de analitos polares como acetaminofén con mayor robustez a variaciones de pH [22]. Ambos permiten ajustes en pH (4-10) y elución con metanol para maximizar la eficiencia, seguido de cuantificación por HPLC en fase reversa isocrática, asegurando resolución y sensibilidad para trazas en efluentes [16], [22].

Por esta razón, en el presente estudio se optimizó un método de extracción por SPE evaluando variables como tipo de fase estacionaria con los cartuchos, volumen de muestra, flujo de elución, y pH; seguido de la cuantificación por HPLC en fase reversa isocrática de los compuestos de acetaminofén, naproxeno e ibuprofeno en muestras de aguas residuales. Se validó el método considerando linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión y recuperación, con el fin de proporcionar resultados fiables y que a su vez apoyen a las estrategias de gestión ambiental y salud pública.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Productos químicos y reactivos

Los estándares de acetaminofén, naproxeno e ibuprofeno fueron adquiridos de Sigma Aldrich. Metanol grado HPLC (lote 25447207) y acetonitrilo grado HPLC (lote 25459912) de marca Scharlau. Soluciones de hidróxido de sodio 0,1N (lote HC3201474) y ácido sulfúrico 0,1N (lote HC20642274), se adquirieron de Sigma Aldrich. El agua milli-Q se empleó de un sistema de purificación de agua Millipore.

2.2. Instrumentos y equipos

La separación cromatográfica se realizó en un equipo HPLC marca Hitachi modelo LaChrom Elite, equipado con bomba cuaternaria (serie 18E11-041), automuestreador (serie 18E31-059), detector DAD (serie 18E06-008) y horno (serie 141123). El procesamiento de los datos se realizó en el software EZChrom versión 3,3,2. Se empleó una columna Kromasil C₁₈ de 50mm x 4,6mm x 5µm (serie E130175). La optimización de la extracción SPE se llevó a cabo en cartuchos C₁₈ marca Thermo Scientific y HLB marca Oasis. Balanza analítica marca Mettler Toledo modelo AB204S. Potenciómetro modelo Seven Direct SD23 marca Mettler Toledo.

2.3. Preparación de estándares de calibración

Las soluciones madre de acetaminofén (ACE), naproxeno (NAP) e ibuprofeno (IBU), fueron preparadas a 250 mg/L. Para ello, se pesó individualmente 12,5 mg de cada activo en balones volumétricos de 50 mL, se le adicionó 20 mL de diluyente (agua milli-Q:Acetonitrilo 60:40) y se llevó a ultrasonido por 5 min. Se dejó atemperar y se completó a volumen con diluyente. Se realizó dilución a 5 mg/L; por lo cual, se tomó 1 mL de solución madre y se llevó a 50 mL con diluyente. Finalmente, se preparó la curva individual del ACE en el rango de 60 ppb a 500 ppb. La curva mix del NAP e IBU se realizó en el rango de 60 ppb a 500 ppb y 120 ppb a 560 ppb, respectivamente a cada activo.

2.4. Implementación y validación de la técnica HPLC

El análisis cromatográfico se dividió en dos sistemas independientes; el primero de ellos, para el ACE, y el segundo para el mix de NAP-IBU. Ambas corridas, se trabajaron a flujo de 1,2 mL/min, volumen de inyección de 10 µL y temperatura de columna de 25°C ± 2°C. Para el sistema del acetaminofén, se empleó una fase móvil de agua:acetonitrilo (88:12), una longitud de onda de 240 nm y un tiempo de corrida de 5 min. Por otro lado, para el sistema del mix de naproxeno e ibuprofeno, se utilizó una fase móvil agua:acetonitrilo (55:45), una longitud de onda de 220 nm y un tiempo de corrida de 10 min.

En la validación de la técnica analítica, se evaluó la linealidad a cinco niveles de concentración, analizados en cuatro réplicas independientes; estos resultados fueron respaldados mediante prueba T para la pendiente, intercepto y coeficiente de determinación; asimismo, una prueba ANOVA para verificar existencia de regresión lineal. Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se determinaron mediante los parámetros establecido por la IUPAC [23]; por lo cual, se evaluó con un K igual a 3 y 10, respectivamente a los límites. La precisión, fue estudiada como precisión intermedia, evaluada en dos días con un mix de los tres compuestos, preparado en el nivel medio de cada curva de calibración, con un número de inyecciones de n=6; los resultados fueron expresados en porcentaje %RSD y contrastados con una prueba ANOVA para verificación de diferencias significativas. Finalmente, la recuperación fue evaluada mediante los parámetros optimizados en la extracción SPE y una solución estándar, preparada a la concentración media de cada curva de calibración de los compuestos estudiados. La extracción se realizó por duplicado y con un número de inyecciones por vial de n=6.

2.5. Optimización de extracción por SPE

Inicialmente, a los cartuchos se le realizó un acondicionamiento previo al uso; por lo cual, se hizo eluir 5 mL de metanol, y posteriormente, 5 mL de agua milli-Q, ambos a flujo de 1 mL/min. En la optimización SPE se contemplaron variables como cartucho, volumen de muestra, flujo y pH, los cuales fueron organizados de manera descendiente al grado de relevancia en la extracción de compuestos farmacéuticos; de este modo, se desarrolló el diseño experimental observado en la **tabla 1**. En los dos primeros ensayos, se varió la fase estacionaria; el primero, con cartucho C₁₈ 6mL (1000 mg) compuesta de sílice modificado con ácido octadecanoico, y el segundo, con una fase inversa de un copolímero de poliestireno-divinilbenceno en el cartucho HLB 20cc (1g); ambas, fueron trabajadas de acuerdo con las condiciones reportadas en la literatura, dejando fijas las demás variables. Seguidamente, se modificó el volumen de muestra a 250 mL y 500 mL, en la cual, se dopó el volumen de agua milli-Q con cada solución estándar a la concentración del punto medio de cada curva de calibración. Luego, se cambió el flujo (mL/min) a 3 y 5; por último, se ajustó la muestra a pH 4 con ácido sulfúrico 0,1N y a pH 10 con

hidróxido de sodio 0,1N. La elución de los analitos de la fase estacionaria se llevó a cabo con 2 volúmenes de 1 mL de metanol, los cuales fueron recolectado en balones de 5 mL y aforado con agua milli-Q; finalmente, cada extracción fue inyectada en el cromatógrafo líquido con sus respectivas condiciones implementadas. Para la secuenciación de los ensayos con cada variable, se tuvo en cuenta la corrida cromatográfica con la mayor área obtenida para el ACE, NAP e IBU.

Tabla 1. Diseño experimental simple aplicado para la optimización de la extracción en fase sólida

Ensayo	Variables										
	Cartuchos		Volumen muestra (mL)			Flujo (mL/min)			pH		
	C ₁₈	HLB	100	250	500	3	5	10	4	7	10
1	X		X					X		X	
2		X	X					X		X	
3	X			X				X		X	
4	X				X			X		X	
5	X			X		X				X	
6	X			X			X			X	
7	X			X			X		X		
8	X			X			X				X

2.6. Muestreo, preparación y lectura de muestra

La validez de los resultados en el análisis de contaminantes emergentes depende críticamente de un protocolo de muestreo que refleja con precisión la carga contaminante real. Las concentraciones de fármacos en aguas residuales (PTAR) no son estáticas; presentan una alta variabilidad diurna; es decir, fluctúan significativamente durante el día. Estas variaciones están directamente relacionadas con los patrones de consumo humano, los horarios de descarga (especialmente de hospitales) y los ciclos de uso del agua en la población [24]. Las muestras fueron recolectadas en la PTAR-Cali (3°28'13.0"N 76°28'43.5"W), del municipio de Santiago de Cali y la PTAR-Hospital (5°03'26.8"N 75°31'45.8"W), de la ciudad de Manizales. El procedimiento fue el siguiente:

Se implementó un muestreo compuesto manual, tomando una alícuota de 250 mL cada hora, durante un período de 8 horas (cubriendo un ciclo representativo de actividad diurna). Las alícuotas de cada sitio se mezclaron en un contenedor ámbar para formar una única muestra compuesta final por sitio (PTAR-Cali y PTAR-Hospital). Las muestras compuestas finales se transportaron inmediatamente al laboratorio en refrigeración aproximada a 4°C y se almacenaron en oscuridad. Con base a los parámetros optimizados en la extracción SPE, correspondientes al ensayo N° 6 de la **tabla 1**, se trabajaron dos muestras de aguas residuales. Una de ellas, proveniente de la PTAR de Cali, y la segunda, de la PTAR de un hospital. Las muestras se filtraron al vacío a través de papel filtro Whatman grado 42, para eliminar partículas suspendidas. Se ajustó el pH a 7 con ácido sulfúrico 0,1N. Luego de la extracción SPE, se inyectaron por triplicado las muestras en el HPLC con cada sistema cromatográfico implementado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Implementación y validación de la técnica HPLC

La implementación de la metodología por cromatografía líquida se inició con inyecciones individuales de cada principio activo; donde fue empleada una fase móvil de agua:acetonitrilo (60:40) bajo condición isocrática. Fueron empleados estándares a una concentración de 5 ppm; de esta manera, con los cromatogramas obtenidos, se logró establecer el orden de elución ascendente correspondiente al acetaminofén (ACE), naproxeno (NAP) e ibuprofeno (IBU). Este comportamiento es atribuible a las diferencias estructurales entre los analitos, particularmente a la naturaleza y número de los grupos funcionales presentes, los cuales determinan su polaridad relativa; por lo que, la retención observada en fase reversa indica que la polaridad decrece en el siguiente orden: ACE > NAP > IBU.

Seguidamente, se procedió a inyectar un mix de los tres fármacos con la misma proporción de fase móvil; sin embargo, se evidenció un factor de capacidad (K) por debajo de 1 para el acetaminofén, lo cual indicaba que, el compuesto no estaba siendo retenido lo suficiente por la fase estacionaria, generando un solapamiento con la señal en el tiempo muerto, correspondiente a la elución del diluyente. Dicho esto, se aumentó la proporción de agua en la fase móvil a 80%, con el fin de obtener un K en el rango de 1 a 10 para todos los analitos, ya que es una oscilación ideal para las condiciones de separación de solutos [25]. Con esta nueva modificación, se favoreció el acetaminofén; sin embargo, se obtuvo un K mucho mayor a 10 para el ibuprofeno, lo cual, provocaba un pico demasiado ensanchado, lo que podría generar pérdidas de eficiencia al momento de la cuantificación a concentraciones bajas.

De acuerdo con lo anterior, se reemplazó el agua milli-Q de la fase móvil por un buffer fosfato 15mM pH 7.0 con el fin de estabilizar las cargas y mantener el pH del sistema. Para ello, se empleó un gradiente de elución, aumentando con el tiempo la proporción de acetonitrilo desde 20% hasta 60% v/v; sin embargo, se evidenció la presencia de picos que no correspondían con los analitos a estudiar. Esto se pudo generar, debido a que los grupos fosfato del buffer no son muy solubles con acetonitrilo, provocando precipitación en la columna y aparición de picos adicionales en el cromatograma. Por ende, se llevó a cabo la separación en dos sistemas cromatográficos independientes, con fase móvil isocrática y proporciones diferentes.

Para el sistema individual del acetaminofén, se inició el acondicionamiento de la columna con fase móvil de agua:acetonitrilo en proporción 88:12. Al emplear un detector DAD, el cual tiene la ventaja de medir espectralmente una muestra a diferentes longitudes de onda (λ) al mismo tiempo; se optó por trabajar para este sistema a $\lambda_{240\text{nm}}$ y a un tiempo de corrida de 5 minutos. Se realizaron tres inyecciones del estándar ACE a 5 ppm, donde se obtuvo un tiempo de retención de 1,1 min (Ver **figura 5A**). Por otra parte, para el sistema dual de naproxeno-ibuprofeno, se equilibró la fase estacionaria a una proporción de eluyente 55:45, con un tiempo de corrida de 10 minutos, y una longitud de onda de 220 nm. Al realizar las inyecciones del estándar mix a 5ppm, se obtuvieron tiempos de retención de 2,1 min y 4,6 min, respectivamente a cada compuesto. De acuerdo con la implementación de la técnica, los cromatogramas obtenidos para la solución blanco arrojaron valores promedios de áreas de 47,6, 97,0 y 139,0, respectivamente al ACE, NAP e IBU; asimismo, como se evidencia en la **figura 4**, no había presencia de interferencias en los tiempos de retención de cada principio activo, observando una línea base estable, la cual no presentaba fluctuaciones significativas.

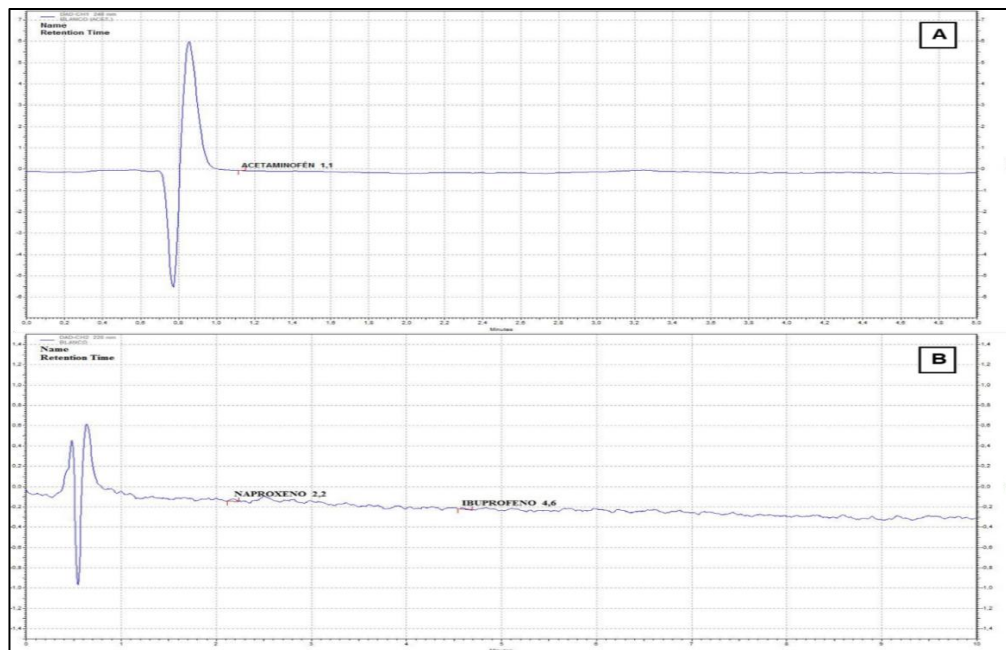


Figura 4. Cromatogramas de la solución blanco: **A)** Corrida de acetaminofén, **B)** Corrida del mix de naproxeno e ibuprofeno.

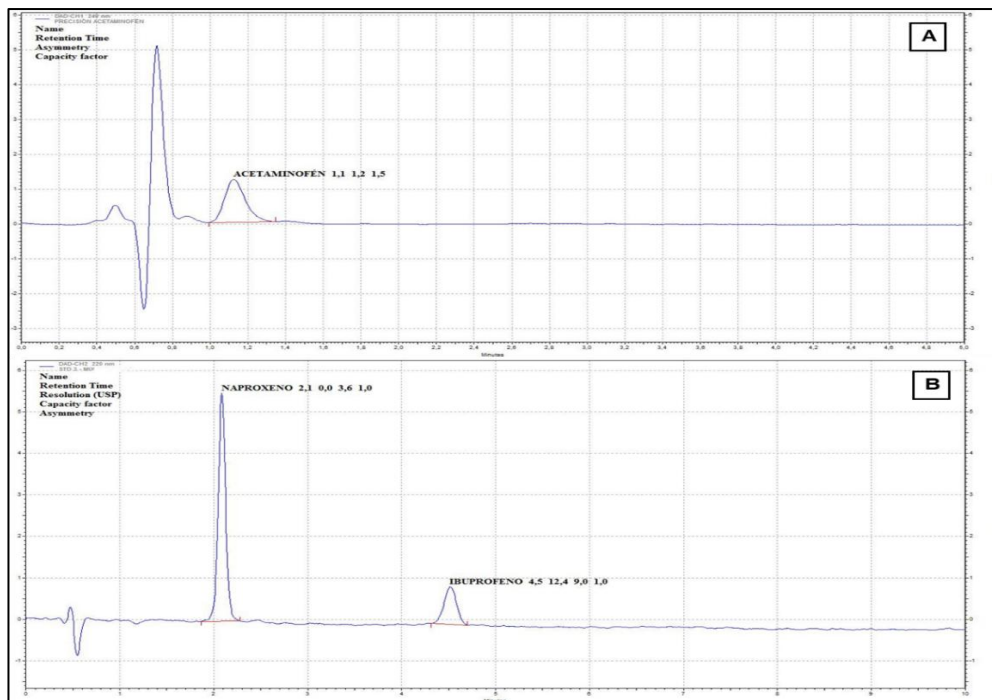


Figura 5. Cromatogramas de la solución estándar: **A)** Corrida de acetaminofén, **B)** Corrida del mix de naproxeno e ibuprofeno.

Estas condiciones cromatográficas experimentales, generaron resultados adecuados para una buena separación de cada compuesto; ya que, se encontró para el acetaminofén un tailing de 1,2, y para el caso del naproxeno e ibuprofeno, se observaron picos gaussianos con valores de 1,0. Estos valores son aceptables, debido a que, valores entre 0,8 a 1,8 son considerados aceptables [26]. En el caso del NAP e IBU, fue un resultado muy bueno, evidenciando picos simétricos tanto del lado derecho como izquierdo, desde el punto más alto; en comparación con el ACE, que presentó tailing, el cual, se pudo generar por la unión de los grupos silanoles de la fase estacionaria con el analito [27] y/o a las condiciones físicas de la columna; no obstante, este valor se encuentra dentro del rango asimétrico. Adicionalmente, como se observa en la **figura 5B** la separación dual del naproxeno e ibuprofeno presentó una resolución (R_s) de 12,4 en el pico del IBU respecto al NAP, la cual fue muy buena; puesto que, se obtuvo un resultado por encima de 1,5; lo cual indica que la columna proporciona una buena capacidad para la separación de dos o más compuestos [25]. Asimismo, como se muestra en la **tabla 2**, se obtuvieron valores de K dentro del rango ideal, por lo que, la elución de las moléculas sobre la fase estacionaria fue la indicada.

Tabla 2. Tiempos de retención (T_R), factor de capacidad (k) y asimetría, de los picos de acetaminofén, naproxeno e ibuprofeno.

	Acetaminofén	Naproxeno	Ibuprofeno
T_R (min)	1,1	2,1	4,6
k	1,5	3,7	9,2
Asimetría	1,2	1,0	1,0

En la validación del método implementado, la linealidad fue evaluada mediante curvas de calibración para cada compuesto, utilizando estándares a cinco niveles de concentración, tabuladas en la **tabla 6** en la sección de anexos; se obtuvieron coeficientes de determinación (R^2) mayores a 0,995 (**Figura 6**) y su respectiva ecuación de la recta, determinada mediante el análisis de mínimos cuadrados. Según la USP los intervalos específicos mínimos aceptables para la determinación de impurezas es de 50% a 120% respecto a la concentración teórica del contenido [26]; por ende, de acuerdo con los diferentes estudios donde determinaron concentraciones a nivel de trazas de estos fármacos en aguas residuales, se planteó el rango de lineal propuesto para cada compuesto, el

cual abarcó el intervalo deseado para cubrir la necesidad de dichas concentraciones. Dicho esto, aun cuando se amplió el intervalo lineal se obtuvo buena respuesta para la linealidad, dado que, los coeficientes de determinación obtenidos fueron mayores que el valor mínimo según la USP 42 [26], indicando que las curvas de calibración se ajustan a un modelo lineal; por ende, se obtienen resultados directamente proporcionales a las concentraciones de los analitos.

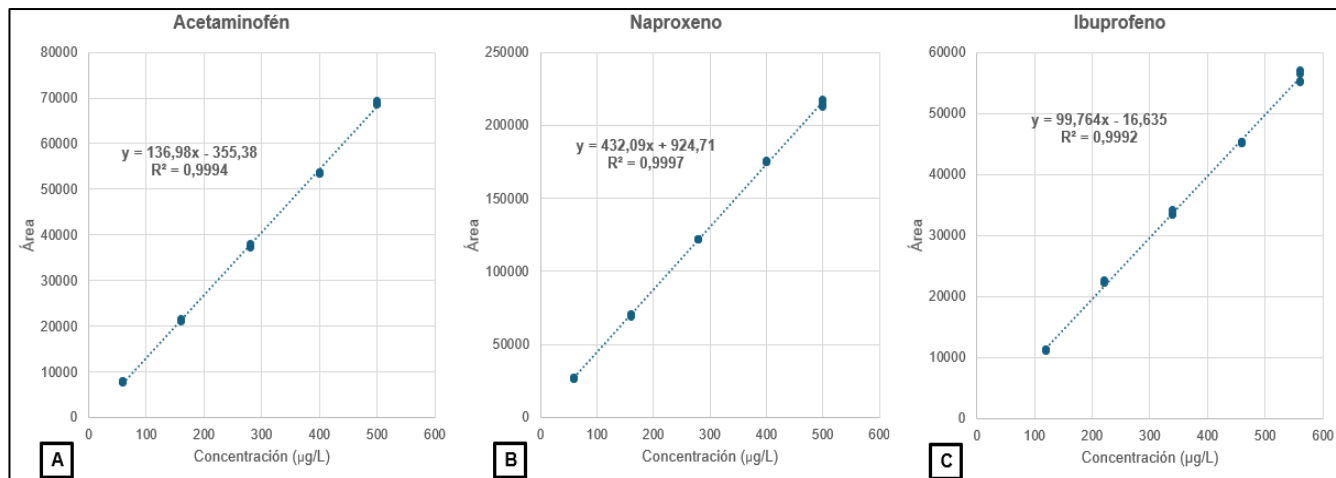


Figura 6. Curvas de calibración correspondientes a los analitos de: **A)** Acetaminofén, **B)** Naproxeno y **C)** Ibuprofeno.

Con el fin de respaldar y comprobar la linealidad, se plantearon dos tipos de hipótesis (*tabla 7 en anexos*); una de ellas, la hipótesis nula (H_0) para evaluar el “b” donde se establece que el intercepto debe ser significativamente igual a cero; por otro lado, con las hipótesis alternativas (H_a) se establecieron los siguientes casos: “Una pendiente diferente de cero”, “Existe correlación entre el eje X y Y” y “Existe regresión lineal”, respectivamente a la evaluación de la pendiente, R^2 y análisis de varianza. La evaluación de estas hipótesis fue realizada mediante una prueba T, donde se hizo la comparación independiente de cada curva sobre el valor calculado a partir de los datos experimentales con respecto al valor teórico ($H_0 = 0$); en la prueba ANOVA se comparan los conjuntos de variaciones de la regresión respecto al residual. En la *tabla 3*, se encuentran los valores calculados y críticos de las pruebas T y F, estos fueron hallados a través de la herramienta de datos de regresión (Ver *tabla 8 en anexos*). Dicho esto, se evidenció para el intercepto que se cumplió la hipótesis nula (H_0), por lo cual, no hay presencia de un error sistemático; por su parte, la H_0 se rechaza para la pendiente, ya que esta es diferente de cero, por ende, se cumple la hipótesis alternativa (H_a), lo que indica que existe una respuesta lineal entre la concentración con respecto al área cromatográfica. En el caso de R^2 , como no procede de una población cuya correlación es cero, se acepta la H_a , por lo cual, hay correlación entre el eje X y Y. Por último, con la prueba ANOVA se concluyó la linealidad de cada curva de calibración, ya que en esta se evaluó el cambio de la respuesta debido al cambio de concentración respecto a la dispersión generada alrededor del análisis de regresión. Se evidenció que para todos los casos planteados se aceptó el criterio; debido a que, en la H_0 los valores de T calculada fueron menores que la T crítica; por el contrario, en las H_a con los resultados calculados de T y F, se evidenciaron valores por encima de los datos críticos. Por ende, se confirma que existe una buena linealidad en el rango evaluado, de acuerdo con los requerimientos estadísticos.

Por otra parte, la sensibilidad de la técnica fue estudiada por medio de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) en unidades de ppb, los cuales fueron calculados de acuerdo con las *ecuaciones 1 y 2* en anexos, arrojando valores bajos respecto al punto inicial de concentración del rango lineal; los cuales dan respuesta a una buena sensibilidad del método. Al realizar comparación de los LD y LC de los compuestos estudiados, se evidenció una mayor sensibilidad analítica para el naproxeno>acetaminofén>ibuprofeno. En el caso de la precisión, la cual fue estudiada como precisión intermedia; se evaluó en dos días con una solución estándar mix a concentraciones de 280 ppb para el acetaminofén y naproxeno y 340 ppb para el ibuprofeno, los cuales corresponden al punto medio de cada curva de calibración; este mix, fue inyectado seis veces, por lo cual, las concentraciones fueron calculadas a partir de la ecuación de la recta de cada compuesto, las cuales se tabularon en la *tabla 9* (Ver *anexos*), donde se obtuvieron %RSD inferiores a 2%, calculados a partir de la *ecuación 3* en anexos. La evaluación de la precisión

dio resultados satisfactorios, puesto que, en el estudio de precisión intermedia se obtuvieron porcentajes de desviación estándar relativa (%RSD) inferiores al establecido por la USP [26]. Asimismo, en el apartado de anexos se encuentra **tabla 10**, que contiene el análisis de varianza de un factor determinado a través de Excel para la evaluación de diferencias significativas entre los resultados obtenidos en los días distintos. Al igual que en la linealidad, este parámetro validado fue estudiado mediante un análisis de varianza, donde se estableció como hipótesis nula que no hay diferencias significativas al análisis en días diferentes; encontrando de este modo que, el criterio planteado es aceptado, dado que, los valores de $F_{\text{calculado}}$ para los tres analitos fueron menores al $F_{\text{crítico}}$. Dicho esto, el método permite que los resultados tengan una baja variabilidad y así mismo, obtener datos consistentes dentro de las condiciones establecidas. Finalmente, para la evaluación de la recuperación se preparó una solución mix con los tres analitos a la concentración media del rango lineal, la cual se hizo eluir en el cartucho C_{18} con las condiciones de volumen, flujo y pH previamente optimizadas. En la **tabla 11** (*Ver anexos*) se encuentran los porcentajes de recuperación obtenidos los cuales fueron determinados a partir de la **ecuación 4**; para ello, se observaron valores por encima del 80% (**Tabla 3**). Por ende, según la ICH el rango aceptable de recuperación a nivel de trazas está entre 70% a 130% [28]; donde se obtuvieron valores conformes para cada compuesto. Se evidenció que el mayor %Recuperación lo tuvo el ibuprofeno, lo cual, puede atribuirse a que este compuesto posee una polaridad relativa más baja, siendo más a fin con la fase estacionaria de los cartuchos C_{18} , en comparación con el NAP y ACE.

Tabla 3. Parámetros de la regresión lineal y validación de la técnica cromatográfica.

	Acetaminofén	Naproxeno	Ibuprofeno
Rango lineal ($\mu\text{g/L}$)	60 – 500	60 – 500	120 – 560
Pendiente (m)	137,0	432,1	99,8
Intercepto (b)	-355,4	924,7	-16,6
R²	0,9994	0,9997	0,9992
T crítico	2,10 *		
T_(m) calculado	192,94	287,29	161,56
T_(b) calculado	1,70	2,09	0,08
T_(R²) calculado	192,94	287,29	161,56
¹F crítica	4,41 *		
¹F calculada	17,99	18,00	17,99
LD ($\mu\text{g/L}$)	1,3	1,2	1,7
LC ($\mu\text{g/L}$)	4,4	3,8	5,5
%RSD Precisión-Día 1	1,2	0,5	1,0
%RSD Precisión-Día 2	1,2	0,5	1,2
²F crítica	4,96 *		
²F calculada	0,02	1,16	0,08
%Recuperación	83,6	87,2	88,4

* Calculado a una significancia de 0,05 y un grado de libertad de n-2.

¹ Valores aplicado para evaluación de linealidad, ² Valores aplicados para evaluación de precisión.

3.2. Optimización de extracción por SPE

La optimización de la extracción en fase sólida (SPE) se realizó mediante el diseño experimental simple mostrado en la **tabla 1**, con el objetivo de maximizar la recuperación de los analitos acetaminofén (ACE), naproxeno (NAP) e ibuprofeno (IBU) a partir de muestras acuosas; mediante el montaje evidenciado en la **figura 7**. Para cada variable, se seleccionó la condición óptima (*Ver tabla 4*) considerando el área cromatográfica máxima promedio obtenida para los tres analitos en las corridas HPLC correspondientes. Los valores obtenidos reflejan la eficiencia de extracción, ya que, áreas mayores indican una mejor retención y recuperación de los analitos en la fase

estacionaria del cartucho y de acuerdo con las variables objeto de optimización. Para ilustrar el impacto de cada variable en la eficiencia de extracción, se elaboró una gráfica comparativa (**gráfica 1**), que muestran los porcentajes de áreas de cada analito en función de las variables evaluadas. Esta gráfica permite identificar tendencias y seleccionar las condiciones óptimas, considerando que un aumento en el área, indica una mayor recuperación de los compuestos farmacéuticos.

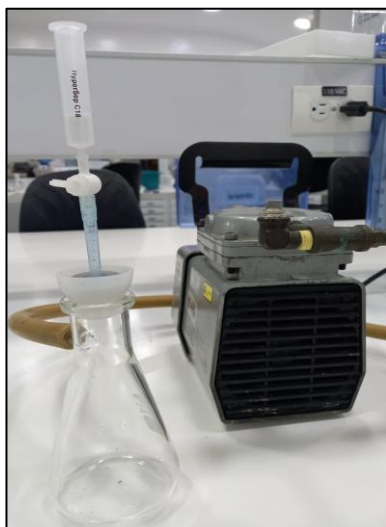
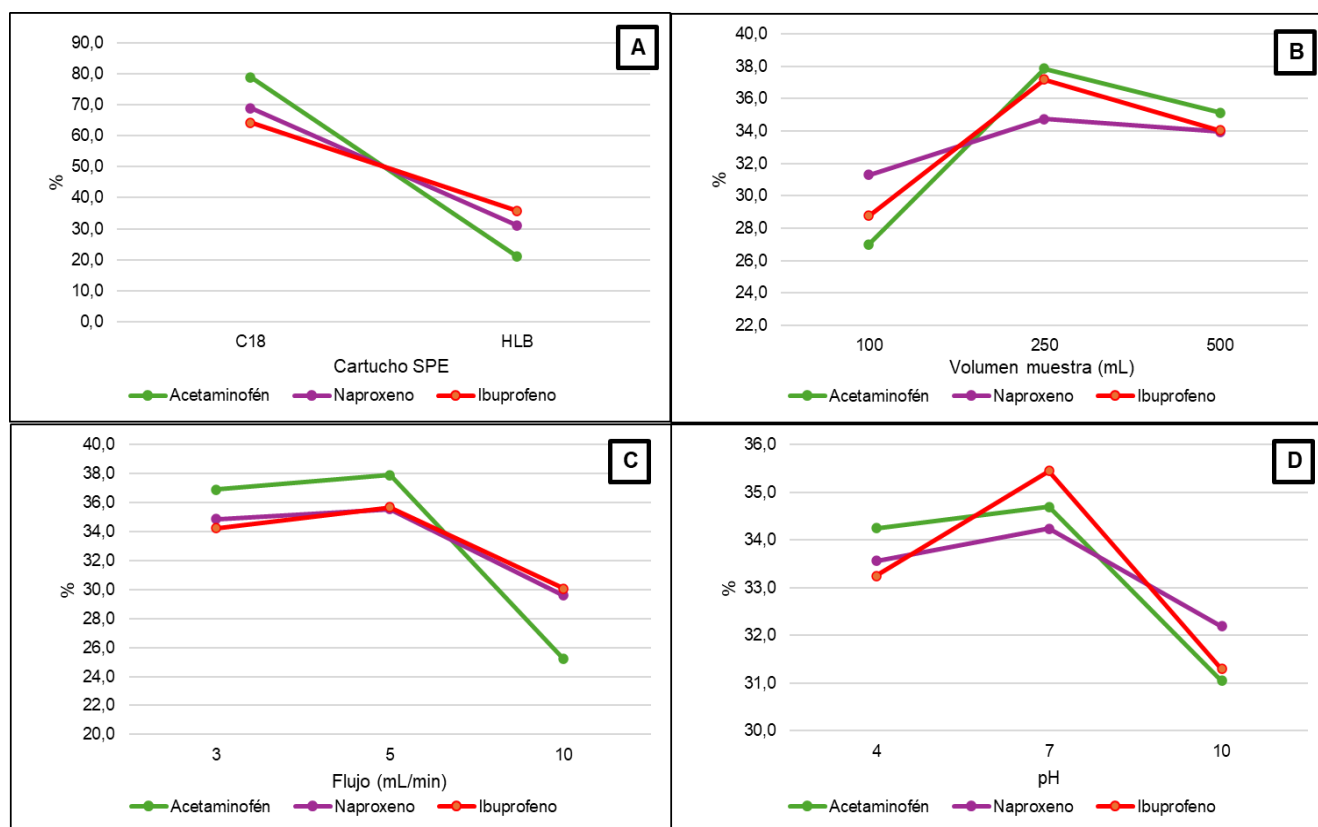


Figura 7. Montaje empleado para la extracción SPE.



Gráfica 1. Ensayos de optimización en la extracción SPE en función del %Área respecto a la variable: **A)** Tipo de cartucho (C18 y HLB), **B)** Volumen de muestra (mL), **C)** Flujo de muestra (mL/min), y **D)** El pH.

Con base a los resultados obtenidos de las inyecciones cromatográficas en los ensayos propuestos para la optimización SPE (Ver **tabla 12 en anexos**), se planteó la siguiente gráfica en función del %Área respecto a cada variable a optimizar. Dicho esto, en la **gráfica 1A** se compararon los porcentajes de áreas obtenidas en los ensayos 1 (C₁₈) y 2 (HLB), con las demás variables fijas (volumen de 100 mL, flujo de 10 mL/min y pH 7). Para el ACE, NAP e IBU, se presentaron porcentajes mayores de 78,9%, 68,9% y 64,3%, respectivamente a cada analito, los cuales son correspondiente a la fase estacionaria C₁₈. Para ACE, el cartucho C₁₈ presentó un área notablemente superior al HLB, lo que representa un incremento aproximado del 274%. De manera similar, para NAP, un aumento del 121%; y para IBU, un incremento del 80%. Lo que indica que el cartucho C₁₈, basado en sílice modificada, ofrece una mejor afinidad por los analitos no polares o moderadamente polares como NAP e IBU, posiblemente debido a interacciones hidrofóbicas más fuertes en comparación con el copolímero del HLB, que es más adecuado para compuestos polares amplios [16].

Seguidamente, manteniendo flujo de 10 mL/min y pH 7, el **gráfica 1B** compara los ensayos 1, 3 y 4, donde se obtuvo un %Área mayor para el ACE de 37,9%, el NAP con 34,7% y el IBU con 37,2%, son correspondientes al volumen de muestra de 250 mL. Para ACE, las áreas aumentaron con volumen de muestra de 100 mL a 250 mL, pero disminuyeron ligeramente a 500 mL, sugiriendo un volumen óptimo de 250 mL donde la saturación del cartucho es equilibrada con la cantidad de analito cargado. Para NAP, se observó un patrón similar, con un máximo en 250 mL (incremento del 11% respecto a 100 mL). Para IBU, con un pico en 250 mL (aumento del 29%). Esta tendencia se atribuye a que volúmenes mayores (500 mL) podrían causar sobrecarga del cartucho, reduciendo la eficiencia de retención por competencia con interferentes de la matriz, mientras que 100 mL subutiliza la capacidad adsorptiva. Así, se mejora la preconcentración sin comprometer la selectividad.

Posteriormente, con el cartucho C₁₈ y volumen de 250 mL fijos, y con un pH 7, en el **gráfica 1C** evalúa los flujos de 3 (ensayo 5), 5 (ensayo 6) y 10 mL/min (ensayo 3). Se evidenció que, para los tres analitos se obtuvo una mayor área con un flujo de 5 mL/min dando porcentajes de 37,9%, 35,5% y 35,7%, respectivamente al acetaminofén, naproxeno e ibuprofeno. Las áreas para ACE fueron máximas en 5 mL/min (aumento del 3% respecto al flujo de 3 y 50% frente a 10). Para NAP: con un máximo en 5 mL/min (incremento del 2% y 20%, respectivamente). Para IBU: nuevamente óptimo en flujo de 5 (aumentando el 4% y 19%, correspondiente al flujo 3 y 10). Con esto, el flujo más bajo permite mayor tiempo de contacto para adsorción, pero 5 mL/min equilibra eficiencia y tiempo de proceso; por otro lado, el flujo mayor analizado reduce la retención por el paso rápido de la muestra. De tal modo, se minimiza tiempos sin sacrificar recuperación.

Finalmente, empleando las condiciones óptimas previas, en el **gráfica 1D** se evaluó la última variable comparando el pH 4 (ensayo 7), 7 (ensayo 6) y 10 (ensayo 8); evidenciando con esta última variable que, a un pH 7 se obtiene la mayor recuperación, dando porcentajes para el ACE, NAP e IBU de 34,7%, 34,2% y 35,5%, respectivamente. Para el pH como variable óptima, el acetaminofén presentó un máximo de área en pH 7 (aumentando el 1% respecto al pH 4 y 11% a pH 10). Para el naproxeno, óptimo en pH 7 (aumento del 2% y 6%). En el caso del ibuprofeno, máximo en pH 7 (aumento del 6% y 12%). Este comportamiento se explica por el estado de ionización de los analitos en condiciones neutras (pH 7), donde NAP e IBU (ácidos débiles con pKa ~4-5) están mayoritariamente deprotonados, pero aún mantienen interacciones suficientes con la fase C₁₈, posiblemente favorecidas por un equilibrio óptimo entre hidrofobicidad y selectividad en matrices acuosas neutras [29]; a pH 4, hay una mezcla de formas que podría reducir la retención uniforme, mientras que a pH 10 (altamente básico), la ionización completa aumenta el carácter hidrofílico, disminuyendo la afinidad por la fase estacionaria [30]. ACE (pKa ~9,4) muestra variaciones menores, pero sigue la tendencia general.

Tabla 4. Variables óptimas para la extracción SPE en matrices de aguas residuales.

Variable	Valor óptimo
Cartucho (SPE)	C ₁₈
Volumen de muestra	250 mL
Flujo de muestra	5 mL/min
pH muestra	7

Tras evaluar el tipo de cartucho, volumen de muestra, flujo de carga y pH, se determinó que el cartucho C₁₈, un volumen de 250 mL, un flujo de 5 mL/min y un pH de 7 maximizan las áreas cromatográficas, reflejando una mayor eficiencia de extracción para los tres analitos. Además, estas variables (**Tabla 4**) lograron un equilibrio óptimo entre la retención de los compuestos, la estabilidad de la matriz y la practicidad del procedimiento, minimizando interferencias y optimizando la preconcentración en matrices complejas como aguas residuales. Al mismo tiempo, proporcionan una base robusta y reproducible para el análisis de fármacos en aguas residuales, contribuyendo a la fiabilidad del método analítico desarrollado y su aplicabilidad en estudios ambientales.

3.3. Determinación de fármacos en muestras de aguas residuales

De acuerdo con la lectura de las muestras, en la **figura 8** se evidencian los cromatogramas correspondientes a las dos muestras de aguas residuales. Asimismo, en la siguiente tabla, se encuentran los resultados obtenidos de la cuantificación de cada principio activo en las muestras problema calculadas a partir de la ecuación de la recta. El caso particular fue en el agua proveniente del hospital, ya que al inyectar esta solución muestra inicial, se obtuvo un pico con área cromatográfica por fuera del rango lineal; por lo cual, se procedió a realizar una dilución de 200 µL en 25 mL de la solución muestra preconcentrada de la extracción SPE, la cual, al realizar nuevamente la inyección, la dilución quedó dentro del rango de la curva de calibración.

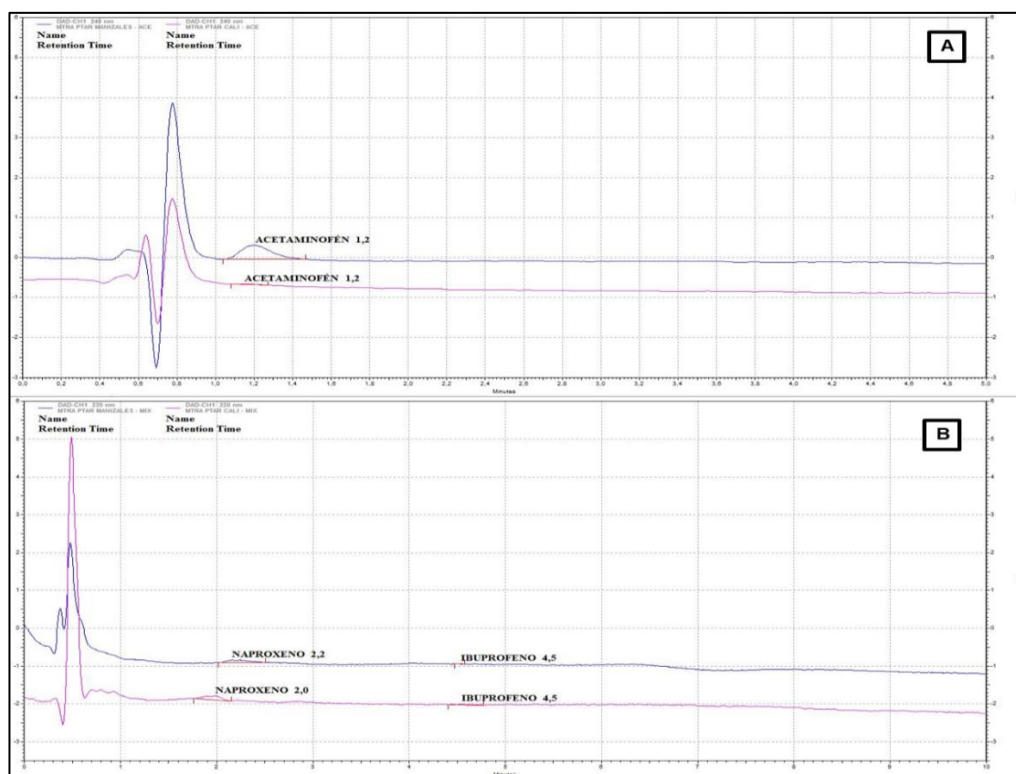


Figura 8. Cromatogramas de las muestras de aguas residuales, correspondiente a la PTAR de Cali con línea rosada (—) y PTAR del hospital con línea azul (—): **A)** Corrida de acetaminofén, **B)** Corrida del mix de naproxeno e ibuprofeno.

De acuerdo con la **tabla 5**, la cuantificación del naproxeno para ambas muestras fue calculada; sin embargo, estas concentraciones son bajas, las cuales no alcanzan a estar dentro del rango lineal estudiado; por ende, la emisión de un resultado a estas condiciones podría tener baja precisión y una mayor incertidumbre, volviéndolo un dato poco confiable. Para el caso del acetaminofén e ibuprofeno en la muestra de Cali, fueron detectados ambos analitos; no obstante, su concentración fue mínima, encontrándose por debajo de los límites de cuantificación. El ibuprofeno en la muestra de agua hospitalaria no fue detectado; por lo cual, no hubo presencia de este compuesto en esta matriz de agua. Por último, la concentración total de acetaminofén en la muestra de agua de la PTAR del

hospital dio un valor de 582,1 ppb la cual fue calculada a partir de la **ecuación 5** (*Ver anexos*); esta concentración se asemeja con un estudio realizado por la Universidad de Antioquia en conjunto con Universidad Jaume I, quienes evaluaron aguas residuales hospitalarias, los cuales reportaron concentraciones de 651,80 ppb y 667,79 ppb [31]. Dicho esto, debido a los pocos estudios que se han realizado en América Latina y el Caribe frente al monitoreo de contaminantes farmacéuticos en ambientes acuáticos [32], aun no se cuenta con regulaciones donde se establezcan límites permitidos, generando la acumulación en estas fuentes hídricas.

Tabla 5. Cuantificación de acetaminofén, naproxeno e ibuprofeno en las soluciones muestras preconcentradas por extracción SPE, provenientes de las aguas residuales.

Muestras	Concentración (ppb)		
	Acetaminofén	Naproxeno	Ibuprofeno
PTAR del hospital	232,9 *	5,4	N.D.
PTAR Cali	< LC	4,0	< LC

N.D.: No detectado, * Valor calculado de la dilución.

4. CONCLUSIONES

El método cromatográfico desarrollado, demostró ser preciso y confiable para la separación y determinación de acetaminofén, naproxeno e ibuprofeno. En la implementación, se logró alcanzar valores adecuados frente al factor de capacidad, simetría y resolución. La validación de la técnica reveló una buena linealidad ($R^2 > 0,995$), los bajos límites de detección y cuantificación generaron alta sensibilidad, especialmente para el naproxeno; la evaluación de la precisión presentó %RDS inferiores al límite establecido, asimismo, la hipótesis nula confirmó la ausencia de diferencias significativas. Los porcentajes de recuperación se encontraron dentro del rango permitido por la ICH, particularmente para el ibuprofeno, que presentó una mayor retención en la fase estacionaria del cartucho, debido a su menor polaridad.

Las condiciones de optimización estudiadas para la extracción en fase sólida mostraron resultados reproducibles y eficientes para la preconcentración de ACE, NAP e IBU en matrices de agua. Los resultados evidenciaron que la combinación de un cartucho C₁₈ con volumen de muestra de 250 mL, flujo de elución de 5 mL/min y un pH neutro, ofrecieron una mayor retención de los analitos, generando de esta manera, una mayor recuperación. Las tendencias observadas para cada variable demostraron la importancia del equilibrio de adsorción e interacción fase estacionaria-matriz frente a las condiciones fisicoquímicas; que, al ser integradas, generan una buena sensibilidad analítica. Por ende, esta metodología proporciona buenas bases para futuras aplicaciones en matrices de aguas residuales.

Finalmente, la cuantificación de las muestras de aguas residuales mediante el método de preconcentración SPE junto con HPLC, permitieron la detección y cuantificación de compuestos como acetaminofén, naproxeno e ibuprofeno. El ACE fue el único compuesto cuantificable dentro del rango lineal en la muestra de la PTAR del hospital, con una concentración comparable a estudios previos en aguas residuales hospitalarias, lo que confirma su presencia en ambientes acuáticos. No obstante, el NAP y IBU presentaron concentraciones bajas o no detectables, lo que compromete la confiabilidad de su cuantificación. Se espera que los resultados obtenidos sumen a las investigaciones de América Latina para lograr establecer regulaciones con límites permitidos de contaminantes emergentes en ambientes acuáticos.

Con base a los resultados obtenidos y las conclusiones planteadas, se evidenció que el método desarrollado constituyó confiabilidad para la detección de acetaminofén, naproxeno e ibuprofeno en aguas residuales; sin embargo, algunos aspectos metodológicos y analíticos podrían ser optimizados con el fin de ampliar la sensibilidad y así mismo, lograr obtener mayor aplicabilidad en diferentes contaminantes farmacéuticos. Dicho esto, emplear una columna cromatográfica encapada con mayor longitud y menor tamaño de partícula, podría aumentar la selectividad de cada componente, ya que, habría una menor exposición de grupos silanoles libre en la fase estacionaria. Por otra parte, el uso de sales fosfato o acetato como soluciones reguladoras de pH para una elución

en gradiente, no fueron muy adecuadas, debido a que estos iones tienden a ser poco solubles con solventes orgánicos como lo es el acetonitrilo, lo que provoca precipitaciones y aparición de picos inusuales en la corrida cromatográfica; por ende, emplear otro tipo de solución buffer que tenga mayor compatibilidad con este tipo de solventes, daría paso a establecer una corrida en un solo sistema cromatográfico en gradiente, generando una mayor eficiencia analítica.

5. AGRADECIMIENTOS

Se agradece el Ph.D. Jhon Jairo Rios Acevedo, quien fue director del trabajo de grado y apoyó con su conocimiento técnico y orientación analítica para el desarrollo de esta investigación. Asimismo, a la empresa Carval de Colombia, especialmente al área de Validaciones y Estabilidades, quienes pusieron a disposición el laboratorio fisicoquímico y recursos materiales e instrumentales para el estudio investigativo. Finalmente, agradecer a los familiares y personas que contribuyeron de una u otra manera para la finalización de este trabajo.

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A. M. Alqarni, "Analytical Methods for the Determination of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Solid and Liquid Environmental Matrices: A Review," *Molecules*, vol. 29, no. 16, p. 3900, Aug. 2024, doi: 10.3390/molecules29163900.
- [2] Meléndez-Marmolejo J et al., "Contaminantes emergentes. Problemática ambiental asociada al uso de antibióticos. Nuevas técnicas de detección, remediación y perspectivas de legislación en América Latina.," Jun. 2020.
- [3] A. Kock, H. C. Glanville, A. C. Law, T. Stanton, L. J. Carter, and J. C. Taylor, "Emerging challenges of the impacts of pharmaceuticals on aquatic ecosystems: A diatom perspective," *Science of The Total Environment*, vol. 878, p. 162939, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.162939.
- [4] A. E. Turcios, M. Hielscher, B. Duarte, V. F. Fonseca, I. Caçador, and J. Papenbrock, "Screening of Emerging Pollutants (EPs) in Estuarine Water and Phytoremediation Capacity of *Tripolium pannonicum* under Controlled Conditions," *Int J Environ Res Public Health*, vol. 18, no. 3, p. 943, Jan. 2021, doi: 10.3390/ijerph18030943.
- [5] I. Martínez-Alcalá, J. Soto, and A. Lahora, "Antibiotics as emerging pollutants. Ecotoxicological risk and control in wastewater and reclaimed water," *Ecosistemas*, vol. 29, no. 3, Dec. 2020, doi: 10.7818/ECOS.2070.
- [6] D. Y. Reasco-Pincay and M. I. Márquez-Alcivar, "Determinación de paracetamol en un agua residual simulada mediante voltamperometría de onda cuadrada usando un electrodo de carbón vítreo dopado con disco de platino," *Ibero-American Journal of Engineering & Technology Studies*, vol. 3, no. 1, pp. 238–255, Apr. 2023, doi: 10.56183/iberotecs.v3i1.599.
- [7] Departamento Nacional de Planeación (DNP), "El país solo alcanza a tratar el 60% de sus aguas residuales en las ciudades: DNP." Accessed: Jul. 19, 2025. [Online]. Available: https://www.dnp.gov.co/Prensa_/Noticias/Paginas/el-pais-solo-alcanza-a-tratar-el-60-de-sus-aguas-residuales-en-las-ciudades-dnp.aspx
- [8] S. Sigonya, S. C. Onwubu, P. S. Mdluli, and T. H. Mokhothu, "Method optimisation and application based on solid phase extraction of non steroidal anti-inflammatory drugs, antiretroviral drugs, and a lipid regulator from coastal areas of Durban, South Africa," *SN Appl Sci*, vol. 4, no. 8, p. 231, Aug. 2022, doi: 10.1007/s42452-022-05120-x.
- [9] A. Cerón-Vivas and G. A. Peñuela Mesa, "Environmental risk assessment of pharmaceutical pollutants in the Oro River Sub-basin (Colombia)," *Environ Res*, vol. 252, p. 118951, Jul. 2024, doi: 10.1016/j.envres.2024.118951.
- [10] M. A. Flórez-Restrepo, X. López-Legarda, and F. Segura-Sánchez, "Bioremediation of emerging pharmaceutical pollutants acetaminophen and ibuprofen by white-rot fungi – A review," *Science of The Total Environment*, vol. 977, p. 179379, May 2025, doi: 10.1016/j.scitotenv.2025.179379.

- [11] D. Wojcieszńska and U. Guzik, "Naproxen in the environment: its occurrence, toxicity to nontarget organisms and biodegradation," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 104, no. 5, pp. 1849–1857, Mar. 2020, doi: 10.1007/s00253-019-10343-x.
- [12] M. Ortúzar, M. Esterhuizen, D. R. Olicón-Hernández, J. González-López, and E. Aranda, "Pharmaceutical Pollution in Aquatic Environments: A Concise Review of Environmental Impacts and Bioremediation Systems," *Front Microbiol*, vol. 13, Apr. 2022, doi: 10.3389/fmicb.2022.869332.
- [13] S. Chopra and D. Kumar, "Ibuprofen as an emerging organic contaminant in environment, distribution and remediation," *Heliyon*, vol. 6, no. 6, p. e04087, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04087.
- [14] European Commission, "Proposal for a Directive amending the Water Framework Directive, the Groundwater Directive and the Environmental Quality Standards Directive," Brussels, 2022. Accessed: Sep. 22, 2025. [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=COM%3A2022%3A540%3AFIN>
- [15] S. Sigonya, S. C. Onwubu, P. S. Mdluli, and T. H. Mokhothu, "Method optimisation and application based on solid phase extraction of non steroidal anti-inflammatory drugs, antiretroviral drugs, and a lipid regulator from coastal areas of Durban, South Africa," *SN Appl Sci*, vol. 4, no. 8, p. 231, Aug. 2022, doi: 10.1007/s42452-022-05120-x.
- [16] A. M. Alqarni, "Analytical Methods for the Determination of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Solid and Liquid Environmental Matrices: A Review," *Molecules*, vol. 29, no. 16, p. 3900, Aug. 2024, doi: 10.3390/molecules29163900.
- [17] M. E. I. Badawy, M. A. M. El-Nouby, P. K. Kimani, L. W. Lim, and E. I. Rabea, "A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis," *Analytical Sciences*, vol. 38, no. 12, pp. 1457–1487, Dec. 2022, doi: 10.1007/s44211-022-00190-8.
- [18] P. Dinis, E. Gallardo, and C. Margalho, "Recent Trends in Solid-Phase Microextraction for the Monitoring of Drugs of Abuse in Wastewater," *Separations*, vol. 12, no. 9, p. 256, Sep. 2025, doi: 10.3390/separations12090256.
- [19] I. Notardonato *et al.*, "Comparison of Two Extraction Procedures, SPE and DLLME, for Determining Plasticizer Residues in Hot Drinks at Vending Machines," *Processes*, vol. 9, no. 9, p. 1588, Sep. 2021, doi: 10.3390/pr9091588.
- [20] M. W. Nassar, A. Serag, M. A. Hasan, and M. Kamel, "Development and validation of a RP-HPLC method for simultaneous determination of five COVID-19 antiviral drugs in pharmaceutical formulations," *Scientific Reports 2025 15:1*, vol. 15, no. 1, pp. 25470–, Jul. 2025, doi: 10.1038/s41598-025-09904-0.
- [21] M. E. I. Badawy, M. A. M. El-Nouby, P. K. Kimani, L. W. Lim, and E. I. Rabea, "A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis," *Analytical Sciences*, vol. 38, no. 12, pp. 1457–1487, Dec. 2022, doi: 10.1007/s44211-022-00190-8.
- [22] N. Mpayipheli, A. Mpupa, N. E. Madala, and P. N. Nomngongo, "Quantification of Acetaminophen, Ibuprofen, and β -Blockers in Wastewater and River Water Bodies During the COVID-19 Pandemic," *Environments*, vol. 12, no. 8, p. 278, Aug. 2025, doi: 10.3390/environments12080278.
- [23] E. F. Critto, G. Medina, M. Reta, and A. Acquaviva, "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface waters by high performance liquid chromatography previous to preconcentration through solid-phase extraction by using polymeric monoliths," *J Chromatogr A*, vol. 1679, p. 463397, Aug. 2022, doi: 10.1016/J.CHROMA.2022.463397.
- [24] Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (Minambiente), "Toma de muestras de aguas residuales - Bifenilos Policlorados (PCB)," 2021.
- [25] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principios de Análisis Instrumental*, 6th ed. México: Cengage Learning, 2008.
- [26] United States Pharmacopeial Convention, *United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 42/NF 37)*. United States Pharmacopeial Convention, 2019.
- [27] E. Rodríguez Cavallo and D. Méndez Cuadro, *Perspectiva analítica y proteómica de residuos de antimicrobianos y plaguicidas en alimentos de origen animal*, Primera edición. Cartagena: Editorial Universitaria, Universidad de Cartagena, 2021.
- [28] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, "ICH Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology," 2005. Accessed: Sep. 27, 2025. [Online]. Available: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
- [29] Z. H. Mussa, F. F. Al-Qaim, A. H. Jawad, M. Scholz, and Z. M. Yaseen, "A Comprehensive Review for Removal of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs Attained from Wastewater Observations Using Carbon-Based Anodic Oxidation Process," *Toxics*, vol. 10, no. 10, p. 598, Oct. 2022, doi: 10.3390/toxics10100598.

- [30] Nguyen Thanh Dong, Nguyen Thi Thu Trang, Nguyen Viet Hoang, Pham Tuan Linh, and Pham Thi Yen, "Simultaneous determination of paracetamol and diclofenac in wastewater by high-performance liquid chromatography method," *Vietnam J Sci Technol*, pp. 599–608, Aug. 2023, doi: 10.15625/2525-2518/16418.
- [31] E. A. Serna-Galvis, A. M. Botero-Coy, M. Rosero-Moreano, J. Lee, F. Hernández, and R. A. Torres-Palma, "An Initial Approach to the Presence of Pharmaceuticals in Wastewater from Hospitals in Colombia and Their Environmental Risk," *Water (Switzerland)*, vol. 14, no. 6, p. 950, Mar. 2022, doi: 10.3390/W14060950/S1.
- [32] R. Hernández-Tenorio, M. Villanueva-Rodríguez, J. L. Guzmán-Mar, L. Hinojosa-Reyes, A. Hernández-Ramírez, and H. H. Vigil-Castillo, "Priority list of pharmaceutical active compounds in aquatic environments of Mexico considering their occurrence, environmental and human health risks," *Environ Toxicol Pharmacol*, vol. 110, p. 104502, Sep. 2024, doi: 10.1016/J.ETAP.2024.104502.

7. ANEXOS

Tabla 6. Concentraciones e intervalos correspondientes al rango lineal de las curvas de calibración.

	Acetaminofén	Naproxeno	Ibuprofeno
Concentraciones (µg/L) de curvas de calibración	60	60	120
	160	160	220
	280	280	340
	400	400	460
	500	500	560
Intervalos del rango lineal (%)	21	21	35
	179	179	165

Tabla 7. Hipótesis planteadas para la evaluación del intercepto (b), pendiente (m), coeficiente de determinación (R^2) y linealidad.

Variable	Hipótesis	Prueba	Criterio aceptación	Concepto
b	H_0	T	Intercepto debe ser significativamente igual a cero	Cumple
m	H_a	T	Una pendiente diferente de cero	Cumple
R^2	H_a	T	Existe correlación entre el eje X y Y	Cumple
Linealidad	H_a	ANOVA	Existe regresión lineal	Cumple

Tabla 8. Análisis de regresión con nivel de confianza del 95% evaluado para parámetro de linealidad en los compuestos de acetaminofén, naproxeno e ibuprofeno. 6

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F			
	Regresión	1	14331129973	14331129973	37223,92377	5,13684E-37		
Residuos	18	8469952,317	384997,8326					
Total	19	14339599925						

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	-355,38	208,54	-1,70	0,10	-787,86	77,10	-787,86	77,10
Concentración (µg/L)	136,98	0,71	192,94	0,00	135,51	138,46	135,51	138,46

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F			
	Regresión	1	1,42592E+11	1,42592E+11	82533,31536	8,09659E-41		
Residuos	18	38009096,19	1727686,19					
Total	19	1,4263E+11						

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	924,71	441,76	2,09	0,05	8,56	1840,85	8,56	1840,85
Concentración (µg/L)	432,09	1,50	287,29	0,00	428,97	435,21	428,97	435,21

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F			
	Regresión	1	8835482774,14	8835482774,14	26101,26	2,5428E-35		
Residuos	18	7447175,20	338507,96					
Total	19	8842929949,33						

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	-16,63	211,46	-0,08	0,94	-455,18	421,91	-455,18	421,91
Concentración (µg/L)	99,76	0,62	161,56	0,00	98,48	101,04	98,48	101,04

El límite de detección (LD) viene dado por la ecuación 1:

$$LD = \frac{3 * \text{Desviación estándar blanco } (S_{Bco})}{\text{Pendiente } \left(\frac{L}{\mu g}\right)} \quad (1)$$

El límite de cuantificación (LC) viene dado por la ecuación 2:

$$LC = \frac{10 * \text{Desviación estándar blanco } (S_{Bco})}{\text{Pendiente } \left(\frac{L}{\mu g}\right)} \quad (2)$$

Tabla 9. Evaluación del parámetro de precisión intermedia estudiada en el punto medio de concentración de las curvas de calibración de los analitos de acetaminofén, naproxeno e ibuprofeno.

#Inyección	Acetaminofén		Naproxeno		Ibuprofeno	
	Concentración (µg/L)		Concentración (µg/L)		Concentración (µg/L)	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
1	277,5	275,6	277,6	276,7	334,3	329,5
2	273,9	274,7	280,0	279,0	339,8	337,5
3	270,8	268,9	276,8	277,2	337,5	338,6
4	271,6	271,0	280,1	276,5	331,5	335,9
5	269,1	271,9	279,5	277,9	334,7	332,6
6	275,6	278,1	278,4	280,0	339,7	339,6
Promedio	273,1	273,4	278,7	277,9	336,2	335,6
%RSD	1,2	1,2	0,5	0,5	1,0	1,2

El porcentaje de desviación estándar relativo (%RSD) viene dado por la ecuación 3:

$$\%RSD = \left(\frac{\text{Desviación estándar del conjunto de datos}}{\text{Promedio de datos}} \right) * 100 \quad (3)$$

Tabla 10. Análisis de varianza de un factor con significancia al 0,05 evaluado para parámetro de precisión intermedia en los compuestos de acetaminofén, naproxeno e ibuprofeno.

	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
	Día 1		6	1638,43177	273,0719616	9,9455642	
Día 2		6	1640,176501	273,3627502	11,188461		
Acetaminofén	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Fcal	Probabilidad	Valor crítico para F
	Entre grupos	0,253673947	1	0,253673947	0,0240062	0,87995178	4,96460274
	Dentro de los grupos	105,6701275	10	10,56701275			
	Total	105,9238014	11				
	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
	Día 1		6	1672,377193	278,7295321	1,8242354	
Día 2		6	1667,285684	277,8809474	1,8993892		
Naproxeno	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Fcal	Probabilidad	Valor crítico para F
	Entre grupos	2,160288275	1	2,160288275	1,1603147	0,30669936	4,96460274
	Dentro de los grupos	18,61812314	10	1,861812314			
	Total	20,77841141	11				
	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
	Día 1		6	2017,308831	336,2181385	10,981949	
Día 2		6	2013,800551	335,6334252	15,057978		
Ibuprofeno	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Fcal	Probabilidad	Valor crítico para F
	Entre grupos	1,02566866	1	1,02566866	0,0787766	0,78468333	4,96460274
	Dentro de los grupos	130,1996356	10	13,01996356			
	Total	131,2253043	11				

Tabla 11. Evaluación del parámetro de precisión intermedia estudiada en el punto medio de concentración de las curvas de calibración de los analitos de acetaminofén, naproxeno e ibuprofeno.

#Inyección	Acetaminofén		Naproxeno		Ibuprofeno	
	%Recuperación		%Recuperación		%Recuperación	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
1	81,9	85,5	87,8	86,8	89,2	86,9
2	84,3	84,0	87,1	87,4	87,8	89,8
3	83,8	84,4	87,6	87,0	86,8	88,4
4	82,6	82,9	87,0	87,1	90,1	88,3
5	84,7	84,2	87,4	87,6	88,2	89,3
6	83,1	82,1	87,4	86,8	87,2	89,0
Promedio	83,4	83,9	87,4	87,1	88,2	88,6
%RSD	1,3	1,4	0,4	0,4	1,4	1,2

El porcentaje de recuperación viene dado por la ecuación 4:

$$\%Recuperación = \left(\frac{\text{Concentración calculada}}{\text{Concentración añadida}} \right) * 100 \quad (4)$$

Tabla 12. Resultados de áreas obtenidas a partir de la doble inyección de los ensayos propuestos para la optimización SPE.

	Acetaminofén	Naproxeno	Ibuprofeno
Ensayo	Área	Área	Área
1	13733	73522	19158
	13872	73003	18711
2	3663	32779	10742
	3709	33480	10320
3	19207	81495	24217
	19489	81207	24751
4	18004	79161	22048
	17896	79923	22793
5	28157	95604	27608
	28491	96028	28166
6	29009	97993	28923
	29168	97450	29179
7	28490	96045	27374
	28933	95528	27111
8	26197	92001	25704
	25861	91762	25589

La concentración final de acetaminofén en la muestra de agua residual hospitalaria viene dada por la ecuación 5:

$$\text{Concentración (ppb)} = 232,9 \text{ ppb} * \frac{25 \text{ mL (dilución)}}{0,2 \text{ mL (Extracción SPE)}} * \frac{5 \text{ mL (Extracción SPE)}}{250 \text{ mL (Muestra)}} = 582,1 \text{ ppb} \quad (5)$$