



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN

FACULTAD DE INGENIERÍA

UNIDAD DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“REMOCIÓN DE FÁRMACOS VETERINARIOS MEDIANTE
HUMEDALES CONSTRUIDOS”**

TESIS

PRESENTADA POR:

BIOL. JOSUÉ RENAN MEZA SULÚ

EN OPCIÓN AL GRADO DE

MAESTRO EN INGENIERÍA

OPCIÓN AMBIENTAL

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2020

“Aunque este trabajo hubiere servido para el Examen de Grado y hubiera sido aprobado por el sínodo, sólo el autor es responsable de las doctrinas emitidas en él.”

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad Autónoma de Yucatán, por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis.

RESUMEN

Los fármacos representan un problema para la calidad del agua debido a que los procesos de tratamiento de aguas residuales convencionales resultan ineficaces para su remoción. En Yucatán una fuente importante de contaminación es la porcicultura, ésta representa una de las mayores actividades económicas del estado. En ésta se emplean gran variedad de fármacos veterinarios. Los analgésicos diclofenaco y flunixin se enlistan entre los fármacos de mayor uso en Yucatán. En este trabajo se evaluó la remoción de dos fármacos veterinarios (diclofenaco y flunixin) por medio de un tratamiento alternativo como son los humedales construidos, para lo cual se implementó un método para su determinación mediante cromatografía de gases acoplado a espectrofotómetro de masas (CG-EM). El objetivo fue evaluar la eficiencia de remoción de analgésicos veterinarios presentes en aguas residuales porcícolas mediante humedales construidos. Los tratamientos incluyen tipos de sustrato (grava, arena y mezcla) y dos especies de macrófitas (*T. latifolia* y *C. papyrus*). El método desarrollado permitió la cuantificación de los analgésicos por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrofotómetro de masas (CG-EM), con porcentajes de recobro para diclofenaco de 71-80.1% y para flunixin de 64.1-74.5 %. Tratamiento con humedales obtuvo porcentajes de remoción de 95.45-98.44 % para diclofenaco y de 96.64-97.65 % para flunixin. Para ambos fármacos el mayor porcentaje de remoción correspondió al tratamiento con mezcla de sustrato y *T. latifolia*.

Abstract

Pharmaceutical products represent a problem for water quality because conventional wastewater treatment processes are ineffective for their removal. In Yucatan an important source of contamination is pig farming. This represents one of the greatest economic activities of the state, in which is used a great variety of veterinary pharmaceuticals products. Diclofenac and flunixin both analgesics are among the most commonly used pharmaceuticals products in Yucatan. In this work, the removal of two veterinary pharmaceuticals products (diclofenac and flunixin) is evaluated by means of an alternative treatment such as constructed wetlands. A method for its determination by GC-MS was employed. The objective was to evaluate the removal efficiency of veterinary analgesics present in swine wastewater using constructed wetlands. Treatments include substrate types (gravel, sand and mixture) and two species of macrophytes (*T. latifolia* and *C. papyrus*). The developed method allowed the quantification of analgesics by means of gas chromatography coupled to mass spectrophotometer (GC-MS), with recovery percentages for diclofenac of 71-80.1 % and for flunixin of 64.1-74.5 %. Removal rates of diclofenac were in the range of 95.45-98.44 %, while flunixin rates were of 96.64-97.65 %. Both pharmaceuticals products had the highest removal percentage corresponding to the treatment with substrate mixture and *T. latifolia*.

ÍNDICE

RESPONSIVA	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	3
3. OBJETIVOS	3
3.1. OBJETIVO GENERAL	3
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
4. MARCO TEÓRICO	4
4.1 FÁRMACOS	4
4.2. RUTAS DE CONTAMINACIÓN EN EL AGUA	5
4.3. ANALGÉSICOS USADOS EN LA PORCICULTURA	6
4.4. EFECTOS NOCIVOS EN EL AMBIENTE	8
4.5. MÉTODOS DE DETECCIÓN	9
4.6. MÉTODOS DE TRATAMIENTO	10
4.7. HUMEDALES CONSTRUIDOS COMO TRATAMIENTO	11
5. METODOLOGÍA	12
5.1 CONSTRUCCIÓN DE HUMEDALES	12
5.2 SELECCIÓN DE ANALGÉSICOS-ANTIINFLAMATORIOS.	13
5.3 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	14
5.3.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN	14
5.3.2 PORCENTAJES DE RECOBRO DE ANALGÉSICOS EN AGUA RESIDUAL PORCÍCOLA	15
5.4 CONTAMINACIÓN DE HUMEDALES Y TOMA DE MUESTRAS DE AGUA	15
5.5 DETECCIÓN DE FLUNIXIN Y DICLOFENACO POR	16

CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG-EM)

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	17
6. RESULTADOS	18
6.1 ENCUESTA DE ANALGÉSICOS	18
6.2 CURVAS DE CALIBRACIÓN DE ESTÁNDARES FARMACÉUTICOS	19
6.3 PORCENTAJES DE RECOBRO DE FLUNIXIN Y DICLOFENACO	20
6.4 REMOCIÓN DE FLUNIXIN Y DICLOFENACO EN EL EFLUENTE DE LOS HUMEDALES CONSTRUIDOS	21
7. DISCUSIÓN	28
8. CONCLUSIÓN	33
9. REFERENCIAS	34
10. ANEXOS	42

LISTA DE TABLAS

NO.	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	PORCENTAJES DE RECOBRO DE DICLOFENACO	20
2	PORCENTAJES DE RECOBRO DE FLUNIXIN	20
3	TABLA DE MEDIAS POR MÍNIMOS CUADRADOS PARA EL PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE DICLOFENACO	24
4	TABLA DE MEDIAS POR MÍNIMOS CUADRADOS PARA EL PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE FLUNIXIN	27

LISTA DE FIGURAS

NO.	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA DE CONSTRUCCIÓN DE HUMEDALES, EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS POR CG-EM DE ANALGÉSICOS VETERINARIOS	13

2	USO DE LOS PRINCIPALES ANALGÉSICOS – ANTIINFLAMATORIOS EN GRANJAS ENCUESTADAS	18
3	CURVA DE CALIBRACIÓN DE ESTÁNDAR DE DICLOFENACO POR CG-EM	19
4	CURVA DE CALIBRACIÓN DE ESTÁNDAR DE FLUNIXIN POR CG-EM	19
5	PORCENTAJE DE REMOCIÓN PROMEDIO DE DICLOFENACO POR TRATAMIENTO	22
6	GRÁFICO DE MEDIAS DEL EFECTO DEL TIPO DE PLANTA EN LA REMOCIÓN DE DICLOFENACO	22
7	GRÁFICO DE MEDIAS DEL EFECTO DEL SOPORTE EN LA REMOCIÓN DE DICLOFENACO	23
8	GRÁFICO DE MEDIAS DEL EFECTO DE LAS RÉPLICAS EN LA REMOCIÓN DE DICLOFENACO	23
9	GRÁFICO DE INTERACCIONES DEL EFECTO DEL SOPORTE Y TIPO DE PLANTA EN LA REMOCIÓN DE DICLOFENACO.	24
10	PORCENTAJE DE REMOCIÓN PROMEDIO DE FLUNIXIN POR TRATAMIENTO	25
11	GRÁFICO DE MEDIAS DEL EFECTO DEL SOPORTE EN LA REMOCIÓN DE FLUNIXIN	26
12	GRÁFICO DE MEDIAS DEL EFECTO DEL SOPORTE EN LA REMOCIÓN DE FLUNIXIN	26
13	GRÁFICO DE MEDIAS DEL EFECTO DEL SOPORTE EN LA REMOCIÓN DE FLUNIXIN	27

1. INTRODUCCIÓN

En la Península de Yucatán existe una amplia disponibilidad de agua. Sin embargo, el incremento en la demanda de este recurso debido al crecimiento de la mancha urbana en los últimos años en el estado y el aumento en las actividades de producción han generado afectaciones al medio ambiente. Tal es el caso de la disminución de la calidad del agua de la capa freática y por ende aumento en la vulnerabilidad a la contaminación del acuífero subterráneo (Kauffer y Villanueva 2012). El estado de Yucatán está caracterizado por poseer un suelo kárstico, compuesto en su mayoría por caliza dura y blanda, con muy alta permeabilidad, que permite que el agua se infiltre rápidamente (García-Gil y Graniel-Castro 2010). Estas características hacen que la única fuente de agua dulce que es el acuífero subterráneo este el riesgo de recibir material contaminante por arrastre en la precipitación pluvial, las aguas de riego, las descargas de aguas residuales, etc. En diversos cenotes de Yucatán se han identificado desechos de productos químicos de consumo cotidiano como la cafeína, algunas drogas de venta libre como la nicotina, drogas ilícitas como la cocaína, y también contaminantes emergentes (Hoogesteijn *et al.* 2015). Los estudios han determinado variaciones en la calidad del agua subterránea, por ejemplo la porción este de Yucatán que presenta elevadas cargas anuales de nitrógeno debido a contaminación por aguas residuales provenientes de criaderos de animales, principalmente de granjas porcícolas (Pacheco-Castro *et al.* 2018).

En los últimos años se ha hecho evidente la preocupación por los efectos que estos contaminantes emergentes pueden producir en el medio ambiente exponiendo a la vida silvestre y a los humanos a sus posibles riesgos, por lo que este tipo de contaminantes ha atraído la atención de la comunidad científica (Aubertheau *et al.* 2017). Es evidente que los fármacos representan un problema para la calidad del agua debido a que los procesos de tratamiento de aguas residuales convencionales resultan ineficaces para su remoción (Rodayan *et al.* 2016). Los compuestos químicos que los conforman no resultan alterados o no logran ser removidos por completo, para ello se requiere de tecnologías avanzadas de mayor costo como el

uso de carbón activado granular, ozonación o radiación ultravioleta por mencionar algunas (Pedrouzo *et al.* 2011).

Muchos de los fármacos de uso doméstico se encuentran en la mayoría de los sistemas acuáticos que reciben descargas de efluentes municipales, generalmente en concentraciones menores a 1µg/L (Berninger *et al.* 2011). En Yucatán una fuente importante de contaminación es la porcicultura, ya que esta representa una de las mayores actividades económicas de nuestro estado. Se ha enfatizado mayormente la contaminación del agua subterránea por las excretas que causan la presencia de amonio, sulfatos, eutrofización, sólidos suspendidos, coliformes fecales entre otros (Méndez *et al.* 2009). En la industria porcícola se emplean gran variedad de fármacos entre los cuales el grupo denominado analgésicos – antiinflamatorios se usan de forma regular con el fin de tratar diversos padecimientos de los animales. Se enlistan como los de mayor uso en Yucatán: butorfanol, buprenorfina, xilazina, medetodimina, fenilbutazona, flunixin, ketoprofen, carprofen, aspirina, meloxicam, piroxicam, dexametasona, flumetasona, diclofenaco y paracetamol (Gutiérrez *et al.* 2017). Por lo que destaca que las excretas de los animales llevan consigo cargas de fármacos de uso veterinario (Kwasny *et al.* 2011). Muchos de los ingredientes activos de los medicamentos consumidos pueden atravesar el cuerpo de los organismos sin ser metabolizados en su totalidad, con lo que se expulsan como metabolitos o en las mismas formas activas (Zyoud *et al.* 2016). Los fármacos pueden sufrir transformaciones a través de procesos biológicos, químicos, fotoquímicos o bien pueden ser absorbidos por los organismos dependiendo del comportamiento de los compuestos (Rodayan *et al.* 2016). En el medio ambiente los fármacos pueden causar afecciones a los organismos vivos incluyendo a los humanos (Rodayan *et al.* 2016). Además su exposición a aguas contaminadas puede conllevar a un problema de salud pública (Robles *et al.* 2013).

En virtud de lo expuesto en este trabajo se plantea llevar a cabo un estudio respecto a la remoción de fármacos veterinarios mediante un tratamiento alternativo. Para ello se realizó un experimento con humedales construidos con diferentes tipos de vegetación y varios sustratos. Esto con el objetivo de evaluar las eficiencias de

remoción de analgésicos veterinarios de aguas residuales porcícolas en humedales construidos.

2. PREGUNTAS DE INVESTIGACION

¿Se puede implementar una metodología validada para la determinación (extracción, detección y cuantificación) de analgésicos por CG-EM?

¿Las modificaciones operacionales de los sistemas de tratamiento modifican la eficiencia de remoción de los analgésicos en los humedales construidos?

¿Los humedales construidos son una alternativa para la remoción de analgésicos en una matriz de agua residual porcícola?

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Evaluar la remoción de analgésicos en el efluente de humedales construidos a escala con tres diferentes materiales de soporte y dos especies de macrófitas.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar los analgésicos mayormente empleados en algunas granjas porcícolas cercanas a Mérida, Yucatán.
- Desarrollar la metodología para la extracción de flunixin y diclofenaco de muestras de agua residual porcícola, y la preparación de la misma para su cuantificación analítica en CG-EM.
- Determinar las concentraciones y evaluar las eficiencias de remoción de flunixin y diclofenaco en el efluente de los humedales construidos.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. FÁRMACOS

Los fármacos son compuestos de gran importancia para la medicina moderna que beneficia a la humanidad. Sin embargo la gran cantidad de productos químicos desarrollados hoy en día y la accesibilidad a estos compuestos para uso humano y veterinario hace de estos una fuente importante de contaminación para el agua (Nikolaou *et al.* 2007). Además, la falta de regulación en la forma de desechar estos productos a favorecido a la presencia de fármacos en el medio ambiente (Fick *et al.* 2009).

En la literatura se señalan como principales fármacos con más amplia distribución a los grupos de antibióticos, analgésicos, esteroides, hormonas, diuréticos, antiepilépticos, antidepresivos, tranquilizantes, medicamentos para la reducción de lípidos y beta bloqueadores (Dong *et al.* 2013, Yan *et al.* 2015). De estos los medicamentos que se detectan de manera constante en aguas residuales y superficiales son el diclofenaco, ácido clorfibrico, acetaminofén, ibuprofeno, aspirina, carbamazepina, atorvastatina, gemfibrozil, fluoxetina, 17 β -etinilestradiol (Yan *et al.* 2015). En diversos estudios se ha detectado la presencia de fármacos a bajos niveles en ambientes acuáticos naturales, aguas residuales y de consumos humano en diversos países (Fick *et al.* 2009). Numerosos compuestos han sido detectados continuamente en los diferentes sistemas acuáticos evidenciando la extensa y constante distribución de estos contaminantes emergentes (Dong *et al.* 2013, Gao *et al.* 2012). Por ejemplo los estudios indican que fármacos antiinflamatorios como el diclofenaco son consumidos en grandes cantidades anuales (940 toneladas) y presenta una pobre eficiencia de remoción en los sistemas de tratamiento de agua residual. Por tanto su presencia en sistemas acuáticos como ríos es frecuente registrando concentraciones de 2 ng L⁻¹ y en aguas subterráneas de 380 ng L⁻¹ (Al-Rajab *et al.* 2010).

4.2. RUTAS DE CONTAMINACIÓN EN EL AGUA

Los fármacos no son asimilados en su totalidad por los organismos que los ingieren, gran parte de los componentes activos son desechados del cuerpo sin ser metabolizados por completo. De esta manera persisten los metabolitos o compuestos inalterados en la orina y heces (Santos *et al.* 2013). Por consiguiente la carga de químicos es incorporada al flujo de las aguas residuales. La disposición de las aguas residuales tratadas o no tratadas hacia los cuerpos de agua de forma directa o en los cuerpos de agua receptores de disposición final lleva consigo cargas de estos contaminantes. Por lo que acciones como estas representan la principal forma de entrada a los sistemas acuáticos (Dong *et al.* 2013). En gran medida debido a la gran variación en la eficiencia de los sistemas de tratamiento de aguas convencionales que resultan inadecuados para eliminar todos estos compuestos antes de su disposición final (Jean *et al.* 2012).

Por otra parte entre los desechos sólidos sanitarios un componente regular son los medicamentos de uso cotidiano. Estos una vez situados en los rellenos sanitarios atraviesan un proceso de disolución con las lluvias, lo cual es una potencial fuente de contaminación por la infiltración de los líquidos de lixiviados a las aguas subterráneas (Masoner *et al.* 2016). La incorrecta disposición de desechos es considerada como la mayor fuente de estos contaminantes.

En diversos trabajos se ha determinado que la industria farmacéutica es una de las fuentes contaminantes de fármacos con mayores concentraciones (Fick *et al.* 2009). A su vez en otros estudios también se han determinado concentraciones prevalentes de fármacos en aguas residuales de hospitales (Zyoud *et al.* 2016). Si bien los hospitales son fuentes de grandes concentraciones de fármacos, no se tiene un proceso específico de tratamiento en estos antes de ser incorporados a los sistemas de aguas residuales o al cuerpo de agua receptor (Jean *et al.* 2012, Santos *et al.* 2013). Por otra parte la cría intensiva de animales es una de las mayores fuentes de contaminantes farmacéuticos en el ambiente. En esta actividad se usan gran variedad de medicamentos de los cuales han recibido mayor atención los

antibióticos y hormonas. Estos cuentan con estudios que relacionan la presencia de estos compuestos en diferentes cuerpos de agua por la contaminación de aguas residuales provenientes de granjas (Bartelt-Hunt *et al.* 2011; Hutchins *et al.* 2007; Kaczala y Blum, 2016). No obstante otros grupos de fármacos como los analgésicos que son de uso recurrente también pueden estar presentes en el ambiente de la misma manera.

4.3. ANALGÉSICOS USADOS EN LA PORCICULTURA

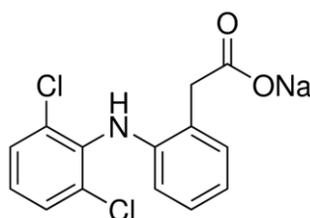
Los analgésicos son medicamentos ampliamente usados a diario con diferentes propósitos, el uso veterinario para la porcicultura es uno de ellos. El uso de antiinflamatorios es recurrente en este medio, en general su uso va dirigido a atender trastornos del aparato locomotor como la cojera. Son auxiliares en el tratamiento de la septicemia, alivian la inflamación y dolor por mastitis, metritis y agalaxia, ayudan a tratar la fiebre, son requeridos como tratamiento posterior a intervenciones quirúrgicas en cerdos como la castración a temprana edad, entre otros (Gama porcino, 2014).

Además, se han observado otros beneficios con el uso de antiinflamatorios, específicamente en la mejora de la productividad animal con la ganancia de peso mediante el manejo adecuado del dolor durante intervenciones (Gutiérrez *et al.* 2017). Por mencionar un ejemplo el meloxicam oral administrado durante el parto tiene efectos en la transferencia de Inmunoglobulina G a los lechones y mejora la ganancia de peso al destete (Mainau *et al.* 2016).

De esta manera el uso frecuente de estos fármacos en la porcicultura tiene ciertos beneficios tanto para la salud y el manejo de los animales. En Yucatán los principales analgésicos usados en cerdos son butorfanol, buprenorfina, xilazina, medetodimina, fenilbutazona, flunixin, ketoprofen, carprofen, aspirina, meloxicam, piroxicam, dexametasona, flumetasona, diclofenaco y paracetamol (Gutiérrez *et al.* 2017).

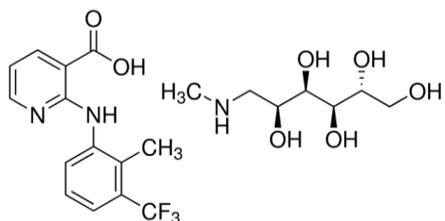
Diclofenaco.- es uno de los analgésicos más recurrentes por su amplio uso en la medicina humana y veterinaria para el tratamiento del dolor e inflamación. Es un compuesto que en los organismos presenta un metabolismo hepático con un 50-60 % de biodisponibilidad. Se fija a proteínas séricas (albuminas). La biotransformación de este compuesto es por glucuronidación e hidroxilación simple y múltiple. Como resultado de su degradación se producen metabolitos fenólicos. La expulsión del diclofenaco del cuerpo se realiza en mayor porcentaje por la orina y otra parte en la bilis de las heces (Santibáñez-Villegas, 2014). Se han hecho estudios en los que se demuestra su propiedad antibacterial tanto para gram positivas como negativas. Y demuestra sinergismo con antibióticos. Tiene un pronunciado efecto antibacterial contra *Enterococcus faecalis*, pero menor a los antibióticos (como amoxicilina y gentamicina) (Salem-Milani *et al.* 2013).

Formula: $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$



Flunixin.- Flunixin meglumine es un inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa. Se utiliza como formulación inyectable y pasta oral, la administración de flunixin meglumina en la práctica en animales pequeños ha disminuido como resultado de la amplia disponibilidad de anti inflamatorios no esteroideos selectivos para ciclooxigenasa-2, que tienen menos efectos secundarios gastrointestinales. Flunixin meglumine todavía se usa ampliamente para reducir la inflamación ocular y es un eficaz antiinflamatorio y antipirético. Flunixin meglumine es metabolizado por el hígado y excretado en las heces (Peterson y Kutzler, 2010).

Formula: $C_{14}H_{11}F_3N_2O_2 \cdot C_7H_{17}NO_5$



4.4. EFECTOS NOCIVOS EN EL MEDIO AMBIENTE

Debido a que los compuestos de los fármacos tienen un efecto en los organismos vivos, es de vital importancia considerar esto en el estudio de los efectos adversos en el medio ambiente (Berninger *et al.* 2011). A pesar de que se conoce que estas sustancias están presentes en diversos sistemas acuáticos, aun se carece de suficiente información en relación a la cantidad de compuestos y sus efectos en la salud de humanos y del ecosistema (Dong *et al.* 2013; Sui *et al.* 2015). Sin embargo se ha comprobado la presencia de algunos fármacos en el ambiente con concentraciones altas capaces de generar alteraciones en ecosistemas acuáticos (Jean *et al.* 2012).

Se conoce que los fármacos pueden tener efectos como trastornar los mecanismos de control de los organismos vivos, causando desequilibrios en el metabolismo, control hormonal, transmisión celular y pueden alterar el sistema endocrino (Nikolaou *et al.* 2007). Además, es posible que estos compuestos también afecten procesos clave en poblaciones humanas sensibles, como niños y mujeres embarazadas (Dong, *et al.* 2013). Por otra parte, los fármacos en las aguas también pueden promover efectos como la resistencia antibiótica de organismos patógenos (Fick *et al.* 2009). El desarrollo de organismos en condiciones de exposición a componentes farmacéuticos disueltos puede conllevar a una amenaza potencial para la salud pública.

Para los fármacos se toma en cuenta en la evaluación de riesgo ambiental sus posibles efectos y el nivel de exposición, se considera que los riesgos por la exposición ante los fármacos dependen de los mecanismos de acción y las respuestas inespecíficas ante ellos (Santos *et al.* 2013). Entre otros aspectos, los

efectos de fármacos en organismos no blanco, aún son poco comprendidos o carecen de estudios (Berninger *et al.* 2011). Entre algunos efectos conocidos se puede mencionar que el diclofenaco resulta tóxico para las aves y en comunidades acuáticas modifica la composición de la película biológica (Al-Rajab *et al.* 2010).

4.5. MÉTODOS DE DETECCIÓN

Evaluar el riesgo potencial de las concentraciones de sustancias farmacéuticas en el agua es un tema con gran relevancia. Esto representa todo un reto, ya que en la actualidad la calidad del agua potable no tiene un control adecuado de su regulación estricta y sistemática (Berninger *et al.* 2011), haciendo que exista una variedad en la cantidad de sustancias presentes en ella, que requiere también se hagan cambios en la regulación acorde al estado del arte en los métodos de cuantificación. Por ello para poder monitorear la presencia de fármacos en las aguas superficiales, freáticas y suelo se requieren de procesos avanzados para su determinación, además se debe considerar que las características de algunos de los compuestos complican los métodos de análisis (Yu *et al.* 2012).

Sin embargo, los avances en las técnicas analíticas han permitido tener una buena respuesta de detección de fármacos para el estudio en los sistemas acuáticos (Jean *et al.* 2012). Es así que, procesos de detección como la cromatografía de gases con espectrómetro de masas es ampliamente utilizada para la separación de compuestos volátiles por su exactitud, sensibilidad y reproducibilidad, dado que permite la separación e identificación de mezclas complejas (Talero-Pérez *et al.* 2014). Aunque resulta laborioso, consumen mucho tiempo y puede ser sensible a condiciones de reacción, demuestran una gran efectividad en la detección de algunos fármacos y es frecuentemente empleado para la detección en aguas de consumo humano y aguas residuales (Yu *et al.* 2012). Este método incluso se ha empleado para la detección de productos farmacéuticos en diferentes matrices líquidas como la leche (Azzouz *et al.* 2011), orina y sangre de animales de granja (Azzouz y Ballesteros, 2012).

4.6. MÉTODOS DE TRATAMIENTO

Los procesos de tratamiento de aguas residuales convencionales no logran remover por completo los químicos que conforman a los fármacos, por lo que pueden ser un problema para la calidad del agua de consumo (Pedrouzo *et al.* 2011; Rodayan *et al.* 2016). Entre los métodos de eliminación se han llevado a cabo una variedad de técnicas como el tratamiento con lodos activados, remoción biológica de nutrientes, lagunas de oxidación, entre otros que demuestran efectividad en la remoción de algunos tipos de medicamentos como antimicrobianos, analgésicos, antibióticos, etc. (Sui *et al.* 2015). En los procesos de tratamiento, las diversas condiciones de operación y parámetros pueden influir en la efectividad de remoción de los fármacos (Samaras *et al.* 2013).

La biodegradación aerobia y anaerobia se enlistan como procesos de importancia en la eliminación de fármacos en fase disuelta, siendo un factor determinante el tiempo de retención hidráulico (Nikolaou *et al.* 2007). Entre otras tecnologías avanzadas para remover estos contaminantes del agua se encuentran el uso de carbón activado granular, tecnología de membranas, ozonación y radiación ultravioleta con resultados efectivos para algunos compuestos (Pedrouzo *et al.* 2011).

A pesar de estos avances, los costos de operación y mantenimiento resultan ser una limitante para que estos sistemas sean implementados. Por ello se ha dado una continua búsqueda por tratamientos alternativos que tengan una buena eficiencia en la remoción de fármacos y el costo en relación sea razonable (Dordio *et al.* 2010). En zonas con capacidades financieras más limitadas se buscan estas alternativas viables con menor costo. En razón a esto los humedales construidos han tenido mayor atención como método de tratamiento de aguas residuales por sus bajos costos de operación, mantenimiento, ahorro de energía, y por tener una buena capacidad de remoción de contaminantes (Solís-Silván *et al.* 2016, Conkle *et al.* 2008).

4.7. HUMEDALES CONSTRUIDOS COMO TRATAMIENTO

Los humedales construidos son sistemas diseñados de tal manera que imitan los procesos que ocurren en los humedales naturales. Se trata de aprovechar la relación de interacción entre el suelo, vegetación y microorganismos para remover contaminantes (Solís-Silván *et al.* 2016). En estos sistemas acontecen varios procesos fisicoquímicos y biológicos como la sorción, sedimentación, fotólisis, hidrólisis, volatilización, translocación y acumulación en las plantas, y degradación microbiana (Fernandes *et al.* 2015). La aplicación de este sistema se da como un tratamiento secundario o terciario para dar una mejor calidad al agua residual tratada previamente (Dordio *et al.* 2010).

Son diversos los trabajos en los que se han reportado el uso de humedales construidos en la remoción de compuestos contaminantes. En ellos se ha demostrado que el tratamiento con humedales es efectivo en la remoción de la concentración de la carga orgánica, nutrientes, organismos patógenos, microcontaminantes y fármacos (Conkle *et al.* 2008). Estos estudios se han enfocado principalmente en el tratamiento de aguas residuales domésticas, aunque recientemente se han hecho estudios sobre la remoción de fármacos en aguas residuales en la industria ganadera (Fernandes *et al.* 2015).

La efectividad de remoción de fármacos en humedales construidos depende de los componentes del sistema, siendo el material de soporte y el tipo de plantas (emergentes, flotantes o sumergidos) seleccionado, los caracteres que varían en la eficiencia del sistema, así como el tipo de flujo del agua, que puede ser flujo libre o subsuperficial (Dordio *et al.* 2010, Solís-Silván *et al.* 2016).

5. MÉTODODOLOGÍA

5.1. CONSTRUCCIÓN DE HUMEDALES.

Se emplearon humedales a escala que se construyeron con cajas de plástico de 60 litros a los que se colocaron llaves de desagüe con tubos de PVC perforados a nivel del fondo de la caja. Se acondicionaron cajas con diferente material de soporte: grava, arena y mezcla de grava con arena para cada especie de planta y control. En total se implementaron nueve humedales y se emplearon las especies de plantas *Typha latifolia* y *Cyperus papyrus* (Figura 1).

El agua residual fue obtenida de una granja de cerdos de la comisaria Sierra Papacal, Yucatán, de la cual se tiene conocimiento del uso regular de analgésicos y cuenta con datos de análisis previos de la presencia de otros fármacos (antibióticos) en el efluente. El lugar cuenta con un sistema de tratamiento a base de biodigestor anaerobio del cual se tomó la muestra (en el efluente) en contenedores de 20 L, los que posteriormente fueron almacenados en cuarto frío a 4°C para conservar la muestra.

Las muestras de aguas residuales porcícolas (ARP) obtenidas se emplearon para la adaptación del sistema de humedales. Esto se inició con un riego solo con agua de grifo y posteriormente con diluciones de ARP al 10 %, 15 %, y 20 % haciendo este incremento cada mes y manteniendo la última concentración en los siguientes meses de riego. Posteriormente se aumentó la concentración a 25 % dos semanas antes de la realización de las pruebas objeto de la investigación, manteniendo esta última concentración para la etapa experimental. El nivel del agua en los humedales se mantuvo levemente por debajo del nivel del material de soporte. Debido a la evaporación se procuró realizar riegos de tres a cuatro veces por semana para mantener el nivel del agua.



Figura 1. Esquema de la metodología de construcción de humedales, extracción y análisis por CG-EM de analgésicos veterinarios.

5.2. SELECCIÓN DE ANALGÉSICOS-ANTIINFLAMATORIOS.

Para determinar los fármacos objeto de estudio se realizaron visitas a granjas con un historial previo de uso de fármacos. En estos se realizó una encuesta sobre los diferentes analgésicos y antiinflamatorios que emplean actualmente, sus aplicaciones, métodos de administración (oral, intramuscular, etc.), frecuencia de usos entre otros. A partir de los resultados de las encuestas se consideraron los factores de viabilidad de análisis (equipo de laboratorio, reactivos, costos, etc.) para seleccionar los fármacos que se emplearon en este estudio.

5.3. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

5.3.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN

Estándares farmacéuticos

Para los fármacos se realizaron soluciones estándar de 300 ppm (solución madre) preparadas en metanol y almacenados en la oscuridad a 4 °C. Los solventes empleados en este estudio fueron de grado HPLC, los reactivos de derivatización (N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida + 1% trimetilclorosilano) y los estándares de referencia (Meglumine de flunixin y sal de diclofenaco de sodio) fueron obtenidos de Sigma Aldrich. Los fármacos veterinarios de venta libre se obtuvieron en comercios agropecuarios locales.

Para las pruebas de detección se realizaron soluciones diarias con concentraciones de 20, 50, 75, 100, 200 ppb y 5 ppm en metanol para cada estándar farmacéutico, y se incluyó un control de metanol sin fármacos. Se realizó el proceso de derivatización y cuantificación en CG-EM para realizar la curva de calibración (sección 5.5).

Se siguieron parámetros de validación para dar certeza al análisis, para ello obtener la linealidad entre la proporcionalidad de las seis concentraciones analizadas de cada fármaco y su respuesta en el equipo para obtener la recta de calibración mediante el método de mínimos cuadrados. Con los datos obtenidos se calculó también el límite de detección el cual define la cantidad mínima en la que puede ser detectado el analito. Así mismo se calculó el límite de cuantificación para determinar la mínima concentración del analito que puede ser cuantificada con exactitud y precisión. La precisión se obtuvo mediante la concordancia entre los resultados de la repetición de los diferentes niveles de concentración de cada fármaco en días diferentes.

Ecuación:

Límite de detección y cuantificación:

$$\frac{LD}{LC} = \frac{K * S_b}{m}$$

K: factor k con valor de 3 para el límite de detección y de 10 para el límite de cuantificación.

S_b : Desviación estándar de la ordenada de origen

m: Pendiente de la curva de calibración

5.3.2 PORCENTAJES DE RECOBRO DE ANALGÉSICOS EN AGUA RESIDUAL PORCÍCOLA.

Agua residual fortificada

Este proceso se efectuó con alícuotas de agua residual porcícola (150 mL) fortificada con concentraciones intermedias de la curva de calibración realizada con los estándares (50, 75 y 100 ppb) utilizando fármacos veterinarios, y se incluyó una muestra de agua no fortificada con fármacos. Para cada concentración se realizaron cuatro replicas. Las muestras fueron tratadas con los procesos de pretratamiento, derivatización, extracción y detección en CG-EM que se describen en la sección 5.5.

5.4 CONTAMINACIÓN DE HUMEDALES Y TOMA DE MUESTRAS DE AGUA

Una solución de agua residual porcícola al 25 % fue contaminada con una concentración de 5 ppm de los fármacos flunixin y diclofenaco. El agua en el humedal fue drenada completamente para añadir la solución contaminada en el tiempo cero. La toma de muestras se realizó en el efluente a las 72 horas de la

contaminación. Se tomaron alícuotas de 500 mL de cada humedal, las cuales fueron colectadas en botellas de plástico limpias (lavado cromatográfico) y resguardadas en obscuridad a 4 °C. La contaminación y toma de muestra se realizaron por triplicado.

5.5 DETECCIÓN DE FLUNIXIN Y DICLOFENACO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG-EM)

La detección se efectuó con un sistema CG-EM y la extracción con un equipo de extracción en fase sólida. Los instrumentos usados consisten en un equipo cromatógrafo de gases Trace GC Ultra marca Thermo Scientific equipado con un inyector de temperatura programada PTV. Este tiene acoplado un detector selectivo de masas Agilent ITQ 900. Se empleó helio BIP como gas de acarreo (99.99% pureza) y una columna capilar ZB-5 (30 m X 0.25 mm ID X 0.25 µm FT).

Las muestras obtenidas del efluente fueron tratadas con los pasos de pretratamiento, extracción en fase sólida, derivatización y análisis CG-EM que se describen a continuación.

Pretratamiento

Se removieron los sólidos suspendidos de las muestras con un filtro Millex de poro medio y se ajustó a pH 3 con ácido ascórbico 10 mM y ácido clorhídrico 1 M.

Extracción en fase solida

Las columnas de extracción C18 IST Isolute-96 se activaron haciendo pasar dos volúmenes (6 mL) de columna de hexano y dos de metanol por gravedad. Para la etapa de retención se hizo pasar la muestra pre tratada por la columna de extracción mediante un goteo lento y constante con un vacío de hasta 3 pulgadas de mercurio. En el lavado se emplearon tres volúmenes de la columna con solución de ácido ascórbico y tres de agua destilada hasta su desecamiento. En la etapa de elución se usaron 2 volúmenes de 5 mL de metanol que fueron recuperados en tubos de vidrio de 50 ml.

Derivatización

Se añadió una mezcla con 100 µL de N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida + 1% trimetilclorosilano (agente de derivación) a una alícuota (1 mL) del extracto de la muestra en viales ámbar. El vial fue sellado herméticamente y los analitos se derivatizaron mediante termo baño a 70 °C por 30 min.

Análisis CG-EM

El cromatógrafo de gases se programó con una temperatura de inyector a 250 °C en modo splitless (1 min). El programa de temperatura utilizado fue de 70 °C iniciales durante 2 min, incrementando la temperatura a 10 °C/min hasta 300 °C y manteniéndola constante durante 5 min. El flujo del helio se mantuvo en 1 ml/min.

El detector de masas se programó con una temperatura de línea de transferencia a 270°C y los análisis se realizaron por impacto electrónico (70 eV). Se utilizó el modo de barrido total del espectro (Full-SCAN) de 50 a 550 m/z a 1.5 scan.s-1.

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó a través del programa STATGRAPHICS Centurión XV.II, utilizando para el análisis de varianza (ANOVA). Esto fue aplicado a los resultados de remoción para tratamiento y determinar que parámetros tuvieron una diferencia significativa para remover cada fármaco en el efluente de los humedales.

6. Resultados

6.1 ENCUESTA DE ANALGÉSICOS

Los analgésicos dipirona, flunixin, piroxicam, diclofenaco y dexametasona fueron las sustancias más identificadas en las granjas encuestadas. Respectivamente y en orden descendente sus porcentajes de uso fueron 36.8, 23.6, 21, 10.5 y 5.2 % (Figura 2). Los fármacos diclofenaco y flunixin fueron seleccionados debido a que para ambos se puede emplear el mismo compuesto derivatizante y existen métodos de detección por cromatografía de gases en matrices acuosas (Azzou y Ballesteros, 2012; Dowling *et al.* 2008). Además comparten características similares como peso molecular (318.13 y 296.24 g/mol) y punto de fusión (275-277 y 226-228 °C) respectivamente para diclofenaco y flunixin. Por otra parte dipirona y piroxicam fueron descartados ya que presentan problemas en la detección por cromatografías de gases y HPLC, por lo que requieren de otros métodos de detección como la cromatografía de capa fina (TLC) (Isaacs *et al.* 20017; Crecelius *et al.* 2004). Las pruebas con dexametasona obtuvieron resultados poco favorables en la derivatización por lo que se descartó de este estudio.

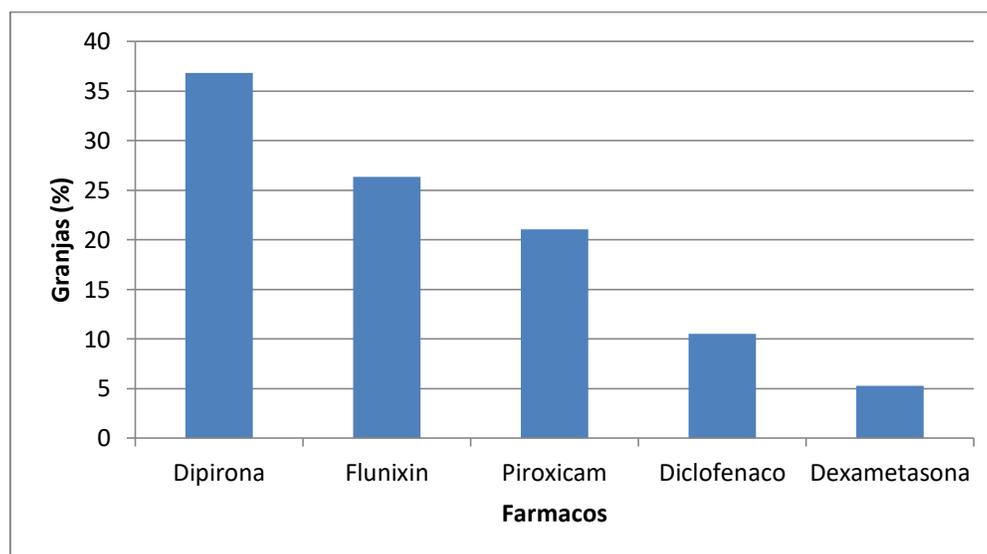


Figura 2. Uso de los principales analgésicos – antiinflamatorios en granjas porcícolas encuestadas.

6.2 CURVAS DE CALIBRACIÓN DE ESTÁNDARES FARMACÉUTICOS

En las Figuras 3 y 4 se representan las curvas de calibración obtenidas para el estándar de diclofenaco y flunixin respectivamente. En estas se aprecia una correlación positiva entre la concentración analizada y el área determinada por CG-EM. Con esto se corrobora que el método de derivatización empleado permite la detección de los fármacos seleccionados por cromatografía de gases.

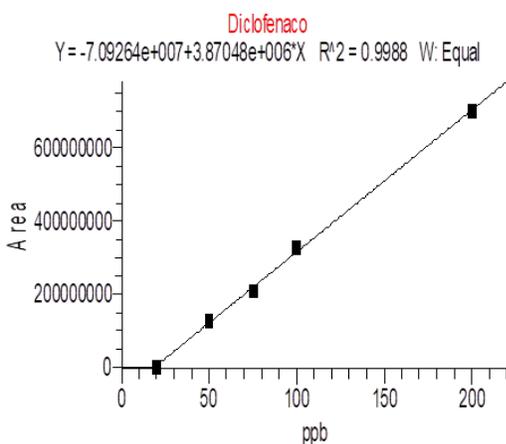


Figura 3. Curva de calibración de estándar de diclofenaco por CG-EM.

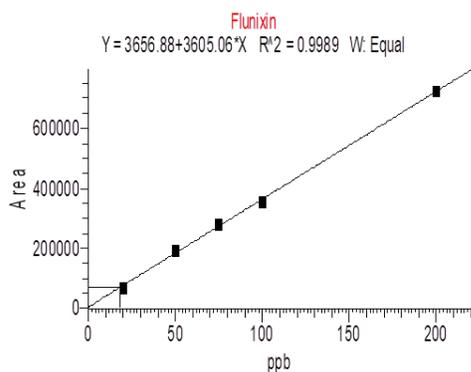


Figura 4. Curva de calibración de estándar de flunixin por CG-EM.

Se estimó el límite de detección para cada fármaco obteniendo un resultado de 6.45 ppb ($\mu\text{g/L}$) y 6.19 ppb para el diclofenaco y flunixin respectivamente. El límite de cuantificación fue de 21.52 ppb para el diclofenaco y 20.65 ppb para el flunixin. Para los parámetros de límite de detección el valor obtenido fue menor al rango menor de

concentraciones empleado para la cuantificación de los fármacos en la curva de calibración, mientras que el límite de cuantificación obtuvo valores muy cercanos a lo 20ppb empleados en la curva. Por lo tanto el intervalo de trabajo fue adecuado para fue adecuado para el presente estudio.

6.3 PORCENTAJES DE RECOBRO DE FLUNIXIN Y DICLOFENACO

En total se realizaron cuatro pruebas de recobro para cada fármaco, en las Tablas 1 y 2 se indican los porcentajes de recobro de flunixin y diclofenaco obtenidos en cada prueba así como su promedio.

Tabla 1. Porcentajes de recobro de diclofenaco.

Prueba 1		Prueba 2	
DCF-100ppb-BTV	73.43	DCF-100ppb-BTV - 2	83.85
DCF-75ppb-BTV	75.26	DCF-75ppb-BTV - 2	86.55
DCF-50ppb-BTV	65.60	DCF-50ppb-BTV - 2	68.99
Prueba 3		Prueba 4	
DCF-100ppb-BTV - 3	73.61	DCF-100ppb-BTV - 4	85.03
DCF-75ppb-BTV - 3	80.42	DCF-75ppb-BTV -4	78.49
DCF-50ppb-BTV - 3	73.38	DCF-50ppb-BTV - 4	76.08
			Desv, Est.
Concentración	Promedio		
DCF-100ppb	78.98		6.32
DCF-75ppb	80.18		4.75
DCF-50ppb	71.01		4.64

Tabla 2. Porcentajes de recobro de flunixin.

Prueba 1		Prueba 2	
FLX-100ppb-BTV	66.93	FLX-100ppb-BTV - 2	58.14
FLX-75ppb-BTV	72.14	FLX-75ppb-BTV - 2	72.24
FLX-50ppb-BTV	70.07	FLX-50ppb-BTV - 2	61.52
Prueba 3		Prueba 4	
FLX-100ppb-BTV - 3	65.15	FLX-100ppb-BTV - 4	66.32
FLX-75ppb-BTV - 3	79.85	FLX-75ppb-BTV -4	74.13
FLX-50ppb-BTV - 3	71.24	FLX-50ppb-BTV - 4	66.43
			Desv. Est.
Concentración	Promedio		
FLX-100ppb	64.13		4.06
FLX-75ppb	74.59		3.62
FLX-50ppb	67.31		4.37

6.4 REMOCIÓN DE FLUNIXIN Y DICLOFENACO EN EL EFLUENTE DE LOS HUMEDALES CONSTRUIDOS.

En total se analizaron 27 muestras de tres réplicas de contaminación a 5 ppm de cada fármaco cada 72 horas (Anexo I). Con ello se obtuvo que la remoción de diclofenaco presentó valores de remoción promedio de 95.45 a 97.63 % con los tratamientos sin plantas, 96.15 a 97.98 % con *C. papyrus*, y 97.30 a 98.44 % con *T. latifolia*, siendo esta última cifra el valor de mayor remoción para el diclofenaco con el factor planta (Figura 5). En cuanto al material de soporte los porcentajes promedio de remoción más altos fueron para el grupo de las mezclas de arena-grava (97.63 a 98.44 %). El grupo con arena como soporte obtuvo remociones de 95.86 a 97.55%, y las gravas de 95.45 a 97.30 %. Considerando la configuración del tratamiento planta-soporte, se obtuvo que el conjunto de las mezclas fue el que alcanzó el mayor porcentaje de remoción de diclofenaco (97.63 a 98.44 %), y la combinación más eficiente fue con *T. latifolia*. Por otro lado las otras configuraciones no formaron algún grupo según el arreglo de los factores y presentaron remociones de 95.45 a 97.55 % (Figura 5).

El análisis de varianza para el porcentaje de remoción de diclofenaco indica que los factores planta y soporte por separado tienen un efecto significativo en la remoción de este compuesto ($P < 0.05$, anexo II; Figura 6 y 7), por el contrario el factor tiempo de cada réplica no fue significativo ($P > 0.05$, anexo II; Figura 8). Conjuntamente la interacción planta-soporte reveló tener un efecto significativo para la remoción del diclofenaco ($P < 0.05$, anexo II; Figura 9).

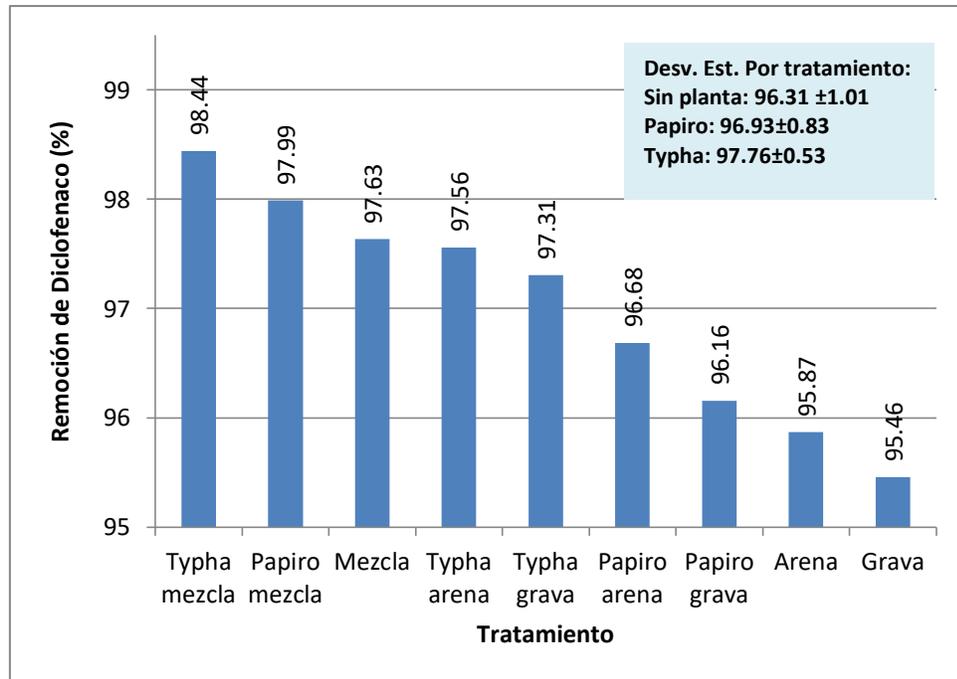


Figura 5. Porcentaje de remoción promedio de diclofenaco por tratamiento.

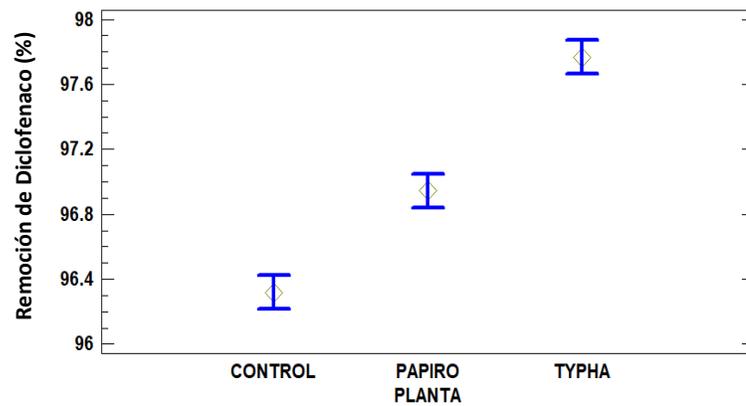


Figura 6. Gráfico de medias del efecto del tipo de planta en la remoción de diclofenaco.

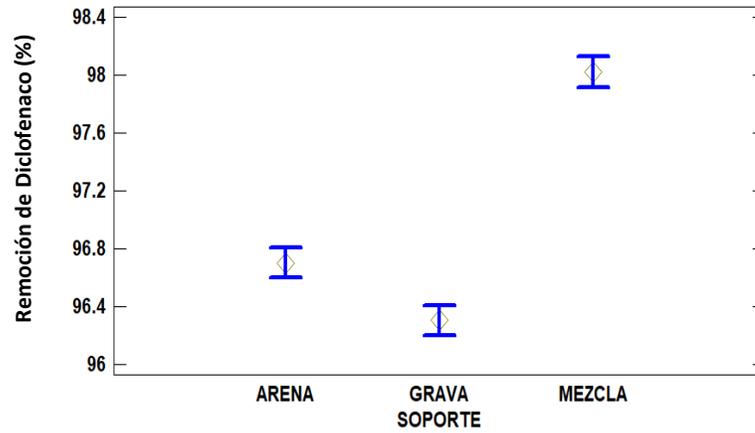


Figura 7. Gráfico de medias del efecto del soporte en la remoción de diclofenaco.

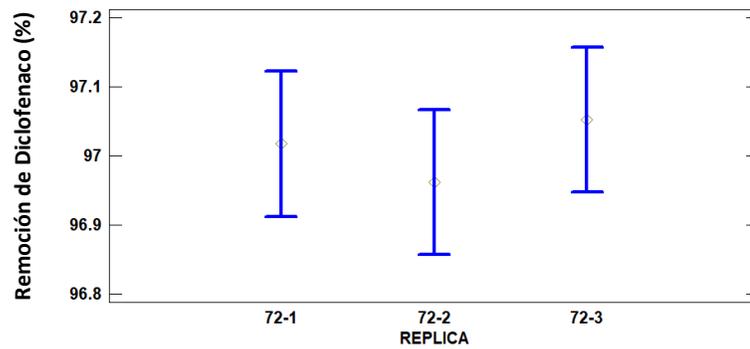


Figura 8. Gráfico de medias del efecto de las réplicas en la remoción de diclofenaco.

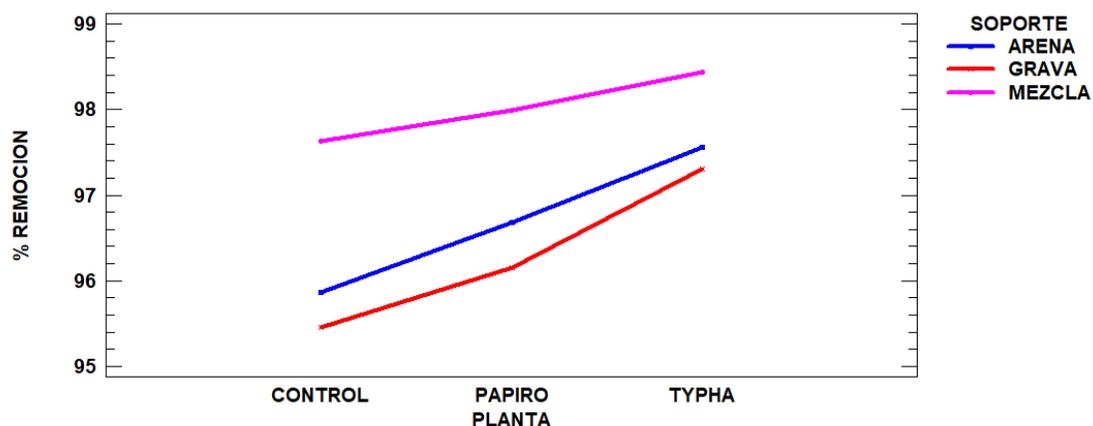


Figura 9. Gráfico de interacciones del efecto del soporte y tipo de planta en la remoción de diclofenaco.

Tabla 3. Tabla de medias por mínimos cuadrados para el porcentaje de remoción de diclofenaco.

			Error	Límite	Límite
Nivel	Casos	Media	Estandar	Inferior	Superior
MEDIA GLOBAL	27	97.0104			
REPLICA					
72-1	9	97.0173	0.0642218	96.8692	97.1654
72-2	9	96.9618	0.0642218	96.8137	97.1099
72-3	9	97.0522	0.0642218	96.9041	97.2003
PLANTA					
CONTROL	9	96.319	0.0642218	96.1709	96.4671
PAPIRO	9	96.9438	0.0642218	96.7957	97.0919
TYPHA	9	97.7686	0.0642218	97.6205	97.9167
SOPORTE					
ARENA	9	96.7038	0.0642218	96.5557	96.8519
GRAVA	9	96.3064	0.0642218	96.1583	96.4545
MEZCLA	9	98.0211	0.0642218	97.873	98.1692

Para el caso de flunixin los promedios de los porcentajes de remoción fueron 96.64 a 97.65% sin plantas, 97.32 a 98.23 % con *C. papyrus*, y 97.87 a 98.51 % con *T. latifolia* (Figura 6). Para el material de soporte el porcentaje promedio de remoción más alto fue de 98.51% para el tratamiento con mezclas y la menor de 97.65 %. El

grupo con arena obtuvo remociones de 96.95 a 98.09 %, y las gravas de 96.64 a 97.87 %. La configuración planta-soporte demostró que la combinación más eficiente fue con *T. latifolia* y mezcla de arena-grava, y la menos eficiente del sistema fue el tratamiento solo con grava (Figura 10).

El análisis de varianza para el porcentaje de remoción de flunixin revela que solo los factores planta y soporte por separado tienen un efecto significativo en la remoción de este compuesto ($P < 0.05$, anexo II; Figura 11 y 12). No obstante las interacciones entre los diferentes factores no exhiben valores que indiquen que tienen un efecto significativo para la remoción del flunixin ($P > 0.05$, anexo II; Figura 13).

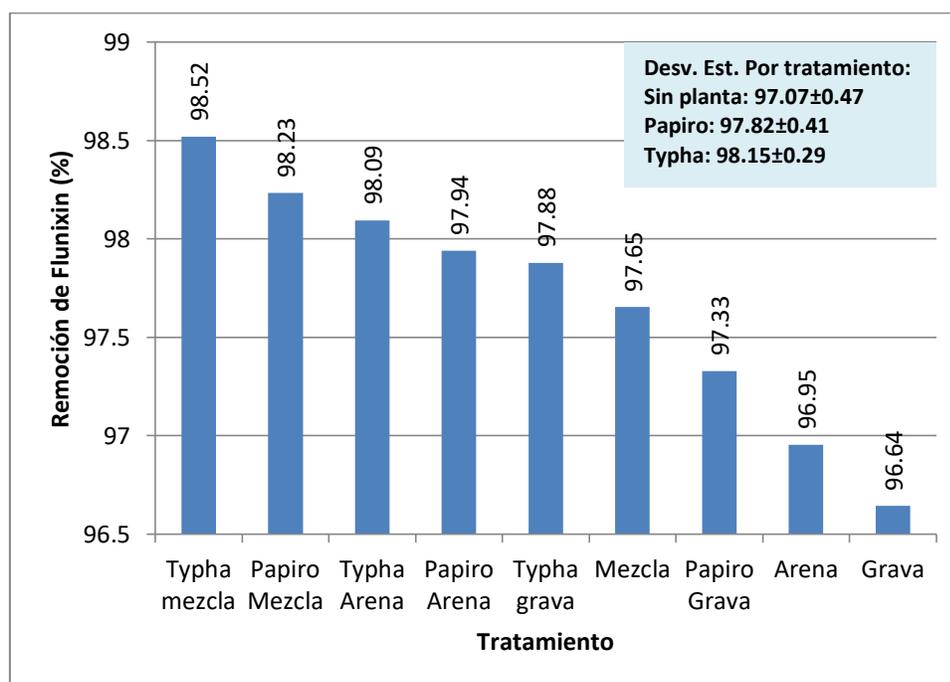


Figura 10. Porcentaje de remoción promedio de flunixin por tratamiento.

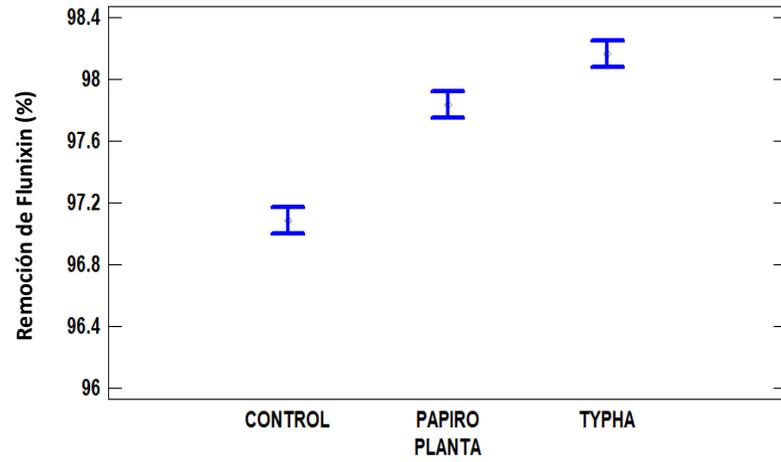


Figura 11. Gráfico de medias del efecto del soporte en la remoción de flunixin.

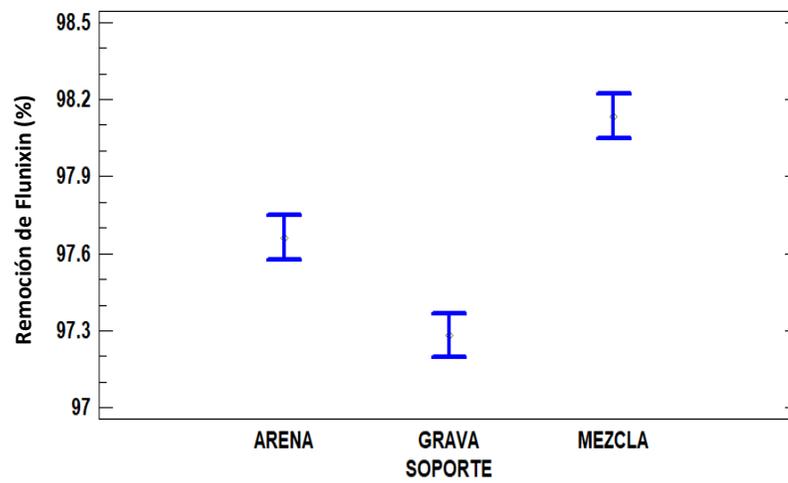


Figura 12. Gráfico de medias del efecto del soporte en la remoción de flunixin.

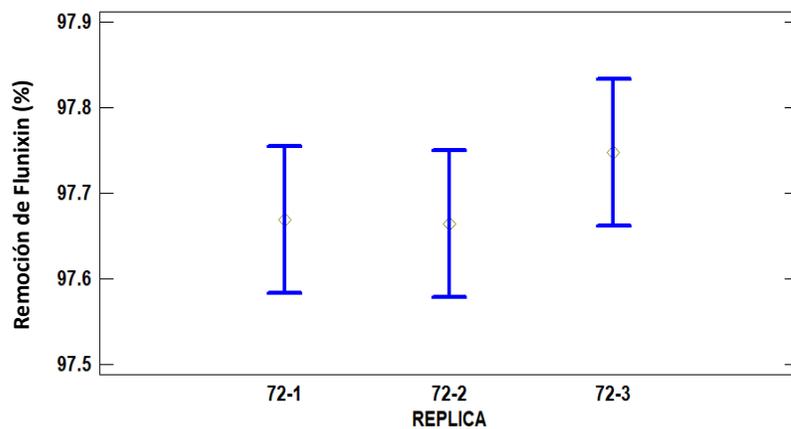


Figura 13. Gráfico de medias del efecto del soporte en la remoción de flunixin.

Tabla 4. Tabla de medias por mínimos cuadrados para el porcentaje de remoción de flunixin.

			Error	Límite	Límite
Nivel	Casos	Media	Estandar	Inferior	Superior
MEDIA GLOBAL	27	97.0104			
REPLICA					
72-1	9	97.0173	0.0642218	96.8692	97.1654
72-2	9	96.9618	0.0642218	96.8137	97.1099
72-3	9	97.0522	0.0642218	96.9041	97.2003
PLANTA					
CONTROL	9	96.319	0.0642218	96.1709	96.4671
PAPIRO	9	96.9438	0.0642218	96.7957	97.0919
TYPHA	9	97.7686	0.0642218	97.6205	97.9167
SOPORTE					
ARENA	9	96.7038	0.0642218	96.5557	96.8519
GRAVA	9	96.3064	0.0642218	96.1583	96.4545
MEZCLA	9	98.0211	0.0642218	97.873	98.1692

7. Discusión

Los resultados de porcentaje de recobro obtuvieron valores (diclofenaco 71-80.1 %, flunixin 64.1-74.5 %) cercanos a los reportados por González *et al.* (1996) quienes emplearon como matriz la orina de equinos, y obtuvieron un 79.6 % promedio para flunixin y 75.4 % promedio para diclofenaco.

En otros estudios realizados en aguas residuales Koutsouba *et al.* (2003) reportan un 76 % \pm 9 de recobro para el diclofenaco, mientras que Miao *et al.* (2002) indica un 62.8 %. Azzou y Ballesteros (2012) obtuvieron porcentajes de recobro mayores (85-102%) para flunixin y diclofenaco con CG-EM en orina y sangre. Caso similar al de Azzou *et al.* (2011) quienes obtuvieron 91-104 % de recobro para ambos fármacos. Las diferencias en los resultados se pueden deber a la divergencia de matrices y técnicas empleadas, como el tratamiento previo y condiciones de análisis de cromatografía de gases. Los métodos de cromatografía líquida empleados en otros estudios de analgésicos en agua también muestran diferencias con respecto a este estudio, tal como Marchese *et al.* (2003) quienes usaron cromatografía líquida con ionización electro-spray y espectrometría de masas tándem. Con ella obtuvieron porcentajes de recobro de 97-98 % para el diclofenaco en agua de consumo y agua superficial. Por otra parte la validación del método analizando agua residual porcícola no fortificada es similar a la propuesta de Azzou y Ballesteros (2012) quienes validaron su método tomando como referencia muestras no contaminadas de la matriz de estudio para obtener los porcentajes de recobro.

En este trabajo la remoción de diclofenaco fue alta (95.45-98.44 %) en comparación con estudios como el de Zhang *et al.* (2011) quienes obtuvieron rangos de remoción bajos de 41.1 a 55.4 %. En trabajos como el de Matamoros *et al.* (2008) se registraron valores (73 a 96 %) más cercanos a los obtenidos en el presente estudio. Estas diferencias pueden deberse a las características de configuración de los humedales empleados por los autores, por ejemplo en el primer caso se usó únicamente grava de 4-10mm como soporte, la planta *Typha angustifolia* y como matriz de análisis un agua residual artificial. Además se podrían considerar

características como las dimensiones, el diseño de humedales y factores como el clima.

En cuanto al flunixin, éste es un fármaco de uso veterinario empleado principalmente en especies grandes, por lo que en comparación con el diclofenaco que es uno de los fármacos más ampliamente distribuido como contaminante emergente en el agua, los estudios referentes al flunixin son mucho menores en número, y no es tan frecuentemente investigado en humedales construidos. Los trabajos que incluyen la detección de flunixin en aguas residuales es menor debido a que la mayoría de los estudios se realizan con matrices de agua urbana o industrial en los cuales se hace mayor énfasis en la detección de otros fármacos más usados como los antibióticos y en el caso de los analgésicos como ibuprofeno y naproxeno (Li *et al.* 2014; Sui *et al.* 2015). Trabajos en los que se incluye flunixin como objeto de estudio, se centran en aguas residuales urbanas que tienen influencia del drenaje de granjas, como en el trabajo de Matamoros *et al.* (2008).

El porcentaje de remoción registrado para flunixin fue de 96.64 a 98.51 %, esto es superior a los valores registrados en otros estudios con rangos de remoción de 61-67 % (Matamoros *et al.*, 2008). Sin embargo las características de diseño de los humedales en el trabajo citado (humedal de flujo superficial a escala completa, matrices de agua de una planta de tratamiento, plantas *Typha* y *Phragmites*) difieren con los de este estudio, por lo que la eficiencia remoción podría tener estas variaciones según la configuración del sistema.

La determinación de los factores que intervienen en la remoción de los fármacos indico que el tiempo de 72 horas no tiene efecto significativo entre replicas en la remoción de diclofenaco y flunixin por medio del análisis de varianza. Se considera que un análisis con diferentes tiempos de retención hidráulica podría mejorar la representatividad del tiempo en estos resultados. Debido a que en trabajos como el de Zhang *et al.* (2011) no se obtuvieron diferencias significativas en la remoción de diclofenaco con tiempos de 2 y 4 días, sería recomendable extender el periodo de evaluación.

La planta *T. latifolia* fue la que presentó la mayor remoción de diclofenaco y flunixin en este estudio. Las especies de este género han demostrado tener una gran tolerancia a los contaminantes y una buena capacidad para removerlos, además de que son de las plantas más empleadas en el tratamiento de aguas mediante humedales construidos (Bartha *et al.* 2014). Tomando en cuenta que la remoción más baja de ambos analgésicos se presentó en el tratamiento con ausencia de plantas, se deduce que la presencia de la vegetación puede jugar un rol importante en la remoción de estos compuestos. Tal como indican los estadísticos, este factor fue significativo para el porcentaje de remoción. Estos resultados son similares a los reportados en otros estudios en los cuales la eficiencia de remoción del diclofenaco fue menor en los soportes sin plantas en comparación con los soportes plantados (Zhang *et al.* 2011).

Por otra parte las rizodeposiciones de sustancias orgánicas (azúcares, aminoácidos, vitaminas, células muertas, etc.) de las plantas puede beneficiar el crecimiento y actividad de las poblaciones de bacterias rizosféricas que a su vez afectan a la salud de la planta influenciando la calidad y cantidad de rizodeposiciones (Brimecombe *et al.* 2007). Por tanto existe un efecto simultáneo en el desarrollo de las poblaciones microbianas y el mejoramiento en su actividad por acción de las plantas. En estudios se ha observado un mayor número de poblaciones en la rizosfera que en soporte (Dordio y Carvalho 2013). Esta zona de interacciones entre la estructura de las raíces y comunidades microbianas puede ser un factor determinante en la remoción del diclofenaco y flunixin. Se ha demostrado que esta zona puede tener la capacidad para degradar, remover, inmovilizar y/o transformar un gran número de contaminantes, entre ellos los compuestos farmacéuticos (Weber 2016).

Por otra parte las condiciones tropicales como la temperatura cálida pueden tener un efecto positivo en la degradación de algunos fármacos, ya que puede mejorar el rendimiento de los microorganismos y aumento en la evapotranspiración en los humedales (Hljosa-Valsero *et al.* 2010; Li *et al.* 2014). Este último está asociado con el consumo activo de algunos compuestos por las plantas, ya que la

evapotranspiración es una vía de consumo de contaminantes (Hijosa-Valsero *et al.* 2010). Por lo que las temperaturas altas y la radiación solar intensa presentes en el área de estudio podrían haber mejorado la actividad de las plantas y microorganismos en los humedales, así como el incremento en la evapotranspiración y por consiguiente la mejora en la remoción de diclofenaco y flunixin. Esto es similar al trabajo de Dordio *et al.* (2010), quienes compararon las temporadas verano e invierno, obteniendo que la mayor temperatura durante el verano aumento las tasas transpiración lo cual incremento el consumo de compuestos y obtuvo mayores eficiencias de remoción de los fármacos que evaluaron.

En cuanto al material de soporte, este demostró ser un factor estadísticamente significativo para remoción del diclofenaco y flunixin. La combinación de arena y grava parece mejorar estas características de retención de estos analgésicos, ya que este arreglo presentó las mejores remociones, considerando únicamente el soporte. Debido a la naturaleza hidrofóbica del diclofenaco es probable que la sorción en la materia orgánica del soporte sea un mecanismo de importancia para su retención (Zhang *et al.* 2011). Se sabe que para compuestos que son difícilmente biodegradados el soporte del humedal juega un papel importante en los fenómenos de sorción (Dordio y Carvalho 2013). Por lo que los materiales pueden afectar significativamente la eficiencia del sistema acorde a sus características como granulometría, composición mineral, propiedades hidráulicas, etc. (Dordio y Carvalho 2013). Una matriz porosa como los materiales empleados en el presente trabajo (porosidad de efectiva de 16% que se considera como media) pueden proveer una superficie para el tratamiento por contacto y para el desarrollo de la biopelícula, los cuales aumentan a mayor porosidad (Calheiros *et al.* 2009).

Las interacciones entre planta y soporte fueron significativas para la remoción de diclofenaco, pero no para el flunixin. Las características mencionadas anteriormente para cada uno de estos dos factores están fuertemente relacionadas con los beneficios que estos aportan para la proliferación de los consorcios bacterianos en el material de soporte (biopelícula) y en la rizosfera (rizobacterias). Por lo cual se deduce que la actividad microbiana juega un papel importante en la remoción de

diclofenaco y flunixin. Es recomendable realizar análisis microbiológicos para determinar los consorcios partícipes y la frecuencia de su actividad en la remoción de estos contaminantes emergentes.

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos apreciar que los humedales construidos ofrecieron buenas eficiencias de remoción para el diclofenaco y flunixin. Aunque la configuración y diseño de los humedales puede variar las eficiencias (Hijosa-Valsero *et al.* 2010; Li *et al.* 2014), en general pueden ser una alternativa de bajo costo para la remoción de contaminantes emergentes (Zhang *et al.* 2011).

8. Conclusiones

El desarrollo del método de extracción y cuantificación por CG-EM permitió evaluar el efluente de nueve humedales construidos a escala en laboratorio alimentado con agua porcícola fortificada (diclofenaco y flunixin a 5 ppm) y la identificación de la configuración planta-soporte con mejores eficiencias de remoción.

- Los analgésicos de mayor uso en las granjas porcícola encuestadas son dipirona, flunixin, piroxicam, diclofenaco y dexametasona.
- El método desarrollado permite extracción y la cuantificación por CG-EM de los analgésicos diclofenaco y flunixin de agua porcícolas.
- El tratamiento con mejor eficiencia de remoción de diclofenaco y de flunixin es la combinación *T. latifolia* y mezcla arena-grava.

9. REFERENCIAS

Aubertheau, E., Stalder, T., Mondamert, L., Ploy, M., Dagot, C., Labanowski, J. (2017). Impact of wastewater treatment plant discharge on the contamination of river biofilms by pharmaceuticals and antibiotic resistance. "Science of the Total Environment", 579: 1387-1398.

Al-Rajab, A., Sabourin, L., Lapen, D., Topp, E. (2010). The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac is readily biodegradable in agricultural soils. "Science of the total environment", 409(1): 78-82.

Azzouz, A., Ballesteros, E. (2012). Gas chromatography–mass spectrometry determination of pharmacologically active substances in urine and blood samples by use of a continuous solid-phase extraction system and microwave-assisted derivatization. "Journal of Chromatography B", 89: 12– 19.

Azzouz, A., Jurado-Sánchez, B., Souhail, B., Ballesteros, E. (2011). Simultaneous determination of 20 pharmacologically active substances in cow's milk, goat's milk, and human breast milk by gas chromatography–mass spectrometry. "Journal of agricultural and food chemistry", 59(9): 5125-5132.

Bartelt-Hunt, S., Snow, D., Damon-Powell, T., Miesbach, D. (2011). Occurrence of steroid hormones and antibiotics in shallow groundwater impacted by livestock waste control facilities. "Journal of Contaminant Hydrology", 123(3-4): 94-103.

Bartha, B., Huber, C., Schröder, P. (2014). Uptake and metabolism of diclofenac in Typha latifolia–How plants cope with human pharmaceutical pollution. "Plant Science", 227: 12-20.

Beninger, J.P. Du, B., Connors, K.A., Eytcheson, S.A., Kolkmeier, M.A., Prosser, K.N., Valenti Jr., T.W., Chambliss, C.K., Brooks, B.W. (2011). Effects of the antihistamine diphenhydramine on selected aquatic organism. "Environmental Toxicology and Chemistry", 9 (20): 2065-2072.

Brimecombe, M. J., De Leij, F. A. A. M., Lynch, J. M. (2007). Rhizodeposition and microbial populations. "The rhizosphere biochemistry and organic substances at the soil-plant interface". CRC Press, Boca Raton, Florida, 73-109.

Calheiros, C. S., Duque, A. F., Moura, A., Henriques, I. S., Correia, A., Rangel, A. O., Castro, P. M. (2009). Substrate effect on bacterial communities from constructed wetlands planted with *Typha latifolia* treating industrial wastewater. "Ecological engineering", 35(5): 744-753.

Conkle, J., White, J., Metcalfe, C. (2008). Reduction of pharmaceutically active compounds by a lagoon wetland wastewater treatment system in Southeast Louisiana. "Chemosphere", 73: 1741-1748.

Crecelius, A., Clench, M. R., Richards, D. S., Parr, V. (2004). Quantitative determination of piroxicam by TLC-MALDI TOF MS. "Journal of pharmaceutical and biomedical analysis", 35(1): 31-39.

Dong, Z., Senn, D., Moran, R., Shine, J. (2013). Prioritizing environmental risk of prescription pharmaceuticals. "Regulatory toxicology and pharmacology", 65: 60-67.

Dordio, A., Carvalho, A. (2013). Organic xenobiotics removal in constructed wetlands, with emphasis on the importance of the support matrix. "Journal of Hazardous materials", 252: 272-292.

Dordio, A., Carvalho, A., Teixeira, D., Dias, C., Pinto, A. (2010). Removal of pharmaceuticals in microcosm constructed wetlands using *Typha* spp. and LECA. "Biosource technology", 101: 886-892

Dowling, G., Gallo, P., Fabbrocino, S., Serpe, L., Regan, L. (2008). Determination of ibuprofen, ketoprofen, diclofenac and phenylbutazone in bovine milk by gas chromatography-tandem mass spectrometry. "Food Additives and Contaminants", 25(12): 1497-1508.

Fernandes, J., Almeida, C., Pererira, A., Riebeiro, J., Reis, I., Carvalho, P., Basto, M., Mucha, A. (2015). Microbial community dynamics associated with veterinary

antibiotics removal in constructed wetlands microcosms. "Bioresource technology", 182: 26-33.

Fick, J., Söderström, H., Lindberg, R.H., Phan, C., Tysklind, M., Larsson, D.H.J. (2009). Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. "Environmental Toxicology and Chemistry", 12 (28): 2522-2527.

Gama porcino. (2014). Farmacología, animales de producción. Barcelona: Laboratorios Karizoo S.A.

Gao, P., Ding, Y., Li, H., Xagorarakis, I. (2012). Ocurrence of pharmaceutical in a municipal wastewater treatment plant: mass balance and removal processes. "Chemosphere", (88): 17-24.

García-Gil, G., Graniel-Castro, E. (2010). Geología. En "Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán", Durán R. y M. Méndez (Eds.). CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA. México. p4.

González, G., Ventura, R., Smith, A. K., de la Torre, R., Segura, J. (1996). Detection of non-steroidal anti-inflammatory drugs in equine plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry. "Journal of Chromatography A", 719(1): 251-264.

Gutiérrez, E., Acevedo, C., Aguilar, A., Ortega A. (2017). Consideraciones sobre la importancia del manejo del dolor y anestesia en animales de granja. "Bioagrociencias", 10(2): 21-29.

Hijosa-Valsero, M., Matamoros, V., Sidrach-Cardona, R., Martín-Villacorta, J., Bécares, E., Bayona, J. M. (2010). Comprehensive assessment of the design configuration of constructed wetlands for the removal of pharmaceuticals and personal care products from urban wastewaters. "Water research", 44(12): 3669-3678.

Hoogesteijn, A., Febles-Patrón J., Nava-Galindo, V. (2015). La contaminación fecal en cenotes de interés turístico y recreacional del estado de Yucatán. "Ingeniería", 19 (4): 169-175.

Hutchins, S., White, M., Hudson F., Fine, D. 2007. Analysis of lagoon samples from different concentrated animal feeding operations for estrogens and estrogen conjugates. "Environmental science & technology", 41(3): 738-744.

Isaacs, R. C., Harper, M. M., Miller, E. C. (2017). Analytical challenges in the confirmative identification of dipyrone as an adulterant in illicit drug samples. "Forensic science international", 270: 185-192.

Jean, J., Perrodin, Y., Pivot, C., Trepo, D., Perraud, M., Droguet, J., Tissot-Guerraz, F., Locher, F. (2012). Identification and prioritization of bioaccumulable pharmaceutical substances discharged in hospital effluent. "Journal of environmental management", 103: 113-121.

Kauffer, E., Villanueva, C. (2012). Retos de la gestión de una cuenca construida: la Península de Yucatán en México. "Revista del Programa Hidrológico Internacional para América Latina y el Caribe", 3(2): 81-91.

Kaczala F., Blum S. 2016. The occurrence of veterinery pharmaceuticals in the environment: a review. "Current analytical chemistry", 12(3): 169-182.

Koutsouba, V., Heberer, T., Fuhrmann, B., Schmidt-Baumler, K., Tsipi, D., Hiskia, A. (2003). Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography–mass spectrometry. "Chemosphere", 51(2): 69-75.

Kwasny, J., Kowalks, Z., Banach, M. (2011). Disposal methodsand treatment of waste from piggeries. "CHEMIK", 65(7):687-696.

Li, Y., Zhu, G., Ng, W. J., Tan, S. K. (2014). A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: design, performance and mechanism. "Science of the Total Environment", 468, 908-932.

Mainau, E., Temple, D., Manteca, X. (2016). Experimental study on the effect of oral meloxicam administration in sows on pre-weaning mortality and growth and immunoglobulin G transfer to piglets. "Preventive veterinary medicine", 126: 48-53.

Marchese, S., Perret, D., Gentili, A., Curini, R., Pastori, F. (2003). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in surface water and wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. "Chromatographia", 58(5-6): 263-269.

Masoner, J. R., Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Cozzarelli, I. M., Gray, J. L. (2016). Landfill leachate as a mirror of today's disposable society: pharmaceuticals and other contaminants of emerging concern in final leachate from landfills in the conterminous United States. "Environmental toxicology and chemistry", 35(4): 906-918.

Matamoros, V., García, J., Bayona, J. M. (2008). Organic micropollutant removal in a full-scale surface flow constructed wetland fed with secondary effluent. "Water research", 42(3): 653-660.

Méndez, R., Castillo, E., Vázquez, E., Briceño, O., Coronado, V., Pat, R., Garrido, P. (2009). Estimación del potencial contaminante de las granjas porcinas y avícolas del estado de Yucatán. "Ingeniería", 13(2):13-21.

Miao, X. S., Koenig, B. G., Metcalfe, C. D. (2002). Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. "Journal of chromatography A", 952(1-2): 139-147.

Nikolaou, A., Meric, S., Fatta, D. (2007). Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. "Analytical and Bioanalytical Chemistry", 387(1):1225–1234.

Pacheco-Castro, R., Pacheco-Ávila, J., Ye, M., Cabrera-Sansores, A. (2018). Groundwater quality: analysis of its temporal and spatial variability in a karst aquifer. "Groundwater", 56(1): 62-72.

Pedrouzo, M., Borrull, F., Pocurull, E., Marce, R. (2011). Presence of pharmaceuticals and hormones in waters from sewage treatment plants. "Water Air Soil Pollution", 21 (7): 267-281.

Peterson, M. E., Kutzler, M. (2010). Small Animal Pediatrics-E-Book: The First 12 Months of Life. "Elsevier Health Sciences".

Robles E., Ramírez E., Durán A., Martínez M. González, M. (2013). Calidad bacteriológica y fisicoquímica del agua del acuífero Tepalcingo-Axochiapan, Morelos, México. "Avances en Ciencias e Ingeniería", 4 (1): 19-28.

Rodayan, A., Afana, S., Segura, P.A., Sultana, T., Metcalfe, C.D., Yargeau, V. (2016). Linking drugs of abuse in wastewater to contamination of surface and drinking water. "Environmental Toxicology and Chemistry", 35 (4): 843–849.

Salem-Milani, A., Balaei-Gajan, E., Rahimi, S., Moosavi, Z., Abdollahi, A., Zakeri-Milani, P., Bolourian, M. (2013). Antibacterial effect of diclofenac sodium on *Enterococcus faecalis*. "Journal of dentistry", 10(1): 16-22.

Samaras, V., Stasinakis, A., Mamais, D., Thomaidis, N., Lekkas, T. (2013). Fate of selected pharmaceuticals and synthetic endocrine disrupting compounds during wastewater treatment and sludge anaerobic digestion. "Journal of hazardous materials", 244: 25-267.

Santibáñez S. D. R. (2014). Determinación de la cinética de degradación de diclofenaco, ibuprofeno y su mezcla, a temperatura ambiente. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de México, México.

Santos, L., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Deleurue-Matos, C., Pena, A., Barcelo, D., Montenegro, M. (2013). Contribution of hospital effluent to the load of pharmaceutical in urban wastewater: identification of ecologically relevant pharmaceuticals. "Science of the total environment", 461: 302-316.

Solís-Silván, R., López-Ocaña, G., Bautista-Margulis, R., Hernández-Barajas, J. Romellón-Cerino, M. (2016). Evaluación de humedales artificiales de flujo libre y

subsuperficial en la remoción de contaminantes de aguas residuales utilizando diferentes especies de vegetación macrófita. "Interciencia", 41: 40-47.

Speltini, A., Sturini, M., Maraschi, F., Profumo, A., Albini, A. (2012). Microwave-assisted extraction and determination of enrofloxacin and danofloxacin photo-transformation products in soil. "Analytical and Bioanalytical Chemistry", 404: 1565-1569.

Sui, Q., Cao, X., Lu, S., Zhao, W., Qiu, Z., Yu, G. (2015). Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: a review. "Emerging Contaminants", 1(1): 14-24.

Talero-Pérez, Y., Medina, O., Rozo-Núñez, W. (2014). Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. "Universitas Scientarum", 19: 11-29.

Weber, K. (2016). Microbial community assessment in wetlands for water pollution control: Past, present, and future outlook. "Water", 8(11): 503.

Yan, Q., Zhang, Y.X., Kang, J., Gan, X.M., Xu-Y, P., Guo, J.S., Gao, X. (2015). A preliminary study on the occurrence of pharmaceutically active compounds in the river basins and their removal in two conventional drinking water treatment plants in Chongqing, China. "Clean-Soil, Air, Water", 43 (6): 794-803.

Yu, J.T, Bisceglia, K.J., Bouwer, E.J. (2012). Determination of pharmaceuticals and antiseptics in water by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry: analysis via pentafluorobenzoylation and stable isotope dilution. "Analytical and Bioanalytical Chemistry", 403 (1): 583-591.

Zhang, D. Q., Tan, S. K., Gersberg, R. M., Sadreddini, S., Zhu, J., Tuan, N. A. (2011). Removal of pharmaceutical compounds in tropical constructed wetlands. "Ecological Engineering", 37(3): 460-464.

Zyoud, S.H., Zyoud, S.H., Al-Jabi, S.W., Sweileh, W.M., Awang, R. (2016). Contribution of Arab countries to pharmaceutical wastewater literature: a

bibliometric and comparative analysis of research output. "Annals of Occupational and Environmental Medicine", 28(28):1-12.

10. ANEXOS

ANEXO I.. Resultados de los porcentajes de remoción de diclofenaco y flunixin.

Tratamiento	Tiempo (horas)- repetición	% de remoción diclofenaco	% de remoción flunixin
Arena	72-1	95.59	96.86
Arena	72-2	95.96	97.04
Arena	72-3	96.04	96.95
Grava	72-1	95.50	96.57
Grava	72-2	95.28	96.60
Grava	72-3	95.56	96.74
Mezcla	72-1	97.84	97.46
Mezcla	72-2	97.44	97.53
Mezcla	72-3	97.60	97.95
<i>Papiro arena</i>	72-1	96.73	98.07
<i>Papiro arena</i>	72-2	96.51	97.83
<i>Papiro arena</i>	72-3	96.80	97.90
<i>Papiro grava</i>	72-1	96.05	97.32
<i>Papiro grava</i>	72-2	96.26	97.44
<i>Papiro grava</i>	72-3	96.15	97.21
<i>Papiro mezcla</i>	72-1	98.25	98.11
<i>Papiro mezcla</i>	72-2	97.94	98.21
<i>Papiro mezcla</i>	72-3	97.76	98.36
<i>Typha arena</i>	72-1	97.35	98.00
<i>Typha arena</i>	72-2	97.76	98.09
<i>Typha arena</i>	72-3	97.55	98.17
<i>Typha grava</i>	72-1	97.31	97.93
<i>Typha grava</i>	72-2	97.26	97.72
<i>Typha grava</i>	72-3	97.33	97.97
<i>Typha mezcla</i>	72-1	98.47	98.65
<i>Typha mezcla</i>	72-2	98.19	98.47
<i>Typha mezcla</i>	72-3	98.64	98.42

ANEXO II. RESULTADOS ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE DICLOFENACO Y FLUNIXIN.

Diclofenaco					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TIEMPO	0.0374407	2	0.0187204	0.5	0.6219
B:PLANTA	9.51561	2	4.75781	128.17	0
C:SOPORTE	14.5001	2	7.25006	195.31	0
INTERACCIONES					
AB	0.0567933	4	0.0141983	0.38	0.8155
AC	0.22711	4	0.0567774	1.53	0.2818
BC	0.990379	4	0.247595	6.67	0.0115
RESIDUOS	0.296959	8	0.0371199		
TOTAL (CORREGIDO)	25.6244	26			
Flunixin					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TIEMPO	0.0388851	2	0.0194426	0.78	0.4887
B:PLANTA	5.51629	2	2.75815	111.25	0
C:SOPORTE	3.27994	2	1.63997	66.15	0
INTERACCIONES					
AB	0.0758339	4	0.0189585	0.76	0.5769
AC	0.0254368	4	0.00635921	0.26	0.8977
BC	0.245714	4	0.0614285	2.48	0.1279
RESIDUOS	0.198342	8	0.0247927		
TOTAL (CORREGIDO)	9.38044	26			